ÖZET

DNA KÜTÜPHANELERİNİN HAZIRLANMASI İÇİN DNA-ADAPTÖR MOLEKÜLLERİ VE BUNLARIN ÜRETİLMESİ İÇİN YÖNTEM VE KULLANIMLARI

Buluş, DNA kütüphanelerinin hazırlanması için olan DNA-adaptör molekülleri ve bunların üretilmesi için yöntemler ve bunların kullanımları ile ilgilidir. Buluş moleküler biyolojide uygulama için, özellikle de Yeni Nesil Sekanslama ve/ veya Kütüphane Çoğullama için yararlıdır. Mevcut buluş çift sarmallı bir polinükleotid molekülü içeren DNA-adaptör moleküllerini açıklamakta olup, burada birinci sarmalın 5′ ucu, kinazlar için herhangi bir bağlanma alanının mevcut olmadığı şekilde modifiye edilmekte, birinci sarmalın 3′ ucu herhangi bir ligasyon meydana gelemeyecek şekilde modifiye edilmekte, ters sarmalın 5′ ucu, bir kinaz için herhangi bir bağlanma alanının mevcut olmadığı şekilde modifiye edilmekte ve ters sarmalın 3′ ucu serbest bir hidroksil grubu içereceği (son nükleotidin 3′ pozisyonunda) şekilde modifiye edilmektedir.

İSTEMLER

1. Kör uçlu çift sarmallı bir molekül içeren DNA-adaptör molekülü **olup, özelliği;**

a. birinci sarmalın 5′ ucunun, birinci nükleotidin 5′ pozisyonunda serbest bir hidroksil grubu ve serbest bir fosfat içermeyeceği şekilde modifiye edilmiş olması,

b. birinci sarmalın 3′ ucunun, son nükleotidin 3′ pozisyonunda serbest bir hidroksil grubu içermeyeceği şekilde modifiye edilmiş olması,

c. ters sarmalın 5′ ucunun, birinci nükleotidin 5′ pozisyonunda serbest bir hidroksil grubu ve serbest bir fosfat içermeyeceği şekilde modifiye edilmiş olması,

d. ters sarmalın 3′ ucunun serbest bir hidroksil grubu içermesidir.

2. İstem 1'e göre DNA-adaptör molekülü **olup, özelliği;** bir barkod sekansının yanı sıra amplifikasyon ve sekanslama primerleri için bağlanma alanları içermesidir.

3. İstem 1 veya 2'ye göre DNA-adaptör molekülü **olup, özelliği;** 20 ila 90, tercihen 40 ila 70, en çok tercihen 40 ila 60 baz çifti uzunluğa sahip olması **ile karakterize edilir.**

4. İstemler 1 ila 3'ten birine göre DNA-adaptör molekülü **olup, özelliği;** her iki sarmalın da 5′ uçlarındaki ve birinci sarmalın 3′ ucundaki hidroksil gruplarının esterleştirilmiş veya eterleştirilmiş olması **ile karakterize edilir.**

5. İstemler 1 ila 4'ten birine göre DNA-adaptör molekülü **olup, özelliği;** ters sarmalın 5′ ucunun 5′-C3-aralayıcının veya 5′-D-aralayıcının eklenmesi ile modifiye edilmiş olması **ile karakterize edilir.**

6. İstemler 1 ila 5'ten birine göre DNA-adaptör molekülü **olup,**

özelliği; birinci sarmalın 5′ ucunun 5′-C3-aralayıcının veya bir 5′-O-metil deoksinükleotidin eklenmesi ile modifiye edilmiş olması **ile karakterize edilir.**

7. İstemler 1 ila 6'dan birine göre DNA-adaptör molekülü **olup, özelliği**; birinci sarmalın 3′ ucunun 3′-C3-aralayıcı veya 3′-amino-modifiye edici tarafından modifiye edilmiş olması **ile karakterize edilir.**

8. Kör uçlu çift sarmallı bir molekülü içeren DNA-adaptör moleküllerinin aşağıdaki aşamalar ile üretimi için yöntemdir:

a. birinci sarmalın 5′ ucunun, serbest hidroksil grubu ve serbest fosfatın bulunmadığı şekilde modifikasyonu,

b. birinci sarmalın 3′ ucunun, serbest hidroksil grubunun bulunmadığı şekilde modifikasyonu,

c. ters sarmalın 5′ ucunun, serbest hidroksil grubu ve serbest fosfat bulunmadığı şekilde modifikasyonu.

9. İstem 8'e göre DNA-adaptör moleküllerinin üretimi için yöntem **olup, özelliği**; burada birinci sarmalın 5′ ucunun modifikasyonunun 5′-O-metil deoksitimidin monofosfat veya bir 5′-C3-aralayıcının eklenmesi ile sağlanıyor olmasıdır.

10. İstem 8 veya 9'a göre DNA-adaptör moleküllerinin üretimi için yöntem **olup, özelliği**; burada birinci sarmalın 3′ ucunun modifikasyonunun 3′-C3-aralayıcının veya 3′-amino-modifiye edicilerin eklenmesi ile sağlanıyor olmasıdır.

11. İstemler 8 ila 10'dan birine göre DNA-adaptör moleküllerinin üretimi için yöntem **olup, özelliği**; burada ters sarmalın 5′ ucunun modifikasyonunun 5′-C3-aralayıcı veya 5′-D-aralayıcının eklenmesi ile sağlanıyor olmasıdır.

12. Bir DNA kütüphanesinin üretilmesi için yöntem **olup, özelliği**;

1. çift sarmallı DNA'nın, tercihen fiziksel ya da kimyasal ya da enzimatik yöntemlerle ya da bunların bir kombinasyonuyla

parçalanması,

2. parçalanmış çift sarmallı DNA'nın uç onarımının, tercihen T4-DNA polimeraz gibi 3'-> 5' eksonükleaz ve 5'-> 3' polimeraz aktivitesine sahip bir DNA polimeraz yardımı ile yapılması,

3. parçalanmış çift sarmallı DNA'nın 5' ucunun, tercihen T4 polinükleotit kinaz gibi bir polinükleotid kinaz tarafından fosforilasyonu,

4. istemler 1-7'den herhangi birine göre olan kör uçlu DNA-adaptör moleküllerinin, parçalanmış, uç onarımı yapılmış ve 5' fosforile edilmiş çift sarmallı DNA'ya bağlanması aşamalarını içermesi, burada istemler 1-7'den herhangi birine göre olan DNA-adaptör moleküllerinin, aşama 2'den önce ilave edilir olmasıdır.

13. Bir DNA kütüphanesinin üretilmesi için yöntem **olup, özelliği;** istemler 1 ila 7'den birine göre kör uçlu DNA-adaptör moleküllerinin parçalanmış, uç onarımı yapılmış ve 5' fosforile edilmiş çift sarmallı DNA'ya bağlanması aşamasını içermesi, burada ligasyondan önce enzimlerin etkisizleştirilmesinin gerçekleştirilmemesidir.

14. Kit **olup, özelliği;** istemler 1 ila 7'den birine göre kör uçlu DNA-adaptör molekülleri,

- tercihen 3'-> 5' eksonükleaz ve 5'-> 3' polimeraz aktivitesinin yanı sıra deoksinükleosit trifosfatlar içeren DNA polimeraz,
- tercihen bir polinükleotit kinaz,
- tercihen ligaz,
- 5'-> 3' eksonükleaz aktivitesine sahip polimeraz, ve
- tercihen tampon içermesidir.

15. İstemler 1 ila 7'den birine göre olan kör uçlu DNA-adaptör moleküllerinin veya DNA kütüphanesinin üretilmesi için istem 14'e göre olan kitin, özellikle Yeni Nesil Sekanslama ve/ veya Kütüphane Çoğullama alanındaki kullanımlarıdır.

TARİFNAME

DNA KÜTÜPHANELERİNİN HAZIRLANMASI İÇİN DNA-ADAPTÖR MOLEKÜLLERİ VE BUNLARIN ÜRETİLMESİ İÇİN YÖNTEM VE KULLANIMLARI

Buluş, DNA kütüphanelerinin hazırlanması için olan DNA-adaptör molekülleri ve bunların üretilmesi için yöntemler ve bunların kullanımları ile ilgilidir. Buluş moleküler biyolojide uygulama için, özellikle de Yeni Nesil Sekanslama ve/ veya Kütüphane Çoğullama için yararlıdır.

MEVCUT TEKNİK

Yeni Nesil Sekanslama (YNS), bir DNA veya RNA sekansının nükleobaz sekansını belirlemek için kullanılan modern bir teknolojidir. YNS'nin avantajları (hız, ekonomik etkinlik, hassasiyet) genetik bilginin analizi ve uygulanmasıyla ilgilenen tüm akademik kurumlarda artan bir dağılıma yol açmaktadır. Roche, Life Technologies ve Illumina dahil olmak üzere birçok küresel şirket YNS için çözümler sunmaktadır.

Bir çalışmada bir dizi numuneyi sekanslamak için, bilinen sekansın barkodları, tanımlanmış numunelere eklenebilir ve sekanslamadan sonra numunelere sekans atamak için kullanılabilir.

Çoğul sekanslama (aynı anda birkaç farklı numuneyi sekanslama) için yöntemler, bileşimler ve kitler, WO 2011156529 A2'de açıklanmaktadır. İki veya daha fazla farklı numuneden çok sayıda hedef polinükleotit, bir reaksiyon odasına sekanslanır ve sekanslanmış hedef polinükleotitlerin her birinin türetildiği numune, barkodlar vasıtasıyla tanımlanır.

Geliştirilmiş numune verimine sahip sekanslama yöntemlerini açıklayan başka bir belge, WO 2008061193 A2'dir. Burada adaptör sekansları (etiket sekansları olarak adlandırılır), daha sonra karıştırılan ve sekanslanan numunelere bağlanır.

WO 2013033721 A1, çoğul DNA sekanslaması için barkod tasarımını

optimize etmeye yönelik yöntemleri açıklar.

US 2013059762 A1, bir numunede bulunan bir veya daha fazla nükleik asidin çoğul PCR'si için yararlı olan yöntemler, bileşimler, kitler, sistemler ve aparatlar sunar. Özellikle, bir veya daha fazla hedef sekansın seçici amplifikasyonuna izin veren çeşitli hedefe özgü primerler sağlanmıştır. Bu nedenle adaptörler, kör uçlu bir ligasyon reaksiyonunda hedef sekanslara bağlanır.

Yeni Nesil Sekanslama (YNS) için DNA kütüphanelerinin hazırlanması sırasında, vakaların çoğunda yüksek moleküler dsDNA, fiziksel veya kimyasal yöntemlerle parçalanır ve sekanslama platformuna özgü olan adaptör sekanslar, üretilen DNA moleküllerine bağlanır. Adaptör sekanslar genel olarak primerler için bağlanma alanları içerir ve bir karışımda çoklu barkodlu DNA kütüphanelerinin sekanslanmasına (çoğullama) ve daha sonra ilgili barkod hakkındaki sekanslama bilgisinin orijinal numuneye atanmasına olanak veren barkod sekansları içerebilir. Adaptör sekanslarının fragmanlara bu ligasyonu gerçekleştirilmeden önce, parçalanma sırasında rastgele ve öngörülemeyen bir biçimde oluşan DNA uçları onarılmalıdır. Sarkık 3′ uçları eksize edilir ve sarkık 5′ uçları ise bir polimeraz ile çift sarmala kadar doldurulur. Daha sonra fragmanların 5′ ucu kinaz ile fosforile edilir. Daha sonra, bir tarafında ligasyonu sağlamak için kör uçlu olan ve diğer tarafında bir ligasyonu önlemek için 3′ sarkıntısı olan fosforile edilmemiş DNA-adaptörleri, bir ligaz yardımı ile üretilen DNA moleküllerine bağlanır. Fosforile edilmemiş adaptör sekansların ligasyonu, adaptörün 5′ ucunda fosfodiester bağlarının oluşmasına yol açmadığından ve dolayısıyla ligasyon sonrası DNA çift sarmalında bir çentik bıraktığından, eksik olan fosfodiester bağlantısının daha sonra çentik (nick) translasyonunu yapabilen bir enzim tarafından kapatılması gerekir.

Yaygın olarak kullanılan adaptör sekansları, uç onarım karışımına eklenemez, çünkü uç onarım karışımındaki enzimler,

onları, ligasyonun yönlülüğünün kaybolacağı ve adaptör dimerleri ve oligomerlerinin oluşacağı şekilde modifiye edecektir.

Amaç

Mevcut buluşun amacı, adaptör sekanslarını, kütüphane hazırlığının başlangıcında, parçalanmış DNA'ya halihazırda eklenebilecek şekilde modifiye etmektir. Buluşun bir başka amacı, adaptör dimerleri ve oligomerlerinin oluşumunu önlemektir.

Buluş

Mevcut buluş, çift sarmallı bir polinükleotid molekülü içeren DNA-adaptör moleküllerini açıklar; burada

a. birinci sarmalın 5′ ucu, birinci nükleotidin 5′ pozisyonunda serbest bir hidroksil grubu ve serbest bir fosfat içermediği, dolayısıyla kinazlar için herhangi bir bağlanma alanının bulunmadığı şekilde modifiye edilmiştir,
b. birinci sarmalın 3′ ucu, son nükleotidin 3′ pozisyonunda serbest bir hidroksil grubu içermeyeceği, dolayısıyla herhangi bir ligasyonun gerçekleşemeyeceği şekilde modifiye edilmiştir,
c. ters sarmalın 5′ ucu, birinci nükleotidin, serbest bir hidroksil grubu ve 5′ pozisyonunda serbest bir fosfat içermediği, dolayısıyla bir kinaz için herhangi bir bağlanma alanının bulunmadığı şekilde modifiye edilmiştir, ve
d. ters sarmalın 3′ ucunda (son nükleotidin 3′ pozisyonunda) serbest bir hidroksil grubu bulunur.

Birinci sarmal ve ters sarmal, herhangi bir sarkıntı olmadan (kör uçlar), tamamlayıcı baz eşleşmesi ile birbirlerine tavlanır. Tercihen, 3′ ve 5′ uçlarındaki yukarıda belirtilen terminal nükleotitleri haricinde, çift sarmal içindeki

nükleotitler, modifiye edilmemiştir. Bununla birlikte, çift sarmalın nükleazlara karşı gelişmiş stabiliteye sahip nükleotitler içermesi, özellikle de fosforotiyoatlar gibi modifiye edilmiş bir omurgaya sahip nükleotitler içermesi göz ardı edilmemektedir. Tercihen, her iki sarmal da tam olarak aynı uzunluğa sahiptir (aynı sayıda nükleotit ile), burada ters sarmalın nükleotit sekansı, birinci sarmalın nükleotit sekansının ters tamamlayıcısıdır.

Avantajlı olarak, buluşa göre olan DNA-adaptör molekülleri, DNA kütüphanesi hazırlığı sırasında doğrudan, parçalanmış DNA'ya eklenebilir. Mevcut tekniğin aksine, buluşa göre olan DNA-adaptör moleküllerini eklenmeden önce ve ligazı eklenmeden önce uç-onarım enzimlerini etkisizleştirmeye gerek yoktur. Buluşa göre olan adaptör moleküllerinin kör uçlu olmalarından dolayı bunlar, 5'-> 3' polimeraz aktivitesi ve 3'-> 5' ekzonükleaz aktivitesi olan T4 DNA Polimeraz, T7 DNA Polimeraz veya Pfu polimeraz gibi polimerazlar için birer substrat değillerdir. Ayrıca, buluşa göre olan DNA-adaptör molekülleri, enzimatik ligasyonun sadece bir yönde (ters sarmalın 3' ucunun serbest hidroksil grubunda) meydana gelebileceği biçimde avantajlı bir şekilde tasarlanmıştır. Bu tarifnamede kullanıldığı haliyle, "serbest hidroksil grubu" terimi, -OH'yi ya da protondan arındırılmış haldeki -O'yu ifade etmektedir. Burada "serbest fosfat" terimi, protondan arındırılmış bir fosfatı ($-OPO_3^{2-}$), mono veya dihidrojen fosfatı tanımlamak için kullanılır.

Burada kullanıldığı şekliyle "polimeraz" terimi, DNA bağımlı bir DNA polimerazı, tercihen 5'-> 3' polimeraz aktivitesi ve 3'-> 5' eksonükleaz aktivitesi olan ve tercihen 5'-> 3' eksonükleaz aktivitesi olmayan bir polimerazı belirtir. Tercih edilen Polimerazlar, T4 Polimeraz, T7 DNA Polimeraz veya Pfu polimeraz gibi kör uçlar oluşturabilen enzimlerdir.

Burada kullanılan "kinaz" terimi, bir polinükleotid molekülünün serbest bir 5'-hidroksil ucuna bir fosfat eklenmesini katalize eden bir polinükleotit 5'-hidroksil-kinazı

belirtir. Tercih edilen kinazlar T4 kinaz veya T7 kinazdır.

Burada kullanılan bir "polinükleotit molekülü", bir zincire kovalent olarak bağlanmış 13 veya daha fazla nükleotit monomerinden oluşan bir biyopolimerdir.

Buluşa göre DNA-adaptör molekülü, tercihen ek olarak amplifikasyon ve sekanslama primerleri için bağlanma alanları ve tercihen bir barkod sekansı içerir.

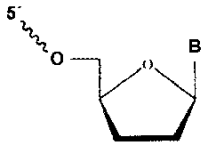
Barkod sekansı tercihen üç ila 20, daha çok tercihen dört ila sekiz baz çifti uzunluğuna sahiptir. Tercihen barkod sekansı, birinci sarmalın 5′ ucuna yakın bir yerde bulunur. DNA-adaptör molekülü tercihen 20 ila 90, daha çok tercihen 30 ila 70, en çok tercih edilen 40 ila 60 baz çiftine sahiptir.

İlk ve/ veya son nükleotidin serbest bir hidroksil grubu içermediği ifadesiyle, buluşa göre olan DNA-adaptör molekülünün, her iki sarmalın da 5′ ucundaki normal olarak meydana gelen hidroksil veya fosfat ve ters sarmalın 3′ ucunda normal olarak meydana gelen hidroksilin burada "sonlandırıcı gruplar" olarak adlandırılan, yukarıda belirtilen ilgili enzimler için bir substrat olmayan modifiye edilmiş bir nükleotitle sonuçlanan diğer gruplar tarafından değiştirileceği şekilde modifiye edilmiş olduğu kastedilmektedir. Tercihen bu sonlandırıcı gruplar bağımsız olarak hidrojen, ornatılmış veya ornatılmamış alkil, alkoksi amino ve bilinen diğer zincir sonlandırıcılar arasından seçilir. Bu sonlandırma gruplarının, enzimler için substratlar olmayacaklarından serbest hidroksil grupları veya hatta serbest bir fosfat içerebilecek olmaları göz ardı edilmemektedir.

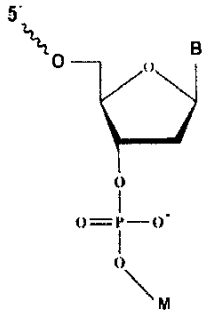
Buluşa göre olan DNA-adaptör molekülü, tercihen, her iki sarmalın da 5′ ucunun ve birinci sarmalın 3′ ucunun zincir sonlandırıcıları içereceği şekilde modifiye edilmiştir.

3′ ucu ve 5′ ucu için zincir sonlandırıcılar, teknikte uzman bir kişi için iyi bilinmektedir. Ters sarmalın 5′ ucunda ve birinci sarmalın 3′ ucunda, sırasıyla serbest 3′ OH veya 5′ OH'ı bloke etmek için olası herhangi bir zincir sonlandırıcı seçilebilir.

Birinci sarmalın 3′ ucu için tercih edilen zincir sonlandırıcı örnekleri, tercihen formül 2'de gösterildiği gibi, 2′3′-dideoksinükleositler (formül 1) veya 3′-modifiye deoksinükleotitlerdir:



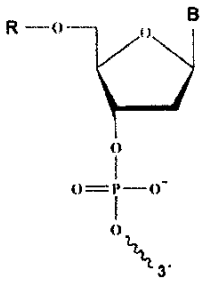
(1)



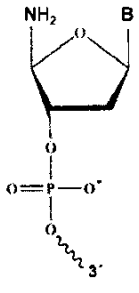
(2)

burada B, tercihen Adenin (A), Guan in (G), Sitozin (C) ve Timin (T) arasından seçilen bir nükleobazdır ve M, L′nin ~~~ tercihen doğrusal veya dallanmış C_1 ila C_6 alkil, tercihen C_3 veya C_4 alkil′den seçildiği NH_2-L'den seçilir, buradaki 5 O, DNA-adaptör molekülünün birinci sarmalının devam eden nükleotit sekansına 3′-> 5′ yönünde olan kovalent bağdır.

5′ ucu için tercih edilen zincir sonlandırıcı örnekleri, eterileştirilmiş deoksinükleotitler (formül 3), 4′-amino-deoksinükleotitler (formül 4) ve 5′-amino-deoksinükleotitlerdir (formül 5), örneğin:

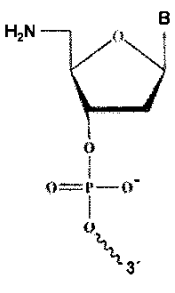


(3),



(4)

ve



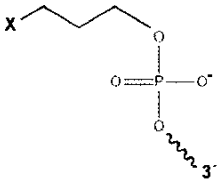
(5)

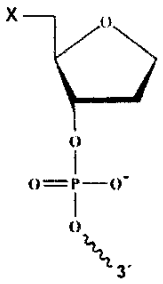
burada B, yukarıdaki gibi seçilen nükleobazdır ve tercihen R = C_1 ila C_3 alkil, daha tercihen CH_3′tür,

buradaki O 3', DNA-adaptör molekülünün birinci sarmalının veya ters sarmalının devam eden nükleotit sekansına 5'-> 3' yönünde olan kovalent bağdır.

Tercihen her iki sarmalın da 5' uçları, birbirinden bağımsız olarak 5' -OMe-deoksinükleotitler, en çok tercihen 5' -OMe deositimidin (5' -OMeT), terminal 5' -C3-aralayıcı-modifikasyonlar ve/ veya 5' -D-aralayıcı modifikasyonlar tarafından modifiye edilir. Bu modifikasyon, polinükleotit kinazlar, özellikle de T4 polinükleotit kinaz yoluyla fosforilasyonun, modifiye edilmiş 5' ucunda gerçekleştirilememesi gerçeğiyle sonuçlanır. Avantajlı olarak, her iki sarmalın da 5' ucu adaptör dimerlerinin ve oligomerlerin oluşumunu önlemek için fosforile edilmemiş halde kalır.

Tercihen, bir 5'-C3-aralayıcı veya 5'-D-aralayıcı aşağıdaki gibi tasarlanmıştır

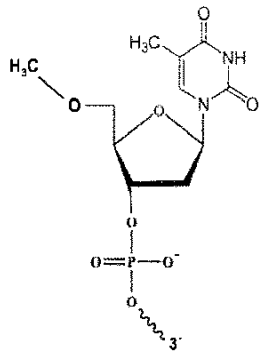




5'-C3-aralayıcı **5'-D-aralayıcı**

burada X, -H, -OH, -OR_x ve halojenden seçilir, tercihen X -OH veya -OR_x'tir ve daha tercihen X, -OH'dır, burada ~~~ R_x isteğe bağlı olarak ornatılmış olan ve/ veya dallı C_1 ila C_3 alkil kalıntısıdır ve daha tercihen R_x CH_3'tür, burada O 3, DNA-adaptör molekülünün birinci sarmalı ya da ters sarmalının devam eden nükleotit sekansına 5 '-> 3' yönünde olan kovalent bağdır.

~~~
~~~



5′-OMe deoksitimidilat (5′-O-metil deoksitimidin monofosfat, burada ayrıca 5′-OMeT olarak da adlandırılır).

Tercihen, DNA adaptör molekülünün birinci sarmalının 5′ ucu, bir 5′ aralayıcı veya 5′ eterleştirilmiş deoksinükleotit (tercihen formül 3'e göre), tercihen bir 5′-OMetil deoksinükleotit tarafından modifiye edilir. Aralayıcı terimi, tercihen bir ila altı karbon atomlu bir hidrokarbon kalıntısı, tercihen 2 ila 4 karbon atomlu bir alkil grubu, en çok tercih edilen doğrusal C3 (5′-C3-aralayıcı) anlamına gelir. DNA-adaptör molekülünün birinci sarmalının 5′ ucunun modifikasyonu, özellikle T4 polinükleotit kinaz yoluyla fosforilasyonun mümkün olmadığı gerçeğiyle sonuçlanır. Ayrıca, tercih edilen modifikasyonlar, ters sarmalın reaktif serbest 3′-OH'ının etkin bir ligasyonuna izin vermek için DNA çift sarmalının konformasyonu üzerinde en az etkiye (sterik engel) sahiptir.

En çok tercih edilen 5′-OMe deoksinükleotit, 5′-OMe deoksitimidilattır (5′ -OMeT). Ayrıca, 5′-OMe deoksisitidilat (5′-O-metil deoksitisidin monofosfat), 5′-OMe dezoksiadenilat (5′-O-metil deoksiadenozin monofosfat) ya da 5′-OMe deoksiguanlat (5′-O-metil deoksiguanozin monofosfat) ile yapılan modifikasyonlar da mümkündür. 5′-OMe deoksinükleotit modifikasyonu (veya 5′-amino-deoksinükleotit) için DNA-adaptör molekülünün ters sarmalının 3′-ucuna ek bir tamamlayıcı deoksinükleotit eklenir, böylece birinci sarmalın 5′-ucundaki modifiye nükleotit, ardıl çentik onarımını engellememek için bu tamamlayıcı nükleotit ile normal, stabilize edilmemiş bir baz çifti oluşturabilir. Örneğin, birinci sarmalın 5′ ucunun modifikasyonu, 5′-OMeTimidin (veya 5'-aminodetoksitimindin

monofosfat) ise tamamlayıcı nükleotid, bir deoksiadenindir.

Kütüphane hazırlığı için kullanıldığında, buluşa göre olan DNA-adaptör molekülü, yalnızca ters sarmalın 3'-ucu ile bir DNA fragmanının birinci sarmalının fosforile edilmiş 5' ucuna bağlanır. DNA-adaptörünün birinci sarmalının 5'-ucu ile DNA parçasının ters sarmalının 3'-OH'ı arasında bir çentik kalır (DNA-adaptör molekülünün birinci sarmalının 5' ucu modifikasyonu nedeniyle 5' ucu serbest bir fosfat içermez). Çentik tercihen daha sonra eksize edilerek ve 5' ucundaki (tercihen 5'-OMeT) modifiye edilmiş nükleotiti modifiye edilmemiş (tercihen deoksitimidin monofosfat) bir nükleotit ile değiştirilerek 5'-> 3' eksonükleaz aktivitesine ve 5'-> 3' polimeraz aktivitesine (DNA polimeraz I gibi) sahip bir nükleotit eksizyon onarımı (burada ayrıca çentik onarımı da denir) ile onarılmıştır. Numunede tercihen hala mevcut ve aktif olan ligaz, daha sonra DNA fragmanının ters sarmalının serbest 3'-hidroksil grubunu, DNA-adaptörünün birinci sarmalının onarılmış 5'-ucuna bağlar.

Buluşa göre olan DNA-adaptör molekülünün birinci sarmalının 3' ucu, tercihen 3'-C3-aralayıcı ya da 3'-amino-modifiye edici ile modifiye edilir. Modifiye edilmiş bu 3' ucu ligaz için bloke edilir ve fosforile edilmiş 5' DNA ile, tercihen dsDNA molekülleri ile birleşme meydana gelemez.



3'-C3-aralayıcı



3'-amino-modifiye edici

burada X, -H, -OH, $-OR_x$ ve halojenden seçilir, tercihen X -OH veya $-OR_x$'tir ve daha tercihen X, -OH'dır, burada R_x isteğe bağlı

olarak ornatılmış olan ve/ veya dallı C_1 ila C_3 alkil kalıntısıdır ve daha tercihen R_x ~~~ CH_3'tür, burada 5' O, DNA- adaptör molekülünün birinci sarmalı devam eden nükleotit sekansına 3'-> 5' yönünde olan kovalent bağdır.

Aynı zamanda, buluşun bir bölümü, aşağıdaki aşamalar ile birlikte çift sarmallı bir DNA molekülü içeren DNA-adaptör moleküllerinin üretimi için bir yöntemdir:

a. birinci sarmalın 5' ucunun, kinaz için bir bağlanma alanı, özellikle serbest hidroksil grubu ve serbest fosfat bulunmadığı şekilde modifikasyonu,

b. birinci sarmalın 3' ucunun, serbest hidroksil grubu bulunmayacak şekilde ve fosforilize edilmiş 5' dsDNA ile bir bağ oluşmayacak şekilde modifikasyonu,

c. ters sarmalın 5' ucunun, kinaz için bir bağlanma alanı, özellikle serbest hidroksil grubu ve serbest fosfat bulunmadığı şekilde modifikasyonu,

burada a-c aşamaları ise isteğe bağlı bir sırada gerçekleşebilir.

Çift sarmallar normal olarak standart oligonükleotit sentezi ile sentezlenen iki tek sarmalın tavlanmasıyla elde edilir. Genel olarak yukarıda belirtilen modifikasyonlar, ilgili 3' ve 5' uçları için olan oligonükleotit sentezi için halihazırda önceden modifiye edilmiş olan yapı blokları kullanılarak yapılır. Bununla birlikte modifikasyon terimi, (daha az tercihen) 5'-OmeT elde etmek için, oligonükleotit sentezinden, ör., serbest bir 5'-OH'a sahip standart bir 5'-Timidinin (tam olarak deoksitimidin monofosfat) metil etere dönüşümünden sonra ilgili 3' ve 5' uçları modifiye etme imkanını içerir.

Tercih edilen modifikasyonlar yukarıda tarif edilmiştir.

Buluşun bir başka kısmı, tercihen aşağıdaki aşamaları içeren bir DNA kütüphanesinin üretilmesi için bir yöntemdir:

1. çift sarmallı DNA'nın, tercihen fiziksel ya da kimyasal ya da enzimatik yöntemlerle ya da bunların bir kombinasyonuyla parçalanması,

2. parçalanmış çift sarmallı DNA'nın, tercihen T4-DNA polimeraz gibi 3'-> 5' eksonükleaz ve 5'-> 3' polimeraz aktivitesine sahip bir DNA polimeraz yardımı ile uç onarımı

3. parçalanmış çift sarmallı DNA'nın 5' ucunun, tercihen T4 polinükleotit kinaz gibi bir polinükleotid kinaz tarafından fosforilasyonu,

4. buluşa uygun DNA-adaptör moleküllerinin, parçalanmış, ucu onarılmış ve 5' fosforile edilmiş çift sarmallı DNA'ya ligasyonu, bununla birlikte buluşa uygun DNA-adaptör molekülleri, aşama 2'den önce ilave edilir ve tercihen enzimlerin (özellikle uç onarım enzimleri) ligasyondan önce etkisizleştirilmesi gerçekleştirilmez.

Enzimler, mevcut teknikte bilinen uygun tamponlara ilave edilir. Aşama 2 ve 3, özellikle bir polimeraz ve kinaz karışımı ilave edilerek paralel olarak gerçekleştirilebilir. Her iki enzim birlikte, burada "uç onarım enzimleri" olarak da adlandırılır. Karışım sırasıyla "uç onarım enzimi karışımı" olarak da adlandırılır. Uç onarımı ve kinaz için kullanılan polimeraz, tercihen magnezyum ve TRIS-HCl gibi bir tamponlama maddesi içeren ve tercihen 7 ila 8 arasında bir pH'a sahip olan aynı tampon içerisinde iyi bir performans sergiler. Bu tampon ayrıca "uç onarım tamponu" olarak da adlandırılır. Uç onarımı için, deoksi nükleosit trifosfatlar da (tercihen dATP, dTTP, dGTP ve dCTP) ya "uç onarım tamponuna" eklenir ya da ayrı olarak eklenir.

Buluşa göre olan DNA-adaptör molekülleri yukarıda açıklandığı gibi oluşturulur, tercihen yukarıda açıklanan bir veya birkaç tercih edilen özelliği içerir. Tercihen, aşama 2'den önce eklenen DNA-adaptör molekülleri barkod sekansları içerir. 1. aşamada çeşitli münferit DNA probları, bir cihazın bireysel bölmelerinde paralel olarak işlenebilir. Tercihen her bir DNA

probuna, farklı barkodlara sahip bir DNA-adaptör molekülü eklenir. Yeni nesil sekanslama için numuneler, genellikle barkodların ligasyonundan sonra toplanır. Bu barkodlar, sekanslamadan sonra sekansların numunelere atanmasına izin verir.

Prensipte barkod adaptörleri, 1. aşamadan sonra ve 4. aşamadan önce veya sırasında eklenebilir.

Avantajlı bir şekilde, buluşa göre olan DNA-adaptör molekülleri, parçalanmış DNA'ya halihazırda uç onarımından ve 5' uçların fosforilasyonunun gerçekleştirilmesinden önce eklenebilir. Bu, sadece 1. aşamada, parçalanmış DNA ve buluşa göre barkodlu DNA-adaptör molekülleri olan bireyselleştirilmiş probların eklenmesi avantajlarına sahiptir. Bu, sonraki aşamaların, örneğin aşama 2 ila 4'teki gibi bir pipetleme robotuyla, tercihen tüm numunelere aynı maddelerin ve hacimlerin eklendiği otomasyonuna izin verir.

Tekniğin mevcut durumunda bilinen protokollerde, bireyselleştirilmiş barkod adaptörlerinin küçük hacimleri (2 µl veya daha az), ligasyondan hemen önce, uç onarımından ve uç onarım enzimlerinin etkisizleştirilmesinden sonra numuneye manuel olarak eklenmelidir. Küçük hacimlerin bu hataya meyilli pipetlemesi, buluşa uyarak önlenebilir.

Bununla birlikte buluşta, barkod adaptörleri, 1.aşamadan sonra her bir numuneye eklenebilir ve sonraki aşamalar tamamen bir pipetleme robotundan gerçekleştirilebilir. Robot, evrensel Uç Onarım ve Ligasyon Karışımları ile tedarik edilebilir ve her bir numuneye sadece önceden ayarlanmış özdeş hacimleri eklemelidir. Bu, yanlışlığı ve Reaksiyon Hacmi kaybını en aza indirir. Ayrıca, robotun her bir pipetleme aşamasından sonra pipetleme başlığını değiştirmesi gerekmez.

Özellikle DNA kütüphanesi hazırlığı için, tercihen ikinci bir DNA-adaptör molekülü, parçalanmış, uç onarımı yapılmış ve 5' fosforile edilmiş çift sarmallı genomik DNA'nın diğer ucuna bağlanır. Bu ikinci DNA-adaptör molekülü tercihen ters primer sekansları içerir ve tercihen her prob için aynı olan evrensel

bir adaptör molekülüdür. İkinci DNA-adaptör molekülü, ya buluşa göre bir DNA-adaptör molekülüdür ya da mevcut teknikte kullanıldığı haliyle çift sarmallı bir polinükleotid molekülünü de içeren bilindik bir DNA-adaptör molekülüdür. İkinci DNA-adaptör molekülü, tercihen modifiye edilmiş bir omurgaya sahip olan nükleotidleri (fosfor tiyoatlar olarak) içerir.

Tercihen, ikinci DNA-adaptör molekülü, buluşa göre bir DNA-adaptör molekülüdür (yukarıda tarif edildiği üzere birinci ve ters sarmalın 5' ucu ve birinci sarmalın 3' ucu ile). Evrensel adaptör molekül olarak ikinci DNA-adaptör molekülünün bir barkod içermesi gerekmez, fakat tercihen ters primer sekansları içerir. Avantajlı bir şekilde, aşama 1'den sonra da eklenebilir.

İkinci DNA-adaptör molekülü (veya evrensel adaptör molekülü), buluşa göre bir DNA-adaptör molekülü ise, bu, ligasyonu gerçekleştirmeden önce enzimlerin, özellikle de uç onarım enzimlerinin etkisizleştirilmesinin gerekli olmadığı avantajına sahiptir.

İkinci DNA-adaptör molekülü (veya evrensel adaptör molekülü), mevcut teknikten bilinen yaygın bir DNA-adaptör molekülü ise, uç onarım enzimlerinin etkisizleştirilmesinin ligasyondan önce gerçekleştirilmesi gerekir (aşama 4), ki bu tercihen kullanılan enzime bağlı olarak yükseltilmiş bir sıcaklıkta, tercihen 60 °C'nin üzerindeki bir sıcaklıktaki inkübasyon vasıtasıyla gerçekleştirilir. Bu durumda, ikinci DNA-adaptör molekülü etkisizleştirmeden sonra, tercihen ligasyon karışımındaki ligaz ile eklenir.

Aşama 1 ila 3, başka bir laboratuarda bağımsız olarak gerçekleştirilebildiğinden, buluş ayrıca, bir DNA kütüphanesinin üretilmesi için, buluşa göre olan DNA-adaptör moleküllerinin, parçalanmış, uç onarımı yapılmış ve 5' fosforile edilmiş çift sarmallı DNA'ya bağlanması aşamasını içeren bir yöntemi içermektedir, burada tercihen ligasyondan önce enzimlerin, özellikle uç onarım enzimlerin etkisizleştirilmesi gerçekleştirilmez.

Ligasyon, tercihen teknikte iyi bilinen şartlarda (ör., Oda

sıcaklığında 2 saat veya gece boyunca 16 °C'de) gerçekleştirilen kör uçlu bir ligasyondur. Ligasyon için kullanılan tercih edilen enzim, T4 DNA ligazdır.

Yukarıda açıklandığı üzere ligasyon aşamasını tercihen bir çentik onarım enzimi, tercihen 5'-> 3' eksonükleaz aktivitesi ve 5'-> 3' polimeraz aktivitesi ile DNA'ya bağımlı bir DNA polimerazının eklenmesi ile bir çentik onarımı (5. aşama) takip eder. Çentik onarım enzimi, örneğin Taq polimerazı gibi tercihen termostabildir. Tercihen reaksiyon karışımının, tercihen 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklara ısıtılmasıyla uç onarım enzimi aktive edilirken ligaz etkisiz hale getirilir. Aşama 4 ve aşama 5 için kullanılan enzimler, aynı anda, çentik onarım enzimi ve ligaz içeren bir karışım- "ligasyon ve çentik onarım enzimi karışımı" olarak ilave edilebilir. Aşama 4 ve aşama 5 için "ligasyon tamponu" olarak kullanılan tamponlama ajanı, TRIS-HCl gibi "uç onarım tamponundaki" ile aynı olabilir ve tercihen 7 ila 8 arasındaki bir pH'a sahiptir. "Ligasyon tamponu" tercihen ayrıca magnezyum içerir. Çentik onarımı için, deoksi nükleosit trifosfatlar da (tercihen dATP, dTTP, dGTP ve dCTP) ya "ligasyon tamponuna" eklenir ya da ayrı olarak eklenir.

DNA kütüphanesini oluşturmak için kullanılan DNA tercihen genomik DNA'dır. Genomik DNA kütüphanesinin önemli özelliklerinden biri, genomik DNA kütüphanesinin, orijinal genom (genomik DNA) üzerindeki bir dizi gen veya sekansın kopya sayısını ve genomik DNA üzerindeki bir dizi gen veya sekansın bolluk oranını büyük ölçüde muhafaza etmesidir.

Buluşun bir başka amacı, bir DNA kütüphanesini oluşturmak, tercihen yukarıda açıklanan bir DNA kütüphanesini üretme yöntemini gerçekleştirmek için olan bir kit olup, aşağıdakileri içerir:

i. buluşa göre olan DNA-adaptör molekülleri,

ii. tercihen uç onarımı için: 3'-> 5' eksonükleaz ve 5'-> 3' polimeraz aktivitesinin yanı sıra deoksinükleosit trifosfatlara (tercihen dATP, dTTP, dGTP ve dCTP) sahip DNA polimeraz,

iii. tercihen 5' fosforilasyonu için: bir polinükleotit kinaz,

iv. tercihen ligasyon için: bir ligaz,

v. tercihen yukarıda açıklanan ikinci bir DNA-adaptör molekülü (tercihen evrensel bir adaptör),

vi. tercihen çentik onarımı için: 5'-> 3' eksonükleaz aktivitesine sahip bir polimeraz, ve

vii. tercihen tampon (yukarıda tarif edildiği gibi tercihen magnezyum ve ATP içeren).

Böylece kit, buluşa göre en azından DNA-adaptör molekülleri ve en çok tercihen bir ligaz içerir. Farklı enzimler tercihen yukarıda tarif edildiği gibi seçilir.

Bileşenler ii ve iii, tercihen yukarıda tanımlandığı üzere bir "uç onarım tamponu" ile birlikte, hatta bu tamponla karıştırılmış olarak tercihen yukarıda tanımlandığı üzere "uç onarım enzim karışımı" olarak sağlanır.

Bileşenler iv ve v, tercihen yukarıda tanımlandığı üzere bir "ligasyon tamponu" ile birlikte, hatta bu tamponla karıştırılmış olarak tercihen yukarıda tanımlandığı üzere "ligasyon ve çentik onarım enzimi karışımı" uç onarım enzimi karışımı" olarak sağlanır.

Tamponlarda sağlanmadığı takdirde kit, ayrı bir bileşen olarak "dNTP karışımı" olarak deoksinükleosit trifosfatları (tercihen dATP, dTTP, dGTP ve dCTP) içerebilir.

Aynı zamanda buluşun bir bölümü, yukarıda açıklanan DNA-adaptör moleküllerinin kullanımı veya özellikle Yeni Nesil Sekanslama ve/ veya Kütüphane Çoğullama alanında kullanılmak üzere bir DNA kütüphanesi oluşturmak için yukarıda tarif edilen kitin kullanımıdır. Buluşa göre olan DNA-adaptör molekülleri, çok basit ve sağlam protokollere izin verdiği için, otomatikleştirilmiş çözümlerle kullanım için özellikle uygundur.

Buluşa göre olan DNA-adaptör modifikasyonları, barkodlu adaptörler, kütüphane hazırlığının başlangıcında DNA'ya (parçalanan DNA'ya, uç onarımı ve 5' uçların fosforilasyonu gerçekleştirilmeden önce) halihazırda manuel olarak

eklenebildiğinden ve daha sonra kütüphane hazırlığı bir pipetleme robotunda gerçekleştirilebildiğinden Kütüphane Çoğullamayı özellikle otomatikleştirilmiş protokollerde mümkün kılar ve kolaylaştırır. Bir başka avantajlı özellik ise, uç onarım enzimlerinin ısıyla etkisizleştirilmesinin gerekli olmamasıdır: Ucu onarılmış kütüphane fragmanları ayrıca, uç onarım karışımında mevcut olan enzimler tarafından daha fazla modifiye edilmez ve buluşa göre olan DNA-adaptör molekülleri de bu enzimler için substrat değildir. DNA ligazın eklenmesinden önce ligasyondan önceki bu enzimlerin etkisizleştirilmesi gerekli değildir ve ligasyon aktif uç onarım enzimleri varlığında gerçekleştirilebilir. Bu, numunelerin ısınması ve soğutulması için zaman harcanmaksızın belirgin bir biçimde kısaltılmış otomatikleştirilmiş kütüphane hazırlama protokollerine izin verir.

Buluş, bunlarla sınırlı olmaksızın aşağıdaki şekiller ve örnekler ile daha ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

Şekil 1, tekniğin mevcut durumdan bilinen, kör uçlu ligasyon için optimize edilmiş olan ancak uç onarımı sırasında veya öncesinde eklenemeyen (ve uç onarım enzimlerinin etkisizleştirilmesi olmadan) bir barkod adaptörünü göstermektedir. Sol tarafta kör uçlu ligasyon bölgesi gösterilmektedir. 3' alanında ligasyonu önlemek için birinci sarmal (SEQ ID NO 9), fosfor tiyoat modifiye nükleositleri A*C* içeren bir 3' sarkıntısına sahiptir (sarkıntının bozulmasını önlemek için). Tamamlayıcı ters sarmal (SEQ ID NO 10) daha kısadır. Her iki sarmalın da 5''i, adaptör dimerlerinin oluşumunu azaltmak için fosforile edilmemiştir (serbest 5' OH'a sahiptir). Barkod sekansının altı çizilidir.

Şekil 2, buluşa göre olan bir barkod adaptörünün bir örneğini göstermektedir. Yine sol tarafta kör uçlu ligasyon bölgesi gösterilmektedir. 3' alanındaki ligasyondan kaçınmak için

birinci sarmal (SEQ ID NO 11), M1 tarafından modifiye edilir. Birinci sarmalın 5''i, fosforilasyondan kaçınmak ve adaptör dimerlerinin ve oligomerlerin oluşumunu azaltmak için M2 tarafından modifiye edilir. Adaptör dimerlerinin ve oligomerlerin oluşumunu azaltmak için ters sarmalın 5''i (SEQ ID NO 12), M3 tarafından modifiye edilir. Barkod sekansının altı çizilidir. Ters sarmalın 3' ucu serbest bir 3'-OH' sahiptir.

Şekil 3, buluşa göre olan modifiye edilmiş bir barkod adaptörünü göstermektedir, burada birinci sarmalın (SEQ ID NO 13) 5' modifikasyonu 5'-OMeT'dir. Kör uç üretimi için ters sarmal (SEQ ID NO 14), 3' ucunda serbest bir 3'-OH grubuna sahip olan tamamlayıcı bir A'ya sahiptir.

Şekil 4, standart protokol ve modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş DNA-adaptör molekülleri ile yeni (veya modifiye edilmiş) kütüphane hazırlama protokolü kullanılarak üretilen DNA kütüphanelerinin Ct-değerlerinin karşılaştırılmasını gösterir, ki burada 1A referanstır. 1A ila 3E tanımlayıcıları, tablo 1'den birine (ilk sütun) karşılık gelir.

Şekil 5 ila 11, ya standart kütüphane hazırlığından **(B)** ya da buluşa göre olan modifiye edilmiş protokol ile kütüphane hazırlığından **(A)** sonra, buluşa göre olan modifiye edilmiş barkod adaptörleri (Şekil 6 ila 11) veya modifiye edilmemiş barkod adaptörleri (Şekil 5) kullanarak DNA kütüphanelerinin fragman boyut analizini göstermektedir. DNA kütüphaneleri, alt ve üst boyut markörü (35-10380 bp) arasındaki boyut aralığında bir Agilent Yüksek Hassasiyetli Çip kullanılarak nitelendirilir. 1A ila 3E tanımlayıcıları, tablo 1'den birine karşılık gelir. İlk tepe noktası (40 bp) bağlanmamış adaptör moleküllerine karşılık gelir. Şekil 5B ve Şekil 6 ila 11'deki ikinci tepe noktası, DNA kütüphanesine karşılık gelir. 10.000 bp üzerindeki tepe noktası, kalan kesilmemiş genomik DNA'ya karşılık gelir. Şekil 5A'da çok-tepe noktalı model, diğer

şekillerde bulunmayan adaptör oligomerlerine karşılık gelir.

Örnek 1: Farklı bir şekilde modifiye edilmiş DNA-adaptör molekülünün standart bir protokolde ve modifiye edilmiş bir kütüphane hazırlama protokolünde karşılaştırılması

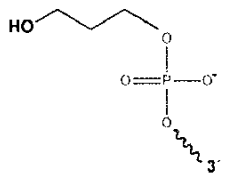
Farklı DNA-adaptör modifikasyonları kombinasyonlarını test etmek için aşağıdaki tek sarmallar sentezlenir ve farklı kombinasyonlarda uygulanır:

Tablo 1

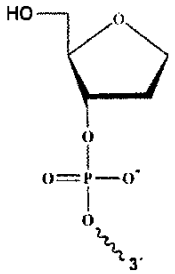
Tanımlayıcı	(5'→3')	
1	TG*GACTTCAATTTACTA*GTAGCAAAGGATACTCCGACGGGGCCGCAGCATCACGA	SEQ ID No. 1
2	**/5SpC3/**G*GACTTCAATTTACTA*GTAGCAAAGGATACTCCGACGGGGCCGCAGCATCACGA	SEQ ID No. 2
3	**/5dSp/**GTGACTTCAA*TTACTA*GTAGCAAAGGATACTCCGACGGGGCCGCAGCA*CACGA	SEQ ID No. 3
A	TCGTGATGCTGCGGGCCGCGTCGGAGTATCCTT*GCTACATAGTAAATTGAAGTCACA	SEQ ID No. 4
B	**/5SpC3/**TCGTGA*GCT*GCGGGCCGCGTCGGAGTATCCTTTGC*ACA*AGTAAAT*GAAG*TCACA/ **3AmMO/**	SEQ ID No. 5
C	**/5SpC3/**TCGTGA*GCT*GCGGGCCGCGTCGGAGTATCCTTTGC*ACA*AGTAAAT*GAAG*TCACA/**3SpC3/**	SEQ ID No. 6
D	**5'-OMeT/**TCGTGA*GCTGCGGGCCGCGTCGGAGTATCCTTTGCTACATAGTAAATTGAAG*TCACA/3 **AmMO/**	SEQ ID No. 7
E	**5'-OMeT/**TCGTGA*GCTGCGGGCCGCGTCGGAGTATCCTTTGCTACATAGTAAATTGAAG*TCACA/3 **SpC3/**	SEQ ID No. 8

"/5SpC3/" terimi, yukarıda tanımlandığı üzere bir 5'-C3-Aralayıcıyı ifade etmektedir, burada tanımlandığı üzere 5'-C3-

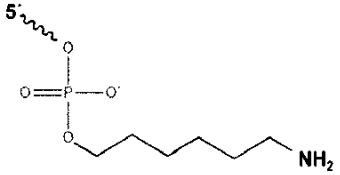
Aralayıcı, aşağıdaki formülün 1- hidroksipropil-3-fosfatidil sonlandırıcısıdır:



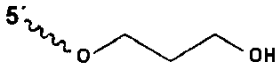
"/5dSp/" terimi, aşağıdaki formülün 5'-D-Aralayıcısı olarak 1,2-dideoksiribosil-3-fosfatı ifade eder:



Burada "/3AmM0/" terimi, aşağıdaki formülün 3'-Amino-modifiye edicisi olarak 6-aminoheksil-1-fosfatı ifade eder:

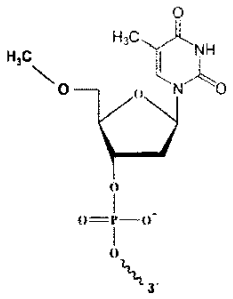


Burada "/3SpC3/" terimi, aşağıdaki formülün 3'-C3-Aralayıcısı olarak 1-oksi-3-propanolü ifade eder:



Burada "OMeT/" terimi, aşağıdaki kimyasal yapının bir 5'- ucu modifiye edicisi olarak 5'-O-metil deoksitimidin monofosfatları

ifade eder:



Modifiye edilmiş adaptör sarmallarının farklı kombinasyonları, standart bir DNA kütüphanesi hazırlama protokolünde, modifiye edilmemiş adaptör sekanslarına (1A) paralel olarak kullanılır (QIAGEN GeneRead ™ Library Prep (L) El Kitabı 03/2013). Bunun için, hazırlık başına *E.coli*'den daha önce 150 baz çifti uzunluğunda parçalanmış olan 1µg genomik DNA (gDNA), bir uç onarım reaksiyonuna uygulanır. Daha sonra enzimler ısıyla etkisiz hale getirilir ve modifiye edilmemiş evrensel adaptör X (birinci sarmal X_fwd: 5′-GTAAAAC-GACGGCCAGT-3′, SEQ ID NO: 15; ters sarmal: X_rev: 5′-ACTGGCCGTCGTTTTAC*T*T-3', SEQ ID NO: 16; * = fosfortiyoat) ile birlikte farklı şekilde modifiye edilmiş adaptör kombinasyonları, ligasyon reaksiyonunda uygulanır.

Bu örnekte, tablo 1'e göre olan aşağıdaki adaptör kombinasyonları kullanılmaktadır: 1A (modifiye edilmemiş adaptör- mevcut teknik), 2B, 2C, 2D, 2E, 3B, 3E.

Standart protokole paralel olarak aynı adaptör molekül kombinasyonları ile modifiye edilmiş bir kütüphane hazırlama protokolü uygulanmaktadır. Standart protokolün aksine barkod adaptörü, B2_lndex_1 gDNA ile birlikte uç onarım reaksiyonuna pipetlenir. Uç onarım reaksiyonunun sonlanmasından sonra ligasyona yalnızca evrensel adaptör X eklenir.

Aşağıdaki tabloda iki kütüphane hazırlık protokolü ("yeni protokol" ve "standart protokol") gösterilmektedir

Tablo 2:

	Mevcut teknikteki standart protokol (µl cinsinden hacim)	Buluşa göre olan yeni protokol (µl cinsinden hacim)
1. Uç Onarımı		
Parçalanmış DNA	18	18
H_2O	2,5	0,9
Barkod-Adaptörü B2_Index_1	0,0	1,6
dNTP'ler içeren Uç-Onarım Tamponu, 10X	2,5	2,5
Uç-Onarım enzimi	2	2
Toplam Tepkime Hacmi:	25	25
2. Adaptör Ligasyonu		
Reaksiyon karışımındaki uç onarımı yapılmış DNA	25	25
Ligasyon Tamponu, 2X	40	40
Evrensel Adaptör X	1,6	1,6
Barkod-Adaptörü B2_Index_1	1,6	0,0
Ligasyon ve Çentik Onarım karışımı	4	4
dNTP karışımı (10 mM)	1	1
H_2O	6,8	8,4
Toplam Hacim:	80	80

Uç Onarım reaksiyonunun hazırlanmasından sonra karışım, 25 °C'de 20 dakika, ardından 70 °C'de 10 dakika boyunca bir enzim etkisizleştirme aşaması ile inkübe edilir. Daha sonra, ligasyon ve çentik onarım reaksiyonu, ligasyon ve Çentik Onarım Karışımı, Ligasyon tamponu ve dNTP'lerin evrensel adaptör ile birlikte uç-onarımı yapılan DNA'ya eklenmesiyle hazırlanır. Bu karışım 10 dakika boyunca 25 °C'de inkübe edilir, bunu 72 °C'de 5 dakika inkübasyon takip eder.

Elde edilen kütüphaneler, GeneRead ™ boyut seçimi ile (QIAGEN, Hilden, DE, 100bp kesim) saflaştırılır. Saflaştırma işleminden sonra ortaya çıkan kütüphaneler, adaptör-yerleştirilmiş primerlerin yardımı ile kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile ölçülür ve numunelerin fragman boyut dağılımı kılcal jel elektroforezi kullanılarak analiz edilir. Standart protokol kullanılarak üretilen DNA kütüphanelerinin Ct değerlerinin karşılaştırılması, modifiye edilmemiş adaptör molekülü 1A ile farklı adaptör modifikasyonları arasında (adaptör 2C hariç) anlamlı bir fark göstermemektedir. Bu durum, Şekil 3'te gösterilmektedir. Bu, buluşa göre olan adaptör modifikasyonlarının adaptör molekülünün işlevselliğini etkilemediğini gösterir.

Standart protokol kullanılarak üretilen DNA kütüphanelerinin Ct değerlerinin, yeni protokol kullanılarak elde edilenlerle karşılaştırılması yeni protokolden sonra modifiye edilmiş adaptör molekülleri için olan Ct değerlerinin, standart protokolden sonra karşılaştırılabilir veya biraz daha iyi olduğunu göstermektedir. Modifiye edilmemiş adaptör molekülü, standart protokol ile kıyaslandığında yeni protokolü kullanırken önemli ölçüde daha kötü Ct-değerleri verir, ki bu, buluşa göre modifiye edilmiş olan adaptör moleküllerinin kullanımı altındaki verimin, nispeten yüksek olan uygulanan kütüphane hazırlama protokolünden bağımsız olduğunu gösterir.

Elde edilen DNA kütüphanelerinin fragman boyutu dağılımı, Agilent BioAnalyzer Yüksek Hassasiyetli DNA Çipleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen DNA kütüphanelerinin, modifiye edilmemiş (mevcut teknik) ve standart protokol için buluşa göre modifiye edilmiş DNA-adaptörleri ile olan fragman boyut dağılımları karşılaştırılabilirdir.

Standart protokol için buluşa göre olan DNA-adaptörleri karşılaştırılabilir. Fragman boyutları ortalama olarak 240 bp'dir (parçalanma işleminden kütüphane fragmanının 150 bp'si + adaptör moleküllerin 90 bp'si). Aynısı, yeni protokol ile buluşa uygun olarak modifiye edilmiş DNA-adaptör moleküllerinin

kullanılmasından kaynaklanan kütüphaneler için de geçerlidir.

Elektroterogramda, yalnızca modifiye edilmemiş adaptör moleküllerin, daha düşük parça büyüklükleri bölgesindeki yeni protokol belirgin tepe noktaları ile kullanılmasıyla ortaya çıkan kütüphaneler görülebilirdir. Bu, (Şekil 5A) modifiye edilmemiş adaptör moleküllerinin, yeni protokolde uygulandığında dimerize ve oligomerize olduğunu ve dolayısıyla yeni protokol için geçerli olmadığını gösterir.

Adaptör dimerleri ve oligomerleri, kantitatif PCR sırasında kütüphaneyi yanlışlar ve öte yandan kütüphaneyi sekanslarken okuma kapasitesini düşürürler, çünkü herhangi bir faydalı bilgi içermeksizin DNA kütüphanesi olarak amplifiye edilir ve sekanslanırlar.

SEKANS LİSTESİ

<110> QIAGEN GmbH

<120> DNA kütüphanelerinin hazırlanması için olan DNA-adaptör molekülleri ve bunların
üretilmesi için yöntem ve bunların kullanımı

<130> 00139P0010EPWO

<150> EP 13 186 776.4
<151> 2013-09-30

<160> 16

<170> PatentIn versiyon 3.5

<210> 1
<211> 57
<212> DNA
<213> yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ters sarmal

<400> 1
tgtgacttca atttactatg tagcaaagga tactccgacg cggccgcagc atcacga 57

<210> 2

<211> 58
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ters sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (1)..(1)
<223> n, 1-hidroksipropil-3-fosfatidildir

<400> 2
ntgtgacttc aatttactat gtagcaaagg atactccgac gcggccgcag catcacga

<210> 3
<211> 58
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ters sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (1)...(1)
<223> n, 1,2-dideoksiribosil-3-fosfattır

<400> 3
ntgtgacttc aatttactat gtagcaaagg atactccgac gcggccgcag catcacga 58

<210> 4
<211> 57
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ileri sarmal

<400> 4
tcgtgatgct gcggccgcgt cggagtatcc tttgctacat agtaaattga agtcaca 57

<210> 5
<211> 59
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ileri sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (1)...(1)
<223> n, 1-hidroksipropil-3-fosfatidildir

<220>
<221> modifiye_baz

<222> (59)...(59)
<223> n, 6-aminoheksil-1-fosfattır

<400> 5
ntcgtgatgc tgcggccgcg tcggagtatc ctttgctaca tagtaaattg aagtcacan 59

<210> 6
<211> 59
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ileri sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (1)...(1)
<223> n, 1-hidroksipropil-3-fosfatidildir

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (59)...(59)
<223> n, 1-oksi-3-propanoldür

<400> 6
ntcgtgatgc tgcggccgcg tcggagtatc ctttgctaca tagtaaattg aagtcacan 59

<210> 7
<211> 59
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ileri sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (1)...(1)
<223> n, 5'-O-metil deoksitimidin monofosfattır

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (59)...(59)
<223> n, 6-aminoheksil-1-fosfattır

<400> 7
ntcgtgatgc tgcggccgcg tcggagtatc ctttgctaca tagtaaattg aagtcacan 59

<210> 8
<211> 59
<212> DNA
<213> Yapay
<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ileri sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (1)...(1)
<223> n, 5'-O-metil deoksitimidin monofosfattır

<220>
<221> modifiye_baz

<222> (59)...(59)
<223> n, 1-oksi-3-propanoldür

<400> 8
ntcgtgatgc tgcggccgcg tcggagtatc ctttgctaca tagtaaattg aagtcacan 59

<210> 9
<211> 56
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ileri sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (54)...(54)
<223> n, fosfor tiyoat modifiye nükleosit A'dır

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (55)...(55)
<223> n, fosfor tiyoat modifiye nükleosit C'dir

<400> 9
cgtgatgctg cggccgcgtc ggagtatcct ttgctacata gtaaattgaa gtcnna 56

<210> 10
<211> 52
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ters sarmal

<400> 10
acttcaattt actatgtagc aaaggatact ccgacgcggc cgcagcatca cg 52

<210> 11
<211> 58
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ileri sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (1)...(1)
<223> N, eterleşmiş deoksinükleotit veya 4'-Amino-deoksinükleotit veya 5'-Amino-deoksinükleotit veya 5'-C3-Aralayıcı veya 5'-D-Aralayıcıdır

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (58)...(58)
<223> n, 3'-Amino-Modifiye edici veya 3'-C3-aralayıcıdır

<400> 11
ncgtgatgct gcggccgcgt cggagtatcc tttgctacat agtaaattga agtcacan 58

<210> 12
<211> 57
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ters sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (1)...(1)
<223> N, eterleşmiş deoksinükleotit veya 4'-Amino-deoksinükleotit veya 5'-Amino-deoksinükleotit veya 5'-C3-Aralayıcı veya 5'-D-Aralayıcıdır

<400> 12
ntgtgacttc aatttactat gtagcaaagg atactccgac gcggccgcag catcacg 57

<210> 13
<211> 58
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ileri sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (1)...(1)
<223> n, 5'-O-metil deoksitimidin monofosfattır

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (58)...(58)
<223> N, eterleşmiş deoksinükleotit veya 4'-Amino-deoksinükleotit veya 5'-Amino-deoksinükleotit veya 5'-C3-Aralayıcı veya 5'-D-Aralayıcıdır

<400> 13
ncgtgatgct gcggccgcgt cggagtatcc tttgctacat agtaaattga agtcacan 58

<210> 14
<211> 58
<212> DNA

<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ters sarmal

<220>
<221> modifiye_baz
<222> (1)...(1)
<223> N, eterleşmiş deoksinükleotit veya 4'-Amino-deoksinükleotit veya 5'-Amino-deoksinükleotit veya 5'-C3-Aralayıcı veya 5'-D-Aralayıcıdır

<400> 14
ntgtgacttc aatttactat gtagcaaagg atactccgac gcggccgcag catcacga 58

<210> 15
<211> 17
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ileri sarmal

<400> 15
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Yapay

<220>
<223> Evrensel DNA adaptör ters sarmal

<220>
<221> n
<222> (17)..(17)
<223> n, 2'-deoksisitosin-5'-O-monofosfortiyoattır

<220>
<221> n
<222> (18)...(18)
<223> n, 2'-deoksitimidin-5'-O-monofosfortiyoattır

<400> 16
actggccgtc gttttannt 19

Mevcut teknik

Şekil 1

M2 M1

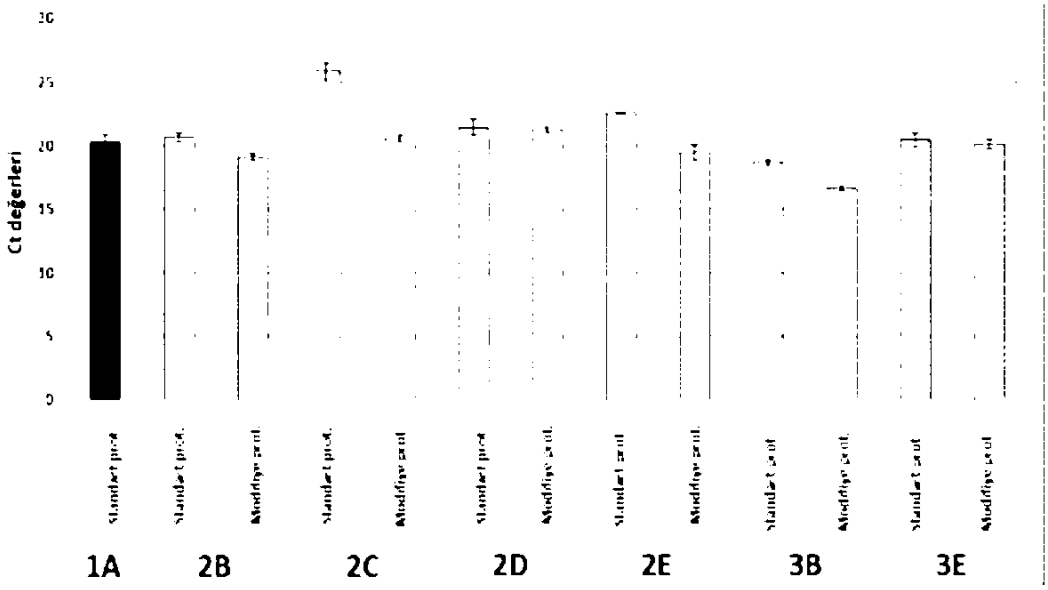
M3

Şekil 2

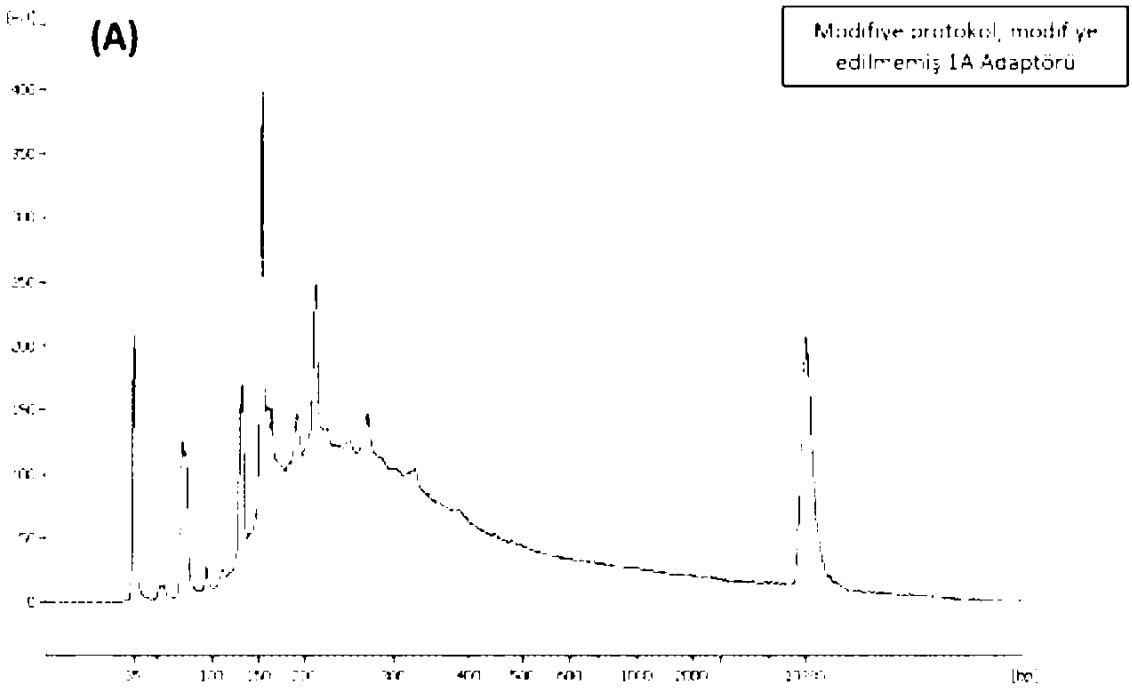
OmeT M1

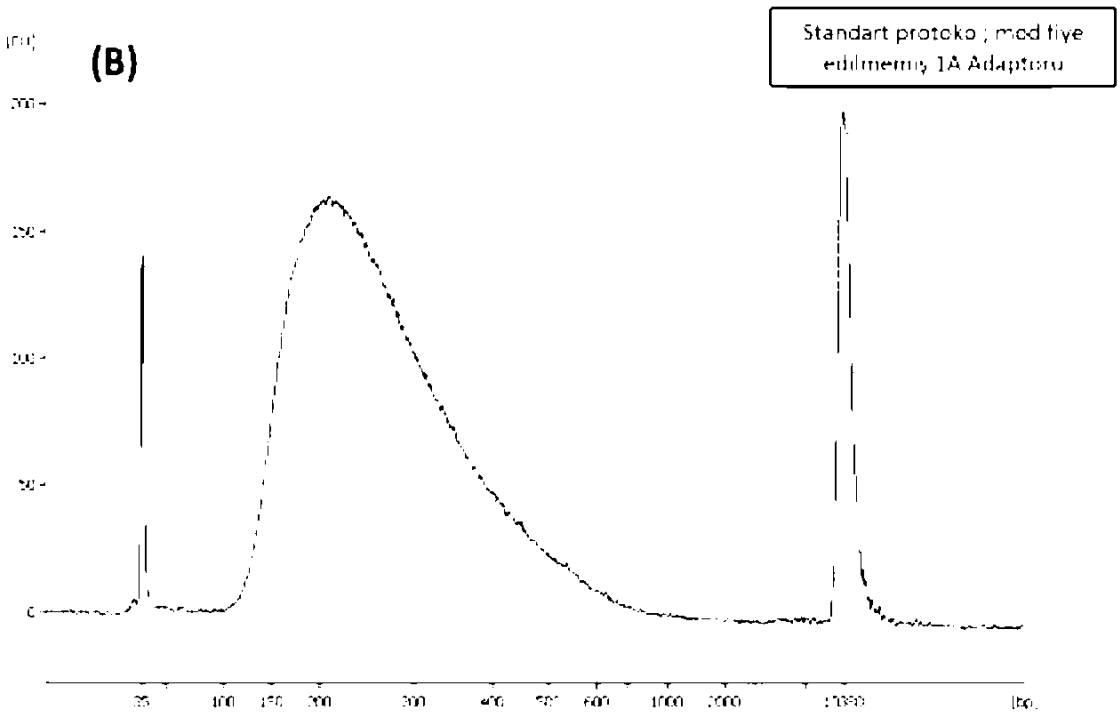
A M3

Şekil 3

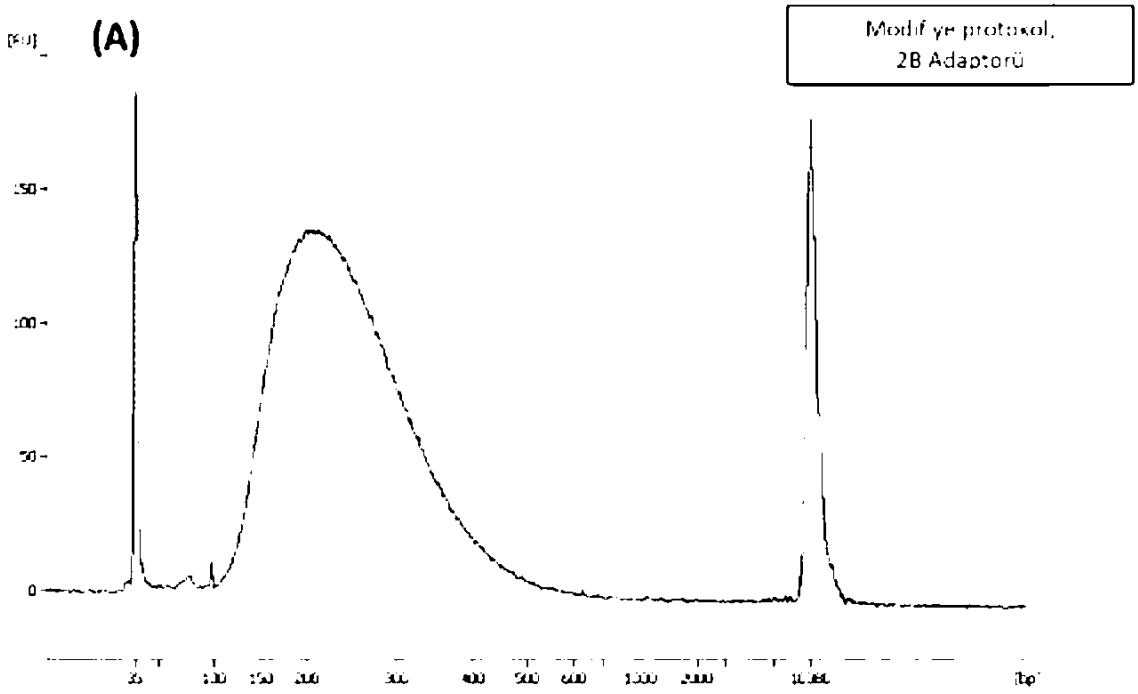


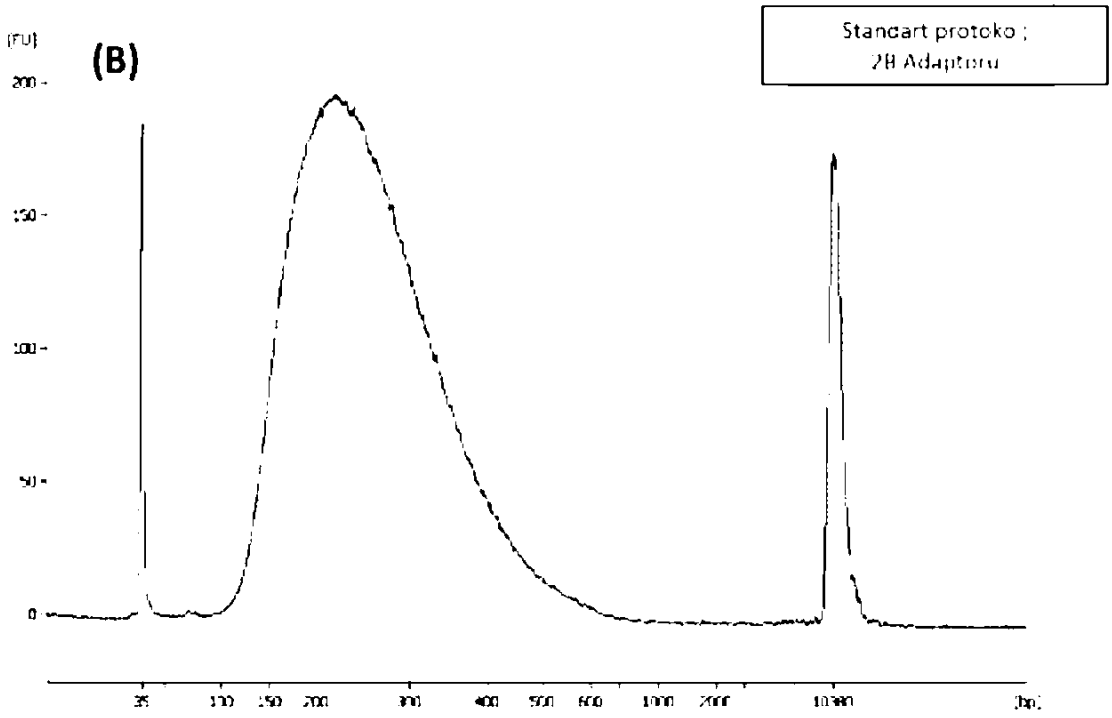
Şekil 4


(A)
Modifiye protokol, modifiye edilmemiş 1A Adaptörü

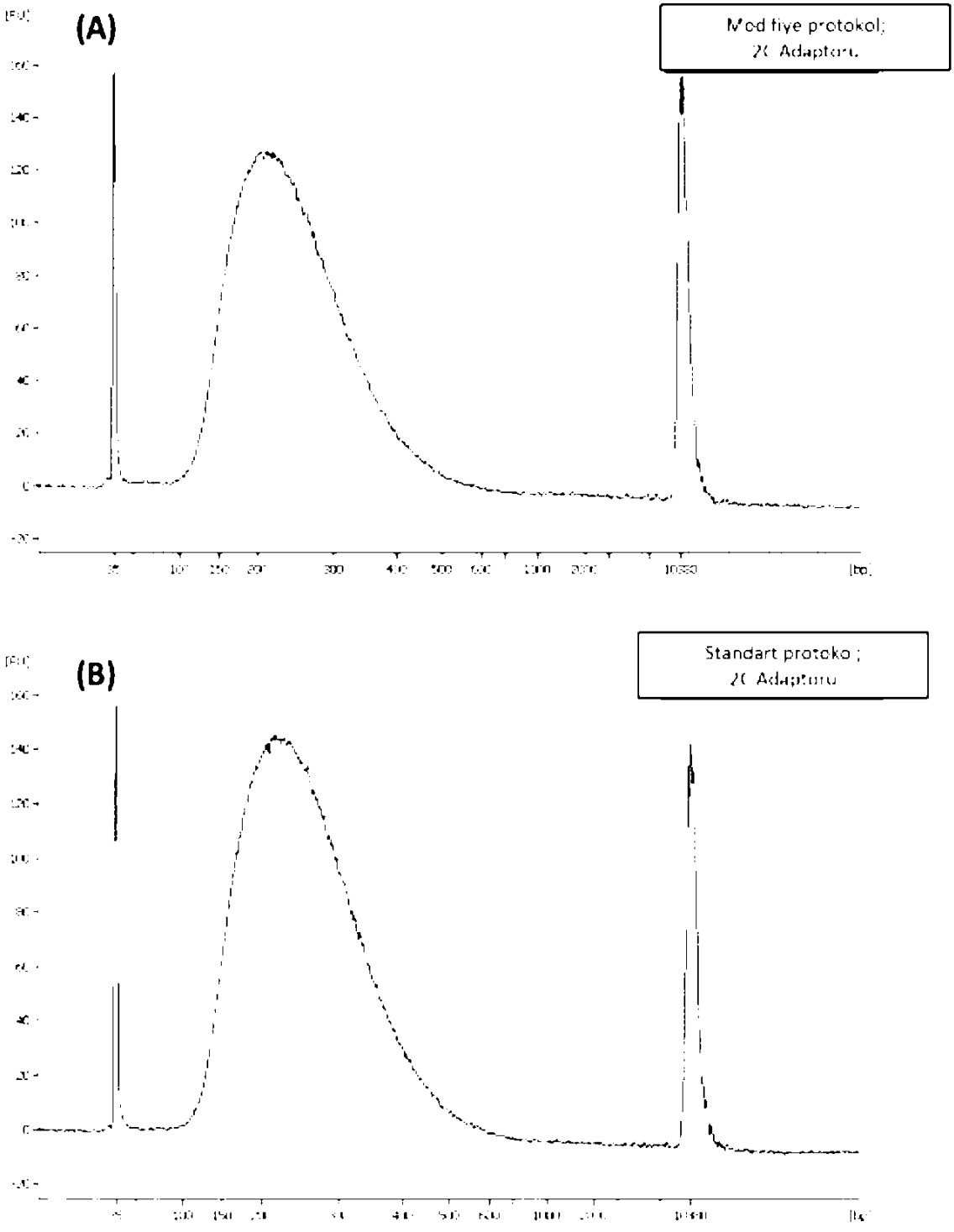

(B)
Standart protokol, modifiye edilmemiş 1A Adaptörü

Şekil 5

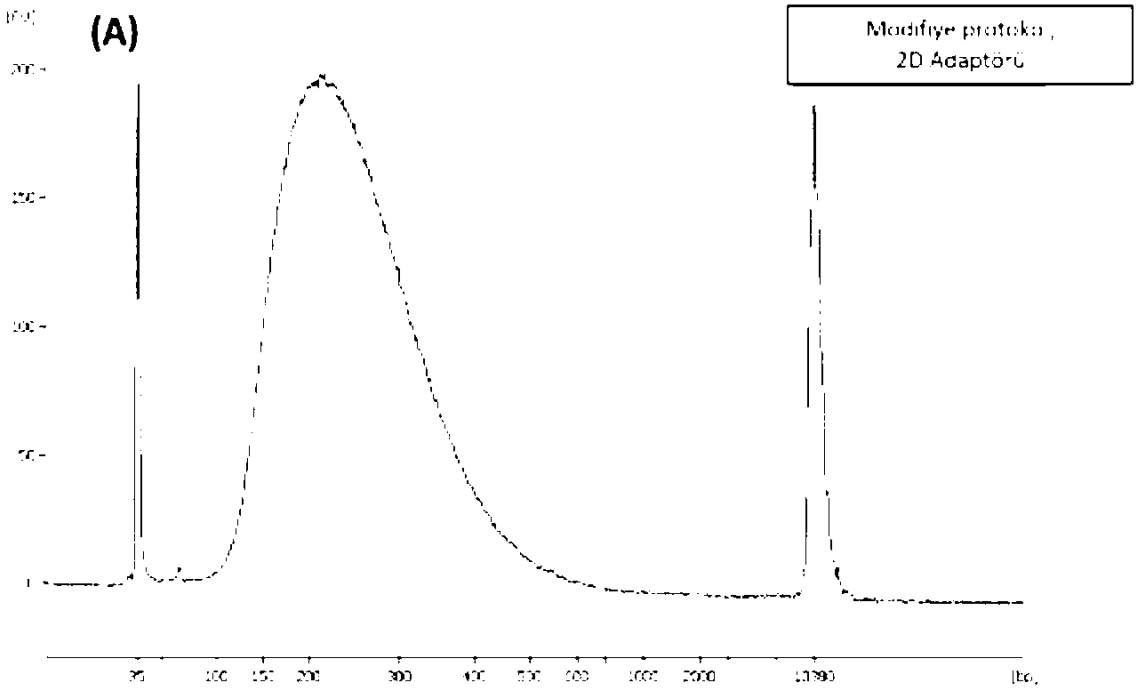

(A)
Modifiye protokol,
2B Adaptörü
[FU]
150
100
50
0
35
100
150
200
300
400
500
600
1000
2000
10380
[bp]

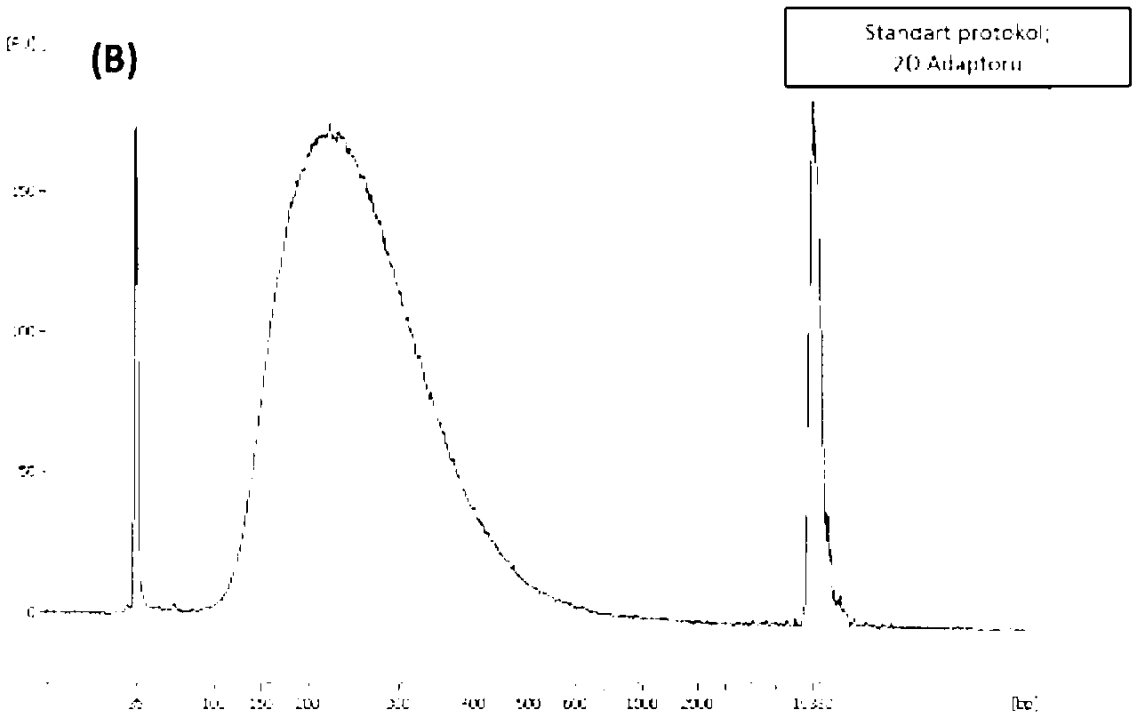

(B)
Standart protokol ;
2B Adaptörü
[FU]
200
150
100
50
0
35
100
150
200
300
400
500
600
1000
2000
10380
[bp]

Şekil 6

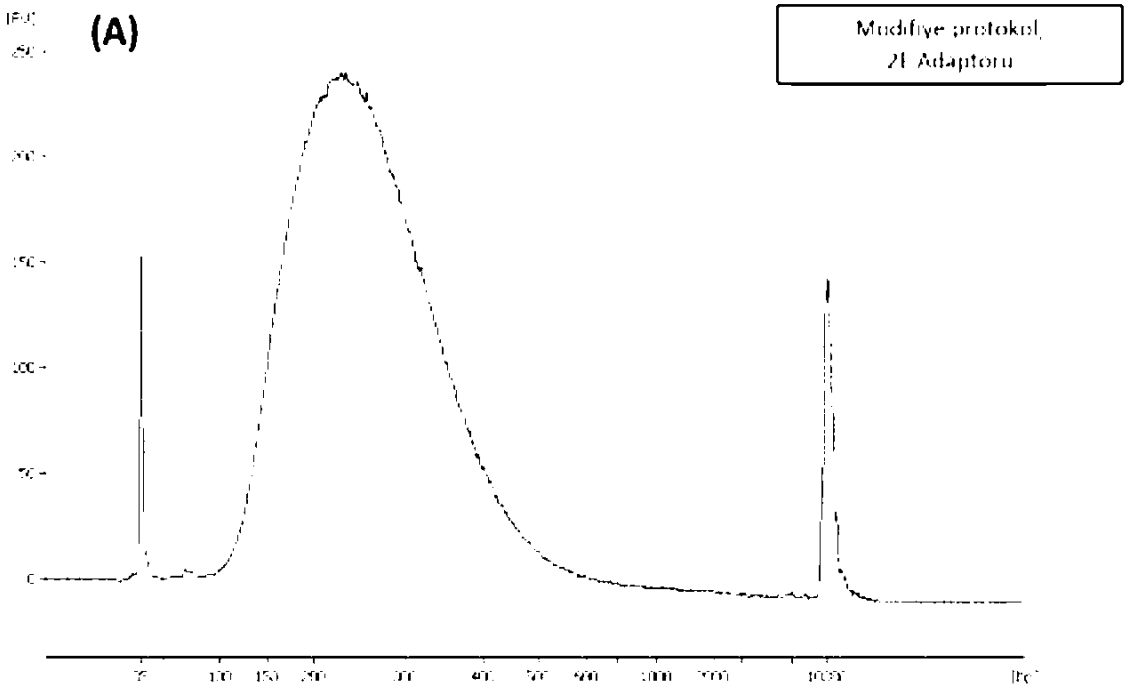

(A)
Mod fiye protokol;
2(Adaptoru
(B)
Standart protoko ;
2(Adaptoru

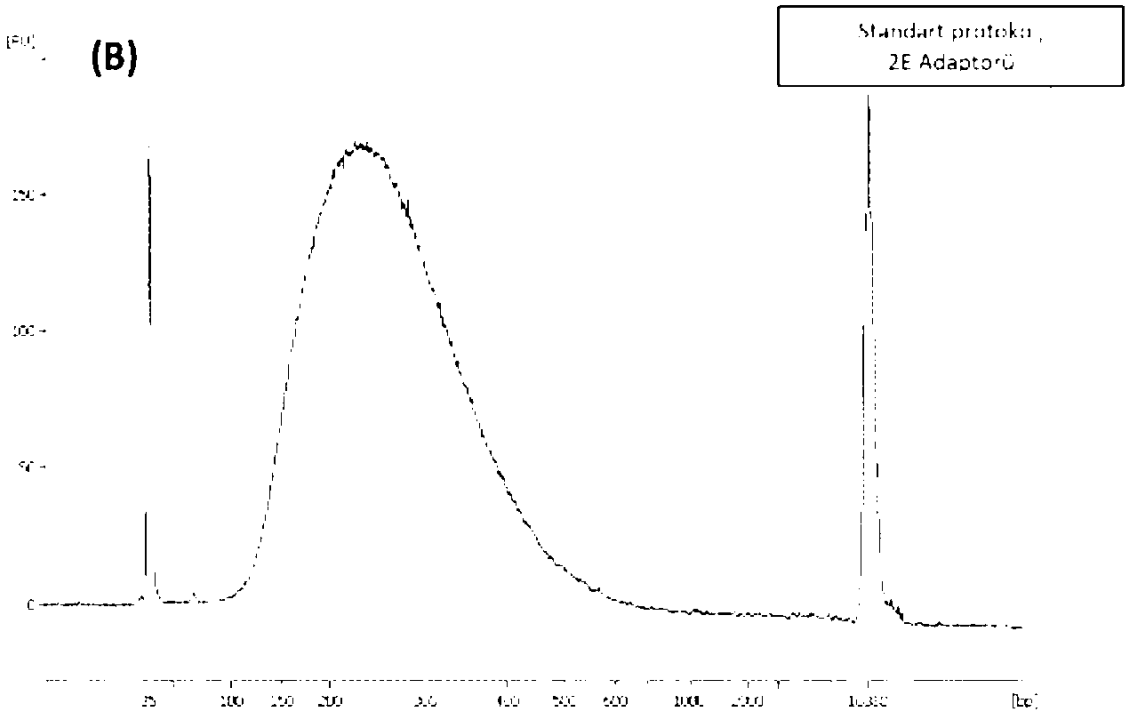
Şekil 7


(A)
Modifiye protokol ;
2D Adaptörü

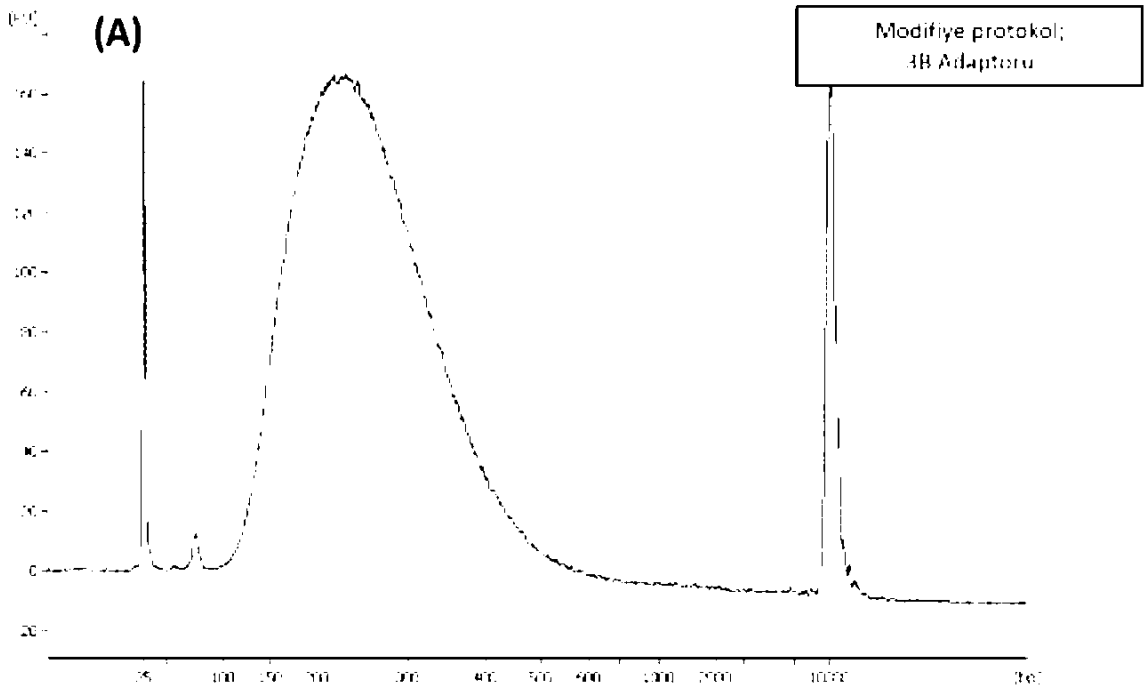

(B)
Standart protokol;
2D Adaptörü

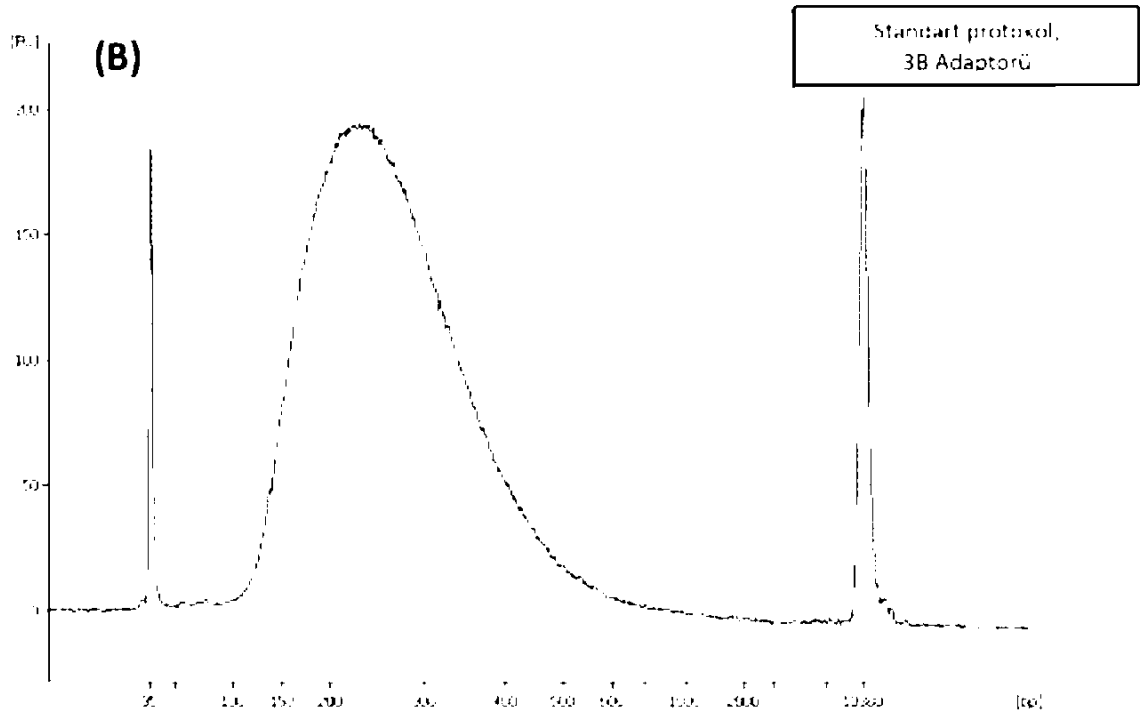
Şekil 8


(A)
Modifiye protokol,
2E Adaptörü

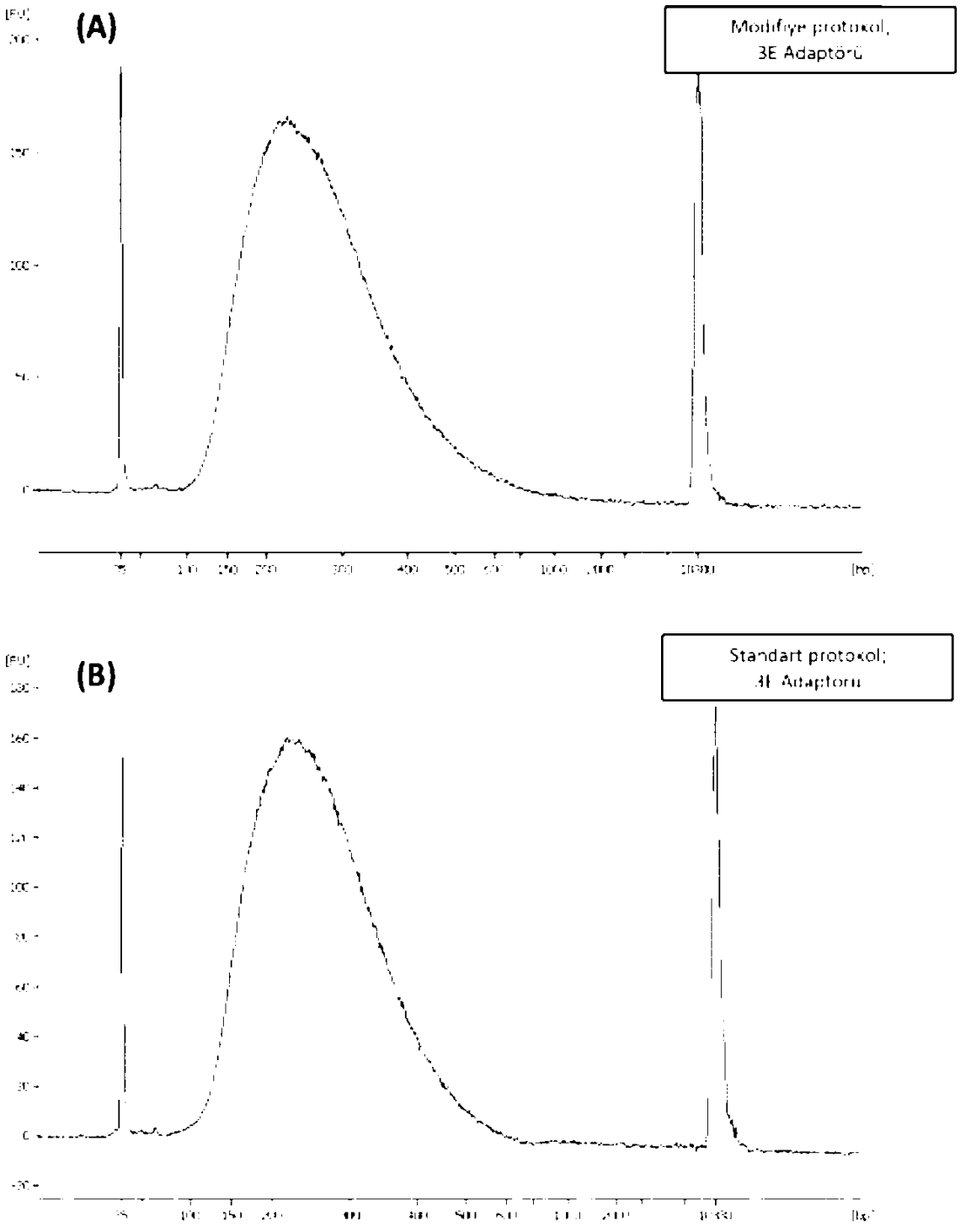

(B)
Standart protokol,
2E Adaptörü

Şekil 9


(A)
Modifiye protokol;
3B Adaptoru


(B)
Standart protokol;
3B Adaptorü

Şekil 10


(A)
Modifiye protokol,
3E Adaptörü
(B)
Standart protokol;
3E Adaptörü

Şekil 11