

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSL OVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.05.2011**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **06.06.2012**
(Věstník č. 23/2012)

(21) Číslo dokumentu:

2011-308

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd
České republiky, v.v.i., Praha 6, CZ
Ústav experimentální medicíny Akademie věd ČR, v.v.i.,
Praha 4, CZ

(72) Původce:

Koberna Karel RNDr. CSc., Praha 4, CZ
Ligasová Anna RNDr. Ph.D., Praha 4, CZ
Strunin Dmytro Mgr., Praha 4, CZ
Rosenberg Ivan Ing. CSc., Praha 6, CZ
Liboska Radek Ing. CSc., Roztoky u Prahy, CZ

(74) Zástupce:

RNDr. Ladislava Součková CSc., Flemingovo náměstí 2,
Praha 6, 16610

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob zpřístupnění specifických
pyrimidinových nukleosidů ve struktuře
dvouřetězcové DNA pro reakci s
protilátkami, které s těmito nukleosidy
reagují**

(57) Anotace:

Řešení popisuje způsob zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů ve struktuře dvouřetězcové DNA pro reakci s protilátkami, které reagují s těmito nukleosidy. Tento způsob spočívá v inkubaci dvouřetězcové DNA v přítomnosti jednomocných iontů mědi a kyslíku a/nebo aktivních okysličovadel. Zdrojem těchto iontů mohou být vodné roztoky obsahující ionty mědi, nebo se může jednat o jednomocnou měď, která byla na DNA navázána. Volitelně se použijí vymývací látky. Tento krok vede k odstranění nežádoucích látek vznikajících v průběhu inkubace v roztoku s ionty jednomocné mědi. Míru zpřístupnění je možné zvýšit pomocí následné inkubace DNA s enzymem majícím exonukleázovou aktivitu. DNA je rovněž možné nejprve inkubovat v roztoku s dvojmoenými ionty mědi, tyto následně přeměnit v jednomocné ionty inkubací v roztoku s redukcujícími látkami a poté v přítomnosti kyslíku vyvolat štěpení DNA. V tomto případě je zpravidla stupeň zpřístupnění nižší než v roztocích s obsahem jednomocných iontů a vyžaduje použití následného zpřístupnění pomocí enzymu s exonukleázovou aktivitou.

Způsob zpřístupnění specifických pyrimidinových nukleosidů ve struktuře dvouřetězcové DNA pro reakci s protilátkami, které s těmito nukleosidy reagují.

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu zpřístupnění specifických pyrimidinových nukleosidů ve dvouřetězcové DNA pro jejich následnou reakci s protilátkami. Příkladem takových nukleosidů je 5-bromo-2'-deoxyuridin, 5-chloro-2'-deoxyuridin, 5-jodo-2'-deoxyuridin nebo 5-methyl-2'-deoxycytidin.

Dosavadní stav techniky

Použití systémů založených na reakci nukleosidů, které jsou součástí DNA, se specifickými protilátkami je běžné jak v základním, tak aplikovaném výzkumu. Příkladem takto používaných nukleosidů je 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), 5-chloro-2'-deoxyuridin (CldU), 5-jodo-2'-deoxyuridin (IdU) nebo 5-methyl-2'-deoxycytidin (MC). Jejich použití dovoluje např. rychlou analýzu buněčných populací z hlediska jejich proliferační aktivity. Další využití spočívá v izolacích fragmentů DNA značených modifikovanými nukleosidy. Své uplatnění mají i ve výzkumu DNA replikace.

Jelikož specifické nukleosidy jsou ve struktuře dvouřetězcové DNA zpravidla nepřístupné pro reakci s protilátkou, je pro jejich zpřístupnění nutné použít speciální kroky (*Genes Dev*, 14, 2855-2868; *J Cell Sci*, 115, 4037-4051), které jsou naprosto klíčové např. pro následující detekce nebo izolace dvouřetězcové DNA. Příkladem těchto kroků je použití roztoků kyseliny chlorovodíkové (depurinace), hydroxidu sodného (rozvolnění struktury DNA v důsledku deprotonace nukleobázi), použití DNázy I nebo směsi DNázy I a exonukleázy. Nevýhodou systémů založených na použití minerálních kyselin a hydroxidů je fakt, že dochází k výrazným změnám struktury buňky a současně k silným, těžko kontrolovatelným destrukcím nejen DNA a RNA, ale rovněž proteinů a proto tento způsob zpřístupnění neumožňuje současnou lokalizaci DNA a proteinů. U DNázy I a směsi DNázy I a exonukleázy je nevýhodou slabý signál v porovnání se signálem získaným při použití kyselin či hydroxidu.

Podstata vynálezu

Předkládaná přihláška vynálezu popisuje postup umožňující efektivní zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů ve struktuře dvouřetězcové DNA pro reakci se specifickými protilátkami. Zpřístupnění je možné provést jednostupňově nebo dvoustupňově.

V případě jednostupňového postupu je DNA inkubována s jednomocnými ionty mědi. Měďné ionty je možné v roztoku generovat *in situ* redukcí měďnatých iontů, např. pomocí askorbátu sodného, hydrazinu nebo tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP) (*Pharm Res*, 25, 2216^{α2*}2230). Jinou možností je přímá aplikace měďných solí, např. měďných halogenidů v podobě jejich roztoků (viz předchozí citace). Další možností je použití komplexů obsahujících jednomocnou měď, jako je hexafluorofosforečnan (tetraacetonitrilo)měďný ($[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$), nebo tetrafluoroboritan (tetraacetonitrilo)měďný ($[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{BF}_4$). Vzorke obsahující DNA jsou pak inkubovány v těchto roztocích. Alternativní možností je inkubace vzorků nejprve v roztoku obsahujícím měďnaté ionty, kdy se využije schopnosti měďnatých iontů vázat se na DNA a následně se buď okamžitě, nebo až po promytí inkubují vzorky v roztoku, který redukuje měďnaté ionty na měďné ionty.

Pro zpřístupnění je podle předkládaných nálezů důležitá i přítomnost kyslíku. Proto je výhodné pro rychlé zpřístupnění nukleosidů vzorky v průběhu inkubace s měďnými ionty, nebo okamžitě po redukcí měďnatých iontů vázaných na DNA na ionty měďné, a to ještě v redukčním roztoku, aktivně provzdušňovat, např. klasickou laboratorní třepačkou nebo probubláváním směsí vzduchem, případně kyslíkem a tím zabezpečit přístup kyslíku. Provzdušňování je možné provést také následně, až po inkubaci s měďnými ionty nebo po přeměně měďnatých iontů vázaných na DNA na ionty měďné, v promývacích roztocích, přičemž v obou případech se při zpřístupnění využívá měďných iontů vázaných na DNA. Namísto provzdušňování lze použít i aktivní okysličovadla. Příkladem je použití monopersíranu draselného $[2\text{KHSO}_5.\text{KHSO}_4.\text{K}_2\text{SO}_4]$, peroxidu vodíku $[\text{H}_2\text{O}_2]$, dihydrogenperoxofosforečnanu draselného $[\text{KH}_2\text{PO}_5]$, nebo peroxoboritanu sodného $[\text{Na}_2(\text{B}_2\text{O}_4(\text{OH})_4).6\text{H}_2\text{O}]$.

Podle našich zjištění je míra zpřístupnění přímo úměrná koncentraci měďných iontů a času inkubace DNA s měďnými ionty, ať již v přítomnosti nebo nepřítomnosti, respektive velice omezené přítomnosti kyslíku, které se dosáhne probubláváním směsí např. dusíkem nebo

přípravou roztoků jednomocné mědi v převařené vodě a následnou inkubací v uzavřených nádobách. V případě inkubace v nepřítomnosti kyslíku dochází se zvyšujícími se koncentracemi a rovněž s narůstajícím časem inkubace k vyššímu navázání měďných iontů na DNA. Pro zpřístupnění je však nutná následující inkubace v roztocích obsahujících kyslík a/nebo v roztocích obsahujících aktivní okysličovadla. Tyto dva kroky: 1) navázání měďných iontů v nepřítomnosti nebo omezené přítomnosti kyslíku a 2) inkubace v roztocích obsahujících kyslík, je možné mnohonásobně opakovat, aby se dosáhlo zvýšeného zpřístupnění.

Při inkubaci vzorků v přítomnosti kyslíku dochází k postupné přeměně měďných iontů zpět na měďnaté ionty. Proto je nutné po určité době, po níž dojde k úplné přeměně měďných iontů na měďnaté ionty, zpravidla doprovázené změnou zabarvení roztoku, tyto roztoky pro další zvýšení míry zpřístupnění nahradit novými roztoky měďných iontů. Takto lze postupovat až do dosažení dostatečného zpřístupnění. Z praktického hlediska je vhodné používat koncentrace měďných iontů pohybující se v řádech mmol.l^{-1} a časů v řádech desítek minut. Nicméně podle získaných výsledků ke zpřístupnění dochází již za použití daleko nižších koncentrací v řádech $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a časů v řádech několika sekund.

Dále bylo zjištěno, že důležitým předpokladem úspěšné interakce protilátky se sledovanými nukleosidy v DNA je následné odstranění nežádoucích málo rozpustných produktů mědi, které vznikají v průběhu zpřístupnění nukleosidů. Nebylo testováno, zda se jedná o sloučeniny mědi nebo o kovovou měď, avšak v závislosti na jejich množství je nutné jejich odstranění. Takové odstranění je zpravidla nezbytné v případech delších inkubací DNA v prostředí s ionty jednomocné mědi. Především se jedná o případy, kdy se vzorky v průběhu inkubace zabarví.

K odstranění nežádoucích produktů dochází při inkubaci vzorků v roztocích následujících látek (dále jen vymývací látky): kyseliny ϵ -lenglykol-bis(2-aminoethyléter)- N,N,N',N' -tetraoctové (EGTA), kyseliny ϵ -lëndiaminotetraoctové (EDTA), kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinánsulfonové (Hepes), kyseliny 3-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-propansulfonové (Hepps), kyseliny N -[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropansulfonové (TAPS), N,N -bis(2-hydroxyethyl)glycinu (Bicín), N -[tris(hydroxymethyl)methyl]glycinu (Tricin), kyseliny 2-[(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino]etansulfonové (TES), kyseliny N -(karbamoylmethyl)iminodioctové (ADA), kyseliny N -bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoetan-

sulfonové (BES), 2,2-bis(hydroxymetyl)-2,2',2''-nitrilotriethanolu (BIS-TRIS), tris(hydroxymetyl)aminometanu (Tris), glycyl-glycinu, kyseliny β -hydroxy-4-morfolinpropansulfonové (MOPSO), kyseliny piperazin-N,N'-bis(2-hydroxypropansulfonové) (POPSO), glycinamidu, D- a L- α -aminokyselin (např. glycinu, alaninu, serinu, prolinu, lysinu, argininu, asparaginu, glutaminu, kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, citrulinu, threoninu), amoniaku, etanolaminu, dietanolaminu, trietanolaminu, dietylaminu, trietylaminu, diisopropyletylaminu, diisopropylaminu, v principu je možné použít jakýkoli primární nebo sekundární amin. K odstranění těchto produktů dochází i v roztocích obsahujících aktivní okysličovadla jako monopersíran draselný, peroxid vodíku, dihydrogen-peroxofosforečnan draselný, nebo peroxoboritan sodný. Je možné rovněž použít kombinace těchto látek.

Jelikož nežádoucí produkty jsou relativně silně zabarvené, jejich odstranění doprovází odbarvení vzorku. Pro úspěšnou interakci sledovaného nukleosidu s protilátkou je nutné preparáty odbarvit úplně. Také při tomto kroku je výhodné preparáty obsahující DNA provzdušňovat. Se zvyšující se efektivitou provzdušňování dochází k rychlejšímu odstranění nežádoucích produktů. Rovněž zvyšující se koncentrace vymývacích látek vede k rychlejšímu vymytí.

Kromě přítomnosti vymývacích látek nebyly zjištěny další specifické požadavky na složení používaných roztoků, a to ať již obsahujících jednomocné ionty mědi a/nebo vymývací látky. Podle získaných výsledků je tudíž možné v případě potřeby použít např. přídavky solí typu chloridu sodného nebo draselného. Získané výsledky rovněž ukázaly, že s výjimkou EDTA a EGTA je možné vymývací látky nebo jejich kombinace přidat přímo do reakční směsi. Tím se docílí zásadního snížení tvorby nežádoucích nerozpustných produktů a výrazného zkrácení doby promývání v roztocích výše uvedených vymývacích látek, nebo úplného odstranění nutnosti promývání. Zpravidla postačuje jen krátké promytí před inkubací s protilátkou, nebo přidání některých z uvedených látek, nebo jejich kombinací přímo do směsi s protilátkou i bez potřeby vřazení promývacího kroku. Pro správnou reakci protilátek s proteiny, proti kterým byly tyto protilátky cíleny, je rovněž důležité odstranění nerozpustných produktů mědi.

Inkubace vzorků s obsahem DNA ve vodné směsi s jednomocnými ionty mědi, která je volitelně doplněná o vymývací látky, případně inkubace vzorků nejprve s dvojmocnými ionty mědi a jejich následná redukce na jednomocné ionty, tedy vede, v přítomnosti kyslíku, ke zpřístupnění nukleosidů ve struktuře dvouřetězcové DNA, přičemž tento krok

nevyvolá degradaci proteinů. Okysličení je možné provést během inkubace vzorků s obsahem DNA v roztoku s jednomocnými ionty, případně okamžitě po přeměně dvojmocných iontů vázaných na DNA na jednomocné ionty, nebo až v promývacích roztocích. K okysličení dostačuje provzdušňování vzorků pomocí míchání, např. na klasické laboratorní třepačce. Alternativně je možné použít aktivní chemická oksylichovadla, případně probublávání vzduchem nebo kyslíkem. Nadto k reakci protilátky s nukleosidy, případně protilátky s proteiny, je třeba odstranit vzniklé nerozpustné produkty obsahující atomy mědi. Tyto produkty jsou efektivně odstraněny účinkem vymývacích roztoků v přítomnosti kyslíku. K okysličování použitých směsí dostačuje promíchávání použitých směsí za přítupu vzduchu. Celou popsanou proceduru je možné několikrát po sobě opakovat, přičemž dochází k odpovídajícímu zvýšení zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů. Výjimkou je případ, kdy se vzorky nejprve inkubují s měďnatými ionty, které jsou až následně přeměněny na jednomocné ionty. V tomto případě vliv opakování byl velice nízký. Pravděpodobně se jedná o důsledek sekvenční specifity měďnatých iontů, kdy se tyto ionty vážou jen na určité sekvence DNA. Tento přístup proto poskytuje nejslabší signál a zpravidla vyžaduje pro dostatečnou míru zpřístupnění provedení druhého stupně postupu.

Zpřístupnění sledovaných nukleosidů ve dvoustupňovém postupu zahrnuje po první fázi, která byla popsána v předchozí části, inkubaci v přítomnosti enzymu, který má exonukleázovou aktivitu, přičemž se využívá faktu, že v průběhu prvního stupně vznikají přerušeni v řetězcích DNA a v místech těchto přerušeni je posléze zahájeno odbourávání části přerušeného řetězce. Použití exonukleázy pro zpřístupnění některých nukleosidů již bylo popsáno, ale jednalo se o studie, vyžadující rovněž reakci s DNázou. Tato reakce byla provedena současně s působením exonukleázy nebo ještě před jejím působením.

Ve zde použitém postupu se k vytvoření přerušeni v DNA používá zcela odlišný princip, a to právě výše popsanou reakcí DNA s jednomocnou mědí. Bez použití prvního stupně není krok s enzymem s exonukleázovou aktivitou účinný a nedovoluje zpřístupnění sledovaných nukleosidů. První stupeň musí nadto zahrnovat i aplikaci vymývacích látek. Bez odstranění nerozpustných produktů obsahujících atomy mědi exonukleázová reakce neproběhne. Při jejich odstranění se postupuje stejně, jako v případě jednostupňové vizualizace. To znamená, že tyto látky jsou obsaženy v roztoku obsahujícím ionty jednomocné mědi již při inkubaci, v promývacím roztoku nebo přímo v roztoku s enzymem s exonukleázovou aktivitou. Obecně platí, že přítomnost vymývacích látek v roztoku s ionty mědi vede ke zkrácení času nutného k

promývání v roztocích vymývacích látek nebo k úplnému odstranění nutnosti použití speciálního vymývacího kroku a postačí přidat vymývací látky jen do inkubačního roztoku obsahující² enzym s exonukleázovou aktivitou. Popsaný dvoustupňový postup vyžaduje rovněž kratší čas inkubace v prostředí, které obsahuje atomy mědi a zpravidla poskytuje stejný nebo vyšší signál než jednostupňový přístup. Reakce s protilátkou tedy může následovat:

- po provedení prvního stupně
- v průběhu druhého stupně současně v roztoku s enzymem s exonukleázovou aktivitou
- až po inkubaci v roztoku s enzymem s exonukleázovou aktivitou.

Jednostupňový postup zpřístupnění je vhodný zejména v případech, kdy není nutné zkracovat dobu inkubace v prostředí obsahujícím ionty mědi a naopak mají být minimalizovány náklady. Opakování jednostupňového přístupu vede ke zvýšení signálu. Naproti tomu použití dvoustupňového přístupu je výhodné v případě, že není žádoucí dlouhá inkubace v prostředí s ionty mědi a prioritou je dosažení vysokého signálu v relativně krátkém čase.

Popsaný přístup, ať již v jednostupňové nebo dvoustupňové formě, je možné použít např. při detekcích replikované DNA a plně nahrazuje přístupy, založené na inkubacích v minerálních kyselinách a hydroxidech nebo čistě enzymatické přístupy. Hlavní výhodou tohoto přístupu oproti dosud používaným metodikám je odstranění degradace proteinových složek a možnost kontrolovat míru degradace DNA a RNA. Popsaný přístup je šetrný k buněčné struktuře a proteinům. Je využitelný v případech, kdy je nutné provádět současně lokalizace proteinů a DNA nebo v případech, kdy je třeba izolovat pomocí interakce protilátek s nukleosidy obsaženými v DNA proteiny vázané na tuto DNA. Oproti přístupům založených na čistě enzymatických metodách se jedná o způsob, který poskytuje daleko silnější signál.

Navíc je možné, v závislosti na potřebách, zvolit buď jen jednostupňový přístup založený na částečné degradaci DNA v přítomnosti iontů mědi, nebo použít přístup realizovaný ve dvou stupních, kdy po prvním stupni následuje exonukleázové štěpení. Využití uvedeného způsobu lze očekávat při výrobě sad dodávaných pro základní výzkum, jako např. sady pro detekci replikované DNA. Sada pro detekci BrdU v replikované DNA využívající směsi enzymů pro zpřístupnění BrdU ve struktuře DNA je momentálně k dispozici například od firmy Roche. Ve srovnání s touto sadou poskytuje způsob popsáný v předkládané přihlášce vynálezu významně silnější signál.

Novost přístupu spočívá v použití iontů mědi pro zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů ve dvouřetězcové DNA a rovněž ve spojení tohoto kroku s následnou exonukleázovou reakcí. Takový přístup zatím pro zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů pro reakci s protilátkami ve struktuře DNA nebyl podle dostupného stavu techniky použit.

Současně s touto přihláškou je podávána i druhá přihláška, která popisuje způsob detekce dvouřetězcové DNA. Ačkoli i druhá přihláška vychází z působení jednomocné mědi na DNA, výsledkem je detekce jakékoli DNA, zatímco podle zde popsaného způsobu lze detekovat výhradně ty části DNA, které obsahují pyrimidinové nukleosidy.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje detekci BrdU (a) a proteinu SC35 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1725^{az}1729) (b) po zpřístupnění BrdU pomocí vodného roztoku jednomocné mědi v přítomnosti 0,2 mol.l⁻¹ Hepes a následném exonukleázovém trávení (dvoustupňová reakce).

Příklady provedení vynálezu

Seznam použitých zkratk

HeLa	buněčná linie lidských epiteliálních buněk
DMEM	Dulbeccova modifikace Eaglova média
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
TCEP	tris(2-karboxyetyl)fosfin
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
CldU	5-chloro-2'-deoxyuridin
IdU	5-jodo-2'-deoxyuridin
MC	5-metyl-2'-deoxycytidin
EGTA	kyselina etylenglykol-bis(2-aminoethyléter)-N,N,N',N'-tetraoctová
EDTA	kyselina etylendiaminotetraoctová
S-MEM	modifikace Eaglova minimálního média pro suspenzní buňky

Příklad 1

Zpřístupnění a detekce míst s inkorporovaným BrdU, CldU nebo IdU ve struktuře DNA pomocí měďných iontů v buňkách přisedlých na podložních sklíčkách.

Následující postup popisuje zpřístupnění a detekci míst v DNA s inkorporovaným BrdU, CldU nebo IdU v HeLa buňkách přisedlých na podložních sklíčkách. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

- A) Lidské HeLa buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v Petriho miskách na kruhových sklech o průměru 13 mm v růstovém médiu DMEM s L-glutaminem (Gibco) s 10% (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1% (obj./obj.) gentamicinem a 0,85 g/l NaHCO_3 v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO_2 při 37 °C.
- B) Druhý den po pasáži byl do růstového média přidán BrdU v konečné koncentraci 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Vzorky byly inkubovány 10 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO_2 při 37 °C. Alternativně byl do růstového média přidán CldU nebo IdU ve stejné koncentraci jako BrdU.
- C) Následně bylo růstové médium odstraněno a nahrazeno pufrem (1x PBS, složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 1 až 2 ml pufru na 4 cm^2 plochy).
- D) Pufr byl odstraněn a vzorky byly 10 minut fixovány 2% (hmotnost/obj.) roztokem formaldehydu v 1x PBS (pH 7,4; 1 až 2 ml fixačního roztoku na 4 cm^2 plochy). Alternativně byly vzorky fixovány metánolem a následně acetonem. V tomto případě byla skla se vzorky nejdříve inkubována 10 minut v metanolu při teplotě -20 °C (přibližně 1 až 2 ml metanolu na 4 cm^2 plochy) a následně ponořena na 30 sekund do kádinky s 50 ml acetonu o teplotě místnosti, skla se vzorky pak byla usušena a po usušení položena do Petriho misky s 1x PBS. V případě použití metanolu a acetonu následoval krok G).
- E) Roztok formaldehydu byl odstraněn a vzorky byly převrstveny 1x PBS (přibližně 1 až 2 ml 1x PBS na 4 cm^2 plochy). Po 5 minutách byl pufr odstraněn a nahrazen novým o stejném složení. Tento krok byl opakován ještě jednou.

- F) Následně byl pufr odstraněn. Vzorky byly 10 minut permeabilizovány 0,2% (obj./obj.) roztokem Tritonu X-100 v 1x PBS (přibližně 1 až 2 ml permeabilizačního roztoku na 4 cm² plochy). Po odstranění permeabilizačního roztoku byly vzorky převrstveny 1x PBS (přibližně 1 až 2 ml 1x PBS na 4 cm² plochy).
- G) Po 5 minutách byl roztok 1x PBS odstraněn a nahrazen stejným množstvím téhož roztoku. Tento krok byl opakován ještě jednou.
- H) Z misek byl odstraněn roztok 1x PBS, vzorky byly převrstveny stejným množstvím 0,5x PBS, po 1 minutě byl roztok 0,5x PBS odstraněn a nahrazen stejným množstvím 0,25x PBS. Nakonec byl uvedený roztok ze vzorků odstraněn a vzorky byly převrstveny destilovanou vodou (přibližně 1 až 2 ml vody na 4 cm² kultivační plochy). Po 5 minutách byla voda odstraněna a nahrazena stejným množstvím destilované vody. Pak byla skla se vzorky vyjmuta pomocí pinzety z Petriho misky a přebytek vody byl odsát pomocí filtračního papíru tak, že skla se vzorky byla položena stranou bez vzorků na filtrační papír. Poté byla skla se vzorky položena na kapky destilované vody na parafilmu (50 µl/kapka). Skla směřovala vzorkem směrem dolů do kapky vody.
- I) Následně byl přebytek vody ze vzorků odsát pomocí filtračního papíru tak, že byl filtrační papír jemně přiložen k hraně skla a skla se vzorky byla přemístěna do inkubačního roztoku (IR) v Petriho misce (1,5 ml roztoku na 9 cm² plochy, složení inkubačního roztoku je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie). Alternativně byla Petriho miska zcela zaplněná IR. Tím došlo k minimalizaci provzdušňování směsi. V dalším případě byla plná Petriho miska po uzavření omotána po obvodu parafilmem, nebo byla směs po celou dobu inkubace probublávána dusíkem. Skla byla umístěna do Petriho misek tak, že směřovala vzorky nahoru do roztoku.
- J) Petriho misky se vzorky na sklech byly přemístěny na třepačku (PS-M3D, Grant-Bio) a zde inkubovány alternativně po dobu 20 sekund, 10, 30 minut a 3 hodin při rychlosti 30 otáček/minutu. Některé vzorky, které byly inkubovány v 1,5 ml IR, byly alternativně namísto míchání na třepačce probublávány vzduchem nebo kyslíkem.
- K)

- a) Inkubační roztok byl odstraněn a vzorky byly převrstveny destilovanou vodou (přibližně 1 až 2 ml vody na 4 cm² plochy). Po jedné minutě byla voda odstraněna a nahrazena stejným množstvím vody. Tento krok byl opakován ještě jednou a následoval postup podle bodu L.
- b) Alternativně byl inkubační roztok odstraněn a ke vzorkům byla přidána destilovaná voda (přibližně 1 až 2 ml vody na 4 cm² plochy). Po jedné minutě byla voda odstraněna a nahrazena stejným množstvím vody. Tento krok byl opakován ještě jednou. Následně byla voda odstraněna a ke vzorkům bylo na 1, 5, 30 nebo 120 minut přidáno stejné množství alternativně 0,001; 4 nebo 100 mmol.l⁻¹ stabilizovaného roztoku monopersíranu draselného (2KHSO₅.KHSO₄.K₂SO₄). V některých případech byl namísto stabilizovaného roztoku monopersíranu draselného použitý vodný roztok peroxidu vodíku (H₂O₂), nebo dihydrogenperoxofosforečnanu draselného (KH₂PO₅) nebo peroxoboritanu sodného [Na₂(B₂O₄(OH)₄).6H₂O] (ve všech případech přibližně 1 až 2 ml roztoku na 4 cm² kultivační plochy). Jejich koncentrace byly stejné jako koncentrace u monopersíranu draselného. Uvedené roztoky byly připraveny těsně před přidáním k buňkám. Po inkubaci byly tyto roztoky odstraněny a bylo pokračováno podle bodu K a).
- L) Voda byla odstraněna a nahrazena vymývacím roztokem (1,5 ml roztoku na 9 cm² plochy). Složení vymývacího roztoku je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie. Petriho misky se vzorky na sklech byly přemístěny na třepačku a zde byly inkubovány buď do odbarvení, minimálně ale 10 minut, nebo v případě nezabarvených skel alternativně 1 minutu, 30 nebo 60 minut. V průběhu vymývání byla skla vždy po 5 minutách nadzvednuta pinzetou tak, aby došlo k vymytí prostoru pod skly a rovněž spodní strany skla. V případě skel inkubovaných 1 minutu ve vymývacím roztoku, byla skla nadzvednuta po 30 sekundách. Skla byla v průběhu nadzvedávání zcela ponořena v roztoku. Alternativně byl vymývací roztok probubláván vzduchem nebo kyslíkem. V některých případech byl vymývací krok zcela vynechán a bylo pokračováno bodem O.
- M) Vymývací roztok byl odstraněn a vzorky byly převrstveny destilovanou vodou (přibližně 1 až 2 ml vody na 4 cm² plochy). Po 2 minutách byla voda odstraněna a nahrazena stejným množstvím vody. Tento krok byl opakován ještě jednou.
- O) Následně byla provedena detekce BrdU, CldU nebo IdU pomocí protilátek.

I. Po inkubaci v IR a promytí

a) Z misek byla odstraněna voda, vzorky byly převrstveny stejným množstvím 0,25x PBS, po jedné minutě byl roztok 0,25x PBS odstraněn a nahrazen stejným množstvím 0,5x PBS. Po jedné minutě byl roztok 0,5x PBS odstraněn a vzorky byly převrstveny roztokem 1x PBS (přibližně 1 až 2 ml roztoku na 4 cm² plochy). Dále byla skla se vzorky vyjmuta pomocí pinzety z Petriho misky a přebytek pufru byl odsát pomocí filtračního papíru tak, že skla se vzorky byla položena stranou bez vzorků na filtrační papír. Skla se vzorky byla položena na kapky 1x PBS na parafilmu (50 µl/kapka). Skla směřovala vrstvou se vzorky směrem dolů do kapky.

b) Následně byly vzorky inkubovány 30 minut s myší anti-bromodeoxyuridinovou protilátkou (Roche Diagnostics, klon BMC 9318, ředění 1:20 v 1x PBS) na kapkách o velikosti 20 µl.

c) Skla se vzorky byla přenesena na kapku 1x PBS. Po 5 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku 1x PBS stejného složení. Tento krok byl ještě třikrát opakován.

Alternativně byl v bodech a), b) i c) roztok 1x PBS nahrazen vymývacím roztokem s přídavkem 100 mmol.l⁻¹ NaCl. Koncentrace vymývacích látek byly stejné jako v případě jejich použití ve vymývacích roztocích.

II. Po inkubaci s enzymem s exonukleázovou aktivitou

a) Skla se vzorky byla vyjmuta pomocí pinzety z Petriho misky a přebytek vody byl odsát pomocí filtračního papíru tak, že skla byla položena stranou bez vzorků na filtrační papír. Skla se vzorky pak byla položena na kapky destilované vody na parafilmu (50 µl/kapka). Skla směřovala vrstvou se vzorky směrem dolů do kapky vody.

b) Vzorky byly inkubovány 30 minut s enzymem s exonukleázovou aktivitou (použité enzymy a složení jejich roztoků je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie) na kapkách o velikosti 20 µl.

c) Skla se vzorky byla přenesena na kapku destilované vody (50 µl). Po 2 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku destilované vody. Tento krok byl ještě třikrát opakován. Následně byla skla se vzorky přenesena na kapku roztoku 0,25x PBS, po jedné minutě na kapku 0,5x PBS a po další jedné minutě na kapku 1x PBS (50 µl kapka ve všech případech). Po 5 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku 1x PBS (50 µl) stejného složení.

d) Skla se vzorky byla inkubována 30 minut s myší anti-bromodeoxyuridinovou protilátkou (Roche Diagnostics, klon BMC 9318, ředění 1:20 v 1x PBS) na kapkách o velikosti 20 μl .

e) Skla se vzorky byla přenesena na kapku (50 μl) 1x PBS. Po 5 minutách byla skla s buňkami přenesena na novou kapku 1x PBS (50 μl) stejného složení. Tento krok byl ještě třikrát opakován.

Alternativně byl v bodech a), b), c), d) a e) roztok PBS nahrazen vymývacím roztokem s přídavkem 100 mmol.l^{-1} NaCl. Koncentrace vymývacích látek byly stejné jako v případě jejich použití ve vymývacích roztocích.

III. Společně s enzymem s exonukleázovou aktivitou

a) Skla se vzorky byla vyjmuta pomocí pinzety z Petriho misky a přebytek vody byl odsát pomocí filtračního papíru tak, že skla se vzorky byla položena zadní stranou na filtrační papír. Pak byla skla se vzorky položena na kapky destilované vody na parafilmu (50 μl /kapka). Skla směřovala vrstvou přisedlých buněk směrem dolů do kapky vody.

b) Skla se vzorky byla inkubována 30 minut ve směsi myší anti-bromodeoxyuridinové protilátky a enzymu s exonukleázovou aktivitou (použité enzymy a složení roztoků je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie) na kapkách o velikosti 20 μl .

c) Skla se vzorky byla přenesena na kapku destilované vody (50 μl). Po 2 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku destilované vody. Tento krok byl ještě třikrát opakován. Následně byla skla se vzorky přenesena na kapku roztoku 0,25x PBS, po jedné minutě na kapku 0,5x PBS a po další jedné minutě na kapku 1x PBS (50 μl kapka ve všech případech). Po 5 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku (50 μl) 1x PBS stejného složení.

Alternativně byly v bodech a), b) a c) roztoky PBS nahrazeny vymývacím roztokem s přídavkem 100 mmol.l^{-1} NaCl. Koncentrace vymývacích látek byly stejné jako v případě jejich použití ve vymývacích roztocích.

P) Skla se vzorky byla inkubována 30 minut s kozí anti-myší protilátkou konjugovanou s fluorochromem Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, ředění 1:100 v 1x PBS) na kapkách o velikosti 20 μl . V případě, že byla anti-bromodeoxyuridinová protilátka ředěna ve vymývacím roztoku s přídavkem 100 mmol.l^{-1} NaCl, byl tento roztok použit i pro ředění kozí anti-myší protilátky.

Q) Skla se vzorky byla přenesena na kapku 1x PBS (50 μ l). Po 5 minutách byla skla s buňkami přenesena na novou kapku 1x PBS stejného složení. Tento krok byl ještě třikrát opakován. Následně byla skla se vzorky přenesena na kapku destilované vody (50 μ l). Po 5 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku destilované vody. Tento krok byl ještě třikrát opakován.

Alternativně byl roztok 1x PBS nahrazen vymývacím roztokem s přídavkem 100 mmol.l^{-1} NaCl. Koncentrace vymývacích látek byly stejné jako v případě jejich použití ve vymývacích roztocích.

R) Nakonec byla voda ze skel odsáta pomocí filtračního papíru, skla byla položena na nový filtrační papír vzorky nahoru a usušena.

S) Po usušení byla skla položena na kapičky (2 μ l) připraveného montovacího média na podložním skle (roztok Mowiol - Polyvinylalkohol 20-98, Fluka). Vzorky směřovaly do kapičky roztoku. Jemným tlakem pomocí pinzety na horní stranu skel se vzorky došlo k roztažení roztoku Mowiolu po celé ploše skel. Tento krok sloužil k zalití vzorků a získání trvalého preparátu. Signál byl detekován pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Příklad 2

Zpřístupnění a detekce míst s inkorporovaným BrdU, CldU nebo IdU ve struktuře DNA pomocí měďných iontů v tkáních.

Následující postup popisuje zpřístupnění a detekci míst v DNA s inkorporovaným BrdU, CldU nebo IdU v jaterní tkáni třídenních potkanů. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

A) Třídenní potkaní samci byli usmrceni dekapitací a následně jim byla vyjmuta játra. Játra byla nakrájena na malé kousky (3 mm – nejdelší rozměr) a položena do Petriho misek s HeLa buňkami inkubovanými jeden den v růstovém médiu DMEM s L-glutaminem (Dulbeccova modifikace Eaglova média, Gibco) s 10% (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1% (obj./obj.) gentamicinem a 0,85 g/l NaHCO_3 . Do média s kousky jater byl přidán BrdU v konečné koncentraci 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a játra byla v tomto médiu inkubována

30 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Alternativně byl do růstového média namísto BrdU přidán IdU nebo CldU ve stejné koncentraci jako BrdU.

B) Následně bylo růstové médium odstraněno a kousky jater byly převrstveny pufr (1x PBS, složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 1 až 2 ml pufru na 4 cm² plochy). Po 5 minutách byl pufr odstraněn a nahrazen stejným množstvím 1x PBS stejného složení. Tento krok byl ještě jednou opakován.

C) Kousek jater byl dán mezi dvě kruhová skla o průměru 13 mm potažená 1% (hmotnost/obj.) želatinou a tkáň byla roztažena po povrchu skel pomocí jemného tlaku pinzetou na sklo. Skla byla oddělena a obě byla dána do Petriho misky s 1x PBS a to tak, že skla směřovala vzorky tkání nahoru do roztoku.

D) V dalších krocích bylo postupováno dle kroků uvedených v Příkladu 1 (D-S).

Příklad 3

Zpřístupnění a detekci míst s inkorporovaným BrdU, CldU nebo IdU ve struktuře DNA pomocí měďných iontů v suspenzních buňkách.

Následující postup popisuje zpřístupnění a detekce míst v DNA s inkorporovaným BrdU, CldU nebo IdU v suspenzních HeLa S3 buňkách. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

A) Lidské HeLa S3 buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v kultivačních lahvích (objem lahví byl 50 ml), které byly třepány, v růstovém médiu S-MEM (modifikace Eaglova minimálního média pro suspenzní buňky, Sigma) s 2 mmol.l⁻¹ L-glutaminem a s 10% (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1% (obj./obj.) gentamicinem a 0,22% (hmotnost/obj.) NaHCO₃ v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Buněčná suspenze obsahovala přibližně 5×10^5 buněk na 1 mililitr.

B) Druhý den po pasáži byl do růstového média přidán BrdU v konečné koncentraci 2 μmol.l⁻¹. Vzorky byly inkubovány 10 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Alternativně byl do růstového média přidán CldU nebo IdU ve stejné koncentraci jako BrdU.

C) Následně byla suspenze buněk přenesena do 15 mililitrové centrifugační zkumavky a vzorky byly odstředovány 1 minutu při 180g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 μ l média) a ke vzorkům bylo přidáno nové médium (10 ml). Vzorky byly rozsuspendovány a následně opět odstředovány 1 minutu při 180g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 μ l média) a k peletu vzorků byl přidán 1 ml nového média. Pelet vzorků byl rozsuspendován.

D) 50 μ l kapka suspenze buněk byla přenesena na kruhová skla o průměru 13 mm potažené vrstvou poly-L-lysinu (způsob přípravy těchto skel je popsán v části Použité roztoky a chemikálie). Po 2 minutách byl přebytek média odsát pomocí filtračního papíru tak, že byl filtrační papír jemně přiložen k hraně skla. Skla byla položena do 2% (hmotnost/obj.) roztoku formaldehydu v Petriho misce a vzorky byly fixovány 10 minut. Skla byla umístěna do Petriho misek tak, že směřovala vzorky nahoru do roztoku.

E) V dalších krocích bylo postupováno podle bodů E-S příkladu 1.

Navržený postup lze použít i při práci se suspenzí buněk po celou dobu jejich zpracování například pro FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). V tomto případě bylo postupováno dle bodu A-C příkladu 3, následně podle bodu D-Q příkladu 1 s tím, že při odstraňování veškerých roztoků, přidávání nových a při promývání byly buňky odstředovány 1 minutu při 180g, následně byl odstraněn supernatant (ve zkumavce bylo ponecháno 200 μ l roztoku), k buňkám byl přidán nový roztok dle rozpisu v příkladu 1 (2 ml), buňky v něm byly rozsuspendovány a inkubovány po doby uvedené v jednotlivých bodech příkladu 1. V průběhu těchto kroků byly buňky třepány na třepačce (Vortex Wizard, VELP Scientifica, při 300 otáčkách za minutu). V případě inkubace v IR byly zkumavky zcela naplněny IR a uzavřeny nebo probublávány dusíkem po celou dobu inkubace v IR. Rovněž v bodě Q podle příkladu 1 nebyly vzorky inkubovány ve vodě, ale ponechány v 1x PBS.

Příklad 4

Zpřístupnění a detekce míst s inkorporovaným BrdU, CldU nebo IdU ve struktuře DNA pomocí měďných iontů, vytvořených redukcí z měďnatých iontů navázaných na DNA v buňkách přisedlých na podložních skličkách, v tkáních a suspenzních buňkách.

Následující postup popisuje příklad zpřístupnění a detekci míst v DNA s inkorporovaným BrdU, CldU nebo IdU v buňkách přisedlých na podložních sklíčkách, v tkáních a suspenzních buňkách. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

Postup byl shodný s protokoly z příkladu 1, 2 a 3 s následujícími změnami:

Namísto inkubace v IR byly vzorky inkubovány alternativně v 0,001; 4 nebo 40 mmol.l⁻¹ vodném roztoku síranu měďnatého (5 minut; 1,5 ml roztoku na 9 cm² plochy). Namísto roztoku síranu měďnatého byly alternativně použity i roztoky chloridu měďnatého, dusičnanu měďnatého, octanu měďnatého nebo bromidu měďnatého ve stejných koncentracích jako u síranu měďnatého. Uvedené roztoky byly odstraněny a vzorky byly inkubovány třikrát po sobě v destilované vodě (2 minuty, přibližně 1 až 2 ml vody na 4 cm² plochy). Po odstranění vody byl ke vzorkům přidán alternativně 0,001; 10 nebo 100 mmol.l⁻¹ roztok askorbátu sodného v destilované vodě (1,5 ml roztoku na 9 cm² plochy). Namísto roztoku askorbátu sodného byl alternativně použit i 0,001; 20 nebo 200 mmol.l⁻¹ roztok hydrazinu nebo 0,001; 8 nebo 80 mmol.l⁻¹ roztok TCEP. Vzorky byly v uvedeném roztoku inkubovány 5 minut.

Alternativně nebyly vzorky promývány destilovanou vodou, ale byly okamžitě po odstranění síranu měďnatého nebo chloridu měďnatého, dusičnanu měďnatého, octanu měďnatého nebo bromidu měďnatého inkubovány 5 minut v uvedených roztocích askorbátu sodného nebo hydrazinu nebo TCEP.

Při inkubaci vzorků ve vymývacím roztoku činila doba inkubace na třepačce 10 minut; po prvních 5 minutách byla skla nadzvednuta pinzetou tak, aby došlo k vymytí prostoru pod skly, přičemž skla byla v průběhu nadzvedávání zcela ponořena v roztoku.

Pro práci se suspenzí buněk zpracovávaných např. pro FACS se postupovalo stejně, jako je popsáno v posledním odstavci příkladu 3 se změnami popsanými v tomto příkladu.

Příklad 5

Zpřístupnění a detekce míst s 5-met²yl-2'-deoxycytidinem ve struktuře DNA pomocí měďných iontů v buňkách přisedlých na podložních sklíčkách, v tkáních a suspenzních buňkách.

Následující postup popisuje příklad zpřístupnění a detekci míst v DNA s 5-methyl-2'-deoxycytidinem (MC) v buňkách přisedlých na podložních sklíčkách, v tkáních a suspenzních buňkách. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

Postup byl shodný s protokoly z příkladu 1, 2, 3 a 4 s následujícími změnami:

- A) Byla vynechána inkubace vzorků s BrdU, CldU a IdU.
- B) Pro detekci MC byla použita následující primární a sekundární protilátka:
 - 1) Ovčí anti-methylcytozinová protilátka (AbD Serotec, ředění 1:500 v 1x PBS nebo vymývacím roztoku)
 - 2) Opičí anti-ovčí protilátka konjugovaná s fluorochromem Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, ředění 1:100 v 1x PBS nebo vymývacím roztoku).

Příklad 6

Zpřístupnění míst s inkorporovaným BrdU, CldU nebo IdU ve struktuře DNA pomocí měďných iontů ve vzorcích lyzovaných buněk.

Následující postup popisuje zpřístupnění míst v DNA s inkorporovaným BrdU, CldU nebo IdU v DNA lyzovaných buněk. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

- A) Lidské HeLa buňky byly pěstovány v Petriho miskách (o průměru 60 mm) bez skel podle příkladu 1. Suspenzní buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích podle příkladu 3. V případě suspenzních buněk se postupovalo při veškerých vymýváních a inkubacích výhradně tak, jak je uvedeno v posledním odstavci příkladu 3. Přisedlé i suspenzní buňky byly inkubovány s BrdU, resp. CldU nebo IdU podle příkladů 1 a 3. Po inkubaci s BrdU, CldU nebo IdU byly buňky promyty 1xPBS (viz příklad 1 a 3) a následně byly 10 minut fixovány 11% (hmotnost/obj.) roztokem formaldehydu v 1x PBS (1 až 2 ml fixačního roztoku na 4 cm² plochy nebo 2 ml v případě suspenzních buněk). Po odstranění roztoku formaldehydu byly buňky inkubovány 5 minut v roztoku 2,5 mmol.l⁻¹ glycinu v 1x PBS (1 až 2 ml roztoku na 4 cm² plochy nebo 2 ml v případě suspenzních buněk). Po odstranění roztoku glycinu byly buňky 3x promyty v 1x PBS vychlazeným na 4 °C (1 až 2 ml roztoku na 4 cm² plochy nebo 2 ml v případě suspenzních buněk).

- B) K přisedlým buňkám bylo přidáno 5 ml 1x PBS a buňky byly pomocí gumové škrabky seškrabány. Získaná buněčná suspenze byla přenesena do 15 ml centrifugační zkumavky a položena na led. Potom byly buňky odstředovány 10 minut při 700g. Po odstranění supernatantu byl pelet buněk resuspendován v 10 ml 1x PBS a suspenze buněk byla přenesena do nové 15 ml centrifugační zkumavky a buňky byly odstředovány 5 minut při 700g. Buňky kultivované v suspenzi byly přeneseny do 15 ml centrifugační zkumavky, bylo k nim přidáno 10 ml 1x PBS a suspenze buněk byla odstředována 5 minut při 700g.
- C) Následně byl odstraněn supernatant a pelet buněk byl resuspendován pomocí třepačky (GVLab, Gilson) v 0,5 ml lyzačního pufru I (Nuclei Isolation kit Nuclei EZ prep, NUC101, Sigma Aldrich). Pak bylo k suspenzi přidáno 3,5 ml výše uvedeného lyzačního pufru. Suspenze buněk byla inkubována v lyzačním pufru 5 minut na ledu.
- D) Vytvořená suspenze buněčných jader byla odstředována 5 minut při 500g a teplotě místnosti. Po odstranění supernatantu byl pelet jader resuspendován ve 4 ml lyzačního pufru I a inkubován 5 minut na ledu. Suspenze buněčných jader byla odstředována 5 minut při 500g při teplotě místnosti a supernatant byl následně odstraněn.
- F) Dále byl pelet jader resuspendován ve 3,5 ml lyzačního pufru II (složení lyzačního pufru II je popsáno v části Použité roztoky a chemikálie). Směs byla inkubována 15 minut v rotační třepačce (PMR-30, Grant-Bio, 30 otáček za minutu).
- G) Po inkubaci byl k roztoku přidán roztok EGTA v konečné koncentraci 25 mmol.l⁻¹.
- H) Lyzát byl odstředován 10 minut při 1600g a teplotě 4 °C. Supernatant byl přenesen do dialyzační komůrky s 1kDa MWCO celulóзовou membránou (Fast Dialyser PY8 74-0415 a PY8 7421-RC1K, Harvard Apparatus). Vzorky byly dialyzovány proti 4 litrům dialyzačního pufru (složení pufru je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie) přes noc při 4 °C. Následně byl lyzát přenesen do 15 ml centrifugační zkumavky a uchováván při -80 °C.

Použité roztoky a chemikálie:

1. Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS)

10x PBS (desetinásobně koncentrovaný roztok PBS):

1,4 mol.l⁻¹ NaCl26 mmol.l⁻¹ KCl90 mmol.l⁻¹ Na₂HPO₄14 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄

Uvedené složky byly rozpuštěny v destilované vodě a pH upraveno do rozmezí 7,3 až 7,4

1x PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok v obvyklé koncentraci)

0,5x PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok v poloviční koncentraci)

0,25x PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok ve čtvrtinové koncentraci)

2. IR (inkubační roztoky):

A)

a. Destilovaná voda

b.

Látka	Askorbát sodný (mmol.l ⁻¹)	Síran měďnatý Alternativně byl použit: chlorid měďnatý (CuCl ₂); dusičnan měďnatý (CuNO ₃); octan měďnatý; bromid měďnatý (CuBr ₂). (mmol.l ⁻¹)
Použitá koncentrace	10	4
Použitá koncentrace	0,001	0,004
Použitá koncentrace	100	40

B)

a. Destilovaná voda

b.

Látka	Hydrazin (mmol.l ⁻¹)	Síran měďnatý Alternativně byl použit: chlorid měďnatý (CuCl ₂); dusičnan měďnatý (CuNO ₃); octan měďnatý; bromid měďnatý (CuBr ₂). (mmol.l ⁻¹)
Použitá koncentrace	20	4
Použitá koncentrace	0,001	0,004
Použitá koncentrace	200	40

C)

a. Destilovaná voda

b.

Látka	TCEP (mmol.l ⁻¹)	Síran měďnatý Alternativně byl použit: chlorid měďnatý (CuCl ₂); dusičnan měďnatý (CuNO ₃); octan měďnatý; bromid měďnatý (CuBr ₂). (mmol.l ⁻¹)
Použitá koncentrace	8	4
Použitá koncentrace	0,001	0,004
Použitá koncentrace	80	40

D)

a. 10 mmol.l⁻¹ hexafluorfosforečnan (tetraacetonitrilo)měďný ([Cu(CH₃CN)₄]PF₆), navážen těsně před použitím)

b. Převařená destilovaná voda

Alternativně byla použita koncentrace hexafluorfosforečnanu (tetraacetonitrilo)měďného 0,001 mmol.l⁻¹ nebo 100 mmol.l⁻¹.

E)

a. 10 mmol.l⁻¹ tetrafluorboritan (tetraacetonitrilo)měďný ([Cu(CH₃CN)₄]BF₄), navážen těsně před použitím)

b. Převařená destilovaná voda

Alternativně byla použita koncentrace tetrafluorboritanu (tetraacetonitrilo)měďného 0,001 mmol.l⁻¹ nebo 100 mmol.l⁻¹.

Uvedené složky IR byly přidávány v uvedeném pořadí.

Dále byly jako IR použity roztoky uvedené v bodu A), B), C), D) a E) s přidavkem vymývacích látek. Vymývací látka byla v případě A), B) a C) přidána jako druhá v pořadí (přidána do vody). V případě D) a E) byla vymývací látka přidána do vody, následně byl tento roztok přidán k výše uvedeným komplexům mědi a tyto v něm byly rozpuštěny. Seznam a koncentrace přidávaných vymývacích látek je uvedena v odstavci 4: „Vymývací látky“. Použitá koncentrace je uvedena před závorkou. Pokud není číslo uvedeno, nebyly tyto látky použity jako přídavek do IR. Je možné použít i kombinaci vymývacích látek.

3. Vymývací roztoky:

a) a) 100 mmol.l⁻¹ Tris (C₄H₁₁NO₃), pH 7,4

b) 100 mmol.l⁻¹ NaCl

Alternativně byly použity tyto koncentrace: 0,001 mmol.l⁻¹ Tris a 0,001 mmol.l⁻¹ NaCl nebo 1 mol.l⁻¹ Tris a 1 mol.l⁻¹ NaCl

c) 20 mmol.l⁻¹ EGTA (C₁₄H₂₄N₂O₁₀), pH 8

Alternativně byly použity tyto koncentrace: 0,001 mmol.l⁻¹ EGTA nebo 0,5 mol.l⁻¹ EGTA

Tris, případně EGTA byly alternativně nahrazeny dalšími vymývacími látkami. Kompletní seznam látek a jejich koncentrací přidávaných do vymývacích roztoků je uveden níže v odstavci 4: „Vymývací látky“. Z výsledků je nicméně jasné, že lze použít jakýkoli primární nebo sekundární amin. Koncentrace použité ve vymývacích roztocích je uvedena v závorce. pH promývacích roztoků bylo upraveno do rozmezí mezi 6,5 a 8 pomocí HCl nebo NaOH. Je možné použít i kombinace vymývacích látek.

4. Vymývací látky:

Koncentrace, které byly alternativně použity v IR jsou uvedeny před závorkou, koncentrace, které byly alternativně použity ve vymývacích roztocích jsou uvedeny v závorce. Pokud údaj před závorkou chybí, nebyla látka v IR použita.

(0,001; 20; 500) mmol.l⁻¹ EGTA

(0,001; 20; 500) mmol.l⁻¹ EDTA

0,001; 200; 1000 (0,001; 200; 1000) mmol.l⁻¹ Hepes (kyselina 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonová)

0,001; 200; 1000 (0,001; 200; 1000) mmol.l⁻¹ Hepps (kyselina 3-[4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinyl]propansulfonová)

0,001; 400; 450 (0,001; 200; 1000) mmol.l⁻¹ TAPS (kyselina N-[tris(hydroxymetyl)metyl]-3-aminopropansulfonová)

0,001; 1; 1000 (0,001; 100; 1000) mmol.l⁻¹ Bicin (N,N-bis(2-hydroxyetyl)glycin)

0,001; 1; 1000 (0,001; 100; 1000) mmol.l⁻¹ Tricin (N-[tris(hydroxymetyl)metyl]glycin)

0,001; 200; 350 (0,001; 100; 1000) mmol.l⁻¹ TES (kyselina 2-[(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymetyl)etyl)amino]etan-sulfonová)

0,001; 20; 50 (0,001; 10; 50) mmol.l⁻¹ ADA (kyselina N-(karbamoylmetyl)iminodioctová)

0,001; 200 (0,001; 200; 1000) mmol.l⁻¹ BES (kyselina N-bis(2-hydroxyetyl)-2-aminoetansulfonová)

0,001; 10; 1000 (0,001; 100; 1000) mmol.l⁻¹ BIS-TRIS (2,2-bis(hydroxymetyl)-2,2',2''-nitrilotrietanol)

- 0,001; 1; 1000 (0,001; 100; 1000) mmol.l⁻¹ Tris (tris(hydroxymetyl)aminometan)
- 0,001; 10; 1000 (0,001; 100; 1000) mmol.l⁻¹ glycyl-glycin
- 0,001; 200; 500 (0,001; 200; 500) mmol.l⁻¹ MOPSO (kyselina β -hydroxy-4-morfolinpropansulfonová)
- 0,001; 100 (0,001; 100) mmol.l⁻¹ POPSO (kyselina piperazin-N,N'-bis(2-hydroxypropansulfonová)
- 0,001; 20; 1000 (0,001; 200; 1000) mmol.l⁻¹ glycine
- 0,001; 10; 1000 (0,001; 100; 1000) mmol.l⁻¹ glycylamid
- 0,001; 20; 1000 (0,001; 20; 1000) mmol.l⁻¹ D- a L- α -aminokyseliny (např. alanin, lysin, arginin)
- 0,001; 20; 400 (0,001; 20; 400) mmol.l⁻¹ D- a L- α -aminokyseliny (např. serin, prolin, asparagin, kyselina asparagová; kyselina glutamová, threonin)
- 0,001; 20; 150 (0,001; 20; 150) mmol.l⁻¹ D- a L- α -aminokyseliny (např. glutamin, citrulin)
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ amoniak
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ etanolamin
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ dietanolamin
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ trietanolamin
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ dietylamín
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ trietylamin
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ diisopropyletylamín
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ diisopropylamin
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ stabilizovaný monopersíran draselný (2KHSO₅.KHSO₄.K₂SO₄)
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ vodný roztok peroxidu vodíku [H₂O₂]
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ dihydrogenperoxofosforečnan draselný [KH₂PO₅]
- 0,001; 4; 100 (0,001; 10; 100) mmol.l⁻¹ peroxoboritan sodný [Na₂(B₂O₄(OH)₄).6H₂O]

5. Roztok exonukleázy III:

- Destilovaná voda
- 1x pufr pro exonukleázu III (Fermentas, 2 μ l 10x koncentrovaného pufru do 20 μ l směsi), tento pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný; složení 10x koncentrovaného pufru je následující: 660 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0 při 30°C), 6,6 mmol.l⁻¹ MgCl₂.
- 1U/ μ l Exonukleáza III (Fermentas), definice jednotky viz bod 13

6. Roztok exonukleázy III s protilátkou:

- a) Destilovaná voda
- b) 1x pufr pro exonukleázu III (Fermentas, 2 μ l 10x koncentrovaného pufru do 20 μ l směsi), tento pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný, složení 10x koncentrovaného pufru je následující: 660 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0 při 30°C), 6,6 mmol.l⁻¹ MgCl₂.
- c) 1U/ μ l Exonukleáza III (Fermentas), definice jednotky viz bod 13
- d) Myši anti-bromodeoxyuridinová protilátka (Roche Diagnostics, klon BMC 9318, ředění 1:20 v 1x PBS)

7. Roztok exonukleázy λ :

- a) Destilovaná voda
- b) 1x pufr pro exonukleázu λ (Fermentas, 2 μ l 10x koncentrovaného pufru do 20 μ l směsi), tento pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný; složení 10x koncentrovaného pufru je následující: 670 mmol.l⁻¹ glycín-KOH (pH 9,4), 25 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 0,1% (obj./obj.) Triton X-100.
- d) 0,1 U/ μ l Exonukleáza λ (Fermentas), definice jednotky viz bod 13

8. Roztok exonukleázy λ s protilátkou:

- a) Destilovaná voda
- b) 1x pufr pro exonukleázu λ (Fermentas, 2 μ l 10x koncentrovaného pufru do 20 μ l směsi), tento pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný; složení 10x koncentrovaného pufru je následující: 670 mmol.l⁻¹ glycín-KOH (pH 9,4), 25 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 0,1% (obj./obj.) Triton X-100.
- c) 0,1 U/ μ l Exonukleáza λ (Fermentas), definice jednotky viz bod 13
- d) Myši anti-bromodeoxyuridinová protilátka (Roche Diagnostics, klon BMC 9318, ředění 1:20 v 1x PBS)

9. Roztok exonukleázy T7:

- a) Destilovaná voda
- b) 1x pufr pro exonukleázu T7 (New England BioLabs, 2 μ l 10x koncentrovaného pufru do 20 μ l směsi), tento pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný; složení 10x koncentrovaného pufru je následující: 200 mmol.l⁻¹ Tris-acetát (TAE; pH 7,9 při

25°C), 500 mmol.l⁻¹ octan draselný, 100 mmol.l⁻¹ octan hořečnatý, 10 mmol.l⁻¹ dithiothreitol.

e) 1 U/ μl Exonukleáza T7 (New England BioLabs), definice jednotky viz bod 13

10. Roztok exonukleázy T7 s protilátkou:

- a) Destilovaná voda
- b) 1x pufr pro exonukleázu T7 (New England BioLabs, 2 μl 10x koncentrovaného pufru do 20 μl směsi), tento pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný; složení 10x koncentrovaného pufru je následující: 200 mmol.l⁻¹ Tris-acetát (TAE; pH 7,9 při 25°C), 500 mmol.l⁻¹ octan draselný, 100 mmol.l⁻¹ octan hořečnatý, 10 mmol.l⁻¹ dithiothreitol.
- c) 1 U/ μl Exonukleáza T7 (New England BioLabs), definice jednotky viz bod 13
- d) Myši anti-bromodeoxyuridinová protilátka (Roche Diagnostics, klon BMC 9318, ředění 1:20 v 1x PBS)

11. Roztok endonukleázy IV:

- a) destilovaná voda
- b) 1x pufr pro endonukleázu IV (Fermentas, 2 μl 10x koncentrovaného pufru do 20 μl směsi), tento pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný. Složení 10x koncentrovaného pufru je následující: 500 mmol.l⁻¹ Tris-acetát (TAE; pH 7,5), 500 mmol.l⁻¹ chlorid draselný, 0,5 % (obj./obj.) Triton X-100, 10 mmol.l⁻¹ EDTA.
- c) 0,1 U/ μl Endonukleáza IV (Fermentas), definice jednotky viz bod 13

12. Roztok endonukleázy IV s protilátkou:

- e) Destilovaná voda
- f) 1x pufr pro endonukleázu IV (Fermentas, 2 μl 10x koncentrovaného pufru do 20 μl směsi), tento pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný. Složení 10x koncentrovaného pufru je následující: 500 mmol.l⁻¹ Tris-acetát (TAE; pH 7,5), 500 mmol.l⁻¹ chlorid draselný, 0,5 % (obj./obj.) Triton X-100, 10 mmol.l⁻¹ EDTA.
- g) 0,1 U/ μl Endonukleáza IV (Fermentas), definice jednotky viz bod 13
- h) Myši anti-bromodeoxyuridinová protilátka (Roche Diagnostics, klon BMC 9318, ředění 1:20 v 1x PBS)

13. Definice jednotky použitých enzymů.

Exonukleáza III (Fermentas)

Jedna jednotka (U) enzymu uvolní za 30 minut 1 nmol produktu z DNA *E. coli* při 37°C. Enzymatická aktivita byla měřena v následující směsi: 50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0), 5 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 1 mmol.l⁻¹ dithiothreitol a 0,05 mmol.l⁻¹ sonikované DNA z *E. coli*.

Exonukleáza λ (Fermentas)

Jedna jednotka (U) enzymu uvolní za 30 minut 10 nmol produktu z DNA *E. coli* při 37°C. Enzymatická aktivita byla měřena v následující směsi: 67 mmol.l⁻¹ glycin-KOH (pH 9,4), 2,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 0,1% (obj./obj.) Tritonu X-100 a 20 µg/ml sonikované DNA z *E. coli*.

Roztok exonukleázy T7 (New England BioLabs)

Jedna jednotka (U) enzymu uvolní za 30 minut 1 nmol produktu z DNA *E. coli* při 25°C. Enzymatická aktivita byla měřena v následující směsi: 20 mmol.l⁻¹ Tris-acetát (TAE; pH 7,9 při 25°C), 50 mmol.l⁻¹ octan draselný, 10 mmol.l⁻¹ octan hořečnatý, 1 mmol.l⁻¹ dithiothreitol, 0,15 mmol.l⁻¹ sonikované DNA z *E. coli*.

Roztok endonukleázy IV

Jedna jednotka (U) enzymu uvolní za 30 minut 1 µg produktu z částečně depurinovaného plazmidu při 37 °C. Enzymatická aktivita byla měřena v následující směsi: 50 mmol.l⁻¹ Tris-acetát (TAE; pH 7,5), 50 mmol.l⁻¹ chlorid draselný, 1 mmol.l⁻¹ EDTA, 0,05% (obj./obj.) Triton X-100, 2 µg částečně depurinované DNA plazmidu pUC19.

14. Příprava polylysinových skel pro ukotvení suspenzních buněk

Kruhová skla s průměrem 13 mm byla vložena do 50 µl kádinky s 20 ml 96% (obj./obj.) etanolu. Po 10 minutách byla pomocí pinzety přenesena do Petriho misky vyložené filtračním papírem a usušena. Skla byla následně na dobu 1 minuty ponořena do 0,01% (hmotnost/obj.) roztoku poly-L-lysinu v DMEM, následně na 30 sekund do 1x PBS a ještě jednou na 30 sekund do PBS. Tento krok byl ještě 3x opakován. Nakonec byla skla položena na filtrační papír a usušena.

15. Lyzační pufr II

- A) a) 1% (obj./obj.) Triton X-100
 b) 1 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 8
 c) 100 mmol.l⁻¹ NaCl
 e) 0,1% (hmotnost/obj.) Na-deoxycholát
 f) 0,5% (obj./obj.) N-lauroylsarkosin
 g) 0,001 nebo 5 nebo 50 mmol.l⁻¹ CuSO₄

Těsně před použitím lyzačního pufru byl k němu přidán:

- h) 1x proteázový inhibitor, (ProteoBlock TM Protease Inhibitor Cocktail, Fermentas, dodávaný jako 100x koncentrovaný roztok, složení: 100 mmol.l⁻¹ AEBSF-HCl, tj. hydrochlorid 4-(2-aminoethyl)benzensulfonylfluoridu, 80 μmol.l⁻¹ Aprotinin, 5 mmol.l⁻¹ Bestatin, 1,5 mmol.l⁻¹ E64, 2 mmol.l⁻¹ Leupeptin, 1 mmol.l⁻¹ pepstatin A, 0,5 mmol.l⁻¹ EDTA)
 i) 0,001 nebo 10 nebo 100 mmol.l⁻¹ askorbát sodný

B) Alternativně byl místo askorbátu sodného použit v lyzačním pufru 0,001; 20 nebo 200 mmol.l⁻¹ hydrazin (N₂H₄) nebo 0,001; 8 nebo 80 mmol.l⁻¹ TCEP. Alternativně byl místo síranu měďnatého použit v lyzačním pufru chlorid měďnatý (CuCl₂); dusičnan měďnatý (CuNO₃); octan měďnatý; bromid měďnatý (CuBr₂) ve stejných koncentracích jako síran měďnatý.

C) V dalším případě byl CuSO₄ a askorbát sodný nahrazen alternativně 0,001; 10 nebo 100 mmol.l⁻¹ hexafluorfosforečnanem (tetraacetonitrilo)měďným ([Cu(CH₃CN)₄]PF₆), který byl navážen těsně před použitím nebo alternativně 0,001; 10 nebo 100 mmol.l⁻¹ tetrafluorboritanem (tetraacetonitrilo)měďným ([Cu(CH₃CN)₄]BF₄), který byl navážen těsně před použitím.

Dále byly použity roztoky uvedené v bodu A), B), C) s přidavkem vymývacích látek. Seznam a koncentrace přidávaných vymývacích látek je uvedena v odstavci 4: Vymývací látky. Použitá koncentrace je uvedena před závorkou. Pokud není číslo uvedeno, nebyly tyto látky použity jako přídavek do lyzačního pufru.

13, Dialyzační pufr

50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 8

10 mmol.l⁻¹ EDTA, pH 8

(uchováván při 4 °C).

Alternativně byly použity v dialyzačním pufru vymývací látky uvedené v bodu 3 a 4 této části.

Průmyslová využitelnost:

Způsob zpřístupnění specifických pyrimidinových nukleosidů ve struktuře dvouřetězcové DNA podle předkládaného vynálezu lze využít v případech, kdy je důležité šetrné zpřístupnění nukleosidů ve struktuře DNA pro reakci se specifickými protilátkami. V této souvislosti je možné mimo jiné předpokládat včlenění tohoto způsobu a jednotlivých použitých látek do komerčně dostupných sad na detekci replikace DNA. Vzhledem k relativní jednoduchosti zpřístupnění dostupných halogenových derivátů ³thymidinu, např. BrdU v DNA, je pravděpodobné využití popsaného způsobu při izolacích značených DNA a s nimi asociovaných proteinů.

Použitá literatura:

1. Kennedy, B.K., Barbie, D.A., Classon, M., Dyson, N. and Harlow, E. (2000) Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev*, **14**, 2855^{α2'}2868.
2. Dimitrova, D.S. and Berezney, R. (2002) The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. *J Cell Sci*, **115**, 4037^{α2'}4051.
3. Hein, C.D., Liu, X.M. and Wang, D. (2008) Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharm Res*, **25**, 2216^{α2'}2230.
4. Fu, X.D. and Maniatis, T. (1992) The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1725^{α2'}1729.

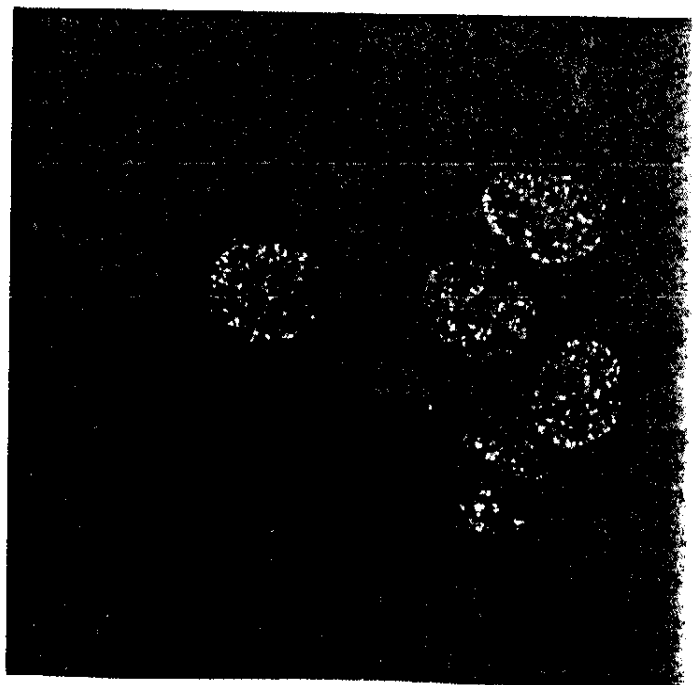
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů ve struktuře dvouřetězcové DNA pro reakci s protilátkami, reagujícími s těmito nukleosidy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vzorky s DNA se inkubují v přítomnosti jednomocných iontů mědi a kyslíku a/nebo chemických oksylichovadel, přičemž zdrojem těchto iontů mohou být vodné roztoky obsahující ionty mědi, nebo se může jednat o jednomocnou měď, která byla na DNA navázána; volitelně se pro odstranění nežádoucích produktů, které vznikají při inkubaci, použijí vymývací látky a míra zpřístupnění se popřípadě zvýší pomocí následné inkubace DNA s enzymem majícím exonukleázovou aktivitu, v tom případě je odstranění nerozpustných produktů obsahujících atomy mědi nezbytné, přičemž se k jejich odstranění použijí vymývací látky, a to buď ještě před reakcí s enzymem majícím exonukleázovou aktivitu, nebo v průběhu takové reakce.
2. Způsob zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů ve struktuře dvouřetězcové DNA pro reakci s protilátkami, reagujícími s těmito nukleosidy, podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jednomocné ionty mědi vázané na dvouřetězcovou DNA se získají inkubací vzorků s touto DNA ve vodných roztocích obsahujících jednomocné ionty mědi, přičemž tato inkubace se výhodně provádí bez přístupu kyslíku, v uzavřené nádobě se vzorky či za probublávání dusíkem a v přítomnosti vymývacích látek podle nároku 1.
3. Způsob zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů ve struktuře dvouřetězcové DNA pro reakci s protilátkami, reagujícími s těmito nukleosidy, podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jednomocné ionty mědi vázané na dvouřetězcovou DNA se získají redukcí dvojmocných iontů mědi navázaných na dvouřetězcovou DNA vzorků, se kterými byly předem inkubovány, účinkem redukujících látek jako jsou askorbát sodný, hydrazin či tris(2-karboxyetyl)fosfin, popřípadě v přítomnosti vymývacích látek z nároku 1.
4. Způsob zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů ve struktuře dvouřetězcové DNA pro reakci s protilátkami, reagujícími s těmito nukleosidy, podle nároků 1, 2 nebo 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že přítomnost kyslíku se během inkubace ve vodných roztocích za přítomnosti iontů jednomocné mědi, jak volných, tak navázaných na DNA, zajistí aktivním prokysličováním.

5. Způsob zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů podle nároků 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že chemická okysličovadla se zvolí ze skupiny, zahrnující monoperoxodraselný, peroxid vodíku, dihydrogenperoxofosforečnan draselný a peroxoboritan sodný.
6. Způsob zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vymývací látky se použijí ve vodných roztocích pro inkubaci s jednomocnými ionty mědi, jak volnými, tak i navázanými na DNA.
7. Způsob zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vymývací látky se aplikují až po inkubaci s jednomocnými ionty mědi, jak volnými, tak i navázanými na DNA.
8. Způsob zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů podle nároků 6 nebo 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vymývací látky se zvolí ze skupiny, zahrnující kyselinu 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinsulfonovou, kyselinu 3-[4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinyl]propansulfonovou, kyselinu N-[tris(hydroxymetyl)metyl]-3-aminopropansulfonovou, N,N-bis(2-hydroxyetyl)glycin, N-[tris(hydroxymetyl)metyl]glycin, kyselinu 2-[(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymetyl)etyl)amino]propansulfonovou, kyselinu N-(karbamoylmetyl)iminodioctovou, kyselinu N-bis(2-hydroxyetyl)-2-aminoetansulfonovou, 2,2-bis(hydroxymetyl)-2,2',2''-nitrilotrietylamin, tris(hydroxymetyl)aminometan, glycyl-glycin, kyselinu β-hydroxy-4-morfolinpropansulfonovou, kyselinu piperazin-N,N'-bis(2-hydroxypropansulfonovou), glycin, glycinamid, D- a L-α-aminokyseliny jako alanin, serin, prolin, lysin, arginin, asparagin, glutamin, kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, citrulin, threonin a dále amoniak, etanolamin, dietanolamin, trietanolamin, dietylamín, trietylamin, diisopropyletylamín a diisopropylamin nebo jiný primární nebo sekundární amin, přičemž je možné rovněž použít kombinace uvedených látek.
9. Způsob zpřístupnění pyrimidinových nukleosidů podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vymývací látky se zvolí ze skupiny, zahrnující kyselinu etylenglykol-bis(2-aminoetyl)eter)-N,N,N',N'-tetraoctovou či kyselinu etylendiamintetraoctovou, popřípadě se použijí v kombinaci s látkami uvedenými v nároku 8.
10. Způsob zpřístupnění nukleosidů podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vymývací látky se použijí společně ve směsi s enzymem majícím exonukleázovou aktivitu.



1b



1a

Copy 1

Copy 2