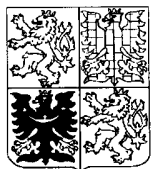


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30.09.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **30.09.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/98307985**
(33) Země priority: **EP**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.09.2001**
(Věstník č. 9/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/GB99/03248**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/18957**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 1183

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 Q 1/68

(71) Přihlašovatel:
APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.
V., Curaçao, AN;

(72) Původce:
Adessi Céline, Ambilly, FR;
Kawashima Eric, Nyon, CH;
Mayer Pascal, Eloise, FR;
Mermod Jean-Jacques, Geneva, CH;
Turcatti Gerardo, Geneva, CH;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob amplifikace a sekvenování nukleové
kyseliny**

(57) Anotace:

Popisují se způsoby amplifikace a sekvenování alespoň jedné nukleové kyseliny zahrnující: 1) tvorbu alespoň jednoho templátu nukleové kyseliny obsahující kyselinu(y), které se amplifikují nebo sekvenují, kde uvedená nukleová kyselina(y) obsahuje na 5'konci oligonukleotidovou sekvenci Y a na 3'konci oligonukleotidovou sekvenci Z a dále nesou na 5'konci prostředek pro zachycení nukleové kyseliny (kyselin) na pevný podklad, 2) smíchání templátu(ů) uvedené nukleové kyseliny s jedním nebo více koloniovými primery X, které se mohou hybridizovat s oligonukleotidovou sekvencí Z a na 5'konci nesou prostředek pro zachycení koloniových primerů na pevný podklad, 3) provedení jedné nebo více amplifikačních reakcí vázaného templátu(ů) nukleové kyseliny tak, že vznikají kolonie nukleové kyseliny, přičemž se uskuteční alespoň jeden krok stanovení sekvence jedné nebo více vytvořených kolonií nukleové kyseliny. V těchto způsobech se používají pevné podklady, sady a přístroje.

Způsoby amplifikace a sekvenování nukleové kyseliny

Oblast techniky

Vynález popisuje amplifikaci nukleové kyseliny a její sekvenování. Specificky se vynález vztahuje k metodám amplifikace a sekvenování nukleové kyseliny a k přístrojům a sadám, které jsou použitelné při amplifikaci a sekvenování ve velkém měřítku s velkým množstvím zpracovávaného materiálu.

Dosavadní stav techniky

Analýza sekvence nukleové kyseliny je základem při mnoha aktivitách v biologii, biotechnologii a v medicíně. Schopnost stanovit sekvenci nukleové kyseliny se stává důležitějším se vzrůstajícími potřebami stanovit sekvence velkých genomů u lidí a jiných vyšších organismů a také při detekci polymorfizmu jediného nukleotidu a testování a monitorování exprese genu. Genetické informace získané sekvenováním se mohou použít v mnoha oblastech, jako je například objev cílených léků a diagnóza onemocnění a posouzení nebezpečí a identifikace organismu a jeho charakterizace.

Prvním krokem takového použití je stanovení aktuálního chemického prostředku nukleových kyselin, přesněji stanovení výskytu čtyř bází, které obsahuje nukleová kyselina. Jsou to adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a thymin (T) nebo uracil (U). Takové použití však vyžaduje sekvenování nukleových kyselin ve velkém měřítku, což činí metody sekvenování vhodné pro zpracování velkého množství materiálu velmi žádané.

Metody sekvenování nukleové kyseliny se popisují v dosavadním stavu techniky. Dvě metody nejčastěji používané jsou metody chemického štěpení podle Maxama a Gilberta, které vznikají na základě specifické chemie bází a v současné době je velmi populární metoda sekvenování podle Sangera, která je

založena na principu zakončení enzymatického řetězce a používá se jako rutinní metoda při sekvenaci nukleové kyseliny.

Při sekvenování podle Sangera se každá sekvenovaná nukleová kyselina replikuje v reakci, která obsahuje polymerázu DNA, deoxynukleotidové trifosfáty (dNTP) a dideoxynukleotidové trifosfáty (ddNTP). DNA polymeráza může začlenit dNTP a ddNTP do rostoucího řetězce DNA. V případě, že se ddNTP začlení, 3' konec rostoucího řetězce DNA nevykazuje hydroxylovou skupinu a neexistuje substrát pro prodloužení řetězce, tak se zakončí řetězec nukleové kyseliny. Protože jedna určitá reakce zahrnuje jeden typ ddNTP, vzniká směs nukleových kyselin s různou délkou, přičemž všechny nukleové kyseliny jsou zakončeny ddNTP. Obvykle se vytvoří oddělené reakce v případě každého ze čtyř typů ddNTP a vzniklá distribuce délek fragmentů nukleových kyselin se analyzuje elektroforézou na denaturačním gelu (kde se fragmenty nukleové kyseliny rozdělí podle své velikosti) nebo hmotnostní spektroskopií. Je obvyklé, aby se jeden nebo více deoxynukleotidtrifosfátů obsažený v reakční směsi značil, což umožňuje detekci fragmentů různých délek.

S hora popsané metody jsou nevýhodné, protože každá sekvenovaná nukleová kyselina se musí zpracovat jednotlivě během biochemické reakce. Gelová elektroforéza je nepohodlná, pracná a pomalá, dokonce, když se použije kapilární elektroforéza, není úplně vhodná pro sekvenování ve velkém měřítku, kdy se zpracovává velké množství materiálu. Navíc následné stanovení sekvence je obtížné. Hmotnostní spektroskopie je stále na úrovni prototypu a vyžaduje velmi drahé zařízení a každý vzorek se musí analyzovat jednotlivě.

Jeden způsob zvýšení množství zpracovávaného materiálu je paralelní způsob zpracování vzorků. Metody použití hybridizace DNA sond nukleové kyseliny umožňují sdružování procesu během

biochemických a elektroforetických procesů, přičemž ale rostou náklady a délka trvajících manipulací.

Dále jsou dostupné metody založené na čípech DNA a DNA hybridizaci (popisuje se v publikaci Thomas and Burke Exp. Opin. Ther. Patents 8: 503-508 (1998)). Tyto metody nejsou výhodné, protože v případě každé aplikace se musí navrhnout a vyrobit čip DNA. Je to dlouho trvající operace a cena jednoho čipu klesne pouze tehdy, jestliže je nutné vyrobit velké množství čipů. Čipy nelze použít více jak jednou a pro jeden vzorek nukleové kyseliny je určen jeden čip. To je nevýhodné, protože, má-li se diagnostikovat pacient, měly by se jeho vzorky dít zpracovat v každém okamžiku. Nakonec rozsah sekvence, která se má analyzovat za použití takového čipu, je omezen na méně než 100 000 bazí a je také omezen druhem použití, jako je například genotypování DNA a profily exprese genů.

Během nejznámějších metod analýzy sekvence nukleové kyseliny, amplifikace nukleových kyselin je nutný krok za účelem získání nukleové kyseliny v množství, které je dostatečné pro analýzu.

Několik metod amplifikace nukleových kyselin je dobře známých v oboru a jsou dokumentovány v dosavadním stavu techniky. Nukleové kyseliny se například amplifikují začleněním nukleové kyseliny do konstrukce expresivního vektoru. Takové vektory se pak mohou začlenit do vhodné biologické hostitelské buňky a vektor DNA zahrnující nukleovou kyselinu se pomnoží kultivací biologického hostitele za použití dobře zavedeného protokolu.

Nukleové kyseliny amplifikované za použití uvedených metod se mohou izolovat z hostitelských buněk za použití metod, které jsou dobře známy v oboru. Takové metody jsou však

nevýhodné, protože jsou časově náročné, pracné a těžko automatizovatelné.

Metoda amplifikace DNA pomocí PCR se popisuje od roku 1985 (v popisu se v publikaci Saiki et al., Science 230, 1350-1354) a je nyní metodou velmi známou a dobře zdokumentovanou. Cílový fragment nukleové kyseliny se může amplifikovat za použití dvou krátkých oligonukleotidových sekvencí (obvykle se nazývají primery), které jsou specifické pro známé sekvence, které lemují sekvenci DNA, jež se amplifikuje. Primery hybridizují s opačnými řetězci dvouřetězcového fragmentu DNA po té, co se denaturovaly a jsou orientovány tak, že dochází k syntéze DNA v oblasti mezi dvěma primery pomocí DNA polymerázy, přičemž sekvence primerů se prodlužují začleněním nukleotidů do sekvence pomocí polymerázy. Extenzní reakce vytvářejí dvě dvouřetězcové cílové oblasti, kdy každá se opět denaturuje a je tak připravena pro další cyklus hybridizace a extenze. Třetí cyklus produkuje dvě dvouřetězcové molekuly, které obsahují cílovou oblast ve dvouřetězcové formě. Pomocí opakovaných cyklů teplotní denaturace, hybridizace primerů a extenze dochází k rychlé exponenciální akumulaci specifického cílového fragmentu DNA. Tato metoda probíhá v roztoku a amplifikovaný fragment cílové nukleové kyseliny se izoluje z roztoku metodami, které jsou dobře známy v oboru. Je to například gelová elektroforéza.

Popisují se metody, které používají jeden primer zachycený na povrchu podkladu ve spojení s volnými primery obsaženými v roztoku. Tyto metody umožňují současnou amplifikaci a zachycení produktu PCR na povrchu podkladu (popisuje se v publikaci Oroskar, A.A. et al., Clinical Chemistry 42: 1547 (1996)).

Dokumenty WO 96/04404 a WO 98/36094 (Mosaic Technologies, Inc. et al.) popisují způsob detekce cílové nukleové kyseliny

ve vzorku, který obsahuje cílovou nukleovou kyselinu. Metoda zahrnuje vyvolání amplifikace cílové nukleové kyseliny založené na PCR, pouze když cílová nukleová kyselina je přítomna v testovaném vzorku. V případě amplifikace cílové sekvence jsou oba primery připojeny na pevný povrch, což zaručuje, že amplifikované sekvence cílové nukleové kyseliny jsou také zachyceny na pevném podkladu. Amplifikační postup popsáný v tomto dokumentu se také někdy nazývá metoda „bridge amplification“. V případě uvedené metody se specificky navrhnu dva primery, jako pro běžné PCR, přičemž primery lemují určitou cílovou sekvencí DNA, která se amplifikuje. Tak v případě, že určitá cílová nukleová kyselina je přítomna ve vzorku, pak se cílová nukleová kyselina může hybridizovat s primery a amplifikovat se pomocí PCR. První krok při tomto postupu amplifikace PCR je hybridizace cílové nukleové kyseliny s prvním specifickým primerem zachyceným na podpoře („primer 1“). První amplifikační produkt, který je komplementární s cílovou nukleovou kyselinou se pak tvoří extenzí sekvence primeru 1. Při vystavení podkladu denaturačním podmínkám se uvolní cílová nukleová kyselina a může se pak účastnit dalších hybridizačních reakcí se sekvencemi primeru 1, které jsou zachyceny na podkladu. První amplifikační produkt, který je zachycen na podkladu se pak může hybridizovat s druhým specifickým primerem („primer 2“) zachyceným na podkladu a druhý amplifikační produkt obsahující sekvenci nukleové kyseliny komplementární s prvním amplifikačním produktem se může tvořit extenzí sekvence primeru 2 a je také zachycený na podkladu. Tak cílová nukleová kyselina prvního a druhého amplifikovaného produktu je schopna se podílet na pluralitě hybridizačního procesu a procesu prodloužení, která je limitována pouze přítomností cílové nukleové kyseliny a počtem sekvencí primeru 1 a primeru 2 a výsledek je počet kopií cílové sekvence připojené na povrchu.

Protože při tomto procesu se tvoří amplifikační produkty pouze, když je přítomna cílová nukleová kyselina, podklad se monitoruje za účelem zjištění, zda je přítomen jeden nebo více amplifikačních produktů, což indikuje přítomnost nebo nepřítomnost specifické cílové sekvence.

Mozaiková metoda se může použít k dosažení množství multiplexování tak, že několik různých cílových sekvencí nukleové kyseliny se může amplifikovat současně sestavením různých sad pro první a druhý primer, které jsou specifické pro každou odlišnou sekvenci cílové nukleové kyseliny v různých oblastech pevného povrchu.

Nevýhodou mozaikového postupu je to, že jak sekvence prvního tak druhého primeru jsou specifické pro každou amplifikovanou cílovou nukleovou kyselinu. To je možné použít pouze při amplifikaci známé sekvence. Navíc množství materiálu je omezeno počtem různých sad specifických primerů a následně amplifikované molekuly cílové nukleové kyseliny, které se mohou sestavit do odlišných oblastí daného pevného podkladu a uspořádání nukleových kyselin do vzdálených oblastí je časově náročné. Mozaikový proces vyžaduje, aby se dva různé primery homologicky zachytily svými 5'konci k podkladu ve vzdálených oblastech, kde se tvoří amplifikovaný produkt. Toho se nedá dosáhnout současně dostupnou technologií výroby čipů DNA a je nutné použít některé způsoby dispenzace vzorků. Tak hustota, které lze dosáhnout tímto přístupem vykazuje některá omezení jako jiné klasické technologie uspořádání. Další omezení je rychlost monitorování jednotlivých vzdálených oblastí na podkladu za účelem zjištění přítomnosti nebo nepřítomnosti amplifikovaných cílových nukleových kyselin.

Uspořádání vzorků DNA se v klasickém případě provede na membránách (například nylonové nebo nitrocelulózové membrány). Použití vhodné robotiky (například Q-bot™, Genetix Ltd, Dorset

BH23 3TG UK) umožňuje získat hustotu až 10 vzorků/mm². Při takových metodách se DNA kovalentně váže na membránu fyzikálněchemickým způsobem (například UV radiací) a je tak možné uspořádat velké molekuly DNA (například molekuly, které jsou tvořeny více jak 100 nukleotidy), stejně jako menší molekuly DNA, jako jsou oligonukleotidové primery.

Jsou známy také jiné postupy, které umožňují získat uspořádání s vyšší hustotou oligonukleotidů. Například přístupy založené na předem uspořádaných skleněných podložních skličkách, kde se uspořádání reaktivních ploch získalo použitím technologie „ink-jet“ (popisuje se v publikaci Blanchard, A. P. and L. Hood, *Microbial and Comparative Genomics*, 1: 225 (1996) nebo uspořádání reaktivních polyakrylových gelů (popisuje se v publikaci Yershov, G et al., *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 93: 4913-4918 (1996)) umožňuje teoreticky uspořádat až 100 vzorků na jednom mm².

Vyšší hustota vzorků je stále dosažitelná použitím čipů DNA (popisuje se v publikaci Fodor, S. P. A. et al., *Science* 251: 767 (1991)). V současné době se v oboru molekulární biologie používají čipy s 625 oligonukleotidovými sondami na 1 mm² (popisuje se v publikaci Lockhart, D. J. et al., *Nature Biotechnology* 14: 1675 (1996)). Udává se, že je možné dosáhnout hustoty sond až 250 000 vzorků na 1 cm² (2 500/mm²) (popisuje se v publikaci Chee, M. et al., *Science* 274: 610 (1996)). Avšak na jediný čip je možné uspořádat až 132 000 různých nukleotidů, jehož plocha je přibližně 2,5 cm². Je důležité poznamenat, že tyto čipy se vyrábějí takovým způsobem, že 3'OH konec oligonukleotidu je zachycen na pevném povrchu. To znamená, že oligonukleotidy zachycené na čipech takovým způsobem se nemohou použít jako primery při amplifikaci PCR.

Je důležité poznamenat, že v případě, kdy produkty PCR se mohou zachytit na zařízení, kde probíhá amplifikace, hustota výsledného uspořádání produktů PCR je omezena dostupným zařízením. Současně dostupné zařízení jsou pouze mikrotitrační destičky, které obsahují 96 prohlubní. Tyto destičky umožňují získat pouze přibližně 0,02 vzorků produktů PCR na 1 mm² povrchu.

Například za použití komerčně dostupného systému Nucleolink™ (Nunc A/S, Roskilde, Dánsko) je možné dosáhnout současné amplifikace a uspořádání vzorků při hustotě 0,02 vzorků na 1 mm² povrchu prohlubní, kde byly zachyceny oligonukleotidové primery. Technické problémy však způsobují, že není pravděpodobné, že tento přístup umožní podstatné zvýšení hustoty vzorků.

Z toho plyne, že jestliže chceme zvýšit množství zpracovávaného materiálu, je nutné vytvořit několik metod amplifikace nukleové kyseliny, které umožňují současnou amplifikaci a uspořádání vzorků nukleové kyseliny při vyšší hustotě a dále umožňuje monitorování vzorků vyšší rychlostí, přičemž se upřednostňuje paralelní způsob.

Navíc je zřejmé, že existuje potřeba vytvořit novou metodu sekvenování, která umožní zpracovat a paralelně sekvenovat velké množství vzorků. To znamená, že je nutné vytvořit metody sekvenování, které umožňují podstatné multiplexování postupu. Podstatné multiplexování sekvenačního postupu povede na druhou stranu k vyššímu množství zpracovaných vzorků, než je možné dosáhnout metodami sekvenování, které jsou dobře známy v oboru. Takové nové metody budou dokonce více požadovány, jestliže umožní sekvenovat větší množství vzorků při rozumných nákladech a s menší vynaloženou prací než běžné způsoby sekvenování.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje nové metody amplifikace nukleové kyseliny na pevné fázi, které umožní uspořádat a současně amplifikovat velké množství rozdílných sekvencí nukleových kyselin při velké hustotě. Vynález také popisuje metody, které umožní velkou rychlostí paralelně monitorovat velké množství odlišných amplifikovaných sekvencí nukleových kyselin. Vynález dále popisuje metody, kterými se mohou současně a v krátkém časovém úseku stanovit sekvence velkého počtu rozdílných nukleových kyselin. Metody jsou zvláště použitelné při sekvenování celého genomu nebo při situacích, kde se musí současně sekvenovat velké množství genů (například 500) z mnoha jednotlivců (například 500) nebo se musí současně vyhodnotit velké množství (například milión) polymorfizmů nebo se současně monitoruje exprese velkého množství genů (například 100 000).

Vynález popisuje způsob amplifikace alespoň jedné nukleové kyseliny, který zahrnuje následující kroky:

- (1) vytvoření alespoň jednoho templátu nukleové kyseliny obsahující amplifikovanou nukleovou kyselinu, kde uvedená nukleová kyselina obsahuje na 5'konci oligonukleotidovou sekvenci Y a na 3'konci oligonukleotidovou sekvenci Z a navíc nukleová kyselina nese na svém 5'konci prostředek pro zachycení nukleové kyseliny na pevném povrchu,
- (2) smíchání uvedeného templátu nukleové kyseliny s jedním nebo více primery X, které mohou hybridizovat s oligonukleotidovou sekvencí Z a nesou na svém 5'konci prostředek pro zachycení na pevném povrchu tak, že 5'konec templátu nukleové kyseliny a primerů se váže na pevný podklad,
- (3) provedení jedné nebo více amplifikačních reakcí nukleové kyseliny vázané na templátu tak, že se tvoří kolonie nukleové kyseliny.

V dalším provedení vynálezu se ve druhém kroku metody dva různé primery kolonií X smíchají s templátem nukleové kyseliny. Upřednostňuje se, aby sekvence primerů kolonií X byly takové, že oligonukleotidová sekvence Z může hybridizovat s jedním koloniovým primerem X a oligonukleotidová sekvence Y je stejná jako sekvence koloniových primerů X.

V jiném provedení vynálezu oligonukleotidová sekvence Z je komplementární s oligonukleotidovou sekvencí Y, přičemž se označuje jako Y' a koloniový primer X je stejná sekvence jako oligonukleotidová sekvence Y.

V dalším provedení vynálezu koloniový primer X může obsahovat degenerovanou primerovou sekvenci a templát nukleové kyseliny, který obsahuje nukleovou kyselinu, jenž se amplifikuje a neobsahuje oligonukleotidovou sekvenci 5' a 3' konce.

V jiném provedení vynálezu metoda zahrnuje další krok, který umožňuje alespoň jeden krok stanovení sekvence jedné nebo více kolonií nukleotidové kyseliny vytvořené v kroku 3.

Vynález dále popisuje způsob sekvenování alespoň jedné nukleové kyseliny obsahující následující kroky:

- (1) vytvoření alespoň jednoho templátu nukleové kyseliny obsahující sekvenovanou nukleovou kyselinu, kde uvedená nukleová kyselina obsahuje na 5'konci oligonukleotidovou sekvenci Y a na 3'konci oligonukleotidovou sekvenci Z a navíc nukleová kyselina nese na svém 5'konci prostředek pro zachycení nukleové kyseliny na pevném povrchu,
- (2) smíchání uvedeného templátu nukleové kyseliny s jedním nebo více koloniovými primery X, které mohou hybridizovat s oligonukleotidovou sekvencí Z a nesou na svém 5'konci prostředek pro zachycení na pevném

povrchu tak, že 5'konec templátu nukleové kyseliny a primerů se váže na pevný podklad,

- (3) provedení jedné nebo více amplifikačních reakcí nukleové kyseliny na vázaném templátu tak, že se tvoří kolonie nukleové kyseliny,
- (4) provedení alespoň jednoho kroku stanovení sekvence alespoň jedné z vytvořených kolonií nukleové kyseliny.

V dalším provedení vynálezu 5'konce templátu nukleové kyseliny a koloniové primery nesou prostředek pro zachycení sekvencí nukleové kyseliny kovalentní vazbou na pevném povrchu. Upřednostňuje se, aby tento prostředek vhodný pro zachycení kovalentní vazbou byla chemicky upravitelná funkční skupina, jako je například fosfátová skupina, karboxylová skupina nebo aldehydová skupina, thiol, hydroxyl a dimethoxyltrityl (DMT) nebo aminoskupina, přičemž se upřednostňuje aminoskupina.

Nukleové skupiny, které se mohou amplifikovat podle způsobů podle vynálezu zahrnují DNA, například genomovou DNA, cDNA, rekombinantní DNA nebo libovolnou formu syntetické nebo modifikované DNA, RNA, mRNA nebo libovolnou formu syntetické nebo modifikované RNA. Uvedené nukleové kyseliny se mohou lišit v délce a mohou to být fragmenty nebo menší části větších molekul nukleové kyseliny. Upřednostňuje se, aby nukleová kyselina, která se bude amplifikovat, měla alespoň 50 párů bazí a více se upřednostňuje 150 až 4 000 párů bazí. Nukleová kyselina, která se bude amplifikovat může mít známé nebo neznámé sekvence a může být v jednořetězcové nebo dvouřetězcové formě. Nukleová kyselina, která se bude amplifikovat se může získat z libovolného zdroje.

Termín „templát nukleové kyseliny“ zahrnuje entitu, která obsahuje nukleovou kyselinu, jenž se amplifikuje nebo

sekvenuje v jednořetězcové formě. Jak se uvádí dále v textu nukleová kyselina, která se amplifikuje a sekvenuje, se může také vyskytovat ve dvouřetězcové formě. Termín „templát nukleové kyseliny“ podle vynálezu může zahrnovat jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou nukleovou kyselinu. Templáty nukleové kyseliny se mohou použít při metodě podle vynálezu a mohou se vyskytovat v různých délkách. Upřednostňuje se, aby templáty obsahovaly alespoň 50 párů bazí a více se upřednostňuje 150 až 4 000 párů bazí. Nukleotidy, které tvoří templát nukleové kyseliny mohou být přirozeně se vyskytující nebo nepřirozeně se vyskytující nukleotidy. Templáty nukleové kyseliny podle vynálezu obsahují ne pouze nukleovou kyselinu, ale mohou také dále obsahovat na 5' a 3' konci krátké oligonukleotidové sekvence. Oligonukleotidová sekvence obsažená na 5' konci se nazývá sekvencí Y. Oligonukleotidová sekvence Y je známou sekvencí a může se vyskytovat ve variabilní délce. Oligonukleotidová sekvence Y vhodná pro použití podle vynálezu obsahuje přednostně alespoň pět nukleotidů, přičemž se upřednostňuje 5 až 100 nukleotidů a více se upřednostňuje přibližně 20 nukleotidů. Přirozeně a nepřirozeně se vyskytující nukleotidy mohou být přítomny v nukleotidové sekvenci Y. Jak se uvádí shora v textu, upřednostňuje se, aby sekvence oligonukleotidu Y byla stejná jako sekvence koloniového primeru X. Oligonukleotidová sekvence obsažená na 3' konci templátu nukleové kyseliny podle vynálezu se zde označuje jako Z. Oligonukleotidová sekvence Z je známou sekvencí a může mít variabilní délku. Oligonukleotidová sekvence Z vhodná pro použití v metodách podle vynálezu obsahuje přednostně alespoň pět nukleotidů, přičemž se upřednostňuje 5 a 100 nukleotidů a více se upřednostňuje přibližně 20 nukleotidů. Přirozeně nebo nepřirozeně se vyskytující nukleotidy se mohou vyskytovat v oligonukleotidové sekvenci Z. Oligonukleotidová sekvence Z se navrhla tak, že hybridizuje s jedním koloniovým primerem X a upřednostňuje se,

aby se navrhla tak, že je komplementární s oligonukleotidovou sekvencí Y, která se nazývá sekvencí Y'. Oligonukleotidové sekvence Y a Z obsažené na 5' a 3' konci templátu nukleové kyseliny se nemusí nacházet na extrémních koncích templátu. Ačkoli nukleotidové sekvence Y a Z se přednostně nacházejí blízko 5' a 3' konců templátu respektive templátů nukleových kyselin (například s 0 až 100 nukleotidy 5' a 3' konce). Oligonukleotidové sekvence Y a Z se mohou proto nacházet v libovolné poloze templátu nukleové kyseliny, která zahrnuje sekvence Y a Z, a vyskytují se na obou stranách. To znamená, že lemují sekvenci nukleové kyseliny, která se amplifikuje.

Termín „templát nukleové kyseliny“ také zahrnuje entitu, která obsahuje nukleovou kyselinu, která se amplifikuje nebo sekvenuje ve dvouřetězcové formě. V případě, že templát nukleové kyseliny se vyskytuje ve dvouřetězcové formě, oligonukleotidové sekvence Y a Z jsou obsaženy na 5' a 3' koncích jednoho z řetězců. Druhý řetězec, což je způsobeno pravidly párování DNA, je komplementární se řetězcem, který obsahuje oligonukleotidové sekvence Y a Z a tak obsahuje oligonukleotidovou sekvenci Z' na 5' konci a oligonukleotidovou sekvenci Y' na 3' konci.

Termín „koloniový primer“ znamená entitu, která obsahuje oligonukleotidovou sekvenci, která je schopná hybridizovat s komplementární sekvencí a iniciovat specifickou polymerázovou reakci. Sekvence obsahující koloniový primer se vybrala tak, že vykazuje maximální hybridizační aktivitu se svou komplementární sekvencí a velmi nízkou nespecifickou hybridizační aktivitu s libovolnou jinou sekvencí. Sekvence, kterou je možné použít jako koloniový primer může zahrnovat libovolnou sekvenci, ale přednostně zahrnuje 5'-AGAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG nebo 5'-CACCAACCCAAACCAACCCAAACC. Koloniový primer může obsahovat 5 až 100 bází, ale upřednostňuje se 15 až 25 bází. Primer může zahrnovat

přirozeně i nepřirozeně se vyskytující nukleotidy. Jeden nebo dva různé koloniové primery se mohou použít při vytvoření kolonií nukleových kyselin za použití metod podle vynálezu. Koloniové primery vhodné pro použití v přítomnosti vynálezu mohou také zahrnovat degenerované primerové sekvence.

Termín „degenerované primerové sekvence“ zahrnuje krátkou oligonukleotidovou sekvenci, která je schopna hybridizovat s libovolným fragmentem nukleové kyseliny nezávislé na sekvenci uvedeného fragmentu nukleové kyseliny. Takové degenerované primery nevyžadují přítomnost oligonukleotidové sekvence Y nebo Z v templátu nukleotidové sekvence, aby došlo k hybridizaci, ačkoli použití degenerovaných primerů při hybridizaci s templátem obsahujícím oligonukleotidové sekvence X nebo Y není vyloučeno. Při použití při amplifikaci podle vynálezu, degenerativní primery musí hybridizovat se sekvencemi nukleové kyseliny v templátu v místech, které jsou vedle nebo lemují sekvenci nukleové kyseliny, která se amplifikuje.

Termín „pevný podklad“ znamená libovolný pevný podklad, na který se může kovalentně zachytit nukleová kyselina, jako jsou například latexové částice, dextranové částice, polystyren, polypropylenový povrch, polyakrylamidový gel, povrch tvořený zlatem, skleněný povrch a silikonové plátky. Upřednostňuje se, aby pevným povrchem byl skleněný povrch.

Termín „prostředky vhodné pro zachycení nukleových kyselin na pevný podklad“ zahrnuje chemické a nechemické zachycení zahrnující chemicky modifikovatelné funkční skupiny. Termín „zachycení“ znamená imobilizaci nukleové kyseliny na pevných površích buď kovalentním zachycením nebo prostřednictvím nevratné pasivní adsorpce nebo prostřednictvím afinity mezi molekulami, imobilizací na povrchu potaženém avidinem. Zachycení musí být dostatečně silné, aby se molekuly nedaly

odstranit vymytím vodou nebo vodným pufrem za podmínek denaturujících DNA.

Termín „chemicky upravitelné funkční skupiny“ zahrnuje skupinu, jako je třeba fosfátová skupina, karboxylová nebo aldehydová část, thiol nebo aminoskupina.

Termín „kolonie nukleové kyseliny“ znamená diskrétní oblast obsahující více kopií řetězce nukleové kyseliny. Ve stejné kolonii může být přítomno více kopií řetězce komplementárního s řetězcem nukleové kyseliny. Velké množství kopií řetězců nukleové kyseliny, které tvoří kolonie jsou v obecném případě imobilizovány na pevném povrchu a mohou být v jednořetězcové nebo ve dvouřetězcové formě. Kolonie nukleových kyselin podle vynálezu se mohou vytvořit v různých velikostech a hustotách v závislosti na použitých podmínkách. Upřednostňovaná velikost kolonií je od 0,2 μm do 6 μm , více se upřednostňuje od 0,3 μm do 4 μm . Hustota kolonií nukleové kyseliny vhodné pro použití při metodě podle vynálezu je v typickém případě 10 000/ mm^2 až 100 000/ mm^2 . Věří se, že je možné dosáhnout vyšší hustoty a to 100 000/ mm^2 až 1 000 000/ mm^2 a 1 000 000/ mm^2 až 10 000 000/ mm^2 .

Metody podle vynálezu se mohou použít k vytvoření kolonií nukleové kyseliny. Vynález tak poskytuje jednu nebo více kolonií nukleotidové kyseliny. Kolonie nukleové kyseliny podle vynálezu se mohou vytvořit z jediného imobilizovaného templátu nukleové kyseliny podle vynálezu. Metoda podle vynálezu umožňuje současnou produkci řady takových kolonií nukleových kyselin, kdy každá může obsahovat odlišné imobilizované řetězce nukleové kyseliny.

Vynález dále popisuje velké množství templátů nukleové kyseliny, které obsahují nukleové kyseliny, které se budou amplifikovat, kde uvedené nukleové kyseliny obsahují na svém

5'konci oligonukleotidovou sekvenci Y a na 3'konci oligonukleotidovou sekvenci Z a navíc nukleotidové kyseliny nesou na svém 5'konci prostředek pro zachycení nukleové kyseliny na pevný povrch. Upřednostňuje se, když se velké množství templátů nukleových kyselin smíchá s velkým množstvím koloniových primerů X, které se mohou hybridizovat s oligonukleotidovou sekvencí Z a nesou na 5'konci prostředek pro zachycení koloniových primerů na pevném povrchu. Upřednostňuje se, aby se velké množství templátů nukleové kyseliny a koloniových primerů kovalentně vázalo na pevný povrch.

V dalším provedení podle vynálezu se velké množství dvou různých koloniových primerů X smíchalo s velkým množstvím templátů nukleové kyseliny. Upřednostňuje se, aby sekvence koloniových primerů X byla taková, že oligonukleotidová sekvence Z se může hybridizovat s jedním koloniovým primerem X a oligonukleotidová sekvence Y je stejná jako sekvence jednoho koloniového primeru X.

V jiném provedení podle vynálezu je oligonukleotidová sekvence Z komplementární s oligonukleotidovou sekvencí Y, (Y') a velké množství koloniových primerů X je stejnou sekvencí jako oligonukleotidová sekvence Y.

Další provedení vynálezu se popisuje velké množství koloniových primerů X obsahujících degenerované primerové sekvence a velké množství templátů nukleové kyseliny obsahujících nukleové kyseliny, které se amplifikují, a tyto templáty neobsahují oligonukleotidovou sekvenci Y nebo Z na 5'a 3'konci.

Templáty nukleové kyseliny podle vynálezu se mohou připravit za použití metod, které jsou standardní nebo běžné v oboru. V obecném případě se tyto metody zakládají na metodách genetického inženýrství.

Nukleové kyseliny, které se budou amplifikovat, se mohou získat za použití metod, které jsou dobře známy a jsou dobře zdokumentovány v oboru. Například získáním vzorku nukleové kyseliny, jako je celková DNA, genomová DNA, cDNA, celková RNA, mRNA atd., metodou, která je dobře známa a dobře zdokumentována v oboru a vytvořením fragmentů z uvedených nukleových kyselin například omezeným štěpením restriktivními enzymy nebo mechanickými způsoby.

V typickém případě se nukleová kyselina, která se má amplifikovat, získala jako dvouřetězcová forma. V případě, že se nukleová kyselina vyskytuje v jednořetězcové formě, se například mRNA nejdříve připraví jako dvouřetězcová forma způsobem, který je dobře znám v oboru, například za použití oligo-dT primerů a reverzní transkriptázy a DNA polymerázy. Poté, co se získá amplifikovaná nukleová kyselina v dvouřetězcové formě s vhodnou délkou, spojí se svými konci oligonukleotidové sekvence Y a Z. To znamená, že se spojí s oběma konci sekvence nukleové kyseliny a vytvoří se tak templát. To je možné provést za použití metod, které jsou dobře známy v oboru, jako je například ligace nebo začlenění nukleové kyseliny, která se bude amplifikovat, do biologického vektoru do místa, které je lemováno vhodnou oligonukleotidovou sekvencí. V jiném případě, když je alespoň část sekvence nukleové kyseliny, která se amplifikuje, je známa, může se pomocí PCR vytvořit templát nukleové kyseliny obsahující oligonukleotidové sekvence Y a Z na 5' a 3' konci. Při PCR se používají vhodné primery PCR, které zahrnují sekvence specifické pro amplifikovanou nukleovou kyselinu. Před zachycením templátu nukleové kyseliny na pevný povrch, se může připravit jednořetězcová forma za použití metod, které jsou dobře známy v oboru, například zahřáním na teplotu 94 °C a rychlým ochlazením na teplotu 0°C na ledu.

Oligonukleotidová sekvence obsažená na 5'konci nukleové kyseliny může být libovolnou sekvencí libovolné délky a je zde označena jako sekvence Y. Vhodné délky a sekvence oligonukleotidů se vybraly za použití dobře známých metod. Například oligonukleotidové sekvence zachycené každým koncem nukleové kyseliny, která se bude amplifikovat, jsou v normálním případě relativně krátké nukleotidové sekvence obsahující 5 až 100 nukleotidů. Oligonukleotidová sekvence obsažená na 3'konci nukleové kyseliny může být libovolnou sekvencí libovolné délky a je zde označena jako sekvence Z. Vhodné délky a sekvence oligonukleotidu se mohou vybrat za použití metod dobře známých v oboru. Oligonukleotidové sekvence obsahovaly na každém konci nukleové kyseliny, která se mají amplifikovat, v normálním případě jde o relativně krátké nukleotidové sekvence obsahující 5 až 100 nukleotidů. Tyto sekvence mohou hybridizovat s jedním z koloniových primerů X. Upřednostňuje se, aby sekvence oligonukleotidové sekvence Y byla stejná jako jeden z koloniových primerů X. Více se upřednostňuje, aby oligonukleotidová sekvence Z byla komplementární s oligonukleotidovou sekvencí Y(Y') a koloniové primery X vykazují stejnou sekvenci jako oligonukleotidová sekvence Y.

Oligonukleotidové sekvence Y a Z podle vynálezu se mohou připravit za použití metod, které jsou standardní nebo běžné v oboru nebo se mohou získat z běžných zdrojů.

V případě produkce templátů nukleové kyseliny podle vynálezu se může zavést další požadovaná nukleová kyselina pomocí metody, která je dobře známa v oboru. Takové další sekvence zahrnují například místa, která rozeznávají restriktční enzymy nebo jisté značky nukleových kyselin, které umožňují amplifikaci produktů dané sekvence templátu nukleové kyseliny. Jiné požadované sekvence zahrnují sekvence zpětně balené DNA, která tvoří smyčku nebo jinou sekundární

strukturu, když se vyskytuje v jednořetězcové formě, „řídící“ sekvence DNA, které řídí interakce protein/DNA, jako je například sekvence promotorové DNA, kterou rozeznává polymeráza nukleové kyseliny nebo sekvenci operátoru, kterou rozeznává protein vázající DNA.

Jestliže existuje velké množství sekvencí nukleové kyseliny, která se amplifikuje, a pak zachycení oligonukleotidů Y a Z může proběhnout ve stejné nebo odlišné reakci.

Když se připraví templát nukleové kyseliny, může se amplifikovat, před tím než se použije v metodách podle vynálezu. Taková amplifikace může proběhnout za použití metod, které jsou dobře známy v oboru, například začleněním templátové nukleové kyseliny do expresivního vektoru a amplifikací ve vhodném biologickém hostiteli nebo amplifikací pomocí PCR. Tento amplifikační krok není však podstatný, protože metoda podle vynálezu umožňuje, aby se v kolonii nukleové kyseliny produkovalo velké množství kopií templátu nukleové kyseliny vytvořené z jedné kopie templátu nukleové kyseliny.

Upřednostňuje se, aby 5'konec templátu nukleové kyseliny, jak se popisuje shora v textu, se upravil tak, aby nesl prostředek pro kovalentní zachycení templátů nukleové kyseliny na pevný povrch. Takové prostředky mohou být například chemicky upravitelná funkční skupina, jako je například fosfátová skupina, karboxylová nebo aldehydová skupina, thiol nebo aminoskupina. Nejvíce se upřednostňuje, když se k úpravě 5'konce nukleové kyseliny použije thiol, fosfát nebo aminoskupina.

Koloniové primery podle vynálezu se mohou připravit za použití metod, které jsou v oboru standardní nebo běžné. V obecném případě koloniové primery podle vynálezu budou

syntetické oligonukleotidy vytvořené způsoby, které jsou dobře známy v oboru nebo se mohou získat z běžných zdrojů.

Při amplifikaci libovolné sekvence nukleové kyseliny se mohou použít jeden nebo více odlišných koloniových primerů. Tím se tato metoda liší a je výhodnější ve srovnání s řadou jiných amplifikačních metod známých v oboru, které se například popisují v dokumentu WO 96/04404, kde se různé specifické primery musí navrhnout pro každou určitou sekvenci nukleové kyseliny, která se bude amplifikovat.

Upřednostňuje se, aby se 5'konce koloniových primerů podle vynálezu upravily tak, aby nesly prostředek pro jejich kovalentní zachycení na pevném povrchu. Upřednostňuje se, aby tento prostředek pro kovalentní zachycení byla chemicky upravitelná funkční skupina, jak se popisuje shora v textu. Je-li to nutné koloniové primery se mohou navrhnout tak, aby zahrnovaly další požadované sekvence taková, jako jsou místa rozeznávaná restriční endonukleázou nebo jiné typy míst štěpení, jako je například štěpitelná místa na rybozómu. Jiné požadované sekvence zahrnují sekvence zpětně balené DNA (která tvoří smyčky nebo jiné sekundární struktury, když se vyskytuje v jednořetězcové formě), „řídící“ sekvence DNA, které řídí interakce protein/DNA, jako je například sekvence promotorové DNA, kterou rozeznává polymeráza nukleové kyseliny nebo sekvenci operátoru, kterou rozeznává protein vázající DNA.

Imobilizace koloniového primeru X na podklad pomocí 5'konce vede k odstranění 3'konce z podkladu tak, že koloniový primer je dostupný pro extenzi polymerázou, pak probíhá hybridizace komplementární oligonukleotidové sekvence obsažené na 3'konci templátu nukleové kyseliny.

Po té, co se syntetizují templáty nukleové kyseliny a koloniové primery podle vynálezu, smíchají se ve vhodném poměru tak, že když jsou zachyceny na pevném povrchu získá se

vhodná hustota zachycených templátů nukleové kyseliny a koloniových primerů. Upřednostňuje se, aby část koloniových primerů ve směsi byla vyšší než část templátů nukleové kyseliny. Upřednostňuje se, aby poměr množství koloniových primerů k množství templátu nukleové kyseliny byl takový, že když koloniové primery a templáty nukleové kyseliny se imobilizují na pevném povrchu tvoří se vrstva koloniových primerů obsahující velké množství koloniových primerů, které se nacházejí v přibližně v jednotné hustotě po celé nebo definované ploše pevné podpory, přičemž jeden nebo více templátů nukleové kyseliny se imobilizuje jednotlivě v intervalech ve vrstvě koloniových primerů.

Templáty nukleové kyseliny se mohou vyskytovat v jednořetězcové formě. Mohou se také vyskytovat úplně nebo částečně ve dvouřetězcové formě, buď s jedním nebo s oběma upravenými 5'konci tak, jak to umožňuje zachycení na povrchu. V tomto případě po ukončení procesu zachycení je možné separovat řetězce způsoby dobře známými v oboru, například zahřáním na teplotu 94 °C a pak se řetězce odstraní promytím. Je vhodné, aby v případě, že oba řetězce dvouřetězcových molekul reagovaly s povrchem a jsou zachyceny na povrchu, výsledek bude stejný jako v případě, kdy pouze jeden řetězec se zachytil a provedl se jeden amplifikační krok. Jinými slovy v případě, že se zachytily oba řetězce dvouřetězcového templátu nukleové kyseliny a oba řetězce se zachytily vzájemně blízko sebe a je tuto situaci možné rozlišit od výsledku, kdy dojde k zachycení pouze jednoho řetězce a uskutečnění amplifikace. Tak je možné použít jednořetězcové i dvouřetězcové templáty nukleových kyselin za účelem získat templát nukleových kyselin zachycený na povrchu a vhodný pro vytvoření kolonií.

Vzdálenost mezi jednotlivými koloniovými primery a jednotlivými templáty nukleové kyseliny (a vzhledem k hustotě

koloniových primerů a templátů nukleových kyselin) je možné řídit změnou koncentrace koloniových primerů a templátů nukleové kyseliny, které se imobilizují na povrchu. Preferovaná hustota koloniových primerů je alespoň 1 fmol/mm², upřednostňuje se alespoň 10 fmol/mm², více se upřednostňuje 30 až 60 fmol/mm². Hustota templátů nukleové kyseliny pro použití v metodě podle vynálezu je v typickém případě 10 000/mm² až 100 000/mm². Věří se, že je možné dosáhnout vyšší hustoty například 100 000/mm² až 1 000 000/mm² a 1 000 000/mm² až 10 000 000/mm².

Naopak řízení hustoty zachycených templátů nukleové kyseliny a koloniových primerů umožňuje řídit konečný vznik kolonií nukleové kyseliny na povrchu podpory. To je způsobeno skutečností, že jedna kolonie nukleové kyseliny může vzniknout následkem zachycení jednoho templátu nukleové kyseliny, což zaručuje, že koloniové primery podle vynálezu jsou přítomny ve vhodné poloze na pevném povrchu (popisuje se dále v textu). Hustota molekul nukleové kyseliny v jedné kolonii se může také řídit řízením hustoty zachycených koloniových primerů.

Po té, co se koloniové primery a templáty nukleové kyseliny podle vynálezu imobilizují na pevném povrchu ve vhodné hustotě, mohou se pak vytvořit kolonie nukleové kyseliny tím, že se provede vhodný počet cyklů amplifikace na kovalentně vázaném templátu nukleové kyseliny tak, že každá kolonie obsahuje více kopií původního imobilizovaného templátu nukleové kyseliny a její komplementární sekvenci. Jeden cyklus amplifikace zahrnuje kroky hybridizace, extenze a denaturace a tyto kroky se v obecném případě uskutečňují za použití činidel nebo podmínek dobře známých v oboru vhodných pro PCR.

Typická amplifikační reakce zahrnuje vystavení pevného povrchu a zachyceného templátu nukleové kyseliny a koloniových primerů podmínkám, které vyvolávají hybridizaci primeru. Například působení teploty okolo 65 °C. Za uvedených podmínek

oligonukleotidová sekvence Z na 3'konci templátu nukleové kyseliny hybridizuje s imobilizovaným koloniovým primerem X a v přítomnosti podmínek a činidel, které podporují extenzi primeru, což je například teplota okolo 72 °C, přítomnost polymerázy nukleové kyseliny, například DNA polymerázy závislé na DNA nebo molekuly reverzní transkriptázy (to je DNA polymeráza závislá na RNA) nebo RNA polymerázy plus přítomnosti molekul nukleozidtrifosfátů nebo libovolných jiných nukleotidových prekurzorů, například upravených molekul nukleozidtrifosfátu, se prodlouží koloniový primer adicí nukleotidů komplementárních se sekvencí templátové nukleové kyseliny.

Příklady polymeráz nukleové kyseliny, které se mohou použít podle vynálezu, jsou DNA polymeráza (Klenow fragment, T4 DNA polymeráza), tepelně stabilní DNA polymeráza pocházející z různých termostabilních bakterií (jako jsou DNA polymerázy Taq, VENT, Pfu, Tfl1), stejně jako jejich geneticky upravené deriváty (TaqGold, VENTexo, Pfu exo). Může se také použít kombinace RNA polymerázy a reverzní transkriptázy, přičemž vzniká amplifikace kolonie DNA. Upřednostňuje se, aby polymeráza nukleové kyseliny užívaná pro extenzi koloniových primerů byla stabilní za podmínek vhodných pro reakci PCR, to znamená při opakovaných cyklech zahřívání a chlazení při používané denaturační teplotě, jejíž hodnota je přibližně 94 °C. Upřednostňuje se, aby používaná DNA polymeráza byla Taq DNA polymeráza.

Upřednostňuje se, aby používané molekuly nukleozidtrifosfátu byly deoxyribonukleotidtrifosfáty, jako jsou například dATP, dTTP, dCTP, dGTP, nebo ribonukleozidtrifosfáty, jako jsou například dATP, dUTP, dCTP, dGTP. Molekuly nukleozidtrifosfátu se mohou vyskytovat přirozeně nebo se mohou syntetizovat.

Po krocích hybridizace a extenze se podpora a zachycená nukleová kyselina vystaví působení denaturačních podmínek v přítomnosti dvou imobilizovaných nukleových kyselin. První nukleovou kyselinou je počáteční imobilizovaný templát nukleové kyseliny a druhou je nukleová kyselina, která je k němu komplementární. Extenze probíhá od jednoho imobilizovaného koloniového primeru X. Původní imobilizovaný templát nukleové kyseliny a imobilizovaný vytvořený prodloužený koloniový primer jsou pak schopny iniciovat další kola amplifikace, přičemž se podklad vystaví dalším cyklům hybridizace, extenze a denaturace. Výsledkem takových dalších kol amplifikace povede ke vzniku kolonie nukleové kyseliny obsahující velké množství imobilizovaných kopií templátové nukleové kyseliny a její komplementární sekvence.

Počáteční imobilizace templátové nukleové kyseliny znamená, že templátová nukleová kyselina může pouze hybridizovat s koloniovými primery lokalizovanými ve vzdálenosti rovnající se celkové délce templátové nukleové kyseliny. Pak hranice kolonie vytvořené nukleové kyseliny je omezena na relativně malou oblast, ve které se imobilizuje počáteční templátová nukleová kyselina. Když probíhají další kola amplifikace, to znamená hybridizace, extenze a denaturace, vzniká jednou tolik kopií templátové molekuly a syntetizuje se její komplement. Pak vytvořená hranice kolonie nukleové kyseliny se bude schopna dále prodlužovat, ačkoli tato hranice je stále omezena na relativně lokální oblast, ve které se imobilizoval počáteční templát nukleové kyseliny.

Schéma metody vytvoření kolonie nukleové kyseliny podle vynálezu je zobrazeno na obrázku č. 1. Obrázek č. 1(a) zobrazuje koloniový primer X podle vynálezu (ukazuje se, že má sekvenci ATT) a templát nukleové kyseliny podle vynálezu, který obsahuje na 5'konci oligonukleotidovou sekvenci Y, zde je zobrazena jako ATT a 3'konci oligonukleotidovou sekvenci Z,

zde zobrazenou jako AAt, která hybridizuje jako sekvence koloniového primeru X. Při schematické reprezentaci se koloniový primer X a oligonukleotidové sekvence Y a Z zobrazují tak, že obsahují pouze tři nukleotidy. V praxi je však vhodné, aby se použila delší sekvence. 5'konce obou koloniových primerů a templátu nukleové kyseliny nesou prostředek pro zachycení nukleové kyseliny na pevném povrchu. To je na obrázku č. 1 zobrazeno jako plné čtverce. Tento prostředek zachycení může vést ke kovalentnímu nebo nekovalentnímu zachycení.

Pro jednoduchost je na obrázku 1(a) zobrazen pouze jeden koloniový primer X a jedna templátová nukleová kyselina. V praxi velké množství koloniových primerů X bude přítomno s velkým množstvím templátů nukleové kyseliny. Velké množství koloniových primerů X může obsahovat dva odlišné koloniové primery X. Pro jednoduchost však schématická reprezentace zobrazuje na obrázku č. 1 pouze jeden typ koloniového primeru X se sekvencí ATT. Velké množství templátů nukleové kyseliny může obsahovat různé sekvence nukleové kyseliny v centrální části mezi oligonukleotidy Y a Z, ale obsahuje stejné oligonukleotidové sekvence Y a Z na 5'a 3'koncích. Na obrázku č. 1 je pro jednoduchost znázorněn pouze jeden druh templátu nukleové kyseliny, kde část sekvence v centrální části je zobrazena jako CGG.

V přítomnosti pevné podpory 5' konce obou templátů nukleové kyseliny a koloniového primeru se vážou na podklad. To je znázorněno na obrázku č. 1(b). Podklad a zachycený templát nukleové kyseliny a koloniové primery se pak vystaví působení podmínek, které vyvolávají hybridizaci primeru. Na obrázku č. 1(c) je zobrazen templát nukleové kyseliny, který hybridizuje s koloniovým primerem. Taková hybridizace je umožněna skutečností, že oligonukleotidová sekvence Z na 3'konci templátu nukleové kyseliny může hybridizovat

s koloniovým primerem. Při schématické reprezentaci oligonukleotidové sekvence Z se ukázalo, že je komplementární s koloniovým primerem, ačkoli v praxi skutečná komplementární sekvence není podstatná. Hybridizace se může objevit za podmínek, kterým jsou vystaveny templáty nukleové kyseliny a koloniové primery.

Na obrázku č. 1(d) je zobrazeno stádium extenze primeru. Za vhodných teplotních podmínek a v přítomnosti DNA polymerázy a doplnění nukleotidových prekurzorů, jako je například dATP, dTTP, dCTP a dGTP, DNA polymeráza prodloužila koloniový primer na jeho 3'konci za použití templátu nukleové kyseliny. V případě, že prodloužení primeru je úplné, zobrazeno na obrázku č. 1(e), je pak možné vidět, že se vytvořil druhý mobilizovaný řetězec nukleové kyseliny, který je komplementární s počátečním templátem nukleové kyseliny. Při oddělení dvou řetězců nukleové kyseliny, například zahřáním, budou přítomny dvě imobilizované nukleové kyseliny. První je počáteční imobilizovaný templát nukleové kyseliny a druhou je jeho komplementární nukleová kyselina, která se prodloužila z jednoho imobilizovaného koloniového primeru X, jak je možné vidět na obrázku č. 1(f).

Původní imobilizovaný templát nukleové kyseliny a imobilizovaný prodloužený vytvořený koloniový primer je pak schopen hybridizovat s jinými přítomnými koloniovými primery (které jsou označeny jako koloniové primery 2 a 3 na obrázku č. 1(g)) a po dalším kole prodloužení primeru (obrázek č. 1(h)) a po separaci řetězce (obrázek 1(i)) vznikají čtyři jednoduché imobilizované řetězce. Dva z nich obsahují sekvence, které odpovídají templátu počáteční nukleové kyseliny, a dva obsahují řetězce s nimi komplementární.

Další cykly amplifikace jsou zobrazeny na obrázku č. 1 a po provedení vzniká kolonie nukleové kyseliny obsahující velké

množství imobilizovaných kopií templátové nukleové kyseliny a její komplementární sekvence.

Je tak možné vidět, že metoda podle vynálezu umožňuje vytvoření kolonie nukleové kyseliny z jednoho templátu imobilizované nukleové kyseliny a že velikost těchto kolonií se může řídit změnou počtu cyklů amplifikace, které je templát nukleové kyseliny vystaven. Tak počet nukleových kyselin vytvořených na povrchu pevného podkladu závisí na počtu templátů nukleové kyseliny, která se na začátku imobilizuje na podkladu, přičemž vzniká dostatečný počet imobilizovaných koloniových prumerů v lokalitě každého imobilizovaného templátu nukleové kyseliny. Z tohoto důvodu se upřednostňuje, aby pevný povrch, na který se koloniové primery a templáty nukleové kyseliny imobilizují, obsahoval vrstvu imobilizovaných koloniových prumerů při vhodné hustotě s templáty nukleové kyseliny imobilizované v intervalech s vrstvou prumerů.

Tak zvané autopaternování kolonií nukleové kyseliny je výhodné ve srovnání s řadou metod, které jsou známy v oboru. Je možné získat vyšší hustotu kolonií nukleových kyselin, což je způsobeno skutečností, že hustotu je možné řídit regulací hustoty, při které se templáty nukleové kyseliny původně imobilizují. Taková metoda není pak omezena například tím, že vykazuje specifické uspořádání prumerů na určité lokální ploše podkladu a pak iniciuje tvorbu kolonií nanesením určitého vzorku, který obsahuje templát nukleové kyseliny na stejné ploše primeru. Počet kolonií, které se mohou uspořádat za použití metod dobře známých v oboru, (popisuje se například v publikaci WO 96/04404, Mosaic Technologies, Inc.) je pak omezen hustotou/mezerami, při kterých se plochy specifických prumerů mohou uspořádat v počátečním kroku.

Tím, že je možné řídit počáteční hustotu templátů nukleové kyseliny a proto také je možné řídit hustotu kolonií nukleové kyseliny vytvořené z templátů nukleové kyseliny, je možné také řídit velikost vytvořených kolonií nukleové kyseliny a navíc hustotu templátů nukleové kyseliny v jednotlivých koloniích, přičemž optimální situace je možné dosáhnout na pevném podkladu dostatečně velké velikosti, který obsahuje velký počet amplifikovaných sekvencí, což umožňuje následnou analýzu nebo monitorování kolonií nukleové kyseliny.

Když se vytvoří kolonie nukleových kyselin, může být nutné provést další krok, jako je například vizualizace kolonií nebo stanovení sekvence (popisuje se dále v textu). Vizualizace kolonií může být například nutná, jestliže je nezbytné testovat kolonie vytvořené v přítomnosti nebo v nepřítomnosti například celé nebo části určitého fragmentu nukleové kyseliny. V tomto případě kolonie, které obsahují určitý fragment nukleové kyseliny by se mohl detekovat navržením sondy nukleové kyseliny, která se specificky hybridizuje s fragmentem nukleové kyseliny.

Taková sonda nukleové kyseliny se přednostně značí detekovatelnou entitou, jako je fluorescenční skupina, entita obsahující biotin (která se může například detekovat inkubací streptavidinem značeným fluorescenční skupinou), radioaktivní značku (která se může začlenit do sondy nukleové kyseliny způsoby, které jsou dobře známy v oboru a mohou se detekovat na základě jejich radioaktivity například inkubací se scintilační kapalinou) nebo barvivem nebo jiným barvicím činidlem.

V jiném případě taková sonda nukleové kyseliny se nemusí značit a navrhne se tak, aby působila jako primer vhodný pro začlenění množství značených nukleotidů s polymerázou nukleové

kyseliny. Může se tak provést detekce začleněné značky a tak se detekují kolonie nukleové kyseliny.

Kolonie nukleové kyseliny podle vynálezu se pak připravují hybridizací. Taková příprava zahrnuje ošetření kolonií tak, že celý nebo část templátu nukleové kyseliny tvořící kolonie je přítomen v jednořetězcové formě. Toho je možné dosáhnout například teplotní denaturací libovolné dvouřetězcové DNA v koloniích. V jiném případě se kolonie mohou ošetřit restriktčními endonukleázami, které jsou specifické pro dvouřetězcovou formu sekvence v templátové nukleové kyselině. Tak endonukleáza může být specifická vůči sekvenci obsažené v oligonukleotidové sekvenci Y nebo Z nebo vůči jiné sekvenci, která je přítomna v templátové nukleové kyselině. Po štěpení se kolonie zahřejí tak, že dvouřetězcové molekuly DNA se oddělí a kolonie se promyjí, aby se odstranily nemobilizované řetězce tak, že v koloniích zůstává zachycena jednořetězcová DNA.

Po přípravě kolonií vhodných pro hybridizaci se pak přidá ke koloniím značená nebo neznačená sonda za podmínek vhodných pro hybridizaci sondy s jejich specifickou sekvencí DNA. Takové podmínky může stanovit odborník za použití metod známých v oboru a budou záležet na příkladu sekvence sondy.

Sonda se pak může odstranit teplotní denaturací, jestliže je to nutné, a pak se může hybridizovat a detekovat sonda specifická pro druhou nukleovou kyselinu. Tyto kroky se mohou opakovat tolikrát, kolikrát je to nutné.

Značené sondy, které hybridizují s koloniemi nukleové kyseliny se pak mohou detekovat za použití zařízení, které zahrnuje vhodné detekční zařízení. Preferovaný detekční systém pro fluorescenční značky je kamera s nábojovou vazbou (CCD), která se v optimálním případě spojí se zvětšovacím zařízením, jako je například mikroskop. Za použití takové technologie je

možné současně paralelně monitorovat velké množství kolonií. Například za použití mikroskopu s CCD kamerou a s objektivem se 10-ti násobným nebo s 20-ti násobným zvětšením, je možné pozorovat kolonie na povrchu mezi 1 mm² a 4 mm², které odpovídají monitorování 10 000 až 200 000 kolonií. Je jasné, že tento počet poroste s vylepšením optiky a s velikostí čipů.

Alternativní metodou monitorování vzniklých kolonií je skenování povrchu pokrytého koloniemi. Je možné například použít systémy, kde je možné současně uspořádat až 100 000 000 kolonií a zachytí se monitorovací obrázek celého povrchu kamerou CCD. Tímto způsobem je možné vidět až 100 000 000 kolonií během krátkého času.

Dále se může použít za účelem monitorování kolonií nukleové kyseliny podle vynálezu libovolné jiné zařízení umožňující detekci a přednostně kvantifikaci fluorescence na povrchu. Také je možné použít fluorescenční zobrazovače nebo konfokální mikroskopy.

V případě, že značky jsou radioaktivní, pak je možné použít systém detekující radioaktivitu.

Při metodách podle vynálezu se provede další krok umožňující alespoň jeden krok stanovení sekvence alespoň jedné z vytvořených kolonií nukleové kyseliny, což je možné provést za použití sekvenační techniky za použití libovolné vhodné pevné fáze. Například jednou metodou stanovení sekvence, která se může použít při stanovení sekvence podle vynálezu, zahrnuje hybridizaci vhodného primeru, který se zde nazývá „sekvenační primer“, s templátem sekvenované nukleové kyseliny, extenzi primeru a detekci nukleotidů používaných při prodloužení primeru. Upřednostňuje se, aby nukleová kyselina užívaná pro prodloužení primeru se detekovala před přidáním dalšího nukleotidu, což umožňuje postupné sekvenování in situ jednotlivých po sobě jdoucích bází nukleové kyseliny.

Detekce začleněných nukleotidů se provádí tak, že se do primeru extenzní reakce začlení jeden nebo více značených nukleotidů. Mohou se použít libovolné vhodné detekovatelné značky, jako je například fluorofor, radioaktivní značení atd.. Upřednostňuje se použití fluorescenční značky. Stejně nebo odlišné značky se mohou použít v každém odlišném typu nukleotidu. V případě, že značka je fluorofor pro každý odlišný typ nukleotidu se použije stejné značky, pak každé začlenění nukleotidu může dojít ke kumulativnímu zvýšení signálu detekovatelného při určité vlnové délce. Jestliže se používají odlišné značky, pak tyto signály se mohou detekovat při různých vlnových délkách.

Aby se umožnila hybridizace vhodného sekvenčního primeru se sekvenovaným templátem nukleové kyseliny, pak templát se vyskytuje v jednořetězcové formě. V případě, že templáty nukleové kyseliny umožňující vytvořit kolonie nukleové kyseliny jsou přítomny ve dvouřetězcové formě, mohou se zpracovat tak, aby vznikly templáty jednořetězcové nukleové kyseliny za použití metod, které jsou dobře známy v oboru, například denaturací nebo štěpením atd..

Sekvenační primery, které hybridizují s templátem nukleové kyseliny a používají se při extenzi primeru, jsou přednostně krátké oligonukleotidy, které přibližně obsahují 15 až 25 nukleotidů. Sekvence primerů se navrhla tak, že hybridizují s částí templátu sekvenované nukleové kyseliny, přičemž se upřednostňuje, aby k tomu došlo za přísných hybridizačních podmínek. Sekvence primerů užívaných při sekvenování může mít stejné nebo podobné sekvence těm, které jsou obsaženy v koloniových primerech a které se používají při vzniku kolonií nukleové kyseliny podle vynálezu. Sekvenační primery se mohou vyskytovat v roztoku nebo v imobilizované formě.

Po té, co se sekvenační primer navázal na templát nukleové kyseliny, který se sekvenuje tak, že se vystaví vhodným podmínkám stanoveným metodami dobře známými v oboru, provede se prodloužení primerů, například za použití polymerázy nukleové kyseliny a dodaných nukleotidů, přičemž, alespoň některé se vyskytují ve značené formě a nastolí se podmínky, které jsou vhodné pro extenzi primeru. Mohou se použít příklady polymeráz nukleové kyseliny a nukleotidů, jak se popisuje shora v textu.

Aby se odstranily nezačleněné nukleotidy, které mohou interferovat s následnými kroky, je třeba po každém kroku prodloužení primeru zahrnout promytí. Po té, co se provedlo prodloužení primeru, monitoruje se kolonie nukleové kyseliny za účelem stanovení, zda značený nukleotid se začlenil do prodlouženého primeru. Krok extenze primeru se pak opakuje za účelem stanovení dalších a následných nukleotidů začleněných do prodlouženého primeru.

Libovolné zařízení, které umožňuje detekci a přednostně kvantifikaci vhodného značení, jako je například fluorescence nebo radioaktivita, je možné využít při stanovení sekvence. V případě, že značka je fluorescenční molekula, je možné použít kameru CCD, která je spojena se zvětšovacím přístrojem (jak se popisuje shora v textu). Ve skutečnosti zařízení používané při stanovení sekvence podle vynálezu může být stejné jako ta zařízení, která se popisují shora v textu a jsou vhodná pro monitorování kolonií amplifikované nukleové kyseliny.

Detekční systém se přednostně používá v kombinaci s analytickým systémem za účelem stanovit počet nebo podstatu nukleotidů začleněných v každé kolonii po každém kroku extenze primeru. Tato analýza, která se může provést bezprostředně po každém kroku prodloužení primeru nebo později za použití

zaznamenaných dat umožňuje, aby se stanovila sekvence templátu nukleové kyseliny v dané kolonii.

Jestliže stanovovaná sekvence není známa, pak nukleotidy aplikované v případě dané kolonie se aplikují obvykle v určeném pořadí, který se pak opakuje po celou analýzu. Je to například dATP, dTTP, dCTP, dGTP. Jestliže stanovovaná sekvence je známa a znovu se sekvenuje, například pro účely analýzy, zda existují malé rozdíly, kterými se sekvence liší od známé sekvence, pak sekvenační proces je rychlejší, když se v každém kroku sekvenace přidají nukleotidy ve vhodném pořadí, které se zvolí podle známé sekvence. Rozdíly od dané sekvence se pak detekují tak, že nedojde k začlenění jistých nukleotidů při určitém stádiu extenze primerů.

Tak je možné vidět, že celá nebo část sekvence amplifikovaného templátu nukleové kyseliny tvořící určité kolonie nukleové kyseliny se může stanovit za použití metod podle vynálezu.

V jiném provedení vynálezu se celá nebo částečná sekvence více jak jedné nukleové kyseliny stanoví určením celé nebo části sekvence amplifikovaného templátu nukleové kyseliny, která je přítomna ve více jak jedné kolonii nukleové kyseliny. Upřednostňuje se, aby se současně mohlo stanovit velké množství sekvencí.

Provedení stanovení sekvence nukleových kyselin za použití metody podle vynálezu je výhodné, protože je pravděpodobné, že je způsobeno skutečností, že velké množství každé sekvenované nukleové kyseliny se vyskytuje v každé kolonii nukleové kyseliny podle vynálezu. Jestliže je to nutné, je možné zvýšit spolehlivost tím, že se použije velké množství kolonií nukleové kyseliny obsahující stejný templát sekvenované nukleové kyseliny a pak stanovení sekvence pro každé množství kolonií a porovnání takto stanovených sekvencí.

Upřednostňuje se, aby zachycení koloniového primeru a templátu nukleové kyseliny na pevný povrch bylo termostabilní při teplotě, které se podklad vystaví během amplifikační reakce nukleové kyseliny. Je to například teplota až přibližně 100 °C, například přibližně 94 °C. Upřednostňuje se, aby zachycení bylo kovalentní.

V jiném provedení vynálezu kovalentní navázání koloniových primerů a templátu nukleové kyseliny na pevný podklad se vyvolává síťovacím činidlem, jako je například 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidhydrochlorid (EDC), sukcinanhydrid, fenyl-diizothiokyanát nebo maleinanhydrid nebo heterobifunkční síťovací činidlo, jako je například m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysukcinimidester (MBS), N-sukcinimidyl-[4-jodoacetyl]aminobenzoát (SIAB), sukcinimidyl-4-[N-maleimidometyl]cyklohexan-1-karboxylát (SMCC), N-y-maleimidobutyryloxy-sukcinimidester (GMBS), sukcinimidyl-4-[p-maleimidofenyl]butyrát (SMPB) a odpovídající sulfosloučeniny (ve vodě rozpustné). Preferovaná síťovací činidla vhodná pro použití podle vynálezu jsou s-SIAB, s-MBS a EDC.

V dalším provedení vynálezu pevný podklad má derivatizovaný povrch. V jiném provedení vynálezu derivatizovaný povrch pevného podkladu se následně upravuje bifunkčními síťovacími skupinami, aby vznikl funkční povrch, přednostně reaktivními síťovacími skupinami.

Termín „derivatizovaný povrch“ znamená povrch, který se upravil chemickými reaktivními skupinami, jako je například aminoskupina, thiolová nebo akrylátová skupina.

Termín „funkční povrch“ znamená derivatizovaný povrch, který se upravil specifickými funkčními skupinami, jako jsou například maleinové nebo sukcinové funkční části.

V metodě podle vynálezu, kterou je možné použít při jistých aplikacích, zachycení koloniových primerů a templátů nukleové kyseliny na pevný podklad splnilo řadu požadavků. Ideální zachycení by nemělo být ovlivněno vystavení vysoké teplotě a opakovanému procházení cykly zahřátí/ochlazení, což se používá při během amplifikace nukleové kyseliny. Podklad by měl umožnit získání hustoty zachycených koloniových primerů alespoň 1 fmol/mm², upřednostňuje se hustota 10 fmol/mm², více se upřednostňuje 30 až 60 fmol/mm². Ideální podklad by měl vykazovat jednotný rovný povrch s nízkou hodnotou fluorescence pozadí a měl by být také teplotně stabilní (neměl by se deformovat). Pevné podklady, které umožňují pasivní adsorpci DNA na jistých typech plastických a syntetických nitrocelulózových membrán, nejsou vhodné. Pevný podklad by se měl použít pouze jedenkrát a neměl by být nákladný.

Z těchto důvodů pevný podklad může být libovolný pevný podklad, na který se může zachytit nukleová kyselina. Může to být například latexové částice, částice dextranu, polystyrenový a polypropylenový povrch, polyakrylamidový gel, povrchy tvořené zlatem, skleněné povrchy a plátky silikonu. Upřednostňuje se, aby pevný podklad byl skleněný povrch a zachycení nukleových kyselin na tento povrch je proveden kovalentní vazbou.

Kovalentní navázání koloniových primerů a templátů nukleové kyseliny na pevný podklad se může provést za použití metod, které jsou známy v oboru. Například epoxysilan-amino kovalentní navázání oligonukleotidů na pevné podklady, jako jsou porézní skleněné částice, které se používají při in situ syntéze oligonukleotidů (prostřednictvím připojení 3'konce) a také se upravily pro zachycení oligonukleotidu 5'konce. Oligonukleotidy upravené na 5'konci pomocí karboxylové a

aldehydové skupiny se kovalentně zachytily na latexových částicích upravených hydrazinem (Kremsky et al., 1987).

Jiné přístupy vhodné pro zachycení oligonukleotidů na pevných površích je použití síťovacího činidla, jako je sukcinanhydrid, fenyliothiokyanát (Guo et al., 1994) nebo maleinanhydrid (Yang et al., 1998). Jiným velmi používaným síťovacím činidlem je 1-etyl-3-(3-dimetylamonipropyl)karbodiimidhydrochlorid (EDC). Chemie EDC se poprvé popisuje v publikaci Gilham et al., (1986). Uvádí se, že templáty DNA se zachytí na papír (celulózu) prostřednictvím terminální fosfátové skupiny na 5'konci. Za použití chemie EDC se použily jiné podklady. Jsou to například latexové částice (popisují se v publikaci Wolf et al., 1987 a Lund et al., 1988), polystyrénové mikroprohlubně (popisuje se v publikaci Rasmussen et al., 1991), sklo s určenou velikostí pórů (popisuje se v publikaci Ghosh et al., 1987) a molekuly dextranu (Gangeras et al., 1987). Kondenzace oligonukleotidů s upraveným 5'-koncem s činidlem zprostředkovaná karbodiimidem se popisuje v publikaci Chu et al., (1983) a Egan et al., (1982) v případě fosfátové skupiny, kterou se upravil 5'konec.

Výsledkem zachycení oligonukleotidu prostřednictvím 5'konce za použití karbodiimidů se může dosáhnout 60 %, ale nspecifického zachycení prostřednictvím vnitřních nukleotidů oligonukleotidu. V publikaci Rasmussen et al., (1991) se popisuje zvýšení až 85 % specifické zachycení prostřednictvím 5'konce derivatizací povrchu za použití sekundárních aminoskupin.

V publikacích se popisují výhody hetero-bifunkčních síťovacích činidel. Hetero nebo monobifunkční síťovací činidla se široce používají při přípravě konjugátových molekul peptidových nosičů (peptid-protein) za účelem zesílit imunogenitu u zvířat (Peeters et al., 1989). U většiny těchto

činidel se popisuje, že tvoří stabilní kovalentní vazby ve vodném roztoku. Tato síťovací činidla se použila při navázání DNA na pevný podklad pouze v jednom bodě molekuly.

V publikaci Chrisey et al., (1996) se popisuje studie účinnosti a stability zachycení DNA na pevné fázi za použití šesti různých heterobifunkčních síťovacích činidel. V tomto příkladu se zachycení projeví pouze na 5'konci oligomerů DNA upraveného thiolovou skupinou. Tento typ zachycení se také popisuje v publikaci O'Donnell-Maloney et al., (1996). Popisuje se zachycení cílů DNA v sekvenční analýze MALDI-TOF a v dokumentu EP-A-665293 Hamamatsu Photonics F.K. company se popisuje stanovení sekvence bazí nukleové kyseliny na pevném povrchu.

Provedlo se několik studií, které hodnotí termální stabilitu zachycení oligonukleotidů na pevném podkladu. Chrisey et al., (1996) popisuje, že v případě sukcinimidyl-4-[p-maleimidofenyl]butyrátové síťovacího činidla (SMPB) se uvolnilo ze skleněného povrchu skoro 60 % molekul během ošetření teplem. V tomto případě se však nepopisuje termální stabilita jiných činidel.

Za účelem vytvořit kolonie nukleové kyseliny prostřednictvím amplifikační reakce na pevné fázi, jak se popisuje v této přihlášce, koloniové primery a templáty nukleových kyselin se specificky zachytí svými 5'konci na pevném povrchu, přičemž se upřednostňuje sklo. Skleněný povrch se může derivatizovat reaktivními aminoskupinami silanizací za použití aminoalkoxysilanů.

Vhodná silanová činidla zahrnují aminopropyltrimetoxysilan, aminopropyltriethoxysilan a 4-aminobutyltriethoxysilan. Skleněné povrchy se mohou také derivatizovat jinými reaktivními skupinami, jako je například

akrylátová skupina nebo epoxyskupina za použití epoxysilanu, akrylátsilanu a akrylamidsilanu. Následuje derivatizační krok, přičemž molekuly nukleové kyseliny (koloniové primery nebo templáty nukleové kyseliny) vykazují na svém 5'konci chemicky upravitelnou funkční skupinu. Je to například fosfátová, thiolová nebo aminoskupina, které jsou kovalentně zachyceny na derivatizovaném povrchu síťovacím činidlem, jak se popisuje shora v textu.

V jiném případě krok derivatizace je následován zachycením bifunkčního síťovacího činidla na povrchových aminoskupinách, přičemž vznikají upravené funkční povrchy. Molekuly nukleových kyselin (koloniový primer nebo templáty nukleové kyseliny), které vykazují na 5'-konci fosfátovou, thiolovou skupinu nebo aminoskupinu pak reagují s funkčním povrchem za vzniku kovalentní vazby mezi nukleovou kyselinou a sklem.

Potencionální síťovací činidla a činidla vhodná pro zavedení se mohou použít při kovalentním zachycení DNA/oligonukleotidu na pevném povrchu a zahrnují 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidhydrochlorid (EDC), sukcinanhydrid, fenylldiizothiokyanát nebo maleinanhydrid nebo heterobifunkční síťovací činidlo, jako je například m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysukcinimidester (MBS), N-sukcinimidyl-[4-jodoacetyl]aminobenzoát (SIAB), sukcinimidyl-4-[N-maleimidometyl]cyklohexan-1-karboxylát (SMCC), N-γ-maleimidobutyryloxy-sukcinimidester (GMBS), sukcinimidyl-4-[p-maleimidofenyl]butyrát (SMPB) a odpovídající sulfosloučeniny, které jsou rozpustné ve vodě. Preferovaná síťovací činidla podle vynálezu jsou s-SIAB, s-MBS a EDC. s-MBS je maleimidsukcinimidový heterobifunkční síťovací činidlo a s-SIAB je jodoacetylsukcinimidové heterobifunkční síťovací činidlo. Obě tyto činidla jsou schopny tvořit kovalentní vazbu se skupinami SH a primárními aminoskupinami. EDC je karbodiimidové činidlo,

které zprostředkovává kovalentní zachycení fosfátové skupiny a aminoskupiny.

Koloniové primery a templáty nukleových kyselin se v obecném případě modifikují na svém 5'konci fosfátovou skupinou nebo primární aminoskupinou (například síťovacím činidlem EDC) nebo thiolovou skupinou (v případě linkerů s-SIAB nebo s-MBS).

Vynález dále poskytuje pevný podklad, na který se připojí velké množství koloniových primerů X, jak se popisuje shora v textu a alespoň jeden templát nukleové kyseliny, jak se popisuje shora v textu, kde uvedené templáty nukleové kyseliny obsahují na svých 5'koncích oligonukleotidovou sekvenci Y, jak se popisuje shora v textu, a na svých 3'koncích obsahují oligonukleotidovou sekvenci Z. Upřednostňuje se, aby se na pevný podklad, kterým je s výhodou sklo, zachytilo velké množství templátů nukleové kyseliny. Upřednostňuje se, aby zachycení templátů nukleové kyseliny koloniových primerů na pevném povrchu byla kovalentní. Uskutečněním jednoho nebo více cyklů amplifikace nukleové kyseliny na imobilizovaném templátu nukleové kyseliny za použití metod, jak se popisuje shora v textu, se mohou vytvořit kolonie nukleové kyseliny podle vynálezu. Vynález dále popisuje podklad obsahující jednu nebo více kolonií nukleové kyseliny podle vynálezu. Vynález dále popisuje použití pevných podkladů podle vynálezu v metodách amplifikace nukleové kyseliny nebo sekvenování. Takové metody amplifikace nebo sekvenace nukleové kyseliny zahrnuje metody podle vynálezu.

Vynález dále popisuje použití derivatizovaného nebo funkčního podkladu, připraveného způsobem, jak se popisuje shora v textu při metodách amplifikace a sekvenování. Takové metody amplifikace a sekvenování nukleových kyselin zahrnují metody podle vynálezu.

Vynález dále popisuje přístroj pro provedení metod podle vynálezu nebo přístroj pro produkci pevného podkladu, který obsahuje kolonie nukleové kyseliny podle vynálezu. Takový přístroj může například obsahovat velké množství templátů nukleové kyseliny a koloniových primerů podle vynálezu vázaných přednostně kovalentní vazbou na pevný podklad, jak se popisuje shora v textu, spolu s polymerázou nukleové kyseliny, s velkým množstvím nukleotidových prekurzorů, jak se popisuje shora v textu, přičemž část z nich se může značit a může obsahovat prostředek pro řízení teploty. V jiném případě může přístroj obsahovat například podklad obsahující jeden nebo více kolonií nukleové kyseliny podle vynálezu. Upřednostňuje se, aby přístroj také obsahoval detekční prostředky pro detekci a rozlišení signálů z jednotlivých kolonií nukleových kyselin uspořádaných na pevném povrchu za použití metod podle vynálezu. Takové detekční prostředky mohou zahrnovat zařízení s vázaným nábojem, které je operativně spojeno se zvětšovacím zařízením, jako je mikroskop, jak se popisuje shora v textu.

Upřednostňuje se, aby libovolný přístroj podle vynálezu byl automatický.

Vynález popisuje řešení a potřeby vědců v oboru biotechnologií, které jsou směřovány do odvětví genomů, farmakologie, vývoje drog, charakterizace potravin a typování genů. Taková metod se může aplikovat například při sekvenování a opětném sekvenování, diagnostikování a testování, monitorování genové exprese, při profilech genové diversity, zkoumání a hodnocení polymorfizmu celého genomu, při vytvoření genomových sklíček (celý genom pacienta se nanese na mikroskopické sklíčko) a sekvenování celého genomu.

Vynález se může použít při sekvenování a opětném sekvenování nukleové kyseliny, kde jsou například geny specificky amplifikovány do kolonií za účelem úplného

sekvenování DNA. Opětná sekvenace genu umožňuje identifikaci všech známých a nových genetických polymorfizmů zkoumaných genů. Amplifikace se používá při diagnóze onemocnění a genetické identifikaci živých organismů.

Při použití vynálezu při diagnostikování a testování se mohou amplifikovat celé genomy nebo frakce do kolonií za účelem sekvenování DNA známých polymorfizmů jediného nukleotidu (SNP). Identifikace SNP nachází použití ve výzkumu v oboru medicíny za účelem identifikovat faktory genetických poruch spojených s onemocněním. Typování genů pomocí SNP také nachází uplatnění při diagnostikování v oboru farmacie, což se využívá při identifikaci a léčbě pacientů pomocí specifických léků.

Použití vynálezu při tvoření profilů genetické diversity se mohou identifikovat amplifikací vzorku DNA do kolonií a následným sekvenováním DNA specifických značek v případě každé jednotlivé genetické entity populace například organismů nebo buněk nebo tkáně. Tímto způsobem se může definovat genetická diverzita vzorku stanovením počtu značek pro jednotlivou entitu.

Použití podle vynálezu při monitorování exprese genu, se exprimované molekuly mRNA tkáně nebo zkoumaného organismu přemění na molekuly cDNA, které se amplifikují do sady kolonií za účelem sekvenování DNA. Frekvence kolonií, které kódují danou mRNA je úměrná frekvenci molekul mRNA přítomných v počáteční tkáni. Aplikace monitorování genové exprese se zahrnuje do bio-medicínského výzkumu.

Mikroskopická sklíčka nesoucí celý genom (genomová sklíčka), kde celý genom živého organismu je přítomen v počtu kolonií DNA, který je dostatečný, aby obsahoval všechny sekvence uvedeného genomu. Tyto sklíčka se mohou připravit za použití metod podle vynálezu a mohou představovat genetické

karty libovolného živého organismu. Genetické karty nacházejí uplatnění ve výzkumu oboru medicíny a genetické identifikaci živých organismů, které se využívají v průmyslu.

Vynález se také může použít k provedení sekvenace celého genomu, kde celý genom živého organismu se amplifikuje jako sada kolonií pro sekvenování rozsáhlé DNA. Sekvenování celého genomu umožňuje například 1) přesnou identifikaci genetických kmenů libovolného živého organismu, 2) zkoumání nových genů kódovaných v genomu a 3) zkoumání nových genetických polymorfizmů.

Aplikace vynálezu nejsou omezeny na analýzu vzorků nukleové kyseliny z jednotlivého organismu nebo pacienta. Značky nukleových kyselin se mohou začlenit do templátů nukleových kyselin a mohou se tak amplifikovat, přičemž pro každý organismus nebo pacienta je možné použít odlišné značky nukleových kyselin. Tak v případě, že se stanoví sekvence amplifikované nukleové kyseliny, může se také stanovit sekvence značky a původ identifikovaného vzorku.

Vynález dále popisuje použití metod podle vynálezu nebo kolonií nukleové kyseliny podle vynálezu nebo velkého množství templátů nukleových kyselin podle vynálezu nebo pevných podkladů podle vynálezu, které se používají při přípravě molekul nukleové kyseliny za účelem sekvenování, monitorování genové exprese, stanovení profilů genetické diversity, diagnostikování, testování, sekvenování celého genomu, zkoumání polymorfizmu celého genomu a hodnocení a přípravy sklíček s celým genomem (to znamená celý genom jednotlivce na jednom podkladu) nebo se mohou použít při libovolné jiné aplikaci, která zahrnuje amplifikaci nebo sekvenování nukleových kyselin.

Vynález dále poskytuje sadu vhodnou pro použití při sekvenování, opětném sekvenování, monitorování exprese genu,

stanovení profilu genetické diversity, testování, sekvenování celého genomu, zkoumání a hodnocení celého genomu nebo libovolnou jinou aplikaci zahrnující amplifikaci nebo sekvenování nukleových kyselin. Tento kit obsahuje velké množství templátů nukleové kyseliny a koloniových primerů podle vynálezu vázaných na pevném podkladu.

Přehled obrázků na výkrese

Na obrázku č. 1 je zobrazeno schéma metody vhodné pro vytvoření kolonie nukleové kyseliny, jak se popisuje v jednom provedení vynálezu.

Na obrázku č. 2 je zobrazeno schéma přípravy templátu a následné zachycení na pevný povrch.

Na obrázku č. 2a je znázorněna příprava templátů A, B a B' obsahující sekvence koloniových primerů. Za použití PCR primerů TP1 a TP2 se z genomové DNA vytvořil templát o velikosti 3,2 Kb. Templáty A (obsahující 854 bp) a B (obsahující 927 bp) se vytvořily za použití PCR primerů TPA1/TPA2 nebo TPB1/TPB2. Oligonukleotidy TPA1 a TPB1 se mají upravený 5' konec a to buď fosfátovou nebo thiolovou skupinou, které slouží k následnému zachycení (*). Získané templáty obsahují sekvence odpovídající koloniovým primerům CP1 a/nebo CP2. 11 exonů genu se zde nazývá jako E1 až E11.

Na obrázku č. 2b je zobrazeno chemické zachycení koloniových primerů a templátů na skleněný povrch. Je zde zobrazena derivatizace pomocí ATS (aminopropyltriethoxysilan).

Na obrázku č. 3 jsou zobrazeny kolonie DNA vytvořené z koloniového primerů. Obrázek zobrazuje počet kolonií pozorovaných v poli pod 20-ti násobným zvětšením, jako funkci

koncentrace templátu vázaného na stěnu. Nejnižší koncentrace detekovatelného templátu je 10^{-13} M.

Na obrázku č. 4 je zobrazena diskriminace mezi koloniemi, které pochází z dvou různých templátů.

Na obrázku č. 4a se nachází zobrazení kolonií vytvořených z obou templátů a negativních kontrol.

Na obrázku č. 4b jsou zobrazeny kolonie pocházející z obou templátů ve stejné poloze ve stejné prohlubni, které se zviditelnilly dvěma různými barvivý, a negativní kontroly.

Na obrázku č. 4c jsou zobrazeny souřadnice obou typů kolonií v pod-sekci pole viditelného v mikroskopu. Jsou zde také zobrazeny kolonie z různých templátů, které se neshodují.

Na obrázku č. 5 jsou zobrazeny schémata templátu nebo zachycení oligonukleotidů na sklo. Krok A je pak derivatizace povrchu, přičemž povrch skleněného sklíčka se ošetří kyselým roztokem, aby se zvýšil počet volných hydroxylových skupina na povrchu skla. Připravená sklíčka se ponoří do roztoku aminosilanu. Zkratka ATS představuje aminopropyltriethoxysilan. Krok B: B1 nebo B2 pak znamená funkcionalizaci skleněného povrchu se síťovacími činidly a pak následuje zachycení oligonukleotidu. Aminoskupina reaguje se síťovacím činidlem prostřednictvím amidové vazby, což odpovídá kroku B1. Zkratka s-MBS znamená sulfo-m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysukcinimidester a zkratka s-SIAB znamená sulfo-N-sukcinimidyl[4-jodoacetyl]aminobenzoát. Krok B2: oligonukleotidy (oligonukleotidy s modifikovaným 5' koncem, kde se vyskytuje thiolová skupina) se zachytí na povrchu prostřednictvím vytvoření kovalentní vazby mezi thiolem a dvojnou vazbou maleimidu. Fosfátem pufovaný fyziologický roztok obsahuje PBS, 0,1 M NaH_2PO_4 , pH 6,5, 0,15 M NaCl). Krok

B3 zahrnuje zachycení oligonukleotidů za použití EDC a imidazolu. 5' konec fosfátem upravených oligonukleotidů reaguje s imidazolem v přítomnosti EDC za vzniku 5'-fosforimidazolidových derivátů (není zobrazeno). Deriváty tvoří fosforamidát vázaný s aminoskupinami derivatizovaného skleněného povrchu. Zkratka EDC znamená 1-etyl-3-(3-dimetylamino-propyl)-karbodiimidhydro-chlorid.

Na obrázku č. 6: je zobrazen graf, kde počet kolonií pozorovaný v poli mikroskopu při zvětšení 20 x je funkcí koncentrace templátu vázaného na stěnu. Templát DNA se vázal v různých koncentracích buď prostřednictvím spojovacího prostředku (EDC) na povrch skla derivatizovaného aminoskupinou (A) nebo na skleněný povrch funkcionalizovaný s-MBS (B). Kolonie s dvouřetězcovou DNA se podrobily štěpení restričními enzymy a získaly se jednotlivé řetězce hybridizované s komplementárním oligonukleotidem značené fluorescentní molekulou cy5.

Na obrázku č. 7 je zobrazen příklad sekvenování in situ kolonií DNA vytvořených na skle.

Na obrázku č. 7a je zobrazen výsledek po inkubaci s Cy5TM-dCTP se vzorkem, který se neinkuboval s primerem p181. Je možné vidět pět rozmazaných bodů, což ukazuje, že dochází k ne příliš dramatickému rušivému účinku (jako je srážení agregátů Cy5TM-dCTP, adsorpce nebo jednoduše nespecifické začlenění do DNA v koloniích nebo na povrchu).

Na obrázku č. 7b je zobrazen výsledek inkubace Cy5TM-dUTP se vzorkem, který se neinkuboval s primerem p181. Neobjevil se žádný bod, což indikuje, že neproběhlo začlenění fluorescenční báze v detekovatelném množství, kdy nukleotid určený pro začlenění neodpovídá sekvenci templátu následující hybridizovaný primer.

Na obrázku č. 7c je zobrazen výsledek inkubace Cy5TM-dCTP se vzorkem, který se inkuboval s primerem p181. Objevila se řada fluorescenčních bodů, což indikuje, že proběhlo začlenění fluorescenční báze v detekovatelném množství, přičemž nukleotid určený pro začlenění odpovídá sekvenci templátu následujícím po hybridizovaném primeru.

Obrázek č. 8 zobrazuje hybridizaci sond s oligonukleotidy zachycenými na Nucleolink před a po proběhnutí cyklů PCR. Obrázek ukazuje hybridizaci R58 s CP2 (5'-(fosfát)-TTTTTTTTTTAGAAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG) (značeno plnými kruhy), CP8 (5'(aminohexametylen)-TTTTTTTTTTTAGAAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG) (značeno plnými trojúhelníky), CP9 (5'(hydroxyl)-TTTTTTTTTTTAGAAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG) (značeno kosočtvercem), CP10 (5'(dimetoxytřítýl)-TTTTTTTTTTTAGAAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG) (značeno prázdnými kruhy) a CP11 (5'(biotin)-TTTTTTTTTTTAGAAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG) (značeno prázdnými trojúhelníky).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Příprava templátů DNA vhodných pro vytvoření kolonií DNA

Kolonie DNA se vytvořily z templátů DNA a koloniových primerů. Termín „sekvence koloniového primeru“ znamená sekvenci odpovídající sekvenci koloniového primeru a nazývá se „oligonukleotidovou sekvencí Y“ nebo „oligonukleotidovou sekvencí Z“.

Vlastnosti koloniových primerů se vybraly na základě výběru oligonukleotidových primerů, které vykazují slabě nespecifické začlenění nukleotidu v přítomnosti tepelně stabilní DNA polymerázy. Koloniové primery CP α (5'-p CACCAACCCAAACCAACCCAAACC) a CP β (5'-p AGAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG) se vybraly na základě jejich malé schopnosti začlenit

radioaktivně značeného nukleotidu [$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP] v přítomnosti stabilní DNA polymerázy (AmpliTaq, Perkin Elmer, Foster City, CA) ve standardním pufru za podmínek teplotních cyklů (teplota 94 °C po dobu 30 vteřin, teplota 65 °C po dobu 1 minuty, teplota 72 °C po dobu 2 minut, 50 cyklů).

Fragment DNA o velikosti 3,2 Kb se vybral jako modelový systém, který demonstruje možnost vytvoření kolonií za použití koloniových primerů a templátů DNA. Vybraný templát obsahuje lidský gen kódující receptor pro další glykozylaci konečných produktů (HUOXRAGE, GenBank číslo uložení D28769). RAGE specifické primery jsou uvedeny v tabulce č. 1. Templát o velikosti 3,2 kb pomocí PCR se amplifikoval z 0,1 μg lidské genomové DNA s 1 μM primery TP1 a TP2 s 1 jednotkou DNA polymerázy (AmpliTaq, Perkin Elmer, Foster City, CA) ve standardním pufru a za podmínek teplotních cyklů (teplota 94 °C po dobu 30 vteřin, teplota 65 °C po dobu 1 minuty, teplota 72 °C po dobu 5 minut, 40 cyklů). Tento fragment DNA o velikosti 3,2 Kb se použil jako templát pro sekundární PCR, za účelem vytvoření dvou kratších templátů vhodných pro vytvoření kolonie (templát A a B). Primery používané k vytvoření kratších templátů obsahují obě sekvence, které jsou specifické pro templát a sekvence koloniových primerů CP1 a CP2, za účelem amplifikace DNA na pevném povrchu. V obecném případě PCR primer používaný ke vzniku templátu DNA se upraví na jeho 5'konci buď fosfátovou nebo thiolovou skupinou. Po amplifikaci PCR se vytvořily fragmenty DNA, které obsahují sekvence koloniových primerů na jednom nebo na obou koncích, které sousedí s DNA fragmentem RAGE (popisuje se na obrázku č. 2a).

Templát A (dvouřetězcový templát, který obsahuje sekvenci koloniového primeru CP β na obou koncích) se vytvořil s 0,1 ng templátu o velikosti 3,2 Kb s 1 μM primery TPA1 a 1 μM TPA2 s 1 jednotkou DNA polymerázy (AmpliTaq, Perkin Elmer, Foster City,

CA) ve standardním pufru a za podmínek teplotních cyklů (teplota 94 °C po dobu 30 vteřin, teplota 65 °C po dobu 60 vteřin, teplota 72 °C po dobu 60 vteřin, 30 cyklů). Produkty se pak čistily na Qia-quick koloně od firmy Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Německo).

Templát B (dvouřetězcový templát, který obsahuje sekvence koloniových primerů odpovídající CP β) se vytvořil s 0,1 ng templátu o velikosti 3,2 kb s 1 μ M primery TPB1 a 1 μ M TPB2 s 1 jednotkou DNA polymerázy (AmpliTaq, Perkin Elmer, Foster City, CA) ve standardním pufru a za podmínek teplotních cyklů (teplota 94 °C po dobu 30 vteřin, teplota 65 °C po dobu 1 minuty, teplota 72 °C po dobu 1 minuty, 30 cyklů). Produkty se pak čistily na koloně Qia-quick od firmy Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Německo).

Templát B' (dvouřetězcový templát obsahující sekvence koloniových primerů odpovídající CP α a CP β na obou koncích) se vytvořil 0,1 ng templátu o velikosti 3,2 kb s 1 μ M primery TPB3 a 1 μ M TPB4 s 1 jednotkou DNA polymerázy (AmpliTaq, Perkin Elmer, Foster City, CA) ve standardním pufru a za podmínek teplotního cyklu (teplota 94 °C po dobu 30 vteřin, teplota 65 °C po dobu 1 minuty, teplota 72 °C po dobu 1 minuty, 30 cyklů). Produkty se pak čistily na kolonách Qia-quick od firmy Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Německo).

Všechny použité specifické oligonukleotidy při přípravě templátů DNA a pro vytvoření kolonií se uvádějí v tabulce č. 1 spolu s libovolnou chemickou modifikací.

Obecné schéma vykazující chemické začlenění koloniových primerů a templátů na skleněném povrchu je zobrazeno na obrázku č. 2b, kde se provedla derivatizace pomocí ATS (aminopropyltriethoxysilan).

Tabulka č. 1: Seznam oligonukleotidů používaných při přípravě
templátů a vytvoření kolonií

název	sekvence DNA	souřadnice (orientace)	úprava oligonukleotidů	použití
TP1		9810 (R)		templát o velikosti 3,2 kb
TP2		6550 (F)		templát o velikosti 3,2 kb
CP1		žádné	5' P	vytvoření kolonií
CP2		žádné	5' P	vytvoření kolonií
CP3		žádné	5' SH	vytvoření kolonií
CP4		žádné	5' SH	vytvoření kolonií
CP5		žádné	5' P	vytvoření kolonií
CP6		žádné	5' P	vytvoření kolonií
CP7		žádné	5' (NH ₂)	vytvoření kolonií
CP8		žádné	5' (NH ₂)	vytvoření kolonií
CP9		žádné	5' (OH)	kontrolní

				oligo
CP10		žádné	5' (DMT)	kontrolní oligo
CP11		žádné	5' (biotin)	kontrolní oligo
TPA1		6550 (F)	5' P	templát A
TPA2		7403 (R)	5' P	templát A
TPB3		9049 (F)	žádné	templát B'
TPB1		9265 (F)	žádné	templát B
TPB2		8411 (R)	5' P	templát B
TPB4		9265 (R)	5' SH	templát B'

Souřadnice pocházejí z „HUMOXRAGE gene“, přístupové číslo je D28769, symbol (R) znamená „reverzní“ a symbol (F) znamená „dopředný“.

Příklad 1a: Příprava náhodného templátu DNA lemovaného degenerativním primerem

Fragment DNA o velikosti 3,2 kb se vybral jako modelový systém pro demonstraci možnosti vytvořit kolonie za použití amplifikace PCR s náhodnými primery. Tato strategie se může aplikovat sekvenováním fragmentů DNA přibližné velikosti 100 kb a kombinací fragmentů s celými genomy. Fragment DNA o velikosti 3,2 kb se vytvořil pomocí PCR z lidské genomové DNA za použití primerů PCR TP1 5'-pGAGGCCAGAACAGTTCAAGG a TP2 5'-pCCTGTGACAAGACGACTGAA, jak se popisuje v příkladu 1. Fragment o velikosti 3,2 kb se pak štěpil na menší fragmenty kombinací restričních enzymů (EcoR1 a Hha1 za vzniku čtyř fragmentů o velikosti 800 bp). Štěpené nebo neštěpené fragmenty DNA se pak smíchaly s degenerovaným primerem p252 (5'-P TTTTTTTTTTISISISISISISIS, kde symbol I znamená inosin (který tvoří pár s A, T a C) a symbol S znamená G nebo C a kovalentně se váže na prohlubně „Nucleolink“ (Nunc, Německo). Ve zkumavkách pak proběhla náhodná PCR amplifikace na pevné fázi a vizualizace se provedla hybridizací se značenými sondami DNA, jak se popisuje v příkladu 2a.

Příklad 2: Kovalentní navázání templátů DNA a koloniových primerů na pevný podklad (plast) a tvorba kolonií s koloniovým primerem

Kovalentní navázání templátu a koloniového primeru na pevný podklad (plast)

Koloniový primer (CP2, 5'- TTTTTTTTTTAGAAGGAGAAG GAAAGGGAAAGGG s fosforylovaným 5'koncem (Microsynth GmbH, Švýcarsko) se zachytil v prohlubních plastových mikrotitračních destiček „Nucleolink“ (Nunc, Dánsko)

v přítomnosti různých dávek templátu A (připraveno způsobem popsaným v příkladu 1). 8 prohlubní se provedlo ve dvou provedeních se sedmi ředěními templátu 1/10 s primerem CP2. Nejvyšší počáteční koncentrace je 1 nM.

Prohlubně mikrotitračních destiček, na které se kovalentně navázaly koloniový primer CP2 a templát se připravily následujícím způsobem. Do každé prohlubně mikrotitrační destičky „Nucleolink“ se přidalo 30 μ l 1 μ M roztoku koloniového primeru s různou koncentrací templátu ředěného z 1 nM v 10 mM 1-metylimidazol (pH 7,0) (Sigma Chemicals). Do každé prohlubně se přidalo k roztoku koloniového primeru a templátu 10 μ l 40 mM 1-etyl-3-{3-dimethylaminopropyl}-karbodimidu (hodnota pH je 7,0) (Sigma Chemicals) v 10 mM 1-metyl-imidazolu. Prohlubně se pak zatavily a inkubovaly se při teplotě 50 °C přes noc. Inkubační prohlubně se pak dvakrát vypláchly 200 μ l RS (0,4 A NaOH, 0,25 % Tween 20), inkubovaly se 15 minut s 200 μ l RS, dvakrát se promyly 200 μ l RS a dvakrát s 200 μ l TNT (TNT tvoří 100 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20). Zkumavky se nechaly vyschnout při teplotě 50 °C a uchovávaly se v zataveném plastovém sáčku při teplotě 4 °C.

Tvorba kolonií

V každé prohlubni se vyvolal růst kolonií přidáním 20 μ l směsi PCR, čtyř dNTP (0,2 mM), 0,1 % BSA (bovinní sérový albumin), 0,1 % Tween 20, 8% DMSO (dimetylsulfoxid, Fluka, Švýcarsko), 1 x koncentrovaného pufru PCR a 0,025 jednotek/ μ l DNA polymerázy AmpliTaq (Perkin Elmer, Foster City, CA). Destičky s prohlubněmi se pak umístily do teplotního cyklovače a růst kolonií se uskutečnil inkubací zatavených prohlubní po dobu 5 minut při teplotě 94 °C a proběhlo 50 cyklů při následujících podmínkách: teplota 94 °C po dobu 30 vteřin, teplota 65 °C po dobu 2 minut, teplota 72 °C po dobu 2 minut.

Po ukončení uvedeného programu se prohlubně uchovávaly při teplotě 8 °C do dalšího použití. Dříve než se provede hybridizace se prohlubně naplnily 50 µl pufru TE (pufr TE obsahuje 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,4) a zahřály se na teplotu 94 °C po dobu 5 minut a ochladily se na ledu. Sonda se přidala po opětovém zahřátí na teplotu 45 °C.

Zviditelnění kolonií

Sonda:

Sondu tvoří fragment DNA obsahující 1 405 párů bazí, který zahrnuje na svém 3'konci sekvenci templátu (polohy nukleotidů 8 405 až 9 259). Sonda DNA se syntetizovala pomocí PCR za použití primeru p47 (5'-GGCTAGGAGCTGAGGAGGAA) amplifikujícího od báze 8 405 a TP2 biotinylovaného na 5'konci amplifikujícího od báze 9 876 kódujícího DNA-řetězce.

Hybridizace a detekce:

Sonda se naředila na koncentraci 1 nM v pufru „easyhyb“ (Boehringer Mannheim, Německo) a do každé prohlubně se přidalo 20 µl. Sonda a kolonie se denaturovaly při teplotě 94 °C po dobu 5 minut a pak se inkubovaly po dobu 6 hodin při teplotě 50 °C. Nadbytek sondy se odstranil promytím při teplotě 50 °C v 2x koncentrovaném SSC 0,1 % roztokem Tween. Sondy DNA se navázaly na zeleně fluorescenční fluorosféry potažené avidinem o průměru 0,04 µ (Molecular Probes) v pufru TNT po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Nadbytek kuliček se odstranil promytím puforem TNT. Kolonie se zviditelnily mikroskopicky a provedla se analýza zobrazení, jak se popisuje v příkladu 2a. Na obrázku č. 3 je zobrazen počet kolonií pozorovaných v poli mikroskopu při 20-ti násobném zvětšení, jako funkce koncentrace templátu vázaného na prohlubeň. Nejnižší koncentrace detekovatelného templátu odpovídá koncentraci 10^{-13} M.

Příklad 2a: Kovalentní navázání templátů DNA a koloniových primerů na pevný podklad (plast) a tvorba kolonií s degenerovaným primerem.

Kovalentní navázání templátu a koloniového primeru na pevný podklad (plast)

Mikrotitrační prohlubně s p252 s fragmenty templátové DNA se připravily následujícím způsobem: do každé prohlubně „Nucleolink“ se přidalo 30 μ l 1 μ M roztoku koloniového primeru p252 s různou koncentrací templátu ředěného z koncentrace 0,5 nM v 10 mM 1-metylimidazolu (pH 7,0) (Sigma Chemicals). Do každé prohlubně se k roztoku koloniového primeru a templátu přidalo 10 μ l 40 mM 1-etyl-3-(dimethylaminopropyl)karbodiimidu (pH 7,0) (Sigma Chemicals) v 10 mM 1-metylimidazolu. Prohlubně se pak zatavily a inkubovaly se přes noc při teplotě 50 °C. Po inkubaci se prohlubně promyly dvakrát 200 μ l RS (0,4 A NaOH, 0,25 % Tween 20), vše se pak inkubovalo po dobu 15 minut s 200 μ l RS, pak následují dvě promytí 200 μ l RS a dvě promytí 200 μ l TNT (pufr TNT zahrnuje 100 mM TrisHCl pH7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20). Zkumavky se sušily při teplotě 50 °C a uchovávaly se v zataveném plastovém sáčku při teplotě 4 °C.

Tvorba kolonií

Tvorba kolonií proběhla podle upraveného protokolu, který umožňuje náhodnou iniciaci v každé prohlubni s 20 μ l směsi PCR, která obsahuje čtyři dNTP (0,2 mM každého dNTP), 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, 8% DMSO (dimetylsulfoxid, Fluka, Švýcarsko), 1x koncentrovaný pufr a 0,025 jednotek/ μ l DNA polymerázy AmpliTaq (Perkin Elmer, Foster City, CA). Destičky s prohlubněmi se pak umístily do teplotního cyklovače a proběhla amplifikace inkubací zatavených prohlubní po dobu 5 minut při teplotě 94 °C a proběhlo 50 cyklů za následujících podmínek: teplota 94 °C po dobu 30 vteřin, teplota 65 °C po

dobu 2 minut, teplota 72 °C po dobu 2 minut. Po dokončení tohoto programu se prohlubně udržovaly při teplotě 8 °C do dalšího použití. Před hybridizací se prohlubně naplnily 50 µl pufru TE (pufr TE obsahuje 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,4) a obsah se zahřál na teplotu 94 °C po dobu 5 minut a ochladil se na ledu. Sonda se přidala po ohřátí na teplotu 45 °C.

Zviditelnění kolonií

Sondy:

Dva fragmenty DNA o velikosti 546 a 1 405 párů bazí obsahující sekvence původního templátu se amplifikovaly pomocí PCR. Kódující DNA-řetězec se značil biotinem za použití PCR primeru značeným biotinem na jeho 5'konci. Souřadnice párů bazí sondy jsou 6 550 až 7 113 a 6 734 až 9 805.

Hybridizace a detekce:

Sonda se ředila na koncentraci 1 nM v pufru „easyhyb“ (Boehringer.Mannheim, Německo) a do každé prohlubně se přidalo 20 µl. Sonda a kolonie se denaturovaly při teplotě 94 °C po dobu 5 minut a pak se inkubovaly po dobu 6 hodin při teplotě 50 °C. Nadbytek sondy se odstranil promytím při teplotě 50 °C v 2x koncentrovaném SSC s 0,1 % roztokem Tween. Sondy DNA se navázaly na zeleně fluorescenční fluorosféry potažené avidinem o průměru 40 nanometrů (Molecular Probes, Portland, OR) v pufru TNT po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Nadbytek částic se odstranil promytím pufrém TNT. Fluorescence se detekovala za použití inverzního mikroskopu (za použití objektivu 20x/0,4 LD Achroplan na Axiovert S100TV s arc rtuťovou lampou HBO 100W/2, Carl Zeiss, Oberkochen, Německo) spojeného s kamerou 768(H)x512(V)pixel-CCD (Princeton Instruments Inc. Trenton, NJ, USA). Expozice trvala 20 vteřin přes sadu filtrů XF22 (Ex. filtr: 485DF22, dichroický filtr: 505DRLPO2 Em: 530DF30) a XF47 (Ex. filtr: 640DF20, dichroický filtr: 670DRLPO2 Em: 682DF22) od firmy Omega Optical

(Brattleboro Vt) v případě značení FITC a Cy5. Data se analyzovala za použití software WinWiew (Princeton Instruments Inc., Trenton NJ, USA). Počet kolonií v poli mikroskopu se spočítal ve dvou provedení prohlubní za použití softwaru pro analýzu zobrazení.

Příklad 3: Sekvenační diskriminace ve různých koloniích, která pochází z různých poměrů dvou různých kovalentně vázaných templátů a koloniového primeru

Kovalentní navázání templátů a koloniového primeru na pevný podklad (plast)

Koloniový primer (CP2, 5'-TTTTTTTTTTAGAAGGAGAAGGAAAGG GAAAGGG s fosforylovaným 5'koncem (Microsynth GmbH, Švýcarsko) se zachytil v prohlubních plastových mikrotitračních destiček „Nucleolink“ (Nunk, Dánsko) v přítomnosti různých dávek templátu A (připraveno způsobem popsáním v příkladu 1). Série 8 prohlubní se provedla ve třech provedeních se sedmi ředěními obou templátů 1/10. Ředění templátu jsou upraveny opačným směrem tak, že nejvyšší koncentrace templátu se shoduje s nejnižší.

Prohlubně mikrotitračních destiček, na které se kovalentně navázaly koloniový primer CP2 a oba templáty se připravily následujícím způsobem. Do každé prohlubně mikrotitrační destičky „Nucleolink“ se přidalo 30 μ l 1 μ M roztoku koloniového primeru CP2 s různou koncentrací obou templátů ředěného z 1 nM v 10 mM 1-metylimidazolu (pH7,0) (Sigma Chemicals). Do každé prohlubně se přidalo k roztoku koloniového primeru a templátu 10 μ l 40 mM 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodimidu (hodnota pH je 7,0) (Sigma Chemicals) v 10 mM 1-metylimidazolu. Prohlubně se pak zatavily a inkubovaly se při teplotě 50 °C přes noc. Inkubační prohlubně se pak dvakrát vypláchly 200 μ l RS (0,4 N NaOH, 0,25 % Tween 20), inkubovaly

se 15 minut s 50 μ l RS, třikrát se promyly 50 μ l RS a třikrát s 50 μ l TNT (TNT tvoří 100 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20). Zkumavky se uchovávaly v TNT při teplotě 4 °C.

Tvorba kolonií

V každé prohlubni se vyvolal růst kolonií přidáním 20 μ l směsi PCR, kterou tvoří čtyři dNTP (0,2 mM), 0,1 % BSA (bovinní sérový albumin), 0,1 % Tween 20, 8% DMSO (dimetylsulfoxid, Fluka, Švýcarsko), 1 x koncentrovaný pufr PCR a 0,025 jednotek/ μ l DNA polymerázy AmpliTaq (Perkin Elmer, Foster City, CA).

Destičky s prohlubněmi se pak umístily do teplotního cyklovače a růst kolonií se uskutečnil inkubací zatavených prohlubní po dobu 5 minut při teplotě 94 °C a proběhlo 50 cyklů při následujících podmínkách: teplota 94 °C po dobu 30 vteřin, teplota 65 °C po dobu 2 minut, teplota 72 °C po dobu 2 minut. Po ukončení uvedeného programu se prohlubně uchovávaly při teplotě 8 °C do dalšího použití. Dříve než se provede hybridizace se prohlubně naplnily 50 μ l pufru TE (pufr TE obsahuje 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,4) a zahřály se na teplotu 94 °C po dobu 5 minut a ochladily se na ledu. Sonda se přidala po opětovém zahřátí na teplotu 50 °C.

Zviditelnění kolonií

Sondy:

Dva fragmenty DNA o velikosti 546 a 1 405 párů bazí odpovídající sekvencím fragmentu DNA o velikosti 3,2 kb na svém 5' a 3' konci se amplifikovaly pomocí PCR. Kódující DNA-řetězec se značil biotinem za použití PCR primeru značeného biotinem (popisuje se v příkladu 2). Dvě sondy se denaturovaly zahřáním na teplotu 94 °C po dobu 5 minut, pak se rychle ochladily v 1 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,4 a nechaly se navázat na fluorosféry potažené streptavidinem o průměru 0,04 μ m, které

se značily různými barvivy po dobu 2 hodin při teplotě 4 °C. Sondy vázané na částicích se ředily 20 krát v pufru „easyhyb“ předeřhřátém na teplotu 50 °C. Do každé prohlubně, která obsahuje denaturované kolonie se přidalo 20 µl sond.

Hybridizace a detekce:

Hybridizace se provedla při teplotě 50 °C po dobu 5 hodin. Nadbytek sondy se odstranil promytím při teplotě 50 °C v 2x koncentrovaném SSC s 0,1 % roztokem SDS. Kolonie se zviditelnily mikroskopem s objektivem umožňující dvacetinásobné zvětšení s expozicí 20 vteřin a provedla se analýza zobrazení způsobem popsáným v příkladu 2a. Na obrázku č. 4a je uvedeno zobrazení kolonií vytvořených z templátů a negativních kontrol. Na obrázku č. 4b jsou zobrazeny kolonie vytvořené z templátů ve stejné poloze ve stejné prohlubni zviditelněné dvěma rozdílnými barvami a negativní kontroly. Obrázek č. 4c zobrazuje souřadnice obou typů kolonií v podsekcí mikroskopického pole. Obrázek č. 4c demonstruje, že kolonie z různých templátů nejsou shodné.

Příklad 4: Kovalentní navázání templátů DNA a oligonukletidů na skleněné pevné podklady

Skleněná skříčka derivatizovaná aminosilanem se použila jako pevný podklad pro kovalentní zachycení oligonukleotidových sond upravených thiolovou skupinou za použití heterobifunkčních síťovacích činidel. Vybraná činidla vykazují skupiny reaktivní s thiolovou skupinou (maleimid) a aminoskupinou (sukcinimidylester). Zachycení oligonukleotidu a stabilita imobilizovaných molekul silně závisí na stabilitě síťovacího činidla za daných podmínek. Reakční schéma templátů DNA nebo zachycení oligonukleotidů na skle se popisuje na obrázku č. 5.

Hodnotila se stabilita při uchovávání připravených skleněných sklíček se síťovacími činidly s-MBS a s-SIAB a jejich teplotní stabilita. Důležitým faktorem, který ovlivňuje rozsah hybridizace imobilizovaných oligonukleotidových sond je hustota zachycených sond (popisuje se v publikaci Beattie et al., 1995 a Joss et al., 1997). Tento účinek se studoval při různých koncentracích oligonukleotidů během imobilizace a testování hustoty zachycených oligonukleotidů hybridizací.

Materiály a metody

Ošetření mikroskopických skleněných sklíček kyselinou

Mikroskopická skleněná sklíčka (Knittel, Merck ABS) se namočily do základního roztoku Helmanex během jedné hodiny (HelmanexII^R 0,25 %, 1N NaOH). Sklíčka se promyla vodou, ponořily se přes noc do 1M HCl, promyly se opět vodou a ošetřily se po dobu jedné hodiny roztokem kyseliny sírové (H₂SO₄/H₂O v poměru objemů 1/1 a přidalo se malé množství čerstvého sulfátu amonného). Sklíčka se promyla vodou a etanolem a nakonec čistým acetonem. Sklíčka se sušila a uchovávala ve vakuu až do doby dalšího použití.

Silanizace povrchu

Předem ošetřená sklíčka se ponořila do 5 % roztoku ATS (aminopropyltriethoxysilan, Aldrich) v acetonu. Silanizace se provedla při teplotě místnosti po dobu dvou hodin. Po třech promytích v acetonu (jedno promytí trvá 5 minut) se sklíčka promyla etanolem, sušily se a uchovávaly se vakuu.

Zachycení síťovacího činidla

Síťovací činidla s-MBS a s-SIAB (sulfo-m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysukcinimidester a zkratka s-SIAB znamená sulfo-N-sukcinimidyl[4-jodoacetyl]aminobenzoát, Pierce, Rockford IL) se připravily jako 20 mM roztoky v PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosforečnanem, 0,1 M NaH₂PO₄, pH7,2, 0,15 M NaCl). Sklíčka upravená silanem, na která se nanalo 80 µl roztoku

síťovacího činidla se přikryly krycími mikroskopickými sklíčky a nechaly se reagovat po dobu 5 hodin při teplotě 20 °C. Sklíčka se promyla PBS, krátce se ponořila do vody a opláchla se etanolem. Sklíčka se pak sušila a uchovávala se ve vakuu ve tmě do doby dalšího použití.

Zachycení oligonukleotidu

Oligonukleotidy se syntetizovaly tak, že se jejich 5' konec upravil thiolovou skupinou (CP3 a CP4 Eurogentec, Brussels) nebo fosforečnanovou částí (CP1 a CP2, Eurogentec, Brussels) za použití standardní chemie fosforamiditu.

Oligonukleotidové primery, které mají na svém 5' konci thiolovou skupinu (CP3 a CP4) se připravily jako 100 µM roztoky ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosforečnanem (NaPi obsahuje 0,1 M NaH₂PO₄ pH 6,6, 0,15 M NaCl) a na sklíčka se nanosly kapky o objemu 1 µl, přičemž sklíčka se funkcionalizovala síťovacím činidlem. Sklíčka se nechala kultivovat po dobu 5 hodin při teplotě místnosti. Sklíčka se uchovávala v saturované vlhké atmosféře, aby se předešlo odpaření. Sklíčka se promyla za stálého míchání pufrem NaPi. V případě studia teplotní stability se sklíčka dvakrát ponořila do pufru Tris (10 mM, pH 8) po dobu 5 minut při teplotě 100 °C a přímo se ponořily do roztoku 5x koncentrovaný SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrát sodný, pH 7) při teplotě 4 °C po dobu 5 minut. Sklíčka se až do dalšího použití uchovávala v 5x koncentrovaném roztoku SSC při teplotě 4 °C.

Oligonukleotidové primery, které mají na svém 5' konci fosfátovou skupinu (CP1 a C2), se aplikovaly (v kapkách o celkovém objemu 1 µl) po dobu 5 hodin při teplotě místnosti na aminoderivatizované skla, jako 1 µM roztoku v 10 mM 1-metylimidazolu (pH 7,0) (Sigma Chemicals), který obsahuje 40 mM 1-ethyl-3-(3-dimetylamino)propyl)karbodiimid (EDC, Pierce,

Rockford, IL). Sklíčka se promyla dvakrát při teplotě 100 °C v pufru Tris (tento pufr obsahuje 10 mM Tris pH 8) a přímo se ponořily do 5x koncentrovaného roztoku SSC při teplotě 4 °C po dobu 5 minut. Sklíčka se uchovávala v 5x koncentrovaném roztoku SSC při teplotě 4 °C až do doby dalšího použití.

Zachycení oligonukleotidu a templátové DNA

Oligonukleotidové primery, které mají na svém 5'konci thiolovou skupinu, (CP3 a CP4) a templát B's thiolovou skupinou na svém 5'konci se smíchaly ve fyziologickém roztoku pufovaném fosforečnanem (roztok NAPI obsahuje 0,1 M NaH_2PO_4 pH6,6, 0,15 M NaCl). Koncentrace templátu DNA kolísá od 0,001 do 1 μM a koncentrace primeru se pohybuje v rozmezí od 0,1 do 100 μM , přičemž optimální koncentrace templátu je 1 μM a v případě primeru to je hodnota 100 μM . Dále se postupuje podle způsobu zachycení primerů CP3 a CP4 na funkční povrch sklíčka popsaného shora v textu.

Oligonukleotidové primery, které mají na svém 5'konci fosfátovou skupinu, (CP1 a CP2) a templát B s fosfátovou skupinou na svém 5'konci se smíchaly ve 10 mM roztoku 1-metylimidazolu (pH 7,0) (Sigma Chemicals), který obsahuje 40 mM 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC, Pierce, Rockford, IL). Koncentrace templátu DNA kolísá od 0,001 do 10 nM a koncentrace primeru se pohybuje v rozmezí od 0,1 do 1 μM , přičemž optimální koncentrace templátu je 10 nM a v případě primeru to je hodnota 1 μM . Dále se postupuje podle způsobu zachycení primerů CP1 a CP2 na aminoderivatizovaný povrch sklíčka popsaného shora v textu.

Hybridizace s fluorescenčně značenými sondami

Oligonukleotidové sondy, které jsou fluorescenčně značené molekulami Cy5 nebo FITC na jejich 5'konci, se syntetizovaly Eurogentec (Brussels). Aby se zabránilo nespecifické

hybridizaci, sklíčka se inkubovala s blokačním roztokem (tento roztok obsahuje 5 x koncentrovaný roztok SSC, Tween 0,1 %, BSA 0,1 %) po dobu jedné hodiny a promyly se za stálého míchání v 5x koncentrovaném roztoku SSC (promývání proběhlo dvakrát a trvalo 5 minut). Oligonukleotidové sondy se ředily na koncentraci 0,5 μM v 5 x koncentrovaném roztoku SSC, Tween 0,1 % a nanesly se na skleněný povrch po dobu 2 hodin při teplotě místnosti. Sklíčka se propláchla za stálého míchání při teplotě 37°C 5x koncentrovaným roztokem SSC po dobu 5 minut a dvakrát 2 x koncentrovaným roztokem SSC, který obsahuje 0,1 % SDS, po dobu 5 minut.

Hybridizace s radioaktivně značenými sondami

Jako hybridizační sondy za účelem kvantifikovat výtěžek hybridizace se použily radioaktivně značené oligonukleotidy komplementární s kovalentně vázanými oligonukleotidy.

Za použití polynukleotidové kinázy bakteriofága T4 (New England Biolabs, Beverly, MA) se enzymaticky značily 5'konce oligonukleotidů pomocí $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (Amersham, UK). Nadbytek $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ se odstranil kolonou „Chroma Spin TE-10“ (Clontech, Palo Alto, CA). Radioaktivně značené oligonukleotidy (0,5 μM oligonukleotidu v 5x koncentrovaném roztoku SSC, Tween 0,1 %) se nanesly na derivatizovaná sklíčka po dobu 2 hodin při teplotě místnosti. Sklíčka se jednou promyla za stálého míchání v 5x koncentrovaném roztoku SSC po dobu 5 minut a dvakrát v 2x koncentrovaném roztoku SSC, SDS 0,1 % po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Po hybridizaci se stanovila specifická aktivita za použití scintilačního počítáče.

Pozorování mikroskopem

Sklíčka se přelila 5x koncentrovaným roztokem a překryla se mikroskopickým krycím sklíčkem. Fluorescence se detekovala za použití inverzního mikroskopu model Axiovert S100TV, který

má arc rtuťovou lampu HBO 100W/2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo) spojený s kamerou CCD vybavenou CCD Kodak s formátem 768(H) x 512 (V) pixelů, 6,91 x 4,6 mm, velikost pixelu je 9 x 9 μm^2 (Princeton Instruments Inc. Trenton, NJ, USA). Doba expozice je 1 až 50 vteřin a použil se objektiv LD Achroplan 20x/0,400 (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo) a sada filtrů XF22 (ex. 485DF22, dichroický filtr 505DRLPO2 Em: 530DF30) a XF47 (Ex: 640DF20, dichroický filtr 670DRLPO2 Em: 682DF22) od Omega Optical (Brattleboro VT) v případě FITC a Cy5 fluoroforů. Data se analyzovaly za použití software Winwiew (Princeton Instruments Inc., Trenton NJ, USA).

Výsledky

Hodnocení stability zachycení při uchovávání a teplotní stability.

Hodnotila se stabilita při uchovávání sklíček připravených s s-MBS a s-SIAB. Protože tato činidla jsou citlivá vůči hydrolýze, výsledky zachycení oligonukleotidů budou záviset na jejich stabilitě. Aminoderivatizovaná sklíčka se funkcionalizovaly čerstvě připravenými síťovacími činidly, jako je s-MBS a s-SIAB. Funkcionalizovaná sklíčka se uchovávala po zachycení pomocí síťovacího činidla po dobu 10 dní v desikátoru ve vakuu ve tmě a při teplotě místnosti. Po této době se testovaly skladovaná sklíčka ($t = 10$ dní) a sklíčka, která bezprostředně reagovaly se síťovacími činidly ($t = 0$). Výsledky získané po reakci oligonukleotidem upraveným thiolovou skupinou a hybridizací s komplementární fluorescenční sondou se porovnály pro oba časy $t = 0$ a $t = 10$ dní.

Po imobilizaci sklíčka funkcionalizovaná s-SIAB jsou po deseti dnech skladování zcela stabilní, jak je zřejmé ze stejných výsledků hybridizace pro $t = 0$ a $t = 10$ dní. Naopak spojení s-MBS se skleněným povrchem je méně stabilní a vede k

30 % ztrátě výtěžku zachycení oligonukleotidu a hybridizace při deseti dnech skladování. Preferují se sklíčka funkcionalizovaná pomocí s-SIAB a mohou se připravovat s předstihem a mohou se uchovávat suchá ve vakuu, ve tmě a po dobu alespoň deseti dní, aniž dojde k žádnému snížení výtěžku zachycení sondy.

Za účelem hodnocení teplotní stability oligonukleotidů zachycených na skleněném povrchu se sklíčka vystavila ošetření při teplotě 100 °C po dobu 5 minut v 10 mM Tris-HCl, pH 8. Zbývající oligonukleotid, který zůstává po promytí stále imobilizovaný, se testoval hybridizací s fluorescenčně značeným komplementárním oligonukleotidem. Přibližně 14 % zachycených molekul se uvolnilo ze sklíček upravených pomocí s-SIAB a 17 % zachycených molekul se uvolnilo ze sklíček upravených pomocí s-MBS po prvních 5 minutách promývání, ale další uvolnění se detekovalo při druhém promytí pro oba případy (tabulka č. 1A). Tyto výsledky jsou povzbudivé ve srovnání s výsledky získanými v publikaci Chrisey et al., 1996, kde se uvolnilo více jak 62 % oligonukleotidů připojených na fúzované silikonová sklíčka prostřednictvím síťovacího činidla SMPB (sukcinimidyl-4-[p-maleimidofenyl]butyrát). Tyto výsledky se naměřily po deseti minutách ošetření v PBS při teplotě 80 °C.

Tabulka č. 1A: Studie teplotní stability

	výsledky hybridizace (jednotky normalizované na 100 %)		
	čerstvě zachyceno	po 5 min promytí při teplotě 100 °C	po 2 x 5 minutách promytí při teplotě 100 °C
s-MBS	80±6	69±4	73±4
s-SIAB	100±9	84±8	87±3

Oligonukleotidy se zachytily na sklíčka funkcionalizovaná buď s-MBS nebo s-SIAB. Zachycené oligonukleotidy se testovaly hybridizací s fluorescenčně značeným komplementárním oligonukleotidem. Fluorescenční signál je normalizovaný na hodnotu 110 v případě nejsilnějšího získaného signálu. Uvádějí se průměrné hodnoty tří provedení analýzy.

Hybridizace jako funkce zachycení sondy

Studovaly jsme rozsah hybridizace kovalentně vázaných oligonukleotidových sond jako funkci povrchového pokrytí zachycených oligonukleotidů za použití síťovacích činidel s-MBS a s-SIAB a reakcí zprostředkovaných EDC. Koncentrace oligonukleotidů aplikovaných za účelem imobilizace byla 1 μM EDC a v případě síťovacího činidla kolísá v rozmezí 1 až 800 μM . Hustota na povrchu se testovala hybridizací se sondami značenými ^{32}P . Optimální koncentrace zachycení primeru za použití heterobifunkčních síťovacích činidel je 500 μM , které souhlasí s povrchovou hustotou hybridizovaných molekul 60 fmol/ mm^2 v případě s-MBS a v případě s-SIAB 270 fmol/ mm^2 . Podobné hustoty se dosáhlo v případě s-MBS za použití zachycení oligonukleotidů s fosfátovou skupinou na svém 5'konci na aminosilanizovaném skle zprostředkovaného EDC/imidazolem. Pouze 1 μM roztoky oligonukleotidu jsou nezbytné pro dosažení stejného výsledku zachycení.

Tabulka č. 1B: Hybridizace jako funkce zachycení sondy

koncentrace oligonukleotidu používaného při zachycení (μM)	Hybridizované oligo (fmol/ mm^2)		
	s-MBS	s-SIAB	EDC
1	NT	NT	50
100	10	100	NT
500	60	270	NT

Oligonukleotidy se zachytily na sklíčka funkcionalizované buď s-MBS nebo s-SIAB nebo prostřednictvím aktivačního činidla EDC. Zachycené oligonukleotidy se testovaly hybridizací s radioaktivně značeným komplementárním oligonukleotidem. Specifická aktivita a proto také hustota hybridizovaných molekul se stanovila scintilační kapalinou. Zkratka NT znamená netestovalo se.

Povrchová hustota 60 fmol/cm^2 odpovídá průměrnému molekulovému prostoru mezi vázanými oligonukleotidy, což je 8 nm. Podle našich výsledků hustota pokrytí 30 fmol/mm^2 (prostor mezi molekulami 20 nm) je dostatečná pro získání kolonií DNA. Tento výtěžek je možné získat imobilizací primerů v koncentraci $100 \text{ } \mu\text{M}$ za použití heterobifunkčního síťovacího činidla s-SIAB nebo $1 \text{ } \mu\text{M}$ sond za použití přístupu sprostředkovaného EDC. Hustota hybridizace je v rozmezí hodnoty nejvyšší hustoty získané na sklíčkách (jak se popisuje v publikaci Guo et al., 1994, Joss et al., 1997, Beattie et al., 1995).

Tvorba kolonií DNA na skle: tvorba kolonií závisí na délce, koncentraci templátu a koncentraci primerů.

Teoreticky tvorba kolonií DNA vyžaduje vhodnou hustotu primerů zachycených na povrchu odpovídající vhodné délce templátové DNA. Za účelem optimální tvorby kolonií DNA je důležité definovat rozmezí hustot vázaných primerů a templátů, stejně jako stechiometrický poměr mezi templátem a primerem.

Materiál a metody

Příprava sklíček

Sklíčka se derivatizovala a funkcionalizovala, jak se popisuje shora v textu (materiály a metody). Primery kolonií DNA jsou CP1 a CP2. Templáty kolonií se připravily způsobem popsáním v příkladu 1 v případě templátu B', ale za použití

primerů TPB3 a TPB2. Upravené kolonie primerů a templátů se aplikovaly na skleněný povrch v různých koncentracích koloniového primeru a koloniového templátu.

Tvorba kolonií

Sklička uchovávaná v 5 x koncentrovaném roztoku SSC se promyla vodou filtrovanou přes mikrofiltr, aby se odstranily sole. Růst kolonií se vyvolal na skleněném povrchu směsí PCR, která obsahuje čtyři druhy dNTP (0,2 mM), 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, 1x pufr PCR a 0,05 U/μl DNA polymerázy AmpliTaq (Perkin Elmer, Foster City, CA). Směs PCR se umístila do zatavené komory (MJ Research, Watertown, MA). Sklička se umístila do teplotního cyklovače (The DNA Engine, MJ Research Watertown, MA) a provedly se následující teplotní cykly: krok 1 při teplotě 94 °C po dobu 1 minuty, krok 2 při teplotě 65 °C po dobu 3 minut, krok 3 při teplotě 74 °C po dobu 6 minut a tento program se opakuje 50 krát. Po ukončení tohoto programu se sklička držela při teplotě 6 °C až do dalšího použití.

Štěpení kolonií s dvouřetězcovou DNA

Skleněný povrch obsahující DNA se štěpil restriční nukleázou tak, že se kolonie přelila restričním enzymem v 1x koncentrovaném štěpicím pufru. Reakce proběhla dvakrát po dobu 1,5 hodiny při teplotě 37 °C. Kolonie s dvouřetězcovou DNA se denaturovaly ponořením skliček dvakrát do pufru Tris (obsahuje 10 mM, pH 8) při teplotě 100 °C po dobu 5 minut. Pak následuje promytí 5x koncentrovaným roztokem SSC při teplotě 4 °C. Sklička se uchovávala v 5x koncentrovaném roztoku až do dalšího použití.

Hybridizace kolonií s jednořetězcovou DNA

Aby se zabránilo nespecifické hybridizaci, sklička se inkubovala s blokačním roztokem (5x koncentrovaný roztok SSC, 0,1 % Tween, 0,1 % BSA) po dobu 1 hodiny a sklička se promyla

5x koncentrovaným roztokem SSC (promytí se provedlo dvakrát po dobu 5 minut). Oligonukleotid s fluorescenčně značeným 5'koncem pomocí molekuly Cy5 (Eurogentec, Brussels) se ředil na koncentraci 0,5 μ M v 5x koncentrovaném roztoku SSC, Tween 0,1 % a nanese se na skleněný povrch na dobu alespoň 2 hodin. Sklíčka se promyla za stálého míchání 5x koncentrovaným roztokem SSC po dobu 5 minut a dvakrát 5 x koncentrovaným roztokem s 0,1 % SDS po dobu 5 minut při teplotě 37 °C.

Sklička se zviditelnila dříve popsaným způsobem.

Pozorovalo se, že rozsah hybridizace je funkce hustoty zachycení oligonukleotidu. Podobná studie s vázanými templáty DNA ukázal, že tvorba kolonií je také funkcí koncentrace templátu zachyceného na sklíčkách. V závislosti na chemických postupech užívaných při zachycení oligonukleotidu a templátu je optimální koncentrace templátu 1 μ M v případě bifunkčního síťovacího činidla s-MBS (obrázek č. 6B) a 1 nM v případě EDC karbodiimidu (obrázek č. 6A). Je zajímavé, že vyšší koncentrace templátu nezvyšuje počet kolonií v případě chemie EDC a dosáhlo se hodnoty odpovídající maximálnímu počtu kolonií.

Studovaly jsme tvorbu kolonií (počet) jako funkci koncentrace primerů, koncentrace templátové DNA aplikované na povrch a délku templátu DNA.

Také se hodnotil počet kopií templátu v každé kolonii. Kvantifikace se založila na fluorescenční detekci fluoroforů značených molekulami Cy5, Cy3 nebo fluoresceinem doplněnými činidlem proti bělení (Prolong, Molecular Probes, Portland, OR). Kalibrace se provedla pomocí hybridizačních experimentů pomocí primerů zachycených na povrchu a odpovídající skutečná hustota se stanovila pomocí radioaktivity.

Příklad 5: In-situ sekvenování DNA kolonií

Sklička (o průměru 5 mm, Verrerie de Carouga, Švýcarsko) se nejdříve umístily do 0,2 % roztoku Helmanex (ve vodě), do lázně 1N NaOH po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti, pak se propláchla destilovanou vodou, čistým hexanem a opět dvakrát destilovanou vodou a aplikovalo se 1 M HCl přes noc při teplotě místnosti. Pak se sklička promyla dvakrát destilovanou vodou a ošetřila se H_2SO_4 (50 %) plus $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Sklička se opět promyla destilovanou vodou a pak dvakrát etanolem. Sklička se derivatizovala ATS (jak se popisuje v příkladu 4).

Koloniové primery CP1 (5'-p TTTTTTTTTTAGAAGGAGAAGG AAAGGGAAAGGG) a CP2 (5'-p TTTTTTTTTTAGAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG) fosforylované na 5'konci (Microsynth GmbH, Švýcarsko) a templátová DNA B (připravený, jak se popisuje v příkladu 1) se kovalentně svým 5'koncem zachytily na skličku o průměru 5 mm (Verrerie de Carouge, Švýcarsko) tak, aby konečná koncentrace byla 1 μM až 10 nM. Postupuje se následovně. 2 nm každého primeru se přidaly k 0,2 nm templátu v 1 ml roztoku A (41 μl metylimidazolu (Sigma, kat. č. M-8878) v 50 ml H_2O , pH se upravilo na hodnotu 7 pomocí HCl) a pak se vše smíchalo v poměru 1:1 s roztokem D (roztok D je 0,2 mM EDC v 10 ml roztoku A). Na obě strany sklíček se nanese 3,5 μl směsi a sklička se inkubovala přes noc při teplotě místnosti. Sklička se pak krátce opláchla 5x koncentrovaným roztokem SSC a umístila se do pufru 10 mM Tris pH 8,0 při teplotě 100 °C po dobu dvakrát pět minut.

Nespecifická místa na skle se blokovala bovinním sérovým albuminem (BSA, Boehringer Mannheim GmbH, Německo, kat. číslo 238040) o koncentraci 1 mg/ml v 5x koncentrovaném roztoku SSC po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti a pak se promyly destilovanou vodou.

15.08.01

Sklíčka se pak jednotlivě umístily do reakční zkumavky Microamp™ (Perkin Elmer), která obsahuje 170 µl směsi PCR a pak se vytvořily kolonie DNA za použití Taq polymerázy (AmpliTaq, PE-Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), přičemž proběhlo 50 cyklů (teplota 94 °C po dobu 60 vteřin, teplota 60 °C po dobu 3 minut, teplota 72 °C po dobu 6 minut) v teplotním cyklovači MTC 200 (MJ Research, Watertown, MA). DNA na každém sklíčku se štěpila dvakrát za použití 1,3 jednotek restriční endonukleázy PvuII (Stratagene) v pufru NEB 2 (New England Biolabs) po dobu 45 minut při teplotě 37 °C. Po štěpení se zkumavky umístily do 10 mM pufru Tris pH 8,0 při teplotě 100 °C po dobu 2x 5 minut, pak se reakce blokovala filtrovaným (Millex GV4, Millipore) roztokem BSA o koncentraci 1 mg/ml v 2x koncentrovaném pufru SSC po dobu 30 minut při teplotě místnosti a promyly se nejdříve 2x koncentrovaným roztokem SSC s 0,1 % SDS a pak 5x koncentrovaným roztokem SSC. Každé sklíčko se inkubovalo přes noc při teplotě místnosti s 5x koncentrovaným roztokem SSC/0,1 % Tween 20, který obsahuje 1 µM sekvenační primer p181 (CGACAGCCGGAAGGAAGGGAGC). Kontroly, které neobsahují primer se uchovávaly v 5x koncentrovaném roztoku SSC s 0,1 % Tween 20. Sklíčka se promyla dvakrát 5x koncentrovaným roztokem SSC s 0,1 % SDS při teplotě 37 °C po dobu 5 minut a dále pak 5x koncentrovaným roztokem SSC. Primer p181 může hybridizovat s templátem B'a sekvence následující po p181 je CAGCT... Za účelem zaostření se zelené fluorescenční částice adsorbovaly na dno prohlubně a každá prohlubeň se inkubovala s 20 µl ředění 1/2 000 žlutých/zelených fluorescenčních FluoSpheres® potažených streptavidinem (Molecular Probes, Eugene, OR) v 5x koncentrovaném roztoku SSC po dobu 20 vteřin při teplotě místnosti.

Po hybridizaci s primerem se přidaly na každé sklíčko 2 µl roztoku, který obsahuje 0,1 % BSA, 6 mM dithiotreitolu (Sigma

Chemicals), 5 μM Cy5^(tm)-dCTP nebo 5 μM Cy5^(tm)-dUTP (Amersham, UK) a 1x koncentrovaný reakční pufr sekvenázy. Přidání Cy5^(tm)-nukleotidu se inicializuje přidáním 1,3 jednotky DNA polymerázy T7 Sequenase^(tm) (Amersham, UK) po dobu dvou minut v 5x koncentrovaném roztoku SSC s 0,1 % SDS po dobu 15 minut a sklička se promyla 5x koncentrovaným pufrům SSC.

Vzorky se pozorovaly za použití inverzního mikroskopu (Axiovert S100TV, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Německo) vybavený CCD kamerou Mikromax 512x768 a za použití software Winview (Princeton Instruments, Trenton, NJ). Při zaostření se použil objektiv s 20-ti násobným zvětšením a sada filtrů XF 22 (Omega Optical, Brattleboro, VT) a při pozorování vzorků se začleněným Cy5TM se použil objektiv s 20-ti násobným zvětšením a sada filtrů XF 47 (Omega Optical, Brattleboro, VT) při 50 vteřinové expozici za použití třídění 2x2 pixelů. Žluté/zelené FluoSpheres® (přibližně se jich v poli objektivu nachází 100) nevykazují detekovatelný signál za použití sady filtru XF47 a při 50 vteřinové expozici (data nejsou uvedeny). Fotografie se vytvořily pomocí programu Winview (Princeton Instruments).

Na obrázku č. 7A je zobrazen výsledek po inkubaci s Cy5TM-dCTP se vzorkem, který se před tím neinkuboval s primerem p181. Je možné vidět pět rozmazaných bodů, což ukazuje, že dochází k ne příliš dramatickému rušivému účinku (jako je srážení agregátů Cy5TM-dCTP, adsorpce nebo jednoduše nespecifické začlenění do DNA v koloniích nebo na povrchu).

Na obrázku č. 7b je zobrazen výsledek inkubace Cy5TM-dUTP se vzorkem, který se neinkuboval s primerem p181. Neobjevil se žádný bod, což indikuje, že neproběhlo začlenění fluorescenční báze v detekovatelném množství, kdy nukleotid určený pro začlenění neodpovídá sekvenci templátu následující hybridizovaný primer.

Na obrázku č. 7c je zobrazen výsledek inkubace Cy5TM-dCTP se vzorkem, který se inkuboval s primerem p181. Objevila se řada fluorescenčních bodů, což indikuje, že proběhlo začlenění fluorescenční báze v detekovatelném množství, přičemž nukleotid určený pro začlenění odpovídá sekvenci templátu následujícím po hybridizovaném primeru.

Ukázalo se, že je možné začlenit fluorescenční nukleotidy do DNA obsažené v koloniích způsobem, který je specifický pro sekvenci, a je možné monitorovat toto začlenění zde popsaným přístrojem nebo metodou. To je však pouze příklad. Je vhodné, když je potřeba, aby se fluorescenční báze opakovaly několikrát. Když se to provede způsobem specifickým pro sekvenci, je pak možné dedukovat část sekvence DNA obsažené v koloniích.

Příklad 6: Analýza značení 5' konce mRNA

Nejpřesnější způsob monitorování exprese genu v buňkách nebo tkáních je omezení počtu kroků mezi shromážděním vzorku a vyhodnocení mRNA. Běžně dostupné jsou také nové metody pro rychlou izolaci mRNA. Nejúčinnější metody zahrnují rychlou izolaci vzorku a bezprostřední porušení buněk do roztoku hydrochloridu guanidinu, který zcela rozloží proteiny a deaktivuje RNázy. Pak následuje čištění mRNA ze supernatantu porušených buněk pomocí oligo-dT afinitní chromatografie. Nakonec mRNA s čepičkou na svém 5'konci se může specificky cílit a transformovat do cDNA za použití jednoduché strategie (syntéza cDNA SMART, Clontech, Palo Alto).

Tato metoda dovoluje syntézu kopií cDNA pouze translačně aktivní mRNA s čepičkou na 5'konci. Kombinací shora popsané rychlé metody izolace mRNA a přípravy cDNA tvorby kolonií DNA metodou vnesení templátu vznikl postup pro identifikaci velkého množství materiálu značek na 5'konci sekvence mRNA. Výhodou našeho vynálezu je možnost sekvenovat velké množství

cDNA přímým zavedením produktu reakcí syntézy cDNA, amplifikací cDNA do tisíce kopií a současně následuje in situ sekvenování cDNA.

Materiály a metody

Syntetické oligonukleotidy a plazmidy

Oligonukleotidy se syntetizovaly s 5'-fosfáty pomocí Eurogentec nebo Microsynth. Za použití standardních metod se vytvořily plazmidy obsahující částečné kódující a 3'nepřekládané sekvence myšího genu draslíkového kanálu mSlo, který následuje po promotoru T3 RNA polymerázy.

Syntéza mRNA

Plazmidy mSlo se linearizovaly v jediném místě, které rozeznává restriční nukleáza SalI nebo SacI a které následuje v plazmidu po sekvenci poly A+. Po ošetření štěpeného plazmidu proteinázou K, DNA linearizovaného plazmidu se extrahovala jednou směsí fenol/CH₃Cl/izoamylalkohol a srážela se s etanolem. Sraženina DNA se znovu rozpustila ve vodě v koncentraci 10 mikrogramů v mikrolitru. Syntetická mRNA s čepičkou 5'-metylguanozin se syntetizovala in vitro pomocí bitu pro syntézu mRNA „mMessage mMachine“ podle instrukcí výrobce (Ambion, Austin TX). Syntetická mRNA se uchovávala při teplotě 80 °C.

Enzymy

Restriční enzymy se získaly od firmy New England Biolabs (Beverly, MA).

Syntéza cDNA

Syntetická mRNA se smíchala s mRNA poly A+ myších jater v různých poměrech (1:1, 1:10, 1:100) a podle směsi mRNA myších jater a syntetické mRNA se uskutečnila za použití sady pro syntézu cDNA „SMART PCR“ (Clontech, Palo Alto, CA) s nějakými malými úpravami. Při reakci syntézy cDNA se

15.06.01

přibližně 1 µg směsi mRNA smíchal s primerem CP5, který má 5'-konec sekvence CPβ, (5'-p-AGAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGGTTTTTTTTTTT TTTTTNN). Tento primer se používá při syntéze prvního řetězce cDNA. V případě syntézy druhého řetězce se použije metoda „SMART“. Základem syntézy „SMART“ je vlastnost reverzní transkriptázy myšího viru Moloney přidat na 3'-konec prvního řetězce cDNA tři až pět deoxycytozinových zbytků v případě, že mRNA obsahuje 5'-metylguanozinovou čepičku (manuál pro uživatele sady SMART, Clontech, Palo Alto, CA). Primer CP6, který obsahuje sekvenci CPβ plus AAAGGGGG na 3'-konci (5'-p-AGAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGGGG), se používá při syntéze druhého řetězce cDNA. Pufr a SUPERSRIPT™ II RNáza II reverzní transkriptáza z viru myší leukémie Moloney (LIFE Technologies, Ltd.) se používá, jak se popisuje v instrukcích a reakce se provedla při teplotě 42 °C po dobu 1 hodiny. cDNA se pak testovala pomocí PCR za použití primeru p251, který obsahuje fragment sekvence CPβ (5'-GAGAAGGAAAGGGAAAGG) a Taq DNA polymerázou (Platinum Taq, Life Technologies, Ltd.).

Příprava kolonií DNA

5'-p-cDNA se smíchala s různými koncentracemi koloniového primeru na pevné fázi CP2 (5'-p-TTTTTTTTTTTAGAAGGAGAAGGAAAGG GAAAGGG) a chemicky vázaly na stěny zkumavek vhodných pro reakce PCR „Nucleolink“ (NUNC) podle návodu výrobce. Kolonie DNA se pak připravily za použití Taq polymerázy (AmpliTaQ Gold, PE-Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) v 30 cyklech (teplota 94 °C po dobu 30 vteřin, 65 °C po dobu 1 minuty, teplota 72 °C po dobu 1,5 minuty) v cyklovači teplot MTC 200 (MJ Research, Watertown, MA).

Sondy DNA a hybridizace

Sondy DNA značené biotinem a radioaktivně ³²P specifické pro sekvenci DNA genu mSlo se syntetizovaly pomocí primeru, který je značen na svém 5'-konci biotinem a normálním přímým

primerem metodou PCR za použití templátu (mSlo DNA plazmid). Sonda začlenila $\alpha[^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (Amersham, Amersham UK) v poměru 300:1 ($\alpha[^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ k dCTP) v reakci PCR s konečnou koncentrací čtyř deoxynukleozidtrifosfátů 50 μM . Z výsledných biotinylovaných a radioaktivně značených sond DNA se odstranily sole na koloně Chromaspin-1 000 (Clontech, Palo Alto, CA). SONDY DNA se hybridizovaly se vzorky v pufru „easyhyb“ (Boehringer-Mannheim, Německo) za použití následujícího schématu teploty (cyklovači teplot MTC200): teplota 94 °C po dobu 5 minut, pak následuje 68 kroků, kdy každých 30 vteřin se sníží teplota o 0,5°C (to znamená, že teplota se sníží během 34 minut o 65 °C). Při hybridizaci se použily zatavené prohlubně. Vzorky se pak třikrát promyly 200 μl TNT při teplotě místnosti. Prohlubně se pak inkubovaly po dobu 30 minut s 50 μl TNT, které obsahuje 0,1 mg/ml BSA (New England Biolabs, Beverly, MA). Prohlubně se pak inkubovaly po dobu 5 minut s 15 μl roztoku červených fluorescenčních mikrosfér o velikosti 40 nanometrů potažených streptavidinem (molecular Probes, Portland, OR). Roztok mikrosfér se připravil tak, že se 2 μl zásobního roztoku mikrosfér, které sonikovaly po dobu 5 minut ve vodní lázni s ultrazvukem o výkonu 50 W (Elgasonic, Bienne, Švýcarsko) ředil v 1 ml roztoku TNT, který obsahoval 0,1 mg/ml BSA a filtroval se přes filtr Millex GV4 s velikostí pórů 0,22 μm (Millipore, Bedford, MA).

Vizualizace kolonií DNA

Obarvené vzorky se pozorovaly za použití inverzního mikroskopu Axiovert 10 za použití objektivu s 20-ti násobným zvětšením (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Německo) vybavený kamerou Micromax 512x768 CCD (Princeton instruments, Trenton, NJ) za použití sady filtrů PB546/FT580/LP590 a deseti vteřinové expozice. Dokumenty se převedly do formátu TIFF a

zpracovaly se ve vhodném software (PhotoPaint, Corel Corp. Ltd., Dublin, Ireland). Zpracování spočívá v inverzi a v lineárním zesílení kontrastu za účelem vytvořit obrázek, který je vhodný pro černobílý tisk na laserové tiskárně.

Výsledky

Syntéza syntetické mRNA a cDNA

Syntéza cDNA se kontrolovala pomocí PCR za použití primeru p251 (vytvořeného na každém konci prvního řetězce cDNA), přičemž správná délka produktů se testovala elektroforézou na agarózovém gelu. Syntetická mRNA mSlo se ředila do mRNA jater a dokázala se pruhy specifickými pro mSlo se snižující se intenzitou zesílením nespecifického směru cDNA jater.

Detekce a kvantifikace kolonií DNA

Kolonie DNA se testovaly za použití fluorescenci zobrazujícího mikroskopu CCD nebo scintilačního počítání. Počet fluorescenčně detekovatelných kolonií se zvýšil jako funkce množství zavedeného templátu, jak je zobrazeno na obrázku č. 6. Toto zvýšení se odráží jako množství detekovatelného ^{32}P .

Pomocí radioaktivně značených sond je možné detekovat kopie mRNA v přibližném poměru 1:100. Pomocí fluorescenčního mikroskopu zobrazovací technologií CCD se může detekovat mRNA v ředění 1:10 000.

Příklad 7: Kovalentní navázání primeru na pevný podklad (plast)

Oligonukleotidové primery se zachytily do plastových mikrotitračních prohlubní Nucleolink (Nunc, Dánsko) za účelem stanovit optimální čas párování. Oligonukleotidy CP2 (5'-(fosfát)-TTTTTTTTTTAGAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG), CP8 (5'-(amino-hexametylen)-TTTTTTTTTTAGAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG), CP9 (5'-(hydroxyl)-TTTTTTTTTTAGAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG), CP10 (5'-(dimethoxytrityl)-TTTTTTTTTTAGAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG a CP11

15.05.01

(5' (biotin)-TTTTTTTTTTAGGAAGGAGAAGGAAAGGGAAAGGG), Microsynth GmbH, Švýcarsko) se zachytily do mikrotitračních prohlubní Nucleolink následujícím způsobem (pro každý nukleotid se použilo 8 prohlubní): do každé prohlubně se dalo 20 µl roztoku, který obsahuje 0,1 µM oligonukleotid, 10 mM 1-metylimidazol (pH7,0) (Sigma Chemicals) a 10 mM 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid (pH7,0) (Sigma Chemicals) v 10 mM 1-metylimidazolu. Prohlubně se pak zatavily a inkubovaly se při teplotě 50 °C po dobu různou dobu. Tárovací reakce se ukončila ve specifický čas promytím dvakrát 200 µl RS (0,4 NaOH, 0,25 % Tween 20) a dvakrát 200 µl TNT (100 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20). Zkumavky se sušily při teplotě 50 °C po dobu 30 vteřin a uchovávaly se v plastovém sáčku při teplotě 4 °C.

Stabilita vázaných oligonukleotidů z podmínek tvorby kolonií pomocí PCR

Stabilita se testovala za podmínek růstu kolonií přidáním směsi PCR (20 µl čtyř dNTP (0,2 mM), 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, 8 % DMSO (dimetylsulfoxid, Fluka Švýcarsko), IX pufr PCR). Prohlubně se pak umístily do cyklovače teplot a proběhlo 33 cyklů za následujících podmínek: teplota 94 °C po dobu 45 vteřin, teplota 60 °C po dobu 4 minut, teplota 72 °C po dobu 4 minut. Po ukončení uvedeného programu se prohlubně promyly 5x koncentrovaným roztokem SSC, 0,1 % Tween 20 a nechaly se při teplotě 8 °C až do dalšího použití. Dříve než se naplnily hybridizační prohlubně 50 µl 5x koncentrovaného SSC, 0,1 % Tween 20 se zahřál na teplotu 94 °C po dobu 5 minut a uchovával se při teplotě místnosti.

Sondy:

Oligonukleotidové sondy R57 (5' (fosfát)-GTTTGGGTTGGTTTGGGTTGGTG, kontrolní sonda) a R58 (5' (fosfát)-

CCCTTTCCCTTTCCTTCTCCTTCT, které jsou komplementární s CP2, CP8, CP9, CP10 a CP11 se enzymaticky značily na jejich 5'konci pomocí $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (Amersham, UK) za použití polynukleotidové kinázy bakteriofága T4 (New England Biolabs, Beverly, MA). Přebytek ^{32}P dATP se odstranil pomocí kolony Chroma Spin TE-10 (Clontech, Palo Alto, CA). Radioaktivně značené oligonukleotidy ($0,5\text{ }\mu\text{M}$ v $5\times$ koncentrovaném roztoku SSC, $0,1\text{ }\%$ Tween 20) se pak hybridizovaly s oligonukleotidem deprivatizovaných v prohlubních Nucleolink při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu dvou hodin. Prohlubně se promyly čtyřikrát $5\times$ koncentrovaným roztokem SSC, $0,1\text{ }\%$ Tween 20 po dobu 15 minut při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Počítáním v scintilačním roztoku se pak testovala navázaná sonda.

Výsledky

Existuje znatelný rozdíl mezi rychlostí a specifikou párování oligonukleotidů závisícího na podstatě funkční skupiny na 5'konci oligonukleotidu. Oligonukleotidy nesoucí na svém 5'konci aminoskupinu, která se páruje přibližně dvakrát rychleji jak se oligonukleotidy funkcionalizují fosfátovou skupinou na svém 5'konci (uvedeno v tabulce č. 2 a na obrázku č. 8). Vedle kontrolních oligonukleotidů funkcionalizovaných 5'hydroxylem, 5'-DMT nebo 5'-biotinem se všechny spojují rychlostí podobnou rychlosti 5'fosfátu, což je otázka specifické podstaty chemického zachycení za použití 5'fosfátové skupiny.

Tabulka č. 2:

	5'-fosfát	5'-aminc	5'-hydroxyl	5'-DMT	5'-biotin
Ka (min ⁻¹)	0,0068	0,0135	0,0063	0,0070	0,0068
zachycený oligonu- kleotid (fmol/pro- hlubeň)	608	1344	542	602	650
stabilita PCR (% zbývající)	56	69	66	66	62

Seznam sekvencí

(2) Informace o SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

AGAAGGAGAA GGAAAGGGAA AGGG

24

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

CACCAACCCA AACCAACCCA AACC

24

(2) Informace o SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

GAGGCCAGAA CAGTTCAAGG

20

(2) Informace o SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

(A) DÉLKA: 20 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

20

CCTGTGACAA GACGACTGAA

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

(A) DÉLKA: 34 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

TTTTTTTTTT CACCAACCCA AACCAACCCA AACC

34

(2) Informace o SEQ ID NO: 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

(A) DÉLKA: 34 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

TTTTTTTTTTT AGAAGGAGAA GGAAAGGGAA AGGG

34

(2) Informace o SEQ ID NO: 7:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 34 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

TTTTTTTTTTT CACCAACCCA AACCAACCCA AACC

34

(2) Informace o SEQ ID NO: 8:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 34 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

TTTTTTTTTTT AGAAGGAGAA GGAAAGGGAA AGGG

34

(2) Informace o SEQ ID NO: 9:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 42 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina

- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

AGAAGGAGAA GGAAAGGGAA AGGGTTTTTT TTTTTTTTTT NN

42

- (2) Informace o SEQ ID NO: 10:
 - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 26 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
 - (ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“
 - (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

AGAAGGAGAA GGAAAGGGAA AGGGGG

26

- (2) Informace o SEQ ID NO: 11:
 - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 52 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
 - (ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“
 - (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

AGAAGGAGAA GGAAAGGGAA AGGGGCGGCC GCTCGCCTGG TTCTGGAAGA CA

52

- (2) Informace o SEQ ID NO: 12:
 - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

15.08.01

- (A) DÉLKA: 44 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

AGAAGGAGAA GGAAAGGGAA AGGGCCTGTG ACAAGACGAC TGAA

44

(2) Informace o SEQ ID NO: 13:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 62 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

TTTTTTTTTT AGAAGGAGAA GGAAAGGGAA AGGGGCGGCC GCTGAGGCCA GTGGAAGTCA

60

GA

62

(2) Informace o SEQ ID NO: 14:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 60 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

TTTTTTTTTT CACCAACCCA AACCAACCCA AACCGAGCTC AGGCTGAGGC AGGAGAATTG

60

(2) Informace o SEQ ID NO: 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 44 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 15:

AGAAGGAGAA GGAAAGGGAA AGGGGAGCTG AGGAGGAAGA GAGG

44

(2) Informace o SEQ ID NO: 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 52 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 16:

AGAAGGAGAA GGAAAGGGAA AGGGGCGGCC GCTCGCCTGG TTCTGGAAGA CA

52

(2) Informace o SEQ ID NO: 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 22 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /popis = „oligonukleotidový primer“

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: modifikovaná báze

(B) Pozice: 11

(D) Jiné informace:

/mod.báze = i

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: modifikovaná báze

(B) Pozice: 13

(D) Jiné informace:

/mod.báze = i

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: modifikovaná báze

(B) Pozice: 15

(D) Jiné informace:

/mod.báze = i

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: modifikovaná báze

(B) Pozice: 17

(D) Jiné informace:

/mod.báze = i

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: modifikovaná báze

(B) Pozice: 19

(D) Jiné informace:

/mod.báze = i

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: modifikovaná báze

(B) Pozice: 21

(D) Jiné informace:

/mod.báze = i

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 17:

TTTTTTTTTT NSNSNSNSNS NS

(2) Informace o SEQ ID NO: 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 18:

CGACAGCCGG AAGGAAGAGG GAGC

24

(2) Informace o SEQ ID NO: 19:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /popis: „oligonukleotidový primer“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 19:

GAGAAGGAAA GGGAAAGG

18

15.08.01

PV 2001-1183
45602

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob amplifikace alespoň jedné nukleové kyseliny

v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

- 1) vytvoření alespoň jednoho templátu nukleové kyseliny obsahující nukleovou kyselinu(y), která se amplifikuje, přičemž uvedená nukleová kyselina(y) obsahuje na 5'konci oligonukleotidovou sekvenci Y a na 3'konci oligonukleotidovou sekvenci Z a navíc nukleovou kyselinu(y) nesoucí na 5'konci prostředky pro zachycení nukleové kyseliny(kyselin) na pevný podklad,
- 2) smíchání uvedeného templátu(ů) nukleové kyseliny s jedním nebo více koloniových primerů X, které mohou hybridizovat s oligonukleotidovou sekvencí Z a nesou na svém 5'konci prostředky pro zachycení koloniových primerů na pevný podklad, přičemž v přítomnosti pevného podkladu se 5'konce templátu nukleové kyseliny a koloniových primerů vážou na pevný podklad,
- 3) provedení amplifikačních reakcí jedné nebo více nukleových kyselin za použití navázaného templátu(ů) tak, že se vytvoří kolonie nukleové kyseliny.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
s e t í m, ž e oligonukleotidová sekvence Z je
komplementární s oligonukleotidovou sekvencí Y a koloniový
primer X je stejná sekvence jako oligonukleotidová sekvence Y.

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
s e t í m, ž e dva různé koloniové primery X se smíchaly
s uvedeným templátem(y) v kroku (2) a kde sekvence koloniových
primerů X jsou takové, že oligonukleotidová sekvence Z může
hybridizovat s jedním z koloniových primerů X a

oligonukleotidová sekvence Y je stejná jako jeden z koloniových primerů X.

4. Způsob amplifikace alespoň jedné nukleové kyseliny, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

- 1) vytvoření alespoň jednoho templátu nukleové kyseliny zahrnující nukleovou kyselinu(y), která se bude amplifikovat, přičemž uvedená nukleová kyselina(y) nesou na svém 5'konci prostředky pro zachycení nukleové kyseliny(kyselin) na pevném povrchu,
- 2) smíchání uvedených templátů nukleové kyseliny s jedním nebo více degenerativních koloniových primerů X, které mohou hybridizovat s oligonukleotidovou sekvencí v uvedeném templátu(ech) na místě lemujícím sekvenci nukleové kyseliny, která se amplifikuje a nese na 5'konci prostředky pro zachycení koloniových primerů na pevný podklad, přičemž v přítomnosti pevného podkladu se 5'konce templátu nukleové kyseliny a koloniových primerů vážou na pevný podklad,
- 3) provedení amplifikačních reakcí jedné nebo více nukleových kyselin za použití vázaného templátu(ů) tak, že se vytvoří kolonie nukleových kyselin.

5. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje další krok, který provádí alespoň v jednom kroku stanovení sekvence jedné nebo více vytvořených kolonií nukleové kyseliny.

6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e krok stanovení sekvence zahrnuje začlenění a detekci značených oligonukleotidů.

7. Způsob podle nároku 5 nebo 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e celé nebo částečné sekvence templátů amplifikované nukleové kyseliny přítomných ve více než jedné kolonii nukleové kyseliny se stanoví současně.

8. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje další krok vizualizace vytvořených kolonií.

9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený krok vizualizace zahrnuje použití značené nebo neznačené sondy nukleové kyseliny.

10. Způsob podle libovolného nároku 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e prostředky pro zachycení templátu(ů) a koloniových primerů na pevný podklad zahrnuje prostředky pro kovalentní zachycení sekvencí nukleových kyselin na uvedený podklad.

11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené prostředky pro kovalentní zachycení sekvencí nukleové kyseliny na pevný podklad je chemicky upravitelná funkční skupina.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená chemicky upravitelná funkční skupina je fosfátová skupina, karboxylová nebo aldehydová část, thiolová, hydroxylová, dimetoxytritylová (DMT) skupina nebo aminoskupina.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená chemicky upravitelná funkční skupina je aminoskupina.

14. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený pevný povrch se vybral ze skupiny zahrnující latexové, dextranové částice, polystyrenový, polypropylenový povrch, polyakrylamidový gel, zlaté, skleněné povrchy a křemíkové plátky.

15. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený pevný podklad je sklo.

16. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e hustota vytvořených kolonií nukleové kyseliny je 10 000 na milimetr čtvereční až 100 000 na milimetr čtvereční.

17. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e hustota koloniových primerů X zachycených na uvedeném podkladu je alespoň 1 fmol/mm².

18. Způsoby podle libovolného z nároků 1 až 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e hustota templátů nukleové kyseliny je 10 000 na milimetr čtvereční až 100 000 na milimetr čtvereční.

19. Velké množství templátů různých nukleových kyselin obsahující nukleové kyseliny, které se amplifikují, přičemž každá z uvedených nukleových obsahuje na svých 5' koncích známou oligonukleotidovou sekvenci Y a na 3' konci známou oligonukleotidovou sekvenci Z a navíc nukleová kyselina(y) nesou na 5' konci prostředek pro zachycení nukleové kyseliny(kyselin) na pevný podklad.

20. Velké množství templátů nukleové kyseliny podle nároku 19, kde oligonukleotidová sekvence Z je komplementární s oligonukleotidovou sekvencí Y.

21. Velké množství templátů nukleové kyseliny podle nároku 19, když se smíchá s velkým množstvím koloniových primerů X, které mohou hybridizovat s oligonukleotidovou sekvencí Z a nesou na svých 5' koncích prostředky na zachycení koloniových primerů na pevný podklad.

22. Velké množství templátů nukleové kyseliny podle nároku 21, kde oligonukleotidová sekvence Z je komplementární s oligonukleotidovou sekvencí Y a koloniový primer je stejná sekvence jako oligonukleotidová sekvence Y.

23. Velké množství templátů nukleové kyseliny podle nároku 19 se smíchá se dvěma různými koloniovými primery X a kde sekvence koloniových primerů X jsou takové, že oligonukleotidová sekvence Y je stejná jako koloniové primery X.

24. Velké množství templátů nukleové kyseliny podle nároku 21, kde koloniové primery X obsahují degenerovanou primerovou sekvenci a templáty nukleové kyseliny neobsahují oligonukleotidové sekvence Y nebo Z.

25. Pevný podklad, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se na něj zachytilo velké množství koloniových primerů X podle libovolného z nároků 1 až 24 a množství templátů nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 19 až 24.

26. Pevný podklad podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je to pevný podklad podle nároků 14 a 15.

27. Pevný podklad podle libovolného z nároků 25 nebo 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zachycení templátů nukleové kyseliny a koloniových primerů na pevný podklad je kovalentní.

28. Pevný podklad, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje jednu nebo více kolonií nukleových kyselin vytvořených metodou podle libovolného z nároků 1 až 18.

29. Použití pevného podkladu podle libovolného z nároků 25 až 28 při způsobech amplifikace nebo sekvenování nukleové kyseliny.

30. Použití podle nároku 29, kde uvedený způsob je způsob podle libovolného z nároků 1 až 18.

31. Použití způsobu podle libovolného z nároků 1 až 18 při amplifikaci nebo sekvenování nukleové kyseliny.

32. Použití způsobu podle libovolného z nároků 1 až 18 nebo kolonií nukleové kyseliny vytvořených uvedenými způsoby nebo velké množství templátů nukleové kyseliny podle nároků 19 až 24 nebo pevných podkladů podle nároků 25 až 28 při získávání molekul nukleových kyselin pro sekvenování a opětné sekvenování, monitorování exprese genu, profilování genetické diverzity, při diagnóze, testování, sekvenování celého genomu, zkoumání a hodnocení polymorfizmu celého genomu a při přípravě sklíčků s celými genomy nebo při jiných aplikacích, které zahrnují amplifikaci nukleových kyselin nebo jejich sekvenování.

33. Sada vhodná pro použití při amplifikaci nebo sekvenování, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje velké množství templátů nukleových kyselin podle libovolného z nároků 19 až 24 a koloniové primery podle libovolného z nároků 1 až 32 vázaných na pevný podklad.

34. Sada podle nároku 33, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je vhodná pro použití při sekvenování, opětném sekvenování, monitorování exprese genu, profilování genetické diverzity, diagnóze, testování, sekvenování celého genomu, zkoumání a hodnocení polymorfizmu celého genomu nebo libovolné jiné aplikaci zahrnující amplifikaci nukleových kyselin nebo jejich sekvenování.

15.08.01

PV 2001-11P3

- 45202

1/10

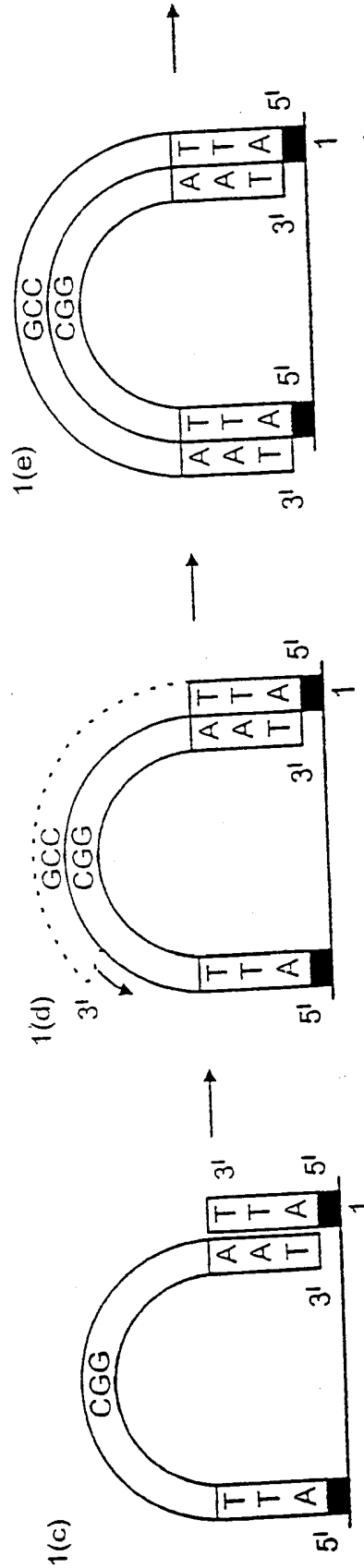
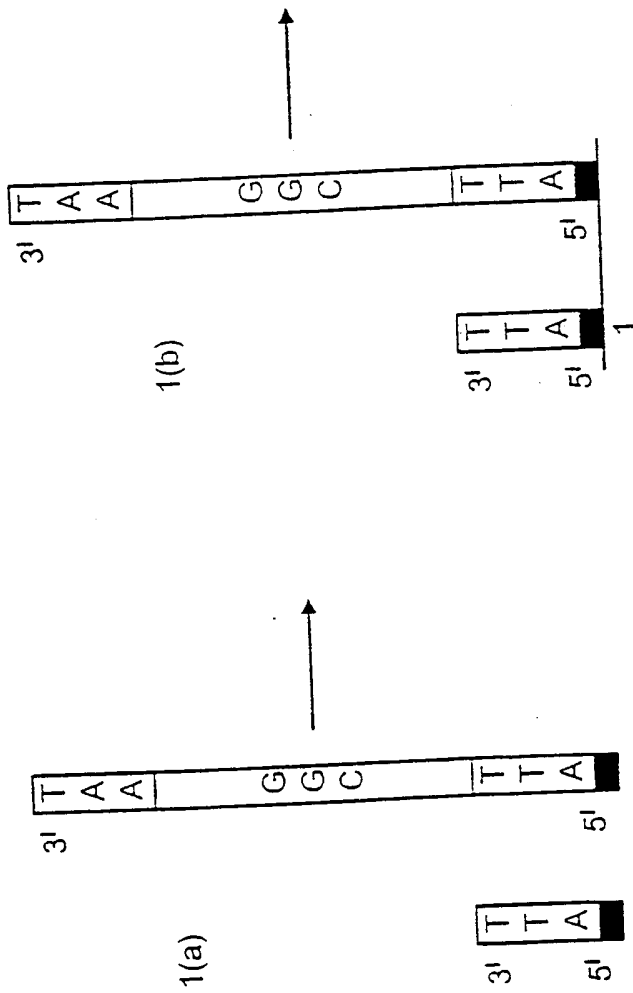


FIG. 1

15.08.01

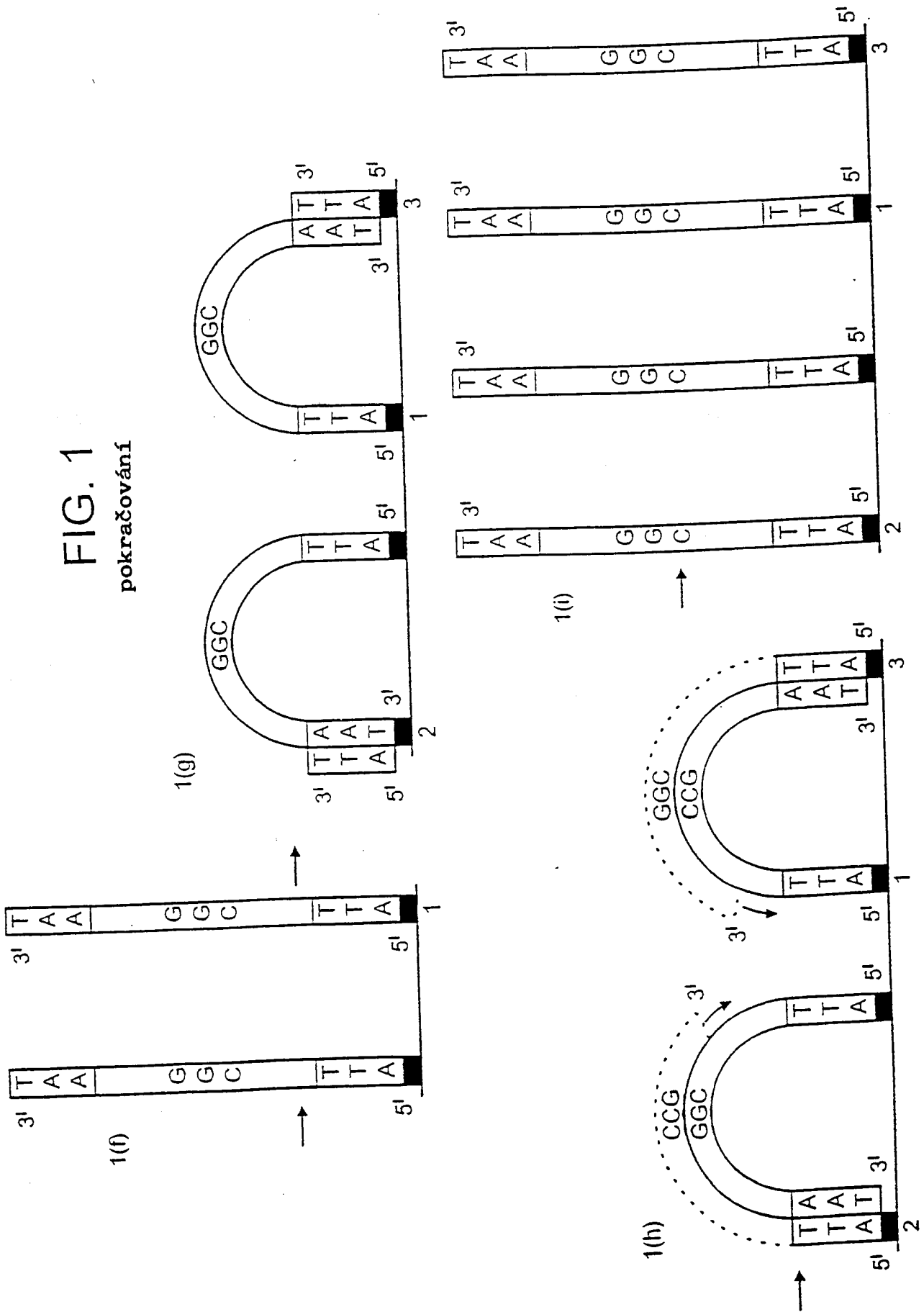
RV 2001-1183

4202

2 / 10

FIG. 1

pokračování



15.08.01

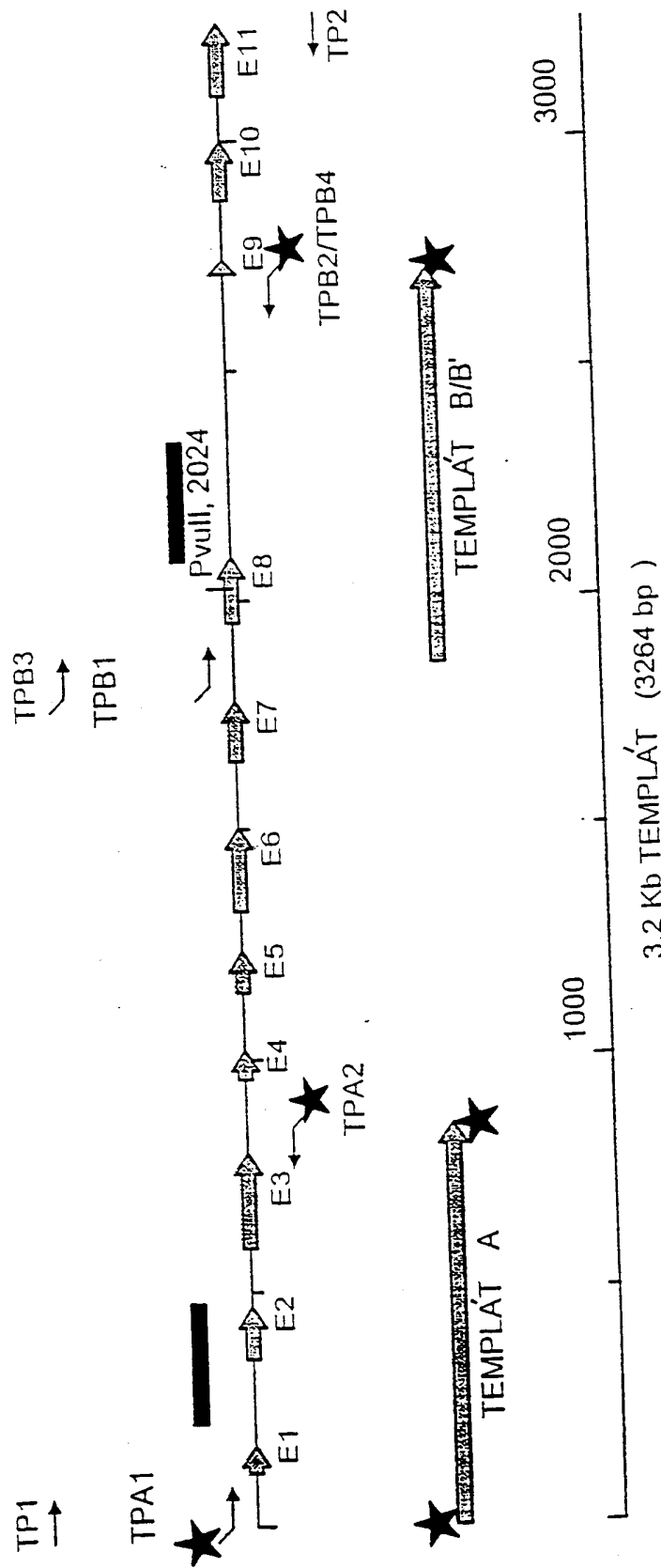
PV 2001-1183

- 45302

3 / 10

FIG. 2a

Příprava templátů, obsahujících sekvence koloniových primerů
(umístění primerů)



15.08.01

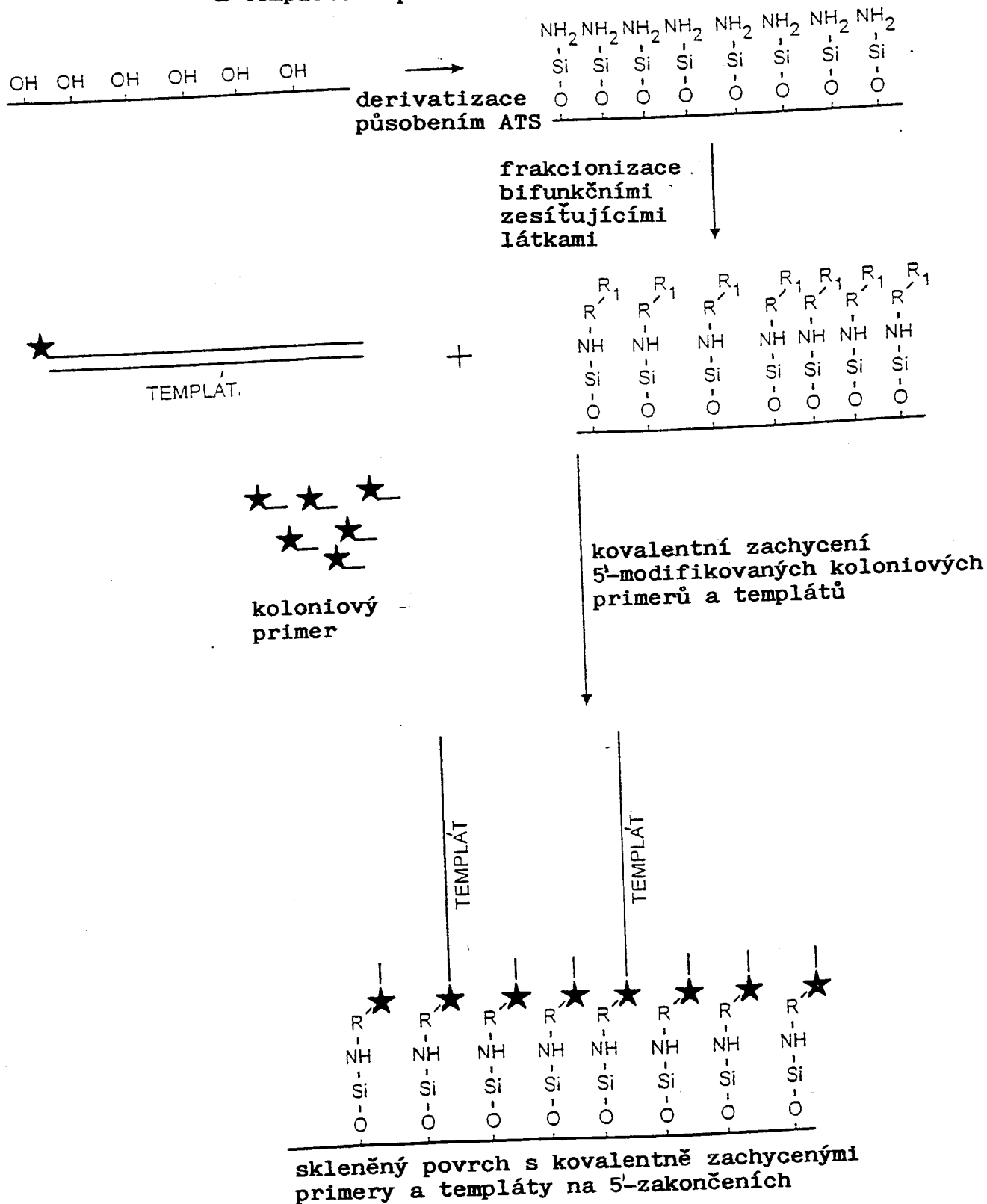
PV 2001-1183

~~45302~~

4/10

FIG. 2b

Chemické zachycení koloniových primerů
a templátů k povrchu



15.06.01

PV 2001 - 11P3

45302

5/10

FIG. 3

Kolonie vytvořené s templáty a koloniovými primery zachycenými k podložce

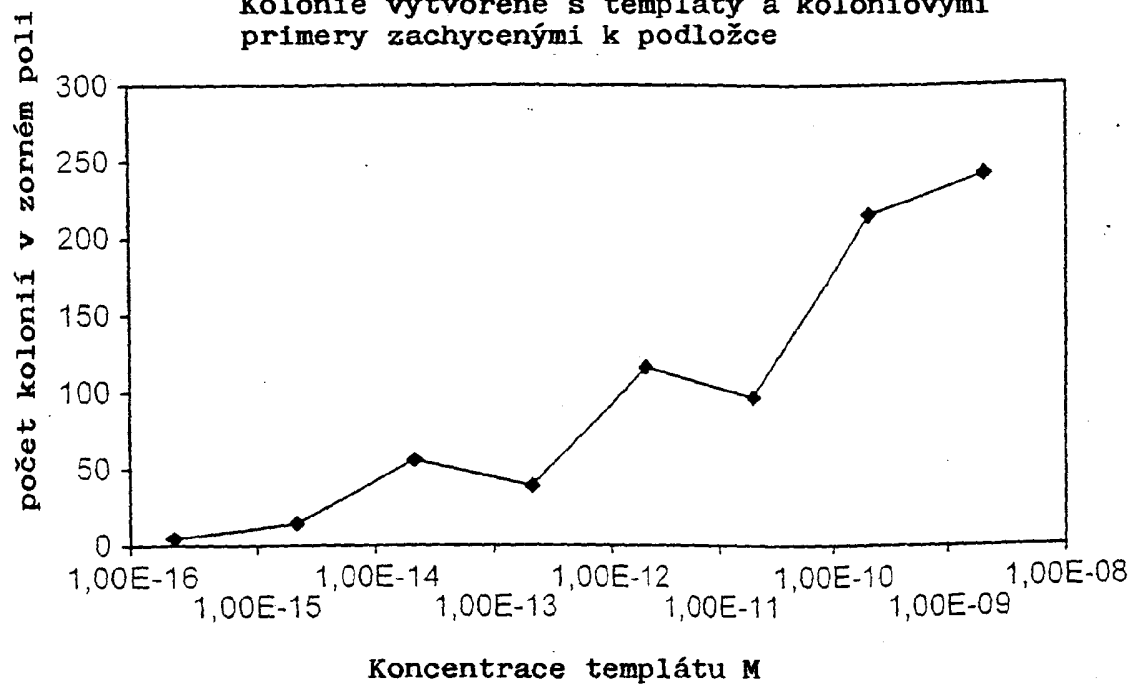
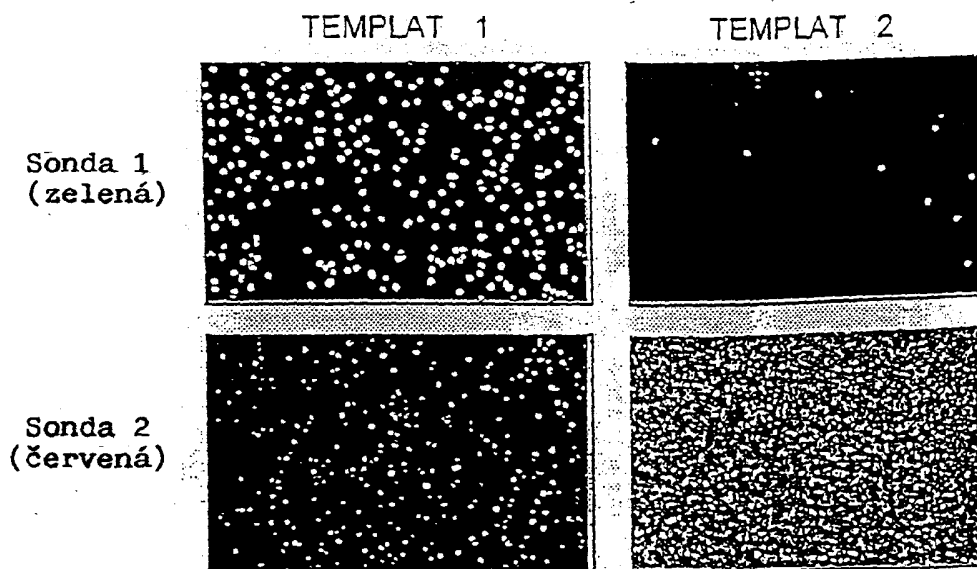


FIG. 4a

Současná detekce dvou nezávislých kolonií DNA



15.06.01

TV 2001-1183

45602

6/10

FIG. 4b

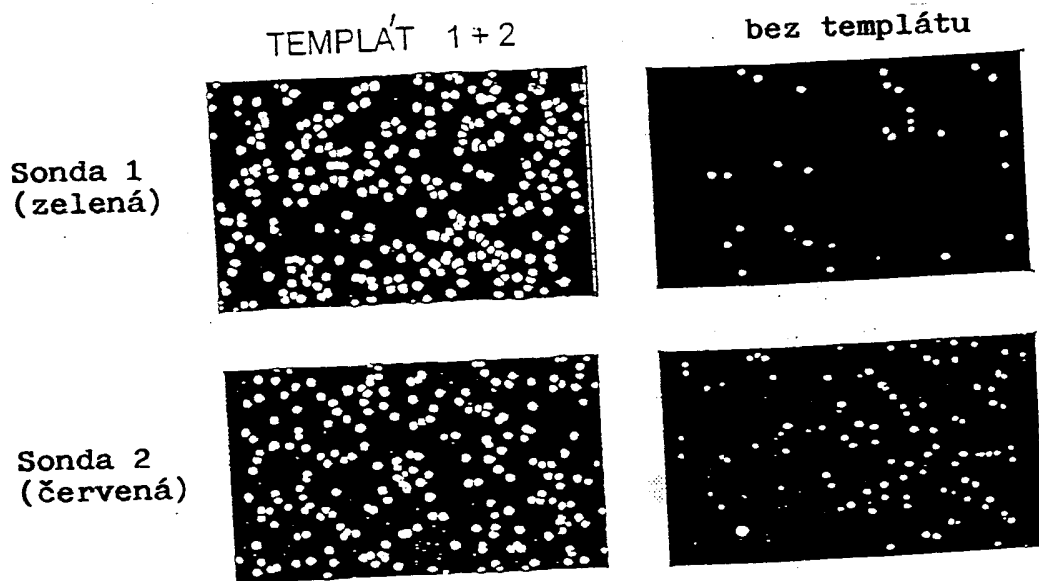
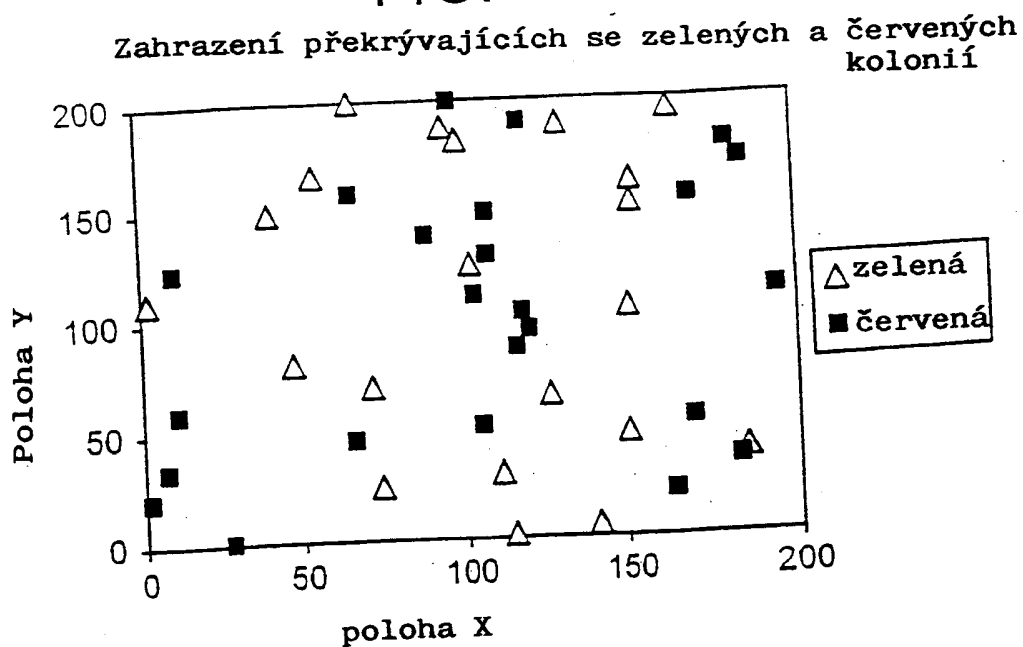


FIG. 4c



~~- 45602~~

—



56E

15.08.01

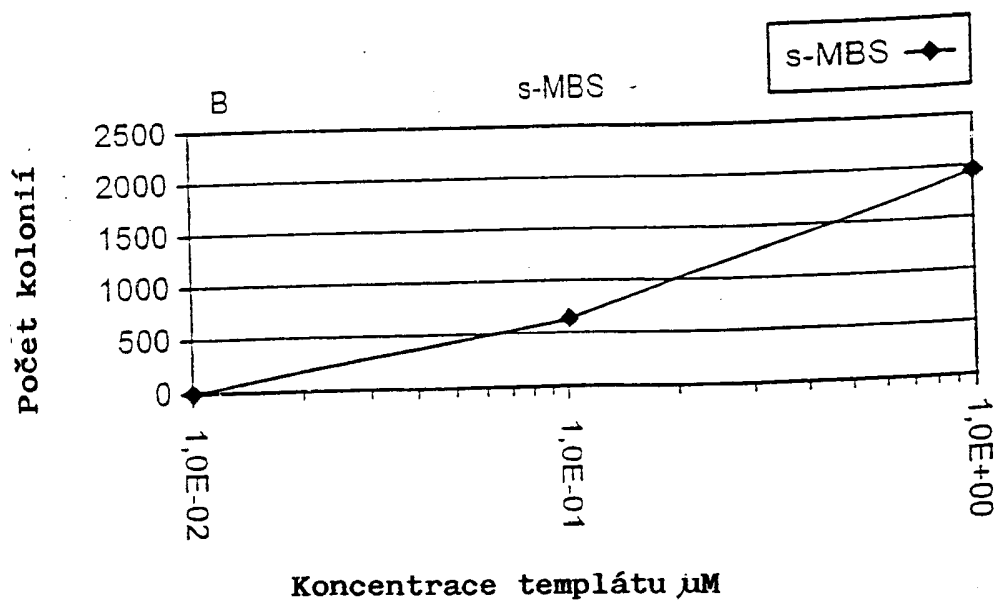
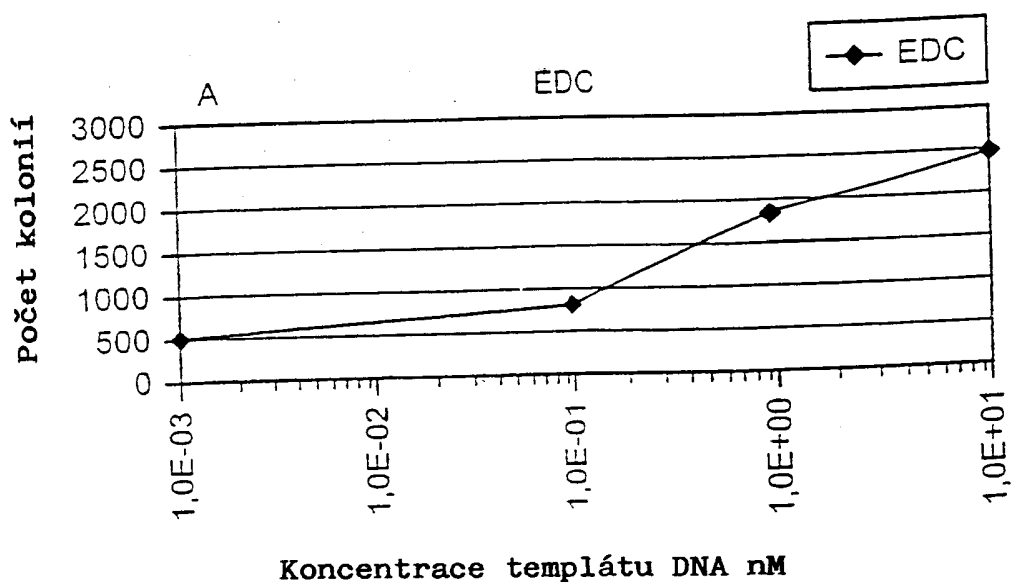
TV 2001 - 1183

45302

8 / 10

FIG. 6

Kolonie DNA na skle: vliv koncentrace templátu



15.06.01

PV 2001-1182

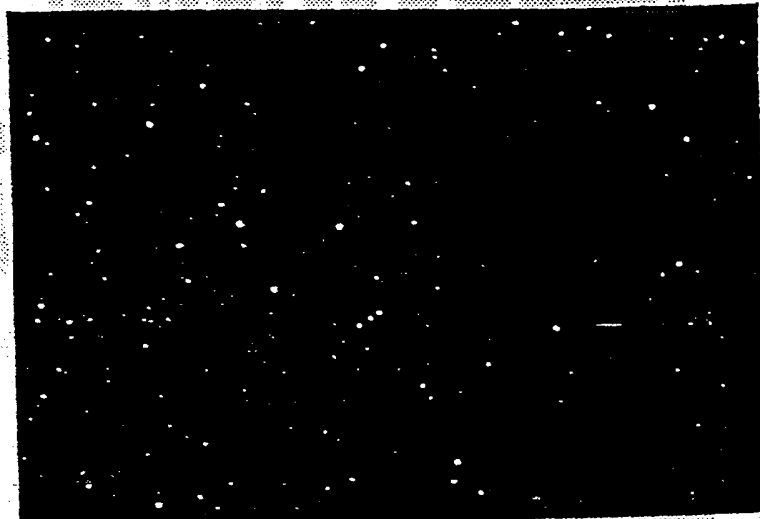
45202

9/10

(a)



(b)



(c)

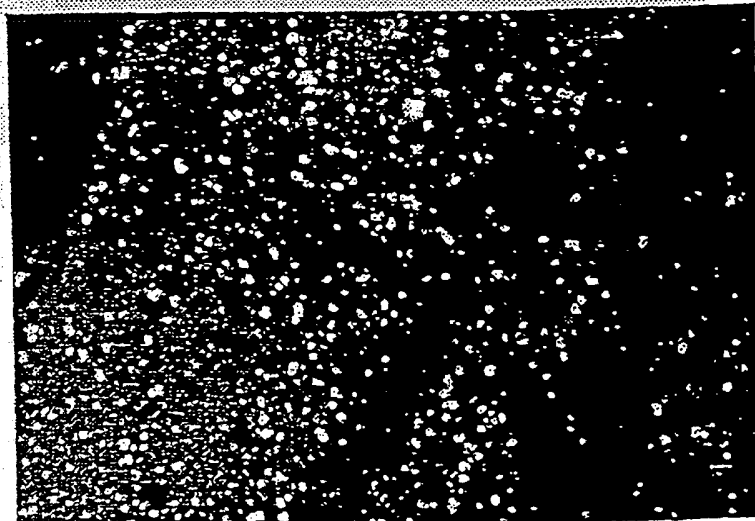


FIG. 7

15.08.01

PV 2001-1183

42602

10/10

FIG. 8

