

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2024-197

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12Q 1/6827 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.10.2022**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.10.2021**
(32) Číslo prioritní přihlášky: **63/257,954**
(32) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **23.10.2024**
(Věstník č. 43/2024)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2022/079299**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2023/067110**

- (71) Přihlašovatel:
TATAA BIOCENTER AB, Göteborg, SE
- (72) Původce:
Mikael Kubista, Göteborg, SE
Robert Sjöback, Göteborg, SE
- (74) Zástupce:
THK Legal s.r.o., Přístavní 531/24, 170 00 Praha 7,
Holešovice

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsoby a kompozice pro detekci
mutantních sekvencí nukleových kyselin**

(57) Anotace:
Popisují se způsoby a kompozice pro detekci
mutantních sekvencí nukleové kyseliny. V
některých případech zde používané způsoby a
kompozice využívají dvoustranný primer v
kombinaci s jedním nebo více kódujícími a
antikódujícími primery konfigurovanými tak, aby
hybridizovaly s konkrétními oblastmi
dvoustranného primeru za účelem umožnění
detekce mutantní sekvence s vysokou selektivitou.

Sekvence nukleotidů / aminokyselin dle ST.26:
<https://isdv.upv.gov.cz/doc/st26/PV2024-197.xml>
SHA-1: 3787be0e8fc39383086c1e686d16df885710f0f9

CZ 2024 - 197 A3

Způsoby a kompozice pro detekci mutantních sekvencí nukleových kyselin

ODKAZ

- 5 Tato přihláška nárokuje výhodu prozatímní přihlášky US č. 63/257,954, s názvem "ZPŮSOBY A KOMPOZICE PRO DETEKCI MUTANTNÍCH SEKVENCÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN", podané 20. října 2021, která je zde jako celek zahrnuta odkazem.

POZADÍ

10

Detekce mutantních sekvencí pomocí amplifikace sondy specifické pro templát v kombinaci s kvantitativními metodami, jako je např. kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR), gelová elektroforéza nebo kapilární elektroforéza se široce využívá pro genotypizaci pacientů pro diagnostické a klinické účely.

15

SHRNUTÍ

Stávající schémata pro detekci mutantních sekvencí pomocí amplifikace sondy specifické pro templát v kombinaci s kvantitativními metodami, jako je kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR), trpí nedostatkem specifity pro detekci mutantních sekvencí, zejména v přítomnosti sekvencí divokého typu, které neobsahují mutaci. Existuje potřeba navrhnout nové kompozice primerů a sond, které zlepšují selektivitu detekce mutantních sekvencí v přítomnosti sekvencí divokého typu.

25 V souladu s tím v některých provedeních současný popis poskytuje způsoby, kompozice, reakční směsi, soupravy a systémy pro zpracování sekvenční varianty za vzniku detekovatelného produktu s vysokou selektivitou. Takové metody, kompozice, reakční směsi, soupravy a systémy mohou být užitečné při neinvazivním prenatálním testování (NIPT), bezbuněčné analýze deoxyribonukleové kyseliny (DNA), genotypizaci pacienta (např. pro identifikaci nádoru nebo diagnostiku autoimunitních onemocnění), digitální polymerázová řetězová reakce (digitální PCR), kapková digitální PCR (ddPCR), přípravě vzorku sekvenováním nové generace (NGS) nebo detekci odmítnutí po transplantaci orgánu (např. v případě transplantace srdce, plic, ledvin nebo jater).

35 V některých aspektech předkládaný popis poskytuje způsob zpracování sekvence DNA, která má nebo je v podezření, že má sekvenční variantu vzhledem k sekvenci divokého typu, přičemž tento způsob zahrnuje: smíchání v reakční směsi vhodné pro zpracování sekvence DNA: (i) sekvence DNA, kde sekvence DNA obsahuje variaci alespoň jednoho nukleotidu vzhledem k sekvenci divokého typu; a (ii) primer vlásenky se smyčkou, který obsahuje: 5' hemisondovou sekvenci konfigurovanou tak, aby hybridizovala s komplementárním prvním koncovým úsekem DNA sekvence; sekvenci vlásenky se smyčkou; a 3' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí DNA sekvence, kde 3' koncová část 3' hemisondové sekvence obsahuje nukleotid komplementární k neshodám v párování, ale ne komplementární k divokému typu sekvence. V některých provedeních způsob dále zahrnuje inkubaci reakční směsi za podmínek vhodných k prodloužení produktu obsahujícího sekvenci 3' hemisondy. V některých provedeních způsob dále zahrnuje kombinování v reakční směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího 3' hemisondovou sekvenci: antikódující primer konfigurovaný tak, aby hybridizoval s genomovou oblastí 3' z nesprávného párování. V některých provedeních má antikódující primer T_m přibližně 50-70 stupňů Celsia. V některých provedeních způsob dále zahrnuje inkubaci reakční směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího sekvenci 3' hemisondy za podmínek vhodných pro produkci produktů prodloužení z antikódujícího primeru. V některých provedeních způsob dále zahrnuje smíchání v reakční směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru: produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru; a kódující primer nakonfigurovaný tak, aby hybridizoval s: (i) alespoň částí sekvence 5' hemisondy; a (ii) alespoň část stopky sekvence vlásenky se smyčkou. V některých provedeních kódující primer obsahuje alespoň přibližně 12 až přibližně 30 nukleotidů komplementárních k sekvenci 5' hemisondy. V

některých provedeních kódující primer obsahuje alespoň přibližně 9 až přibližně 35 nukleotidů komplementárních ke stopce sekvence vlásenky se smyčkou 3' k nukleotidům komplementárním k 5' sekvenci hemisondy. V některých provedeních má přímý primer T_m přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia. V některých provedeních způsob dále zahrnuje inkubaci reakční směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru za podmínek vhodných k 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

V některých aspektech předkládaný popis poskytuje soupravu pro zpracování sekvence DNA, která obsahuje: (a) primer vlásenky se smyčkou, který obsahuje: (i) sekvenci 5' hemisondy nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s komplementární první koncovou oblastí sekvence DNA; (ii) sekvence vlásenky se smyčkou; a (iii) 3' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí DNA sekvence; (b) kódující primer nakonfigurovaný pro hybridizaci s: (i) alespoň částí sekvence 5' hemisondy; a (ii) alespoň částí stopky sekvence vlásenky se smyčkou; a (c) antikódující primer nakonfigurovaný tak, aby hybridizoval s genomovou oblastí 3' z neshody. V některých provedeních sekvence DNA má nebo je v podezření, že má variaci alespoň jednoho nukleotidu vzhledem k sekvenci divokého typu. V některých provedeních obsahuje 3' terminální část 3' sekvence hemisondy nukleotid komplementární k variaci, ale ne komplementární k sekvenci divokého typu. V některých provedeních souprava dále obsahuje oligonukleotidovou sondu obsahující detekovatelnou skupinu, přičemž oligonukleotid je nakonfigurován tak, aby hybridizoval s alespoň částí primeru vlásenky se smyčkou. V některých provedeních alespoň část primeru vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část sekvence vlásenky se smyčkou. V některých provedeních alespoň část sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část sekvence smyčky v sekvenci vlásenky se smyčkou. V některých provedeních detekovatelná skupina obsahuje 5' fluorofor. V některých provedeních oligonukleotidová sonda obsahující detekovatelnou skupinu dále obsahuje zlášec. V některých provedeních má antikódující primer T_m přibližně 50 až 70 stupňů Celsia. V některých provedeních kódující primer obsahuje

alespoň přibližně 12 až přibližně 30 nukleotidů komplementárních k sekvenci 5' hemisondy. V některých provedeních přímý primer obsahuje alespoň přibližně 9 až přibližně 35 nukleotidů komplementárních ke stopce sekvence vlásenky se smyčkou 3' k nukleotidům komplementárním k 5' sekvenci hemisondy. V některých provedeních má přímý primer Tm přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia. V některých provedeních vlásenky se smyčkou amplifikuje mutantní polynukleotidovou sekvenci alespoň přibližně 10krát, alespoň přibližně 100krát, alespoň přibližně 1000krát, alespoň přibližně 10 000krát, alespoň přibližně 100 000krát, nebo alespoň přibližně 1 000 000krát přednostně oproti polynukleotidové sekvenci divokého typu. V některých provedeních obsahuje sekvence 5' hemisondy délku přibližně 7 až přibližně 22 nukleotidů. V některých provedeních obsahuje sekvence 3' hemisondy délku přibližně 3 až přibližně 9 nukleotidů. V některých provedeních má sekvence 3' hemisondy Tm přibližně 30 až 40 stupňů nebo sekvence 5' hemisondy má Tm přibližně 60 až 75 stupňů. V některých provedeních sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje délku přibližně 15 nukleotidů nebo více. V některých provedeních je sekvence vlásenky se smyčkou konfigurována tak, aby měla Tm přibližně 55 až přibližně 75 stupňů Celsia. V některých provedeních smyčka sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň přibližně 1 až alespoň přibližně 20 nukleotidů na délku. V některých provedeních smyčka sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje barkód. V některých provedeních primer vlásenky se smyčkou, kódující primer nebo antikódující primer obsahuje kteroukoli ze SEKV ID Č: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 64, 65, 66, 67, 68, 71 nebo 72. V některých aspektech předkládaný popis poskytuje kompozici pro zpracování sekvence DNA, která obsahuje: (a) primer se vlásenky se smyčkou, který obsahuje: (i) 5' hemisondovou sekvenci konfigurovanou tak, aby hybridizovala s komplementárním prvním koncovým úsekem DNA sekvence; (ii) sekvence vlásenky se smyčkou; a (iii) 3' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí DNA sekvence; (b) kódující primer konfigurovaný pro hybridizaci s: (i) alespoň částí sekvence 5' hemisondy; a (ii) alespoň část stopky sekvence vlásenky se smyčkou; a (c) antikódující primer nakonfigurovaný tak, aby hybridizoval s genomickou oblastí 3' od neshody, přičemž koncentrace kódujícího primeru nebo koncentrace antikódujícího primeru jsou alespoň 10krát vyšší než koncentrace primeru vlásenky se smyčkou. V některých provedeních sekvence DNA má nebo je v podezření, že má variaci alespoň jednoho nukleotidu vzhledem k sekvenci divokého typu. V některých provedeních sekvence 3' hemisondy obsahuje nukleotid komplementární k variaci, ale ne komplementární k sekvenci divokého typu. V některých provedeních kompozice dále obsahuje oligonukleotidovou sondu obsahující detekovatelnou skupinu, přičemž oligonukleotid je konfigurován tak, aby hybridizoval s alespoň částí primeru vlásenky se smyčkou. V některých provedeních alespoň část primeru vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část sekvence vlásenky se smyčkou. V některých provedeních alespoň část sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část sekvence smyčky v sekvenci vlásenky se smyčkou. V některých provedeních detekovatelná skupina obsahuje 5' fluorofor. V některých provedeních oligonukleotidová sonda obsahující detekovatelnou skupinu dále obsahuje zhášec. V některých provedeních jsou koncentrace kódujícího primeru nebo koncentrace antikódujícího primeru vyšší než nebo jsou alespoň přibližně 20násobné, alespoň přibližně 50násobné, alespoň přibližně 100násobné, alespoň přibližně 200násobné alespoň přibližně 500krát, alespoň přibližně 1000krát vyšší než koncentrace primeru vlásenky se smyčkou. V některých provedeních obsahuje 3' terminální část 3' sekvence hemisondy nukleotid komplementární k neshodám v párování, ale ne komplementární k sekvenci divokého typu. V některých provedeních má antikódující primer Tm přibližně 50-70 stupňů Celsia. V některých provedeních kódující primer obsahuje alespoň přibližně 12 až přibližně 30 nukleotidů komplementárních k sekvenci 5' hemisondy. V některých provedeních kódující primer obsahuje alespoň přibližně 9 až přibližně 35 nukleotidů komplementárních ke stopce sekvence vlásenky se smyčkou 3' k nukleotidům komplementárním k 5' sekvenci hemisondy. V některých provedeních má kódující primer Tm přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia. V některých provedeních primer vlásenky se smyčkou amplifikuje mutantní polynukleotidovou sekvenci alespoň přibližně 10krát, alespoň přibližně 100krát, alespoň přibližně 1000krát, alespoň přibližně 10 000krát, alespoň přibližně 100 000krát, nebo alespoň přibližně 1 000 000krát přednostně oproti polynukleotidové sekvenci divokého typu. V některých provedeních obsahuje sekvence 5' hemisondy délku přibližně 7 až přibližně 22 nukleotidů. V některých provedeních obsahuje sekvence 3' hemisondy délku

přibližně 3 až přibližně 9 nukleotidů. V některých provedeních má sekvence 3' hemisondy T_m přibližně 30 až 40 stupňů nebo sekvence 5' hemisondy má T_m přibližně 60 až 75 stupňů. V některých provedeních sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje délku přibližně 15 nukleotidů nebo více. V některých provedeních je sekvence vlásenky se smyčkou konfigurována tak, aby měla T_m přibližně 55 až přibližně 75 stupňů Celsia. V některých provedeních smyčka sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň přibližně 1 až alespoň přibližně 20 nukleotidů na délku. V některých provedeních smyčka sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje barkód. V některých provedeních kódující primer nebo antikódující primer obsahuje kteroukoli ze SEKV ID Č: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 57 59, 60, 61, 64, 65, 66, 67, 68, 71 nebo 72. V některých provedeních inkubace zahrnuje PCR reakci, qPCR reakci, dPCR reakci, ddPCR reakci nebo sekvenační reakci.

V některých aspektech předkládaný popis poskytuje způsob zpracování sekvence DNA, která má nebo je v podezření, že má methylovaný cytosin na konkrétním zbytku, přičemž způsob zahrnuje: smíchání v reakční směsi vhodné pro zpracování sekvence DNA: (i) sekvence DNA, kde sekvence DNA byla ošetřena bisulfitem a obsahuje uracil na cytosinovém zbytku, který byl před bisulfitovým ošetřením nemethylován; a (ii) první primer vlásenky se smyčkou, který obsahuje: 5' hemisondovou sekvenci konfigurovanou tak, aby hybridizovala s komplementární první koncovou oblastí DNA sekvence; sekvence vlásenky se smyčkou; a 3' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí DNA sekvence, kde 3' koncová část 3' hemisondové sekvence obsahuje nukleotid komplementární k uracilu, ale ne komplementární k cytosinovému zbytku. V některých provedeních způsob dále zahrnuje inkubaci reakční směsi za podmínek vhodných k prodloužení produktu obsahujícího sekvenci 3' hemisondy. V některých provedeních způsob dále zahrnuje kombinování v reakční směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího 3' hemisondovou sekvenci: antikódující primer konfigurovaný tak, aby hybridizoval s genomovou oblastí 3' z neshody. V některých provedeních má antikódující primer T_m přibližně 50 až 70 stupňů Celsia. V některých provedeních způsob dále zahrnuje inkubaci reakční směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího sekvenci 3' hemisondy za podmínek vhodných pro produkci produktů prodloužení z antikódujícího primeru. V některých provedeních způsob dále zahrnuje smíchání v reakční směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru: produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru; a kódující primer nakonfigurovaný tak, aby hybridizoval s: (i) alespoň částí sekvence 5' hemisondy; a (ii) alespoň část stopky sekvence vlásenky se smyčkou. V některých provedeních kódující primer obsahuje alespoň přibližně 12 až přibližně 30 nukleotidů komplementárních k 5' hemisondové sekvenci. V některých provedeních kódující primer obsahuje alespoň přibližně 9 až přibližně 35 nukleotidů komplementárních ke stonku sekvence vlásenky se smyčkou 3' k nukleotidům komplementárním k 5' hemisondové sekvenci. V některých provedeních má kódující primer T_m přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia. V některých provedeních způsob dále zahrnuje inkubaci reakční směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru za podmínek vhodných k produkci produktů prodloužení z kódujícího primeru. V některých provedeních způsob dále zahrnuje poskytnutí sekvence DNA. V některých provedeních způsob dále zahrnuje ošetření DNA sekvence bisulfitem před kombinováním. V některých provedeních inkubace zahrnuje PCR reakci, qPCR reakci, dPCR reakci, ddPCR reakci nebo sekvenační reakci.

Další aspekty a výhody předkládaného řešení budou odborníkům v tomto oboru snadno zřejmé z následujícího podrobného popisu, kde jsou ukázána a popsána pouze ilustrativní provedení předkládaného vynálezu. Bude porozuměno, že předkládaný vynález je schopen dalších a odlišných provedení a jeho různé detaily je možné modifikovat v různých zřejmých ohledech, aniž by došlo k odchýlení se od popisu. V souladu s tím je třeba výkresy a popis považovat za ilustrativní a nikoli za omezující.

ZAČLENĚNÉ ODKAZY

5 Všechny publikace, patenty a patentové přihlášky uvedené v této specifikaci jsou sem zahrnuty odkazem ve stejném rozsahu, jako kdyby každá jednotlivá publikace, patent nebo patentová přihláška byla konkrétně a individuálně označena jako zahrnutá odkazem.

BAREVNÉ VÝKRESY

10 Patentový spis nebo přihláška obsahuje alespoň jeden barevný výkres. Kopie tohoto patentu nebo zveřejnění patentové přihlášky s barevným výkresem (kresbami) poskytne Úřad na vyžádání a po zaplacení nezbytného poplatku.

STRUČNÝ POPIS VÝKRESŮ

15 Nové znaky vynálezu jsou konkrétně předloženy v připojených patentových nárocích. Lepšího porozumění rysům a výhodám tohoto vynálezu bude dosaženo odkazem na následující podrobný popis, který uvádí ilustrativní provedení, ve kterých jsou využity principy tohoto vynálezu, a připojené výkresy:

20 **OBRÁZEK 1 (OBR. 1)** zobrazuje příklad detekčního testu citlivého na mutanty s použitím primerů vlásenka se smyčkou podle některých provedení tohoto popisu. V tomto testu přítomnost mutantního zbytku v např. genomové DNA (zvýrazněna) umožňuje prodloužení 3' hemisondové oblasti primeru vlásenka se smyčkou v první prodlužovací reakci. Ve druhé fázi tohoto testu je prodloužený primer vlásenka se smyčkou kombinován s antikódujícím primerem, který se váže na 3' genomovou oblast 3' hemisondy ve druhé prodlužovací reakci, což umožňuje produkci druhého vlákna, které odpovídá primeru vlásenka se smyčkou obsahujícímu sekvenci antikódujícího primeru. Nakonec je produkt obsahující sekvenci antikódujícího primeru kombinován ve 3. prodlužovací reakci s kódujícím primerem pokrývajícím část 5' hemisondy a kmenových oblastí; 30 zahrnutí sondy vázající sekvenci 5' tohoto přímého primeru případně umožňuje detekci tohoto produktu např. qPCR.

OBRÁZEK 2 (OBR. 2) zobrazuje navržené podmínky (A) a křivky qPCR (B) pro optimalizační experiment popsáný v příkladu 1 pro detekci mutantu ACTN3. Spodní panel (B) ukazuje stopy pro 35 amplifikaci sekvencí obsahujících mutantní ACTN3 s ACTN3 mutantním detekčním primerem vlásenka se smyčkou; Horní panel (B) ukazuje graf RFU pro amplifikaci z mutantního detekčního primeru vlásenka se smyčkou pro reakce obsahující homozygotní sekvence WT, homozygotní mutanty a heterozygotní ACTN3, což ukazuje, že tyto 3 genotypy lze rozlišit pomocí PCR.

40 **Obr. 3 (obr. 3)** zobrazuje navržené podmínky (A) a křivky qPCR (B) pro optimalizační experiment popsáný v příkladu 1 pro detekci mutantu NRAS. Spodní panel (B) ukazuje stopy pro amplifikaci sekvencí obsahujících mutantní NRAS s primerem vlásenka se smyčkou detekujícím mutanty NRAS; Horní panel (B) ukazuje graf RFU pro amplifikaci z mutantního detekčního primeru vlásenka se smyčkou pro reakce obsahující homozygotní WT, homozygotní mutantní a 45 heterozygotní sekvence ACTN3, což ukazuje, že tyto 3 genotypy lze rozlišit pomocí PCR.

Obr. 4 (obr. 4) zobrazuje výsledky experimentu navrženého pro hodnocení selektivity primerů detekujících mutantní ACTN3 a NRAS detekujících primery vlásenka se smyčkou. (A) znázorňuje návrh reakce pro testy selektivity. Horní panel (B) zobrazuje hodnoty C_q pro sondy značené FAM (mutant) a sondy značené HEX (divokého typu), měřené v různých poměrech cílů (mutant/WT), jak je popsáno v (A) pro test ACTN3; Spodní panel (B) znázorňuje hodnoty C_q pro sondy značené FAM (mutantní) a HEX značené (divokého typu), měřené pro různé poměry cílů, jak je popsáno v (A) pro test NRAS.

OBRÁZEK 5 (OBR. 5) znázorňuje příklady digitálních PCR dat testů primerů vlásenka se smyčkou detekujících SNP ze dvou různých experimentů. Panely (A-C) znázorňují výsledky experimentu navrženého k posouzení citlivosti testu primeru vlásenka se smyčkou detekujícího mutant G12R KRAS na vzorcích s různými poměry WT/mutant cílový templát (mezi 0,05 % a 50 % poměr mutant k WT) na QIAcuity Digital PCR systém. Panel (A) znázorňuje numerická data z experimentu; panel (B) znázorňuje 1D amplitudové grafy a panel (C) znázorňuje příklady 2D amplitudových grafů ze stejného experimentu, což dokazuje, že jen velmi málo teček odpovídajících správné kategorii se chybně segreguje. Panel (D) znázorňuje výsledky ze sady experimentů navržených pro hodnocení funkce G12R KRAS mutantního stanovení primeru vlásenka se smyčkou na různých platformách dPCR. Zobrazené výsledky jsou 2D amplitudové grafy a zkrácené tabulky numerických výsledků ze stejného testu prováděného na vzorcích s 50% WT a 50% mutantní cílovou šablonou na třech různých platformách dPCR: QX200 Droplet Digital PCR System, Naica System pro Crystal Digital PCR a QIAcuity Digital PCR systém

OBRÁZEK 6 (OBR. 6) znázorňuje 2D amplifikační grafy pro pět různých testů detekujících vlásenka se smyčkou mutantů KRAS, všechny za použití stejných generických sekvencí vlásenky a komplementárních sond jako v příkladu 7.

OBRÁZEK 7 (OBR. 7) ukazuje 2D grafy amplitudy pro experiment znázorněný v tabulce 14 a příkladu 7.

OBRÁZEK 8 (OBR. 8) znázorňuje návrh primerů a methylační diskriminaci pro experiment popsáný v příkladu 8 pracující na sekvencích CORO6. Obrázek 8 panel A ukazuje schéma methylačně detekujícího 2T-primeru (CORO6-2T.M) navrženého pro cílení na gen CORO6, s hemisondami v černém textu (tučně/podtržené) a sekvencí vlásenka se smyčkou a rameny v tmavě šedých čarách, cílová sekvence černým textem, rozšířená sekvence 2T-primeru (šedým textem), sekvence antikódujícího a kódujícího primeru (černou kurzívou). Sonda (nezobrazena) se selektivně váže na komplement sekvence kmenové smyčky a ramena 2T-primeru. Cílová DNA má na původních cytosinových místech malá písmena, která se bisulfitovou úpravou mohou změnit na uracil (reprezentované na obrázku a v syntetických sekvencích DNA jako thyminy), zatímco methylovaná CpG místa mají šedé zvýraznění (které v nemethylované DNA mohou být zastoupen pomocí TG). Obrázek 8 panel B ukazuje alelickou diskriminační účinnost 2T-testu s použitím složek z panelu A v qPCR na syntetických gBlock sekvencích představujících methylovanou DNA, nemethylovanou DNA, smíšenou methylovanou/nemethylovanou DNA a kontrolu bez templátu (NTC).

OBRÁZEK 9 (OBR. 9) znázorňuje návrh primerů a methylační diskriminaci pro experiment popsáný v příkladu 9 pracující na sekvencích FAM101A. Obrázek 9 panel A ukazuje schéma 2T-primeru nedetekujícího metylaci pro detekci methylačního stavu genu FAM101A (FAM101A-2T.NM s hemisondami v černém textu (tučně/podtržené) a sekvencí vlásenka se smyčkou a rameny v tmavě šedých čarách, cílovou sekvencí v černém textu, sekvencí antikódujícího a kódujícího primeru (černou kurzívou) Sonda (není ukázána) se selektivně váže na komplement sekvence vlásenky se smyčkou a ramena 2T-primeru byla modifikována tak že původní „jediná“ cytosinová místa jsou reprezentována thyminem (protože bisulfitové ošetření může takové cytosiny přeměnit na uracily), zatímco původní CpG místa mají šedé zvýraznění (které v nemethylovaném templátu DNA a na obrázku jsou reprezentovány TG) Obrázek 9 panel B ukazuje alelickou diskriminaci 2T-testu v qPCR na syntetických sekvencích gBlock představujících methylovanou DNA, nemethylovanou DNA, smíšenou methylovanou/nemethylovanou DNA a kontrolu bez templátu (NTC). Při analizační teplotě přibližně 55-62 °C, test funguje robustně a je provedeno jasné rozlišení různých typů templátové DNA při zachování velmi nízkého falešně pozitivního a na FAM kanál (detekce methylované DNA) omezeného signálu.

OBRÁZEK 10 (OBR. 10) ukazuje výsledky bialelické diskriminace methylace CORO6 a FAM101A na běžných vzorcích. Obrázek 10 panel A zobrazuje výsledky alelické diskriminace qPCR při analýze methylačních/nemethylačních reprezentativních gBlocků genů CORO6 a

FAM101A, které byly synteticky vyrobeny (M.gB – methylovaný cíl; NM.gB – nemethylovaný cíl; Mix.gB – 50 /50 mix M/NM-gBlocks) spolu se dvěma unikátními bisulfitově upravenými (BST) vzorky DNA extrahovanými z bílých krvinek (WBC) a srdeční tkáň (40 ng DNA/reakce (před BST)). Primery CORO6 a FAM101A byly zkonstruovány jako v předchozích příkladech a qPCR pro detekci obou markerů byla provedena jako v předchozích příkladech. HEX fluorofor je signál pro methylovanou sekvenci CORO6 a nemethylovanou FAM101A. Jak předpovídá zdokumentované chování CORO6 a FAM101A, WBC vykazují signál v kanálu FAM, zatímco srdce ukazuje signál v kanálu HEX i FAM, což ukazuje, že oba testy mohou detekovat srdeční DNA na pozadí bílých krvinek (tzv. hlavní zdroj DNA v cfDNA). Obrázek 10 panel B znázorňuje výsledky, když vzorky popsané na obrázku 10 panel A byly analyzovány pomocí FAM101A 2T-testu pomocí digitální PCR (QIAcuity, Qiagen) místo qPCR. Vzorky srdce vykazují smíšený signál (FAM/HEX), zatímco WBC vykazují signál pro methylovanou DNA (FAM). NTC vykazují relativně vysokou fluorescenci pozadí v NTC, ale signál je omezen na kanál FAM a jako taková není ohrožena detekce signálu specifického pro srdce (HEX).

OBRÁZEK 11 (OBR. 11) znázorňuje výsledky experimentu genotypizace nezpracované krve z příkladu 11. Levý panel na obrázku 11 ukazuje duplicitní měření qPCR u homozygotů divokého typu (nahore), homozygotních mutantů (uprostřed) a heterozygotů (dole). Pravý panel ukazuje graf spojovací naměřená data na základě intenzity fluorescence jasně rozlišující duplikáty dvou homoduplexů a heteroduplexů. Graf na pravém panelu jasně ukazuje, že divoký typ, heterozygotní a mutantní mohou být odlišeni od plně surové krve bez dalších kroků čištění.

PODROBNÝ POPIS

25 *Definice*

Zde použitá terminologie slouží pouze k popisu konkrétních případů a není zamýšlena jako omezující. Jak se zde používá, tvary jednotného čísla „a“, „an“ a „the“ v původním textu v anglickém jazyce, mají zahrnovat také tvary v množném čísle, pokud z kontextu jasně nevyplývá něco jiného. Kromě toho, v rozsahu, v jakém jsou v podrobném popisu a/nebo nárocích použity výrazy „včetně“, „zahrnuje“, „mít“, „má“, „s“ nebo jejich varianty, jsou takové výrazy zamýšleny jako včetně způsobem podobným pojmu „zahrnující“.

Výraz „přibližně“ nebo „kolem“ obecně označuje množství, které je blízko řečeného množství o přibližně 10 %, 5 % nebo 1 %, včetně jeho přírůstků. Například „přibližně“ nebo „kolem“ může znamenat rozsah zahrnující konkrétní hodnotu a pohybující se od 10 % pod touto konkrétní hodnotou až po 10 % nad touto konkrétní hodnotou.

Praxe některých způsobů zde popsaných využívá, pokud není uvedeno jinak, techniky imunologie, biochemie, chemie, molekulární biologie, mikrobiologie, buněčné biologie, genomiky a rekombinantní DNA. Viz například Sambrook a Green, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4. vydání (2012); série *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds.); série *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc.), *PCR 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames a G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow a Lane, ed. (1988) *Protolátky, laboratorní příručka a kultura živočišných buněk: příručka základní techniky a specializovaných aplikací*, 6. vydání (R.I. Freshney, ed. (2010)) (které je zde celé zahrnuto odkazem).

Termíny "polynukleotid", "nukleová kyselina" a "oligonukleotid", jak se zde používají, obecně označují polymerní formu nukleotidů jakékoli délky, buď deoxyribonukleotidy nebo ribonukleotidy nebo jejich analogy. Polynukleotidy mohou mít jakoukoli trojrozměrnou strukturu a mohou vykonávat jakoukoli funkci, známou nebo neznámou. Následují neomezující příklady polynukleotidů: kódující nebo nekódující oblasti genu nebo genového fragmentu, intergenová DNA, lokusy (lokus) definované z vazebné analýzy, exony, introny, messenger RNA (mRNA), transferová RNA, ribozomální RNA, krátká interferující RNA (siRNA), krátká vlásenková RNA (shRNA), mikro-RNA (miRNA), malá nukleolární RNA, ribozymy, cDNA, rekombinantní

polynukleotidy, rozvětvené polynukleotidy, plazmidy, vektory, izolovaná DNA libovolné sekvence, izolovaná RNA jakákoli sekvence, sondy nukleové kyseliny, adaptéry a primery. Polynukleotid může obsahovat modifikované nukleotidy, jako jsou metylované nukleotidy a analogy nukleotidů. Pokud jsou přítomny, modifikace nukleotidové struktury mohou být provedeny před nebo po sestavení polymeru. Sekvence nukleotidů může být přerušena nenukleotidovými složkami. Polynukleotid může být dále modifikován po polymeraci, jako například konjugací se značící složkou, značkou, reaktivní skupinou nebo vazebným partnerem. Polynukleotidové sekvence, pokud jsou poskytnuty, jsou uvedeny ve směru 5' ke 3', pokud není uvedeno jinak.

"Hybridizuje" a "annealing", jak se zde používá, obecně označuje reakci, ve které jeden nebo více polynukleotidů interaguje za vzniku komplexu, který je stabilizován vodíkovou vazbou mezi bázemi nukleotidových zbytků. K vodíkové vazbě může dojít Watsonovým Crickovým párováním bází, Hoogsteinovou vazbou nebo jakýmkoli jiným sekvenčně citlivým nebo specifickým způsobem. Komplex může obsahovat dvě vlákna tvořící duplexní strukturu, tři nebo více vláken tvořících víceřetězcový komplex, jediné autohybridizující vlákno nebo jakoukoli jejich kombinaci. Hybridizační reakce může představovat krok v rozsáhlejší proces, jako je iniciace PCR nebo enzymatické štěpení polynukleotidu ribozymem. O první sekvenci, která může být stabilizována pomocí vodíkových vazeb s bázemi nukleotidových zbytků druhé sekvence, lze obecně říci, že je "hybridizovatelná" s druhou sekvencí. V takovém případě o druhé sekvenci lze také říci, že je hybridizovatelná s první sekvencí.

Termíny "komplement", "komplementary", "komplementární" a "komplementarita", jak se zde používají, obecně označují sekvenci, která plně doplňuje danou sekvenci a je s ní hybridizovatelná. V některých případech je první sekvence, která je hybridizovatelná s druhou sekvencí nebo sadou druhých sekvencí, specificky nebo selektivně hybridizovatelná s druhou sekvencí nebo sadou druhých sekvencí, takže se používá hybridizace s druhou sekvencí nebo sadou druhých sekvencí. Hybridizovatelné sekvence mohou sdílet určitý stupeň komplementarity sekvencí přes celou nebo část jejich příslušných délek, jako je komplementarita mezi 25 % až 100 %, včetně alespoň přibližně 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % a 100 % sekvenční komplementarita.

Jak se zde používá, termín "homologie" obecně odkazuje na nukleotid sekvence, která je homologní s referenční nukleotidovou sekvencí. Stupeň homologie a komplementarity se může lišit v souladu s danou aplikací a může být více než 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, nebo více než 95 %.

Jak se zde používá, výrazy „amplifikovat“, „amplifikovat“, „amplifikovat“, „amplifikace“ a „amplikon“ obecně označují jakýkoli způsob replikace nukleové kyseliny s použitím polymerázy závislé na primeru a/nebo produkty těchto procesů. V některých případech je amplifikace uskutečněna pomocí PCR s použitím páru primerů obsahujících první a druhý primer, jak je popsáno výše. Amplifikované produkty mohou být podrobeny subsekvenčním analýzám, včetně, aniž by byl výčet omezující, analýzy křivky tání, sekvenování nukleotidů, testu polymorfismu jednovláknové konformace, alelově specifické oligonukleotidové hybridizace, analýzy Southern blot a štěpení restrikční endonukleázou.

Amplifikační produkty mohou být detekovány použitím sondy. Jak se zde používá, termín "sonda" obecně označuje polynukleotid, který nese detekovatelný člen a má komplementaritu k cílové nukleové kyselině, takže je schopen hybridizovat s uvedeným cílem a být detekován uvedeným detekovatelným členem. V určitých provedeních může sonda zahrnovat Watsonovy-Crickovy báze nebo modifikované báze. Modifikované báze zahrnují, ale nejsou omezeny na, AEGIS báze popsané např. v U.S. č. 5,432,272; 5,965,364; a 6,001,983, z nichž každý je zde celý zahrnut jako odkaz. V určitých aspektech jsou báze spojeny přirozenou fosfodiesterovou vazbou nebo odlišnou chemickou vazbou. Různé chemické vazby zahrnují, ale nejsou omezeny na, peptidovou vazbu, LNA vazbu nebo fosforothioátovou vazbu.

Amplifikace může být provedena jakýmkoliv vhodným způsobem. Nukleové kyseliny mohou být amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), jak je popsáno například v U.S. č. 5,928,907 a 6,015,674, z nichž každý je zde uveden jako odkaz pro jakýkoli účel. Jiné způsoby amplifikace nukleové kyseliny mohou zahrnovat například ligázovou řetězovou reakci, test ligace oligonukleotidů a test hybridizace, jak je podrobněji popsáno v U.S. č. 5,928,907 a 6,015,674, z nichž každý je zde zahrnut odkazem ve své úplnosti. Metody mohou zahrnovat optické detekční systémy v reálném čase popsané podrobněji například v U.S. č. 5,928,907 a 6,015,674, které jsou zde zahrnuty odkazem. Další způsoby amplifikace, které lze použít podle některých způsobů podle tohoto vynálezu, zahrnují způsoby popsané v U.S. č. 5,242,794; 5,494,810; 4,988,617; a 6,582,938, z nichž každý je zde zahrnut jako celek.

Příklady provedení

V některých aspektech předkládaný popis poskytuje způsob zpracování sekvence nukleové kyseliny. V některých případech má sekvence nebo je v podezření, že má sekvenční variaci vzhledem k sekvenci divokého typu. V některých případech sekvence nukleové kyseliny obsahuje DNA. Sekvence nukleové kyseliny může obsahovat v podstatě jakýkoli typ sekvence. V některých případech sekvence, která má nebo je v podezření, že má mutaci obsahující dvouvláknovou DNA, jako je genomová DNA. V některých případech sekvence která má nebo je v podezření, že má mutaci obsahuje genovou oblast, jako je otevřený čtecí rámec, exon, intron nebo sestřihové spojení. V některých případech sekvence která má nebo je v podezření, že má obsahuje intergenovou oblast, jako je oblast promotoru, zesilovače nebo izolátoru. V některých případech sekvence, která má nebo je v podezření, že má obsahuje oblast konkrétního genu, jako je oblast genu RAS (např. KRAS, NRAS, HRAS) nebo oblast genu ACTN3.

V některých provedeních způsob zahrnuje: smíchání v reakční směsi vhodné pro zpracování sekvence nukleové kyseliny: (i) sekvence nukleové kyseliny, kde sekvence nukleové kyseliny obsahuje neshodu alespoň jednoho nukleotidu vzhledem k divokému posloupnost typů; a (ii) primer vlásenka se smyčkou. V některých provedeních zpracování zahrnuje amplifikaci a zahrnuje přidání pomocných enzymů (např. polymeráz), dNTP, pufrů nebo chemických stabilizátorů (např. DMSO, DTT, mannitol, betain) nezbytných k provedení amplifikační reakce. V některých provedeních primer vlásenka se smyčkou obsahuje: 5' hemisondovou sekvenci konfigurovanou tak, aby hybridizovala s komplementární první koncovou oblastí sekvence nukleové kyseliny; se sekvencí vlásenky se smyčkou; a s 3' hemisondovou sekvencí. V některých provedeních je 3' hemisondová sekvence konfigurována tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí sekvence nukleové kyseliny. V některých provedeních 3' terminální část 3' hemisondová sekvence obsahuje nukleotid komplementární k neshodám v párování, ale ne komplementární k sekvenci divokého typu. V některých provedeních způsob dále zahrnuje inkubaci reakční směsi za podmínek vhodných k prodloužení produktu obsahujícího 3' hemisondové sekvenci. V některých provedeních způsob dále zahrnuje kombinování v reakční směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího 3' hemisondovou sekvenci: antikódující primer konfigurovaný tak, aby hybridizoval s genomovou oblastí 3' z nesprávného párování. V některých provedeních jsou v uvedené reakční směsi uvedeny antikódující a kódující primer v přebytku nebo jsou v alespoň přibližně 20násobně, v alespoň přibližně 50násobně, v alespoň přibližně 100násobně, v alespoň přibližně 200násobně, v alespoň přibližně 500násobně, v alespoň přibližně 1000násobně vyšší koncentraci, než je koncentrace uvedeného dvoustranného primeru. V některých provedeních je v uvedené reakční směsi koncentrace uvedeného dvoustranného primeru vyšší než nebo je v alespoň přibližně 20násobně, v alespoň přibližně 50násobně, v alespoň přibližně 100násobně, v alespoň přibližně 200násobně, v alespoň přibližně 500násobně, v alespoň přibližně 1000násobně vyšší koncentraci, než je koncentrace uvedené sekvence DNA. V některých provedeních má antikódující primer T_m alespoň přibližně 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66 nebo 68 stupňů Celsia. V některých provedeních má antikódující primer T_m nejvýše přibližně 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 nebo 70 stupňů Celsia. V některých provedeních má antikódující primer T_m přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia. V některých provedeních způsob dále zahrnuje inkubaci reakční směsi vhodné pro zpracování

produktu obsahujícího 3' hemisondovou sekvenci za podmínek vhodných pro produkci produktu
 prodloužení z antikódujícího primeru. V některých provedeních způsob dále zahrnuje smíchání v
 reakční směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru:
 produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru; a kódující primer nakonfigurovaný tak,
 5 aby hybridizoval s: (i) alespoň částí sekvence 5' hemisondové sekvence; nebo (ii) alespoň část
 kmene ze sekvence vlásenky se smyčkou. V některých provedeních kódující primer obsahuje
 alespoň přibližně 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 nebo 29 nukleotidů
 na nejvíce asi 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 nebo 30 nukleotidů
 komplementárních k 5' hemisondové sekvenci. V některých provedeních kódující primer obsahuje
 10 alespoň přibližně 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30,
 31, 32, 33 nebo 34 nanejvýš asi 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,
 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 nebo 35 nukleotidů komplementárních ke stopce sekvence vlásenky se
 smyčkou 3' k nukleotidům komplementárním k 5' hemisondové sekvence. V některých
 15 provedeních má kódující primer T_m alespoň přibližně 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66 nebo 68
 stupňů Celsia. V některých provedeních má kódující primer T_m nejvýše přibližně 52, 54, 56, 58,
 60, 62, 64, 66, 68 nebo 70 stupňů Celsia. V některých provedeních má kódující primer T_m přibližně
 50 až přibližně 70 stupňů Celsia. V některých provedeních způsob dále zahrnuje inkubaci reakční
 směsi vhodné pro zpracování produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru za podmínek
 vhodných k produkci produktu prodloužení z kódujícího primeru. V některých provedeních primer
 20 vlásenky se smyčkou amplifikuje mutantní polynukleotidovou sekvenci alespoň přibližně 10krát,
 alespoň přibližně 100krát, alespoň přibližně 1000krát, alespoň přibližně 10 000krát, alespoň
 přibližně 100 000krát, nebo alespoň přibližně 1 000 000krát přednostně oproti polynukleotidové
 sekvenci divokého typu. V některých provedeních mutantní polynukleotidová sekvence nebo
 polynukleotidová sekvence divokého typu obsahuje genomovou DNA. V některých provedeních
 25 5' hemisondové sekvence obsahuje alespoň přibližně 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,
 20, 21 nebo 22 až nanejvýš přibližně 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 nebo 22
 nukleotidů na délku. V některých provedeních 3' hemisondové sekvence obsahuje alespoň
 přibližně 3, 4, 5, 6, 7 nebo 8 nukleotidů až nanejvýš přibližně 4, 5, 6, 7, 8 nebo 9 nukleotidů na
 30 délku. V některých provedeních má 3' hemisondová sekvence T_m alespoň přibližně 30, 31, 32, 33,
 34, 35, 36, 37, 38 nebo 39 stupňů Celsia až nanejvýš přibližně 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39
 nebo 40 stupňů Celsia. V některých provedeních má 5' hemisondová sekvence T_m alespoň
 přibližně 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 nebo 74 stupňů Celsia do nejvíce asi
 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 nebo 75 stupňů Celsia. V některých provedeních
 sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje přibližně 5, 8, 10, 12 nebo 15 nukleotidů na délku nebo
 35 více. V některých provedeních je sekvence vlásenky se smyčkou nakonfigurována tak, aby měla
 T_m alespoň přibližně 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 nebo 72 stupňů Celsia až nanejvýš přibližně
 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 nebo 75 stupňů Celsia. V některých provedeních smyčka sekvence
 vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň přibližně 1 až alespoň přibližně 20 nukleotidů na délku. V
 40 některých provedeních smyčka sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje barkód. V některých
 provedeních uvedená reakční směs vhodná pro zpracování uvedeného produktu obsahujícího
 sekvenci antikódujícího primeru za podmínek vhodných k produkci produktu prodloužení z
 uvedeného kódujícího primeru dále obsahuje oligonukleotidovou sondu obsahující detekovatelnou
 skupinu, přičemž uvedená oligonukleotidová sonda je nakonfigurována tak, aby hybridizovala s
 komplementem alespoň část uvedeného primeru vlásenky se smyčkou. V některých provedeních
 45 uvedená oligonukleotidová sonda obsahuje sekvenci homologní s alespoň částí uvedeného primeru
 vlásenka se smyčkou. V některých provedeních uvedená alespoň část uvedeného primeru vlásenka
 se smyčkou obsahuje alespoň část uvedené vlásenky se smyčkou. V některých provedeních
 uvedená alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část sekvence
 smyčky v uvedené sekvenci vlásenky se smyčkou. V některých provedeních uvedená
 50 detekovatelná skupina obsahuje fluorofor. V některých provedeních je fluoroforem 5'-fluorofor. V
 některých provedeních uvedená oligonukleotidová sonda obsahující uvedenou detekovatelnou
 skupinu dále obsahuje zhášec. V některých provedeních uvedeným zhášecem je 3' zhášec. V
 některých provedeních je uvedeným inhibítorem vnitřní zhášec (např. připojený k vnitřnímu
 zbytku nebo nukleotidu uvedené oligonukleotidové sondy). V některých provedeních uvedená
 55 sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje nesprávné párování ve stonku uvedené sekvence vlásenky

se smyčkou. V některém provedení uvedená sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň 1, alespoň 2, alespoň 3, alespoň 4, alespoň 5 nebo alespoň 6 neshod v párování ve kmeni uvedené sekvence vlásenky se smyčkou. V některých případech je stopka uvedené vlásenky se smyčkou je konfigurována tak, aby měl T_m mezi 50 a 70 stupni Celsia. V některých případech uvedená kmenová smyčka obsahuje alespoň přibližně 40 až alespoň přibližně 70 nukleotidů. V některých provedeních primeru vlásenky se smyčkou, kódující primer nebo antikódující primer obsahuje kteroukoli ze SEKV ID Č: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 64, 65, 66, 67, 68, 71 nebo 72.

V některých případech uvedený způsob zahrnuje kombinování v uvedené reakční směsi vhodné pro zpracování sekvence nukleové kyseliny množství různých kmenů - primery vlásenky se smyčkou obsahující 5' nebo 3' oblasti se specificitou pro různé sekvence DNA. V některých případech, při použití většího počtu různých primerů vlásenky se smyčkou obsahujících 5' nebo 3' oblasti se specificitou pro různé sekvence DNA, může takové složení umožnit detekci více různých sekvencí DNA bez jedinečných molekulárních identifikátorů nebo UMI. (např. detekci různých délek vlásenek se smyčkou začleněných do primerů vlásenky se smyčkou).

V některých aspektech předkládaný popis poskytuje soupravu pro zpracování sekvence nukleové kyseliny, která má nebo je v podezření z toho, že má mutaci ve vztahu k sekvenci divokého typu. V některých provedeních souprava obsahuje (a) primer vlásenky se smyčkou, který obsahuje: (i) 5' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s komplementární první koncovou oblastí sekvence nukleové kyseliny; (ii) sekvenci vlásenky se smyčkou; a (iii) 3' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí sekvence nukleové kyseliny, kde 3' koncová část 3' hemisondové sekvence obsahuje nukleotid komplementární k neshodám v párování, ale ne komplementární k sekvenci divokého typu; (b) kódující primer konfigurovaný pro hybridizaci s: (i) alespoň částí 5' hemisondové sekvence; a (ii) alespoň částí stopky sekvence vlásenky se smyčkou; a (c) antikódující primer konfigurovaný tak, aby hybridizoval s genomovou oblastí 3' z neshod v párování. V některých provedeních souprava dále obsahuje oligonukleotidovou sondu obsahující detekovatelnou skupinu, přičemž uvedený oligonukleotid je konfigurován tak, aby hybridizoval s alespoň částí uvedeného primeru vlásenky se smyčkou. V některých provedeních uvedená alespoň část uvedeného primeru vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou. V některých provedeních uvedená alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část sekvence smyčky v uvedené sekvenci vlásenky se smyčkou. V některých provedeních uvedená detekovatelná skupina obsahuje 5' fluorofor. V některých provedeních uvedená oligonukleotidová sonda obsahující uvedenou detekovatelnou skupinu dále obsahuje zhášec. V některých provedeních uvedeným zhášecem je 3' zhášec. V některých provedeních uvedeným inhibítorem je vnitřní inhibitor (např. spojený s vnitřním zbytkem nebo nukleotidem uvedené oligonukleotidové sondy). V některých provedeních uvedená sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje neshodu v párování ve stopce uvedené sekvence vlásenky se smyčkou. V některém provedení uvedená sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň 1, alespoň 2, alespoň 3, alespoň 4, alespoň 5 nebo alespoň 6 neshod v párování ve stopce uvedené sekvence vlásenky se smyčkou. V některých případech je stopka uvedené vlásenky se smyčkou konfigurována tak, aby měla T_m alespoň přibližně 50 až alespoň přibližně 70 stupňů Celsia. V některých případech uvedená vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň přibližně 40 až alespoň přibližně 70 nukleotidů. V některých případech uvedená souprava obsahuje množství různých primerů vlásenky se smyčkou obsahujících 5' nebo 3' oblasti se specificitou pro různé sekvence DNA. V některých případech při použití většího počtu různých primerů vlásenky se smyčkou obsahujících 5' nebo 3' oblasti se specificitou pro různé sekvence DNA, může takové složení umožnit detekci více různých sekvencí DNA bez jedinečných molekulárních identifikátorů nebo UMI. (např. detekci různých délek vlásenek se smyčkou začleněných do primerů vlásenky se smyčkou). V některých provedeních má antikódující primer T_m přibližně 50 až 70 stupňů Celsia. V některých provedeních kódující primer obsahuje alespoň přibližně 12 až přibližně 30 nukleotidů komplementárních k sekvenci 5' hemisondy. V některých provedeních kódující primer obsahuje alespoň přibližně 9 až přibližně 35 nukleotidů

komplementárních ke stopce vlásenky se smyčkou sekvence 3' k nukleotidům komplementárním k 5' hemisondové sekvenci. V některých provedeních má kódující primer Tm přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia. V některých provedeních primer vlásenky se smyčkou amplifikuje mutantní polynukleotidovou sekvenci alespoň přibližně 10krát, alespoň přibližně 100krát, alespoň přibližně 1000krát, alespoň přibližně 10 000krát, alespoň přibližně 100 000krát, nebo alespoň přibližně 1 000 000krát přednostně oproti polynukleotidové sekvenci divokého typu. V některých provedeních obsahuje 5' hemisondová sekvence délku přibližně 7 až přibližně 22 nukleotidů. V některých provedeních obsahuje 3' hemisondová sekvence délku přibližně 3 až přibližně 9 nukleotidů. V některých provedeních má 3' hemisondová sekvence Tm přibližně 30-40 stupňů nebo 5' hemisondová sekvence má Tm přibližně 60 až 75 stupňů. V některých provedeních sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje délku přibližně 15 nukleotidů nebo více. V některých provedeních je sekvence vlásenky se smyčkou konfigurována tak, aby měla Tm přibližně 55 až přibližně 75 stupňů Celsia. V některých provedeních smyčka sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň přibližně 1 až alespoň přibližně 20 nukleotidů na délku. V některých provedeních smyčka sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje barkód. V některých provedeních primer vlásenky se smyčkou, kódující primer nebo antikódující primer obsahuje kteroukoli ze SEKV ID Č: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 64, 65, 66, 67, 68, 71 nebo 72.

V některých aspektech předkládaný popis poskytuje kompozici pro zpracování sekvence nukleové kyseliny, která má nebo je v podezření z toho, že má mutaci vzhledem k sekvenci divokého typu, obsahující: (a) primer vlásenky se smyčkou, který obsahuje: (i) 5' hemisondovou sekvenci konfigurovanou tak, aby hybridizovala s komplementární první koncovou oblastí sekvence nukleové kyseliny; (ii) sekvenci vlásenky se smyčkou; a (iii) 3' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí sekvence nukleové kyseliny; (b) kódující primer konfigurovaný pro hybridizaci s: (i) alespoň částí 5' hemisondové sekvence; a (ii) alespoň část stopky sekvence vlásenky se smyčkou; a (c) antikódující primer nakonfigurovaný tak, aby hybridizoval s genomovou oblastí 3' od neshody, přičemž koncentrace kódujícího primeru nebo koncentrace antikódujícího primeru jsou alespoň 10krát vyšší než koncentrace primeru vlásenky se smyčkou. V některých provedeních uvedená kompozice dále obsahuje oligonukleotidovou sondu obsahující detekovatelnou skupinu, přičemž uvedený oligonukleotid je konfigurován tak, aby hybridizoval s alespoň částí uvedeného primeru vlásenky se smyčkou. V některých provedeních uvedená alespoň část uvedeného primeru vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou. V některých provedeních uvedená alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část sekvence smyčky v uvedené sekvenci vlásenky se smyčkou. V některých provedeních uvedená detekovatelná skupina obsahuje 5' fluorofor. V některých provedeních uvedená oligonukleotidová sonda obsahující uvedenou detekovatelnou skupinu dále obsahuje zhášeč. V některých provedeních je uvedeným zhášečem je 3' zhášeč. V některých provedeních je uvedeným inhibítorem vnitřní inhibitor (např. spojený s vnitřním zbytkem nebo nukleotidem uvedené oligonukleotidové sondy). V některých provedeních uvedená sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje neshody v párování ve stopce uvedené sekvence vlásenky se smyčkou. V některém provedení uvedená sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň 1, alespoň 2, alespoň 3, alespoň 4, alespoň 5 nebo alespoň 6 neshod v párování ve stopce uvedené sekvence vlásenky se smyčkou. V některých případech je stopka uvedené vlásenky se smyčkou konfigurována tak, aby měla Tm mezi 50 a 70 stupni Celsia. V některých případech uvedená vlásenka se smyčkou obsahuje alespoň přibližně 40 až alespoň přibližně 70 nukleotidů. V některých případech uvedená kompozice obsahuje velké množství různých primerů vlásenky se smyčkou obsahujících 5' nebo 3' oblasti se specificitou pro různé sekvence DNA. V některých případech, při použití většího počtu různých primerů vlásenky se smyčkou obsahujících 5' nebo 3' oblasti se specificitou pro různé sekvence DNA, může takové složení umožnit detekci více různých sekvencí DNA bez jedinečných molekulárních identifikátorů nebo UMI. (např. detekci různých délek vlásenek se smyčkou začleněných do primerů vlásenek se smyčkou). V některých provedeních jsou koncentrace kódujícího primeru nebo koncentrace antikódujícího primeru alespoň přibližně 20násobně, alespoň přibližně 50násobně, alespoň přibližně 100násobně, alespoň přibližně 200násobně, alespoň přibližně 500násobně, alespoň asi 1000násobně vyšší než je

koncentrace primeru vlásenky se smyčkou. V některých provedeních obsahuje 3' terminální část 3' hemisondové sekvence nukleotid komplementární k neshodám v párování, ale ne komplementární k sekvenci divokého typu. V některých provedeních má antikódující primer T_m přibližně 50 až 70 stupňů Celsia. V některých provedeních kódující primer obsahuje alespoň přibližně 12 až přibližně 30 nukleotidů komplementárních k sekvenci 5' hemisondy. V některých provedeních kódující primer obsahuje alespoň přibližně 9 až přibližně 35 nukleotidů komplementárních ke stopce sekvence vlásenky se smyčkou 3' k nukleotidům komplementárním k 5' hemisondové sekvenci. V některých provedeních má kódující primer T_m přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia. V některých provedeních primer vlásenky se smyčkou amplifikuje mutantní polynukleotidovou sekvenci alespoň přibližně 10krát, alespoň přibližně 100krát, alespoň přibližně 1000krát, alespoň přibližně 10 000krát, alespoň přibližně 100 000krát, nebo alespoň přibližně 1 000 000krát přednostně oproti polynukleotidové sekvenci divokého typu. V některých provedeních obsahuje 5' hemisondová sekvence délku přibližně 7 až přibližně 22 nukleotidů. V některých provedeních obsahuje 3' hemisondová sekvence délku přibližně 3 až přibližně 9 nukleotidů. V některých provedeních má 3' hemisondová sekvence T_m přibližně 30 až 40 stupňů nebo 5' hemisondová sekvence má T_m přibližně 60 až 75 stupňů. V některých provedeních sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje délku přibližně 15 nukleotidů nebo více. V některých provedeních je sekvence vlásenky se smyčkou konfigurována tak, aby měla T_m přibližně 55 až přibližně 75 stupňů Celsia. V některých provedeních smyčka sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň přibližně 1 až alespoň přibližně 20 nukleotidů na délku. V některých provedeních smyčka sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje barkód. V některých provedeních primer vlásenky se smyčkou, kódující primer nebo antikódující primer obsahuje kteroukoli ze SEKV ID Č: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 64, 65, 66, 67, 68, 71 nebo 728 nebo kterákoli ze sekvencí popsanych v tabulce 1.

Tabulka 1: Sekvence zde popsanych složek primeru nebo oligonukleotidu

SEKV ID Č:	NÁZEV	SEKVENCE (DNA)
1	2T- ACTN3_Mut_05- 2	CAGCCTCGGGCAGTGTTCCTTTTACGAAATGTTGGTACAGTGA GTACCAATATGAGGACCATTGCTCTCA
2	2T- ACTN3_WT_05- 2	CAGCCTCGGGCAGTGTTCCTTTTACGAAATGCAGGTACAGTTG GTACCTGTCTCCACCTCGCTCTCG
3	2T_ACTN3_Rv_0 3	TGACAGCGCACGATCA
4	2T_ACTN3_Fw_ 03	CAGTGTTGCCTTTTACGAAAT
5	2T- NRAS Mut_01	GAGTACAGTGCCATGAGAGACTTACGAAATGCAGGTACAGTTGG TACCTGTCTCCACCAGCTGGACG
6	2T- NRAS WT_01	GAGTACAGTGCCATGAGAGACTTACGAAATGTTGGTACAGTGAG TACCAATATGAGGACCATCAGCTGGACA
7	2T_NRAS_Rv_01	GCAAATACACAGAGGAAGCC

SEKV ID Č.:	NÁZEV	SEKVENCE (DNA)
8	2T_NRAS_Fw_0 1	TGCCATGAGAGACTTACGAAAT
9	2T WT primer (příklad 3)	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGT ACCAATATGAGGACCATCTACGCCACC
10	2T Mut primer (příklad 3)	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGT ACCTGTCTCCACCTACGCCACG
11	WT sonda (příklad 3)	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
12	Mut sonda (příklad 3)	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
13	Kódující primer (příklad 3)	CCTGCTGAAAATGACTGAA
14	Antikódující primer (příklad 3)	CCAAC TACCACAAGTTTATTTAC
15	2T WT primer (příklad 4)	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGT ACCAATATGAGGACCATCTACGCCACC
16	2T Mut primer (KRAS 29T) (příklad 4)	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGT ACCTGTCTCCACCTACGCCACA
17	WT sonda (příklad 4)	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
18	Mut sonda (KRAS 29T) (příklad 4)	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
19	Kódující primer (příklad 4)	CCTGCTGAAAATGACTGAA

SEKV ID Č.:	NÁZEV	SEKVENCE (DNA)
20	Antikódující primer (příklad 4)	CCAAC TACCACAAGTTTATTTAC
21	obecná WT detekce sekvence vlásenky se smyčkou (příklad 5)	TTACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
22	Obecná mutantní detekce sekvence vlásenky se smyčkou (příklad 5)	TTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
23	2T WT primer KRAS 29T	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGT ACCAATATGAGGACCATCTACGCCACC
24	2T Mut primer KRAS 29T	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGT ACCTGTCTCCACCTACGCCACA
25	WT sonda KRAS 29T	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
26	Mut sonda KRAS 29T	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
27	Kódující primer KRAS 29T	CCTGCTGAAAATGACTGAA
28	Antikódující primer KRAS 29T	CCAAC TACCACAAGTTTATTTAC

SEKV ID Č:	NÁZEV	SEKVENCE (DNA)
29	<i>2T WT primer KRAS 29C</i>	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGT ACCAATATGAGGACCATCTACGCCACC
30	<i>2T Mut primer KRAS 29C</i>	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGT ACCTGTCTCCACCTACGCCACG
31	<i>WT sonda KRAS 29C</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
32	<i>Mut sonda KRAS 29C</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
33	<i>Kódující primer KRAS 29C</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
34	<i>Antikódující primer KRAS 29C</i>	CCAAC TACCACAAGTTTATTTAC
35	<i>2T WT primer KRAS 29A</i>	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGT ACCAATATGAGGACCATCTACGCCACC
36	<i>2T Mut primer KRAS 29A</i>	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGT ACCTGTCTCCACCTACGCCACT
37	<i>WT sonda KRAS 29A</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
38	<i>Mut sonda KRAS 29A</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
39	<i>Kódující primer KRAS 29A</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
40	<i>Antikódující primer KRAS 29A</i>	CCAAC TACCACAAGTTTATTTAC

SEKV ID Č:	NÁZEV	SEKVENCE (DNA)
41	<i>2T WT primer KRAS 30T</i>	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGT ACCAATATGAGGACCATCTACGCCACC
42	<i>2T Mut primer KRAS 30T</i>	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGT ACCTGTCTCCACCTACGCCAA
43	<i>WT sonda KRAS 30T</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
44	<i>Mut sonda KRAS 30T</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
45	<i>Kódující primer KRAS 30T</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
46	<i>Antikódující primer KRAS 30T</i>	CCAAC TACCACAAGTTTATTTAC
47	<i>2T WT primer (KRAS 30C)</i>	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGT ACCAATATGAGGACCATCTACGCCACC
48	<i>2T Mut primer (KRAS 30C)</i>	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGT ACCTGTCTCCACCTACGCCAG
49	<i>WT sonda (KRAS 30C)</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
50	<i>Mut sonda (KRAS 30C)</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
51	<i>Kódující primer (KRAS 30C)</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
52	<i>Antikódující primer (KRAS 30C)</i>	CCAAC TACCACAAGTTTATTTAC

SEKV ID Č.:	NÁZEV	SEKVENCE (DNA)
53	CORO6.2T-M	AATCTCCCCTAAACTCCAATTACGAAATGTACTAGCGGCAAGCTA GTGCTAGACTTGACACCGCTAAAACGACG
54	CORO6.2T-NM	AATCTCCCCTAAACTCCAATTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTAC CTGTCTCCACCCTCCACTAAAACAACA
55	2T-Universal HEX (methylační) sonda	TACTAGCGGCAAGCTAGTGCTAGACTT
56	2T-Universal FAM (ne-methylační) sonda	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
57	CORO6.F	CCCTAAACTCCAATTACGAAATG
58	CORO6.R-M	CGCGGGAGATTAGAAATTTTGG
59	CORO6.R-NM	TGTGGGAGATTAGAAATTTTGG
60	FAM101A.2T-M	ATCGCAAATAAAAACCGAACATTTTCCTTACGAAATCCAGGTACAG TTGGTACCTGTCTCCACCCAACGCACGATAAAACG
61	FAM101A.2T- NM	ATCACAAATAAAAACCAACATTTTCCTTACGAAATCTACTAGCGG CAAGCTAGTGCTAGACTTCAACAACACACAATAAAAACA
62	2T-Universal HEX (non-methylační) sonda	TACTAGCGGCAAGCTAGTGCTAGACTT
63	2T-Universal FAM (methylační) sonda	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC

SEKV ID Č.:	NÁZEV	SEKVENCE (DNA)
64	FAM101A.F-M	CCGAACATTTTCCTTACGAAATC
65	FAM101A.F-NM	AACCAAACATTTTCCTTACGAAATC
66	FAM101A.R	GAAAAGTGTAGGTTTTATAGGTAGA
67	<i>2T-primer mutace faktoru V („Leiden“)</i>	GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTATTACGAAATGCAGGTACA GTTGGTACCTGTCTCCACCTGGACAGGCA
68	<i>Faktor V WT 2T- primer</i>	GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTATTACGAAATGTTGGTACA GTGAGTACCAATATGAGGACCATCGGACAGGCG
69	<i>sonda WT faktoru V</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
70	<i>Sonda mutančního (leidenská mutace) faktoru V</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
71	<i>faktor V kódujícího primeru</i>	AGGTATTTTGTCTTGAAGTATTACG
72	<i>faktor antikódujícího primeru</i>	CTAACATGTTCTAGCCAGAAGAA

- 5 V některých případech může být RT reakce a/nebo DNA amplifikační reakce (např. PCR) provedena v kapkách, například kapkovou digitální PCR. Zde použité kapky mohou zahrnovat emulzní kompozice (nebo směsi dvou nebo více nemísitelných kapalin), jak se popisuje v patentu US č. 7,622,280. Kapky mohou být generovány zařízeními popsány ve WO/2010/036352.
- 10 Termín emulze, jak se zde používá, může označovat směs nemísitelných kapalin (jako je olej a voda). Emulze v olejové fázi a/nebo voda v oleji umožňují rozdělení reakčních směsí do vodních kapek. Emulze mohou obsahovat vodné kapky v kontinuální olejové fázi. Zde poskytnuté emulze mohou být emulze typu olej ve vodě, kde kapky mohou být kapky oleje v kontinuální vodné fázi. V některých případech jsou kapky uspořádány tak, aby se zabránilo míšení mezi oddíly, přičemž každý oddíl chrání svůj obsah před odpařováním a splnutím s obsahem jiných oddílů.

Rozdělení vzorku do malých reakčních objemů (např. pro kapkovou digitální PCR) může umožnit použití sníženého množství činidel, čímž se sníží materiálové náklady na analýzu. Snížení složitosti vzorku rozdělením také zlepšuje dynamický rozsah detekce, protože molekuly s vyšším výskytem jsou odděleny od molekul s nízkým výskytem v různých odděleních, což umožňuje molekulám s nižším výskytem větší proporcionalní přístup k reakčním činidlům, což zase zlepšuje detekci molekul s nižším výskytem.

Kapky mohou být generovány s průměrným průměrem přibližně, menší než, alespoň nebo více než 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 180, 200, 300, 400 nebo 500 mikronů. Kapky mohou mít průměrný průměr přibližně 0,001 až přibližně 500, přibližně 0,01 až přibližně 500, přibližně 0,1 až přibližně 500, přibližně 0,1 až přibližně 100, přibližně 0,01 až přibližně 100 nebo přibližně 1 až přibližně 100 mikronů. Mikrofluidní způsoby výroby emulzních kapek pomocí mikrokanálové fokusace s příčným tokem nebo fyzikálního míchání mohou produkovat buď monodisperzní nebo polydisperzní emulze. Kapky mohou být monodisperzní kapky. Kapky mohou být generovány tak, že se velikost kapek nemění o více než plus nebo minus 5 % průměrné velikosti kapek. V některých případech mohou být kapky generovány tak, že se velikost kapek nemění o více než plus nebo minus 2 % průměrné velikosti kapek. Generátor kapek může generovat populaci kapek z jednoho vzorku, přičemž velikost žádné z kapek se neliší o více než plus nebo minus asi 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % nebo 10 % průměrné velikosti celkové populace kapek.

Kapka může být vytvořena protékáním olejové fáze vodným vzorkem. Vodná fáze může obsahovat pufrovaný roztok a činidla pro provádění PCR reakce, včetně nukleotidů, primerů, sondy (sond) pro fluorescenční detekci, templátových nukleových kyselin, enzymu DNA polymerázy a případně enzymu reverzní transkriptázy.

Vodná fáze může obsahovat pufrovaný roztok a činidla pro provádění PCR reakce bez kuliček v pevné fázi, jako jsou magnetické kuličky.

Ve vodné fázi lze použít nespecifické blokovací činidlo, jako je BSA nebo želatina z hovězí kůže, přičemž želatina nebo BSA jsou přítomny v koncentračním rozmezí přibližně 0,1 až přibližně 0,9 % hmotn./obj. Další možná blokující činidla mohou zahrnovat betalaktoglobulin, kasein, sušené mléko nebo jiná běžná blokující činidla. V některých případech jsou koncentrace BSA a želatiny asi 0,1 % hmotn./obj.

V některých případech může vodná fáze také obsahovat aditiva včetně, ale bez omezení na ně, nespecifických nespecifické základní/blokující nukleové kyseliny (např. DNA lososího spermatu), biokonzervačních látek (např. azid sodný), zesilovačů PCR (např. betain, trehalóza, atd.) a inhibitorů (např. inhibitory RNázy).

V některých případech se do vodné fáze přidává neiontový blokový kopolymer ethylenoxid/propylenoxid v koncentraci přibližně 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %) nebo 1,0 %). Běžné biosurfaktanty mohou zahrnovat neiontové povrchově aktivní látky, jako je Pluronic F-68, Tetronics, Zonyl FSN.

Olejová fáze může obsahovat fluorovaný základní olej, který může být dodatečně stabilizován kombinací s fluorovaným povrchově aktivním činidlem, jako je perfluorovaný polyether. V některých případech může být základním olejem jeden nebo více z HFE 7500, FC-40, FC-43, FC-70 nebo jiný běžný fluorovaný olej.

Olejová fáze může dále obsahovat aditivum pro ladění vlastností oleje, jako jsou tlak par nebo viskozita nebo povrchové napětí. Neomezující příklady zahrnují perfluoroktanol a 1H,1H,2H,2H-perfluorodekanol.

V některých případech mohou být kapky emulze generovány pomocí komerčně dostupného generátoru kapek, jako je Bio-Rad QX100™ Droplet Generator. RT a kapková PCR mohou být prováděny za použití komerčně dostupného a kapka je analyzována za použití komerčně dostupné čtečky kapek, jako je generátor, jako je Bio-Rad QX100™ Droplet Reader.

V některých případech se krok amplifikace provádí prováděním digitální PCR, jako je digitální PCR na bázi mikrofluidů nebo kapkové digitální PCR.

V některých případech se digitální PCR provádí v kapkách, které mají objem mezi přibližně 1 pl a přibližně 100 nl.

V některých případech může tvorba kapek zahrnovat zavedení zapouzdřujících barviv, jako jsou fluorescenční molekuly, do kapek, například se známou koncentrací barviv, kde jsou kapky suspendovány v nemísitelné nosné tekutině, jako je olej, za vzniku emulze.

Příklady fluorescenčních barviv, která lze použít s jakýmikoli způsoby podle současného popisu, zahrnují derivát fluoresceinu, jako je karboxyfluorescein (FAM) a barvivo PULSAR 650 (derivát Ru(bpy)₃). FAM má relativně malý Stokesův posun, zatímco barvivo Pulsar® 650 má velmi velký Stokesův posun. Barvivo FAM i PULSAR 650 lze excitovat světlem přibližně 460-480 nm. FAM vyzařuje světlo s maximem asi 520 nm (a ne v podstatě při 650 nm), zatímco barvivo PULSAR 650 emituje světlo s maximem asi 650 nm (a ne v podstatě při 520 nm).

Karboxyfluorescein může být v sondě například spárován s barvivem BLACK HOLE Quencher™ 1 a barvivo PULSAR 650 lze spárovat v sondě například s barvivem BLACK HOLE.

Barvivo Quencher™ 2. Fluorescenční barviva například zahrnují, ale nejsou omezeny na DAPI, 5-FAM, 6-FAM, 5(6)-FAM, 5-ROX, 6-ROX, 5,6-ROX, 5-TAMRA, 6-TAMRA, 5(6)-TAMRA SYBR, TET, JOE, VIC, HEX, R6G, Cy3, NED, Cy3.5, Texas Red, Cy5 a Cy5.5.

Zde poskytnuté způsoby jsou vhodné pro použití s technikou digitální analýzy. Digitální analýza může být digitální polymerázová řetězová reakce (digitální PCR, DigitalPCR, dPCR nebo dePCR). dPCR může být kapková dPCR (ddPCR).

V některých případech způsoby zahrnují použití kapkové dPCR (ddPCR), kde je dosaženo extrémně vysoké úrovně zvýšení citlivosti pomocí odstranění templátu pozadí prostřednictvím rozdělení s vlastní citlivostí poskytnutou zde poskytnutým systémem s horkým startem pro amplifikaci primeru. Například u hromadných PCR reakcí je citlivost přibližně 1/100 až 1/10 000 včetně, nebo např. 1/100 až 1/1 000, jak je definováno jako mutant/ (mutant + divoký typ). Při použití ddPCR se tato citlivost projevuje v každém oddílu, jako například u 20 000 kapek je citlivost přibližně 1/1 000 až 1/100 000 včetně.

Obecně může dPCR zahrnovat prostorovou izolaci (nebo rozdělení) jednotlivých polynukleotidů ze vzorku a provedení polymerázové řetězové reakce na každém rozdělení. Přepážka může být např. jamka (např. jamky mikrotitrační destičky), kapilára, dispergovaná fáze emulze, komora (např. komora v řadě miniaturizovaných komor), kapka nebo vazba nukleové kyseliny. povrch. Vzorek může být distribuován tak, že každý oddíl má 0 nebo 1 polynukleotid. Po PCR amplifikaci lze vyčísřit počet oddílů s nebo bez produktu PCR. Celkový počet oddílů může být přibližně, alespoň nebo více než 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10,000, 11,000, 12,000, 13,000, 14,000, 15,000, 16,000, 17,000, 18,000, 19,000, 20,000, 30,000, 40,000, 50,000, 60,000, 70,000, 80,000, 90,000, 100,000, 150,000, 200,000, 500,000, 750,000, 1,000,000, 2,500,000, 5,000,000, 7,500,000, 10,000,000, 25,000,000, 50,000,000, 75,000,000 nebo 100,000,000. Pozitivní a negativní kapky lze spočítat.

V některých případech může být detekováno méně než 0,00001, 0,00005, 0,00010, 0,00050, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9 nebo 10 kopií cílového polynukleotidu. V některých případech lze detekovat méně než asi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 nebo 500 kopií cílového polynukleotidu. V některých případech mohou být zde popsané kapky generovány rychlostí vyšší než 1, 2, 3, 4, 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2500, 5000, 10 000, 25 000, 50 000, 75 000, 100 000, 250 000, 500 000 nebo 1 000 000 kapek za sekundu. V některých případech mohou být zde popsané kapky generovány rychlostí přibližně 1 až přibližně 10, přibližně 10 až přibližně 100, přibližně 100 až přibližně 1000, přibližně 1000 až přibližně 10 000, přibližně 10 000 až přibližně 100 000 nebo přibližně 100 000 až přibližně 1 000 000 kapek za sekundu.

Ve způsobech podle tohoto popisu může být použito integrované, rychlé, průtokové zařízení tepelného cyklovače. Viz např. mezinárodní přihláška č. PCT/US2009/005317, podaná 23.9.2009. V takovém integrovaném zařízení je kapilára navinuta kolem válce, který udržuje 2, 3 nebo 4 teplotní zóny. Když kapky protékají kapilárou, jsou vystaveny různým teplotním zónám, aby se dosáhlo tepelného cyklování. Malý objem každé kapky má za následek extrémně rychlý teplotní přechod při vstupu kapky do každé teplotní zóny.

Digitální PCR zařízení pro použití se zde popsanými způsoby, kompozicemi a soupravami může detekovat více signálů (viz např. PCT publikace č. WO2012109500A2, která je zde v celém rozsahu zahrnuta odkazem).

V některých způsobech podle tohoto popisu je detekce DNA amplifikací tzv. metodami „amplifikací v reálném čase“ také známými jako kvantitativní PCR (qPCR) nebo Taqman. Základ pro tento způsob monitorování tvorby produktu amplifikace vytvořeného během PCR reakce s templátem s použitím oligonukleotidových sond/oligo specifických pro oblast templátu, která má být detekována. V některých provedeních jsou qPCR nebo Taqman použity bezprostředně po reakci reverzní transkriptázy provedené na izolované buněčné mRNA; tento druh slouží ke kvantifikaci hladin jednotlivých mRNA během qPCR.

Taqman používá duálně značenou fluorogenní oligonukleotidovou sondu. Duálně značená fluorogenní sonda používaná v takových testech je typicky krátký (cca 20-25 bází) polynukleotid, který je značen dvěma různými fluorescenčními barvivy. 5' konec sondy je typicky připojen k reportérovému barvivu a 3' konec je připojen ke zhášecímu barvivu. Ať se bere ohled na značení nebo ne, qPCR sonda je navržena tak, aby měla alespoň podstatnou sekvenční komplementaritu s místem na cílové mRNA nebo odvozené nukleové kyselině. Upstream a downstream PCR primery, které se vážou na lemující oblasti lokusu, jsou také přidány do reakční směsi. Když je sonda neporušená, dochází k přenosu energie mezi dvěma fluorofory a zhášecí zhasí emisi z reportéru. Během extenzní fáze PCR je sonda štěpena 5' nukleázovou aktivitou polymerázy nukleové kyseliny, jako je Taq polymeráza, čímž se uvolní reportér od polynukleotidového zhášecí a výsledkem je zvýšení reportérové emisní intenzity, což se může měřit pomocí vhodného detektoru. Zaznamenané hodnoty pak mohou být použity k výpočtu nárůstu normalizované reportérové emisní intenzity na kontinuálním základě a nakonec kvantifikovat množství amplifikované mRNA. Hladiny mRNA mohou být také měřeny bez amplifikace hybridizací se sondou, například s použitím sondy s rozvětvenou nukleovou kyselinou, jako je QuantiGene® Reagent System od Panomics. Tento formát testu je zvláště užitečný pro multiplexní detekci více genů z reakce jednoho vzorku, protože každý pár fluorofor/zhášecí připojený k jednotlivé sondě může být spektrálně ortogonální k ostatním sondám použitým v reakci, takže více sond (každá směřovaná proti odlišnému genovému produktu) mohou být detekovány během amplifikační/detekční reakce.

qPCR lze také provést bez duálně značené fluorogenní sondy s použitím fluorescenčního barviva (např. SYBR Green) specifického pro dsDNA, které odráží akumulaci dsDNA amplifikovaných specifických upstream a downstream oligonukleotidových primerů. Nárůst fluorescence během

amplifikační reakce je sledován kontinuálně a může být použit pro určení množství amplifikované mRNA.

5 V některých provedeních se pro qPCR nebo Taqman detekci provádí krok „předamplifikace“ na cDNA transkribované z buněčné RNA před kvantitativně monitorovanou PCR reakcí. To slouží ke zvýšení signálu v podmínkách, kdy je přirozená hladina RNA/cDNA, která má být detekována, velmi nízká. Vhodné způsoby předamplifikace zahrnují, ale nejsou omezená LM-PCR, PCR s náhodnými oligonukleotidovými primery (např. náhodná hexamerní PCR), PCR s poly-A specifickými primery a jakákoli jejich kombinace.

10 V některých provedeních se pro detekci qPCR nebo Taqman nejprve provede krok RT-PCR, aby se vytvořila cDNA z buněčné RNA. Taková amplifikace pomocí RT-PCR může být buď obecná (např. amplifikace s částečně/zcela degenerovanými oligonukleotidovými primery) nebo cílená (např. amplifikace s oligonukleotidovými primery zaměřenými proti specifickým genům, které 15 mají být analyzovány v pozdějším kroku).

V některých případech může kterýkoli ze zde popsaných způsobů dále zahrnovat provedení sekvenačního testu na extenzi, amplifikaci nebo zpracování produktů vyrobených podle kteréhokoli ze zde popsaných způsobů. Sekvenační test může zahrnovat (i) sekvenování exomu, 20 (ii) sekvenování panelu genů, (iii) sekvenování celého genomu, (iv) sekvenování syntézou za použití chemie reverzibilních terminátorů, (v) pyrosekvenování, (vi) sekvenování nanopórů, (vii) sekvenování jedné molekuly v reálném čase, (viii) Sangerovo sekvenování nebo jakákoli jejich kombinace. Sekvenování lze provádět různými v současnosti dostupnými systémy, jako je, bez omezení, sekvenační systém od Illumina®, Pacific Biosciences (PacBio®), Oxford Nanopore® 25 nebo Life Technologies (Ion Torrent®) nebo jiné technologie „sekvenování nové generace“.

PŘÍKLADY

30 **Příklad 1.** – Optimalizace koncentrace primeru pro testy ACTN3 a NRAS mutantního primeru vlásenky se smyčkou qPCR

Pro nalezení optimální koncentrace primerů vlásenky se smyčkou byly hodnoceny různé koncentrace od 10 nM do 200 nM primerů. Různé koncentrace primerů byly hodnoceny na 100 % divokého typu, 100 % mutantu, 50 % divokého typu / 50 % mutantu, na genomové DNA a na 35 negativní kontrole. Návrhy pro ACTN3 a NRAS v tabulce 1 byly posuzovány samostatně. Reakce obsahovala 400 nM kódujících a antikódujících primerů, 5 - 25 nM mutantních primerů a primerů divokého typu vlásenky se smyčkou a 200 nM mutantních a standardních sond. qPCR probíhala při 95 °C po dobu 60 sekund, následovalo 45 cyklů po 5 sekundách při 95 °C a 30 sekundách při 95 °C. Pro lepší vizualizaci dat byla všem negativním vzorkům přiřazena hodnota Cq 45. Data byla 40 vyhodnocena naměřeným rozdílem mezi hodnotami Cq pro testy divokého typu a testy mutantů (ACq) a rozptylovými grafy hodnot koncového bodu fluorescence. Výsledky tohoto experimentu jsou uvedeny na OBRÁZKU 2 a OBRÁZKU 3.

45 **Příklad 2.-** Hodnocení selektivity ACTN3 a NRAS mutantních primerů vlásenky se smyčkou qPCR testů

Pro vyhodnocení citlivosti a specifčnosti návrhů byly vyhodnoceny různé poměry mutantní gBlock DNA oproti DNA divokého typu při konstantním celkovém množství gBlock DNA. Pro srovnání byla rovněž zahrnuta 100 % genomová DNA divokého typu, 100 % mutantní genomová 50 DNA a negativní kontrola. Návrhy pro ACTN3 a NRAS v tabulce 1 byly posuzovány samostatně. Reakce obsahovala 400 nM kódujících a antikódujících primerů, 25 nM mutantních primerů a primerů vlásenky se smyčkou divokého typu a 200 nM mutantních a standardních sond. qPCR probíhala při 95 °C po dobu 60 sekund, následovalo 45 cyklů po 5 sekundách při 95 °C a 30 sekundách při 95 °C. Pro lepší vizualizaci dat byla všem negativním vzorkům přiřazena hodnota 55 Cq 45. Výsledky tohoto experimentu jsou uvedeny na OBRÁZKU 4.

Příklad 3.- Detekce vzácné sekvenční varianty KRAS pro mutaci KRAS G12R**Reagencie/Postup**

5

Pro cílový test byly zkonstruovány syntetické templáty pro divoký typ (WT) KRAS a mutantní KRAS (KRAS G12R) (gBlocks™, zakázkově objednané od IDT), jeden obsahující sekvenci WT a jeden obsahující mutantní (KRAS G12R) sekvenci. Tyto dva templáty byly smíchány v různých poměrech, aby se simulovaly různé frekvence mutací. Frekvence simulovaných mutací byly: 50 %
10 %, 5 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % a 0,05 % mutantů.

10

Podíl WT a mutantní DNA v každé směsi byl hodnocen pomocí dPCR s použitím návrhů primerů a schémat amplifikace, jak je zde popsáno podle obrázku 1 (viz tabulka 2). Každá dPCR reakce byla 40 µl a obsahovala 10 µl QIAcuity Sonda Mastermix, 800 nM dopředný primer, 800 nMantikódující primer, 400 nM sondu WT (HEX), 400 nM Mut sondu (FAM), 50 nM WT TwoTail primer, 50 nM primer Mutant/0106 kopie syntetický templát (celková koncentrace mutantu a templátu WT ve vzorku, koncentrace jednotlivých templátů se u jednotlivých vzorků liší na základě frekvence simulované mutace)

15

20 Tabulka 2: Návrhy primerů použité v příkladu 3

<i>název</i>	sekvence (DNA)
<i>2T WT primer</i>	CTCCA ACTACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATCTACGCCACC
<i>2T Mut primer</i>	CTCCA ACTACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACCTACGCCACG
<i>WT sonda</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
<i>Mut sonda</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
<i>Kódující primer</i>	CCTGTCTGAAAATGACTGAA
<i>Antikódující primer</i>	CCA ACTACCACAAGTTTATTTAC

25

Reakce dPCR byly vloženy do QIAcuity Nanoplate 26K a cyklovány na QIAcuity Digital PCR System za následujících podmínek: 3 minuty při 95 °C, 45 cyklů, z nichž každý zahrmoval 15 sekundovou denaturaci při 95 °C následovanou 55 °C prodloužení na 30 sekund. Akvizice obrazu byla provedena v kanálu FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí QIAcuity Software Suite za použití manuálního prahování.

30

Výsledek

30

OBRÁZEK 5 znázorňuje příklady digitálních PCR dat testů primerů vlásenky se smyčkou detekujících SNP ze dvou různých experimentů. Panely (A-C) a tabulka 3 níže zobrazují výsledky experimentu navrženého k posouzení citlivosti testu primeru vlásenky se smyčkou detekujícího mutant G12R KRAS na vzorcích s různými poměry WT/mutantní cílový templát (mezi 0,05 % a 50 % poměr mutant k WT) na digitálním PCR systému QIAcuity. (A) zobrazuje číselná data z experimentu, která jsou reprodukována v tabulce 3 níže:

35

40 Tabulka 3: Výsledky dPCR na šablonách WT a KRAS s použitím návrhů primerů podle tohoto popisu

40

vzorek	test	reportér	koncentrace (kopie/μl)	CI (95%)	Přijaté oddíly	Pozitivní oddíly	Negativní oddíly	% detekovaných mutantů
50%	KRAS G12R	Mut	940,4	1,4%	25500	13722	11778	52,19%
		WT	861,5	1,5%	25500	12933	12567	
5%	KRAS G12R	Mut	86,5	4,6%	25480	1747	23733	4,84%
		WT	1701,2	1,1%	24333	18317	6016	
1,0%	KRAS G12R	Mut	16,1	10,7%	25486	335	25151	0,98%
		WT	1623,9	1,1%	25269	18612	6657	
0,5%	KRAS G12R	Mut	9,2	14,2%	25461	192	25269	0,55%
		WT	1654,2	1,1%	25461	18918	6543	
0,1%	KRAS G12R	Mut	2,3	28,3%	25475	49	25426	0,14%
		WT	1706,1	1,0%	25475	19202	6273	
0,05%	KRAS G12R	Mut	1,4	36,3%	25500	30	25470	0,08%
		WT	1730,5	1,0%	25500	19345	6155	

Příklad 4. - Detekce vzácné sekvenční varianty KRAS pro mutaci KRAS 29T

Po vyhodnocení schopnosti 2T designu podle obrázku 1 detekovat jedinou mutaci KRAS v příkladu 3 byla hodnocena výkonnost metody s různými platformami dPCR (QX200, Naica a QIAcuity).

Reagencie/Postup

- Amplifikační vzorky použité v experimentu obsahovaly syntetické templáty (gBlocks™, zakázkově objednané od IDT) pro mutanty (KRAS 29T) a WT KRAS. V experimentu byly použity dva templáty na jeden test, jeden obsahující sekvenci WT a jeden obsahující mutantní sekvenci pro cílový test.
- Pro platformu QX200:** Každá dPCR reakce byla 20 μl a obsahovala 10 μl ddPCR Supermix pro sondy (bez dUTP), 800 nM kódujícího primeru, 800 nM antikódujícího primeru, 400 nM sondy WT (HEX), 400 nM sondy Mut (FAM), 25 nM WT Two Tail primeru, 25 nM Mutant Two Tail primeru, 500 kopií/μl syntetického templátu WT a 500 kopií/μl syntetického templátu Mutant. Reakční směs dPCR byla vložena do generátoru kapek Bio-Rad QX100 spolu s olejem pro generování kapek pro sondy a podle pokynů výrobce byly vytvořeny kapky. Kapky byly přeneseny na 96jamkovou reakční destičku a tepelně utěsněny propíchnutelnou fólií. Utěsněná deska byla cyklována v termocykleru podle následujících podmínek: 4 minuty při 95 °C, 45 cyklů, z nichž každý zahrnoval 30sekundovou denaturaci při 94 °C následovanou prodloužením 53 °C po dobu 60 sekund a závěrečný krok 10 minut při 95 °C. Destička byla inkubována při 4 °C po dobu 1 hodiny před detekcí pomocí čtečky kapek QX200 v akvizičních kanálech FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí softwaru QuantaSoft™ Analysis Pro s použitím manuálního stanovení prahů.

Pro platformu Naica: Každá dPCR reakce byla 25 μ l a obsahovala 12,5 μ l TATAA Sonda Grandmaster Mix, 600 nM kódujícího primeru, 600 nM antikódujícího primeru, 400 nM sondy WT (HEX), 400 nM Mut sondy (FAM), 25 nM WT Two Tail primeru, 25 nM Mutant TwoTail primeru, 100nM fluoresceinu, 1000 kopií/ μ l syntetického templátu WT a 1000 kopií/ μ l syntetického templátu Mutant. Reakční směs dPCR byla vložena do čipu Sapphire a cyklována na cyklovací jednotce systému Naica podle následujících podmínek: 4 minuty při 95 °C, 45 cyklů, z nichž každý zahrnoval 10sekundovou denaturaci při 95 °C následovanou 55 °C prodloužení na 30 sekund. Safírový čip byl přenesen do čtecí jednotky systému Naica a detekován v kanálech FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí Naica Crystal Reader a Nacia Crystal Miner Software za použití manuálního stanovení prahové hodnoty.

Platforma QIAcuity: Každá reakce dPCR byla 40 μ l a obsahovala 10 μ l QIAcuity Sonda Mastermix, 800 nM kódujícího primeru, 800 nM antikódujícího primeru, 400 nM sondy WT (HEX), 400 nM sondy Mut (FAM), 25 nM WT Two Tail primeru, 25 nM Mutant Two Tail primeru a 800 kopií/ μ l syntetického templátu WT a 800 kopií/ μ l syntetického templátu Mutant. Reakční směs dPCR byla vložena do QIAcuity Nanoplate 26K a cyklována na QIAcuity Digital PCR System s následujícími podmínkami: 3 minuty při 95 °C, 45 cyklů, z nichž každý zahrnoval 15 sekundovou denaturaci při 95 °C s následnou extenzí při 56 °C po dobu 30 sekund. Akvizice obrazu byla provedena v kanálu FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí manuálního prahování QIAcuity Software Suite.

Tabulka 4: Návrhy primerů použité v příkladu 4

<i><u>název</u></i>	<u>sekvence (DNA)</u>
<i>2T WT primer</i>	CTCCA ACTACCACAAGTTTATTIACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACCA ATATGAGGACCATCTACGCCACC
<i>2T Mut primer (KRAS 29T)</i>	CTCCA ACTACCACAAGTTTATTIACGAAATGCAGGTACAGTTGGTACCT GTCTCCACCTACGCCACA
<i>WT sonda</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
<i>Mut sonda (KRAS 29T)</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
<i>Kódující primer</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
<i>Antikódující primer</i>	CCA ACTACCACAAGTTTATTIAC

Výsledky

Obrázek 5 panel (D) znázorňuje výsledky ze sady experimentů navržených pro hodnocení funkce testu primeru s kmenovou smyčkou detekujícího G12R KRAS na různých platformách dPCR. Zobrazené výsledky jsou 2D grafy amplitudy a zkrácené tabulky numerických výsledků ze stejného testu prováděného na vzorcích s 50 % WT a 50 % mutantního cílového templátu na třech různých platformách dPCR: QX200 Droplet Digital PCR System, Naica System for Crystal Digital PCR a QIAcuity Digital PCR systém. Jak je vidět z porovnání grafů a souvisejících dat, 2T návrhové schéma mělo podobný výkon mezi všemi třemi platformami.

Příklad 5.- Posouzení výkonnosti generických sekvencí s kmenovou smyčkou pro 2T primery

Po vyhodnocení užitečnosti 2T designu v jednom případě detekce WT/mutantní DNA byla vyhodnocena obecná výkonnost dvou různých sekvencí kmenové smyčky s řadou různých 5' a 3' hemisond (viz obr. 4 panel A). Pro detekci divokého typu byla použita generická 2T primerová sekvence 5'-hemisonda- TTACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC-3'hemisonda (SEKV ID Č: 21), zatímco generická sekvence primeru byla použita CCACC – 3'hemisonda (SEKV ID Č: 22). Byla provedena hodnocení pro detekci KRAS G12R a NRAS Q61R.

Reagencie/Postup

Pro detekci KRAS G12R byly provedeny postupy jako v příkladu 3 a primery byly popsány v příkladu 3.

Pro detekci NRAS Q61R obsahovaly vzorky NRAS pro amplifikaci syntetické templáty (gBlocksTM, objednané na zakázku od IDT). V experimentu byly použity dva templáty, jeden obsahující sekvenci WT a jeden obsahující mutantní sekvenci pro cílový test. Tyto dva templáty byly smíchány v různých poměrech, aby se simulovaly různé frekvence mutací. Frekvence simulovaných mutací byly: 50 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1,0 %, 0,5 % a 0,1 % mutantů.

Každá dPCR reakce byla 40 µl a obsahovala 10 µl QIAcuity Sonda Mastermix, 400 nM kódujícího primeru, 400 nM antikódujícího primeru, 200 nM sondy WT (HEX), 200 nM sondy Mut (FAM), 25 nM WT TwoTail primeru a 24nM 24nM Mutant TwoTail primeru a 2400 kopií/ µl syntetického templátu (celková koncentrace mutantního a WT templátu ve vzorku, koncentrace jednotlivých templátů se u každého vzorku liší v závislosti na frekvenci simulované mutace).

Reakční směs dPCR byla vložena do QIAcuity Nanoplate 26K a cyklována na QIAcuity Digital PCR System za následujících podmínek: 3 minuty při 95 °C, 45 cyklů, z nichž každý zahrnoval 15sekundovou denaturaci při 95 °C následovanou 60°C prodloužením na 30 sekund. Akvizice obrazu byla provedena v kanálu FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí QIAcuity Software Suite s použitím manuálního prahování.

Tabulka 5: Návrhy primerů použité v příkladu 5 pro detekci NRAS Q61R

<i>název</i>	<i>sekvence (DNA)</i>
<i>2T WT primer</i>	GAGTACAGTGCCATGAGAGACTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATCAGCTGGACA
<i>2T Mut primer</i>	GAGTACAGTGCCATGAGAGACTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACCAGCTGGACG
<i>WT sonda</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
<i>Mut sonda</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
<i>Kódující primer</i>	GCAAATACACAGAGGAAGCC
<i>Antikódující primer</i>	TGCCATGAGAGACTTACGAAAT

Výsledky

Pro detekci KRAS WT a mutantu jsou výsledky uvedeny v tabulce 6 níže
Tabulka 6: Detekce mutantu KRAS WT/G12R s generickými sekvencemi kmenové smyčky

vzorek	test	reportér	Koncentrace (kopie / μ l)	CI (95%)	Přijaté oddíly	Pozitivní oddíly	Negativní oddíly	% detekovaných mutantů
50%	KRAS G12R	Mut	940,4	1,4%	25500	13722	11778	52,19%
		WT	861,5	1,5%	25500	12933	12567	
5%	KRAS G12R	Mut	86,5	4,6%	25480	1747	23733	4,84%
		WT	1701,2	1,1%	24333	18317	6016	
1,0%	KRAS G12R	Mut	16,1	10,7%	25486	335	25151	0,98%
		WT	1623,9	1,1%	25269	18612	6657	
0,5%	KRAS G12R	Mut	9,2	14,2%	25461	192	25269	0,55%
		WT	1654,2	1,1%	25461	18918	6543	
0,1%	KRAS G12R	Mut	2,3	28,3%	25475	49	25426	0,14%
		WT	1706,1	1,0%	25475	19202	6273	
0,05%	KRAS G12R	Mut	1,4	36,3%	25500	30	25470	0,08%
		WT	1730,5	1,0%	25500	19345	6155	

Jak je vidět z výsledků v tabulce 6, % detekované mutanty bylo těsně zarovnáno (např. v rámci 10 %) s množstvím umístěným ve vzorku (srovnejte sloupce „vzorek“ a „% detekované mutanty“).

5 **Tabulka 7: Detekce NRAS WT/mutanta s generickými sekvencemi kmenové smyčky**

vzorek	test	reportér	Koncentrace (kopie / μ l)	CI (95%)	Přijaté oddíly	Pozitivní oddíly	Negativní oddíly	% detekovaných mutantů
50%	NRAS	Mut	1318	1,30%	25477	15531	9946	52,74%
		WT	1181,1	1,30%	25477	14510	10967	

vzorek	test	reportér	Koncentrace (kopie / μ l)	CI (95%)	Přijaté oddíly	Pozitivní oddíly	Negativní oddíly	% detekovaných mutantů
10%	NRAS	Mut	241,3	3,00%	25469	3985	21484	9,18%
		WT	2386,5	0,90%	25469	20736	4733	
5%	NRAS	Mut	122,8	4,20%	25476	2131	23345	4,41%
		WT	2664,3	0,90%	25476	21645	3831	
2,5%	NRAS	Mut	64,23	5,70%	25480	1140	24340	2,44%
		WT	2573	0,90%	25480	21407	4073	
1,0%	NRAS	Mut	28,19	8,60%	25472	512	24960	1,08%
		WT	2588,7	0,90%	25460	21514	3946	
0,5%	NRAS	Mut	22,18	9,60%	25449	415	25034	0,78%
		WT	2813,2	0,90%	25436	22276	3160	
0,1%	NRAS	Mut	8,232	16,00%	25493	150	25343	0,30%
		WT	2774,5	0,90%	25493	22005	3488	

Jak je vidět z výsledků v tabulce 7, % detekovaných mutantů bylo těsně odpovídalo (např. v rámci 10 %) množství umístěným ve vzorku (srovnejte sloupce „vzorek“ a „% detekované mutanty“).

5

Příklad 6.- Detekce více různých mutantů KRAS v single-plex testech

Po prokázání, že 2T design z obrázku 1 byl vysoce účinný pro detekci jedné mutanty KRAS, byly navrženy a testovány kombinace sond pro detekci více různých mutantů KRAS.

10

Reagencie/Postup

Vzorky použité v experimentu pro amplifikaci nesoucí WT, 29T, 29C, 29A, 30T, 30C obsahovaly syntetické šablony (gBlocksTM, objednané na zakázku od IDT). V experimentu na test byly použity dva templáty, jeden obsahující sekvenci WT a jeden obsahující mutantní sekvenci pro cíl testu.

15

Každá dPCR reakce byla 12 μ l a obsahovala 3 μ l QIAcuity Sonda Mastermix, 800 nM kódujícího primeru, 800 nM antikódujícího primeru, 400 nM sondy WT (HEX), 400 nM sondy Mut (FAM), 100 nM WT TwoTail primeru, 50 nM Mutant TwoTail primeru, 500 kopii/ μ l syntetického Mutant templátu.

20

Reakční směs dPCR byla vložena do QIAcuity Nanoplate 8,5K a cyklována na QIAcuity Digital PCR System za následujících podmínek: 3 minuty při 95 °C, 45 cyklů, z nichž každý zahrnoval 15sekundovou denaturaci při 95 °C s následným 55°C prodloužením na 30 sekund. Akvizice obrazu byla provedena v kanálu FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí QIAcuity Software Suite s použitím manuálního prahování.

25

Tabulka 8: Návrhy primerů použitých v příkladu 6 pro detekci KRAS 29T

<i>název</i>	<i>sekvence (DNA)</i>
<i>2T WT primer KRAS 29T</i>	CTCCAACCTACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACCAATAT GAGGACCATCTACGCCACC
<i>2T Mut primer KRAS 29T</i>	CTCCAACCTACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTACCTGTCT CCACCTACGCCACA
<i>WT sonda KRAS 29T</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
<i>Mut sonda KRAS 29T</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
<i>Kódující primer KRAS 29T</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
<i>Antikódující primer KRAS 29T</i>	CCAACCTACCACAAGTTTATTTAC

5 Tabulka 9: Návrhy primerů použitých v příkladu 6 pro detekci KRAS 29C

<i>název</i>	<i>sekvence (DNA)</i>
<i>2T WT primer KRAS 29C</i>	CTCCAACCTACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACCA ATATGAGGACCATCTACGCCACC
<i>2T Mut primer KRAS 29C</i>	CTCCAACCTACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTACCT GTCTCCACCTACGCCACG
<i>WT sonda KRAS 29C</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
<i>Mut sonda KRAS 29C</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
<i>Kódující primer KRAS 29C</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
<i>Antikódující primer KRAS 29C</i>	CCAACCTACCACAAGTTTATTTAC

10 Tabulka 10: Návrhy primerů použitých v příkladu 6 pro detekci KRAS 29A

<i>název</i>	<i>sekvence (DNA)</i>
<i>2T WT primer KRAS 29A</i>	CTCCAACCTACCACAAGTTTATTIACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACCA ATATGAGGACCATCTACGCCACC
<i>2T Mut primer KRAS 29A</i>	CTCCAACCTACCACAAGTTTATTIACGAAATGCAGGTACAGTTGGTACCT GTCTCCACCTACGCCACT
<i>WT sonda KRAS 29A</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
<i>Mut sonda KRAS 29A</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
<i>Kódující primer KRAS 29A</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
<i>Antikódující primer KRAS 29A</i>	CCAACCTACCACAAGTTTATTIAC

Tabulka 11: Návrhy primerů použitých v příkladu 6 pro detekci KRAS 30T

<i>název</i>	<i>sekvence (DNA)</i>
<i>2T WT primer KRAS 30T</i>	CTCCAACCTACCACAAGTTTATTIACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACCA ATATGAGGACCATCTACGCCACC
<i>2T Mut primer KRAS 30T</i>	CTCCAACCTACCACAAGTTTATTIACGAAATGCAGGTACAGTTGGTACCT GTCTCCACCTACGCCAA
<i>WT sonda KRAS 30T</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
<i>Mut sonda KRAS 30T</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC

5

<i>Kódující primer KRAS 30T</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
<i>Antikódující primer KRAS 30T</i>	CCAACCTACCACAAGTTTATTIAC

Tabulka 12: Návrhy primerů použitých v příkladu 6 pro detekci KRAS 30C

10

<i>název</i>	<i>sekvence (DNA)</i>
<i>2T WT primer (KRAS 30C)</i>	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACCA ATATGAGGACCACTACGCCACC
<i>2T Mut primer (KRAS 30C)</i>	CTCCAAC TACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTACCT GICTCCACCTACGCCAG
<i>WT sonda (KRAS 30C)</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
<i>Mut sonda (KRAS 30C)</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
<i>Kódující primer (KRAS 30C)</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
<i>Antikódující primer (KRAS 30C)</i>	CCAAC TACCACAAGTTTATTTAC

Výsledky

- 5 Obrázek 6 znázorňuje 2D amplifikační grafy pro pět různých testů detekujících vlásenku se smyčkou mutantů KRAS, všechny používající stejné generické sekvence vlásenky a komplementární sondy. Jak lze vidět na segregaci bodů na grafech, všech pět testů detekce mutantů funguje velmi dobře s minimálním nesprávným překrýváním bodů.
- 10 **Příklad 7.-** Detekce více různých mutantů KRAS za použití společné sekvence s kmenovou smyčkou

15 Po prokázání, že 2T design z obrázku 1 byl vysoce účinný pro detekci mnoha různých mutací pro KRAS jednotlivě, byla hodnocena schopnost rozlišit mnohočetné mutace pomocí společné sekvence vlásenky se smyčkou.

Reagencie/Postup

20 Vzorky použité v experimentu pro amplifikaci obsahovaly syntetické templáty (gBlocksTM, objednané na zakázku od IDT). Bylo použito šest templátů, jeden obsahující sekvenci WT a pět samostatných fragmentů, z nichž každý obsahuje jednu mutantní sekvenci (mutace G12C, G12R, G12S, G12V a G12A).

25 Každá dPCR reakce byla 12 μl a obsahovala 3 μl QIAcuity Sonda Mastermix, 800 nM kódujícího primeru, 800 nM antikódujícího primeru, 400 nM WT sondy (HEX), 400 nM Mut sondy (FAM), 50 nM WT TwoTail primeru, 20nM 29T Mutant TwoTail primeru, 20nM 29C Mutant TwoTail primeru, 20nM 30T Mutant TwoTail primer, 20nM 30C Mutant TwoTail primer, 1000 kopií/μl WT templátu (WT vzorek) nebo 500 kopií/μl syntetického WT templátu a 500 kopií/μl jednoho z pěti syntetických mutantních templátů (50 % vzorků – názvy vzorků udávají, který mutantní templát byl použit pro příslušné vzorky).

30

Reakce dPCR byly vloženy do QIAcuity Nanoplate 8,5K a cyklovány na QIAcuity Digital PCR System za následujících podmínek: 3 minuty při 95 °C, 45 cyklů, z nichž každý zahrnoval 15sekundovou denaturaci při 95 °C následovanou 55 °C prodloužením na 30 sekund. Akvizice

obrazu byla provedena v kanálu FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí QIAcuity Software Suite s použitím manuálního prahování.

5 **Tabulka 13: Návrhy primerů použitých v příkladu 7 pro detekci více různých mutantů KRAS pomocí běžné sekvence vlásenky se smyčkou**

<i>název</i>	<i>sekvence (DNA)</i>
<i>2T WT primer</i>	CTCCA ACTACCACAAGTTTATTTACGAAATGTTGGTACAGTGAGTACC AATATGAGGACCATCTACGCCACC
<i>2T 29T Mut primer</i>	CTCCA ACTACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTAC CTGTCTCCACCTACGCCACA
<i>2T 29C Mut primer</i>	CTCCA ACTACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTAC CTGTCTCCACCTACGCCACG
<i>2T 29A Mut primer</i>	CTCCA ACTACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTAC CTGTCTCCACCTACGCCACT
<i>2T 30T Mut primer</i>	CTCCA ACTACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTAC CTGTCTCCACCTACGCCAA
<i>2T 30C Mut primer</i>	CTCCA ACTACCACAAGTTTATTTACGAAATGCAGGTACAGTTGGTAC CTGTCTCCACCTACGCCAG
<i>WT sonda</i>	TTGGTACAGTGAGTACCAATATGAGGACCATC
<i>Mut sonda</i>	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
<i>Kódující primer</i>	CCTGCTGAAAATGACTGAA
<i>Antikódující primer</i>	CCA ACTACCACAAGTTTATTTAC

Výsledky

10 Výsledky jsou uvedeny v tabulce 14 níže.

Tabulka 14: Detekce více mutantů KRAS s generickými sekvencemi vlásenky se smyčkou

vzorek	test	reportér	Koncentrace (kopie / μl)	CI (95%)	Přijaté oddíly	Pozitivní oddíly	Negativní oddíly	% detekovaných mutantů
WT	Skriningový test KRAS	Mut	0,39	274,40%	8253	1	8252	0,04%
		WT	976,4	3,90%	8253	2161	6092	
50% G12C	Skriningový test KRAS	Mut	467,7	5,70%	8257	1101	7156	47,37%
		WT	519,7	5,40%	8257	1214	7043	
50% G12R	Skriningový test KRAS	Mut	528,1	5,30%	8262	1245	7017	50,11%
		WT	525,8	5,30%	8262	1240	7022	
		Mut	529,1	5,20%	8225	1290	6935	48,44%

vzorek	test	reportér	Koncentrace (kopie / μ l)	CI (95%)	Přijaté oddíly	Pozitivní oddíly	Negativní oddíly	% detekovaných mutantů
50% G12S	Skriningový test KRAS	WT	563,2	5,10%	8225	1366	6859	
50% G12V	Skriningový test KRAS	Mut	258,6	7,70%	8274	620	7654	32,48%
		WT	537,7	5,40%	8274	1237	7037	
50% G12A	Skriningový test KRAS	Mut	460,6	5,60%	8242	1126	7116	46,43%
		WT	531,5	5,20%	8242	1285	6957	

Jak je patrné ze souhrnných údajů, množství detekovaných mutantů pro každou z mutací se těsně shoduje se skutečnou hodnotou 50 %, což dokazuje, že sady primerů s běžnými sekvencemi vlásenky se smyčkou jsou vysoce účinné pro detekci všech mutací v tabulce 14. OBRÁZEK 7 ukazuje 2D grafy amplitudy pro stejný experiment, což graficky dokazuje, že metoda 2T s běžnými primery vlásenky se smyčkou funguje dobře pro rozlišení více mutantů.

Příklad 8.- Rozlišení mezi methylovanou a nemethylovanou DNA za použití 2-stranných primerů

Poté, co bylo pozorováno, že 2-stranný design z obrázku 1 byl účinný pro detekci mutantní DNA, byly primery navrženy tak, aby rozlišovaly mezi nemethylovanou a methylovanou DNA na základě standardního protokolu s použitím bisulfitového ošetření, které také zavádí změny párů bází v DNA pomocí konverze methylovaných cytosinů na uracil (např. způsobující změnu z GC páru bází na AT pár bází v následné PCR reakci). Methylované cytosiny se v eukaryotické DNA nacházejí v 5'-CG-3' dinukleotidových repetitích, které jsou zvláště bohaté v mnoha oblastech zájmu známých jako CpG-ostrovy.

Vzhledem k tomu, že 2T-primery se zaměřují na samotné CG-dinukleotidové kroky, jejichž methylační stav je zkoumán, metoda dvoustranné hemisondy představuje zjevné výhody oproti tradiční PCR amplifikaci.

CORO6 je gen, o kterém bylo zdokumentováno, že obsahuje ostrůvky CpG, které jsou hypermethylované v kardiomyocytech (viz např. "Heart-specific DNA methylation analysis in plasma for the investigation of myocardial damage", Ren et al., 2022, jenž je začleněn odkazem v celém rozsahu zde). Jako takovou lze DNA specifickou pro srdce odlišit od DNA z jiných tkání – například v cfDNA z krve – pomocí testu PCR citlivého na metylaci.

Obrázek 8 panel A ukazuje schéma metylaci detekujícího 2T-primeru (CORO6-2T.M) navrženého k cílení na gen CORO6, s hemisondami černým textem (tučně/podtrženým) a sekvencí vlásenky se smyčkou a rameny tmavými šedé čáry, cílovou sekvencí černým textem, rozšířenou sekvencí 2T-primerem (šedým textem), sekvencí antikódujícího a kódujícího primeru (černou kurzívou). Sonda (není ukázána) se selektivně váže na komplement sekvence kmenové smyčky a ramena 2T-primeru. Cílová DNA má na původních cytosinových místech malá písmena, která se bisulfitovou úpravou mohou změnit na uracil (reprezentované na obrázku a v syntetických sekvencích DNA jako thyminy), zatímco methylovaná CpG místa mají šedé zvýraznění (které v nemethylované DNA mohou být zastoupen TG).

3' hemisonda 2T-primerů byla navržena ke zkoumání tří CpG míst v CpG ostrůvku CORO6 (čárkovaný rámeček). Protože 3' hemisonda je velmi krátká (13 bp pro 2T-primer detekující methylovanou DNA, 16 bp pro 2T primer detekující nemethylovanou DNA (viz CORO6-2T.NM 3'-hemisonda na obrázku)), délka zkoumané sekvence DNA může být krátká, což je výhodou při práci s vysoce fragmentovaným materiálem DNA, jako je cfDNA a bisulfitově upravená DNA. Kromě toho krátká 3' hemisonda poskytuje rozlišení mezi methylovanou a nemethylovanou sekvencí, zejména proto, že zahrnuje tři CpG místa.

Reagenie/Postup

Byl proveden experiment k vyhodnocení navrženého testu CORO6, jehož výsledek je znázorněn na obr. 8 panel B. Templát použitý v experimentu obsahoval syntetické templáty (gBlocksTM, IDT), jeden představující metylovanou sekvenci CORO6 (Methylated gBlock, čtverečky na obrázku) a jeden obsahující nemetylovanou sekvenci CORO6 (nemetylovaný gBlock). Templátová DNA byla uspořádána takovým způsobem, že všechny cytosiny objevující se samostatně (nikoli v CpG dinukleotidu) v sekvenci byly převedeny na thymin, který představuje uracil vytvořený po bisulfitovém ošetření. Cytosiny vyskytující se v CpG-dinukleotidech byly ponechány nezměněné v sekvenci představující metylovaný gBlock, zatímco byly změněny na thyminy v sekvenci představující nemetylovaný gBlock. Tyto dva templáty byly smíchány v poměru 50/50 (Mixed gBlock, trojúhelníky na obrázku), aby se simulovala tkáň se smíšeným methylačním vzorem, jako je srdeční tkáň (viz Ren et al.). Byla také zahrnuta kontrola bez šablony (NTC (H2O), křížky na obrázku). Množství templátu bylo 2E5 kopií/reakci na cílovou sekvenci.

Reakční objem byl 10 µl a obsahoval TATAA Sondu GrandMaster Mix (1x), 400 nM kódujícího a antikódujícího primeru, 25 nM primeru CORO6.2T-M (detekce methylace), 25 nM primeru CORO6.2T-NM (ne-detekce methylace), 200 nM HEX sondy (vazba na komplement 2T-M primeru), 200 nM FAM sondy (vazba na komplement 2T-NM primeru).

Reakce qPCR byly cyklovány na BioRad CFX384 s následujícím termocyklovacím programem: 1 minuta při 95 °C, 45 cyklů, z nichž každý zahrnoval 5sekundovou denaturaci při 95 °C s následnou extenzí při 60 °C po dobu 30 sekund. Akvizice obrazu byla provedena v kanálu FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí softwaru CFX Maestro g automatické prahování (jediný práh) a úprava základní linie (proložení odečtené křivky základní linie).

Oligonukleotidové sekvence (5'→3') použité v experimentu jsou uvedeny v tabulce níže, sekvence komplementární k vazebným místům sondy jsou uvedeny pro 2T-primer podtrženým textem:

oligo	sekvence
CORO6.2T-M	AATCTCCCCTAAACTCCAATTACGAAATG <u>I</u> ACTAGCGGC <u>A</u> AAGCTAGTGCTAGACTT <u>G</u> ACACCGCTAAAACGACG
CORO6.2T-NM	AATCTCCCCTAAACTCCAATTACGAAATG <u>C</u> AGGTACAGT <u>I</u> GGTACCTGTCTCCACCCTCCACTAAAACA
2T-Universal HEX (methylační) sonda	TACTAGCGGCAAGCTAGTGCTAGACTT
2T-Universal FAM (ne- methylační) sonda	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC

CORO6.F	CCCTAAACTCCAATTACGAAATG
CORO6.R-M	CGCGGGAGATTAGAATTTTG
CORO6.R-NM	TGTGGGAGATTAGAATTTTG

35 *Výsledky*

Graf na obrázku 8 panel B ukazuje alelickou diskriminační účinnost 2T-testu s použitím složek z panelu A v qPCR na syntetických sekvencích gBlock představujících metylovanou DNA, nemetylovanou DNA, smíšenou metylovanou/nemetylovanou DNA a neovládání šablony (NTC). Při teplotě anealingu 60 °C se jasně odliší jiný typ templátové DNA, zatímco omezený falešně pozitivní signál pozorovaný v NTC je omezen na kanál FAM (detekce nemetylované DNA), který nemusí interferovat s detekcí metylované DNA.

Příklad 9. - Zkoumání stavu methylace FAM101A pomocí 2T-PCR

FAM101A je gen, který obsahuje CpG místa, která mají nízký stupeň methylace v srdeční tkáni ve srovnání s jinými tkáněmi (viz např. “Non-invasive detection of human cardiomyocyte death using methylation patterns of circulating DNA”, Zemmour et al., 2018, který je zde v celém svém rozsahu zahrnut odkazem). Jako taková může být FAM101A srdce specifická DNA odlišena v cfDNA od krve pomocí testu PCR citlivého na methylaci.

Obrázek 9 panel A ukazuje schéma 2T-primeru nedetekujícího methylaci pro detekci stavu methylace genu FAM101A (FAM101A-2T.NM s hemisondami v černém textu (tučně/podtržené) a sekvencí kmenové smyčky a rameny v tmavě šedých čarách, cílová sekvence v černém textu, sekvence antikódujícího a kódujícího primeru (černou kurzívou) Sonda (není ukázána) se selektivně váže na komplement vlásenky se smyčkou sekvence a ramena 2T-primeru DNA byla upravena tak, že původní „jediná“ cytosinová místa jsou reprezentována thyminem (protože bisulfitové ošetření může takové cytosiny proměnit na uracily), zatímco původní CpG místa mají šedé zvýraznění (které v nemetylovaném templátu DNA a na obrázku jsou zastoupeny TG).

Hemisonda 3' 2T-primerů byla navržena tak, aby zkoumala tři CpG-místa, zatímco 5' konec dotazovala dvě CpG-místa FAM101A. Díky konstrukci 2T-testu může být délka dotazované sekvence DNA krátká, což je výhodou při práci s vysoce fragmentovaným materiálem DNA, jako je cfDNA a bisulfitově upravená DNA. Kromě toho relativně krátká 3' hemisonda (20 bp) poskytuje vynikající rozlišení mezi metylovanou a nemetylovanou sekvencí, zejména proto, že zahrnuje tři CpG místa. V tomto provedení testu také 5' hemisonda zvyšuje specificitu testu, protože kooperativní vazebná síla 2T testu bude slabší, pokud nebudou všechna CpG místa metylována/nemetylována ve stejnou dobu.

Reagencie/Postup

Byl proveden experiment k vyhodnocení navrženého testu FAM101A, jehož výsledek je znázorněn na obr. 9 panel B. Templát použitý v experimentu obsahuje syntetické templáty (gBlocksTM, IDT), z nichž jeden představuje metylovanou sekvenci FAM101A (metylovaný gBlock, kruhy na obrázku) a jeden obsahující nemetylovanou sekvenci FAM101A (nemetylovaný gBlock, čtverce na obrázku). Templátová DNA byla uspořádána takovým způsobem, že všechny cytosiny objevující se samostatně (nikoli v CpG dinukleotidu) v sekvenci byly převedeny na thymin, který představuje uracil vytvořený po bisulfitovém ošetření. Cytosiny vyskytující se v CpG-dinukleotidech byly ponechány nezměněné v sekvenci představující metylovaný gBlock, zatímco byly změněny na thyminy v sekvenci představující nemetylovaný gBlock. Tyto dva templáty byly smíchány v poměru 50/50 (Mixed gBlock, trojúhelníky na obrázku), aby se simulovala tkáň se smíšeným methylačním vzorem, jako je srdeční tkáň (viz Ren et al.). Byla také zahrnuta kontrola bez šablony (NTC (H₂O), křížky na obrázku). Množství templátu bylo 2E5 kopií/reakci na cílovou sekvenci.

Reakční objem byl 10 µl a obsahoval TATAA Sondu GrandMaster Mix (1x), 400 nM kódujícího a antikódujícího primeru, 25 nM primeru FAM101A.2T-M (detekce methylace), 25 nM primeru FAM101A.2T-NM (ne-detekce methylace), 200 nM HEX sondu (vazba na komplement 2T-M primeru), 200 nM FAM sondu (vazba na komplement 2T-NM primeru).

Reakce qPCR byly cyklovány na BioRad CFX384 s následujícím termocyklovacím programem: 1 minuta při 95 °C, 45 cyklů, z nichž každý zahrnoval 5sekundovou denaturaci při 95 °C následovanou žiháním/prodlužováním při 55,2 až 61,8 °C po dobu 30 sekundy. Akvizice obrazu byla provedena v kanálu FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí CFX Maestro Software za použití automatického prahování (jediný práh) a úpravy základní linie (proložení odečtené křivky základní linie).

Oligonukleotidové sekvence (5'→3') použité v experimentu jsou uvedeny v tabulce níže, sekvence komplementární k vazebným místům sondy jsou uvedeny pro 2T-primer v podtrženém textu:

oligo	Sekvence
FAM101A.2T-M	ATCGCAAATAAAAACCGAACATTTCCCTTACGAAATC CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACCCAACGCACGATAAAAACG
FAM101A.2T-NM	ATCACAAAATAAAAACCAAACATTTCCCTTACGAAATC TACTAGCGGCAAGCTAGTGCTAGACTTCAACAACACACAATAAAAACA
2T-Universal HEX (nemethylační) sonda	TACTAGCGGCAAGCTAGTGCTAGACTT
2T-Universal FAM (methylační) sonda	CAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACC
FAM101A.F-M	CCGAACATTTCCCTTACGAAATC
FAM101A.F-NM	AACCAAACATTTCCCTTACGAAATC
FAM101A.R	GAAAAGTGTAGGTTTTATAGGTAGA

Výsledky

Obrázek 9 panel B ukazuje alelickou diskriminační účinnost 2T-testu v qPCR na syntetických sekvencích gBlock představujících methylovanou DNA, nemethylovanou DNA, smíšenou methylovanou/nemethylovanou DNA a kontrolu bez templátu (NTC). Při teplotách anealingu kolem 55 až 62 °C test probíhá robustně a je provedeno jasné rozlišení různých typů templátové DNA, přičemž se falešně pozitivní signál udržuje velmi nízký a je omezen na kanál FAM (detekce methylované DNA).

Příklad 10.- Detekce tkáňově specifické DNA zacílením na selektivní methylační vzor

U CG-ostrovů CORO6 a FAM101A bylo zdokumentováno, že mají, v tomto pořadí, vysoký a nízký stupeň methylace v srdeční tkáni, v protikladu k vzorům pozorovaným v jiných tkáních, jako jsou bílé krvinky (viz např. Ren et al. 2022, Zemmour et al. 2018, který je zde zahrnut jako odkaz v celém rozsahu). Po prokázání účinnosti dvoustranného přístupu z obrázku 1 pro CORO6 a FAM101A v předchozích příkladech jsme předpokládali, že je možné rozlišit srdeční DNA v bezbuněčné DNA přítomné v plazmě.

Reagencie/postup

Za účelem vyhodnocení testů tkáňové diskriminační kapacity byly testy použity k analýze DNA extrahované ze srdeční tkáně a bílých krvinek (WBC). Diagram na obrázku 10 Panel A představuje grafy alelické diskriminace založené na konečné relativní fluorescenci (RFU) získané v experimentu qPCR, ve kterém dříve popsané 2T-PCR testy CORO6 a FAM101A byly použity k rozlišení mezi metylovanou a nemetylovanou DNA.

Použité syntetické templáty byly stejné, jak jsou uvedeny v části metody pro obrázek 8 a 9: představující metylovanou sekvenci CORO6/FAM101A (M.gBlock) a nemetylovanou sekvenci CORO6/FAM101A (NM.gBlock). Templáty byly smíchány v poměru 50/50 (Mixed gBlock), aby se simulovala tkáň se smíšeným methylačním vzorem, jako je srdeční tkáň (Ren et al. 2022, který je zde celý zahrnut odkazem). Množství templátu bylo 2E5 kopií/reakci na cílovou sekvenci. Byla také zahrnuta kontrola bez šablony (NTC).

Vzorky odvozené od člověka pocházejí ze dvou jedinečných vzorků WBC odebraných ze shromážděných vzorků krve v EDTA zkumavkách od 20-30 jedinců a dvou vzorků srdce získaných od dvou jedinečných pacientů podstupujících operaci srdce. DNA byla extrahována z buněk/tkáni pomocí soupravy DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, art no 69504). 200 ng každého extrahovaného vzorku DNA bylo poté ošetřeno bisulfitem (BST) pomocí soupravy EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, art no. D5030) a eluováno v 10 µl elučního pufru. 2 µl eluátu bylo použito jako templát pro následnou qPCR analýzu, což odpovídá 40 ng BST-DNA. Očekává se, že bisulfitové ošetření degraduje DNA na úroveň 60-90 % (Zemmour et al. 2018).

Reakční objem byl 10 µl a obsahoval TATAA Sonda GrandMaster Mix (1x), 400 nM kódující a antikódující primer, 25 nM primer CORO6/FAM101A.2T-M (detekce methylace), 25 nM CORO6/FAM101A.2T- NM primer (nemethylační detekce), 200 nM HEX sonda (vazba na komplement 2T-M (CORO6) nebo 2T-NM (FAM101A) primeru), 200 nM FAM sonda (vazba na komplement 2T-NM (CORO6) popř. 2T-M (FAM101A) primer). Oligonukleotidové sekvence použité v experimentu byly stejné jako ty, které jsou uvedeny v části reagentie/postup v příkladu 8 a 9.

Reakce qPCR byly cyklovány na BioRad CFX384 s následujícím termocyklovacím programem: 1 minuta při 95 °C, 45 cyklů, z nichž každý zahrnoval 5sekundovou denaturaci při 95 °C následovanou žiháním/prodlužováním při 60 °C po dobu 30 sekund. Získávání snímků bylo prováděno pomocí kanálu FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí CFX Maestro Software za použití automatického prahování (jediný práh) a úpravy základní linie (proložení odečtené křivky základní linie).

Vzorky popsané ve způsobu výše pro obrázek 10 Panel A byly také analyzovány v digitálním PCR experimentu s použitím testovacího oligonukleotidu FAM101A popsaného v reagentiích/postupu pro příklad 9. Každá dPCR reakce byla 12 µl a obsahovala QIAcuity Sonda Mastermix (1x), 800 nM kódující a antikódující primer, 25 nM primer FAM101A.2T-M (detekce methylace), 25 nM primer FAM101A.2T-NM (detekce nemethylace), 200 nM sonda HEX (vazba na komplement 2T-NM primeru), 200 nM sonda FAM (vazba na komplement 2T-M primeru). Ke každé reakci byly přidány 4 µl templátu. U syntetických vzorků gBlock měl zásobní roztok koncentraci 1E4 cp/µl (celkové zatížení na reakci: 40 000 kopií na cíl), zatímco tkáňová DNA měla před ošetřením BST koncentraci 20 ng/µl (celkové zatížení na reakci, 80 ng, což odpovídá přibližně 24 000 kopií genomu). Oligonukleotidové sekvence použité v experimentu byly stejné, jak jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Reakce dPCR byly vloženy do QIAcuity Nanoplate 26K a cyklovány na QIAcuity Digital PCR System za následujících podmínek: 3 minuty při 95 °C, 45 cyklů, každý obsahující 15sekundovou denaturaci při 95 °C a následné prodloužení při 55 °C po dobu 30 sekund. Akvizice obrazu byla provedena v kanálu FAM a HEX. Data byla analyzována pomocí QIAcuity Software Suite za použití manuálního prahování.

Výsledky Obrázek 10 panel A znázorňuje výsledky alelické diskriminace pomocí qPCR při analýze methylačních/nemethylačních reprezentativních gBlocků genu CORO6 a FAM101A synteticky vyrobených (2E5 cp/reakce) (M.gB – methylovaný cíl; NM.gB – nemethylovaný target; Mix.gB – 50/50 mix M/NM-gBlocks) spolu se dvěma unikátními bisulfitově ošetřenými (BST) vzorky DNA extrahovanými z bílých krvinek (WBC) a srdeční tkáně (40 ng DNA/reakce (před BST)). Primery CORO6 a FAM101A byly zkonstruovány jako v předchozích příkladech a pro detekci obou markerů byla provedena qPCR jako v předchozích příkladech. HEX fluorofor je signál pro methylovanou sekvenci CORO6 a nemethylovanou FAM101A. Jak se očekává na základě zdokumentovaného chování CORO6 a FAM101A, vykazují WBC signál v kanálu FAM, zatímco srdce vykazuje signál v kanálu HEX i FAM, což ukazuje, že oba testy mohou detekovat srdeční DNA na pozadí bílých krvinek (tzv. hlavní zdroj DNA v cfDNA).

Obrázek 10 panel B znázorňuje výsledky, když vzorky popsané na obrázku 10 panel A byly analyzovány pomocí FAM101A 2T-testu za použití digitální PCR (QIAcuity, Qiagen) místo qPCR. Vzorky srdce vykazují smíšený signál (FAM/HEX), zatímco WBC vykazují signál pro methylovanou DNA (FAM). NTC vykazují relativně vysokou fluorescenci pozadí v NTC, ale signál je omezen na kanál FAM a jako taková není ohrožena detekce signálu specifického pro srdce (HEX). Tyto výsledky naznačují, že 2T-PCR bude účinná pro kvantifikaci celkové cílové DNA v kontextu methylace (nemethylované/methylované), což je přínosné pro analýzu cfDNA, kde je analýza tkáně původu pro cfDNA biologicky informativní.

Příklad 11. Přímá krevní genotypizace

Po pozorování vysoké účinnosti dvoustranné metody z obrázku 1 pro detekci mutací v různých kontextech jsme se zeptali, zda může být metoda účinná pro genotypizaci ze vzorků nezpracované krve. V souladu s tím byl vzorek nezpracované krve (např. bez extrakce nebo čištění nukleové kyseliny) genotypován na mutaci faktoru V ("Leiden") pomocí 2T-qPCR. Primery byly navrženy podle schématu zobrazeného na obrázku 1 a předchozích příkladů pro vytvoření SEKV ID Č: 67-72. Tři standardní vzorky krve (homozygot divokého typu, homozygotní mutant a heterozygot) byly získány od Equalis. byl inkubován 1 µl každého krevního vzorku s 24 µl lyzačního pufru při 96 °C po dobu 10 minut. Vzorek byl za účelem odstranění buněčných zbytků centrifugován. Supernatant byl poté smíchán se stejným množstvím vody a 2 µl byly použity jako templát v qPCR za podmínek popsaných v předchozích příkladech.

Obrázek 11 znázorňuje výsledky tohoto experimentu. Levý panel na obrázku 11 ukazuje duplicitní měření qPCR u homozygotu divokého typu (nahore), homozygotního mutantu (uprostřed) a heterozygotu (dole). Pravý panel ukazuje graf shromažďující naměřená data na základě intenzity fluorescence jasně rozlišující duplikáty dvou homoduplexů a heteroduplexů. Graf na pravém panelu jasně ukazuje, že divoký typ, heterozygot a mutant mohou být odlišeni od plně nezpracované krve bez dalších kroků čištění.

I když zde byla ukázána a popsána výhodná provedení předkládaného vynálezu, bude odborníkům v oboru zřejmé, že taková provedení jsou poskytnuta pouze jako příklad. Odborníkům v oboru nyní vyvstanou četné variace, změny a substituce, aniž by došlo k odchýlení se od vynálezu. Mělo by být zřejmé, že při provádění vynálezu mohou být použity různé alternativy ke zde popsaným provedením vynálezu. Je zamýšleno, že následující nároky definují rozsah vynálezu a že způsoby a struktury v rozsahu těchto nároků a jejich ekvivalenty jsou v nich zahrnuty.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob zpracování sekvence DNA mající nebo je v podezření, že ji má, sekvenční variantu vzhledem k sekvenci divokého typu, kde tento způsob zahrnuje:
5 v reakční směsi vhodné pro zpracování uvedené sekvence DNA se spojí:
(i) uvedená sekvence DNA, kde uvedená sekvence DNA obsahuje variaci alespoň jednoho nukleotidu vzhledem k uvedené sekvenci divokého typu; a
(ii) primer vlásenka se smyčkou, který obsahuje:
5' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s první koncovou oblastí
10 komplementární k uvedené DNA sekvenci;
sekvence vlásenky se smyčkou; a
3' hemisondová sekvence konfigurovaná tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí uvedené sekvence DNA, kde 3' terminální část uvedené 3' hemisondové sekvence obsahuje nukleotid komplementární k uvedené neshodě, ale ne komplementární k uvedené sekvenci
15 divokého typu.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje inkubaci uvedené reakční směsi za podmínek vhodných k prodloužení produktu obsahujícího uvedenou 3' hemisondovou sekvenci.
3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje spojení v uvedené reakční směsi vhodné pro zpracování uvedeného produktu obsahujícího uvedenou 3' hemisondovou sekvenci:
20 antikódujícího primeru konfigurovaného tak, aby hybridizoval s genomickou oblastí 3' z uvedené neshody.
4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že antikódující primer má T_m přibližně 50 až 70 stupňů Celsia.
5. Způsob podle kteréhokoli z nároků 3 až 4, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje inkubaci
25 uvedené reakční směsi vhodné pro zpracování uvedeného produktu obsahujícího uvedenou 3' hemisondovou sekvenci za podmínek vhodných k produkci produktů prodloužení z antikódujícího primeru.
6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje spojení v reakční směsi vhodné pro zpracování uvedeného produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru:
30 uvedeného produktu obsahujícího uvedenou sekvenci antikódujícího primeru; a kódujícího primeru konfigurovaného pro hybridizaci s: (i) alespoň částí uvedené 5' hemisondové sekvence; a (ii) alespoň částí stopky uvedené sekvence vlásenky se smyčkou.
7. Způsob podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že kódující primer obsahuje alespoň přibližně 12 až přibližně 30 nukleotidů komplementárních k uvedené 5' hemisondové sekvenci.
8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že kódující primer obsahuje alespoň přibližně 9 až
35 přibližně 35 nukleotidů komplementárních k uvedené stopce uvedené 3' sekvence vlásenky se smyčkou k uvedeným nukleotidům komplementárním k uvedené 5' hemisondové sekvenci.
9. Způsob podle kteréhokoli z nároků 6 až 8, **vyznačující se tím**, že uvedený kódující primer má T_m přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia.
10. Způsob podle kteréhokoli z nároků 6 až 9, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje inkubaci
40 uvedené reakční směsi vhodné pro zpracování uvedeného produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru za podmínek vhodných k produkci produktů prodloužení z uvedeného kódujícího primeru.
11. Způsob podle kteréhokoli z nároků 6 až 10, **vyznačující se tím**, že uvedené antikódující a
45 kódující primery jsou v přebytku nebo jsou alespoň přibližně ve 20násobně, alespoň přibližně v

50násobně, alespoň přibližně ve 100násobně, alespoň přibližně ve 200násobně, alespoň přibližně v 500násobně, alespoň přibližně v 1000násobně vyšší koncentraci, než je koncentrace uvedeného dvoustranného primeru.

5 12. Způsob podle kteréhokoli z nároků 6 až 11, **vyznačující se tím**, že koncentrace uvedeného dvoustranného primeru je vyšší než nebo je alespoň přibližně 20násobně, alespoň přibližně 50násobně, alespoň přibližně 100násobně při alespoň přibližně 200násobně, alespoň přibližně 500násobně, alespoň přibližně 1000násobně vyšší v koncentraci než koncentrace uvedené sekvence DNA.

10 13. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 12, **vyznačující se tím**, že uvedená vlásenka se smyčkou amplifikuje uvedenou mutantní polynukleotidovou sekvenci alespoň přibližně 10krát, alespoň přibližně 100krát, alespoň přibližně 1000krát, alespoň přibližně 10 000krát, alespoň přibližně 100 000krát nebo alespoň přibližně 1 000 000krát přednostně oproti uvedené polynukleotidové sekvenci divokého typu.

15 14. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 13, kde uvedená mutantní polynukleotidová sekvence nebo polynukleotidová sekvence divokého typu obsahuje genomovou DNA.

15 15. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 14, **vyznačující se tím**, že uvedená 5' hemisonďová sekvence obsahuje délku přibližně 7 až přibližně 22 nukleotidů.

16 16. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15, **vyznačující se tím**, že uvedená 3' hemisonďová sekvence obsahuje délku přibližně 3 až přibližně 9 nukleotidů.

20 17. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 16, **vyznačující se tím**, že uvedená 3' hemisonďová sekvence má T_m přibližně 30 až 40 stupňů nebo uvedená 5' hemisonďová sekvence má T_m přibližně 60 až 75 stupňů.

18 18. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 17, kde uvedená sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje délku přibližně 15 nukleotidů nebo více.

25 19. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18, **vyznačující se tím**, že uvedená sekvence vlásenky se smyčkou je konfigurována tak, aby měla T_m přibližně 55 až přibližně 75 stupňů Celsia.

20 20. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 19, kde vlásenka se smyčkou obsahuje alespoň přibližně 1 až alespoň přibližně 20 nukleotidů na délku.

30 21. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 20, **vyznačující se tím**, že smyčka uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje barkód.

35 22. Způsob podle kteréhokoli z nároků 10 až 21, **vyznačující se tím**, že uvedená reakční směs vhodná pro zpracování uvedeného produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru za podmínek vhodných pro produkci produktů prodloužení z uvedeného kódujícího primeru dále obsahuje oligonukleotidovou sonda obsahující detekovatelnou skupinu, přičemž uvedená oligonukleotidová sonda je konfigurována tak, aby hybridizovala s komplementem alespoň částí uvedeného primeru vlásenky se smyčkou.

23. Způsob podle nároku 22, **vyznačující se tím**, že uvedená alespoň část uvedeného primeru vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou.

40 24. Způsob podle nároku 23, **vyznačující se tím**, že uvedená alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část sekvence smyčky v uvedené sekvenci vlásenky se smyčkou.

25. Způsob podle kteréhokoli z nároků 22 až 24, **vyznačující se tím**, že uvedená detekovatelná skupina obsahuje 5' fluorofor.
26. Způsob podle nároku 25, **vyznačující se tím**, že uvedená oligonukleotidová sonda obsahující uvedenou detekovatelnou skupinu dále obsahuje zhášec.
- 5 27. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 10 až 26, **vyznačující se tím**, že uvedená inkubace zahrnuje PCR reakci, qPCR reakci, dPCR reakci, ddPCR reakci nebo sekvenační reakci.
28. Sada pro zpracování sekvence DNA **vyznačující se tím**, že obsahuje:
a) primer vlásenky se smyčkou, který obsahuje:
10 (i) 5' hemisondovou sekvenci konfigurovanou tak, aby hybridizovala s první koncovou oblastí komplementární k uvedené DNA sekvenci;
(ii) sekvenci vlásenky se smyčkou; a
(iii) 3' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí uvedené DNA sekvence;
15 (b) kódující primer konfigurovaný pro hybridizaci s: (i) alespoň částí uvedené 5' hemisondové sekvence; a (ii) alespoň část kmene uvedené sekvence vlásenky se smyčkou; a
(c) antikódující primer konfigurovaný tak, aby hybridizoval s genomovou oblastí 3' z uvedené neshody.
29. Sada podle nároku 27, **vyznačující se tím**, že uvedená sekvence DNA má nebo je v podezření, že má variaci alespoň jednoho nukleotidu vzhledem k sekvenci divokého typu.
- 20 30. Sada podle nároku 29, **vyznačující se tím**, že 3' terminální část uvedené 3' hemisondové sekvence obsahuje nukleotid komplementární k uvedené variaci, ale ne komplementární k uvedené sekvenci divokého typu.
31. Sada podle nároku 27, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje:
25 (d) oligonukleotidovou sondu obsahující detekovatelnou skupinu, kde uvedený oligonukleotid je konfigurován tak, aby hybridizoval s alespoň částí uvedeného primeru vlásenky se smyčkou.
32. Sada podle nároku 27 nebo nároku 29, **vyznačující se tím**, že uvedená alespoň část uvedeného primeru vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou.
33. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 32, **vyznačující se tím**, že uvedená alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje v uvedené sekvenci vlásenky se smyčkou alespoň část sekvence vlásenky se smyčkou.
- 30 34. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 33, **vyznačující se tím**, že uvedená detekovatelná skupina obsahuje 5' fluorofor.
35. Sada podle nároku 34, **vyznačující se tím**, že uvedená oligonukleotidová sonda obsahující uvedenou detekovatelnou skupinu dále obsahuje zhášec.
- 35 36. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 35, **vyznačující se tím**, že antikódující primer má T_m přibližně 50 až 70 stupňů Celsia.
37. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 36, kde uvedený kódující primer obsahuje alespoň přibližně 12 až přibližně 30 nukleotidů komplementárních k uvedené 5' hemisondové sekvenci.
- 40 38. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 37, kde uvedený kódující primer obsahuje alespoň přibližně 9 až přibližně 35 nukleotidů komplementárních k uvedenému kmene uvedené sekvence vlásenka se smyčkou 3' k uvedeným nukleotidům komplementárním k uvedené 5' hemisondové sekvenci.

39. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 38, kde uvedený kódující primer má Tm přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia.

40. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 39, kde uvedený primer vlásenky se smyčkou amplifikuje uvedenou mutantní polynukleotidovou sekvenci alespoň přibližně 10násobně, alespoň přibližně 100násobně, alespoň přibližně 1000násobně, alespoň přibližně 10 000násobně, alespoň přibližně 100 000násobně nebo alespoň přibližně 1 000 000násobně přednostně oproti uvedené polynukleotidové sekvenci divokého typu.

41. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 40, kde uvedená 5' hemisondová sekvence obsahuje délku přibližně 7 až přibližně 22 nukleotidů.

42. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 41, kde uvedená 3' hemisondová sekvence obsahuje délku přibližně 3 až přibližně 9 nukleotidů.

43. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 42, **vyznačující se tím**, že uvedená 3' hemisondová sekvence má Tm přibližně 30 až 40 stupňů nebo uvedená 5' hemisondová sekvence má Tm přibližně 60 až 75 stupňů.

44. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 43, kde uvedená sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje délku přibližně 15 nukleotidů nebo více.

45. Sada podle kteréhokoli z nároků 27 až 44, **vyznačující se tím**, že uvedená sekvence vlásenky se smyčkou je konfigurována tak, aby měla Tm přibližně 55 až přibližně 75 stupňů Celsia.

46. Kit podle kteréhokoli z nároků 27 až 45, kde smyčka uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň přibližně 1 až alespoň přibližně 20 nukleotidů na délku.

47. Kit podle kteréhokoli z nároků 27 až 46, **vyznačující se tím**, že smyčka uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje barkód.

48. Kit podle nároku 27, **vyznačující se tím**, že uvedený primer vlásenky se smyčkou, uvedený kódující primer nebo uvedený antikódující primer obsahují kteroukoli ze SEKV ID Č: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 53, 54 58, 59, 60, 61, 64, 65, 66, 67, 68, 71 nebo 72.

49. Kompozice pro zpracování sekvence DNA, **vyznačující se tím**, že obsahuje

(a) primer vlásenky se smyčkou, který obsahuje:

(i) 5' hemisondovou sekvenci konfigurovanou tak, aby hybridizovala s první koncovou oblastí komplementárním s uvedenou DNA sekvence;

(ii) sekvence vřeteno-smyčka; a

(iii) 3' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí uvedené DNA sekvence;

(b) kódující primer konfigurovaný pro hybridizaci s:(i) alespoň částí uvedené 5' hemisondové sekvence; a (ii) alespoň část kmene uvedené sekvence vlásenky se smyčkou; a

(c) antikódující primer konfigurovaný tak, aby hybridizoval s genomickou oblastí 3' z uvedené neshody, přičemž

koncentrace uvedeného kódujícího primeru nebo koncentrace uvedeného antikódujícího primeru jsou alespoň 10krát vyšší než koncentrace uvedeného primeru vlásenky se smyčkou.

50. Kompozice podle nároku 49, **vyznačující se tím**, že uvedená sekvence DNA má nebo je v podezření, že má variaci alespoň jednoho nukleotidu vzhledem k sekvenci divokého typu.

51. Kompozice podle nároku 50, **vyznačující se tím**, že 3' koncová část uvedené 3' hemisondové sekvence obsahuje nukleotid komplementární k uvedené variaci, ale ne komplementární k uvedené sekvenci divokého typu.

52. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 51, dále obsahující:

(d) oligonukleotidovou sondu obsahující detekovatelnou skupinu, kde uvedený oligonukleotid je konfigurován tak, aby hybridizoval s alespoň částí uvedeného primeru vlásenky se smyčkou.

53. Kompozice podle nároku 52, **vyznačující se tím**, že uvedená alespoň část uvedeného primeru vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou.

54. Kompozice podle nároku 53, **vyznačující se tím**, že uvedená alespoň část uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje v uvedené sekvenci vlásenky se smyčkou alespoň část sekvence smyčky.

55. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 54, **vyznačující se tím**, že detekovatelná část obsahuje 5' fluorofor.

56. Kompozice podle nároku 55, kde uvedená oligonukleotidová sonda obsahující uvedenou detekovatelnou skupinu dále obsahuje zhášec.

57. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 56, **vyznačující se tím**, že uvedená koncentrace uvedeného kódujícího primeru nebo uvedená koncentrace uvedeného antikódujícího primeru je vyšší než nebo je alespoň přibližně 20násobně, alespoň přibližně 50násobně, alespoň přibližně 100násobně, alespoň přibližně 200násobně, alespoň přibližně 500násobně, alespoň přibližně 1000násobně vyšší než je uvedená koncentrace uvedeného primeru vlásenky se smyčkou.

58. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 57, kde 3' terminální část uvedené 3' hemisondové sekvence obsahuje nukleotid komplementární k uvedené neshodě, ale ne komplementární k uvedené sekvenci divokého typu.

59. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 58, **vyznačující se tím**, že uvedený antikódující primer má T_m přibližně 50 až 70 stupňů Celsia.

60. Prostředek podle kteréhokoli z nároků 49 až 59, **vyznačující se tím**, že kódující primer obsahuje alespoň přibližně 12 až přibližně 30 nukleotidů komplementárních k uvedené 5' hemisondové sekvenci.

61. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 60, kde uvedený kódující primer obsahuje alespoň přibližně 9 až přibližně 35 nukleotidů komplementárních k uvedené stopce uvedené sekvence vlásenky se smyčkou 3' k uvedeným nukleotidům komplementárním k uvedené 5' hemisondové sekvenci.

62. Kompozice podle kteréhokoliv z nároků 49 až 61, **vyznačující se tím**, že uvedený kódující primer má T_m přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia.

63. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 62, kde uvedený primer vlásenky se smyčkou amplifikuje uvedenou mutantní polynukleotidovou sekvenci alespoň přibližně 10násobně, alespoň přibližně 100násobně, alespoň přibližně 1000násobně, alespoň přibližně 10 000násobně, alespoň přibližně 100 000násobně nebo alespoň přibližně 1 000 000násobně výhodně oproti uvedené polynukleotidové sekvenci divokého typu.

64. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 63, kde uvedená 5'-hemisondová sekvence obsahuje délku přibližně 7 až přibližně 22 nukleotidů.

65. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 64, kde uvedená 3' hemisondová sekvence obsahuje délku přibližně 3 až přibližně 9 nukleotidů.

66. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 65, vyznačující se tím, že uvedená 3' hemisondová sekvence má T_m přibližně 30 až 40 stupňů nebo uvedená 5' hemisondová sekvence má T_m přibližně 60 až 75 stupňů.

67. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 66, kde uvedená sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje délku přibližně 15 nukleotidů nebo více.

68. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 67, **vyznačující se tím**, že uvedená sekvence vlásenky se smyčkou je konfigurována tak, aby měla T_m přibližně 55 až přibližně 75 stupňů Celsia.

69. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 68, kde smyčka uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje alespoň přibližně 1 až alespoň přibližně 20 nukleotidů na délku.

70. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 49 až 69, **vyznačující se tím**, že smyčka uvedené sekvence vlásenky se smyčkou obsahuje barkód.

71. Kompozice podle nároku 49, vyznačující se tím, že uvedený primer vlásenky se smyčkou, uvedený kódující primer nebo uvedený antikódující primer obsahuje kteroukoli ze SEKV ID Č: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 48, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 64, 65, 66, 67, 68, 71 nebo 72.

72. Způsob zpracování sekvence DNA, která má nebo je v podezření z toho, že má methylovaný cytosin na konkrétním zbytku, přičemž způsob zahrnuje:

spojení v reakční směsi vhodné pro zpracování uvedené sekvence DNA:

(i) uvedené sekvence DNA, kde uvedená sekvence DNA byla ošetřena bisulfitem a obsahuje uracil na cytosinovém zbytku, který nebyl před uvedeným bisulfitovým ošetřením nemethylován; a

(ii) prvního primeru vlásenky se smyčkou, který obsahuje:

5' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s komplementárním prvním koncovým regionem uvedené DNA sekvence;

sekvenci vlásenky se smyčkou; a

3' hemisondovou sekvenci nakonfigurovanou tak, aby hybridizovala s druhou koncovou oblastí uvedené DNA sekvence,

kde 3' koncová část uvedené 3' hemisondové sekvence obsahuje nukleotid komplementární k uvedenému uracilu, ale ne komplementární k uvedenému cytosinovému zbytku.

73. Způsob podle nároku 72, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje inkubaci uvedené reakční směsi za podmínek vhodných k prodloužení produktu obsahujícího uvedenou 3' hemisondovou sekvenci.

74. Způsob podle nároku 73, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje spojení v uvedené reakční směsi vhodné pro zpracování uvedeného produktu obsahujícího uvedenou 3' hemisondovou sekvenci: antikódujícího primeru konfigurovaného tak, aby hybridizoval s 3' genomickou oblastí z uvedené neshody.

75. Způsob podle nároku 74, **vyznačující se tím**, že antikódující primer má T_m přibližně 50 až 70 stupňů Celsia.

76. Způsob kteréhokoliv z nároků 74 až 75, dále zahrnující inkubaci uvedené reakční směsi vhodné pro zpracování uvedeného produktu obsahujícího uvedenou 3' hemisondovou sekvenci 3' za podmínek vhodných pro produkci produktů prodloužení z antikódujícího primeru.

77. Způsob podle nároku 76, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje spojení v reakční směsi vhodné pro zpracování uvedeného produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru: uvedeného produktu obsahujícího uvedenou sekvenci antikódujícího primeru; a kódujícího primeru konfigurovaného pro hybridizaci s: (i) alespoň částí uvedené 5' hemiprobové sekvence; a s (ii) alespoň částí kmene uvedené sekvence vlásenky se smyčkou

78. Způsob podle nároku 77, **vyznačující se tím**, že kódující primer obsahuje alespoň přibližně 12 až přibližně 30 nukleotidů komplementárních k uvedené sekvenci 5' hemisondové sekvence.

5 79. Způsob podle nároku 78, **vyznačující se tím**, že kódující primer obsahuje alespoň přibližně 9 až přibližně 35 nukleotidů komplementárních k uvedenému kmeni sekvence vlásenky se smyčkou 3' sekvence 3' k uvedeným nukleotidům komplementárním k uvedené sekvenci 5' hemisondy.

80. Způsob podle kteréhokoli z nároků 77 až 79, **vyznačující se tím**, že kódující primer má T_m přibližně 50 až přibližně 70 stupňů Celsia.

10 81. Způsob podle kteréhokoli z nároků 77 až 80, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje inkubaci uvedené reakční směsi vhodné pro zpracování uvedeného produktu obsahujícího sekvenci antikódujícího primeru za podmínek vhodných pro produkci produktů prodloužení z uvedeného kódujícího primeru.

82. Způsob podle kteréhokoli z nároků 72 až 81, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje poskytnutí uvedené sekvence DNA.

15 83. Způsob podle nároku 82, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje ošetření uvedené sekvence DNA bisulfitem před uvedeným spojením.

84. Způsob podle kteréhokoli z nároků 81 až 83, **vyznačující se tím**, že uvedená inkubace zahrnuje PCR reakci, qPCR reakci, dPCR reakci, ddPCR reakci nebo sekvenační reakci.

20 výkresů

20

Uspořádání reakcí pro optimalizaci koncentrace primeru ACTN3

F	WT gBlock	MUT gBlock	Mix gBlock	gDNA		NTC
50 nM	45	25,9	26,1	29,2		45
25 nM	45	25,3	25,3	28,4		45
10 nM	45	25,5	25,6	28,6		45
5 nM	45	26,3	26,4	29,4		45

HEX (WT sonda)

F	WT gBlock	MUT gBlock	Mix gBlock	gDNA		NTC
50 nM	26,1	42,1	26,7	29,6		45,0
25 nM	25,8	45,0	26,2	29,2		45,0
10 nM	26,2	45,0	26,8	29,6		45,0
5 nM	27,0	45,0	27,6	30,5		45,0

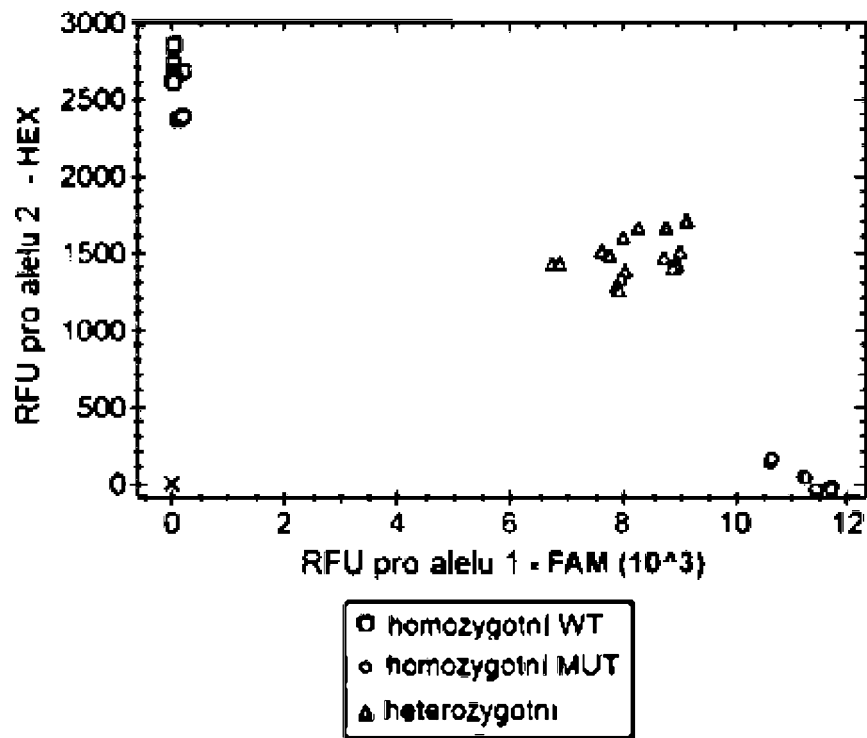
 ΔCq (HEX-FAM)

HEX-FAM	ΔWT	ΔMUT	ΔMIX	$\Delta gDNA$	ΔNTC
50 nM	-18,9	16,1	0,6	0,4	-
25nM	-19,2	19,7	0,9	0,7	-
10nM	-18,8	19,5	1,2	1,0	-
5nM	-18,0	18,7	1,2	1,1	-

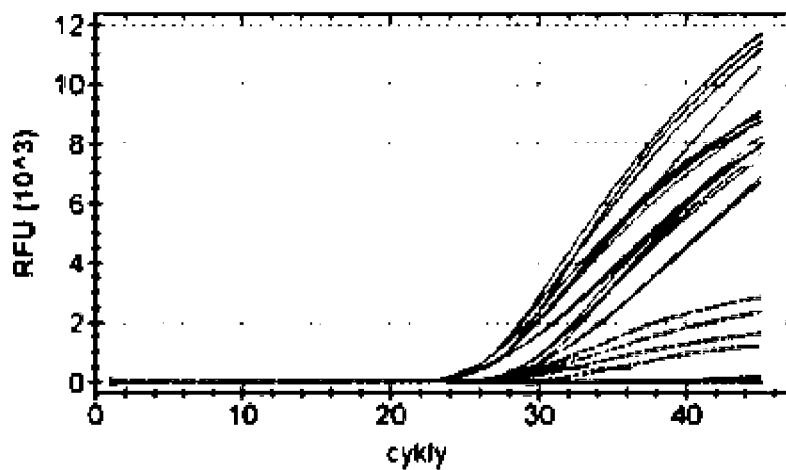
Obr. 2A

stopy qPCR pro optimalizaci koncentrace primeru ACTN3

alelická diskriminace



amplifikace



Obr. 2B

Uspořádání reakcí pro optimalizaci koncentrace primeru NRAS

FAM (mutantová sonda)

F	WT gBlock	MUT gBlock	Mix gBlock	gDNA		NTC
400 nM	45	31,5	33,8	45,0		45
50 nM	45	27,2	28,4	45,0		45
25 nM	45	27,4	28,8	45,0		45
10 nM	45	28,5	29,7	45,0		45
5 nM	45	29,3	30,1	45,0		45

HEX (WT sonda)

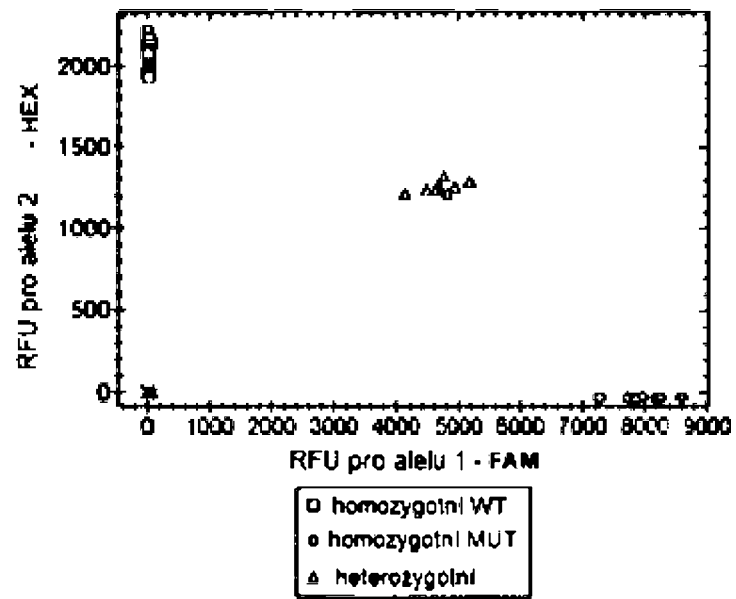
F	WT gBlock	MUT gBlock	Mix gBlock	gDNA		NTC
400 nM	36,3	45,0	40,2	36,9		45,0
50 nM	36,5	45,0	29,7	29,1		45,0
25 nM	28,7	45,0	30,0	29,3		45,0
10 nM	29,5	45,0	30,8	30,3		45,0
5 nM	30,3	45,0	31,2	31,1		45,0

ΔCq (HEX-FAM)

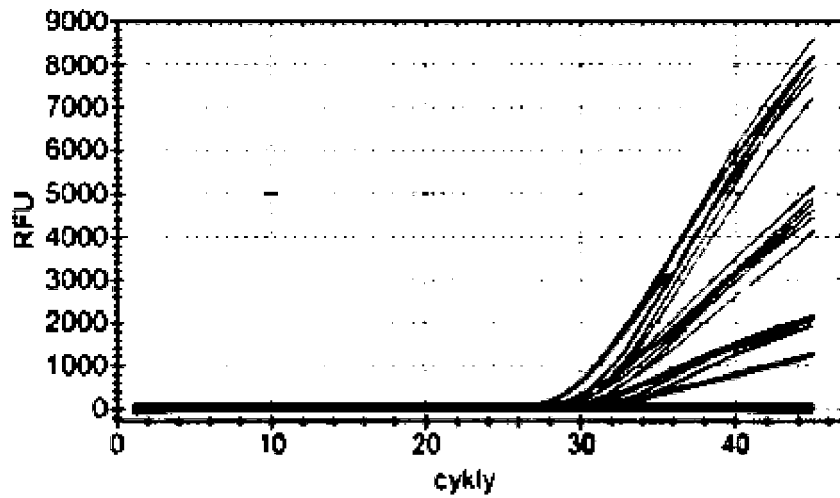
HEX-FAM	ΔWT	ΔMUT	ΔMIX	$\Delta gDNA$	ΔNTC
400 nM	-8,7	13,5	6,5	-8,1	0,0
50 nM	-16,5	17,8	1,3	-15,9	0,0
25 nM	-16,3	17,6	1,1	-15,7	0,0
10 nM	-15,5	16,5	1,1	-14,7	0,0
5 nM	-14,7	15,7	1,1	-13,9	0,0

Obr. 3A

štopy qPCR pro optimalizaci koncentrace NRAS primeru
alelická diskriminace



amplifikace



Obr. 3B

(A)

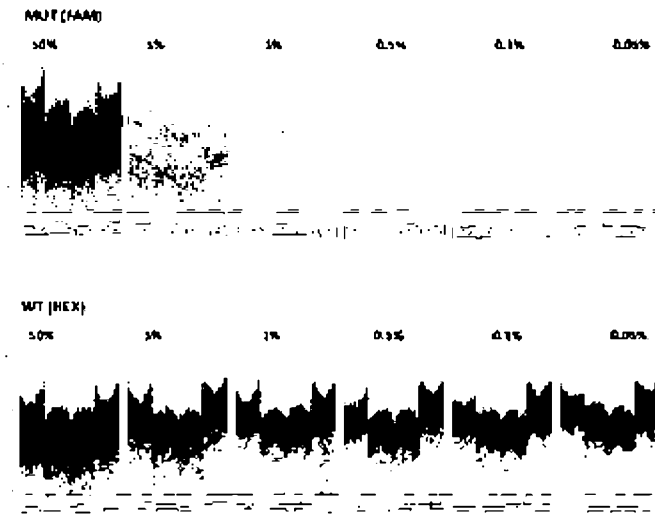
	per rxn	per rxn	
WT	2,00E+05		
Mut	2,00E+05		
směs 50 50	1,00E+05	1,00E+05	50%
smíšené 90 10	1,80E+05	2,00E+04	10%
smíšené 95 5	1,90E+05	1,00E+04	5%
smíšené 99 1	1,98E+05	2000	1%
smíšené 99 5 0 5	199000,00	1000	0,50%
smíšené 99 9 0 1	199800,00	200	0,10%

(B)

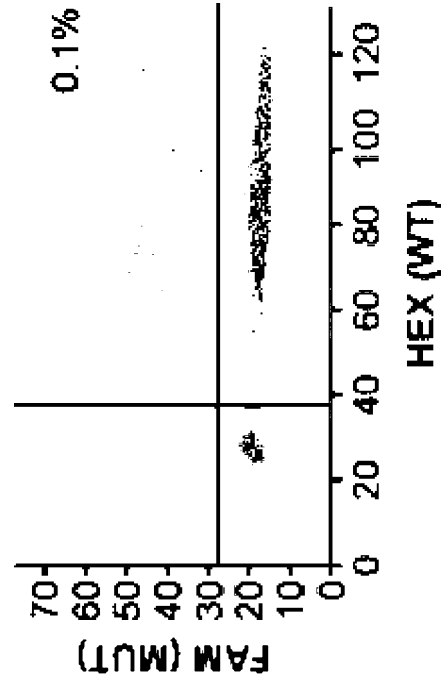
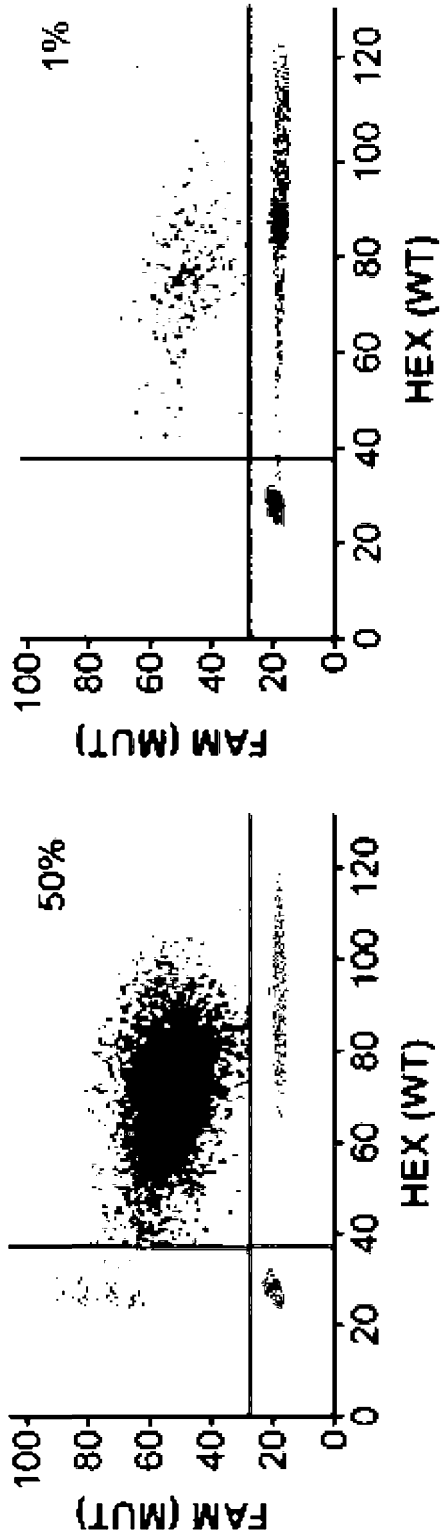
	ΔWT	ΔAMT	směs 50:50	smíšené 10%	smíšené 5%	smíšené 1%	smíšené 0,5%	smíšené 0,2%	gDNA	ATC
WT směs	FAA	23,1	21,6	25,2	26,0	31,6	34,9	41,2	29,1	45
WT směs	MCI	23,0	47,0	24,8	23,4	23,2	23,2	23,1	31,4	10
WT směs	FAA	26,4	24,5	29,7	31,7	34,8	38,4	42,4	29,1	45
WT směs	MCI	26,4	47,0	31,5	29,2	30,4	28,2	29,8	29,4	10

Obr. 4

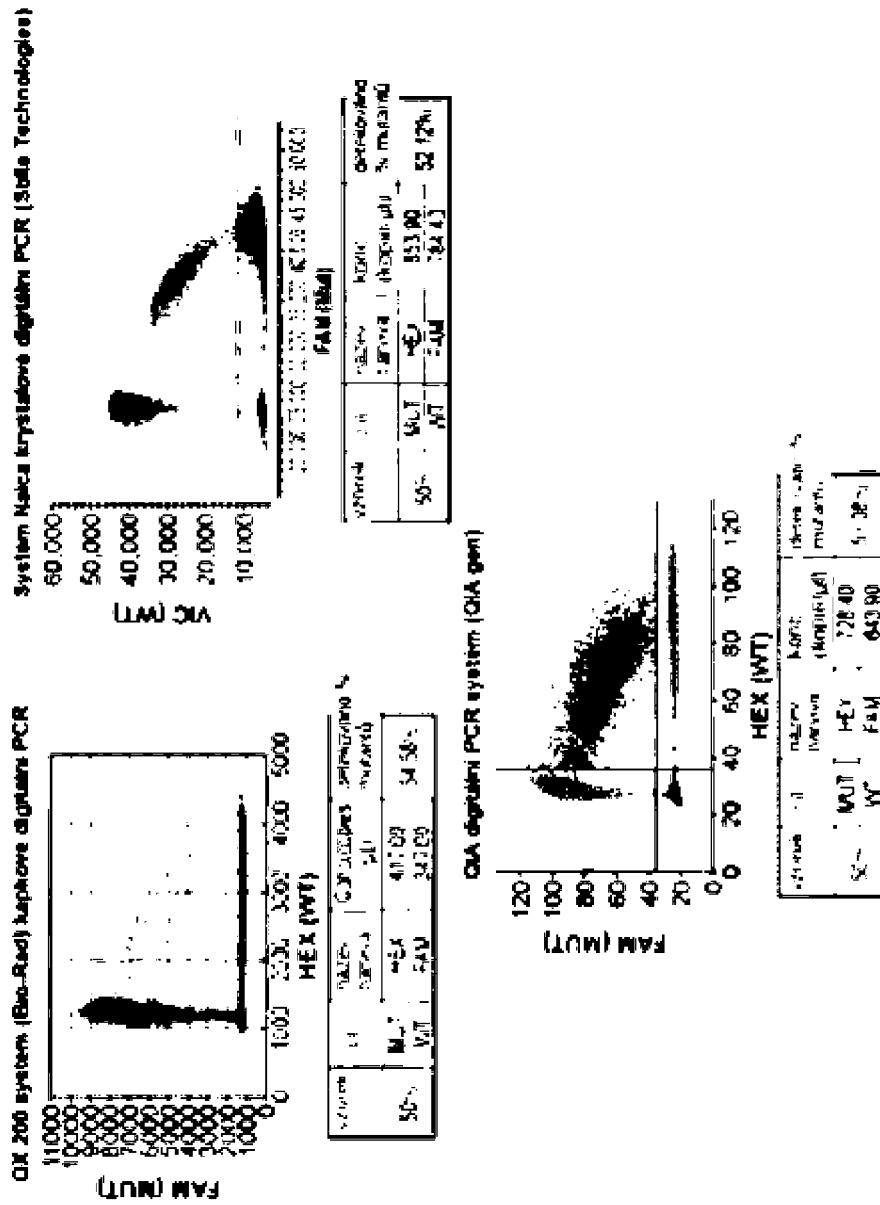
(B)



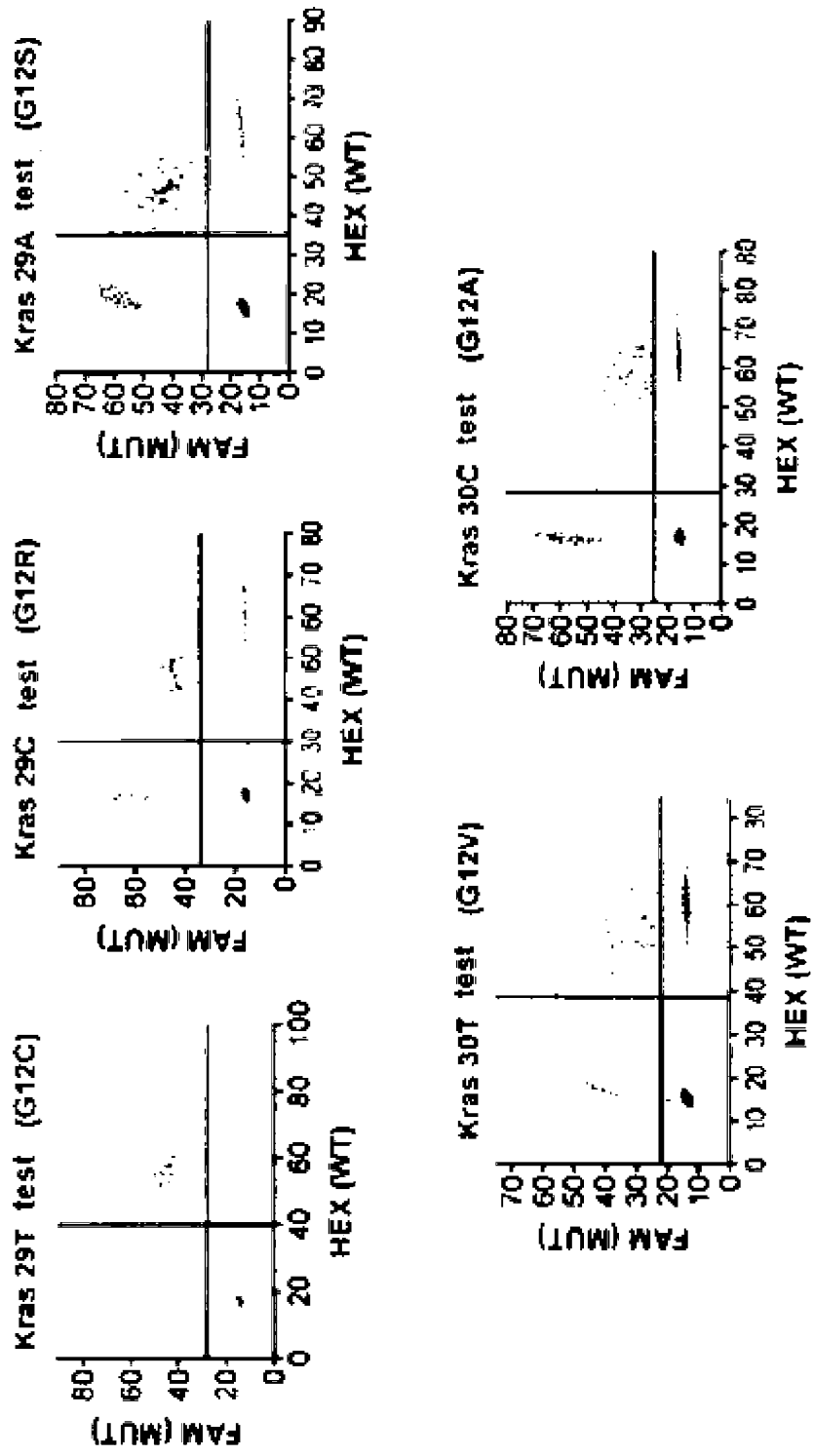
Obr. 5



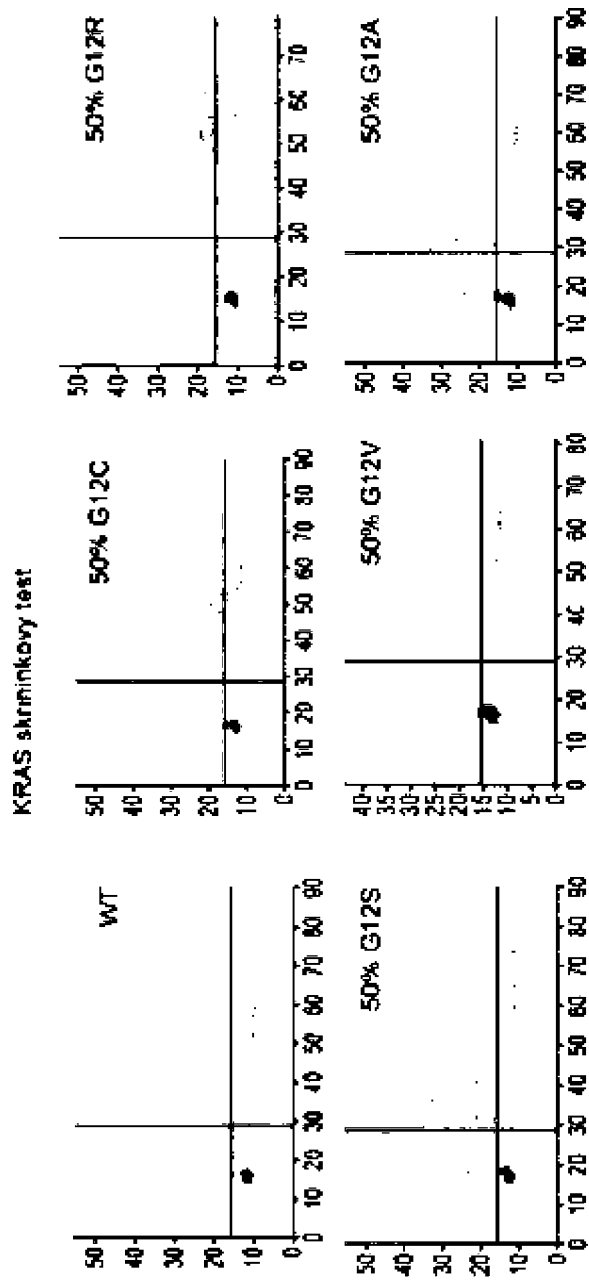
Obr. 5C



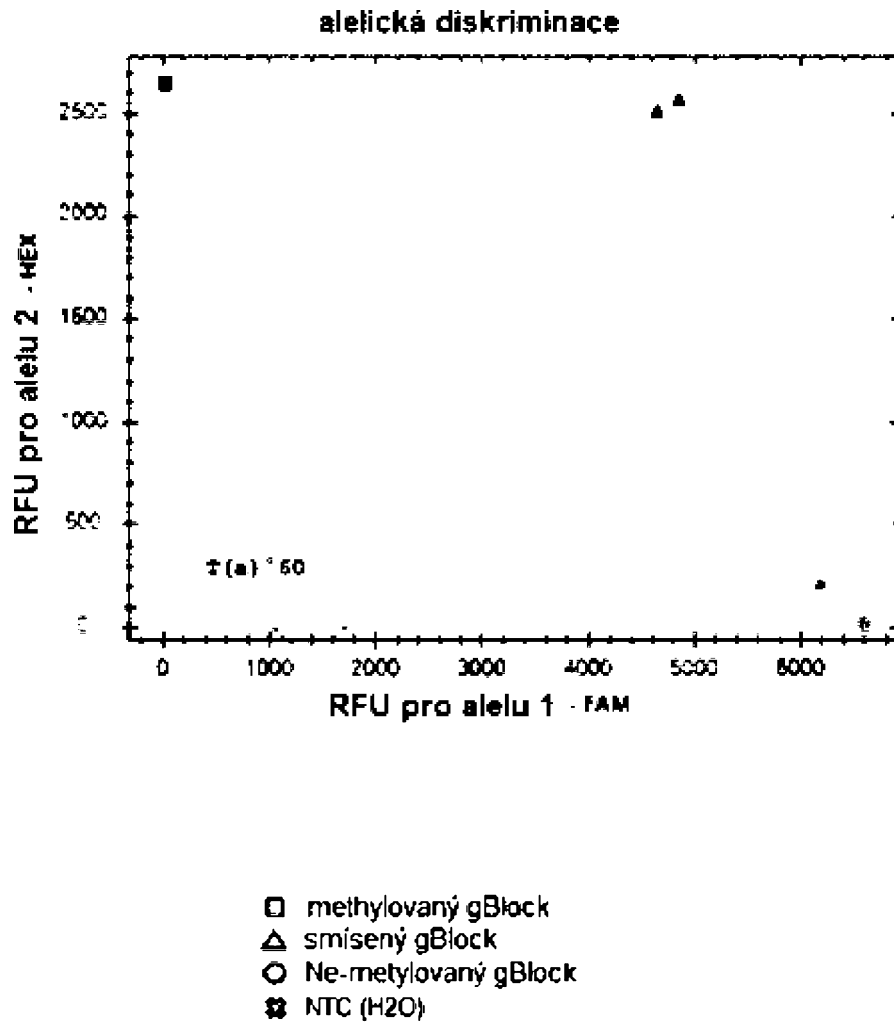
Obr. 5D



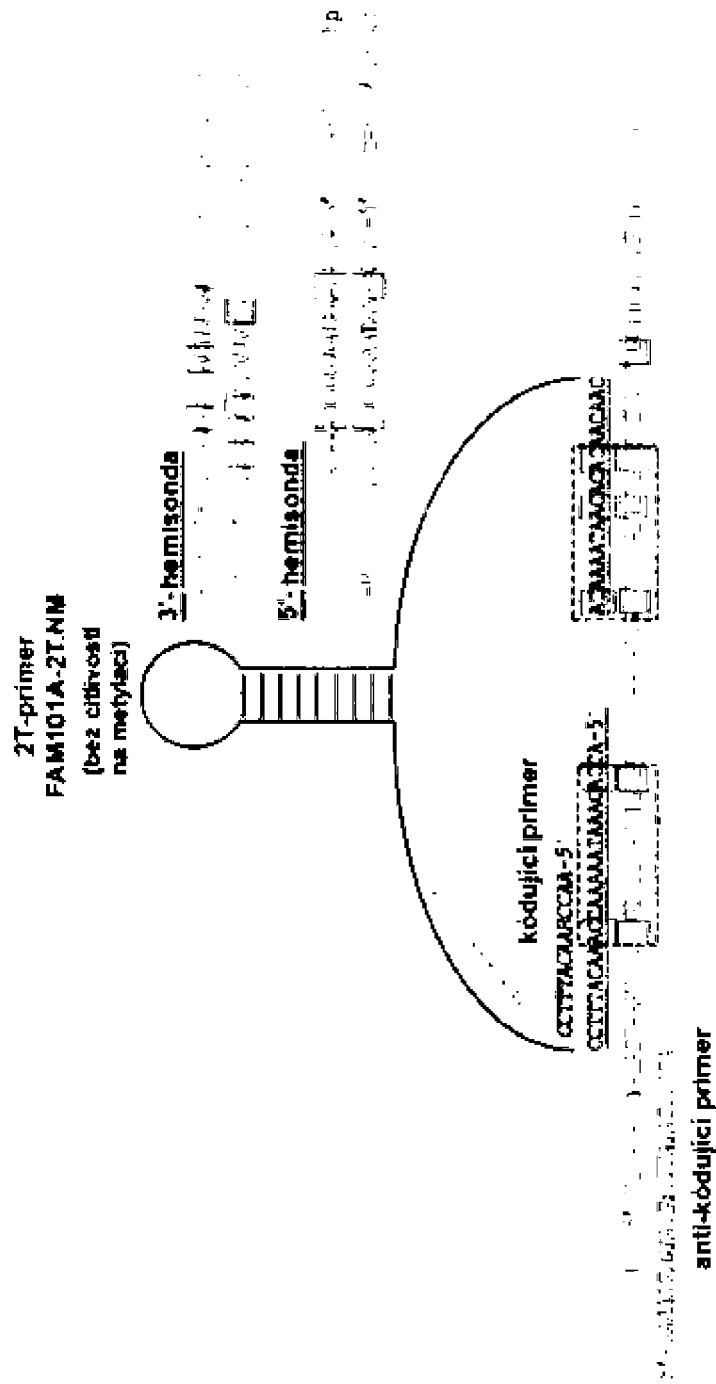
Obr. 6



Obr. 7

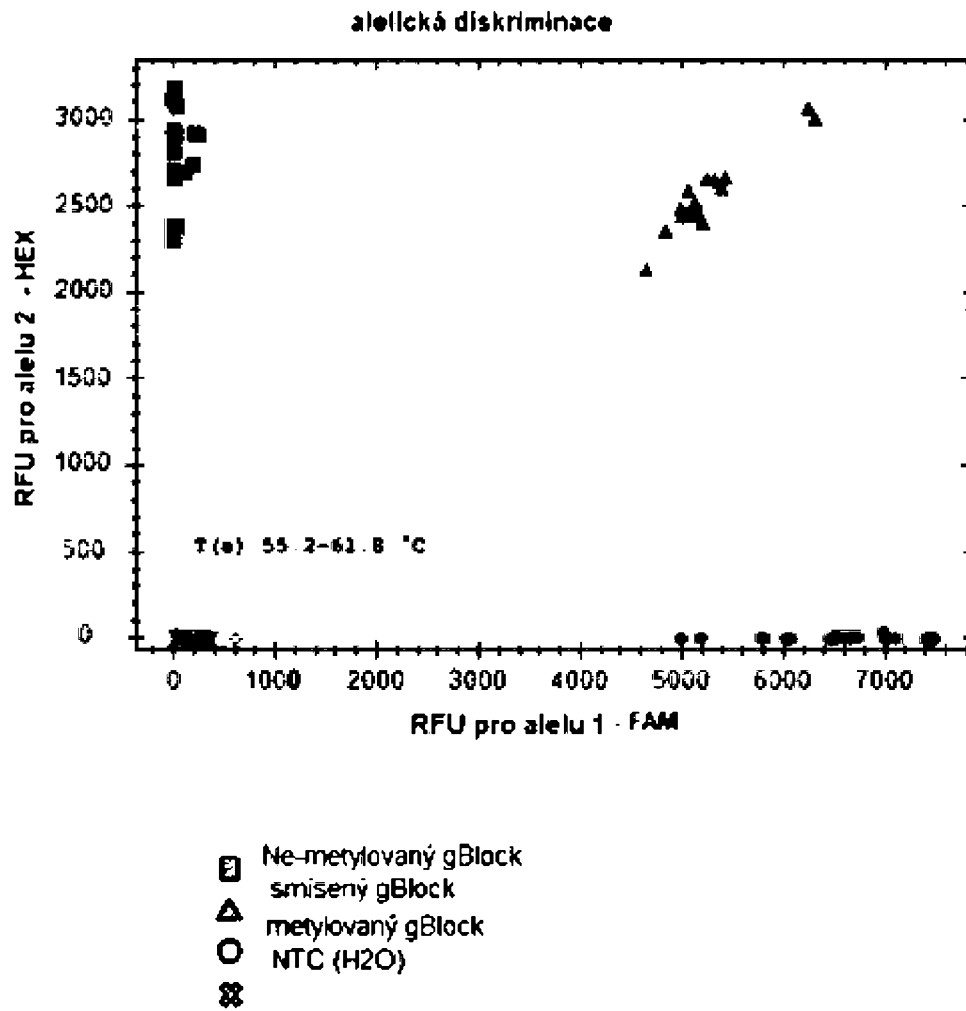


Obr. 8



Obr.9A

(B)



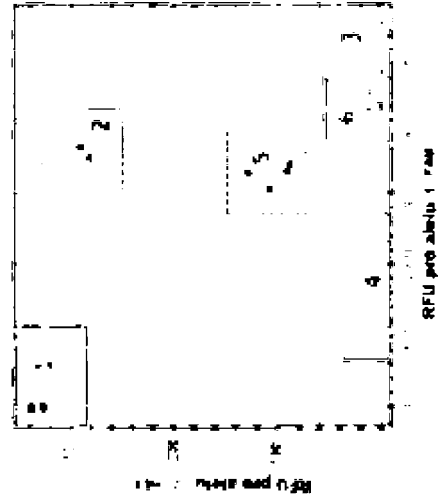
Obr. 9

(A)

vzorky CORO6-test :

1. M.gB CORO6
2. Mix.gB CORO6
3. NM.gB CORO6
4. NTC
5. srdce (2 jediné vzorky)
6. WBCs (2 jediné vzorky)

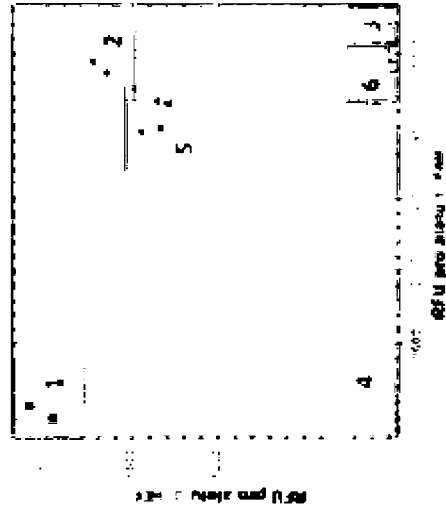
CORO6 alelická diskriminace



vzorky FAM101A-test :

1. NM.gB CORO6
2. Mix.gB CORO6
3. M.gB CORO6
4. NTC
5. srdce (2 jediné vzorky)
6. WBCs (2 jediné vzorky)

FAM101A alelická diskriminace



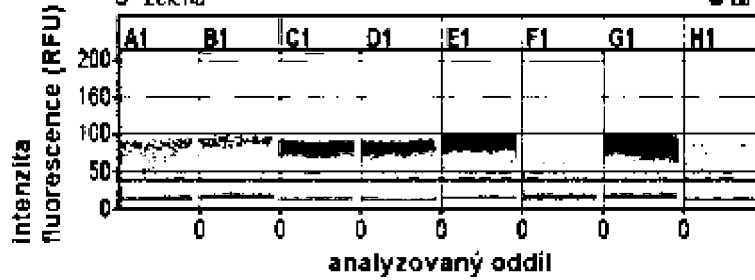
Obr. 10

FAM101A 2T-PCR test

55°C, 45s anealing, 45 cyklů

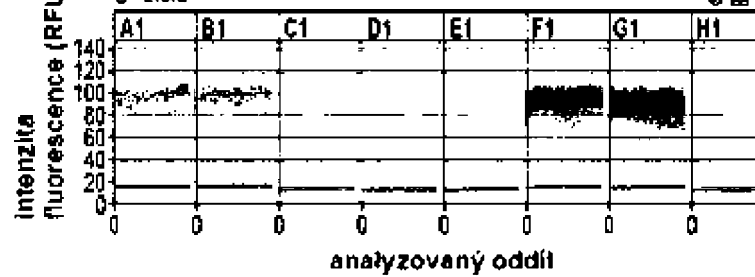
srdce 1	srdce 2	WBC 1	WBC 2	IM, gBlock	NM, gBlock	Mix, gBlock	NTC
---------	---------	-------	-------	------------	------------	-------------	-----

metylované (8 jamek) přidat ke zprávě
 o zelená



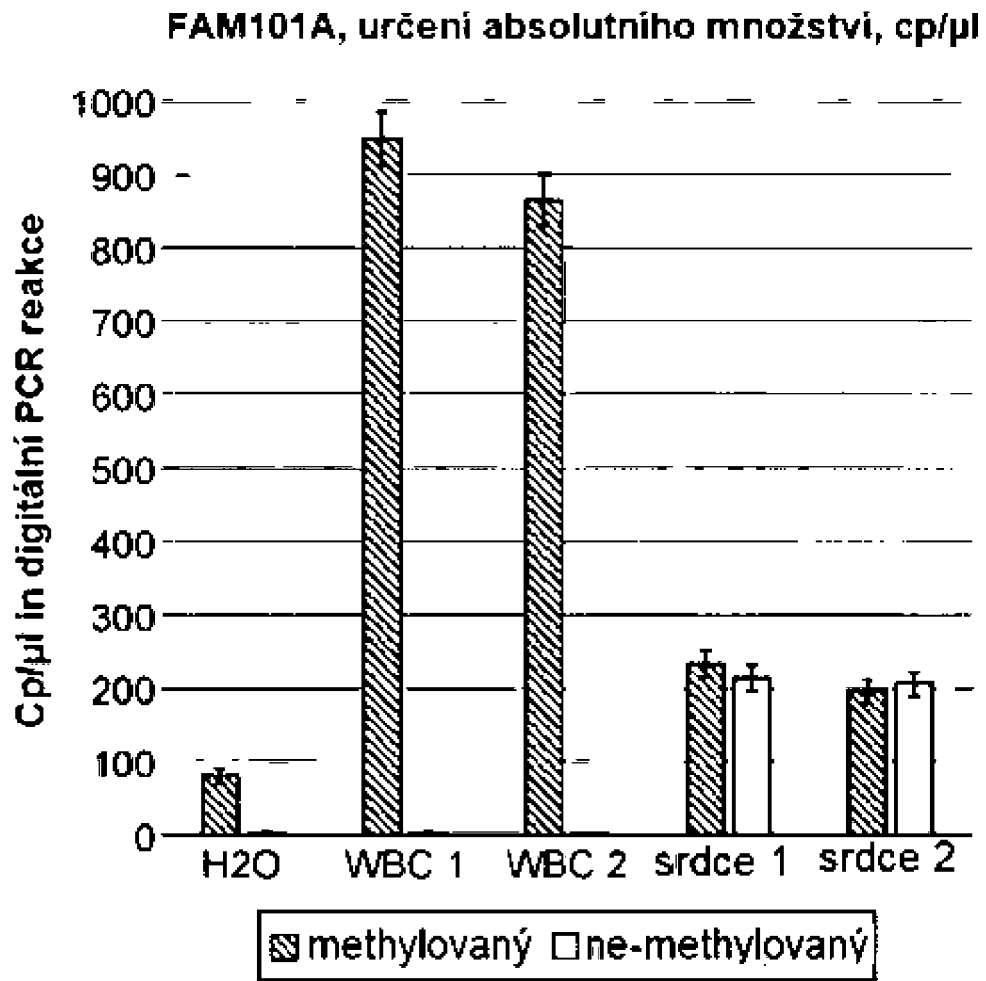
FAM detekuje metylovaný cíl (bílé krvinky ale také v srdci)

ne-metylované (8 jamek) přidat ke zprávě
 o žlutá

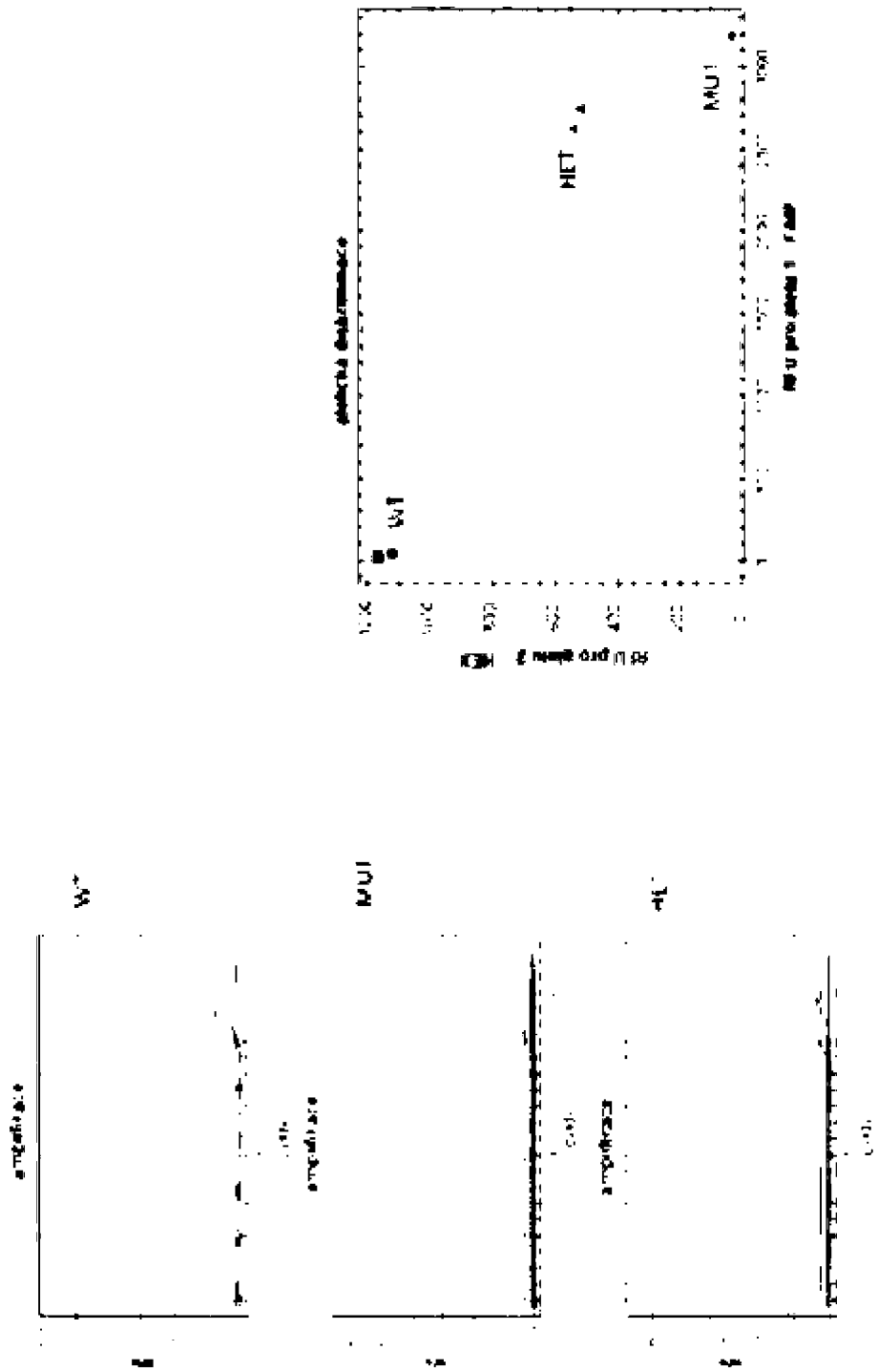


FAM detekuje ne-metylovaný cíl (srdeční tkáň)

Obr. 10B



Obr. 10B (pokračování)



Obr. 11