

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-4582**
(22) Přihlášeno: **21.06.2000**
(30) Právo přednosti: **21.06.1999 US 09/337325**
(40) Zveřejněno: **17.04.2002**
(Věstník č. 4/2002)
(47) Uděleno: **24.03.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **05.05.2010**
(Věstník č. 18/2010)
(86) PCT číslo: **PCT/US2000/016952**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/079008**

(11) Číslo dokumentu:

301 618

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 99/32663; WO 99/28494; WO 97/47640; WO 97/31256; US 5241060; US 4716106; EP 0846776.

Niemeyer C.M. et al.: „Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors.....“, Nucleic Acids Research, Vol. 22, No. 25, 5530-5539, 1994.

(73) Majitel patentu:

KRIS Richard M., Tuscon, AZ, US
FELDER Stephen, Tuscon, AZ, US

(72) Původce:

Kris Richard M., Tuscon, AZ, US
Felder Stephen, Tuscon, AZ, US

(74) Zástupce:

JUDr. Pavel Zelený, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:

Způsob detekce alespoň jednoho cíle

(57) Anotace:

Způsob detekce alespoň jednoho cíle zahrnuje: (a) uvádění vzorku, který může obsahovat uvedený(é) cíl(e) do kontaktu s kombinací, která před přidáním tohoto vzorku obsahuje (i) povrch, obsahující více prostorově oddělených oblastí, z nichž alespoň dvě jsou v podstatě identické, přičemž každá oblast zahrnuje (ii) alespoň dvě různá místa kotev, přičemž kotvy v každém místě jsou každá ve spojení s (iii) bifunkčním linkerem, který má první část, která je specifická pro kotvu, a druhou část, která zahrnuje sondu, která je specifická pro uvedený(é) cíl(e), za podmínek, při kterých se uvedený(é) cíl(e) účinně váže (vážou) na tuto kombinaci, a kde dvě nebo více kotev umístěných v alespoň jednom místě oblasti jsou ve spojení s různými bifunkčními linkery, majícími rozdílnou specifickou pro cíl.

CZ 301618 B6

Způsob detekce alespoň jednoho cíle

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu detekce alespoň jednoho cíle, který spočívá v tom, že zahrnuje uvádění vzorku, který může obsahovat uvedený(é) cíl(e) do kontaktu s dále popsanou kombinací, za podmínek, při kterých se uvedený(é) cíl(e) účinně váže (vážou) na tuto kombinaci, a kde dvě nebo více kotev umístěných v alespoň jednom místě oblasti jsou ve spojení s různými bifunkčními linkery, majícími rozdílnou specifickou pro cíl.

10

Dosavadní stav techniky

15 Vynález se týká například kompozice, přístroje a způsoby použitelné

pro současné provádění většího množství biologických nebo chemických testů, který využívá skupin zkoušek. Přitom se využívá řada oblastí, z nichž každá obsahuje skupinu generických kotevních molekul. Tyto kotvy jsou spojeny s bifunkčními linkerovými molekulami, z nichž každá obsahuje část, která je specifická pro alespoň jednu kotvu a část, která je sondou, specifickou pro předmět zájmu. Výsledná řada sond se používá k analýze přítomnosti jedné nebo více cílových molekul, které interagují specificky s uvedenými sondami. Vynález se týká polí obsahujících řadu různých oblastí, které se od sebe liší povahou interakce molekul, mezi které patří, kromě jiných, hledání farmaceutických účinných látek, molekulární biologie, biochemie, farmakologie a diagnostická technologie v medicíně.

20

Řada molekulárních sond uspořádaná na povrchu neboli „čipů“ je již používána při různých druzích biologických a chemických testů. Testy se provádějí za účelem stanovení nebo zjištění přítomnosti cílových molekul, o které je zájem a které interagují se sondami. Poté co se sondy vystaví působení cílových molekul za zvolených testovacích podmínek, detekční zařízení zjišťuje, zda cílová molekula interagovala s danou sondou.

30

Tyto systémy jsou užitečné při řadě screeningových metod pro získání informace o sondách nebo o cílových molekulách. Tak např. byly použity pro hledání peptidů potenciálních léčiv, která se váží k receptoru, o který je zájem, mezi jiným; pomocí těchto metod byly testovány vzorky např. na přítomnost genetických mutací, variant allel v populaci nebo na určitý patogen nebo na určitý kmen určitých patogenů, a pro mnohé další účely; dále ke studiu genové exprese, např. k identifikaci mRNA, jejichž exprese koreluje s některými fyziologickými stavy, vývojovými stavy nebo pokročilostí nemoci a tak pod.

40

Podstata vynálezu

45 Předmětem tohoto vynálezu je způsob detekce alespoň jednoho cíle, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje:

a) uvádění vzorku, který může obsahovat uvedený(é) cíl(e) do kontaktu s kombinací, která před přidáním tohoto vzorku obsahuje

50 i) povrch, obsahující více prostorově oddělených oblastí, z nichž alespoň dvě jsou v podstatě identické, přičemž každá oblast zahrnuje

ii) alespoň dvě různá místa kotev, přičemž kotvy v každém místě jsou každá ve spojení s

iii) bifunkčním linkerem, který má první část, která je specifická pro kotvu, a druhou část, která zahrnuje sondu, která je specifická pro uvedený(é) cíl(e),

za podmínek, při kterých se uvedený(é) cíl(e) účinně váže (vážou) na tuto kombinaci,

a kde dvě nebo více kotev umístěných v alespoň jednom místě oblasti jsou ve spojení s různými bifunkčními linkery, majícími rozdílnou specifickou pro cíl.

Výhodné provedení způsobu podle vynálezu dále zahrnuje uvádění do kontaktu uvedené kombinace a jakýchkoli vázaných cílů s alespoň jedním detekčním linkerem, který obsahuje první část specifickou pro jeden vázaný cíl (jeden z vázaných cílů) a druhou část specifickou pro hlásící činidlo. Při tomto způsobu je účelné, pokud dále zahrnuje vázání uvedené kombinace a jakýchkoli vázaných cílů s alespoň jednou detekční sondou. Přitom je účelné, pokud

první detekční sonda se váže na první cíl, vázaný na kombinaci v prvním místě,

druhá detekční sonda se váže na druhý cíl, vázaný na kombinaci ve stejném místě, a

první detekční sonda a druhá detekční sonda se detekují současně nebo postupně.

Jiné výhodné provedení způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že uvedeným(i) cílem(y) je (jsou) fragment(y) chránící detekovaný cíl před nukleázou, specifický(é) pro hledanou(é) nukleovou(é) kyselinu(y). K účelnému provedení vynálezu patří způsob, při kterém uvedeným(i) cílem(y) je (jsou) fragment(y) chránící detekovaný cíl před nukleázou, specifický(é) pro hledanou(é) nukleovou(é) kyselinu(y). Jiným účelným provedením vynálezu je způsob, při kterém uvedeným(i) cílem(y) je (jsou) fragment(y) chránící detekovaný cíl před nukleázou, specifický(é) pro hledanou(é) nukleovou(é) kyselinu(y).

Další výhodné provedení způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že každá oblast obsahuje alespoň osm různých kotev. Účelným provedením vynálezu je způsob, při kterém alespoň jeden detekční linker se zředí blokováním detekčním linkerem.

Ještě jiné výhodné provedení způsobu podle vynálezu pro detekci alespoň jednoho cíle na bázi nukleové kyseliny spočívá v tom, že zahrnuje:

a) uvádění vzorku, který může obsahovat uvedený(é) cíl(e) do kontaktu s fragmentem(y) chránícím(i) detekovaný cíl před nukleázou, specifickým(é) pro uvedený(é) cíl(e) a který(é) se váže(ou) na tento (tyto) cíl(e), vystavením vzorku účinku nukleázy schopné digestovat zbývající jednovláknové nukleové kyseliny a potom se výsledný vzorek uvede do kontaktu s kombinací, která obsahuje

i) povrch, obsahující více prostorově oddělených oblastí, z nichž alespoň dvě jsou v podstatě identické, přičemž každá oblast zahrnuje

ii) alespoň dvě různá místa kotev, přičemž kotvy v každém místě jsou každá ve spojení s

iii) bifunkčním linkerem, který má první část, která je specifická pro kotvu, a druhou část, která zahrnuje sondu, která je specifická pro jeden z fragmentů chránících detekovaný cíl před nukleázou,

za podmínek, při kterých se uvedený(é) fragment(y) chránící detekovaný cíl před nukleázou účinně váže (vážou) na tuto kombinaci, a

kde dvě nebo více kotev umístěných v prvním místě oblasti jsou ve spojení s různými bifunkčními linkery, majícími rozdílnou specifickou pro cíl, a

b) detekování tohoto (těchto) vázaného(ých) fragmentu(ů).

Účelným provedením vynálezu je způsob, který dále zahrnuje hybridizaci vázaných fragmentů se specifickými detekčními linkery a/nebo detekčními sondami, přičemž se vytváří signál odpovídající každé z uvedených nukleových kyselin. Jiným účelným provedením tohoto vynálezu je způsob, při kterém jeden cíl je přítomen ve větší hojnosti než druhý cíl v uvedeném vzorku a řady uvedených rozdílných bifunkčních linkerů v prvním a druhém místě jsou upraveny tak, že signály odpovídající prvním a druhým cílům jsou souhlasně upraveny a/nebo souhlasně upravení těchto signálů používá blokové detekční linkery. Ještě jiné účelné provedení tohoto vynálezu spočívá ve způsobu, který dále zahrnuje:

a) hybridizaci uvedené kombinace a jakékoli (jakýchkoli) vázaného(ých) fragmentu(ů) chránícího(ch) detekovaný cíl před nukleázou s alespoň jedním detekčním linkerem, který obsahuje první část, která je specifická pro jeden z vázaných fragmentů chránících detekovaný cíl před nukleázou, a druhou část, která je specifická pro hlásící činidlo,

b) uvedení do kontaktu tohoto (těchto) detekčního(ích) linkeru(ů) s hlásícím činidlem obsahujícím signální entitu, a

c) detekování uvedené signální entity.

Dalším účelným provedením tohoto vynálezu je způsob, při kterém

první detekční linker se váže na první fragment chránící detekovaný cíl před nukleázou, vázaný v prvním místě,

druhý detekční linker se váže na druhý fragment chránící detekovaný cíl před nukleázou, vázaný ve stejném místě, a

první detekční linker a druhý detekční linker se detekují současně nebo postupně.

Rovněž výhodné provedení tohoto vynálezu spočívá ve způsobu, při kterém uvedené oblasti jsou ve formě trubičky a místa na kotvách jsou uspořádána v lineárním seskupení v těchto trubičkách. Účelným provedením je způsob, při kterém uvedené oblasti jsou ve formě trubičky a místa na kotvách jsou uspořádána v lineárním seskupení v těchto trubičkách.

Ještě další výhodné provedení způsobu podle tohoto vynálezu spočívá v tom, že alespoň jedním z cílů je DNA molekula a alespoň jedním z cílů je RNA molekula. Účelným provedením je způsob, při kterém alespoň jeden z fragmentů chránících detekovaný cíl před nukleázou je specifický pro DNA molekulu a alespoň jeden z fragmentů chránících detekovaný cíl před nukleázou je specifický pro RNA molekulu. Jiným účelným provedením je způsob, při kterém cílový(é) fragment(y) je (jsou) amplifikován(y) pomocí PCR předtím než se vzorek(ky) uvede(ou) do kontaktu s kombinací. Dalším účelným provedením je způsob, který spočívá v tom, že se cíl(e) amplifikuje(i) pomocí PCR za použití dvou PCR primerů, přičemž jeden nebo oba z nich obsahují chemickou modifikaci, která dovoluje primeru přichytit se na tuhému povrchu.

Další výhodné provedení způsobu podle tohoto vynálezu spočívá v tom, že zahrnuje uvedení do styku této kombinace a jakýchkoli vázaných cílů se značenou detekční sondou a detekování této značené sondy, přičemž tato značená detekční sonda obsahuje nekonvertovaný fosfor. Účelné je provedení způsobu, který obsahuje:

uvedení do styku kombinace a jakýchkoli vázaných fragmentů s alespoň dvěma detekčními linkery, z nichž každý obsahuje část specifickou projeden z uvedených fragmentů a část specifickou

kou pro běžnou 3' přesahující sekvenci na uvedených fragmentech, která není specifická pro uvedené cíle,

5 uvedení do kontaktu těchto detekčních linkerů s hlásícím činidlem, které je specifické pro uvedenou běžnou sekvenci a který obsahuje signalizační entitu, a

detekování uvedené signalizační entity.

10 Jiné účelné provedení způsobu spočívá v kombinaci, která obsahuje 25 až 1536 oblastí.

Ještě jiné výhodné provedení způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že každá oblast obsahuje alespoň osm různých kotev. Účelným provedením je způsob, při kterém každá oblast obsahuje alespoň osm různých kotev.

15 Dále se uvádí podrobnější popis předmětného vynálezu, současně s údaji osvětlujícími tento vynález v širších souvislostech a také se popisují možnosti aplikace vynálezu.

Předložený vynález umožňuje řešit kompozice, přístroje a způsoby pro současné provádění většího počtu biologických nebo chemických testů a umožňuje rychlé provedení analýzy velkého počtu vzorků, jako například vzorků od řady pacientů, pokud se má jednat o screeningové testy, jejichž cílem je diagnóza, nebo pro testování řady potenciálních léčiv nebo terapeutických přísad a činidel, která se mají testovat při způsobu hledání léku. Je vyřešena také kombinace, která je vhodná pro detekci jednoho nebo více cílů ve vzorku. Tato kombinace zahrnuje povrch, který je tvořen řadou navzájem oddělených oblastí, které se mohou nazvat testovacími oblastmi, přičemž 25 tyto oblasti jsou např. vytvořeny jako jamky, a přičemž alespoň dvě z nich jsou v podstatě identické.

Každý povrch zahrnuje alespoň dvě, výhodně alespoň dvacet nebo více, např. alespoň asi 25, 50, 96, 864 nebo 1536 atd., v podstatě identických oblastí. Každá testovací oblast definuje prostor 30 pro zavedení vzorku obsahujícího (nebo potenciálně obsahujícího) jeden nebo více cílů a obsahuje skupinu biologických nebo chemických testů. (Věty jako je „vzorek obsahující cíl“ nebo „detekovat cíl ve vzorku“ nejsou míněny tak, že by mezi tyto činnosti nepatřily případy, kdy vzorek nebo stanovení (pokus o stanovení) nevedlo ke zjištění cílů nebo nebyl cíl detekován. V obecném smyslu, tento vynález zahrnuje matice, které slouží ke stanovení, zda cíl je obsažen ve vzorku nebo zda není obsažen ve vzorku). Takováto matice zahrnuje generické „kotvy“, z nichž 35 každá je spojena s bifunkční molekulou linkeru, která obsahuje první část specifickou pro kotvu a druhou část, která obsahuje sondu, která je specifická pro alespoň jeden cíl nebo více cílů. Kombinace podle tohoto vynálezu se uvede do kontaktu se vzorkem obsahujícím jeden nebo více cílů, které po případě reagují s molekulou (molekulami) detektoru a poté se pomocí detekčního 40 zařízení stanovuje jaké reakce mezi cílovými molekulami a sondami proběhly v testovacích oblastech, přičemž se získá alespoň jeden výsledek nebo více výsledků testu.

Vynález řeší způsoby a kompozice, které jsou zejména vhodné pro vysoce výkonné biologické testování. V provedeních, která jsou zejména výhodná, se dá vynález používat pro vysoce 45 výkonný screening pro hledání léčiv. Tak např. vysoce výkonný test se dá provést v mnoha (např. 100) 96 jamkových mikrodestičkách najednou. Každá jamka na destičce může obsahovat např. 36 různých testů provedených pomocí matice zhruba 36 kotev a linkerových párů. To znamená, 100 destiček, 96 jamek na destičku a každá jamka 36 testů, takže je možné dosáhnout celkového počtu 345 000 testů; např. každý z 9 600 různých kandidátů na léčivo se může testovat současně 50 z hlediska 36 různých parametrů testu. Vysoce výkonný testovací systém poskytuje mnohem více informací o každé látce, která je kandidátem na léčivo než při jednotlivých testech, kdy se zjišťuje pouze jediný parametr. Tak např. je možno při jednom zahajovacím vysoce výkonném screeningovém testu stanovit, zda uvedené navržené léčivo je selektivní, specifické a/nebo netoxické. Nevysocce účinné metody stanovení vyžadují extenzivní následné testování, pomocí 55 kterého se zjišťují parametry pro každou látku, která je předmětem zájmu a která je kandidátem

na léčivo v daném případě. Několik typů vysoce výkonných screeningových testů je popsáno např. v příkladech 15 17. Schopnost provést simultánně širokou řadu biologických testů a dosáhnout mnoha testů najednou (tj. při velmi vysokém počtu testů a velké rychlosti) představuje dvě důležité výhody vynálezu.

5

V jednom provedení se např. pomocí 96 jamkových DNA nosných destiček (Corning Costar) vyrobených z polystyrenu s povrchem chemicky upraveným pro navazování primárních aminů, jako jsou např. aminokyseliny nebo modifikované oligonukleotidy, je soubor 36 různých oligonukleotidů nanesen na povrch každé jamky každé desky, která má sloužit jako kotva. Tyto kotvy se pak mohou kovalentně napojit na chemicky upravený polystyren, přičemž stejných 36 kotev se dá použít pro veškeré screeningové testy. Pro jeden konkrétní test je dán soubor linkerů, který se dá použít k naprogramování povrchu každé jamky, aby byl specifický pro až 36 různých cílů nebo typů, které jsou předmětem zájmu testu. Při tom se dá na každou z 96 jamek na každé destičce působit jiným vzorkem. Stejný soubor kotev se dá použít vícekrát a dá se přeprogramovat povrch každé jamky pro jiné cíle a jiné testy, které jsou předmětem zájmu nebo se dá použít několikrát se stejným souborem linkerů. Tato flexibilita a opakovatelná použitelnost představuje další výhody tohoto vynálezu.

Jedno provedení vynálezu představuje kombinace použitelná pro detekci jednoho nebo více cílů ve vzorku, přičemž toto provedení zahrnuje, před přidáním uvedeného vzorku,

20

a) povrch, obsahující řadu vzájemně oddělených oblastí, přičemž alespoň dvě z těchto oblastí jsou v podstatě identické, přičemž každá oblast obsahuje

25

b) alespoň osm odlišných oligonukleotidových kotev, z nichž každá je spojena s

c) bifunkčním linkerem, který má první část specifickou pro uvedenou oligonukleotidovou kotvu a druhou část, která zahrnuje sondu, která je specifická pro uvedený cíl nebo pro uvedené cíle.

30

Jiným provedením podle vynálezu je kombinace použitelná pro detekci jednoho nebo více cílů ve vzorku, která zahrnuje, před přidáním uvedeného vzorku,

a) povrch, obsahující řadu navzájem oddělených oblastí, z nichž alespoň dvě jsou v podstatě identické, přičemž každá oblast obsahuje

35

b) alespoň osm různých kotev, z nichž každá je spojena s

c) bifunkčním linkerem, který má první část specifickou pro kotvu a druhou část, která obsahuje sondu, která je specifická pro uvedený cíl nebo cíle.

40

Podle dalšího provedení vynález řeší způsob detekce alespoň jednoho cíle, při kterém se uvádí do kontaktu vzorek, který obsahuje cíl nebo cíle s kombinací, která je popsána shora, za podmínek efektivních pro navázání uvedeného cíle nebo cílů na uvedenou kombinaci. Podle jiného provedení se řeší způsob stanovení exprimovaného vzorce RNA, při kterém se inkubuje vzorek, který obsahuje jako cíl nebo jako cíle alespoň dvě molekuly RNA s kombinací popsanou shora, přičemž alespoň jednou sondou v této kombinaci je nukleová kyselina (např. oligonukleotid), který je specifický (tj. selektivní) pro alespoň jeden nebo více RNA cílů, za podmínek, které jsou efektivní pro specifickou hybridizaci RNA cíle (cílů) se sondou (sondami). Další provedením je způsob pro identifikaci činidel (nebo podmínky (podmínek)), které modulují exprimovaný vzorec RNA, přičemž tento způsob je stejný jako způsob popsaný shora pro stanovení exprimovaného vzorce RNA, a dále zahrnuje srovnávání exprimovaného vzorce RNA, který je produkován za přítomnosti uvedeného činidla (nebo za podmínky nebo za podmínek) s exprimovaným vzorcem RNA produkovaným při jiných podmínkách.

55

Pomocí příkladu, obr. 1 a 2, jsou ilustrovány kombinace podle vynálezu a způsoby jejich použití k detekci mRNA cíle. Povrch vytvořený podle vynálezu, znázorněný na obr. 2, obsahuje 15 identických testovacích oblastí; při výhodném provedení podle vynálezu je každá z těchto testovacích oblastí vytvořena v jedné jamce mikrotitrové destičky. Každá z testovacích oblastí obsahuje šest různých kotev, zde označených jako čísla 1 až 6. Obrázek 1 schematicky znázorňuje jednu z takovýchto kotev, kotvu 1, která je ve většině provedení podle vynálezu tvořena oligonukleotidem. Ke kotvě 1 je navázána molekula linkeru, v tomto případě linker 1, který zahrnuje dvě části. První část, která je specifická pro kotvu, je na tomto obrázku oligonukleotid, který se může hybridizovat specificky vůči kotvě. Druhou částí, kterou je sonda specifická pro cíl zájmu – zde, cílová mRNA 1 – je na tomto obrázku znázorněna jako oligonukleotid, který je hybridizovatelný s tímto cílem. Na tomto obrázku není znázorněno, že každá ze zbývajících pěti kotev se může hybridizovat se svým vlastním linkerem přes část specifickou pro kotvu; každý linker může obsahovat část, která je tvořena sondou, specifickou pro např. mRNA odlišnou od (nebo stejnou jako) mRNA 1. Tato znázorněná kombinace se dá použít k testování až 15 různých vzorků současně na přítomnost mRNA 1 (nebo simultánně, pro mRNA cíle, které jsou specifické (programované) dalšími pěti sondami testu). Při provádění testu se každý vzorek, který je v tomto případě vzorek RNA extraktu z, řekněme, jedné z 15 nezávislých buněčných linií, přidá v malém množství k jedné z oblastí nebo do jedné z jamek, a inkubuje se za podmínek, které jsou efektivní pro hybridizaci sondy a cíle. Za účelem stanovení, zda mRNA 1 je ve vzorku přítomna, se pomocí zařízení rozpozná, zda došlo nebo nedošlo k interakci specifické pro dané místo v každé oblasti tak, že se zjišťuje, zda je přítomen nebo není přítomen určitý signál. Pokud se buněčné linie inkubují za podmínek, ve kterých jejich mRNA jsou značeny *in vivo* pomocí určité značky a jestliže je ve vzorku přítomna mRNA 1, detektor zjistí signál vycházející ze značené mRNA na místě definovaném souborem kotva/ komplex sond 1. Alternativně může být mRNA přímo značena *in vitro*, což se děje před nebo po jejím přidáním k oblastem (k jamkám). Alternativně, jak je znázorněno na obr. 1, může být mRNA značena nepřímo před nebo po hybridizaci sondou, tj. inkubací RNA se značeným „detektorem“, což je oligonukleotid (cílově specifický oligonukleotid), který je komplementární k sekvenci jiné, než která má být rozpoznávána danou sondou. Ve znázorněném případě, je možné analyzovat současně až 15 vzorků. Vzhledem k tomu, že současně lze podle vynálezu analyzovat minimálně 20 nebo více např. až 1536 nebo více vzorků, jedná se o velice výkonný systém.

Termín „cíl“, jak je zde používán, znamená látku, jejichž přítomnost, aktivita a/nebo množství je potřeba zjistit, a která má afinitu pro danou sondu. Cíle se mohou vyrábět uměle nebo to mohou být látky vyskytující se v přírodě. Také lze je použít jejich nezměněný stav nebo lze tyto cíle sledovat ve formě agregátu s jinými druhy. Cíle se dají navazovat, kovalentně nebo nekovalentně, na vazné členy, což lze činit přímo nebo přes specifické vazací látky. Příklady cílů, které se mohou používat při tomto vynálezu, jsou mimo jiné, receptory (na vehikula, tuky, buněčné membrány nebo různé jiné receptory); ligandy, agonisté nebo antagonisté, které jsou vázány na specifické receptory; polyklonální protilátky, monoklonální protilátky a antiséra reagující se specifickými antigenovými determinanty (jako jsou specifická na víry, buňky nebo jiné materiály); léčiva; nukleové kyseliny nebo polynukleotidy (včetně mRNA, tRNA, rRNA, oligonukleotidů, DNA, virové RNA nebo DNA, ESTŮ, cDNA, PCR–zesílených produktů odvozených od RNA nebo DNA a mutací, variant nebo modifikací uvedených látek); proteiny (včetně enzymů jako jsou enzymy způsobující štěpení neurotransmitérů, proteázy, kinázy apod.); nosiče enzymů; peptidy; kofaktory; lektiny; cukry; polysacharidy; buňky; buněčné membrány; orgány; atd. A stejně tak může jít o molekuly nebo jiné látky, které mohou existovat komplexní, kovalentně vázané zesilované nebo další jiné formě. Zde se používají termíny nukleová kyselina, polynukleotid, polynukleová kyselina a oligonukleotid, což jsou termíny vzájemně zaměnitelné. Cíle se také dají označovat jako anti–sondy.

Výraz „sonda“, který je zde používán, je látka, např. molekula, která může být specificky rozpoznána určitým cílem. Typy potencionálních dvojic sonda/cíl nebo cíl/sonda s navázanými dalšími částmi zahrnují také dvojice receptor/ligand; ligand/antiligand; interakce nukleových kyselin (polynukleotidů) mezi které patří DNA/DNA, DNA/RNA, PNA (peptidová nukleová kyselina)/-

nukleová kyselina; enzymy nebo jiné katalyzátory nebo jiné látky, se substráty, malými molekulami nebo efektorovými molekulami; atd. Příklady sond, které jsou např. uvažovány pro použití podle tohoto vynálezu, mimo jiné, jsou organické nebo anorganické materiály nebo polymery, včetně kovů, chelatačních činidel nebo jiných sloučenin, které interagují specificky s kovy, 5 plasty, agonisty a antagonisty pro buněčné membrány a jejich receptory, toxiny a venomy, virální epitopy, hormony (např. opioidní peptidy, steroidy, atd.), receptory hormonů, lipidy (včetně fosfolipidů), peptidy, enzymy (jako jsou proteázy nebo kinázy), nosiče enzymů, kofaktory, léčiva, lektiny, cukry, nukleové kyseliny (včetně oligonukleotidů, DNA, RNA, PNA nebo modifikované nebo substituované nukleové kyseliny), oligosacharidy, proteiny, enzymy, polyklonální a 10 monoklonální látky, protilátky s jedním řetězcem nebo fragmenty uvedených látek. Polymerní sondy mohou být lineární nebo cyklické. Sondy mohou rozlišovat mezi fosforylovanými a nefosforylovanými proteiny, buď zdánlivou, nebo skutečně odlišnou aktivitou nebo odlišným způsobem bandy. Sondy jako jsou lektiny mohou rozlišovat mezi glykosylovanými proteiny. Výrazy nukleová kyselina, polynukleotid, polynukleová kyselina a oligonukleotid jsou zde, jak 15 jsou používány, zaměnitelné. Jakákoliv látka pospaná shora jako „sonda“ může sloužit také jako „cíl“ a naopak.

Podle vynálezu lze použít jakékoliv kompatibilní povrchy. Povrch (obvykle pevný) může být jakoukoliv varietou organických nebo anorganických materiálů nebo jejich kombinacemi, včetně 20 např. formou příkladu, plastů jako jsou polypropylen nebo polystyren; keramiky; křemíku; (napojeného) oxidu křemičitého, křemene nebo skla, přičemž tyto povrchy mohou mít tloušťku např. mikroskopické skleněné folie nebo skleněného povlaku; papír jako např. filtrační papír; diazotovaná celulóza; nitrocelulózové filtry; silonové membrány; gelové vrstvy polyakrylamidového či jiného typu, například lehčené bublinkové fólie nebo lehčené perličky, vyrobené z aerogelu, který 25 je například ve formě vysoce porézní pevné látky, včetně filmů, které se připravují sušením vlhkého gelu jakýmkoliv známým způsobem. Substráty, které jsou průhledné, jsou vhodné pro provádění testů, jejichž součástí je optická detekce. Ve výhodném provedení jsou plastové povrchy vícejamkové, např. se může jednat o tkáňové kultury tvořící kotouče, např. může jít o 24-, 96-, 256-, 384-, 864-, nebo 1536- jamkové desky (např. může jít o upravené desky jako je 30 Corning Costar DNA deska). Kotvy mohou být připojeny, např. vazbou, přímo na povrch nebo mohou být spojeny s jedním typem povrchu např. se sklem nebo mohou být umístěny do kontaktu s druhým povrchem např. uvnitř plastové „jamky“ na mikrotitrovou plošku. Tvar povrchu není kritický. Podle vynálezu se dá celý povrch vytvořit jako Čtverec, obdélník nebo kruh nebo může být trojrozměrný, například může jít o částice lože, precipitáty, sraženiny, trubky, 35 kuličky a pod.

Tak např. při výhodném provedení mohou být oblastmi jamky nebo jejich soubory umístěné na kotoučích, např. 24-, 96-, 256-, 384-, 864- nebo 1536- jamkové desky. Alternativně může jít o skleněné povrchy, které mohou být děleny takže mají např. 864 nebo 1536 oddělených jamek. 40 Alternativně mohou tyto povrchy obsahovat oblasti, které nejsou nijak od sebe odděleny, nebo může jít o jamky. V takovém případě také může být povrch hladký, např. může jít o plastový kousek, sklo nebo papír a jednotlivé oblasti se mohou dále oddělit od sebe materiálem, který se nanese na tento povrch (např. plastový nebo skleněný materiál). Tento nanesený materiál potom odděluje od sebe jednotlivé oblasti. Povrch může také již být předem opatřen mřížkou nebo 45 kotvami, nebo mohou být kotvy již napojeny na linkery před tím, než se jednotlivé oblasti od sebe oddělí. V jiném provedení mohou být mřížky kotev uvnitř každého regionu vytvořeny vzájemným oddělením prázdnými prostory na povrchu, přičemž v těchto oddělovacích prostorech nejsou žádné kotvy nebo může jít o oddělení chemickými bariérami jako je vosk nebo silikonové plasty, čímž se zabrání rozšiřování nanášených kapek. Podle dalšího provedení jsou oblasti 50 definované jako trubičky nebo kanálky, kterými může protékat regulovaně tekutina, např. mohou být vytvořeny takto oblasti pro test prováděný při průtoku tekutiny, jak je popsáno např. v publikaci Beattie et al (1995). Clin. Chem. 4, 700-706. Trubičky mohou mít libovolnou velikost, například mohou mít průměr jako kapiláry nebo větší, mohou umožňovat průtok kapalin nebo mohou být parciálně nebo úplně ucpány gelem, například agarózovým nebo polyakrylamidovým, 55 kterým mohou být sloučeniny transportovány (mohou procházet, protékat nebo se mohou skrz

něj čerpat) například elektroforeticky. Ve výhodném provedení je trubice naplněna gelem a tento gel je aktivován, takže je schopen navazovat kotvy. Různé kotvy se nechají procházet gelem postupně, což umožňuje vytvoření lineárního uspořádání (matice) kotev uvnitř gelu. Linkery, cíle atd. se nechávají procházet gelem postupně. Oblasti uvnitř povrchu, nebo na povrchu a pod. se také mohou od sebe oddělit modifikací povrchu jako takového. Tak např. plastový povrch může obsahovat části vytvořené z modifikovaného nebo chemicky upraveného plastu, který může sloužit např. jako místa pro adici specifických typů polymerů (např. PEG se může připojit na polystyrénový povrch a pak chemicky upravit karboxylovými nebo aminovými skupinami, dvojnými vazbami, aldehydy a pod.). Alternativně může plastový materiál zahrnovat roztavené struktury jako např. vystupující výčnělky, které mohou sloužit jako základny pro navázání kotev. V jiném provedení mohou být oblasti tvořeny gelovými vrstvami, například polyakrylamidovými gelovými fóliemi nebo lehčenými fóliemi, které jsou na povrchu, například skleněném, uspořádány do požadované matice, nebo jsou vrstveny mezi dvěma povrchy, například mezi skleněnou a křemennou destičkou. Kotvy, linkery a podobně mohou být imobilizovány na povrchu těchto podložek nebo mohou být navázány uvnitř. Rada takovýchto uspořádání je odborníkům v oboru zřejmá a mnoho se jich dá získat rutinním způsobem, známými metodami. Relativní orientace testovacích regionů může mít řadu forem včetně, kromě jiných, paralelních nebo kolmých mřížek uvnitř čtverce nebo obdélníku nebo jiného tvaru, může jít o přímo prodloužené mřížky uvnitř kruhového nebo jiného povrchu nebo o lineární mřížky a tak pod.

Prostorově oddělené oblasti podle vynálezu jsou přítomny ve více kopiích. To znamená, že jsou přítomny alespoň dvě, výhodně alespoň dvacet nebo alespoň 24, 50, 96, 256, 384, 864, 1536, 2025 nebo více a pod. v podstatě identických, prostorově oddělených (separovaných) oblastí. Vyšší počet opakování oblastí může umožnit přes vyšší průchodnost rychlost provádění testu. V podstatě identické oblasti, jak jsou zde používány, znamenají oblasti, které obsahují identické nebo v podstatě identické mřížky kotev a/nebo komplexy kotva/linker. Termín v podstatě identické, jak je zde používán, znamená, že mřížka oblasti je vytvořena tak, že slouží v podstatě pro stejnou funkci jako jiná mřížka nebo oblasti v kontextu analýzy cílových látek ve smyslu vynálezu. Odlišnosti, které v podstatě neovlivní funkci, to je schopnost detekovat cíle, jsou např. drobné nedokonalosti u malých nukleotidů (vynechání/přidání/substituce) nebo oligo- nepřesnosti (slabší schopnost povrchu vázat linkery) a tak pod., které v rámci přesnosti testu výrazně neovlivňují výsledky, kterými je stanovení cílové látky nebo funkce.

Pochopitelně odborník v oboru pozná, že všechny oblasti na povrchu nemusí být v podstatě identické. Např. pokud jsou testovány dva různé soubory matic současně, může být výhodné zahrnout oba soubory matic na jediný povrch. Tak např. dva různé soubory matic mohou být uspořádány v podobě střídajících se pruhů, čímž se docílí srovnání mezi nimi. V jiném provedení může v praxi nastat požadavek zahrnout do testu jednu nebo dvě nebo více oblastí, které mohou být detekovány odlišným způsobem z jiné oblasti na povrchu a tím mohou být použity jako „registrační region (regiony)“. Tak např. registrační region může obsahovat oligonukleotidy nebo peptidy, které vykazují odlišný způsob fluorescence molekul, který může být rozpoznán skenovacím detekčním zařízením jako „výchozí bod“ pro nastavení daných míst oblastí na povrchu.

Velikost a fyzikální oddělování testovacích oblastí nejsou nijak limitovány. Typickými oblastmi jsou plochy asi 1 až asi 700 mm², výhodně 1 až 40 mm² a jsou od sebe odděleny mezerami o síle 0,5 až 5 mm. Jejich tvar se volí podle možností dané plochy. Ve výhodném provedení je vzdálenost oblastí asi 5 mm. Tak např. každá oblast může obsahovat obdélníkový rošt, s např. 8 řadami a 6 sloupci zhruba kruhových míst s kotvami, přičemž tato místa mají průměr asi 100 mikrometrů a jsou od sebe vzdálená asi 500 mikrometrů; takovéto oblasti mohou pokrývat asi 20 mm povrchu plochy. Větší a menší oblasti a plochy a větší nebo menší vzdálenosti od sebe jsou ovšem pochopitelně také možné a jsou součástí vynálezu.

Oblasti se mohou dále dělit tak, že veškeré kotvy uvnitř oblasti nebo některé kotvy uvnitř oblasti jsou fyzicky od sebe odděleny způsobem jako je např. zářez nebo důlek. Tak např. počet podoblastí v oblasti může být 10 až asi 100 nebo více nebo méně. Podle jednoho provedení oblast,

5 která je jamka s 1536 jamkovým kruhem se dá jemněji rozdělit na menší jamky, např. asi 4 až asi 900, výhodně asi 16 až 36 jamek, čímž se vytvoří matice jamek uvnitř jamky. Viz obrázek 4. Takovýto vroubkovaný povrch má nižší toleranci, která je vyžadovaná pro fyzické umístění jedné kotvy (nebo skupiny kotev) na určité přesné místo (lokalitu) a velikost plochy obsahující kotvy je

Termín „kotva“, jak je zde používán, znamená jakoukoliv entitu nebo látku, např. molekulu (nebo „skupinu“ v podstatě identických takovýchto látek (viz např. obrázek 7)), která je spojena s (např. imobilizována navázána kovalentně nebo nekovalentně) s povrchem nebo která je součástí
10 takového povrchu (např. části chemicky změněné, nalézající se na plastovém povrchu) a která může podstoupit specifickou interakci nebo asociaci s linkerem nebo jinou látkou, jak je zde popsáno. Termín kotva/komplex linkerů, jak je zde používán, připadá v úvahu tehdy, když kotva a linker se kombinují prostřednictvím molekulární asociace specifickým způsobem. Interakce s linkerem může být buď ireversibilní, jako je taková, která probíhá přes určité kovalentní vazby,
15 nebo reversibilní, jako je hybridizace nukleové kyseliny. Ve výhodném provedení je kotvou nukleová kyselina, která může být jakkoli dlouhá (např. může jít o oleonukleotid) nebo může být libovolného typu (např. DNA, RNA, PNA nebo PCR produkt RNA nebo DNA molekuly). Nukleová kyselina se dá modifikovat nebo chemicky upravit (např. pokud obsahuje přírodně se vyskytující nukleotidy jako je např. inosin; připojené různými známými vlastními zbytky jako je
20 sulfamát, sulfamid, fosforothionát, metylfosfonát, karbamát atd. nebo semisyntetické molekuly, jako je např. konjugát DNA–streptavidin atd.). Výhodné jsou nukleové kyseliny s jedním řetězcem. Kotvou může také být peptid nebo protein. Tak např. může jít o polyklonální nebo monoklonální protilátku molekulu nebo fragment této molekuly nebo této protilátky nebo o proti-
25 látku s jedním řetězcem nebo její fragment, která se váže specificky k části linkeru, kterým je antigen nebo molekula protilátky; v jiné obměně může být kotvou peptid a část linkeru, která se váže k tomuto peptidu může být tvořena protilátkou nebo podobně. V dalším provedení může být kotvou lektin (jako je konkanavalin, a nebo aglutininy z organismu jako je Limulus, podzemnice olejná, fazol zlatý, fazol, obilné klíčky atd.), které jsou specifické zejména pro cukry. V dalším provedení může být kotvou organická molekula, jako je molekula modifikovaná nebo chemicky
30 změněný plastový polymer, který může sloužit např. jako stadium specifické chemické syntézy oligonukleotidu v pevné fázi. V tomto případě se chemicky změněný plast distribuuje jako mřížka na diskrétních chemicky změněných místech, která jsou vytvořena integrálně do plastového povrchu kombinace při procesu výroby. V jiném provedení může kotva mít výhodu specifické preferenční vazby mezi kovovými ionty, např. Ni, Zn, Ca, mg atd. a určitými konkrétními
35 proteiny nebo chelatačními činidly. Tak např. kotvou může být polyhistidin a částí specifickou pro kotvu, která představuje linker, může být nikl, který je napojen přes nikl přes chelatační činidlo na cílově specifickou sondu. Alternativně může být chelatační Činidlo kotvou a polyhistidin může být částí spojenou se sondou. Alternativně může být kotvou anorganická látka. Může to být např. kov jako je vápník nebo hořčík a částí linkeru, která je specifická pro kotvu
40 může být vhodné chelatační Činidlo jako je EDTA nebo EGTA, přičemž toto chelatační činidlo je připojeno k sondě, která je specifická pro určitý cíl. Odborník v oboru snadno rozpozná, že jako kotvy mohou být použity nejrůznější molekuly, kterých je velké množství a tyto obecné typy se také diskutují ve spojení s cíly a sondami.

45 Počet kotev v testovací oblasti může být nejméně 2, výhodně od asi 8 do asi 900 (méně nebo více je také možno), výhodnější je, aby jich bylo 8 až asi 300 a ještě výhodnější mezi 30 a asi 100 (např. asi 64). V některých výhodných provedeních je použito 16, 36, 45 nebo 100 kotev/testovací oblast pro povrch s 96 testovacími oblastmi (např. jamkami) nebo asi 9, 16 nebo 25 kotev/testovací oblast pro povrch s 384 testovacími oblastmi (např. jamkami). Ve většině
50 provedeních má každá kotva v testovací oblasti oproti ostatním kotvám v mřížce odlišnou specifitu. Nicméně dvě nebo více kotev může pokrývat stejnou specifitu a veškeré kotvy také klidně mohou být identické. V jednom provedení, ve kterém je zahrnuta kombinace hodně velkého počtu testovacích oblastí (např. asi 864, 1536 nebo více) tak, že se zároveň provádí velký počet testů, může být zájem testovat takové vzorky, že se pro každý vzorek požaduje pouze velmi

omezené množství parametrů (např. asi 2, 4, 6 nebo 9). Jinými slovy, pro kombinace zahrnující hodně velké počty oblastí, může být výhodné mít pouze 2 až 9 kotev na oblast.

Fyzikální oddělení a relativní orientace kotev v nebo na testovací oblasti nejsou omezeny. Obvykle je vzdálenost mezi kotvami asi 0,003 až asi 5 milimetrů nebo menší, výhodně mezi kotvami asi 0,003 až asi 5 milimetrů nebo menší, výhodně mezi asi 0,03 a asi 1. Vzdálenosti mezi kotvami (a plochami) mohou být také větší nebo menší. Kotvy mohou být uspořádány v libovolné orientaci jedna vůči druhé i vůči hranicím jednotlivých oblastí. Tak např. mohou být uspořádány v dvourozměrné orientaci, jako např. ve čtverci, obdélníku, šestiúhelníku nebo v jiném geometrickém tvaru, nebo v kruhovém tvaru, přičemž kotvy v takovém případě směřují od středu v radiálních liniích nebo v soustředných kruzích. Kotvy také mohou být uspořádány v jednorozměrném, lineárním tvaru. Tak např. oligonukleotidy se mohou hybridizovat ve specifických pozicích podél DNA nebo RNA sekvence, čímž tvoří supramolekulární uspořádání, nebo v lineárním uspořádání při průchodu gelem. Alternativně mohou být kotvy také uloženy v mřížkovité nebo žebříčkovité formaci. (Viz. obr. 6). Tak např. kotvy mohou být uloženy jako dlouhé rovnoběžné linie, které leží jedna vedle druhé. Vzdálenost mezi nimi nebo délka každé této linie mohou být různé podle nejlepší cesty k získání jednoduchého rozpoznatelného vzorce jako je žebříček, mřížka a pod., přičemž první a třetí linie může být dvakrát tak dlouhá jako zbytek, nebo může být jedna linie vypuštěná, atd. Jedna prázdná linie navíc se může umístit po poslední linii, aby se odlišila jedna testovací oblast a žebříčkovitý nebo mřížkovitý tvar se může opakovat v oblastech úspěšných testů.

V jednotlivých oddělených testovacích jamkách (testovacích oblastech) nebo v oddělených testovacích místech, nemusí být uspořádání kotev vždy ve stejné pozici. Výraz „testovací pozice“ je používán tak, že označuje místa, na kterých lze na povrchu provádět test, a na která se nanášejí testované vzorky. (Tyto pozice mohou být určeny možností umístění oddělených kapek testovaného vzorku nebo umístění jamek nebo pomocí jakýchkoliv oddělovacích prostředků, určujících jednotlivou testovací jamku nebo tvořících mnohojamkovou desku.) Uspořádání kotev samo o sobě (např. žebříčkovitý nebo mřížkovitý tvar oligonukleotidových kotev) se používá tehdy, kdy je třeba umístit každou jednotlivou kotvu na přesném místě do daného tvaru – např. jako je v případě, že jednotlivé linie jsou uspořádány žebříčkovitě a jednotlivá pozice je rozpoznávána vůči ostatním liniím svou polohou. Z tohoto důvodu první kotva nemusí být na první hraně jednoho rohu každé testovací pozice. První kotva se nalezne na základě rozpoznání rozložení, což je výhodnější než pokud se nalézá na základě pozice, kterou mají vzájemnou vůči sobě pro jednotlivá testovací místa. Vzhledem k tomu, že plocha využívaná každou testovací pozicí (např. plocha kapky nebo plocha jamky) je dostatečně velká, aby byla schopna obsahovat alespoň jednu celou jednotku opakovaných vzorů kotev, každý testovací bod testuje vzorek dodaný do jedné testovací pozice na všechny cíle, které jsou specifikovány (mřížkovitým nebo žebříčkovitým) uspořádáním, přičemž toto uspořádání leží uvnitř plochy testovací pozice.

Kotvy uvnitř každé testovací oblasti nemusí být umístěny v přesné nebo dokonce fixní pozici. Tak např. každá kotva může být připojena k Částici, korálku nebo podobně, přičemž se předpokládá, že uvnitř testovací oblasti může být pozice náhodná. Umístění každé kotvy může být determinováno použitím např. detekovatelné jmenovky. Tak např. může být molekula linkeru specifická pro každý typ kotvy a může být značená různou fluorescenční, luminiscenční a podobnou značkou. Pozice částice, která obsahuje konkrétní dvojici linker/kotva se přitom může identifikovat povahou signálu, který vyzařuje linker, např. excitačním nebo emisním spektrem. Odborník v oboru může připravit řadu linkerů s množstvím různých takových připojených „značek“, přičemž každá má odlišitelné spektrum. Alternativně mohou být kotvy značeny přímo. Tak např. každý typ kotvy může být značen značkou, která fluoreskuje různým spektrem, které se liší od značky jiných typů nebo kotev. Alternativně se mohou částice nebo perličky navzájem od sebe lišit velikostí nebo tvarem. Jakékoliv značení a detekční metody zde popsané se dají prakticky použít. Tak např. fluorescence se dá zjišťovat zobrazovacím systémem založeným na velké CCD, skenovacím fluorescenčním mikroskopem nebo řadičem buněk aktivovaným fluorescenčně (FACS).

Kotvy mohou interagovat nebo se mohou spojovat specificky s jednou částí – s částí specifickou pro kotvu – s molekulou linkeru. Termínem „interagovat“ nebo „spojovat“ se zde míní, že dvě látky nebo sloučeniny (např. kotva nebo část linkeru specifická pro kotvu, testovací část a její cíl, nebo cíl a hlásič specifický pro cíl) jsou spojeny (např. navázány, svázány, hybridizovány, připojeny, nataveny, kovalentně navázány nebo jiným způsobem spojeny) jedna s druhou tak, že je to dostačující pro provedení zamýšlených testů. Termínem „specifický“ nebo „specificky“, se zde míní, že dvě složky (např. kotvy nebo oblasti linkeru specifické pro kotvu, testovací části a jejich cíle nebo cíl a cílově specifický hlásič) se váží selektivně jedna k druhé a v nepřítomnosti jakékoliv chránící techniky, ne obecně s jinými složkami, které nejsou určeny k navázání na předmětné komponenty. Vyžadované parametry k dosažení specifických interakcí se mohou zjistit rutinním způsobem, např. použitím běžných metod známých v oboru.

Pro nukleové kyseliny např. odborník v oboru může experimentálně stanovit znaky (jako je délka, složení hlavní části a stupeň komplementarity), které budou schopny nukleovou kyselinu (např. oligonukleotidovou kotvu) hybridizovat s jinou nukleovou kyselinou (např. částí linkeru specifickou pro kotvu) za podmínek přesně zvolených tak, aby se minimalizovaly nespecifické hybridizace s jinými látkami nebo molekulami (např. jiné oligonukleotidové linkery). Obvykle se DNA nebo jiná nukleokyselinová sekvence kotvy, části linkeru, nebo detekčního oligonukleotidu jeví dostatečnou komplementaritu, aby se její partner k navázání byl schopen hybridizovat za selektivních přesných podmínek a T_m bude v oblasti 10 až 20 °C nad pokojovou teplotou (např. asi 37 °C). Obecně může mít oligonukleotidová kotva od asi 8 do asi 50 nukleotidů, výhodně asi 15, 20, 25 nebo 30 oligonukleotidů. Jak je zde používáno, „vysoce přesné hybridizační podmínky“ znamená, že jsou to jakékoliv podmínky, za kterých se projeví hybridizace, která se uskuteční alespoň v 95 %, výhodně v 97 až 100 %, nukleotidové komplementarity (identity) mezi dvěma nukleovými kyselinami. Nicméně v závislosti na požadovaném účelu, mohou být hybridizační podmínky voleny tak, že vyžadují menší komplementaritu, např. asi 90, 85, 75, 50 % atd. Mezi hybridizační reakční parametry, které mohou variovat patří koncentrace soli, pufru, pH, teplota, doba inkubace, množství a typ denaturačního prostředku, který je přítomen např. formamidu atd. (viz např. Sambrook et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed.) Vols. 1–3, Cold Spring Harbor Press, New York; Hames et al. (1985). *Nucleic Acid Hybridization*, IL Press; Davis et al. (1986). *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Sciences Publishing, Inc., New York). Např. nukleová kyselina (např. linker oligonukleotidů) se může přidat do testovací oblasti (např. jamky vícejamkové destičky – ve výhodném provedení je to 96 nebo 384 nebo vícejamková destička) v objemu, který se pohybuje od 0,1 do asi 100 nebo více μ l (ve výhodném provedení asi 1 až asi 50 μ l, nejvýhodněji kolem 40 μ l), při koncentraci, která se pohybuje v oblasti od asi 0,01 do asi 5 μ M (ve výhodném provedení asi 0,01 μ M), v pufru jako je např. 6X SSPE-T (0,9 M NaCl, 60 mM NaH_2PO_4 , 6 mM EDTA a 0,05 % Tritonu X-100), a hybridizuje se s vazným partnerem (např. oligonukleotidovou kotvou nebo povrchem) po dobu asi 10 minut a asi až alespoň 3 hodin (ve výhodném provedení je to nejméně asi 15 minut) při teplotě, která se pohybuje v oblasti od asi do asi 37 °C. (ve výhodném provedení při pokojové teplotě). Podmínky se mohou volit tak, aby umožňovaly vysoký výtěžek a reakční rychlost při řešení podle vynálezu, reakční podmínky se přibližně shodují s fyziologickými podmínkami.

Volba jiných typů látek nebo molekul (např. polypeptidy, lektiny atd.), které mohou např. sloužit jako kotvy nebo jako části linkerů a reakčních podmínek, které jsou vyžadovány pro dosažení určitých specifických interakcí s příslušnými vaznými partnery, jsou rutinní a jsou běžné v oboru (například jak je popsáno v publikacích Niemeyer et al (1994). *Nucl. Acids Res.* 22, 5530–5539; Fodor et al (1996). *Patent US 5 510 270*; Pirrung et al (1992), *Patent US 5 143 854*). Mezi inkubační parametry patří pufr, koncentrace solí, pH, teplota, doba inkubace, přítomnost nosiče a/nebo činidla nebo podmínek ke snížení nespecifických interakcí atd. Tak např. do testovací oblasti (např. jamky, vícejamkové destičky ve výhodném provedení 96 nebo 384 jamkové nebo větší), která obsahuje jako kotvy protilátky, se mohou přidat anti-protilátky (antigeny nebo protilátkově specifické sekundární protilátky) v objemu, který se pohybuje v oblasti od asi 0,1 do asi 100 nebo více μ l (ve výhodném provedení asi 1 až asi 50 μ l, nejvýhodněji asi kolem 40 μ l),

při koncentraci v oblasti od asi 10 pM do asi 10 nM (ve výhodném provedení asi 1 nM), v pufru jako je např. 6X SSPE-T, PBS nebo fyziologická solanka a inkubuje se s kotvami na povrchu po dobu 10 minut až alespoň 3 hodiny, (ve výhodném provedení nejméně asi 15 minut) při teplotě, která se pohybuje od asi 4 do asi 45 °C (ve výhodném provedení asi 4 °C). Pro peptidové kotvy
5 je výhodná délka asi 5 až asi 20 aminokyselin.

V některých provedeních vynálezu může každá kotva v uspořádání interagovat s specifickou částí (pro určitou kotvu) jejího odpovídajícího linkeru na v podstatě stejný stupeň jako reaguje jiná kotva v tomto uspořádání, pokud jsou zvoleny určité reakční podmínky. Tato skutečnost může
10 zajistit, že specifika kotev, je v podstatě jednotná pro linker a tudíž i pro jednotlivé testovací oblasti.

Kotvy uvnitř testovací oblasti mohou být umístěny „genericky“, kdy každá kotva může interagovat s jedním nebo více různými linkery, přičemž každý z linkerů má část specifickou pro kotvu,
15 ale s různou „sondovou testovací“ částí; takže při tomto jednom uspořádání generických kotev se mohou použít k programování nebo k definování souboru různých testů. Pružná povaha takového generického uspořádání kotev se dá ilustrovat s odkazem na obr. 1 a 2. Obrázek 2 ilustruje povrch, který zahrnuje 15 testovacích oblastí, přičemž každá z těchto oblastí obsahuje uspořádání 6 různých kotev, které jsou v tomto příkladě představovány oligonukleotidy. Obrázek 1 schematicky znázorňuje jednu z těchto (oligonukleotidových) kotev, kotvu 1, která se v kontaktu s linkerem 1, který zahrnuje jednu část, která je specifická pro kotvu 1 a druhou část, která je specifická pro cílovou mRNA 1. Alternativně jedna z nich může být substituovaná, např. linkerem 2, který podobně jako linker 1, obsahuje část specifickou pro kotvu 1, ale který zahrnuje druhou část, která je specifická pro cílovou mRNA 2 místo cílové mRNA 1. Takže, kotva 1 se může použít ke
20 specifikaci (nebo programování nebo definici nebo determinování) testů pro buď pro dva; nebo více různých cílových mRNA. Způsob generování a navazování vysoce výkonných uspořádání oligonukleotidů nebo peptidů může být drahý, může spotřebovat velmi dlouhou dobu a/nebo fyzicky obtížný. Schopnost použít předem zformované uspořádání kotev k programování řady různých sond ti uspořádání sond je v případě tohoto vynálezu velkou výhodou.

Přestože je na obr. 2 znázorněno uspořádání generických kotev pro oligonukleotidové sondy, identické uspořádání kotev by se také mohlo použít k programování uspořádání jiných sond, např. receptorů proteinů (viz např. obr. 3). Je jasné, že je v tomto případě možné obrovské množství permutací, které je dáno počtem typů interakcí kotva/linker, např. komplexnější vrstva „sendvičová“ nebo „nesených sond“ jako jsou kombinace protein/protilátka. Tudíž povrch kotev podle
35 tohoto vynálezu sám o sobě, nabízí nové výhody.

V jednom z možných provedeních podle tohoto vynálezu mohou interagovat kotvy s linkery reverzibilně; tudíž generický soubor kotev se může opětně používat k programování řady souborů
40 testů. Tak např. oligonukleotidová kotva se může oddělit od oligonukleotidové části linkerů např. tím, že se povede zahřátí, které způsobí, že dva oligonukleotidy disociují a může dojít potom k navázání druhého linkeru. Schopnost opětného použití určitého uspořádání kotev, které může být drahé, jeho příprava může spotřebovat mnoho času a/nebo může být fyzikálně obtížné toto uspořádání připravit, je další velkou výhodou tohoto vynálezu.

Kotva nemusí nutně interagovat s linkerem. Tak například kotva může být spojena (přímo nebo nepřímou) s detekovatelnou molekulou, jako je fluorochrom a může tímto způsobem sloužit k lokalizaci plošky v mřížce, např. za účelem přenesení informace mezi povrchem a detektorem. Alternativně může být kotva značená známým množstvím detekovatelných molekul tak, aby to
50 mohlo sloužit k vnitřní kvantifikaci markeru, např. pro účely kalibrace.

Termín „linker“ jak je zde používán znamená bifunkční látku, která zahrnuje první část (nebo skupinu nebo část), která je specifická pro zvolenou (označenou) kotvu nebo podsoubor kotev („specifické pro kotvu“) a druhou část, která je sondou specifickou pro cílový zájem („specifická

pro cíl“). Tyto dvě části linkeru se mohou napojit přes kovalentní nebo nekovalentní vazbu a mohou být připojeny přímo nebo přes mezičlen.

Chemická povaha částí linkeru, specifické pro kotvu, je pochopitelně funkcí kotvy nebo kotev, s kterými interaguje. Tak například, jestliže kotvou je oligonukleotid, tak částí linkeru, která interaguje s touto kotvou může být, např. peptid, který se váže specificky k oligonukleotidu, nebo nukleová kyselina, která může účinně a specificky hybridizovat s touto částí za zvolených přesných hybridizačních podmínek. Touto nukleovou kyselinou může být např. oligonukleotid, DNA, RNA, PNA, PCR produkt, nebo substituovaná nebo modifikovaná nukleová kyselina (např. obsahující nepřirodně se vyskytující nukleotid jako je např. inosin; napojený přes různé známé vazby a můstky jako je sulfamát, sulfamid, fosforotionát, metylfosfonát, karbamát; nebo semisyntetická molekula jako je DNA–streptavidin nový konjugát atd.). Výhodné jsou molekuly s jedním řetězcem. Část linkeru, která je specifická pro oligonukleotidovou kotvu může obsahovat asi od 8 do asi 50 nukleotidů v délce, výhodně asi 15, 20, 25 nebo 30 nukleotidů. Jestliže kotvou je protilátka, částí linkeru, která interaguje s touto protilátkou může být např., protilátka, antigen nebo menší fragment jedné z takových molekul, který může interagovat specificky s kotvou. Látky nebo molekuly, které interagují s jinými typy kotev, popsanými shora a které mohou sloužit jako části linkeru specifické pro kotvu, jsou v oboru dostatečně známé a mohou být navrženy pomocí obvyklých postupů (např. viz shora).

Chemická povaha části linkeru specifické pro cíl je, pochopitelně, funkcí cíle, pro který je tato sonda navržena a s kterým interaguje. Tak např. jestliže cílem je určitá mRNA, částí linkeru specifickou pro cíl může být, např. oligonukleotid, který se váže specificky k cíli, ale ne k rušivým RNA nebo DNA za zvolených hybridizačních podmínek. Odborník v oboru může s pomocí metod, které byly vyvinuty v oboru, rozpoznat experimentálně znaky jakéhokoli nukleotidu, který bude hybridizovat optimálně s cílem, přičemž se dodrží minimálně hybridizace s nespecifickými, interferujícími DNA nebo RNA (např. viz shora). Obecně je délka oligonukleotidové sondy použité k rozpoznání cílové mRNA přítomné na pořadí velkého přebytku necílových RNA může být od asi 8 do asi 50 nukleotidů, výhodně asi 18, 20, 22 nebo 25 nukleotidů. Nukleotidová sonda pro použití při biochemickém testu, při kterém není velké pozadí konkurenčních cílů, může být kratší. Pomocí postupů vyvinutých v oboru (např. počítačový program BLAST), mohou sekvence oligonukleotidových sond být voleny tak, aby nebyly vzájemně příbuzné a aby nebyly podobné potenciálně interferujícím sekvencím ve známých genetických databázích. Výběr hybridizačních podmínek, který umožní specifickou hybridizaci oligonukleotidové sondy na nějakou RNA se může povést na základě rutiny, pomocí způsobu, které jsou známy v oboru (např. viz shora). Tak např. cílová RNA /např. celá RNA nebo mRNA extrahovaná z tkání nebo rostoucích buněk (a po případě zpracovaná působením činidla podle potřeby) v jakékoliv nádobě, jako např. v jamce nebo ve vícejamkové mikrotitrové destičce (např. 96 nebo 384 nebo více jamek)/ se dá přidávat k testovací oblasti obsahující oligonukleotidové sondy v určitém uspořádání (viz shora) v pufru jako je 6X SSPE–T nebo jiné, popřípadě obsahující činidlo k redukci nespecifické vazby (např. asi 0,5 mg/ml degradované DNA lososa nebo sledě nebo RNA kvasinek), a inkubuje se při empiricky stanovené teplotě po dobu v rozmezí mezi asi 10 minutami a nejméně 18 hodinami (ve výhodném provedení asi 3 hodiny). Délka navázaného řetězce s hybridizací může být stejná nebo menší v porovnání s délkou použitou při spojování kotev s částí linkeru specifickou pro kotvu. Navržení a použití jiných typů sond je také věcí rutiny a znalostí v oboru, např. jak je diskutováno shora.

Části specifické pro cíl a části specifické pro kotvu použitého linkeru se mohou připojit (navázat, asociovat) jakýmkoliv způsobem kovalentními nebo nekovalentními vazbami, přičemž není tento způsob podstatný pro vynález. Tyto dvě části se mohou napojovat přímo nebo přes molekulu meziproductu. V jednom z možných provedení jsou v obou částech linkeru oligonukleotidy, které mohou být napojeny kovalentními vazbami jako jsou např. fosfodiesterové vazby, čímž vytvoří jednu kolineární nukleovou kyselinu. V dalším provedení, ve kterém část specifická pro kotvu je oligonukleotid a část specifická pro cíl je receptor, např. receptor proteinu, se tyto dvě části mohou spojit pomocí interakce biotinové a streptavidinové molekuly, což je ve formě příkladu

znázorněno na obrázku 3. Mnoho variací takovýchto vazeb je známo (např. viz Niemeyer et al (1994). NAR 22. 5530–5539). Alternativně mohou být tyto dvě části spojeny přímo, např. oligonukleotid může být amidován a pak navázán přímo (např. zesíťován) k peptidu nebo proteinu amidickou vazbou nebo může být připojen k membránovému členu pomocí amidické vazby nebo tukové vazby. Způsoby k vytvoření takovýchto kovalentních nebo nekovalentních vazeb jsou obvyklé a snadno se optimalizují, což je věcí rutiny odborníka v oboru.

Po spojení dvou látek (např. inkubací dvou nukleových kyselin, dvou proteinů, proteinů plus nukleové kyseliny nebo jiných) a vznikne komplex (jako je např. komplex kotva/linker) může být tento výsledný komplex po případě dále zpracován (např. promýván) aby se odstranily nevázané látky (např. linkery), přičemž se používá podmínek, které jsou empiricky stanovitelné, aby se předešlo specifickým nežádoucím interakcím, ale aby se odstranily nespecificky navázané materiály. Tak např. reakční směs se mohou promývat jednou až desetkrát za stejných nebo podobných podmínek, které byly používány při tvorbě komplexů (např. komplexu kotva/linker).

Kombinace podle tohoto vynálezu se mohou vyrobit rutinním způsobem, s použitím známé technologie.

Některé typy povrchů, které se mohou používat při vynálezu, jsou snadno dostupné od komerčních dodavatelů. Ve výhodném provedení je to povrch 96-, 384- nebo 1536 jamkových mikrotitrových destiček jako jsou např. prodávané modifikované destičky od Corning Costar. Alternativně jde o povrchy, na nichž jsou vytvořeny jamky, které zahrnují odsazení nebo důlky a dají se formovat mikrozpracováním látek jako je hliník nebo ocel, přičemž se připravuje tavěnina, pak mikroinjekční plastové nebo podobné materiály, které se do formy nastříkují a vzniká struktura jak je např. znázorněna na obr. 4. Alternativně je takováto struktura na obr. 4 opatřena skleněnými, plastovými, keramickými nebo podobnými doplňky, např. mohou tam být tři elementy jako jsou ty, které jsou znázorněny na obr. 5: první sekce se nazývá separační val, (obr. 5a), přičemž tyto valy jsou vytvořeny mezi jednotlivými jamkami pro vzorky; druhá sekce zvaná podrozdělovač (obr. 5b), která tvoří pododdíly nebo další důlky v každé testovací jamce a třetí sekce zvaná báze (obr. 5c), která tvoří základnu destičky a nižší povrch testovacích jamek. Separátor může být např. tvořen kouskem materiálu jako je silikon s otvory, které jsou proraženy skrz tento materiál tak, že každý otvor netvoří okraje testované jamky, když se spojí všechny tři části. Podrozdělovačem může být např. tenký kousek materiálu např. křemíku, vytvarovaný do podoby sítě nebo jemného síta. Tato báze může být kouskem plochého materiálu, např. skla např. v tvaru nižší částí typické mikrodestičky používané pro biochemické testy. Horní část povrchu báze může být plochá, jak je znázorněno na obr. 5c, nebo může být vytvořena s vymezeními, které jsou vytvarovány jako podrozdělovače a zajišťují vytvoření pododdílů nebo důlku uvnitř každé jamky pro vzorek. Uvedené tři části mohou být spojeny běžnými způsoby, např. způsoby používanými k sestavení křemíkových výrobků.

Oligonukleotidové kotvy, linkerové skupiny nebo detektory se mohou syntetizovat běžnou technologií, např. s použitím komerčních syntetizérů oligonukleotidů a/nebo navazováním subfragmentů, které již byly takto syntetizovány. V jednom možném provedení podle vynálezu se vytvoří kotvy na bázi nukleových kyselin, jako např. oligonukleotidové kotvy a mohou se umístit na nebo uvnitř povrchu testovací oblasti a připevnit tam jakoukoliv obvyklou technikou včetně fotolitografie nebo chemického síťového nanesení, které se může provádět technologií inkoustové tiskárny, kapilárně rastrováním nebo pomocí čipu s kanálky na tekutinu, elektrochemickým vytvořením vzoru pomocí soustavy elektrod, přikládáním jehly nebo trubičky nebo denaturací, která následuje po ozařování nebo zahřívání na filtrech (viz např. Rava et al (1996). Patent US 5 545 531; Fodor et al (1996). Patent US 5,510,270; Zanzucchi et al (1997). Patent US 5 643 738; Brennan (1995). Patent US 5 474 796; PCT WO 92/10092; PCT WO 90/15070). Kotvy se mohou přemístit na vrchol povrchu testovací oblasti nebo mohou být např. v případě lože z polyakrylamidového gelu uloženy uvnitř povrchu takovým způsobem, že některé kotvy vyčnívají z povrchu a jsou přístupné interakcím s linkerem. Ve výhodném provedení jsou vytvořené oligonukleotidové kotvy substituovány v poloze 5' volnou aminoskupinou, přičemž jsou

rozpuštěny při koncentraci, která se dá empiricky rutinním způsobem zjistit (např. asi 1 μ M) v pufru jako je 50 mM fosfátový pufr, pH 8,5 a 1 mM EDTA a nanášeny pomocí zařízení „Pixus nanojet dispenser“ (Cartesian Technologies) v kapičkách asi 10,4 nanolitru na konkrétní zvolená místa uvnitř testovací jamky, jejíž horní povrch je čerstvě upraven, a tvořen suchou DNA vazebnou destičkou (Corning Costar). V závislosti na relativním poměru oligonukleotidového připojení a odpařování, může být požadováno, aby byla udržována vlhkost v jamce po dobu celé přípravy. Podle jiného provedení mohou být oligonukleotidové kotvy syntetizovány přímo na povrchu testovací oblasti s použitím běžných metod, jako je např. světlem aktivované odstranění chránění z prodlužovaných oligonukleotidových řetězců (např. ve spojení s použitím maskování na určitém řízeném místě) nebo vytvoření soustavy nanolitrových kapiček deaktivující sloučeniny s použitím mikrotřyskové zařízení „Nanojet dispenser“. Např. se může provést odstranění chránění ze všech rostoucích sekvencí, které mají být určeny k navázání jednoho nukleotidu a potom tento nukleotid přidat k celému povrchu.

Rutinním způsobem lze také generovat peptidové, proteinové, lektinové, chelatačně vytvořené, plastové nebo jiné typy kotev nebo linkerových skupin a kotvy se mohou umisťovat na nebo uvnitř povrchů, přičemž se může použít libovolné dostupné technologie (viz Fodor et al (1996). Patent US 5 510 270; Pirrung et al (1992). Patent US 5 143 854; Zanzucchi et al (1997). Patent US No. 5 643 738; Lowe et al (1985). Patent US 4 562 157; Niemeyer et al (1994). NAR 22, 5530–5539).

Při některých provedeních podle vynálezu se používají popsané kombinace v řadě rastrovacích metod a/nebo pro získání informace o úrovni, aktivitě nebo struktuře sond nebo cílových molekul. Takovéto testy jsou nazývány „Multi Array Plate Screen“ (MAPS) metody nebo testy a povrchy obsahující matice nebo kotvy nebo kotvy plus sondy, které se používají pro tyto testy jsou označovány MAPS matice nebo MAPS destičky.

Složky reakční směsí, testy nebo řádkovací metody se mohou spolu v různém pořadí kombinovat. Tak např. kotvy, linkery a cíle se mohou sestavovat postupně nebo cíle a linkery v přítomnosti nebo absenci hlásičů, se mohou sestavit v roztoku a pak uvést do kontaktu s kotvami.

Podle jednoho z možných provedení podle vynálezu jde o způsob detekce alespoň jednoho cíle, při kterém se:

- a) uvádí do kontaktu vzorek, který může obsahovat uvedený cíl nebo uvedené cíle s bifunkčním linkerem, který má první část, která je specifická pro oligonukleotidovou kotvu a druhou část, která zahrnuje sondu, která je specifická pro uvedený cíl nebo uvedené cíle, za podmínek účinných k získání prvního produktu hybridizace mezi uvedeným cílem nebo uvedenými cíli a uvedeným linkerem.
- b) uvádí se do kontaktu první hybridizační produkt s kombinací za podmínek účinných k získání druhého hybridizačního produktu, který je produktem hybridizace mezi uvedeným prvním produktem hybridizace a uvedenou kombinací, přičemž uvedená kombinace zahrnuje, před přidáním prvního produktu hybridizace,
 - 1) povrch obsahující množství oddělených oblastí, z nichž alespoň dvě jsou v podstatě identické, přičemž každá oblast zahrnuje
 - 2) alespoň 8 různých oligonukleotidových kotev,
- c) uvádí se do kontaktu zmíněný první produkt hybridizace nebo uvedený druhý produkt hybridizace se značenou detektorovou sondou a
- d) detekuje se uvedená detekční sonda.

Každý test nebo každý postup dále popsany se dá provádět takovým způsobem, že se dosahuje vysokých počtů testů, přičemž velký počet vzorků (např. tak velké množství jako asi 864, 1036, 1536, 2025 nebo více v závislosti na počtu oblastí v kombinaci) se může testovat na každé destičce nebo na povrchu rychle a souběžně. Dále mnoho destiček nebo povrchů se dá zpracovat najednou. Např. při způsobech hledání nových účinných látek se velké množství vzorků, z nichž každý zahrnuje látku, která je kandidátem na účinnou látku (např. člen knihovny kombinační chemie, jako jsou varianty malých molekul, peptidů, oligonukleotidy nebo jiné látky) se může přidat k oddělené oblasti kombinace, jak je popsána nebo se může přidat k biologickému nebo k biochemickému vzorku, které jsou pak přidávány do jednotlivých oblastí kombinace a inkubovány se soustavou sond, umístěných v oblasti. Testy se v takovém případě dají provádět s každým vzorkem. S přihlédnutím k současnému nástupu a pokračujícímu vývoji mikrodestiček o vysoké hustotě testovacích míst, DNA testovacích zařízení a metod jako je laserová technologie k přípravě a získávání dat z takovýchto hustých mikrodestiček, technologie využívající robotů a díky zlepšenému způsobu nakládání, promyšleným detekčním systémům a softwaru k zpracování dat mohou metody podle vynálezu být používány k screeningu nebo analýze tisíců a desítek tisíc nebo více sloučenin denně.

Tak např. provedení, při kterém sondami jsou oligonukleotidy, může být testována pro účely diagnostiky nukleová kyselina nebo může jít o polynukleotidový screening (např. test na vazbu nebo jiný test), přičemž se může zpracovat velký počet vzorků na přítomnost různých genetických variací nebo defektů (např. polymorfismus nebo specifické mutace spojené s chorobami jako je cystická fibróza. Viz např. Iitja et al (1992). *Molecular and Cellular Probes* 6, 505–512)); Může jít o testy na patogenní mikroorganismy (jako jsou bakterie, viry, prvoci, jejichž hostiteli jsou živočichové včetně lidí nebo rostliny) nebo může jít mRNA transkripční schémata, která jsou diagnostická pro určité fyziologické stavy nebo choroby. Soubory sond na bázi nukleových kyselin zahrnují části, které obsahují ESTy (včetně kopií plné délky) mohou být použity k hodnocení transkripčních vzorů, které produkují buňky, od kterých jsou ESTy odvozeny (nebo jiné). Sondy na bázi nukleových kyselin mohou také detekovat peptidy, proteiny nebo proteinové domény, které se vážou specificky na určité sekvence nukleových kyselin (a naopak).

V dalším provedení se dá kombinace podle vynálezu použít k monitorování biochemických reakcí jako je např. interakce proteinů, nukleových kyselin, malých molekul nebo podobně – např. účinnosti nebo specificky interakcí mezi antigeny a protilátkami; nebo receptorů (jako jsou např. přečištěné receptory nebo receptory vázané k buněčným membránám) a jejich ligandů, antagonistů nebo agonistů; nebo enzymů (jako jsou proteázy nebo kinázy) a jejich nosičů nebo pro stanovení nebo k zvýšení nebo k snížení množství nosiče, který je převeden na produkt; a zrovna tak v mnoha jiných dalších případech. Takovéto biochemické testy se dají použít k charakterizaci vlastností sondy nebo cíle nebo jako fáze pro screeningové testy. Tak např. prohledávání vzorků na přítomnost určitých proteáz (např. proteáz uplatňujících se při srážení krve jako jsou proteázy Xa a VIIa) se mohou tyto vzorky testovat na kombinace, ve kterých jsou sondy fluorogenních substrátů specifické pro každou proteázu jednotlivě. Pokud se cílová proteáza váže k substrátu a štěpí jej, substrát bude fluoreskovat což je obvyklým výsledkem, např. štěpení a separace mezi dvěma páry k přenosu energie a signál takto může být detekován. V jiném případě při testování vzorků na přítomnost určité kinázy (kináz) (např. Src, tyrosinové kinázy nebo ZAP70) se mohou testovat vzorky obsahující jedno nebo více kináz na kombinacích, ve kterých jsou sondami peptidy, které jsou selektivně fosforované jednou z kináz, o které máme zájem. S pomocí metod, které jsou rozpoznatelné na základě znalostí z oboru a rutinně stanovitelných podmínek se vzorky mohou inkubovat s řadou substrátů ve vhodném pufru a s nutnými kofaktory, při čemž se empiricky stanoví doba této inkubace. (Při některých testech např. pro biochemické výzkumy faktorů, které regulují aktivitu kináz, o které máme zájem, můžeme aktivitu každé kinázy upravit tak, že každý substrát se fosforuje podobným způsobem). Po dalším ošetření (např. promytím) každého reakčního produktu při empiricky stanovených podmínkách za účelem odstranění kináz a nežádoucích reakčních složek (popřípadě) se mohou fosforylované substráty detekovat např. inkubací s detekovatelnými reakčními činidly jako jsou např. fluoresceinem značené antifosfotyrosinové nebo antifosfoserinové protilátky (např. při koncentraci asi

- 10 μM nebo větší nebo menší) a signál se může detekovat. V jiném případě se může provádět test na schopnost navazování. Tak např. domény SH2 jako jsou GRB2 SH2 nebo ZAP70 SH2 se mohou testovat na matici sond vhodně fosforylovaných peptidů; nebo se může testovat krevní sérum na matici určitých receptorů za účelem zjišťování přítomnosti imunitních nedostatečností.
- 5 Také testy na navázání enzymů se mohou provádět v tomto maticovém formátu. Kombinace podle vynálezu se může také použít k detekci enzymových mutantů, které jsou buď více, nebo méně aktivní než jejich divoké příbuzné formy nebo pro hledání řady činidel včetně herbicidů a pesticidů.
- 10 MAPS testy se mohou provádět ke kvantifikaci (měření, množství) aktivních cílů ve vzorku, přičemž sonda není plně využita, to znamená, ne více než asi z 90 % přístupných sondovacích míst se naváže (nebo reaguje nebo hybridizuje) s cílem. Za těchto podmínek se může cíl kvantifikovat, protože máme více cílů, bude mít za následek větší obsazení sond. Na druhé straně za podmínek, kdy přes 90 % dostupných sond je obsazených nebo se naváže, nebude už dále růst množství navázaných cílů z jejich koncentrací. Jakékoliv zde zmíněné typy cílů se mohou kvantifikovat tímto způsobem. Tak např. příklad 6 popisuje kvantifikaci oligonukleotidových cílů. Dále tento příklad demonstruje, že dokonce pokud je cíl přítomen ve velkém přebytku (např. pokud je přítomen v takových množstvích, že nasycuje velké množství přístupných sond v matici sond MAPS) se může přidáním známých množství neznačených cílů k vazné směsi kvantifikovat za
- 15 „citlivost posunů“ reakce, čímž se umožní měřit takováto velká množství cílů.
- 20

V dalším provedení se mohou kombinace podle vynálezu použít k hledání činidel, která moduluji interakci cílů a daných sond. Např. jakékoliv činidlo může modulovat i interakci cíle se sondou tím, že přímo interaguje nebo nepřímo interaguje s některou sondou, cílem nebo komplexem

25 vytvořeným cílem a sondou dohromady. Modulace může mít řadu forem včetně, nikoliv však výlučně, zvyšování nebo snižování vazebné afinity k cíli pro danou sondu, zvyšování nebo snižování rychlosti jakou se cíl a sonda váží, konkurenční nebo nekonkurenční inhibice vazby sondy a cíle, nebo zvyšování nebo snižování aktivity sondy nebo cíle, které může v některých případech vést ke zvýšení nebo ke snížení interakce sonda / cíl. Těmito činidly mohou být činidla uměle

30 připravená nebo to mohou být látky vyskytující se v přírodě. Také mohou být takováto činidla používána v nezměněném stavu nebo ve formě agregátu s jinými typy látek. Dále mohou být tato činidla připojena kovalentně nebo nekovalentně k vazebnému členu, což může být buď přímé připojení, nebo mohou být tato připojení provedena přes specifickou vazebnou látku. Tak např. k identifikaci potenciálních „krevních srážedel“ nebo činidel, která interagují s některým stupněm

35 kaskády proteáz, které způsobují srážení krve, směsi proteáz, o které je zájem a které mohou být testem hledány z řady kandidátů na toto činidlo a dále testovány na aktivitu jak je shora popsáno. Jiné příklady činidel, která mohou být využita v tomto vynálezu jsou velmi různé a zahrnují pesticidy a herbicidy. Příklady 16 a 17 popisují vysoce výkonné testy na činidla, která selektivně inhibují specifické kinázy nebo na selektivní inhibitory interakce mezi SH2 doménami a fosforylovanými peptidy.

40

V jiném provedení se kombinace podle vynálezu mohou používat k hledání činidel, která moduluji vzorec genové exprese. Lze použít např. matici oligonukleotidů, která může identifikovat mRNA jednotlivých typů, jejichž vzorec exprese ze souboru genů koreluje s určitými fyziologickými stavy nebo vyvíjejícími se stádii nebo s chorobným stavem („korelující“ geny, RNA nebo expresní vzorce). Termínem „koreluje“ nebo „korelující“ je míněno, že syntézní vzorec RNA je spojen s určitým fyziologickým stavem buňky, ale není to nutně vždy tak, že exprese dané RNA je zodpovědná za určitý fyziologický stav nebo je jeho příčinou. Tak např. může se identifikovat malý podsoubor takových mRNA, které jsou exprimovány, pozitivně a/nebo negativně konvertovány v buňkách, což slouží jako model pro určitý chorobný stav. Tento proměnlivý projev exprese, pokud je srovnáván se stejnou expresí u normálních buněk, které nevykazující patologický fenotyp, může sloužit jako indikátor nemoci nebo chorobného stavu („indikátor“ genů, RNA nebo expresní vzorce). Termíny „korelující“ a „indikátor“ se mohou používat tak, že se mohou mezi sebou zaměnit. Tak např. buňky, které jsou ošetřovány promotorem nádorů jako je

45

50

55

forbol myristát mohou vykazovat expresi genů, která je podobná té, která je pozorovatelná při

časných stádiích růstu nádorů. V jiném modelu rakoviny, se používá buněk myšního inzulinomu (např., buněčná linie TGP61), které při infekci adenovirem vykazují zvýšení exprese např. c-Jun a MIP-2, přičemž exprese domácích genů, jako GAPDH a L32 zůstává v podstatě neovlivněna.

5 Činidla, která po uvedení do kontaktu s buňkou modelu určité nemoci, buď přímo, nebo nepřímo a buď in vivo, nebo in vitro (např. v tkáňové kultuře) modulují expresní vzorec indikátoru, mohou působit jako terapeutické prostředky nebo účinné látky na organismy (např. lidi nebo zvířata nebo rostliny) trpící touto chorobou. Činidla také mohou modulovat expresní vzorce tím, že se uvádějí přímo do kontaktu s nukleovou kyselinou, např. in vitro (testovací trubička),
 10 expresního systému. Výraz „modulovat“, jak je zde používán, znamená působit zvyšování nebo snižování množství a/nebo aktivity molekuly nebo podobně, která je součástí měřitelné reakce. Kombinace podle vynálezu se mohou použít pro screening takovýchto činidel. Tak např. řada buněk (např. z modelu nemoci) se dá uvést do kontaktu s řadou činidel (např. po dobu od 10 minut až do 48 hodin nebo i více) a s použitím rutinních v oboru dobře známých metod (např.
 15 komerčně dostupných souprav) lze extrahovat celou RNA nebo mRNA. Pokud je to žádoucí zesílí se množství RNA standardními procedurami jako je RT-PCR zesílení, které může být použito (viz např. Innis et al es., (1996) PCR Protocols: A Guide to Methods in Amplification, Academic Press, New York). Extrakty (nebo namnožené produkty z těchto extraktů) se mohou nechat působit (např. společnou inkubací) na řadu v podstatě identických matic, které zahrnují
 20 sondy pro vhodný indikátor různých RNA a jejich činidla, která jsou spojená se změnou expresního vzorce těchto indikátorů, se mohou v takovém případě identifikovat. Příklad 15 popisuje testovací systém s vysokou výkonností, jehož účelem je hledat sloučeniny, které mohou změnit expresi genů, které jsou v korelaci s určitými chorobnými stavy.

25 Podobně se mohou rozpoznávat činidla, která modulují expresní vzorce spojené s určitými fyziologickými stavy nebo vývojovými stádii. Takováto činidla se mohou vyrobit uměle nebo může jít o látky vyskytující se v přírodě, včetně faktorů prostředí jako jsou látky, které vznikají při embryonálním vývoji, nebo které se uplatňují při regulaci fyziologických reakcí nebo látky důležité pro zemědělskou výrobu jako jsou pesticidy nebo herbicidy. Také může jít o činidla,
 30 která jsou využitelná v nezměněném stavu nebo jsou využitelná ve formě agregátů s jinými typy látek. Tato činidla mohou být připojena v takovém případě kovalentně nebo nekovalentně k nosnému členu, což může také být přímé nebo přes specifické látky, které umožňují navázání nebo můstek.

35 Dalším provedením podle vynálezu je souprava, vhodná k detekci alespoň jednoho cíle ve vzorku, která zahrnuje:

- a) povrch, obsahující velké množství navzájem oddělených oblastí, z nichž alespoň dvě jsou v podstatě identické, každá oblast zahrnuje alespoň 8 různých kotev (oligonukleotid nebo
 40 jeden z dalších typů zde popsaných a
- b) nádobu obsahující alespoň jednu bifunkční molekulu linkeru, která má první část specifickou pro alespoň jednu uvedenou kotvu (kotvy) a druhou část, která obsahuje sondu, která je specifická pro alespoň jeden uvedený cíl (cíle).

45 V jednom provedení se řeší povrch jako v a) shora a soubor instrukcí pro napojování alespoň jedné z uvedených kotev k bifunkční molekule linkeru, který má první část specifickou pro alespoň jednu uvedenou kotvu a druhou část, která obsahuje sondu, která je specifická alespoň na jeden cíl. Tyto instrukce mohou zahrnovat např. (nikoliv však výlučně) popis každé z kotev na povrchu, indikaci jak mnoho kotev je na povrchu a kde na povrchu jsou umístěny a návod na vytvoření specifických připojení (asociací, vazbu atd.) linkeru ke kotvám. Tak např. pokud kotvami jsou oligonukleotidy, instrukce mohou zahrnovat sekvenci každé kotvy, z které praktik může navrhnout komplementární skupinu linkerů specifickou pro danou kotvu, aby docílil specifickou interakci s (např. hybridizační) kotvami; jestliže kotvami jsou peptidy, instrukce
 50 mohou zahrnovat informaci např. o tom, které protilátky specificky interagují s danými peptidy.

- Tyto instrukce mohou také zahrnovat návod k asociaci kotev a linkerů, např. reakční podmínky, činidla pro hybridizaci (nebo jiný typ spojení) jako je teplota a doba inkubace, podmínky a činidla pro odstranění nepřipojených molekul (např. lázně) a pod. Dále mohou kromě toho instrukce také informovat o vytvoření a použití jakýchkoliv typů kontrolních linkerů zde diskutovaných a o metodách např. ke kvantitativnímu stanovení, normalizaci, „jemnému doladění“ nebo kalibraci testů, které se mají provádět s danými kombinacemi. Tyto instrukce mohou zahrnovat také jakékoliv parametry, podmínky nebo provedení, která jsou uvedeny v přihlášce, které mohou všechny být provedeny rutinně s běžnými postupy, které jsou známy odborníkovi z oboru.
- 5 Jak je diskutováno v této přihlášce, praktik může napojit k povrchu podle vynálezu, obsahujícímu danou matici (nebo matice) kotev, širokou řadu typů linkerů, čímž naprogramuje jakýkoliv soubor sond. Kromě toho může praktik odstranit určitý soubor linkerů z povrchu podle vynálezu a přidat k němu jiný soubor linkerů (buď stejný, nebo odlišný od prvního souboru), což umožní, že daný povrch se může několikrát opakovaně používat. Tato flexibilita a opakovatelná použitelnost představuje další výhody řešení podle vynálezu.
- 10
- 15

V dalším provedení mohou být kombinace podle vynálezu použity k mapování ESTů („Expressed Sequence Tags“). To znamená, že testy MAPS mohou být použity k rozpoznání, které ze skupin ESTů, pokud tam nějaké jsou, byly generovány z různých (nebo částečně se překrývajících) částí stejného genu (stejných genů), a které, pokud tam jsou nějaké, jsou nové. Obr. 18, 19, 20 a 21 ilustrují takový test, přičemž v tomto případě jde o stanovení, které ESTy, pokud že jsou nějaké, ze 16 jsou „navázány“ k běžnému genu. První stupeň testu (viz obr. 18) spočívá v sestavení matic, ve kterých každý z ESTů, které se mají stanovit, je reprezentován alespoň jednou oligonukleotidovou sondou, která tomu odpovídá. Někjaký počet matic ekvivalentních (nebo větší než) určitý počet ESTů, které se mají hledat, je rozloženo v oddělených oblastech (např. v jamkách) povrchu; v ilustračním případě povrch kombinace zahrnuje 16 jamek, z nichž každá obsahuje matici v 16 různých oligonukleotidů specifických pro EST, očíslovaný 1 až 16. Oligonukleotid, který „koresponduje“ EST (je „specifický pro EST“) je jedním, který je dostatečně komplementární k ESTu tak, že za zvolených přesných hybridizačních podmínek bude oligonukleotid hybridizovat specificky s tímto ESTem, ale ne s jinými ESTy, se kterými není spojen. Nukleotid korespondující s nějakým ESTem tohoto typu, se může vázat specificky (za optimálních podmínek) ke kódujícímu nebo nekódujícímu řetězci cDNA syntetizovanému z genu, ze kterého byl EST původně generován nebo k mRNA syntetizované z genu, z kterého byl původně EST generován. Faktory, které se mají řešit při navrhování oligonukleotidů a hybridizační parametry, které se mají optimalizovat za účelem dosažení specifické hybridizace, jsou diskutovány v této přihlášce na jiných místech. Za účelem sestavení matic se připravují molekuly linkeru, z nichž každá zahrnuje skupinu specifickou pro jednu z kotev generické matice plus skupiny obsahující oligonukleotidovou sondu, která koresponduje s jedním z ESTů, které se mají mapovat; a linkery jsou připojeny ke kotvám, jak je popsáno na jiných místech přihlášky.

20

25

30

35

40

45

V následujícím stupni se alikvotní podíl vzorku obsahujícího směs nukleových kyselin (např. mRNA nebo jednu řetězcovou nebo denaturovanou cDNA), který může obsahovat sekvence, které jsou komplementární k jedné nebo více oligonukleotidových sond, přidá ke každé z oblastí (jamek), které obsahují matici sond; pak se směs inkubuje za podmínek stanovitelných optimálně rutinním způsobem, čímž se umožní nukleové kyselině, aby se navázala na komplementární sondy. Jestliže je několik sond specifických na EST komplementárních k různým částem jedné nukleové kyseliny, musí potom se nukleová kyselina váže na každé takovéto místo v matici, na kterém jsou tyto sondy umístěny.

V následném stupni se různé detektory oligonukleotidů (v ilustračním příkladě jsou to detektory označované jako # 1 až 16) přidá ke každé oblasti (jamce) (viz obr. 19). Detektor nukleotidů se navrhne pro každé ESTy, které se mají mapovat. Každý detektor specifický pro EST odpovídá jiné (alespoň částečně se nepřekrývající) části EST než sonda oligonukleotidů, takže se sondy a detektory oligonukleotidů mezi sebou neinterferují. Tak např. ESTy označené na obr. 21, které korespondují s ESTy 1, 2 a 6 obrázků 18 až 20. Obr. 21 ukazuje, že ESTy #1 a #2 byly oba získány z genu X (jsou „navázány“), přičemž EST #6 byl získán z různých, nepřibuzných genů.

50

55

Jestliže alikvoty příkladu obsahující směs mRNA, včetně toho, který je generován v genu X, jsou inkubovány s maticí sond, znázorněnou na obr. 18 až 20, dojde k tomu, že mRNA genu X bude za optimálních podmínek hybridizovat na místě, kde jsou sondy 1 a 2 ale nebude hybridizovat na místech se sondou 6. (Pochopitelně každá mRNA musí být přidávána v molárním přebytku počítáno na sumu sond, se kterými může hybridizovat). Pokud se přidá detektor oligonukleotidu 1 k oblasti (jamce) 1 bude hybridizovat s genem s mRNA genu X, která je vázána na místě 1 a 2 matice sond, ale nebude hybridizovat na místě 6. Podobně, jestliže detektor oligonukleotidu 2 bude přidán k další jamce – řekněme jamce #2 – bude se také vázat na místech 1 a 2, ale nebude na místě 6. Tímto způsobem se dá determinovat ve vysoké rychlosti, které ESTy jsou navázány, tj. kód pro části stejného genu a které ESTy jsou nové nebo odlišné. Jako hypotetický příklad jsou na obr. 20 znázorněny první 3 ESTy kódující části stejného genu, posledních 5 ESTů kódujících části jiného genu a zbylé ESTy, které by se neměly navazovat. Podmínky hybridizace, popř. promývací stupně, metody detekce a pod. jsou diskutovány na jiných místech této přihlášky ve vztahu k jiným testům MAPS. Za účelem ověření údajů o vzniklých vazbách získaných MAPS testem se dají uskutečnit PCR reakce s použitím párů ESTově specifických oligonukleotidových sond jako sense a anti-sense primerů. Každý pár navázaných ESTů by měl poskytovat jako výtěžek PCR produkt. Je třeba poznamenat, že tyto párové PCR testy se dají provádět za účelem stanovení vazeb přímo bez použití navazovacích testů MAPS; nicméně mnoho reakcí by vyžadovalo, a každý primér EST by měl být syntetizován jako sense a antisense řetězec. V ilustrovaném případě by bylo vyžadováno 180 takových reakcí.

Podle jednoho aspektu se vynález týká způsobu stanovení, které ze souborů ESTů jsou komplementární k dané nukleové kyselině, při kterém se

- a) inkubuje imobilizovaná matice oligonukleotidových sond, alespoň jedna z kterých odpovídá každému uvedenému ESTu, s testovacím příkladem, který může obsahovat určitou uvedenou nukleovou kyselinu, za účelem získání hybridizačního produktu mezi uvedenými oligonukleotidovými sondami a uvedenou nukleovou kyselinou,
- b) inkubuje uvedený hybridizační produkt s detektorem oligonukleotidu, který koresponduje s nějakým ESTem, se kterým koresponduje jedna z uvedených oligonukleotidových sond, ale který je specifický pro jinou část EST, než uvedená oligonukleotidová sonda a
- c) detekuje se která oligonukleotidová sonda z uvedené matice je označena uvedeným detektorem oligonukleotidu,

příčemž uvedená matice oligonukleotidových sond se imobilizuje na oblasti tvořené kombinací, příčemž uvedená kombinace zahrnuje

- 1) povrch obsahující určité množství oddělených v podstatě identických oblastí, ekvivalentní počtu ESTů, které se mají studovat, příčemž každá oblast zahrnuje
- 2) určitý počet různých kotev ekvivalentních k určitému počtu ESTů, který se má studovat, příčemž každá kotva je spojena s
- 3) bifunkčním linkerem, který má první část, specifickou pro kotvu a druhou část, která obsahuje oligonukleotidovou sondu, která koresponduje alespoň s jedním s uvedených ESTů.

V dalším aspektu se vynález týká způsobu jako shora, při kterém jeden nebo více z uvedených ESTů může být komplementární k uvedené nukleové kyselině a kde každý z uvedených ESTů zahrnuje dvě různé oligonukleotidové sekvence, z nichž první definuje oligonukleotidovou sondu korespondující s uvedeným ESTem a druhá definuje detektor oligonukleotidu korespondující s uvedeným ESTem, při kterém se

- a) uvádí do kontaktu vzorek, obsahující molekuly uvedených nukleových kyselin s alespoň jednou oblastí kombinace, při čemž uvedená oblast obsahuje matici oligonukleotidových sond, alespoň jedna z nichž koresponduje s každým z uvedených ESTů,
- 5 b) indikuje se uvedený vzorek s uvedenou oblastí, čímž se umožní molekulám uvedené nukleové kyseliny navázat se na uvedené oligonukleotidové sondy specifické korespondující s určitými ESTy, které jsou komplementární k části uvedené nukleové kyseliny,
- 10 c) inkubuje se zmíněná oblast obsahující molekuly uvedené nukleové kyseliny navázané na jednu nebo více uvedených oligonukleotidových sond specifických korespondujících s EST s detektorem oligonukleotidu, který koresponduje s ESTem, se kterým je daná jedna oligonukleotidová sonda uvedené matice je spojena, čímž se naváže detektor oligonukleotidu k molekulám nukleových kyselin, které se již navázaly na uvedenou oligonukleotidovou sondu nebo na jinou oligonukleotidovou sondu, které jsou komplementární k uvedené nukleové kyselině,
- 15 d) detekuje se přítomnost uvedeného detektoru oligonukleotidů, čímž se identifikuje, která z oligonukleotidových sond korespondujících s EST z dané matice je komplementární k části nukleové kyseliny, která se váže na uvedenou sondu pro oligonukleotid korespondující s EST, čímž se identifikuje, které ESTy jsou komplementární k dané nukleové kyselině, přičemž uvedená matice oligonukleotidových sond je imobilizována na oblasti kombinace, která zahrnuje
- 20 1) povrch obsahující určitý počet oddělených, v podstatě identických oblastí, ekvivalentních k určitému počtu ESTů, které se mají studovat, přičemž každá oblast obsahuje
- 25 2) určitý počet odlišných kotev ekvivalentních k určitému počtu ESTů, které se mají studovat, přičemž každá kotva je spojena
- 30 3) bifunkčním linkerem, který má část specifickou pro kotvu a druhou část, která obsahuje oligonukleotidovou sondu, která koresponduje s alespoň jedním z uvedených ESTů. Komponenty testu pro mapování EST se mohou sestavovat v libovolném pořadí. Tak např. kotvy, linkery a ESTy se mohou sestavovat sekvenčně; nebo linkery a ESTy za přítomnosti nebo v nepřítomnosti hlásičů, se mohou sestavovat v roztoku a pak přidat ke kotvám.
- 35 V jiném aspektu se vynález týká způsobu stanovení, který z řady ESTů je komplementární k dané nukleové kyselině, při kterém se,
- 40 a) inkubuje soubor bifunkčních oligonukleotidových linkerových molekul, z nichž každá obsahuje první část, což je sonda, korespondující s alespoň jedním z uvedených ESTů a druhou část, která je specifická pro oligonukleotidovou kotvu, s testovaným vzorkem, který může obsahovat uvedenou nukleovou kyselinu, za účelem získání prvního hybridizačního produktu mezi uvedenými oligonukleotidovými sondami a uvedenou nukleovou kyselinou,
- 45 b) inkubuje první hybridizační produkt s imobilizovanou maticí oligonukleotidových kotev, přičemž každá kotva oligonukleotidu koresponduje s částí specifickou pro kotvu alespoň jedné uvedené molekuly linkeru, čímž se vytvoří druhý hybridizační produkt, který obsahuje uvedené kotvy, uvedené oligonukleotidové sondy a uvedené nukleové kyseliny a
- 50 c) inkubuje buď uvedený první, nebo uvedený druhý hybridizační produkt s oligonukleotidovým detektorem, který koresponduje s ESTem, s kterým koresponduje uvedená oligonukleotidová sonda, ale který je specifický pro jinou část ESTu, než je uvedená oligonukleotidová sonda a

- d) detekuje se, které oligonukleotidové sondy z uvedené matice jsou označeny zmíněným oligonukleotidovým detektorem,

příčemž uvedená matice kotev oligonukleotidů se imobilizuje na oblasti kombinace, která obsahuje

- 1) povrch obsahující určitý počet vzájemně oddělených v podstatě identických oblastí ekvivalentních počtu ESTů, které se mají studovat, přičemž každá oblast obsahuje

- 2) určitý počet odlišných kotev ekvivalentních ESTů, které se mají studovat.

Pochopitelně shora zmíněné metody pro mapování ESTů se dají použít k mapování testovaných sekvencí (např. polynukleotidů) na jakékoliv nukleové kyselině, o kterou je zájem. Tak např. se dá stanovit, jestli dva nebo více klonovaných DNA fragmentů nebo cDNA map patří stejné genomické DNA. Takovýto postup by mohl přispět např. k objasnění struktury dlouhých, komplexních genů. Podobným způsobem se dá stanovit, zda je jedna nebo více sekvencí, které jsou vzájemně propleteny nebo mapy kódujících sekvencí, příslušná ke stejné genomické DNA. Takovéto stanovení by se mohlo používat např. při diagnostických testech k rozlišení mezi normálními a chorobnými stavy, které jsou charakterizovány odlišně spředenými sestavami. Mnoho dalších aplikací těchto mapovacích metod je evidentní těm, kteří se zabývají tímto oborem.

V dalším aspektu se vynález týká způsobu stanovení, které z řady polynukleotidů jsou komplementární k dané nukleové kyselině, kde jeden nebo více uvedených polynukleotidů může být komplementární k uvedené nukleové kyselině a kde každý z uvedených polynukleotidů obsahuje dvě různé oligonukleotidové sekvence, z nichž první definuje oligonukleotidovou sondu, korespondující s uvedeným polynukleotidem a druhý definuje detektor oligonukleotidu korespondující s uvedeným polynukleotidem, při kterém se

- a) uvádí do kontaktu vzorek, který zahrnuje molekuly uvedených nukleových kyselin s alespoň jedním regionem dané kombinace, přičemž tento region obsahuje matici oligonukleotidových sond, z nichž alespoň jedna odpovídá každému z uvedených polynukleotidů,

- b) inkubuje uvedený vzorek s uvedeným regionem, čímž se umožní molekulám uvedené nukleové kyseliny navázat se na uvedené oligonukleotidové sondy, odpovídající uvedenému polynukleotidu, které jsou komplementární k částem uvedené nukleové kyseliny,

- c) inkubuje uvedený region, obsahující molekuly uvedené nukleové kyseliny, vázané na jednu nebo více oligonukleotidových sond, odpovídajícím polynukleotidu, s detektorovým oligonukleotidem, které odpovídají polynukleotidu, se kterým koresponduje konkrétní jedna z oligonukleotidových sond uvedené matice, čímž se naváží detektorové oligonukleotidy na molekuly nukleových kyselin, které jsou již navázány na danou oligonukleotidovou sondu nebo na jiné oligonukleotidové sondy, které jsou komplementární uvedené nukleové kyselině,

- d) detekuje se přítomnost uvedených detektorových oligonukleotidů, čímž se identifikuje, které oligonukleotidové sondy, odpovídající polynukleotidu, z uvedené matice jsou komplementární částem nukleové kyseliny, která se váže k uvedené dané oligonukleotidové sondě, odpovídající polynukleotidu, a tím se identifikuje, které polynukleotidy jsou komplementární k uvedené dané nukleové kyselině,

příčemž uvedená matice kotev oligonukleotidů se imobilizuje na oblasti kombinace, která obsahuje

- 1) povrch obsahující určitý počet vzájemně oddělených, v podstatě identických oblastí ekvivalentních počtu polynukleotidů, které se mají studovat, přičemž každá oblast obsahuje

- 2) určitý počet různých kotev, ekvivalentních polynukleotidům, které se mají studovat, přičemž každá kotva je ve spojení s
- 5 3) bifunkčním linkerem, který má první část specifickou pro kotvu a druhou část, která obsahuje oligonukleotidovou sondu, která odpovídá nejméně jednomu z uvedených polynukleotidů.

Podle dalšího aspektu vynálezu zahrnují shora uvedené způsoby k mapování ESTů nebo jiných polynukleotidů dále ještě odstraňování nenavázaných podílů vzorku mezi jedním nebo více
10 stupni.

V dalším provedení podle vynálezu se jeden nebo více RNA cílů, o které jde (např. mRNA nebo jiných typů RNA) převádí na cDNA reverzní transkriptázou a tyto cDNA se potom hybridizují na matici sond. Tento typ testů je ilustrován schematicky na obr. 8. RNA extrakty (nebo čištěná
15 mRNA) se připravují z buněk nebo tkání jak je zde popsáno. Reverzní transkriptáza a oligonukleotidové priméry, které jsou specifické pro tyto RNA, o které je zájem, se pak přidávají k vzorku RNA a s použitím podmínek, které jsou v oboru známy a způsobu, které se mohou provést rutinně i optimalizovat, se generuje první řetězec cDNA. Termín specifický primér znamená, že je to takový, který je dostatečně komplementární k mRNA, o který je zájem, při
20 navázání na tuto RNA za zvolených přísně hybridizačních podmínek a může být rozpoznán reverzní transkriptázou, ale který se naváže na nežádoucí nukleové kyseliny (viz shora např. diskuse o vhodných reakčních podmínkách k dosažení specifické hybridizace). Reziduální RNA – mRNA, které nebyly rozpoznány specifickými priméry a/nebo jinými typy kontaminujících RNA v NA extraktu, jako jsou např. tRNA nebo rRNA – se mohou odstranit jakoukoliv varietou
25 ribonukleáz nebo chemickými postupy, jako je např. působením alkalické látky, odštěpující zadní jednoduchý řetězec cDNA, která se v podstatě uvede do kontaktu s maticí MAPS. Použití reverzní transkriptázy v tomto způsobu minimalizuje potřebu extenzivního nadměrného manipulování s RNA, která může být senzitivní k degradaci nukleázami a tak se s ní pracuje velmi špatně. Dále přídatná specifika, která se dosahuje specifickými priméry reverzní transkriptázy,
30 dodává testu další vrstvu specifčnosti.

Shora popsané cDNA se mohou popřípadě také namnožit před hybridizací, čímž se zesílí signál matice sond. Priméry oligonukleotidové reverzní transkriptázy popsané shora mohou obsahovat na 5' zakončení sekvence (které mohou být zhruba 22 až 27 nukleotidů dlouhé), které specifikují
35 iniciační místa pro RNA polymerázu (např. T7, T3 nebo SP2 polymerázu nebo podobně). V příkladě znázorněném na obr. 8 byl přidán T7 promotor sekvence k priméru reverzní transkriptázy. Místo rozpoznávající polymerázu se vkládá do cDNA a pak slouží jako rozpoznávací místo pro řadu transkripcí vhodnou RNA polymerázou (in vitro transkripce neboli „IVT“). Popřípadě se může mRNA, která byla takto generovaná, namnožit nebo zesílit dále
40 s použitím PCR a vhodných primérů nebo cDNA sama o sobě se může také zesilovat. Způsoby transkripce a PCR jsou rutinní a v oboru jsou dostatečně známy.

Flexibilita PCR umožňuje mnoho variant způsobu podle vynálezu. Při jednom provedení tvoří jeden nebo oba priméry, které se používají k zesilování cíle, chemická úprava, která umožňuje
45 specifické nebo nespecifické připojení výsledného PCR produktu k pevnému podkladu. Takovou chemickou úpravou může být například 5'-amidace, která umožňuje vazbu k povrchu podkladu jako jsou například destičky „Costar's DNA Bind Plates“, (například takových, které jsou modifikovány N-oxysukcinimidesterem) nebo maleinanhydridem potažené destičky jako jsou „Reacti-Bind plates“ od firmy Pierce, Rockford, IL). Způsoby vytváření oligonukleotidů jsou rutinní a
50 v oboru známy. PCR produkt, zahrnující takový modifikovaný primér, může být navázán k jakémukoliv požadovanému podkladu, včetně pevného podkladu, například k vnitřním stěnám mikrotitrové jamky, tělískům (například nemagnetickým nebo nemagnetickým tělískům) nebo k jakýmkoliv povrchům zde popsaným. Pochopitelně může být PCR primér také navázán na podklad dříve, než se iniciuje PCR reakce. Několik cyklů PCR se může opakovat bez promývání,
55 ale s přebytkem navázaného priméru, aby výsledný produkt zůstal navázaný k podkladu. Toto

připojení zesílené cílové sekvence usnadňuje promytí (nebo čištění) cíle, buď před jeho uvedením do kontaktu (například hybridizací s tímto povrchem) s podkladem obsahujícím kotvy a/nebo linkery, nebo po jeho uvedení do tohoto kontaktu s následným uvolněním z takového povrchu. V jiném provedení může jeden nebo oba priméry, používané pro zesílení cíle, obsahovat jedno
 5 nebo více míst pro restrikční enzym, která umožňují zavedení restrikčních míst, přiléhajících buď ke konci, (nebo k jeho blízkosti) cílové sekvence, která je hledána. Restrikční místa se mohou dodat do zesíleného cíle pomocí PCR buď před jeho uvedením do kontaktu (například za účelem hybridizace s tímto povrchem) s podkladem obsahujícím kotvy a/nebo linkery, nebo po jeho uvedení do tohoto kontaktu. Restrikční místo(místa), zavedené(á) například tímto způsobem,
 10 mohou usnadnit klonování zesíleného cíle, poskytnutím klonovacích míst, která sousedí s cílovou sekvencí. Restrikční místa také mohou usnadnit čištění zesílené sekvence. Tak například se může jedna nebo několik restrikčních míst umístit v PCR priméru mezi cílově specifickou sekvencí a chemickou úpravu, která umožňuje připojení k podkladu. Po PCR zesílení nějakého cíle pomocí modifikovaného PCR priméru a navázání k podkladu přes chemickou úpravu se může
 15 kombinace promýt a pak rozštěpit v restrikčním místě (v několika restrikčních místech), čímž se uvolní promytý cíl. Viz například obrázek 23.

Při způsobech popsaných shora se pochopitelně dají použít jiná štěpitelná místa než jsou místa pro restrikční enzymy, například se dá použít peptid, který se pak štěpí specifickou proteázou,
 20 nebo se dá použít jiný komponent, který se dá štěpit a/nebo uvolnit fyzikálními, chemickými a/nebo jinými prostředky.

V jiném provedení obsahuje nejméně jeden z primérů, který se používá k zesílení cíle, sekvenci (která nemusí nutně být přítomna v cíli), která je specifická pro, například, pro cílově specifický
 25 hlásič nebo detekční linker.

Shora uvedené modifikace priméru mohou být pochopitelně použity spolu s jakoukoliv požadovanou kombinací, a mohou se přidat do zesíleného produktu v jakékoliv fázi testu.

30 Shora popsaný způsob, při kterém se mRNA cíle převedou na cDNA působením reverzní transkriptázy a/nebo se zesílí pomocí PCR před testováním na MAPS destičkách, se dá použít místo standardního MAPS testu pro jakoukoliv soustavu testů založených na RNA, které je shora popsaná.

35 V jiném provedení podle vynálezu se jeden nebo více cílů na bázi nukleových kyselin, o které je zájem, hybridizují se specifickým polynukleotidovým chránicím fragmenty a podrobí se nukleázové ochranné proceduře a tyto chrání fragmenty, které jsou hybridizované s cílem (s cíly), o který(é) je zájem, se pak testují na destičkách MAPS. Jestliže je cílem zájmu RNA a ochranným fragmentem je DNA, může nukleázová ochrana při MAPS testu („NPA-MAPS“) snížit
 40 náročnost na nadměrnou manipulaci s RNA, která může být citlivá na degradaci kontaminujícími nukleázami, a tím může způsobovat těžkosti při manipulaci. V takovéto NPA-MAPS testu jsou sondami v matici oligonukleotidy o stejném zřetězení jako cílové nukleové kyseliny, o které je zájem, což je výhodnější než když jsou k nim komplementární jak je tomu ve standardním MAPS testu. Jedním příkladem testu NPA-MAPS je příklad, který je schematicky znázorněn na obr. 9.

45 Při testu NPA-MAPS může být cílem zájmu jakákoliv nukleová kyselina např. genomická DNA, cDNA, virová DNA nebo RNA, rRNA, tRNA, mRNA, oligonukleotidy, nukleové kyselinové fragmenty, modifikované nukleové kyseliny, syntetické nukleové kyseliny nebo podobně. Ve výhodném provedení podle vynálezu je používán způsob, který testuje jeden nebo více cílových
 50 mRNA, které jsou přítomny v tkáni nebo extraktu buněčné RNA. Vzorek, který obsahuje cíl (nebo cíle) zájmu se nejprve hybridizuje za zvolených přesných podmínek (viz shora diskuse o vhodných reakčních podmínkách pro dosažení specifické hybridizace) s jedním nebo více ochrannými fragmenty. Ochranným fragmentem je polynukleotid, který může být např. RNA, DNA (včetně PCR produktu), PNA nebo modifikované nebo substituované nukleové kyseliny,
 55 které jsou specifické pro část nukleové kyseliny, která je cílem zájmu. Termínem „specifický“

ochranný fragment je míněn polynukleotid, který je dostatečně komplementární k příslušnému zvolenému vaznému partnerovi, aby se za přesných zvolených podmínek navázal, ale aby se nenavazoval k ostatním nukleovým kyselinám, o které není zájem. Ochranný fragment může mít délku nejméně 10 nukleotidů, výhodně má délku 50 až asi 100 nukleotidů nebo je asi tak dlouhý jako celá cDNA. Ve výhodném provedení jsou ochranné fragmenty jednořetězcové DNA oligonukleotidy. Ochranné fragmenty specifické pro 100 cílů nebo více mohou vznikat jednou hybridizační reakcí. Po hybridizaci se vzorek ošetří směsí jedné nebo více nukleáz tak, aby zničily v podstatě všechny nukleové kyseliny s výjimkou ochranných fragmentů, které byly hybridizovány s nukleovými kyselinami, o které je zájem a (po případě) s částmi cílových nukleových kyselin, které byly hybridizovány a chráněny před napadením nukleázou v průběhu procedury nukleázového chránění (jsou ve zdvojeném hybridu). Např. jestliže vzorek obsahuje buněčný extrakt, nežádoucích nukleových kyselin, jako jsou genomické DNA, tRNA, rRNA a mRNA, které jsou jiné než cílové, mohou být tyto látky v podstatě v tomto stupni zničeny. Jakákoliv varieta nukleáz se dá v tomto případě použít, a to včetně pankreatických RNA z nukleázy fazolí, S1 nukleázy, RNAzy A, ribonukleázy T1, exonukleázy III nebo pod., podle povahy hybridizovaných komplexů a podle nežádoucích nukleových kyselin, které jsou přítomny ve vzorku. RNAza H se může např. použít pro odstranění zbytkové navázané RNA na DNA chránicím fragmentu. Reakční podmínky pro tyto enzymy jsou velmi dobře známy a mohou být optimalizovány empiricky. Také lze použít chemických postupů jako je např. alkalická hydrolyza RNA. Jak je požadováno, vzorky mohou být zpracovány dále známými způsoby, pomocí kterých se odstraní nehybridizovaný materiál a/nebo se inaktivují odstraněné zbytkové enzymy (např. extrakcí fenolem, srážením, filtrací na koloně atd.). Proces hybridizace, který je následován nukleázou digescí a (popřípadě) chemickou degradací, se nazývá nukleázová chránicí procedura; tyto chránicí procedury již byly popsány (viz např. Lee et al (1978). Meth Enzymol. 152 633–648. Zinn et al (1983). Cell 34, 865–879). Vzorky se zpracují nukleázovou ochranou, pak následuje (popřípadě) procedura inaktivace nukleáz a pak se uvedou do kontaktu s maticí sond MAPS a provedou se obvyklé kroky testu na MAPS. Navázané chránicí fragmenty se mohou detekovat hybridizací, za účelem značení cílově specifických hlásičů, jak je popsáno zde pro standardní MAPS testy, nebo mohou být chránicí fragmenty samy o sobě značeny, kovalentně nebo nekovalentně, pomocí detekovatelné molekuly.

Ve výhodném provedení se přímo značí chránicí fragment, což je lepší než když se značí hybridizační s cílově specifickým hlásičem. Tak např. hlásič je navázán na ochranný fragment pomocí interakce ligand – antiligand, např. streptavidinový enzymový komplex se přidá k biotinylovanému chránicímu oligonukleotidu. V jiném případě se ochranný fragment modifikuje chemicky (např. přímou kopulací koňské peroxidázy (HRP) nebo fluorescenčního barviva) a tato chemická modifikace se detekuje, buď s pomocí části nukleové kyseliny chránicího fragmentu, nebo bez ní (např. po štěpení modifikace řekněme enzymaticky nebo chemicky). V jakékoliv ze shora uvedených metod se ochranný fragment značí před nebo po hybridizaci s korespondující molekulou linkeru.

Za účelem kontroly, že nukleázová ochranná procedura funguje správně, tj. že nehybridizované nukleové kyseliny byly digestovány jako nežádoucí, se dá navrhnout jeden nebo více ochranných fragmentů, který by obsahoval anti-sense (nehybridizovaný) segment, který by se štěpil nukleázou v případě, že procedura pracuje správně. Přítomnost nebo absence takového opačně fungujícího kontrolního fragmentu se pak dá stanovovat komplementární hybridizací, značenou detekční sondou nebo anti-sense dílem chránicího fragmentu, který může být jako takový značen, kovalentně nebo nekovalentně, pomocí detekovatelné molekuly. Tato kontrola se může provádět před tím, než je vzorek uveden do kontaktu s maticí sond, nebo jako část testů MAPS jako takových. Příkladem takového kontrolního testu je test popsáný v příkladu 15. Pochopitelně vzhledem k tomu, že různé značení se může snadno rozpoznat (např. fluory s různým absorpčním spektrem) je v tomto testu zahrnuto několik možných různých značených oligonukleotidů. Dále se dá v průběhu vývoje testu použít standardní nukleázový chránicí test, který využívá analýzy gelovou elektroforézou, čímž se ověří, že chránicí fragmenty jsou využity a uplatňují se dle očekávání.

Po detekci cílů se může signál detekční sondy (například HRP–značené) eliminovat (například denaturací, zabitím, ochlazením, supresí, blokováním), promytím destiček se odstraní veškeré zbytky reakčních činidel, aktivních látek nebo pufrů, které by mohly rušit následující krok (například denaturačním činidlo), a pak se to co zůstalo může detekovat odlišnou detekční sondou (například opět značenou HRP). Po aplikaci denaturace signálu se může v kterékoliv fázi testu provést navázání odlišné sondy se stejnou signální skupinou. Použití dvou různých fluorescenčních sond a dvoubarevné detekce je možné i bez denaturace či blokování signálu.

NPA–MAPS testy se mohou použít ke kvantifikaci množství cíle ve vzorku. Pokud se přidá chránicí fragment ve velkém molárním přebytku oproti cíli za účelem dosažení zcela kompletního průběhu hybridizační reakce, množství chránicího fragmentu, které zůstává po stupni nukleázové ochrany, bude ovlivněno tím, jak mnoho cíle je přítomno ve vzorku. Příkladem takové reakce pro kvantitativní stanovení jsou příklady 12 a 13.

NPA–MAPS testy se mohou použít k implementaci jakýchkoliv metod, popsanych shora, které využívají MAPS testů.

Ve výhodném provedení se polynukleotidové chránicí fragmenty měří hmotnostním spektrometrem, což je výhodnější než na MAPS destičkách. V nejvýhodnějším provedení se v průběhu hybridizace nebo v průběhu stupňů nukleázové digesce nenavazují žádné polynukleotidy (připojené) k pevnému povrchu. Po hybridizaci se hybridizační cíl degraduje, např. nukleázou nebo chemickým zpracováním, přičemž se odštěpí chránicí fragment ve stejném poměru v jakém byl hybridizován s cílem. Alternativně se dá postupovat tak, aby se odštěpila (jednořetězcová) hybridizační část cíle, nebo se vytvoří duplex hybridizací cíle a chránicího fragmentu, který se dále analyzuje. Vzorky, které se mají analyzovat, se oddělí od zbytku hybridizační a nukleázové směsi (např. srážením etanolem nebo adsorpcí nebo afinitní chromatografií atd.), eluují nebo se rozpustí a vsříknou se do hmotnostního spektrometru opakovací tryskou pro vysoký výkon. Ve výhodném provedení, které se mají analyzovat (např. ochranné fragmenty) adsorbují k povrchu a analyzují se laserovou desorpcí, přičemž se používá velmi dobře známých metod z oboru. Pro dosažení vysoké citlivosti se použije spektrometru Fourier Transform Mass Spectrometry (FTMS) nebo jiného podobného zařízení vyspělé techniky, tak aby se mohl detekovat fragment množství na úrovni femtomolů nebo méně.

Ochranné fragmenty, které se mají v jednom nebo více vzorcích detekovat se mohou navrhnout tak, aby poskytovaly jediný signál pro hmotnostní spektrometr, který se používá. V jednom z možných provedení každý z ochranných fragmentů má stejnou molekulovou hmotnost po hybridizaci a ošetření nukleázou, a jejich molekulové hmotnosti a ionizační vlastnosti a průběh fragmentace jsou dostatečné k měření jejich koncentrace. Aby se dosáhlo zvýšení senzitivity a zlepšila se analýza komplexních směsí, mohou se chránicí fragmenty modifikovat (např. se mohou připravovat jejich deriváty) pomocí chemických skupin, které se volí tak, aby poskytovaly čistý jednotný signál. Tak např. každý ochranný fragment se může přeměnit na derivát působením jiné přírodní nebo nepřirodní aminokyseliny, která se připojí přes amidovou vazbu na oligonukleotidový řetězec v jedné nebo více polohách podél hybridizační části řetězce. S pomocí hmotnostního spektrometru o vhodné energii se projeví fragmentace na amidových vazbách, uvolní se charakteristické části aminokyselin. Tento typ přístupu, při kterém se používají chemické skupiny s oderovanou velikostí (zhruba o molekulové hmotnosti 80 až 200) se používá při hmotnostní spektrometrii zakončení a je žádoucí, neboť molekuly o této velikosti se obecně snadněji detekují. V jiném příkladě se chemická modifikace organické molekuly s definovaným spektrometrickým signálem jako je tetraalkylamoniová skupina, která může být např. odvozena od jiné molekuly, jako je např. aminokyselina. V jiném případě je pozitivní nebo negativní iontový signál zesilován reakcí s jakýmkoliv počtem činidel. Tak např. ke zvýšení detekce pozitivního iontu se dá použít reakce pyriliové soli (jako je např. 2–4–diethenyl, 6–ethyl–pyryliumtetrafluorborát nebo mnoho dalších) s aminem, čímž se vytvoří pyridinové soli; lze také použít jakákoliv jiná podpůrná činidla, která pozitivně ovlivní funkční skupiny (viz např. Quirke et al (1994). Analytical Chemistry 66, 1302–1315). Podobně se může uvést do reakce jakýkoliv počet v oboru

známých činidel, který podporuje vytvoření negativního iontu. Chemická modifikace se může detekovat pochopitelně buď po odštěpení od nukleové kyseliny, nebo při asociaci s nukleovou kyselinou. Umožněním každého chránícího fragmentu, aby byl identifikován odlišným způsobem, je také možné testovat (např. provádět screening) velký počet různých cílů (např. 2, 6, 10, 16 nebo více odlišných cílů) v jediném testu. Mnoho takových testů se dá provádět rychle a snadno pomocí vynálezu se takovéto testy nebo soubory testů mohou provádět, neboť se dosahuje vysokého výkonu, jak je zde definováno.

Pokud jde o případy, kdy se oligonukleotidy detekují přímo pomocí jejich hmotnosti nebo v případě, že se použijí vzácná molekulární zakončení, signály každé molekuly, která se má detekovat, lze plně charakterizovat v čistých preparátech o známých koncentracích. To umožňuje pro každý signál kvantifikovat (měřit, kvantitativně stanovit) přesně. Pro každou molekulu, která se má detekovat pomocí hmotnostní spektrometrie se nemůže intenzita a profil vždy předem předpovědět přesně. Tato tendence molekul k ionizaci, citlivost všech chemických vazeb uvnitř molekuly na fragmentaci, stupeň, ve kterých se každý fragment multiplikuje nebo na jeden nebo dva náboje se pro všechny komplexy může předpovědět. Nicméně při použití určitého daného zařízení se stálou energií a s určitou charakteristikou zpracování vzorku jsou intenzita a profil signálu velmi reprodukovatelné. Z těchto důvodů lze charakterizovat pro každou sondu signál pomocí čistých standardů a signál, který poskytuje experiment lze velmi přesně kvantifikovat.

Podle jednoho aspektu se vynález týká způsobu detekce jedné nebo více nukleových kyselin, o které je zájem analyzovat, při kterém se podrobí vzorek obsahující nukleové kyseliny, o které je zájem analyzovat, nukleázové ochráně jedním nebo více chránícími fragmenty a detekci hybridizovaného duplexu molekul nebo chráněné nukleové kyseliny nebo chránícího fragmentu, pomocí hmotnostní spektrometrie.

Způsoby analyzování nukleových kyselin hmotnostní spektrometrií jsou v oboru dobře známé. Viz např. Alper et al (1998). Science 279, 2044–2045 and Koster, Pat. US 5 605 798.

Kromě toho, že lze využít řadu vysoce výkonných testů shora popsanych, je evidentní pro odborníka v oboru, že lze využívat i mnoho dalších.

Výhodou k používání multisonďových testů je schopnost začlenit řadu „kontrolních“ sond do každé matice sond, která se podrobuje stejným reakčním podmínkám jako funkční experimentální sondy. Tak např. každá oblast v matici může obsahovat pozitivní a/nebo negativní kontroly. Termín „pozitivní kontrolní sonda“, se zde používá v takovém významu, že znamená kontrolní sondu, která je známá např. tím, že výrazně interaguje s cílem nebo interaguje s cílem v kvantitativním nebo kvalitativně známým způsobem, čímž působí jako (interní) standard pro interakci sonda/cíl. Takováto sonda může např. kontrolovat hybridizační účinnost. Termín „negativní kontrolní sonda“ se zde používá tak, že má význam kontrolní sondy, které mohou např. kontrolovat hybridizační specifitu. Jako příklady typů kontrol, které se dají použít za předpokladu, že se provádí test, při kterém se používá matice oligonukleotidových sond k screeningu na činidla modulující expresi souboru korelativních genů na určitou chorobu. Jako interní normalizační kontrola pro proměnné jako je počet rozložených buněk u každého vzorku, spotřeba mRNA nebo hybridizační účinnost může matice sond zahrnovat sondy, které jsou specifické pro jednu nebo více základních hladin nebo konstitutivních domácích genů, jako jsou strukturální geny (např. aktin, tubulin nebo jiné) nebo DNA vazné proteiny (např. transkripci regulující faktory nebo jiné), jejichž exprese se neočekává, že by měla být modulována činidly, která se testují. Dále aby se zjistilo, zda činidla, která se testují, způsobují nežádoucí vedlejší efekty, jako je např. usmrcování buněk nebo toxicita, může obsahovat matice sondy, které jsou specifické pro geny, které jsou známy tím, že jsou indukovány jako součást procesu apoptózy (programované smrti buněk) nebo které jsou indukovány za podmínek poranění buněk (např. proteiny tepelného šoku) nebo buněčnou toxicitu (např. geny p450).

V matici mohou být za účelem „jemného doladění“ zahrnuty také jiné kontroly sondy, aby se jemně doladila citlivost testu. Tak např. pokud se jedná o test na činidla, které modulují produkci mRNA spojených s určitým chorobným stavem. Jestliže předchozí analýza indikovala, že jedna z korelativních mRNA (řekněme mRNA-A) v souboru je produkována v takto velkých množstvech ve srovnání s jinými, že její signály vyzařují jiné mRNA, mohou se linkery nastavit na „jemné ladění“ testu tak, aby byly vyrovnány síly těchto jednotlivých signálů. „Blokované linker-y“, které zahrnují oligonukleotidové sekvence specifické pro kotvu, navržené na mRNA-A cíl, ale kde chybí sekvence specifická pro sondu, se mohou přidat k roztoku směsi určitých cílově specifických linkerů a tak snížit citlivost testu vůči této mRNA. Vhodné poměry blokováných a neblokováných linkerů se dají stanovit rutinním způsobem, konvenčními metodami, které mohou provést odborníci v oboru.

„Jemné ladění“ testu pro určitý cíl zředením aktivního elementu neaktivním elementem se také může provést v jiných fázích testu. Tak například se může provést na úrovni detekce zředením značeného, cílově-specifického hlásiče „inaktivním“ cílově-specifickým hlásičem, například takovým, který má stejnou cílově-specifickou skupinu (například oligonukleotidová sekvence), ale bez signalizační entity nebo s deaktivovanou nebo inaktivní formou signalizační entity. Termín „signalizační entita“, jak je zde používán, znamená značení, charakteristický zbytek, molekula nebo jakákoliv látka, která emituje detekovatelný signál nebo je schopna takový signál generovat. Může to být například fluorescenční molekula, luminiscenční enzym nebo jakákoliv varianta signalizační entity, která je zde zmíněna. V mimořádně výhodném provedení se dá „jemné doladění“ provést ve stupni, ve kterém se uvádí do kontaktu komplex, obsahující cíl, s detekčním linkerem (detekční linkery jsou popsány dále, například v části popisu, která se týká detekčních metod, využívajících vrstvené komplexy, příklad 23 a obrázek 24). Soubor detekčních linkerů se dá navrhnout například tak, aby se dosáhlo jemného vyladění citlivosti na každý jednotlivý cíl, hledaný v testu. Tak například jestliže o určitém cíli je známo, že je přítomen ve vzorku ve velmi vysokých koncentracích, může se detekční linker pro tento cíl zředit empiricky-stanovitelným množstvím „blokováného detekčního linkeru“, který obsahuje skupinu, specifickou pro tento cíl (například oligonukleotidovou sekvenci), ale neobsahuje žádnou skupinu, specifickou pro hlásící činidlo (reportér), nebo obsahuje skupinu, specifickou pro skupinu, specifickou pro hlásící činidlo, která byla již předem navázána na inaktivní hlásící činidlo. To znamená, že místo skupiny, specifické pro hlásící činidlo, může tato skupina chybět nebo jí může být zabráněno (například blokováním) v interakci (například hybridizaci) s hlásícím činidlem. Toto „jemné ladění“ bývá někdy označováno jako „zeslabování“.

Příklady, které se mají testovat v testu podle vynálezu mohou být jakékoliv cíle shora popsané, nebo jiné. Kapalné vzorky, které se mají testovat, mohou mít jakýkoliv vhodný objem a velikost testované oblasti se může pohybovat od asi 100 nanolitru do asi 100 mikrolitru. Ve výhodném provedení se tekuté kapky asi 1 mikrolitru nanášejí do každé jamky z 1536 jamkového mikrotitrové destičky. Vzorky se mohou umístit do kontaktu s maticemi sond pomocí jakéhokoliv typu metody vhodné pro vysoce výkonnou analýzu, např. pipetování, nastříkávání pomocí replikačních jehlových zařízení. Vzorky se inkubují za podmínek (např. koncentrace soli, pH, teplota, doba inkubace, atd. viz shora) efektivní k dosažení vazby nebo jiné stabilní interakce sondy a cíle. Tyto podmínky jsou stanovitelné rutinním způsobem. Po inkubaci se vzorky popřípadě ještě nějak ošetří (např. promyjí), aby se odstranil nenavázaný cíl, pomocí podmínek, které jsou determinovány empiricky se ponechají specifické interakce, ale odstraní se nespecificky vázaný materiál. Tak např. vzorky se mohou promýt mezi jednou až desetkrát nebo víckrát stejným nebo poněkud více přesně stanoveným roztokem, který se používá k dosažení vazby sonda/cíl.

Vzorky obsahující cílové RNA, např. mRNA, rRNA, tRNA, virovou RNA, celkovou RNA, se mohou připravovat jakýmkoliv typem způsobu. Tak např. buněčné kultury in vitro, ze kterých se extrahuje mRNA se mohou umísťovat na povrchu oblasti jako jsou individuální jamky nebo mikrotitrové destičky. Po případě tyto buňky mohou po dosažení žádané buněčné hustoty, být ošetřeny činidlem podle potřeby, jako je stimulační činidlo nebo potenciální terapeutický prostředek, které se může přidat do buněk jakýmkoliv známým způsobem, např. s replikačním jehlovým

nástrojem (jako jsou jehly dostupné od firmy Beckman 96 nebo 384) pipetováním nebo ink-jet podáním a inkubují se s buňkami po vhodnou dobu např. 15 minut a až 48 hodin, v závislosti na povaze testu. Celková RNA, mRNA atd. extrakty z tkání nebo buněk z in vitro nebo in vivo zdroje se mohou připravit rutinním způsobem metodami, které jsou známy z oboru (např. komerčně dostupnými soupravami).

Popřípadě mohou nukleové kyseliny, které jsou schopny hybridizace s RNA, o kterou je zájem analyzovat, použít pro specifickou sondu (tj. genomickou DNA, rRNA, tRNA nebo mRNA, které maskují alespoň jednu parciální sekvenční homologii s RNA, o kterou je zájem. Ty mohou být alespoň částečně odstraněny ze vzorku RNA před zpracováním vzorku s nukleázovou ochranou (NP) před podrobením vlastní hybridizace. Nukleová kyselina („chránicí fragment“, která může být např. RNA, DNA nebo PNA), která je komplementární k alespoň jedné části RNA, o kterou je zájem a jejíž sekvence se částečně nebo úplně překrývá s těmi, které má sonda, které jsou specifické pro RNA, o kterou je zájem analyzovat, se zavádějí v přebytku do vzorku a inkubují se za přesně zvolených hybridizačních podmínek, ve kterých tento chránicí fragment hybridizuje specificky s RNA, o kterou je zájem analyzovat (viz shora diskusi o vhodných reakčních podmínkách). V tomto stupni se mohou přidat chránicí fragmenty specifické pro jakoukoliv ze všech RNA, o které je zájem (např. asi 100 nebo více). Po hybridizaci se na vzorek působí směsí jedné nebo více nukleáz tak, aby se zničily v podstatě všechny nukleové kyseliny s výjimkou částí každé RNA, o kterou je zájem analyzovat, která je komplementární k chránicímu fragmentu (fragmentům) nebo s výjimkou duplexů vytvořených mezi chránicími fragmenty s chráněnou RNA. V následném stupni se chránicí fragment (fragmenty) mohou eliminovat z takových duplexů denaturací duplexů a digesí pomocí vhodného enzymu, který degraduje chránicí fragment (y), přičemž ponechá chráněnou RNA v podstatě netknutou. Lze použít jakýkoliv typ nukleázy, např. shora diskutovaný stupeň digesce včetně např. pankreatické RNAzy, nukleázy z fazole, RNAzy H, S1 nukleázy (za podmínek digesce s vysokou nebo nízkou koncentrací soli), RNAzy A, ribonukleázy T1, exonukleázy III, exonukleázy VII, RNAzy CL3, RNAzy PhyM, Rnase U2, a pod. podle povahy hybridizačních komplexů a nežádoucích nukleových kyselin přítomných ve vzorku. Reakční podmínky pro tyto enzymy jsou velmi dobře známy v oboru a lze je optimalizovat empiricky. Jak je požadováno, vzorek se může ošetřit známými způsoby, aby se odstranil nehybridizovaný materiál a/nebo inaktivovaly nebo odstranily reziduální enzymy (např. fenolickou extrakcí, srážením, kolonovou filtrací atd.). Ošetřené vzorky se pak uvedou do kontaktu s maticí sond. Za účelem kontroly specifické hybridizace a následné nukleázové ochrany se jeví jako užitečné, když se použijí značené chránicí fragmenty, které jsou součástí této reakční směsi. Za účelem kontroly, že procedura nukleázové ochrany správně funguje, tj. že se nehybridizované nukleové kyseliny spotřebovávají tak, jak je to žádoucí, se může navrhnout jeden nebo víc chránicích fragmentů, které obsahují opačné (nehybridizující) segmenty, které by měly být štěpeny nukleázami, pokud test správně pracuje. Přítomnost nebo nepřítomnost opačných fragmentů se může stanovit hybridizací s komplementární, značenou sondou, nebo opačnou částí ochranného fragmentu, který jako takový může být značen detekovatelnou molekulou.

Pro mnoho způsobů podle tohoto vynálezu může být značený (navázaný) jakýkoliv postup, který je dobře známý v oboru a/nebo který je popsán kdekoli zde v přihlášce (např. pro detekci fragmentů nukleázové ochrany). Tak např. cílové molekuly se mohou kopulovat přímo nebo nepřímo s chemickými skupinami, které poskytují signál pro detekci, jako jsou chemoluminiscentní molekuly, nebo enzymy, které katalyzují produkci chemoluminiscenčních molekul, nebo fluorescenčních molekul jako je fluorescein nebo cy5 nebo se může řešit pomocí takového typu fluorescenčních molekul, které využívají chelatované lantanidy, nebo radioaktivní sloučeniny. Alternativně se cíle mohou značit poté, co již zreagovaly se sondou jedním nebo dvěma cílově specifickými hlásiči (např. protilátky, oligonukleotidy jak jsou znázorněny na obr. 1 nebo jakýkoliv obecný typ molekul diskutovaný shora ve spojení se sondami a cíli).

Jedním typem fluorescenční molekuly může projevovat „nahoru převádějící fosforescenci“ (tj. světélkování, při kterém látka absorbuje záření o dlouhé vlnové délce, například infračervené, a je tímto zářením excitována, načež vlivem excitace emituje záření o kratší vlnové délce, napří-

klad viditelné světlo). Jelikož fosforescenční látky tohoto „nahoru převádějícího“ typu absorbují delší vlnové délky než většina potenciálně rušivých materiálů, přítomných obvykle v analyzovaných vzorcích, umožňují tyto nahoru převádějící fosforescencia oproti fosforescenčním látkám, absorbujícím kratší vlnové délky, omezit rušení, způsobené materiálem vzorku. Úzké emisní spektrum většiny nahoru převádějících fosforescenčních látek také umožňuje současnou detekci záření většího počtu odlišných nahoru převádějících fosforescenčních látek. Nahoru převádějící fosforescencia jsou v oboru dobře známé a obvyklé. Patří mezi ně například ionty kovů vzácných zemin, například yterbium (Yb), erbium (Er), thulium (Tm) a preseodym (Pr), zejména ve formě oxysulfidových solí. Bylo již popsáno asi 80 nebo více nezávisle detekovatelných, nahoru převádějících fosforescenčních látek. (Viz například „Biological Agent Detection and Identification, duben 27–30, 1999, DARPA, Biological Warfare Defense, Defense Sciences Office. Fosforescenční látky se mohou popřípadě navázat na jakýkoliv povrch, například na mikrokuličku nebo na latexové zrno. Stejně jako ostatní fluorescenční značení, mohou se nahoru převádějící fosforescencia detekovat jakýmkoliv převedením energie do značení (nebo modulací značením), které na dostatečně blízkém linkeru, cíli nebo hlásiči. Kromě toho se nahoru převádějící fosforescencia mohou, stejně jako jiní signalizující entity zde popsané, použít ke kvantitativnímu stanovení množství cíle a mohou se použít v jakékoliv variantě zde popsaného způsobu, například k detekci nukleázových chránicích fragmentů.

Nahoru převádějící fosforescencia se pochopitelně mohou použít k detekci cílů, které jsou na povrchu rozmístěny jakýmkoliv způsobem, například k detekci cílů (včetně nukleázových chránicích fragmentů), které jsou navázány přímo na povrch, dále těch, které jsou navázány přímo na matici různých oligonukleotidů na povrchu, nebo které jsou navázány přes bifunkční linkery ke kotvám (různé nebo v podstatě identické), rozloženým na povrchu v podstatě rovnoměrně, či v jakémkoliv požadovaném obrazci či tvaru. Lze použít jakýkoliv povrch, například průtočný systém, nebo pevný povrch například na povrch perličky. Tyto perličky, používané při uvedených testech podle vynálezu, mohou být libovolného typu, například vyrobené z libovolného materiálu, magnetického nebo nemagnetického, přičemž v jednom testu mohou být používány perličky v podstatě stejné, nebo různé co do velikosti a/nebo tvarů.

Dá se také použít řada dalších detekčních komplexních postupů „sendvičového“ typu. Tak např. cíle se mohou hybridizovat s bifunkční molekulou obsahující první skupinu, která je specifická pro cíl a druhou skupinu, která může být rozpoznána běžnými (tj. stejnými) hlásicími činidly, např. značeným polynukleotidem, protilátkou nebo podobně. Bifunkční molekuly se mohou navrhovat tak, že mohou být použity při testu s jakýmkoliv známým hlásicím.

Pro jakékoliv varianty způsobu podle vynálezu se dají použít ke značení (napojení charakteristického zbytku) různé detekční způsoby komplexního sendvičového typu. Tak například cíl může interagovat, například formou hybridizace, s bifunkční (nebo multifunkční) molekulou (tzv. „detekčním linkerem“) obsahující první skupinu, která je specifická pro cíl, a druhou skupinu, která je specifická pro „hlásicí činidlo“. Termín „specifický pro“, jak je zde používán ve smyslu interakcí, například s sondou a cílů. Termín „hlásicí činidlo“, jak je zde používán, znamená značený polynukleotid, protilátku nebo jakýkoliv obecný typ molekuly, diskutované zde v souvislosti se sondami a cíly. Tyto dvě skupiny detekčních linkerů mohou rozpoznat příslušné vazebné partnery (interagovat nebo asociovat s nimi), jakýmkoliv způsobem, shora diskutovanými v souvislosti se sondami a cíly. Detekční linker může také obsahovat jiné sekvence, například sekvence, které jsou specifické pro cíl ale jsou odlišné (nepřesahující) od cílově-specifické skupiny odpovídajícího linkeru, navázaného na kotvu. Jakákoliv sekvence, přítomná v detekčním linkeru, může sloužit jako rozpoznávací sekvence pro detekční sondu nebo hlásicí činidlo. Ve výhodném provedení je detekčním linkerem polynukleotid.

Detekční linkery se dají navrhovat tak, že se v matici může použít libovolný požadovaný počet obecných hlásiců. Tak například se dá navrhnout soubor detekčních linkerů tak, aby každý detekční linker byl specifický pro jiný cíl, ale obsahoval vazné místo pro stejný (obecný) cíl, nebo pro jedno z omezeného počtu hlásicích činidel. Schopnost použít omezený počet hlásicích

činidel (například jedno), pro značení více různých cílů v jediném testu poskytuje výhodu snížených nákladů a nižších pozadí. Pochopitelně detekční kombinace linker/hlásič se dá použít k detekci cílů, které jsou rozmístěny jakýmkoliv způsobem na povrchu, například jak je popsáno shora při popisu typů uspořádání cílů, které se dají detekovat pomocí nahoru převádějících fosforescenčních látek.

Ve většině výhodných provedení se detekční linkery dají navrhnout tak, aby detekovaly nukleázové chránící fragmenty takovým způsobem, aby chránící fragmenty, které byly nukleázou z kontroly „překrývajících se“ sekvencí v průběhu nukleázového chránícího postupu (jak je popsán v příkladu 15), byly preferenčně označeny. Tento typ detekce je schematicky znázorněn na obrázku 24. V tomto provedení obsahuje detekční linker první funkční skupinu, která je specifická pro cíl, a druhou funkční skupinu, která je specifická pro běžnou kontrolní přechnívající sekvenci, která je ve výhodném provedení na startu testu přítomna v podstatě ve všech nukleázových chránících fragmentech. Pokud, jak je to žádoucí, kontrolní přechnívající sekvence se odštěpí od nukleázového chránícího fragmentu již v průběhu nukleázové chránící reakce, a cílově-specifická skupina detekčního linkeru se pak nenaváže a zůstane funkční pro další hybridizaci. Na druhé straně, pokud se kontrolní přechnívající sekvence od chránícího fragmentu neodštěpí (například z důvodů neúplné digesce nukleázy v průběhu nukleázové chránící procedury), obě specifické funkční skupiny detekčního linkeru (skupina specifická pro cíl a skupina specifická pro kontrolní přechnívající sekvenci) budou hybridizovat s chránícím fragmentem a nebudou pro další hybridizaci funkční. Ve výhodném provedení se komplexy obsahující nukleázové chránící fragmenty a navázané detekční linkery potom hybridizují v dalším kroku na hlásící činidlo, které obsahuje signalizující entitu (například fluorochrom, haptén, enzym nebo jakoukoliv další molekulu, nesoucí detekovatelný signál nebo entitu, generující signál) a funkční skupinu (např. oligonukleotid), která je specifická pro skupinu detekčního linkeru, specifickou pro kontrolní přechnívající sekvenci. Hlásící činidlo je výhodně vázáno a značeno komplexy, ze kterých je již před tím kontrolní přechnívající sekvence nukleázového chránícího fragmentu odštěpena (tj. komplexy, ve kterých je skupina detekčního linkeru, specifická pro kontrolní přechnívající sekvenci, přístupná pro další hybridizaci s hlásícím činidlem).

Řada dalších obměn sendvičových detekčních postupů je odborníkovi v oboru již zřejmá.

Způsoby, kterými se mohou cíle inkubovat s cílově specifickými hlásiči za podmínek účinných pro dosažení vazby nebo jiných stabilních interakcí, jsou stanovitelné rutinním způsobem (viz shora). Tak např. fluorescenční oligonukleotidové hlásiče (při koncentraci asi 10 nM až asi 1 μ M nebo více, výhodně asi 30 nM v pufru jako je 6X SSPE-T nebo v jiných) se mohou inkubovat s navázanými cíli po dobu mezi 15 minutami a 2 hodinami nebo více (výhodně asi 30 až 60 minut) při teplotě mezi asi 15 a asi 45 °C (výhodně asi při pokojové teplotě). Po inkubaci se mohou vzorky po případě ještě ošetřit (např. promýt) za účelem odstranění nenavázaných cílově specifických hlásičů, za pomoci podmínek, které jsou stanovitelné empiricky, čímž se ponechají specifické interakce nedotčeny, ale odstraní se nespecificky vázaný materiál. Tak např. vzorky se dají promýt jednou až desetkrát nebo vícekrát za stejných nebo za přesných podmínek, než jsou ty, které byly dosaženy k získání vazby cíl/hlásič.

Zakončení značením pomocí cílově specifického hlásiče se může také použít na přídatné vrstvě, kterou se dosahuje specifika k původní hybridizační reakci. Např. v případě, kdy cílově specifický oligonukleotidový hlásič je zacílen na jiné části sekvence cílové nukleové kyseliny, než je oligonukleotidová sonda nebo při kterém sonda a hlásičové protilátky mohou rozpoznat různé epitopy cílového antigenu. Dále zakončení s cílově specifickými hlásiči může umožnit „ladění“ senzitivity reakce. Tak např. jestliže cílová mRNA, která je částí korelativního exprimovaného vzorce, je exprimována ve velice nízkých množstvích, hladina signálu se může zvýšit (zesílení signálu) hybridizací vázaného cíle s několika (např. asi 2 až asi 5 nebo více) cílově specifickými oligonukleotidovými hlásiči, z nichž každý hybridizuje specificky s jinou částí cílové mRNA.

Schopnost detekovat dva typy označení nezávisle umožňuje další typ kontroly MAPS testů. Některé (např. asi 10 až asi 100 %) linkery navržené na konkrétní místa kotev (obr. 7 ukazuje tři typická místa kotev, kde každé obsahuje řadu v podstatě identických kotev (A, B nebo C)) mohou mít značku (např. fluor) připojenou k jednomu konci. Tak např. rhodamin nebo Cy5 fluor se může připojit na 5' zakončení linkeru. Takové modifikované linkery jsou označovány jako „kontrolní linkery“. Poté co byla směs linkerů a kontrolních linkerů asociována s kotvami a vzorek obsahující cíl byl inkubován s výslednou maticí sond, lze použít cílově specifický hlásič, nesoucí jiný fluor (např. fluorescein nebo jiné detekovatelné značení jako je chemoluminiscenční) nebo lze také použít cíl přímo značený fluorem nebo jinou detekční značkou); a poměr dvou signálů se dá v takovém případě stanovit. Přítomnost kontrolních linkerů umožňuje kalibraci řady funkčních (např. schopných interagovat s linkery) kotev uvnitř a mezi testovanými oblastmi (tj. testy kapacity každého místa matice na schopnost navázat cíl za účelem normalizace signálů) slouží jako základ pro kvantifikaci množství navázaného cíle, pomoc při lokalizaci kotev na určité místo a/nebo poskytuje pozitivní kontrolu, např. v případě, kdy není žádný signál jako výsledek nepřítomnosti cíle ve vzorku. V jednom možném provedení podle vynálezu se také může použít dvou různě značených (např. fluoroforem) molekul k detekci různých populací cílových molekul; nicméně schopnost rozpoznat přítomnost cílů oddělenými signály umožňuje použít jeden typ značení pro různé cílové molekuly.

Schopnost detekovat značení nezávisle (například fluorescenčním značením, které odlišitelné vlnové délky, jako je například fluorescein a rhodamin, nebo různé nahoru převádějící fosforescenční látky) umožňují způsob podle vynálezu flexibilně obměňovat. Tak například každý ze dvou nebo více cílů může být přímo nebo nepřímo značen, jeho vlastním, jedinečně detekovatelným značením. To umožňuje navíc k (nebo místo), například identifikaci pozice lokalizovaného cíle na povrchu, nebo identifikaci cíle podle velikosti perliček, na kterých je cíl lokalizován, detekovat cíle na bázi znaků, specifických pro tato značení (například barva emitovaného světla). V jiném provedení podle vynálezu se dá na jednom místě v rámci oblasti detekovat nezávisle více cílů. Tak například na místě, které je definováno jednou skupinou (v podstatě shodných) kotev, se dají detekovat dva i více cílů (např. 2, 3, 4, 5, 6 nebo více). To znamená, že se dá použít soubor linkerů, z nichž každý má část, specifickou pro tutéž kotvu a část specifickou pro jiný cíl. Pokud se použije soubor například čtyř takových linkerů, mohou se všechny čtyři tyto linkery navázat na členy skupiny kotev na jednom místě, což umožňuje, aby se na tomto místě vázaly různé cíle. Pokud je každý z těchto cílů značen (přímo nebo nepřímo) jiným, odlišitelným značením, může výzkumník stanovit přítomnost každého z těchto cílů na tomto místě nezávisle. Z tohoto důvodu se matice například pěti kotev (skupin kotev) v oblasti dá použít ve scénáři, popsaném shora, k detekci až dvaceti různých cílů. Takový test je ilustrován v příkladech 24 a 25. Podobně se dá větší množství cílů (80 nebo více) detekovat nezávisle, když se každý jednotlivý typ kotvy rozmístí, nikoliv na jedno místo, ale v jakékoliv potřebné podobě na pevném povrchu, jako je například povrch perličky nebo v průtočném zařízení. Přitom se pro poskytnutí informace o identitě cíle nebo o identitě skupiny cílů se dá použít jiných znaků, například velikost perličky nebo rozložení.

V jiném provedení podle vynálezu se „kotvy“, které jsou specifické pro cíl (cíle), o které je zájem nespojují s linkery, ale spíše se asociují přímo s cíli; cíl(e) na druhé straně může interagovat po případě s cílově-specifickým hlásičem (hlásiči). Cíle, ať již jsou značené nebo neznačené, se dají detekovat kteroukoliv z řady procedur, které jsou rutinní a známé v oboru (viz. např. Fodor et al (1996). Pat US 5 510 270; Pirrung et al (1992). Pat US 5 143 854; Koster (1997). Pat US 5 605 798; Hollis et al (1997) Pat US 5 653 939; Heller (1996). Pat. US 5 565 322; Eggers et al (1997). Pat US 5 670 322; Lipshutz et al (1995). Bio Techniques 19, 442–447; Southern (1996). Trends in Genetics 12, 110–115). Detekční metody, které zahrnují detekce založené na enzymech, kolorimetrické metody, SPA, radiografii, hmotnostní spektrometrii, elektrické metody, detekci absorbance nebo luminiscence (včetně chemiluminiscence nebo elektroluminiscence) a detekci rozkladu světla, např. z mikroskopických částic, se používají jako konečné. Detekce se také dá provádět pomocí fluorescenčních značení, např. zobrazováním pomocí CCD nebo fluorescenční mikroskopii (např. skenováním nebo souosým fluorescenčním mikroskopem) nebo

- spojení skenovacího systému CCD maticí nebo fotonásobičovou trubicí nebo použitím technologie založené na detekci matic (např. povrchový potenciál každé desetiminutové části testovací oblasti se může detekovat nebo úvaz do povrchové plazmové rezonance, čímž se získá dostatečná přesnost pro měření). Alternativně může matice obsahovat značku (např. sondu na bázi přenosu energie elektronového páru, jako např. je fluorescein a rhodamin), které mohou být detekovány tím, že dochází k přenosu energie (nebo modulací) značení na linker, cíl nebo hlásič. Mezi použitelné detekční systémy založené na fluorescenci jsou intenzita fluorescence, polarizace fluorescence (FP), časově odložená fluorescence, přenos fluorescenční rezonanční energie a homogenní časově odložená fluorescence (HTRF). Analýza opakujícího se grafu se dá provést analýzou grafu (přičemž se najde vhodný skok nebo linie pro každý specifický značený cíl je pozice vůči jiným liniím nebo vrcholům) následně se pak může provést kvantifikace intenzity těchto značení. Zařízení na grafy a počítačový software pro analýzu jedno nebo dvourozměrných matic jsou rutinně vytvářeny a/nebo komerčně dostupné (např. viz Rava et al (1996). Patent US 5 545 531).
- Způsoby výroby použití částic matic podle vynálezu, včetně přípravy povrchů oblastí jako jsou ty, které jsou zde popsány, syntéza čištěných a připojení a sestavování látek, jako jsou zde kotvy, linkery, sondy a detekční sondy zde popsané a detekce a analýza značených nebo specificky zakončených látek jsou popsány zde a jsou velmi dobře známou technologií. Kromě toho jsou tyto metody popsány v odkazech citovaných shora, viz např. v patentech, které byly uděleny firmám Affymax, Affymetrix, Nanogen, Protogene, Spectragen, Millipore and Beckman (jejichž produkty použitelné pro vynález jsou dostupné); standardní příručky molekulární biologie a vědecké knihy o proteinech, včetně těch, které byly citované shora a Cozette et al (1991). Pat. US 5 063 081; Southern (1996), Current Opinion in Biotechnology 7, 85–88; Chee et al (1996). Science 274, 610–614; and Fodor et al (1993). Nature 364, 555–556.

Přehled obrázků na výkresech

- Obr. 1 znázorňuje navržené schéma pro oligonukleotidy, ve kterých linker 1 obsahuje část, která je specifická pro kotvu 1 a jinou část (sondu), která je specifická pro cílovou mRNA 1 a ve které značená detekční sonda 1 je specifická pro sekvenci cílové mRNA 1, která je odlišná od sekvence cílové specifické části linkeru.
- Obr. 2 znázorňuje povrch, který zahrnuje 15 testovacích oblastí, z nichž každá zahrnuje matici šesti oligonukleotidových kotev.
- Obr. 3 znázorňuje návrh linkeru pro test na vazbu receptoru, ve kterém se část linkeru specifická pro kotvu asociuje se sondovou částí (receptorový protein) přes biotinovou a streptavidinovou molekulu a ve kterém ligand specifický pro receptor je značen fluorescenčně značenou molekulou. B: biotin. SA: streptavidin. Rec: receptorový protein. Ligand: přírodní nebo syntetický ligand pro daný receptor. *: fluorescenčně značená molekula připojená k ligandu.
- Obr. 4 znázorňuje povrch, který zahrnuje 21 testovacích oblastí, z nichž každá je dále podrozdělena na 16 podoblastí (identity, zdvojení).
- Obr. 5a, 5b a 5c ilustrují tři kousky, z nichž může být sestaven povrch, jak je znázorněn na obr. 4. Obr. 5a představuje separátor jamek; obr. 5b představuje podrozdělovač a obr. 5c představuje bázi.
- Obr. 6 představuje dvě testovací oblasti, z nichž každá zahrnuje lineární matici sond (nebo kotev), které jsou v „grafu“ podobné formaci.
- Obr. 7 schématicky znázorňuje testovací oblast zahrnující 3 kotvy (A, B a C), z nichž každá je přítomna v řadě kopií („skupina“). Umístění každé skupiny kotev se nazývá „místo“.

Obr. 8 znázorňuje test, ve kterém jsou cDNA generovány specifickou reversní transkriptázou a testovány destičkách MAPS.

Obr. 9 znázorňuje test, který využívá postupu nukleázové ochrany (NPA-MAPS test). Vzorek RNA se připraví z buněk nebo z tkáně a je představován tenkou vlnitou čarou. Ke vzorku RNA se přidá skupina polynukleotidových fragmentů, což je znázorněno tlustou tmavou a světlou čarou. Tmavá část ochranných fragmentů reprezentuje segmenty, které jsou komplementární ke specifické RNA cíli a hybridizují se s těmito cíli. Světlá část představuje opačnou část: sekvenční, které nejsou komplementární k tomuto cíli. Ochranné fragmenty jsou přidávány v přebytku. Po hybridizaci všech dostupných cílů s chránicími fragmenty se na vzorek působí vhodnou směsí nukleáz a chemicky se tak zničí nežádoucí nehybridizované RNA a nehybridizované polynukleotidy. Tak např. nukleáza S1 může zničit jakoukoliv jednořetězcovou DNA, která je přítomna. Z toho plyne, že přebytečný chránicí fragment je hydrolyzován tehdy, pokud se jedná o opačný nehybridizovatelný díl tohoto fragmentu. RNA se může hydrolyzovat ribonukleáz včetně ribonukleázy H a/nebo zahřátím vzorku v zásaditém prostředí. Zůstává soubor štěpených ochranných fragmentů, který odráží, jak mnoho cílových RNA bylo přítomno ve vzorku. Zbylé ochranné fragmenty se měří pomocí MAPS hybridizačního testu.

Obr. 10 znázorňuje hybridizační specifitu při MAPS testu.

Obr. 11 znázorňuje kinetiku navazování kotvy s linkerem.

Obr. 12 znázorňuje test MAPS dvou oligonukleotidových cílů.

Obr. 13 znázorňuje kvantifikaci posunu senzitivity.

Obr. 14 znázorňuje stanovení teploty tkání pro 4 kombinace oligonukleotidových linkerů/kotva.

Obr. 15 znázorňuje stanovení teploty tkání pro 4 kombinace oligonukleotidových linkerů/kotva.

Obr. 15 znázorňuje mRNA test prováděný pomocí NPA-MAPS.

Obr. 16 znázorňuje rozpouštěcí křivku NPA-MAPS.

Obr. 17 znázorňuje test pro detekci peptidů obsahující fosfotyrosinové zbytky.

Obr. 18 znázorňuje první stupeň testu na map ESTy. Sestavení linkeru odpovídající každému z ESTů, který se má mapovat na maticích generických kotev na MAPS destičce. Na povrch každé ze 16 jamek mikrodestičky se připojí linkery obsahující 16 různých oligonukleotidových sond, uspořádané v matici 4x4. První místo má oligo 1, které je komplementární k části první EST sekvence a tak je na 16 ESTech, které se mají testovat.

cDNA nebo mRNA generované z genů, ze kterých byly ESTy získány, se přidají k všem 16 jankám a umožní se hybridizace za vhodných podmínek. Na základě toho cDNA nebo mRNA, které obsahují jednu ze 16 EST sekvencí, bude připojena s místem, kde je komplementární sonda.

Obr. 19 znázorňuje následný stupeň v testu, kdy se mají mapovat ESTy: přidání detektorových oligonukleotidů k destičce MAPS. Každá jamka destičky obdrží oligonukleotidový receptor, který odpovídá jednomu z ESTů, které se mají mapovat. Každým detektorovým oligonukleotidem je oligonukleotid navázaný na molekulu, používanou pro detekci, např. fluorescein, pokud se používá fluoresceinové zobrazování. Každý oligonukleotidový detektor je komplementární k jednomu z ESTů, ale odlišný od sondy specifické pro EST tak, že sonda a oligonukleotidový detektor, které jsou komplementární k jednomu ESTu se mohou oba vázat zároveň.

Po promytí se přidá ke každé jamce jeden oligonukleotidový detektor, jak je značeno na obrázku. To znamená, oligonukleotidový detektor se sekvencemi komplementární k prvnímu ESTu se přidá k první jamce atd.

5 Obr. 20a a 20b znázorňují výsledky testu na map ESTů zobrazenou na obr. 18 a 19. Po hybridizaci oligonukleotidového detektoru a promytí za vhodných podmínek se 16 jamek mikrotitrové destičky zobrazí pomocí CCD fluorescenčního zobrazovače. Obr. 20a ukazuje upravené výsledky. Očekává se, že každý EST-specifický oligonukleotidový detektor by měl značit mRNA nebo cDNA drženou korespondující EST-specifickou sondou. Tak např. sonda 5 tak tomu je v případě
10 těchto dat, se všemi značeními detekčních oligonukleotidů sestavené sondy. Kromě toho první tři oligonukleotidové detektory každé značené cDNA nebo mRNA jsou přidrženy prvními třemi sondami, což ukazuje, že tyto sekvence leží podél stejného genu. Podobně posledních pět ESTů se projevuje tak, že jsou spojeny. Vazby, které vyplývají z těchto dat, jsou uvedeny graficky na obr. 20b.

15 Obr. 21 znázorňuje uspořádání sond oligonukleotidových detektorů a ESTů #1, 2 a 6 znázorněných na obr. 18 až 20.

Obr. 22 znázorňuje test s vysokou výkonností.

20 Obr. 23 znázorňuje způsob přípravy zesíleného cíle.

Obr. 24 znázorňuje test s detekčními linkery a hlásícími činidly.

25 Obr. 25 znázorňuje použití různých prášků.

Příklady provedení vynálezu

30 Příklad 1 Hybridizační specifita (viz obrázek 10)

A generická destička MAPS byla vyrobena s použitím zařízení s tryskami, systém Pixus (Cartesian Technologies, Inc., Irvine, CA), aby se získala v každé jamce mikrotitrové destičky identická síť DNA. Všechny oligonukleotidy byly koupeny od Biosource International (Camarillo, CA). V případě této destičky bylo vytvořeno sedm různých oligonukleotidových kotev v každé jamce, a to v uspořádání, které je znázorněno jako Klíč (levá strana obrázku). Každý oligonukleotid byl nanesen jako 10 nanolitrová kapička ve dvou tečkách, oddělených ze 2 μ M roztoku, obsahujícího 500 mM fosforečnanu sodného o pH 8,5 a 1 mM EDTA, do jamek DNA vazebné destičky (Corning Costar), a ponechán uschnout. Po přilnutí byly jamky zablokovány 50 mM pufru Tris pH 8, a pak byl oligonukleotid, který se kovalentně nenavázal k povrchu, vymyt 0,1% SDS v 5x SSP pufru. K omyté destičce byly přidány fluorescenčně značené oligonukleotidové linkery a byly ponechány hybridizovat v 6x SSPE s 0,1% Tritonu X-100 při pokojové teplotě po dobu třiceti minut. Tento postup je výhodný pro připojení linkerů. Oligonukleotidové linkery byly v průběhu syntézy substituovány cy5- a byly komplementární v segmentech o 25 báзовých párech ke specificky kotveným oligonukleotidům. Sekvence sedmi kotev a linkerů byly následující (všechny znázorněny mezi 3' a 5'):

#1 Kotva*:

SEQ ID: 1

TCCACGTGAGGACCGGACGGCGTCC

Linker **

SEQ ID: 2

GTCGTTTCCAICTTTGCAGTCATAGGATACTGAGTGGACGCCGTCCGG
TCCTCACGTGGA

RNA model (myš C-jun):

SEQ ID: 3

CTATGACTGCAAAGATGGAAACGACGATACTGAGTTGGACCTAACAT
TCGATCTCATTCA

Detekční oligonukleotid***

SEQ ID: 4

TGAATGAGATCGAATGTTAGGTCCA

#2 Kotva*:

SEQ ID: 5

CACTACGGCTGAGCACGTGCGCTGC

Linker** SEQ ID: 6
CTAGGCTGAAGTGTGGCTGGAGTCTGCAGCGCACGTGCTCAGCCGTA
GTG

RNA model (myš MIP-2): SEQ ID: 7
AGACTCCAGCCACACTTCAGCCTAGGATACTGAGTCTGAACAAAGGC
AAGGCTAACTGAC

Detekční oligonukleotid*** SEQ ID: 8
GTCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTTCAG

#3 Kotva*: SEQ ID: 9
GTCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTTCAG

Linker** SEQ ID:10
ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGGGCGCTCCCACAACGCTCGACCG
GCG

RNA model (myš GAPDH): SEQ ID:11
CCTTCATTGACCTCAACTACATGGTGATACTGAGTGGAGAAACCTGCC
AAGTATGATG AC

Detekční oligonukleotid *** SEQ ID:12
GTCATCATACTTGGCAGGTTTCTCC

#4 Kotva*: SEQ ID:13
GAACCGCTCGCGTGTCTACAGCCA

Linker** SEQ ID:14
CTACCGAGCAAACCTGGAAATGAAATTGGCTGTAGAACACGCGAGCGG
TTC

RNA model (myš L32 protein):

SEQ ID:15

ATTTCAATTTCCAGTTTGCTCGGTAGGATACTGAGTGAGTCACCAATCC
CAACGCCAGGCT

Detekční oligonukleotid***

SEQ ID:16

AGCCTGGCGTTGGGATTGGTGAATC

#5 Kotva* :

SEQ ID:17

CTCGTTCCGCGTCCGTGGCTGCCAG

Linker**

SEQ ID:18

CTGGCAGCCACGGACGCGGAACGAG

#6 Kotva*:

SEQ ID:19

CGGTCGGCATGGTACCACAGTCCGC

Linker**

SEQ ID:20

CGGACTGTGGTACCATGCCGACCG

#7 Kotva*:

SEQ ID:21

CGCGCCGCGTTATGCATCTCTTCG

Linker**

SEQ ID:22

CGAAGAGATGCATAACGCGGCGCCG

Vysvětlivky:

* Kotvy byly syntetizovány pomocí spaceru C12 s amidem na zakončení 5'

** Linkery byly syntetizovány pomocí Cy5 navázaného na zakončení 5'

5 *** Oligonukleotidové detektory byly syntetizovány s použitím biotinu, navázaného na zakončení 5'

10 Do každé jamky byl přidán buď jeden linker, nebo byla směs linkerů v celku (jak je znázorněno na obrázku). (Do jamky označení „všechny“ byla přidána směs všech sedmi linkerů.). Po následné inkubaci a trojím promytí 5 x SSP byl získán pomocí zobrazovače „Tundra“ (IRI, St. Catharines, Ontario) fluorescenční obraz, znázorněný v pravé části obrázku. Jak je možno vidět, linkery se samy sestavily na povrchu podle specifické asociace s komplementárními, jím příslušnými, kotvami.

15 Tento proces se opakuje s tím rozdílem, že se do každé jamky umístí osm kotev a s nimi se následně výhodně spojí linkery. Celý postup se opakuje s 36, 64 atd. různými kotvami v každé jamce na 24, 96, 384, 864 nebo 1536 jamkové destičce.

Příklad 2 Kinetika navazování (viz obrázek 11)

Na obrázku je znázorněna rychlost hybridizace Cy5-substituovaného linkeru číslo 1 s komplementární kotvou pro různé koncentrace linkeru. Generická destička MAPS byla připravena podle obrázku 1, s tím rozdílem, že kotva 1 byla navázána na čtyři místa v každé jamce. Inkubace byly prováděny při pokojové teplotě v 5x SSP s 0,1% Tweenu-20, jamky byly promyty 3 krát s použitím 5x SSP, a byla měřena navázaná fluorescence. Fluorescenční obraz byl získán pomocí zařízení „Tundra“, pozadí bylo odečteno a pro každou tečku uvnitř každé jamky byla pomocí softwaru „Tundra“ vypočtena integrovaná intenzita. Vyneseny jsou i průměr a standardní odchylka pro uvedenou integrovanou intenzitu u čtyř teček uvnitř každé ze dvou duplikátních jamek.

Příklad 3 Fluorescenční linker

A generická destička MAP se připraví s použitím jednoho kotvicího oligonukleotidu natečkovaného buď po 1 tečce na jamku (horní dvě řady), po 4 tečkách na jamku (následující čtyři řady), nebo po 16 tečkách na jamku (nižší dvě řady), podle metod, které jsou diskutovány shora. Do každé jamky se komplementárně naváže fluorescenčně značený linker, s použitím výhodného postupu popsaného v příkladu 1. Fluorescenční obraz byl po promytí získán pomocí zobrazovače „Tundra“. Intenzita fluorescence každé tečky informuje, do jaké míry je každý funkční linker přístupný hybridizaci s cílem. Intenzita signálu teček je při opakované detekci vysoce reprodukovatelná.

Příklad 4 Křivky kinetiky navazování.

Do destiček, připravených podle postupu, popsaného v příkladu 3, se přidají různé koncentrace cílového oligonukleotidu. Linker, který je asociován obsahuje 25-merní sekvenci komplementární k části cíle. Cíl se přidá 5x SSC s 0,05% SDS v celkovém objemu buď 30, nebo 100 mikrolitrů, a destička se zakryje a inkubuje při 50 °C přes noc. Po hybridizaci cíle k připojenému linkeru se cíl vizualizuje pomocí výhodného postupu s použitím chemiluminiscence. Přidá se biotinylovaný detekční oligonukleotid, obsahující a 25-merní sekvenci komplementární k oddělené části cíle (ne ke stejné části komplementární k linkeru) v koncentraci 30 nM. Biotinylovaný detektor se může přidávat po dobu 30 minut po vypláchnutí přebytečných nenavázaných cílů, nebo se může přidat spolu s cílem a ponechat přes noc k hybridizaci. Po navázání detektoru se povrch opláche dvakrát pomocí 5x SSC, jednou pomocí 1 x SSP obsahujícího 0,1% Tweenu-20 a 1% PEG (SSPTP), a při pokojové teplotě se přidává po dobu 5 hodin zředěný (1:50 000) roztok 250 µg/ml křenové peroxidázy konjugované se streptavidinem (HRP:SA, od Pierce, Rockford, Ill.) v SSPTP. Jamky se promyjí čtyřikrát pomocí SSPTP, a jednou opláchnou, načež se inkubují s činidlem Super Signal Ultra (Pierce). Po několika minutách se získá luminiscenční obraz například pomocí zařízení „Tundra“. Tento obrázek se může akumulovat v CCD matici po dobu pěti minut. Nízké hladiny cíle se mohou vizualizovat v některých jamkách při koncentraci cíle až tak malé, jako $\sim 5 \times 10^{-13}$ M; Intenzita signálu se obecně stává nasycenou při koncentraci $\sim 10^{-10}$ M. Intenzita signálu teček je při opakované detekci vysoce reprodukovatelná.

Příklad 5 Test dvou oligonukleotidů (viz obrázek 12)

Křivka navazování ukazuje případ, kdy MAPS hybridizační test, při použití výhodného protokolu z postupu diskutovaného shora, byl aplikován pro dva různé cílové oligonukleotidy. Generická destička MAPS byla připravena se čtyřmi různými kotvicími oligonukleotidy, z nichž každý byl natečkovan čtyřikrát uvnitř každé jamky. Na druhé a čtvrté kotvě byly oligonukleotidové komplementární linkery sestaveny přímo na povrchu, jak je popsáno. Do každé jamky byly přidány dva cíle v uvedené koncentraci do 40 mikrolitrů jak je popsáno, a inkubovány při 50 °C přes noc.

Množství každého navázaného cíle bylo vizualizováno připojením biotinylovaného detekčního oligonukleotidu specifického pro každý cíl s následným chemoluminiscenčním zobrazením HRP:SA, jak je popsáno. Na nižším panelu byla intenzita vyzařování stanovena kvantitativně. Ve všech případech obrázků v liniích mezi šipkami, znázorněnými na horním panelu, byl pro naske-
 5 nování intenzity použit software, který je součástí zařízení „Tundra Imager“. Pro nejnížší koncentrace cíle, 1,1 pM, ukazují naskenované obrazy každé tečky Gaussovu křivku tvaru píku, definovanou jamkou, přičemž u vzorku úplně vlevo, kde byla koncentrace cíle nulová, nejsou na pozadí viditelné žádné rozpoznatelné píky.

10 Příklad 6 Posun sensitivity (viz obrázek 13)

Hybridizační test MAPS se dá použít pro měření koncentrace souboru oligonukleotidů, pomocí navázání k povrchu a značení. Tento pracovní postup je vhodný pro ty oligonukleotidy, které jsou
 15 v menší nebo nízké koncentraci. Dva vzorky lze odlišit v takovém případě i tehdy, pokud jeden vzorek obsahuje více oligonukleotidu, protože bud více vázat. Na druhé straně, jestliže koncentrace cílového oligonukleotidu je pro daný povrch nasycená (tj. jestliže je dostatečně vysoká, aby obsadila všechna vazebná místa), pak v případě, že se koncentrace zvýší, nemůže se žádný další navázat, takže množství nelze změřit. Nicméně, křivky navazování cíle se mohou posunout
 20 přidáním neznačeného konkurujícího ligandu. Data charakterizující rovnováhu a průběh navazování se získají pro čtyři různé oligonukleotidové cíle, z nichž všechny nasycují povrch (tj. dosahují maximálního navázání) při koncentraci zhruba 3 nM. Přidáním neznačených konkurujících cílů do všech jamek se rovnováha navazování značeného oligonukleotidu posune takže se při nižší koncentraci naváže méně cílového oligonukleotidu a hladina, při které se dostavuje nasycení se posune na vyšší hodnotu koncentrace. Tak se mohou přidat konkurenční oligonukleotidy,
 25 konkurující například cílům 1 a 3, ale nekonkurující například cílům 2 a 4. Takto se posunou sensitivity testů pouze pro cíle 1 a 3. Touto cestou se dají měřit koncentrace oligonukleotidových cílů ve značném rozsahu v jedné testovací jamce, jestliže je známo očekávané relativní množství oligonukleotidu.

Data se mohou kvantifikovat, jak je vysvětleno shora, pro navazování jednoho z oligonukleotidových cílů. Obrázek 13 ukazuje kvantitativně, že přidání konkurenčního oligonukleotidu při
 30 testu posunuje křivky navazování, zkoumané při tomto testu pro určitý cíl, k vyšším koncentracím.

35 Příklad 7 Teplota tání čtyř sond (viz obrázek 14)

Je vynesena závislost většího množství čtyř různých fluorescenčně značených oligonukleotidových linkerů, specificky hybridizovaných na kotvy oligonukleotidů při MAPS testu, na
 40 rostoucí teplotě. Tyto čtyři oligonukleotidy byly nejprve ponechány hybridizovat při 50 °C po dobu 1 hodiny při koncentraci 300 nM. Pak byly jamky vymyty SSC bez sond, a bylo změřeno navázané množství fluorescence, jak je popsáno shora (50 °C). Pak byly povrchy inkubovány při 55 °C po dobu 30 minut a byla změřena intenzita navázané fluorescence, což se provedlo stejně
 45 pro všechny teploty, které jsou uvedeny.

Příklad 8

Byly přímo srovnávány dvě detekční metody, následujícím postupem: k destičce MAPS, na které
 50 jsou ve formě čtyřech teček na jednu jamku navázány čtyři oligonukleotidové kotvy, se přidají dva oligonukleotidy do každé jamky, přičemž oba včetně kovalentně připojených cy5 skupin nebo oba obsahující biotinovou skupinu. Proveďte se epifluorescenční měření, jak je popsáno v části o prohlížení a měření fluorescenčních linkerů. Chemoluminiscenční měření se provede
 55 tak, jak je popsáno pro MAPS test s použitím následného přidání HRP:SA a chemoluminis-

cenčního substrátu. Generované signály jsou zhruba srovnatelné. Nicméně, pro geometrii mikrodestiček, které obsahují valy, oddělující jednotlivé jamky, a popřípadě bublinky tekutiny nebo rozhraní tekutin, mohou odrazy v epifluorescenčních obrazech působit rušivě na interpretaci dat.

5

Příklad 9 Chemoluminiscenční produkty

Srovnává se použití dvou výrobků, dostupných jako chemoluminiscenční substráty pro křenovou peroxidázu, pro MAPS test. Destička MAPS se připraví postupem, uvedeným pro příklad 8, a inkubuje se s biotinylovaným oligonukleotidovým linkerem. Pak se přidá buď alkalická fosfatáza, navázaná na streptavidin (AlkPhos:SA), nebo HRP:SA, načež následuje promývání s přidavkem buď CDP-Star (Tropix) do jamky spolu s AlkPhos:SA, nebo ECLPlus do jamky s HRP:SA. Pro účely značení západních teček je navrhováno výrobcem použití SA navázaných enzymů a substrátů. Tyto dvě (jak jamka, tak i další přístupné substráty) se mohou obě použít k umožnění oligonukleotidové hybridizace na MAPS destičkách.

15

Příklad 10

Rychlost současného systému pro analýzu pomocí MAPS byla testována tak, že se připravila MAPS destička se čtyřmi různými oligonukleotidovými kotvami na jamku, z nichž každý byl natečkován čtyřikrát na jamku, s vydĺážděním (vzdálenost střed–střed) 0,6 mm. Pak se hybridizuje buď cy5–navázané linkery, nebo biotinylované linkery a provede se detekce a skenování, jak je uvedeno shora. Při tomto epifluorescenčním měření je rychlost vyšší (dláždění by mohlo být patrně zmenšeno). Při chemoluminiscenční detekci nejsou sousední tečky úplně odděleny, takže se musí řešit oddělení jednotlivých piků jednoznačně přepočtem hodnot počítačem.

25

Příklad 11 Protokol testu při použití nukleázové ochrany.

30

Při testu, ve kterém se mají zjišťovat optimální podmínky pro hybridizaci a nukleázové působení pro postup při nukleázové ochrany, při použití soupravy „Nuclease Protection Test kit“ od firmy Ambion (Austin, Texas). Tím se stanoví podmínky, pufrů a enzymy. V jednom ze tří pufrů se připraví osm vzorků. „Hyb Buff 1“ je 100% Hybridizační pufr (Ambion); „Hyb Buff 2“ je 75% Hybridizační pufr a 25% hybridizační rozpouštěcí pufr (Ambion); a „Hyb Buff 3“ je 50% směs všech. Byl syntetizován 70–merní oligonukleotid, který obsahoval 60 zbytků komplementárních k hledané mRNA (Biosource International, Camarillo, CA) a byl značen pomocí psoralenfluoresceinu (Schleicher a Schuell, Keene, NH) s použitím protokolu, jak je doporučen pro značení psoralenbiotinem firmou Ambion. Zjednodušeně řečeno, ochranný fragment byl zředěn na koncentraci 50 µg/ml ve 20 µl TE pufru (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8), vařen 10 minut, a rychle ochlazen ledovou vodou. Byly přidány čtyři µl 130 µg/ml. Dále byl přidán psoralenfluorescein v DMF a vzorek byl osvětlen 45 minut při 40 °C ručně drženým dlouhovlnným LTV zdrojem. Volný psoralenfluorescein byl odstraněn extrakcí nasyceným butanolem. Použitá mRNA byla GAPDH anti-sense mRNA, připravená z anti-sense plasmidu (pTRI-GAPDH–myší anti-sense kontrolní šablona (Anti-sense Control Template) od firmy Ambion) s použitím T7 promotoru a soupravy MaxiScript (Ambion). Krátký chránicí fragment je 60–merní komplementární část syntetizovaná odděleně a značená podobně. Tyto sekvence chránicích fragmentů byly v pokusu následující:

45

Chránicí fragment plné délky:

SEQ ID: 23

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCAC
CACCAACTGCTTGCT TGTCTAA

Krátký chránicí fragment:

SEQ ID: 24

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCAC
CACCAACTGCTT

- Hybridizace se provede mísením chránicích fragmentů při koncentraci 20 nM s GAPDH mRNA při koncentraci 60 nM v 10 µl finálního objemu po dobu dvou hodin při 22 nebo při 37 °C. Po hybridizaci bylo přidáno 200 µl směsi nukleáz podle instrukcí výrobce (název použité soupravy:
- 5 „Ambion Nuclease Protection Kit“, použité ředění směsi nukleáz bylo 1:200) a inkubace byla prováděna opakovaně při stejných teplotách po dobu 30 minut. Hydrolýza byla pak zastavena hybridizačním inhibičním pufrům (Ambion), a oligonukleotidy byly vysráženy a promyty ethanolem. Pak bylo přidáno 10 µl gelového pufru 1x (Ambion) a oligonukleotidy byly odděleny na
- 10 a byl zobrazen pomocí „Tundry“ s použitím fluoresceinových filtrů pro selekci excitačně emitovaných vlnových délek. Obrázek byl akumulován na CCD matici po dobu 2 minut. Nejlepší se ukázaly být ty podmínky, kdy vzorky byly inkubovány v „Hyb Buff 2“ při 37 °C nebo v „Hyb Buff 3“ při 22 °C. V těchto vzorcích nezůstal žádný detekovatelný chránicí fragment plné délky a bylo viditelné signifikantní množství části chránicího fragmentu plné délky o zřetelně
- 15 stejné velikosti, jakou má krátký chránicí fragment.

Příklad 12 Test na mRNA pomocí NPA–MAPS. (viz obrázek 15)

- 20 Byl použit celý protokol NPA–MAPS, s použitím podmínek pro hybridizaci a nukleázy podobným zpracováním jako je popsán v příkladu 11. Pro tento test byly připraveny vzorky. Všechny obsahovaly stejné množství 70–merního oligonukleotidového chránicího fragmentu a různá množství GAPDH mRNA. Hybridizované vzorky byly 10 µl v 50% hybridizačního pufru a 50% rozpouštěcího pufru obsahující 0,08 mg/ml Yeast RNA (Ambion) byly zahřívány na 90 °C po
- 25 dobu 6 minut, krátce odstředěny, zahřáty na 70 °C po dobu 5 minut, ponechány ochladit na 19 °C a inkubovány po dobu 19 hodin. Pak bylo přidáno ke každému vzorku 200 µl směsi nukleáz a ponecháno působit po dobu 30 minut při 19 °C. Z každého vzorku byl odebrán alikvotní podíl 60 µl pro test MAPS. Byly přidány 2 µl 10N NaOH a 2 µl 0,5 M EDTA a vzorek byl zahřát na 90 °C po dobu 15 minut, na 37 °C po dobu 15 minut, a pak ponechán usadit při pokojové teplotě
- 30 20 minut. Pak byly vzorky neutralizovány pomocí 2 µl 10M HCl a bylo k nim přidáno 12 µl 20x SSC, obsahujícího 2M HEPES o pH 7,5 a 200 nM biotinylovaného detekčního oligonukleotidu, specifického pro příslušný chránicí fragment spolu s 1 µl 10% SDS. Vzorky byly míchány, zahřáty na 80 °C po dobu 5 minut a 35 µl alikvoty každého vzorku byly odpipetovány do dvou jamek na destičce MAPS (každý vzorek byl rozdělen do dvou testů, prováděných duplicitně na
- 35 jedné MAPS destičce). Destička byla před tím připravena podle standardního MAPS protokolu, s použitím vlastního sestavovaného linkeru specifického pro určitý chránicí fragment, vždy navázaného na CY5. Destička MAPS byla zakryta a inkubována při 50 °C přes noc, načež byla provedena detekce a luminiscence jak je popsáno. K poslednímu vzorku nebyly při tomto testu přidány žádné nukleázy, což sloužilo jako kontrola, která umožňuje vizualizovat, jak by byl
- 40 samotný chránicí fragment detekován na MAPS. Na nižší části obrázku je zobrazena naskenovaná intenzita (jak byla analyzována zobrazením horní řady jamek). Množství GAPDH mRNA, přítomných ve vzorku (to je množství v každém alikvotním opakování v jamce na MAPS destičce) je uvedeno na obrázku.

Oligonukleotidy, použité na MAPS destičkách, byly následující:

Kotva*:

SEQ ID: 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

Linker**

SEQ ID: 26

CTTGAGTGAGTTGTCATATITCTCGGATACTGAGTGCGCTCCCACAAC
GCTCGACCGGCG

Chránicí fragment

SEQ ID: 27

(komplementární myší anti-sense mRNA pro GAPDH)

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCAC
CACCAACTGC TTGCTTGTCTAA

Detekční oligonukleotid***

SEQ ID: 28

- značený na zakončení 5' biotinem

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCAT

Vysvětlivky:

* Kotvy byly syntetizovány pomocí C12 spaceru s amidem na zakončení 5'

5 ** Linkery byly syntetizovány pomocí Cy5, napojeného na zakončení 5'

*** Detekční oligonukleotidy byly syntetizovány biotinem, napojeným na zakončení 5'

Příklad 13 Rozpouštěcí charakteristiky, NPA-MAPS (viz obrázek 16)

10

Data diskutovaná v příkladu 12 a zobrazená na obrázku 15, byla kvantifikována a vynesena jako rozpouštěcí charakteristiky. Průměrné a standardní odchylky po všech osm míst dvou duplicitních jamek jsou vyneseny pro každou koncentraci mRNA. Křivka navazování je znázorněna v superpozici ve formě:

15

$$\text{Frakční navázání} = \text{Maximální navázání} * 1/(1 + IC_{50}/L)$$

kde „Maximální navázání“ je maximum navázání při nasycení, „Frakční navázání“ je množství navázané při koncentraci ligandu L, a IC_{50} je koncentrace ligandu, při které je Frakční navázání rovno polovině Maximálního navázání. Znázorněná tečkovaná křivka na obrázku, získaná s nejvýhodnější hodnotou $IC_{50} = 4,2$ femtomolů, má průběh vyznačený na obrázku.

20

Příklad 14 NPA-MAPS test GAPDH mRNA v úplném RNA extraktu myších jater.

25

Úplný extrakt myší RNA se testuje na GAPDH mRNA s použitím NPA-MAPS testu a jako křivka se vynesou rozpouštěcí charakteristiky. Úplný extrakt RNA z myších jater se připraví pomocí soupravy Qiagen. RNA se vysráží v 70% EtOH působením 0,5M octanu hořečnatého a resuspenduje se v 10 μ l 5x SSC s 0,05% SDS s 1,8 nM chránicího fragmentu. Tímto chránicím fragmentem, který se přidává, je oligonukleotid, o délce 70 bází, z nichž 60 bází je komplementárních k myšímu GAPDH. Bud' se použije fragment komplementární k myší GAPDH mRNA

30

(„chránicí fragment“), nebo se použije komplement k sekvenci jako negativní kontrola („anti-sense fragment“).

- 5 RNA vzorky s chránicími fragmenty se zahřívají na 90 °C po dobu 5 minut, a provedou se hybridizace přivedením vzorku na teplotu 70 °C a ponecháním pomalu ochladit na pokojovou teplotu přes noc. Přidá se S1 nukleáza (Promega) při zředění 1:10 ve 30 µl 1 x S1 nukleázového pufru (Promega) na 30 minut při 19 °C, načež se reakce zastaví 1,6 µl 10N NaOH a 2,7 µl 0,5 M EDTA. Vzorky se zahřívají na 90 °C po dobu 15 minut a poté na 37 °C po dobu 15 minut, aby se denaturovaly a zničila se RNA, neutralizují přidáváním 1,6 µl 10M HCl, a inkubují na destičkách
- 10 MAPS přes noc v 5 x SSC spolu s 0,05% SDS doplněným 200 mM HEPES pH 7,5, ke kterému je přidáno 30 nM biotinylovaného detekčního oligonukleotidu. Oplachování a vizualizace SA-HRP se provádí, jak bylo popsáno. Velikost signálu klesá podle toho, jak klesá množství myší RNA ve vzorku (ve vzorcích je obsaženo 500, 170, 50, 5 nebo 0,5 µg totální myší RNA. Současně se testují dva kontrolní vzorky, do kterých nebyla přidána žádná S1 nukleáza. Signál je
- 15 vidět pouze pro komplementární chránicí fragment.

Použité oligonukleotidy:

Pro anti-sense kontrolu (stejně oligonukleotidy jako v příkladě 12):

Kotva* :

SEQ ID: 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

20 Linker**

SEQ ID: 26

CTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGATACTGAGTGCGCTCCCACAAC
GCTCGACCGG CG

Chránící fragment

SEQ ID: 27

(komplementární k myši antisense mRNA pro GAPDH)

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCAC
CACCAACTGC TTGCTTGTCTAA

Detekční oligonukleotid***

SEQ ID: 28

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCAT

Pro Sense GAPDH mRNA vzorky:

Kotva*:

SEQ ID: 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

Linker**

SEQ ID: 29

ATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGATACTGAGTGCGCTCCCACAAC
GCTCGACCGGCG

Chránící fragment

(komplementární k myši mRNA pro GAPDH):

SEQ ID: 30

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCATTGCTGACAATCTTGAGTGAGTTG
TCATATTTCT CGGCTTGTCTAA

Detekční oligonukleotid **

SEQ ID: 31

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAG

Vysvětlivky:

* Kotvy byly syntetizovány s použitím spaceru C12 s amidem na zakončení 5'

** Linkery byly syntetizovány s použitím Cy5, navázaného na zakončení 5'

5 *** Sondy byly syntetizovány s použitím biotinu, navázaného na zakončení 5'

Příklad 15 Test MAPS využívající nukleázovou ochranu s kontrolami.

- 10 mRNA se extrahuje z myších jater nukleázová ochrana se provede v podstatě tak, jak je popsáno v příkladu 14, jen s tím rozdílem, že CADPH specifický chránící fragment zahrnuje 60 nukleotidů, které jsou komplementárními myši GAPDH, za kterými následuje 15 „přesahujících“ nukleotidů na zakončení 3' fragmentu, které nejsou komplementární k cíli. Po hybridizaci

a nukleázové digesce se zbylý chránicí fragment hybridizuje na destičce MAPS, jak je naznačeno v příkladu 14 jen s tím rozdílem, že se pro detekci imobilizovaného chránicího fragmentu použijí dva různé oligonukleotidové detekční fragmenty. Jeden detekční fragment je komplementární k GAPDH–specifické části chránicího fragmentu, a druhý, kontrolní, je komplementární k 15bázové „přečnívající“ části chránicího fragmentu. Každý detekční fragment se používá na jiném replikátu vzorku (tj., v různých jamkách), takže oba detekční fragmenty mohou být značeny stejnou detekční molekulou. V tomto příkladu jsou oba fragmenty značeny pomocí HRP. Bez přidání nukleázy jsou signály z obou detekčních fragmentů viditelné, zatímco když se provede nukleázová digestce, je detekovatelný jen signál, odpovídající GAPDH sekvencím. Velikost GAPDH–specifického signálu se sníží s přihlédnutím k signálu, který je pozorován v nepřítomnosti nukleázové digesce, neboť chránicí fragment se přidává v přebytku, počítáno na množství přítomné GAPDH mRNA. To umožňuje, aby bylo množství GAPDH mRNA omezeno na ochrannou hybridizaci, takže množství vytvořeného dvouvláknového hybridu (a proto množství chránicího fragmentu, který chráněn před nukleázou) odráží množství mRNA. Pokud není přítomna v reakční směsi žádná mRNA, nedetekuje se, pokud se přidají nukleázy, žádný signál. Shora uvedená zjištění ukazují, že hybridizační a digestivní stupně testu se projevují, jak je potřebné.

Pokud se při tomto testu použijí chránicí fragmenty, korespondující s větším množstvím cílů, pak každý z chránicích fragmentů může obsahovat přesahující část, ve které je stejných 15 bází. To umožňuje použít jeden detekční fragment pro testování ostatních přesahujících částí pro všechny vzorky.

Příklad 16 Transkripční screeningový test na sloučeniny, které mohou změnit expresi genů, souvisejících s chorobným stavem.

Používá se buněčná linie, odvozená od lidského nádoru. Byla zjištěna vyšší hladina exprese 30 genů než u normálních buněk. (To znamená, těchto 30 genů je používáných k produkci mRNA více, než je tomu u normálních buněk, a tak se produkuje protein, pro který představují tyto geny instrukce. Transkripční test měří, jak mnoho se tyto geny používají, tím způsobem, že měří, jaké je přítomno množství mRNA pro každý gen). S použitím nukleázové ochrany při testu na destičkách MAPS (NPA–MAPS) se testuje 8800 chemických sloučenin, aby se vidělo, zda růst buněk v přítomnosti těchto sloučenin, může redukovat expresi některých ze 30 korelujících genů bez ovlivnění exprese šesti normálních (konstitutivních, neboli „domácích“) genů. Jakákoliv sloučenina, která má tento účinek, může být v budoucnu užitečná při vývoji farmaceutických prostředků k léčení tohoto typu nádoru.

Do každé jamky ve 100 96ti–jamkových polystyrénových destičkách se přidá asi 10 000 až 100 000 buněk, které se pak nechají růst 2 dny, dokud nepokryjí povrch každé jamky. V 8 jamkách každé destičky jsou buňky ponechány růst bez přísad. Ke zbývajícím 88 jamkám každé destičky se přidají různé chemické sloučeniny tak, aby mohl být testován účinek každé sloučeniny samostatně. Do 100 destiček, používaných najednou, se tak dá testovat, nebo screeningem hledat, 8800 sloučenin. Buňky rostou 24 hodin za přítomnosti testovaných sloučenin, a pak se buňky sklídí pro test. Buňky v každé destičce se ošetřují podle instrukcí pro získání RNA ve vzorku z 96–jamkových destiček (například pomocí soupravy „Qiagen RNeasy 96 kit“). Po přípravě RNA se kvantitativně stanoví množství každé z 36 různých druhů mRNA pomocí přístupu NFA–MAPS, včetně 30 korelativních genů a 6 normálních „domácích“ genů. 36 DNA oligonukleotidové chránicí fragmenty, každý korespondující s jedním z genů, o které je zájem, se přidají do každé jamky a ponechají se hybridizovat za přesně zvolených podmínek s jím příslušnými cílovými mRNA sekvencemi. Pak se přidá S1 nukleáza, aby se zničil přebytek nehybridizované DNA, a vzorky se chemicky ošetří, aby se zničila také RNA. Ponechán je oligonukleotidový chránicí fragment pro každý ze 36 genů v množství, které je úměrné tomu, jak mnoho mRNA bylo v ošetřených buňkách přítomno v každém vzorku.

Sto 96-jamkových destiček, z nichž každá zahrnuje matici skupin 36 různých oligonukleotidových kotev v každé jamce, se připraví přidáním 36 různých oligonukleotidových linkerů do každé jamky. Linkery sestavené na povrchu každé jamky, mění generické destičky na MAPS destičky, obsahující specifické sondy pro každý ze 36 oligonukleotidových chránících fragmentů. Každý linker má část specifickou pro jednu z 36 kotev a část, specifickou pro segment jednoho ze 36 chránících oligonukleotidů. Z každé jamky ze 100 vzorkových destiček, se oligonukleotidový vzorek přidá do korespondující jamky ze 100 MAPS destiček. Po hybridizaci za přesně zvolených podmínek a detekci oligonukleotidu pro každý cíl se přidá chemoluminiscenční enzym, tak aby každé specifické místo každé jamky zářilo podle toho, jaké množství mRNA bylo přítomno ve vzorku. Jakékoliv jamky, které vykazují snížená množství korelativních genů a nemají žádný vliv na 6 domácích genů, jsou zajímavé. Sloučeniny přidané k buňkám v těchto vzorcích představují možné výchozí body pro vývoj protinádorových účinných látek.

Příklad 17 Indukovaná a konstitutivní genová exprese

RNA byla připravena v podstatě jak je opsáno v příkladu 14, z jater myši, které byly buď neinfikované („kontrola“), nebo byly jednu hodinu po infikování („infikované“) adenovirem. Na každý vzorek bylo použito 60 µg jaterní RNA, vzorky byly připraveny duplicitně. Každá testovaná jamka obsahovala tři sady duplicitních míst, odpovídající třem genům popsaným shora. Každé místo obsahovalo kotvu, navázanou k linkeru, který obsahoval sondu, komplementární k chránícímu fragmentu, korespondujícímu s jedním ze tří genů. Nukleázová ochrana byla provedena při MAPS testu v podstatě jak je popsáno na obrázku 12, a obrazy byly získány a skenovány jak je popsáno. Pro každý ze tří mRNA cílů jsou znázorněny řady získaných obrazových dat a naskenované intensity pro duplicitní jamky. Tato čísla získaná přes skenované linie, se integrují do hodnot intenzit a vypočtou se standardní odchylky pro každý případ ($n = 4$). Domácí gen, GAPDH, který se podle očekávání neměl měnit, vykazoval mírné, 1,3-násobné, zvýšení u infikovaného vzorku, které nebylo statisticky průkazné. Transkripce MIP-2 a C-jun byla zvýšena 4 a 6-krát. Tato zjištění ukazují, že dva geny, MIP-2 a C-jun, vykazují ve srovnání s kontrolou – konstitutivně exprimovaným genem – GAPDH – zvětšenou expresi jako odpověď na infekci adenovirem.

Příklad 18 Enzymový test, vhodný pro hledání sloučenin, které selektivně inhibují tyrosinové nebo serinové kinázy (viz příklad 17)

Kinázy jsou enzymy, které spojují fosfát s proteiny. Bylo prokázáno mnoho případů stimulace růstu normálních a neoplastických buněk. Odtud plyne, že sloučeniny, které inhibují specifické kinázy (ale ne všechny kinázy) se mohou použít k testování, zda jsou tyto kinázy součástí patologického jevu, a jestliže je tomu tak, slouží jako výchozí body pro farmaceutický vývoj. Například, pět tyrosinových kináz, které se podílejí na stimulaci růstu buněk nebo na regulaci zánětlivých odpovědí, jsou src, lck, fyn, Zap70 a yes. Každá kináza má nosič, a tyto nosiče jsou částečně identifikovány jako krátké peptidy, které obsahují tyrosin. Některé kinázové specifity se překrývají, takže různé kinázy mohou fosforylovat některé peptidy stejně, ale některé přednostně. Pro uvedených pět kináz bylo vybráno 36 peptidových nosičů, které vykazují spektrum specifických a překrývajících se specifit.

Používají se 96ti-jamkové destičky; každá jamka obsahuje 36 generických oligonukleotidových kotev. Připraví se 36 linkerů, kterými se převedou generické oligonukleotidové matice (s pouhými kotvami) na matice obsahující peptidové nosiče. Uvedených 36 peptidových nosičů bylo syntetizováno a každý byl kovalentně navázan, například amidovou vazbou, na oligonukleotid obsahující 5' aminoskupinu. Oligonukleotidy obsahují sekvence, které se specificky hybridizují s kotvami. Tyto útvary o struktuře peptid/oligo linkery byly sestaveny na povrchu přidáním do všech jamek MAPS destiček.

Pro screening bylo přidáno do každé jamky pět kináz při vhodných koncentracích (tak, aby rychlosti fosforylace nosičů byly co nejvíce vyrovnané), vždy spolu s jednou z 8800 různých sloučenin, které se měly testovat. Sloučeniny byly testovány na schopnost přímo inhibovat izolované enzymy. Množství fosforylace každého peptidu v matici se detekovalo přidáním značených

5 protilátek, které váží jen peptidy, které jsou fosforylované na tyrosinu. Jakékoliv jamky, které vykazují snížení fosfotyrosinové tečky, ale ne všech teček, jsou zajímavé. Sloučeniny, které byly přidány do této jamky, mohou být sestavovány dále, s co největší selektivitou, jaká je možná na inhibitory některé z testovaných kináz.

10 Schéma testu je znázorněno na horní části panelu na obrázku 17. Připraví se chimérická linkerová molekula, ve které je zahrnut oligonukleotid, obsahující 25 párů bází, komplementární k jedné z kotev, křížově navázan k peptidovému nosiči tyrosin fosfokinázového enzymu. Tento chimérický oligopeptidový nosič se sestavuje na matici oligonukleotidových kotev, přičemž se k fosforylaci peptidové části chiméry použije kinázový enzym a po proběhnutí enzymatické reakce se

15 kvantitativní stupeň fosforylace peptidu stanoví antifosfotyrosinovými nebo antifosfoserinovými protilátkami s připojenou detekcí fluoroforu nebo enzymu.

Výsledky testu jsou zobrazeny na nižším panelu. Homobifunkční síťovací činidlo, DSS (Pierce), bylo použito k navázání 5' aminoskupiny oligonukleotidového linkeru k N-zakončení peptidu, syntetizovaného pomocí fosforylovaného tyrosinu. Sekvence peptidu v jednopísmenovém kódu byla: TSEPQpYQPGENL (SEQ ID: 32), kde pY znamená fosfotyrosin. Tato chiméra byla buď

20 přímo dále použita, nebo byla nejprve upravena její reakce na pH 14 po dobu 60 minut, aby se parciálně hydrolyzovala fosfátová skupina od tyrosinu. Fosforylované nebo parciálně defosforylované chimérické molekuly byly sestaveny na komplementárních molekulách kotev na destičce

25 MAPS při znázorněných koncentracích, po dobu jedné hodiny. Po promytí a blokování jamky působením 0,3% BSA v SSPTP byly přidány antifosfotyrosinové protilátky křížově navázané k HRP (protilátka 4610 z Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) ve zředěném (1:3000) roztoku v SSPTP po dobu 1 hodiny, a množství navázané protilátky se detekovalo pomocí chemoluminiscenčního podkladu, (substrát „Super Signal Blaze“). Znázorněný obrázek byl

30 akumulován na CCD matici 1 minutu. Podle očekávání byly v množství fosfátu, navázaného k oligopeptidu, pozorovány rozdíly. Tento rozdíl je základem pro test měření, jak aktivní je soubor kináz, pokud se na něj působí různými možnými inhibitory.

35 **Příklad 19 Test kinetiky navazování pro detekci selektivních inhibitorů interakce SH2 domén a fosforylovaných peptidů**

SH2 domény slouží jako zásobní podjednotky některých růstově regulačních proteinů. Domény se váží k fosfotyrosinu, obsahujícímu proteiny nebo peptidy s neúplnou specifitou. To znamená,

40 že některé fosfotyrosinové peptidy se váží specificky k jednomu z menšího počtu SH2 proteinů, zatímco jiné se váží divoce k mnoha SH2 proteinům.

Pro tento test se linkery fosforylují peptidy, kovalentně navázané k oligonukleotidům. Peptidové skupiny se volí pro jejich schopnost, vázat se ke skupině vybraných SH2 proteinů. Linkery

45 konvertují generické destičky MAPS na destičky s ligandy, specifickými pro skupinu SH2 proteinů. Tak se generuje sto 96-jamkových MAPS destiček nesoucích ligandy. Proteiny se izolují a značí se například fluorescenční molekulou cy5.

Pokud se hledají inhibitory SH2 domén/fosfopeptidové interakce, tak se přidá ke každé jamce ze

50 100 96-jamkových MAPS destiček skupina značených SH2 proteinů, a do každé jamky se přidá jiná testovaná sloučenina. Takto se dosáhne toho, že se individuálně testuje vliv každé sloučeniny na interakci SH2 proteinů s jejich fosfopeptidovými ligandy. Při testu se měří fluorescence navázaných SH2 proteinů, spojených s každým povrchově vázaným peptidovým linkerem. Pro jakoukoliv jamku, znázorňující sníženou fluorescenci některých teček, ne však všech teček, kde

může být přidána sloučenina dále testována jako nadějný potenciální selektivní inhibitor blokování SH2.

5 Příklad 20 Vysoce výkonný screening (viz obr. 22)

Vyobrazeny jsou destičky MAPS pro vysoký výkon, na kterých je demonstrována detekce signálu z 96 jamek v jednom experimentu. Hybridizace se stejným oligonukleotidem byla měřena v 16 opakováních v 80 jamkách. Jak je zobrazeno, reprodukovatelnost 1280 hybridizačních testů byla velmi vysoká. Krajní levý a krajní pravý sloupec slouží jako kontroly ke standardizaci signálu pro různé koncentrace oligonukleotidu.

Podobným způsobem se dá testovat 16 různých oligonukleotidů v každé jamce, a tento test opakovat v 80 různých jamkách destičky. Pochopitelně, dá se testovat i větší počet oligonukleotidů nebo různých sond, (např. 100 nukleotidových sond) v každé jamce, a mnoho destiček se dá testovat současně (např. 100 destiček, jako jsou 96ti jamkové mikrotitrové destičky). Velký počet testů, které se dají provádět na každém vzorku (např. v každém z posledních případů asi 100 různých testů) a velký počet vzorků se dá testovat současně (např. v posledně jmenovaném případě 96 x 100, nebo 9 600 různých vzorků), čímž se dosáhne vysokého výkonu testování.

20

Příklad 21 Příprava zesíleného cíle (viz Obrázek 23)

Na pevný podklad (například perličky nebo reakční nádoby) se naváže PCR primér (primér jedna), což se provede pomocí chemické modifikace, která se zavede na 5' zakončení oligonukleotidového priméru. Tento primér obsahuje 5' až 3', chemickou modifikaci, místo pro restriční enzym a sekvenci, která je komplementární k hledanému cíli (například cDNA kopie mRNA, která je předmětem zájmu). Cíl se zesílí pomocí PCR s použitím PCR primérů s připojeným primérem jedna a primérem dvě, které obsahují 5' a 3', sekvence specifické pro detekční oligonukleotid a sekvenci, která je komplementární k jiné části cíle, než je primér jedna. Po PCR zesílení se zesílená DNA promyje, aby se odstranil přebytek reakčních činidel a uvolní se z pevného podkladu odštěpením pomocí restričního enzymu, specifického pro zmíněné restriční místo na priméru jedna. Zesílený primér se tak uvolní do kapalné fáze. K deaktivaci restričního enzymu a k denaturaci dvouvláknového DNA produktu se dá použít zahřívání a/nebo chemické působení. Uvolněné molekuly jednovláknové cílové DNA se pak mohou uvést do kontaktu s povrchem, obsahujícím kotvy a/nebo linkery a cíl se může detekovat pomocí detekčních oligonukleotidů, komplementárních k specifickým detekčním sekvencím v priméru dvě.

40 Příklad 22 Příprava zesíleného cíle

Na pevný podklad (například perličky nebo reakční nádoby) se naváže PCR primér (primér jedna), což se provede pomocí chemické modifikace, která se zavede na 5' zakončení oligonukleotidového priméru. Tento primér obsahuje 5' až 3' chemickou modifikaci, peptidovou sekvenci, která je štěpitelná proteázou a sekvenci, která je komplementární k hledanému cíli (například cDNA kopie mRNA, která je předmětem zájmu). Míst peptidu lze také použít jakýkoliv jiný člen, který se dá specificky štěpit. Po PCR zesílení, jak je popsáno například v příkladu 21, se PCR produkt, který je stále navázaný na pevný podklad, denaturuje a (popřípadě) promyje, přičemž se ponechá za jednovláknovou molekulou, navázanou na podklad. Promytá, navázaná molekula se pak může štěpit a uvolnit (například působením vhodné proteázy) a uvede se do kontaktu s povrchem, který obsahuje kotvy a/nebo linkery. Alternativně se může řetězec zesíleného cíle, který se uvolní po denaturaci, uvést do kontaktu s povrchem, obsahujícím kotvy a/nebo linkery. V jiném případě se může uvádět do kontaktu pouze jeden řetězec zesíleného cíle (například hybridizovaný) s linkerem, čímž se eliminuje konkurence hybridizace z protilehlého

50

řetězce a sníží se pozadí. Linker se pak dá navrhnout tak, aby byl specifický pro jeden oba řetězce zesílených cílových řetězců.

5 **Příklad 23 Test s detekčními linkery a hlásicím činidlem (viz Obrázek 24)**

Vzorek, obsahující mRNA, která je předmětem zájmu, se podrobí nukleázové chránici proceduře, přičemž se používá jako chránící fragment oligonukleotid, který obsahuje cílovou specifickou skupinu a kontrolní přesahující skupinu, která není komplementární k mRNA. Pokud je to žádoucí, může se kontrolní přesahující skupina pro nukleázové digesci odštěpit, jak je znázorněno v levé části obrázku, nebo přesahující část nepodléhá digesci, jak je to znázorněno v pravé části obrázku. Výsledné nukleázové chránici fragmenty se hybridizují na detekční linker, který obsahuje skupinu, specifickou pro cíl, a skupinu, specifickou pro kontrolní přesahující skupinu. V testu, znázorněném v levé části obrázku, zůstává kontrolní přesahující skupina detekčního linkeru nehybridizovaná; a v kontrastu s tím, v testu, znázorněném v pravé části obrázku, se kontrolní přesahující skupina detekčního linkeru hybridizuje na reziduální kontrolní přesahující sekvenci chránícího fragmentu. V následujícím kroku testu se hlásící činidlo, obsahující skupinu schopnou interagovat se skupinou, specifickou pro kontrolní přesahující skupinu, nechává interagovat s komplexy. V testu, znázorněném v levé části obrázku, se hybridizuje hlásící činidlo se skupinou detekčního linkeru, specifickou pro kontrolní přesahující sekvenci, která zůstala přístupná pro hybridizaci a komplex se pak detekuje například pomocí signalizační entity na hlásicím činidle. Na rozdíl od toho v testu, znázorněném v pravé části obrázku, není hlásící činidlo schopno se navázat na komplex, neboť komplementární sekvence nejsou pro hybridizaci přístupné, a tak s tímto komplexem není spojen žádný signál.

25 V mnoha z těchto testů podle vynálezu může hlásící činidlo interagovat s jakoukoliv sekvencí, přítomnou v detekčním linkeru, bez omezení na sekvenci, specifickou pro kontrolní přesahující sekvenci.

30 **Příklad 24 Více fluorescenčních látek (viz obrázek 25)**

Na obrázku 25 je znázorněna oblast, rozdělená na pět lokalit, A až E. Každá lokalita zahrnuje jinou skupinu v podstatě identických kotev, kotvy A až E. Na kotvy v lokalitě A jsou hybridizovány čtyři různé typy linkerů, z nichž každý obsahuje skupinu, specifickou pro kotvu A. Nicméně každá z těchto kotev obsahuje skupinu, specifickou pro jiný cíl: pro cíl 1, 2, 3 nebo 4. Proto se po hybridizaci cílů na komplexy kotva/linker cíle naváží na lokalitě A. Podobně mohou být čtyři různé typy linkerů hybridizovány na lokalitě B, přičemž každý linker obsahuje skupinu, specifickou pro kotvu B, ale jejich skupiny, specifické pro cíle, jsou specifické pro cíle 5, 6, 7 nebo 8. Podobným způsobem jsou cíle 9 až 12 spjaty s lokalitou C, cíle 13 až 16 s lokalitou D a cíle 17 až 20 s lokalitou E. Jestliže každý z těchto cílů je značen (přímo nebo nepřímo) jiným, nezávisle detekujícím fluorogenem, jako je například nahoru převádějící fosforescenční látka, lze nezávisle detekovat všech 20 cílů na pěti indikovaných lokalitách.

45 **Příklad 25 Test na vysoce výkonné podobě**

V tomto příkladu se používá transkripční test podle vynálezu pro detekci a kvantifikaci změn v genové expresi, a to ve formátu, upraveném pro vysoce výkonný screening. Veškeré kroky v testu se provádějí roboticky. Rutinní promývání není explicitně popsáno. Veškeré reakce se provádějí konvenčními postupy, které jsou buď v oboru známé, nebo jsou zde popsány.

Na 96-jamkových mikrotitrových destičkách se špičatými jamkami, se nechají v množství 50 000 až 150 000 buněk na jamku růst lidské monocytů THP-1. Tyto buňky jsou buď neošetřeny, nebo jsou rozděleny pomocí 12-myristátu-13-acetátu forbolu (dále zkratka „PMA“) po

dobu 48 hodin, načež následuje aktivace lipopolysacharidem (LPS) po dobu 4 hodin. Po ošetření se buňky rozloží v guanidinisoithiokyanátu a zmrazí do dalšího použití. mRNA se získá pomocí streptavidinových paramagnetických částic, ke kterým je navázán biotin-poly dT. Alternativně se získá Celá RNA extrakcí trojitým reakčním činidlem (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

5 Vzorky, obsahující buď mRNA, nebo celkovou RNA se podrobí nukleázové chránicí proceduře, přičemž se použije jako DNA chránicích fragmentů směs třinácti 60-merních jednovláknových oligonukleotidů, z nichž každý obsahuje 5' až 3', 25-mer, specifický pro jeden z třinácti cílů, které se hledají (GAPDH, IL-1, TNF- α , katepsin G, cox-2, cyklin-2, vimetin, LD-78- β , HMG-17, osteopontin, β -thromboglobulin, angiotensin nebo aktin); 10-merní spacer; 25-mer specifický pro běžnou oligonukleotidovou detekční sondu; a 15-merní běžnou kontrolní přesahující sekven-

10 ci. mRNA se tím převede na stechiometrické množství „odpovídajícího DNA chránicího fragmentu“, který slouží jako cíl v testu. Kontrolní experimenty, při kterých se tyto „odpovídající DNA chránicí fragmenty inkubují se sondou, specifickou pro kontrolní přesahující sekven-

15 ci, ukazují, že podle očekávání se při nukleázové digesci ukazuje, že v odpovídajících chránicích fragmentech jsou přítomny v podstatě jen sekvence, specifické zvolené mRNA cíle, o které je zájem při testu, jak je to požadováno.

Povrchy se připraví způsobem podle vynálezu. V každé z 96-jamkových DNA-navazovacích destiček se vytvoří matice šestnácti různých 25-merních oligonukleotidových kotev. Používá se

20 čtrnáct různých druhů kotev. V každém ze tří rohů matice se použije jeden druh kotvy a na ostatních lokalitách matice se použije 13 různých druhů kotev, přičemž na každé lokalitě je vždy jen jediný druh. Kotvy se pak hybridizují v definovaném kolmém uspořádání, s 60-merními oligonukleotidovými linkery, z nichž každý obsahuje, 5' až 3', 25-mer, který odpovídá jednomu ze třinácti hledaných cílů, 10-merní spacer a 25-mer, specifický pro jednu z kotev. Tím se

25 dosáhne toho, že v každé z mnoha 16-ti místních matic je každý ze třinácti cílově-specifických linkerů lokalizován v definované pozici (na stejném místě) matice. Ilustrace takového kolmého uspořádání je na obrázku 18. Linkery, odpovídající GAPDH, konstitutivně exprimující domácí gen, sloužící jako vnitřní normalizační kontrola, jsou v každé matici znázorněny na třech místech. Kontrolní experimenty ukázaly, že linkery, stejně jako chránicí fragmenty a detektorové oligo-

30 nukleotidy použité v experimentu, vykazují požadovanou specifitu.

Vzorky obsahující směsi odpovídajících chránicích fragmentů připravené podle shora uvedeného popisu, se hybridizují na matice entit kotva/linker. Používají se vzorky, odvozené od indukova-

35 ných kultur. Přítomnost a množství hybridizovaných chránicích fragmentů na každém místě matice se pak detekuje hybridizací se značenými detektorovými oligonukleotidy. Za účelem normalizace velikosti signálu na každém místě se detektorové oligonukleotidy zředí vhodným množstvím blokových oligomerů, jak je zde popsáno. Síla signálu v každém místě se zpracovává a získané hodnoty se normalizují na kontrolní GAPDH signály. Získané údaje jsou podle

40 výsledků v osmi opakováních se stejným vzorkem reprodukovatelné, a stejně tak u vzorků, připravených ze tří nezávislých pokusů, provedených v různých dnech. Přehled relativních četností třinácti transkriptů při jednom experimentu je znázorněn v následující tabulce.

Tabulka relativních intenzit (10^5 buněk/jamku)

Gen	Kontrolní		Indukované		Koeficient intenzity
	průměr	CV(n=16)	průměr	CV(n=16)	
GAPDG	10110	7 %	9833	9 %	0,97
IL-1	527	36 %	8124	38 %	15,40
TNF	229	35 %	2249	36 %	9,80
GAPDH	9591	11 %	10031	17 %	1,05
Katepsin G	10394	31 %	19648	46 %	1,89
COX-2	415	39 %	3557	25 %	8,58
Cyklin-2	1728	23 %	2960	25 %	1,71
Vimetin	25641	25 %	71074	20 %	2,77
LD78	1298	39 %	13437	20 %	10,35
HMG-17	8286	19 %	2405	20 %	0,29
Osteopontin	5604	42 %	19053	46 %	3,40
Tromboglobulin	-53	-	31761	23 %	> 100
GAPDH	10299	13 %	10136	12 %	0,98
Angiotensin	3575	28 %	6561	31 %	1,84
Aktin	12741	27 %	21802	23 %	1,71
(kontrola)	108	-	234	-	-

Příklad 26 Algoritmus pro počítačové zpracování dat z více matic

5

Výhodný algoritmus hledá pozici všech míst na MAPS destičce a automaticky vypočítává metodou nejlepšího výběru nejpravděpodobnější amplitudu signálu v každém místě, které poskytuje data. Výhodně je tento algoritmus implementován pro počítač.

10

1 – Vybere se část zobrazených dat, okénko 40x40, obsahující hodnotu intenzity pro jednotlivý pixel (prvek v obrázku) zobrazené matice, který zahrnuje první jamku, která se má zkoumat.

2 – Definuje se funkce, která vypočítává očekávanou intenzitu na pozici každého pixelu, přičemž se používá 16 neznámých. Tyto neznámé jsou:

15

- amplitudy v každém ze 13 odlišných bodů mikromatice (to je, jak jasné jsou skutečné signály na každé pozici v DNA matici). Protože ze 16 (=4x4) míst v každé jamce je 13 různých a ostatní představují duplikáty některých cílů.
- x – odchylka a y – odchylka, které definují přesnou pozici matice 4x4 v konkrétní jamce.
- intenzita pozadí obrázku matice v jamce.

20

Tato funkce vyhodnocuje pro pozici každého pixelu vzdálenost mezi pixelem a každým místem, a přičítá k intenzitě, pozorované na každém pixelu, určitou hodnotu, způsobenou povahou jednotlivého místa, přičemž tuto hodnotu vypočítává násobením amplitudy v daném místě hodnotou, která je funkcí závislosti odezvy impulsu na vzdálenosti pixelu od místa. Pro daná zobrazení se používá funkce odezvy impulsu, která je definována součtem Gaussových a Lorentzových směrodatných (konstantních) odchylek.

25

30

3 – zahájí se rychlé úpravy hodnot pro danou jamku odhadem hodnot těchto parametrů. Při tom se vypočítává průměrná intenzita obrázku pro každou ze 16 oblastí obrázku, ve které se očekává testovací místo. Úbytek hodnoty při určité poloze na každé koordinátě a empiricky se tak získají konstanty pro úpravu hodnoty v určité vzdálenosti. Pak se matematickým přepočtem pomocí

těchto konstant upraví výsledky ze 16 míst s 13 různými amplitudami. Pro pozadí a odchylky se použijí jakkoliv malá čísla.

4 – Optimalizují se upravené hodnoty (pro 16 neznámých) úpravou křivky. Konkrétně byla použita metoda nelineární regrese pomocí nejmenších čtverců podle Marquardta, přičemž se pro uvedených 16 neznámých získá $40 \times 40 = 1600$ rovnic (Pochopitelně ne všechny rovnice jsou lineárně nezávislé).

5 – Použije se hodnota chyb x a y , vypočtených pro danou jamku, k přesnějšímu odhadu, jak je umístěn rastr v další jamce mikrodestičky. Ta se očekává ve vzdálenosti 9 milimetrů na koordinátě od sousední jamky (vzdálenost získána převedením počtu pixelů podle zvětšení, které používá daný zobrazovací systém). Vzhledem k tomu, že vzdálenost mezi jamkami je vůči velikosti destičky malá, použití lokálních odhadů pozice je nejpřesnější.

6 – Pomocí zlepšeného odhadu pozice se definuje menší ploška obrázku pro zpracování signálů z pixelů z další jamky, a to 30×30 . To výrazně zrychlí proces zpracování hodnot.

Jdi na stupeň 2 a opakuj pro každou jamku.

Z předchozího popisu může odborník v oboru snadno pochopit podstatné vlastnosti vynálezu, a aniž by se odchýlil od myšlenky vynálezu a aniž by vybočil z jeho rozsahu, může uskutečnit různé obměny a modifikace vynálezu, aby jej přizpůsobil různému použití a různým podmínkám.

Bez dalšího propracování to může odborník, který ovládá obor, dle našeho mínění provést a jen s použitím předchozího popisu může využít vynález v celém rozsahu. Popsaná výhodná provedení byla míněna pouze ilustrativně, a ne jako omezení popisu v jakémkoliv směru.

Celý popis všech aplikací, patentů a publikací, citovaných shora a veškerá jejich vyobrazení jsou tímto včleněny do popisu formou odkazu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob detekce alespoň jednoho cíle, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje:

a) uvádění vzorku, který může obsahovat uvedený(é) cíl(e) do kontaktu s kombinací, která před přidáním tohoto vzorku obsahuje

i) povrch, obsahující více prostorově oddělených oblastí, z nichž alespoň dvě jsou v podstatě identické, přičemž každá oblast zahrnuje

ii) alespoň dvě různá místa kotev, přičemž kotvy v každém místě jsou každá ve spojení s

iii) bifunkčním linkerem, který má první část, která je specifická pro kotvu, a druhou část, která zahrnuje sondu, která je specifická pro uvedený(é) cíl(e),

za podmínek, při kterých se uvedený(é) cíl(e) účinně váže (vážou) na tuto kombinaci, a

kde dvě nebo více kotev umístěných v alespoň jednom místě oblasti jsou ve spojení s různými bifunkčními linkery, majícími rozdílnou specifickou pro cíl.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje uvádění do kontaktu uvedené kombinace a jakýchkoli vázaných cílů s alespoň jedním detekčním linkerem, který obsahuje první část specifickou pro jeden vázaný cíl (jeden z vázaných cílů) a druhou část specifickou pro hlásicí činidlo.

5

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje vázání uvedené kombinace a jakýchkoli vázaných cílů s alespoň jednou detekční sondou.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že

10

první detekční sonda se váže na první cíl, vázaný na kombinaci v prvním místě,

druhá detekční sonda se váže na druhý cíl, vázaný na kombinaci ve stejném místě, a

15

první detekční sonda a druhá detekční sonda se detekují současně nebo postupně.

5. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že uvedeným(i) cílem(y) je (jsou) fragment(y) chránící detekovaný cíl před nukleázou, specifický(e) pro hledanou(é) nukleovou(é) kyselinu(y).

20

6. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že uvedeným(i) cílem(y) je (jsou) fragment(y) chránící detekovaný cíl před nukleázou, specifický(é) pro hledanou(é) nukleovou(é) kyselinu(y).

25

7. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že uvedeným(i) cílem(y) je (jsou) fragment(y) chránící detekovaný cíl před nukleázou, specifický(é) pro hledanou(é) nukleovou(é) kyselinu(y).

30

8. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že každá oblast obsahuje alespoň osm různých kotev.

9. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že alespoň jeden detekční linker se zřídí blokovaným detekčním linkerem.

35

10. Způsob podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že alespoň jeden detekční linker se zřídí blokovaným detekčním linkerem.

11. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že alespoň jeden detekční linker se zřídí blokovaným detekčním linkerem.

40

12. Způsob podle nároku 1, pro detekci alespoň jednoho cíle na bázi nukleové kyseliny, **vyznačující se tím**, že zahrnuje:

45

a) uvádění vzorku, který může obsahovat uvedený(é) cíl(e) do kontaktu s fragmentem(y) chránícím(i) detekovaný cíl před nukleázou, specifickým(é) pro uvedený(é) cíl(e) a který(é) se váže(ou) na tento (tyto) cíl(e), vystavením vzorku účinku nukleázy schopné digestovat zbývající jednovláknové nukleové kyseliny a potom se výsledný vzorek uvede do kontaktu s kombinací, která obsahuje

50

i) povrch, obsahující více prostorově oddělených oblastí, z nichž alespoň dvě jsou v podstatě identické, přičemž každá oblast zahrnuje

ii) alespoň dvě různá místa kotev, přičemž kotvy v každém místě jsou každá ve spojení s

iii) bifunkčním linkerem, který má první část, která je specifická pro kotvu, a druhou část, která zahrnuje sondu, která je specifická pro jeden z fragmentů chránících detekovaný cíl před nukleázou,

- 5 za podmínek, při kterých se uvedený(é) fragment(y) chránící detekovaný cíl před nukleázou účinně váže (vážou) na tuto kombinaci, a

kde dvě nebo více kotev umístěných v prvním místě oblasti jsou ve spojení s různými bifunkčními linkery, majícími rozdílnou specifickou pro cíl, a

10

b) detekování tohoto (těchto) vázaného(ých) fragmentu(ů).

13. Způsob podle nároku 12, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále zahrnuje hybridizaci vázaných fragmentů se specifickými detekčními linkery a/nebo detekčními sondami, přičemž se vytváří signál odpovídající každé z uvedených nukleových kyselin.

15

14. Způsob podle nároku 13, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že jeden cíl je přítomen ve větší hojnosti než druhý cíl v uvedeném vzorku a řady uvedených rozdílných bifunkčních linkerů v prvním a druhém místě jsou upraveny tak, že signály odpovídající prvním a druhým cílům jsou souhlasně upraveny a/nebo souhlasně upravení těchto signálů používá blokové detekční linkery.

20

15. Způsob podle nároku 12, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále zahrnuje:

- 25 a) hybridizaci uvedené kombinace a jakékoli (jakýchkoli) vázaného(ých) fragmentu(ů) chránícího(ch) detekovaný cíl před nukleázou s alespoň jedním detekčním linkerem, který obsahuje první část, která je specifická pro jeden z vázaných fragmentů chránících detekovaný cíl před nukleázou, a druhou část, která je specifická pro hlásící činidlo,

- 30 b) uvedení do kontaktu tohoto (těchto) detekčního(ích) linkeru(ů) s hlásícím činidlem obsahujícím signální entitu, a

c) detekování uvedené signální entity.

- 35 16. Způsob podle nároku 15, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že

první detekční linker se váže na první fragment chránící detekovaný cíl před nukleázou, vázaný v prvním místě,

- 40 druhý detekční linker se váže na druhý fragment chránící detekovaný cíl před nukleázou, vázaný ve stejném místě, a

první detekční linker a druhý detekční linker se detekují současně nebo postupně.

- 45 17. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že uvedené oblasti jsou ve formě trubičky a místa na kotvách jsou uspořádána v lineárním seskupení v těchto trubičkách.

18. Způsob podle nároku 12, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že uvedené oblasti jsou ve formě trubičky a místa na kotvách jsou uspořádána v lineárním seskupení v těchto trubičkách.

50

19. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že alespoň jedním z cílů je DNA molekula a alespoň jedním z cílů je RNA molekula.

20. Způsob podle nároku 12, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že alespoň jeden z fragmentů chránících detekovaný cíl před nukleázou je specifický pro DNA molekulu a alespoň jeden z fragmentů chránících detekovaný cíl před nukleázou je specifický pro RNA molekulu.

5 21. Způsob podle nároku 12, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že cílový(é) fragment(y) je (jsou) amplifikován(y) pomocí PCR předtím než se vzorek(ky) uvede(ou) do kontaktu s kombinací.

22. Způsob podle nároku 21, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se cíl(e) amplifikuje(i) pomocí PCR za použití dvou PCR primérů, přičemž jeden nebo oba z nich obsahují chemickou modifikaci, která dovolu je priméru přichytit se na tuhém povrchu.

23. Způsob podle nároku 1 nebo 12, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje uvedení do styku této kombinace a jakýchkoli vázaných cílů se značenou detekční sondou a detekování této značné sondy, přičemž tato značená detekční sonda obsahuje nekonvertovaný fosfor.

15 24. Způsob podle nároku 6 nebo 13, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje:

uvedení do styku kombinace a jakýchkoli vázaných fragmentů s alespoň dvěma detekčními linker-y, z nichž každý obsahuje část specifickou pro jeden z uvedených fragmentů a část specifickou pro běžnou 3' přesahující sekvenci na uvedených fragmentech, která není specifická pro uvedené cíle,

uvedení do kontaktu těchto detekčních linkerů s hlásicím činidlem, které je specifické pro uvedenou běžnou sekvenci a který obsahuje signalizační entitu, a

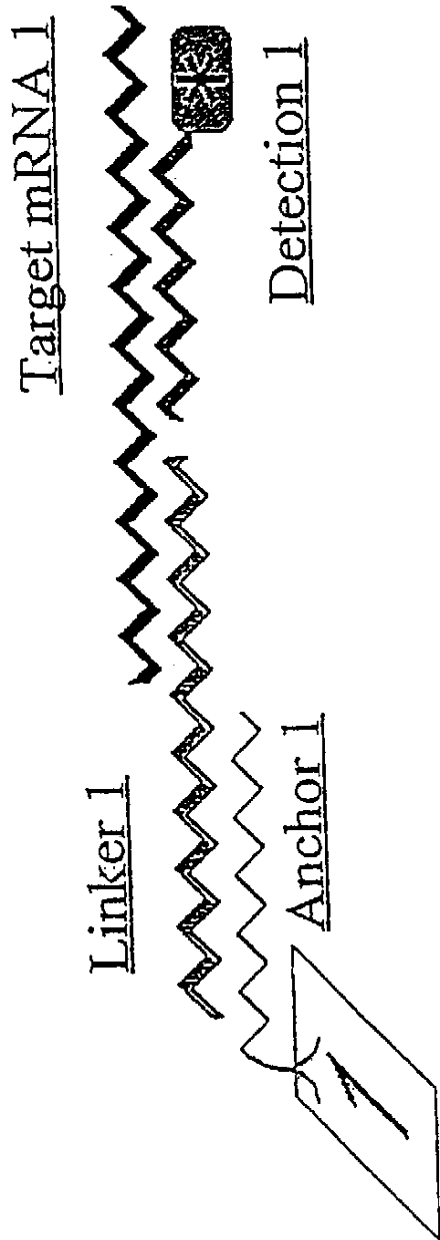
25 detekování uvedené signalizační entity.

25. Způsob podle nároku 12, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že uvedená kombinace obsahuje 25 až 1536 oblastí.

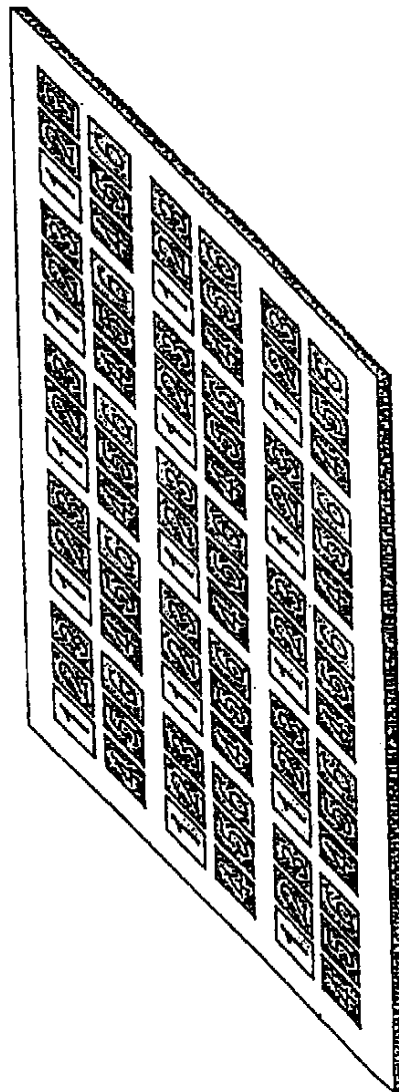
30 26. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že každá oblast obsahuje alespoň osm různých kotev.

27. Způsob podle nároku 12, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že každá oblast obsahuje alespoň osm různých kotev.

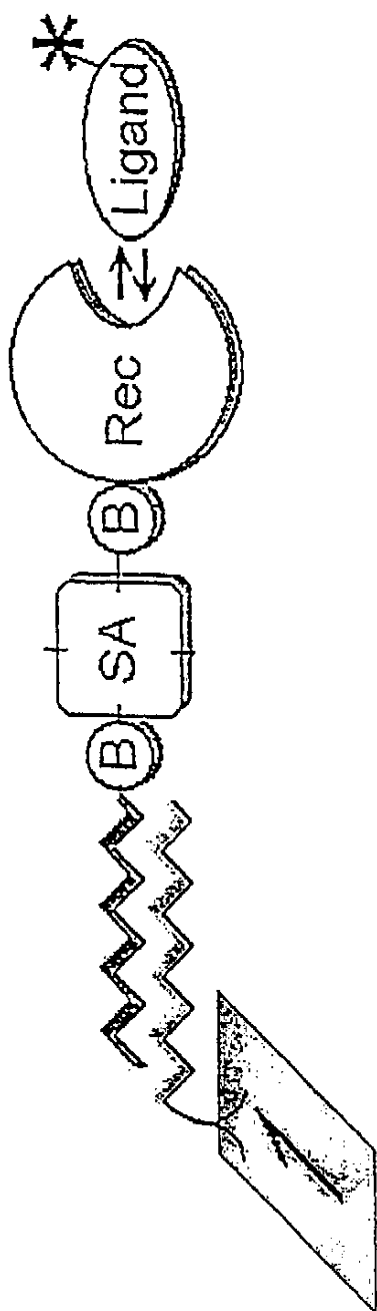
40 22 výkresů



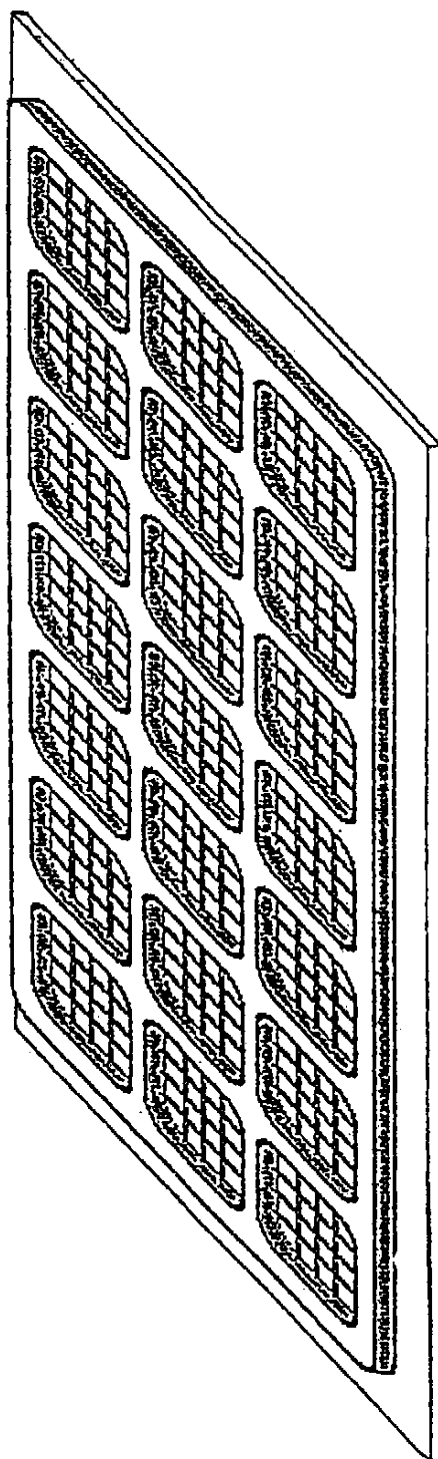
OBR. 1



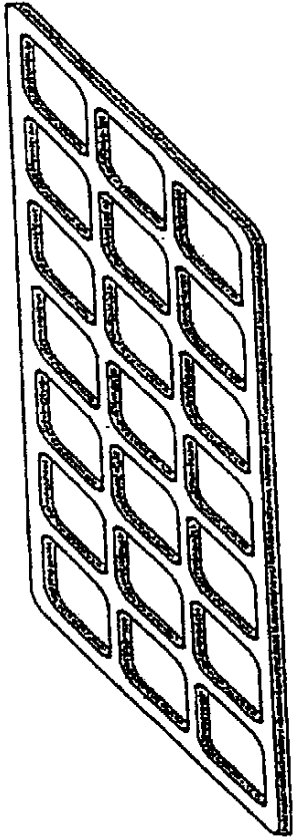
OBR. 2



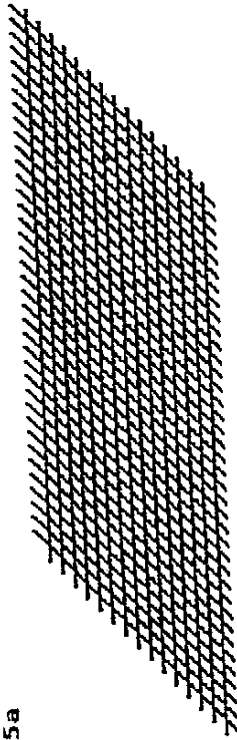
OBR . 3



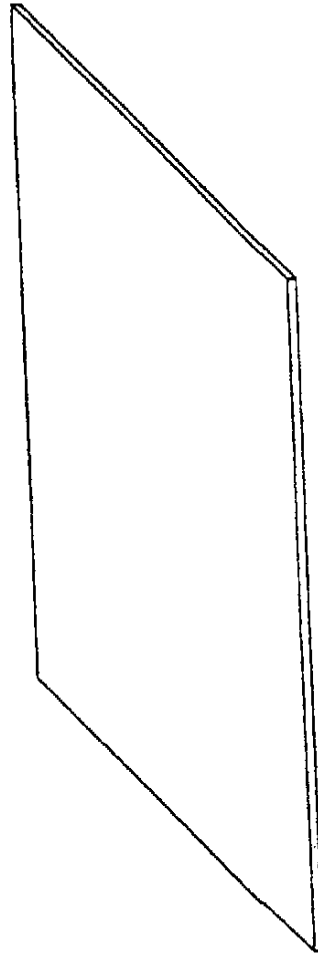
OBR . 4



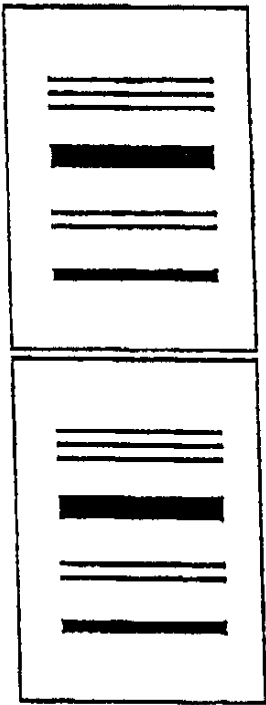
OBR. 5a



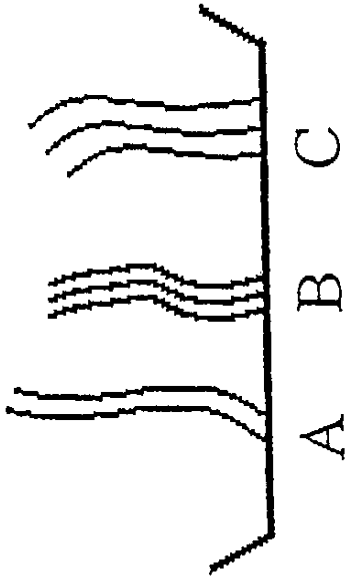
OBR. 5b



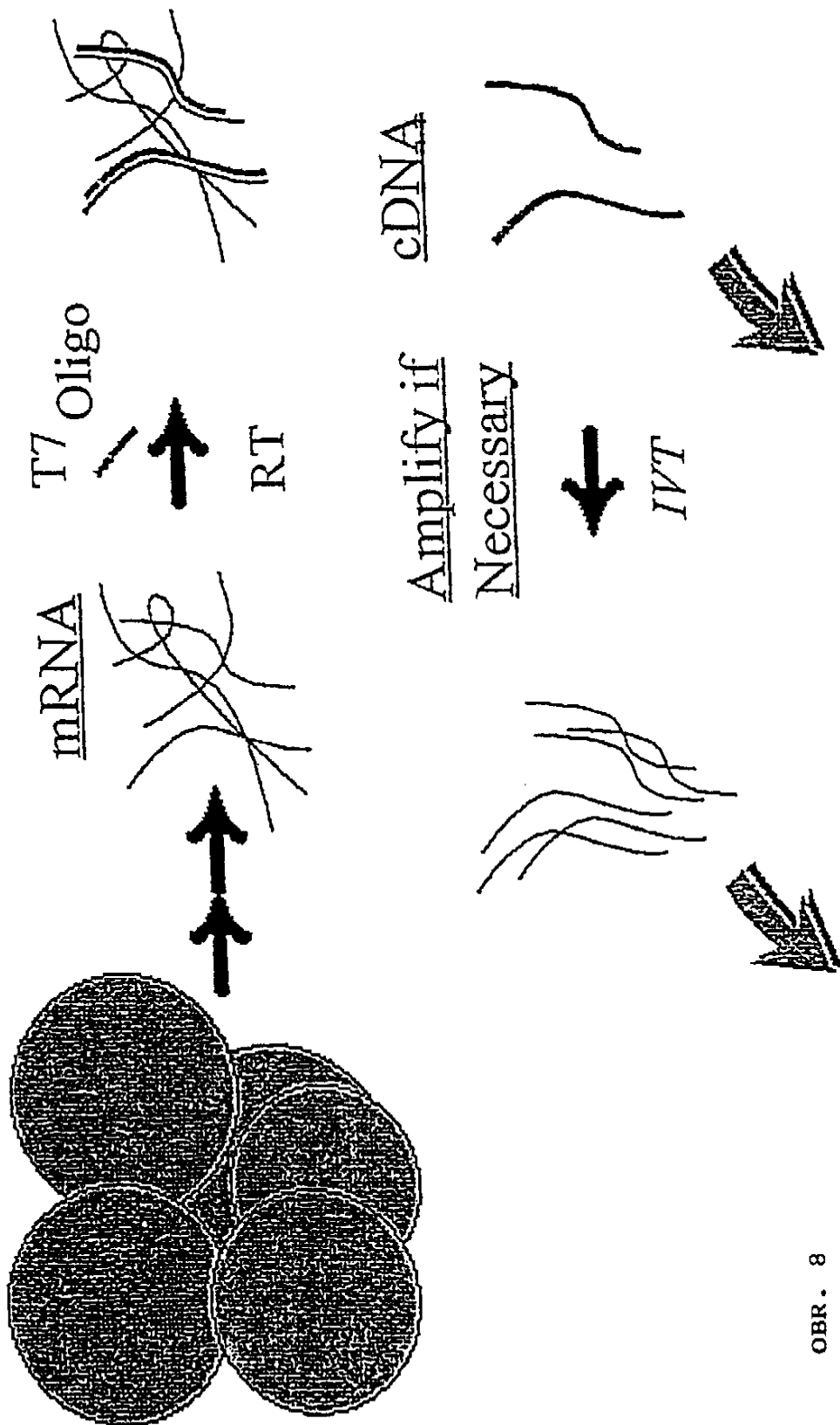
OBR. 5c



OBR. 6

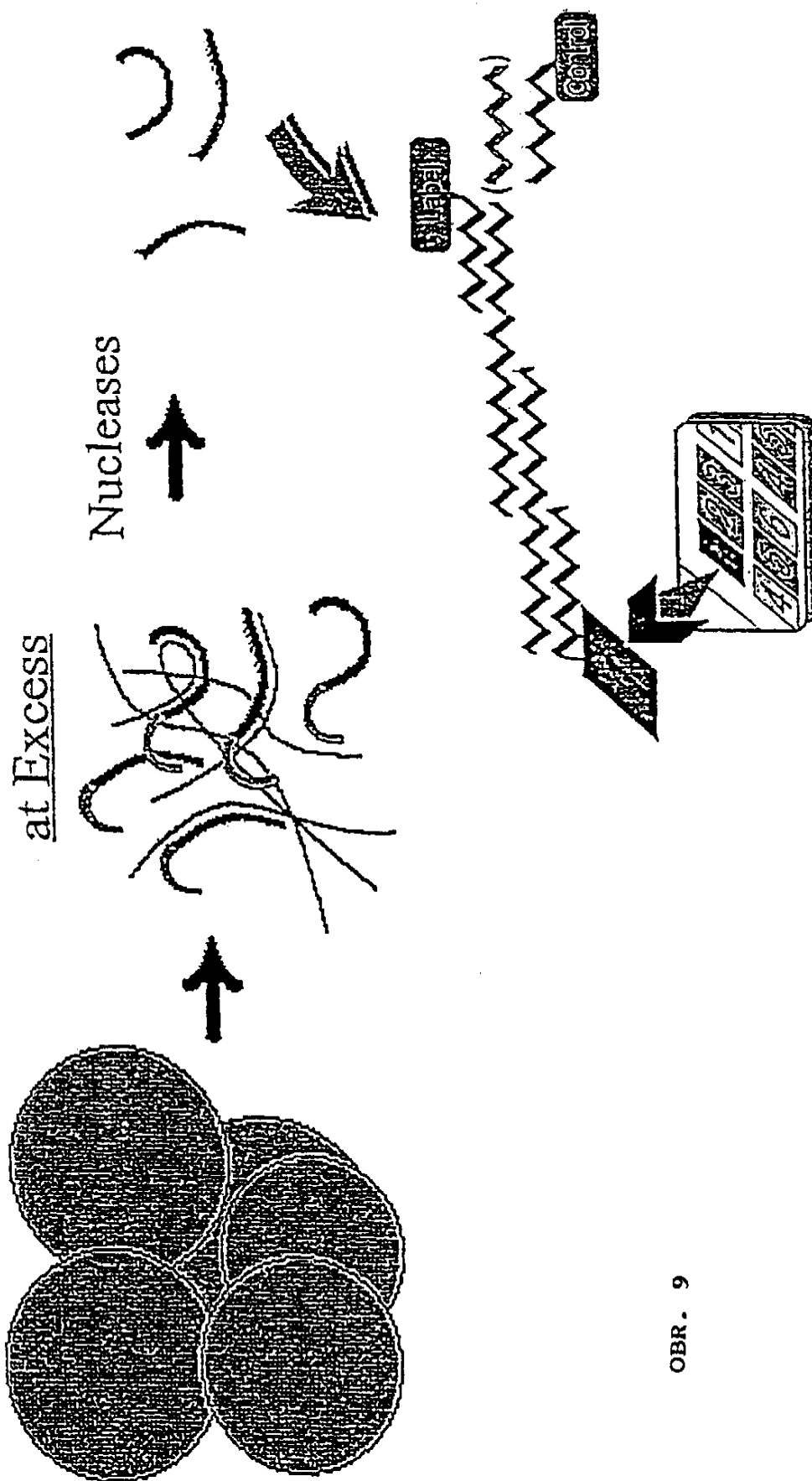


OBR. 7



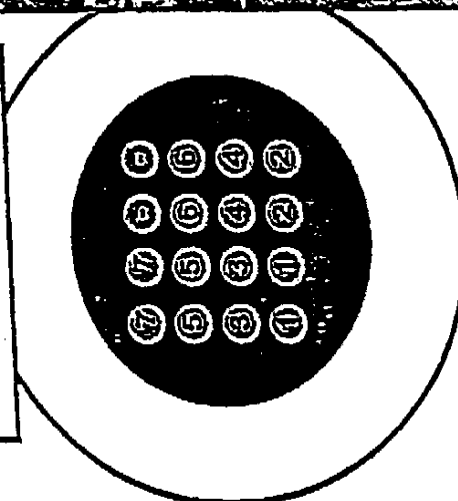
OBR. 8

Protection Fragments

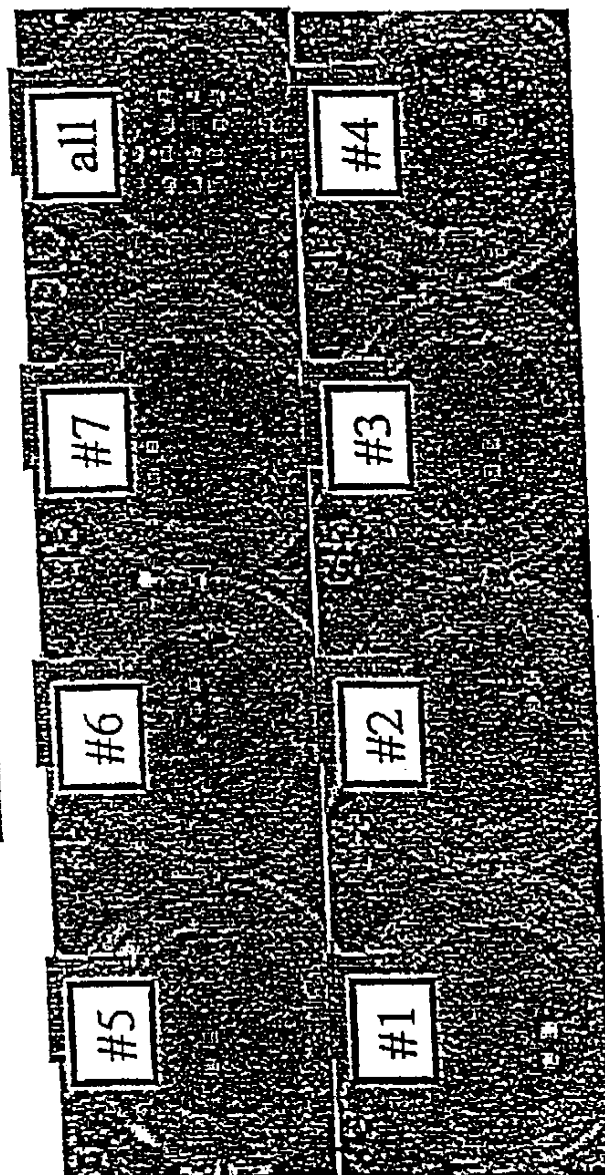


OBR. 9

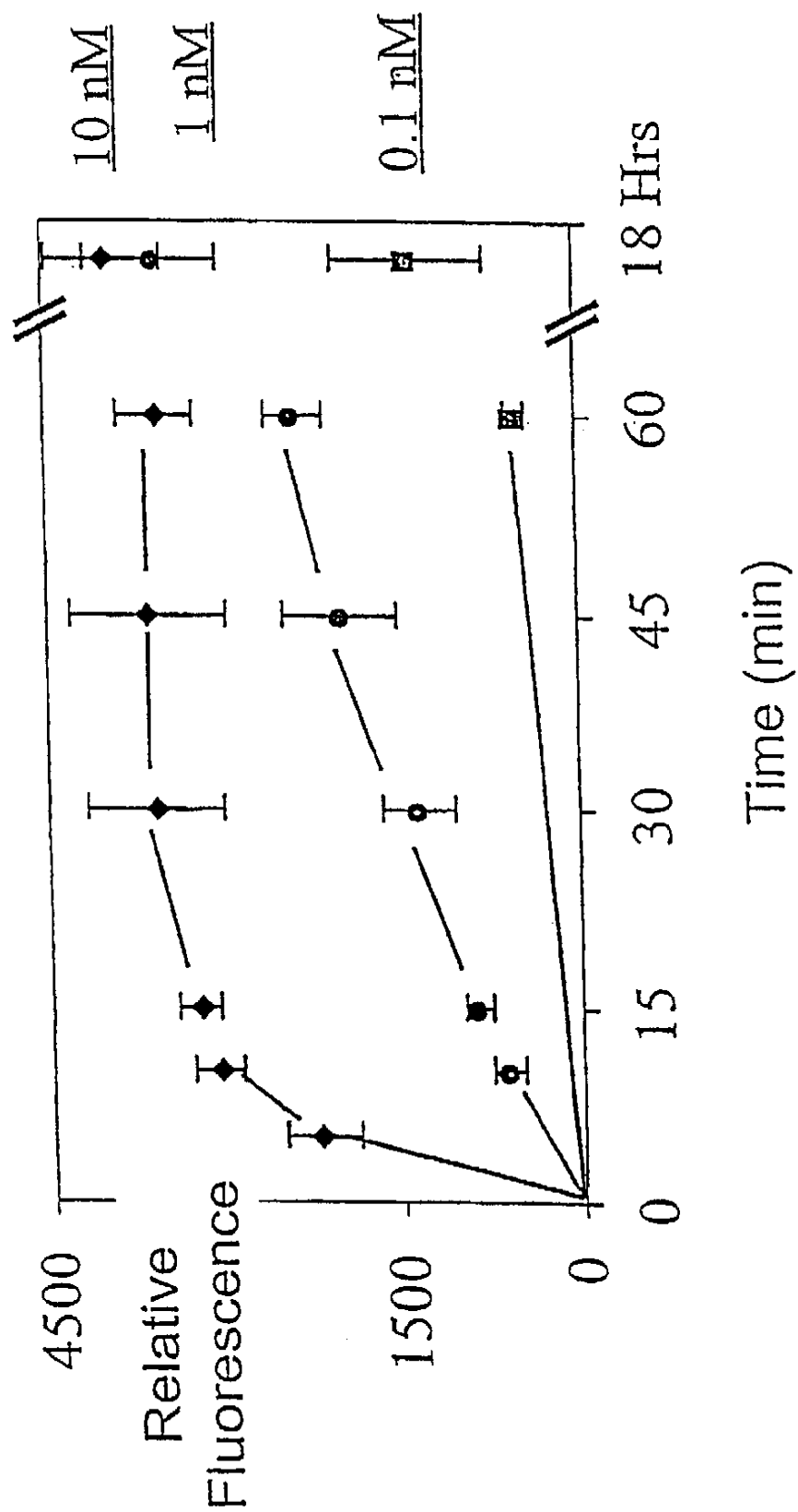
Key:
Anchors
Attached in
Each Well



Experimental:
Linker Added

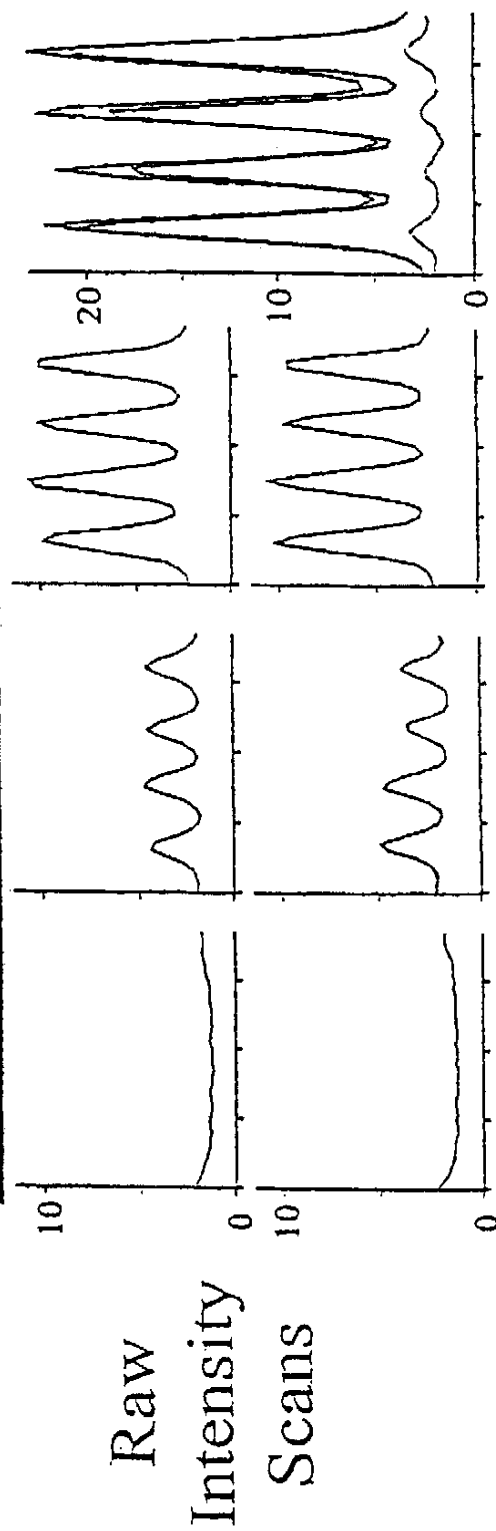
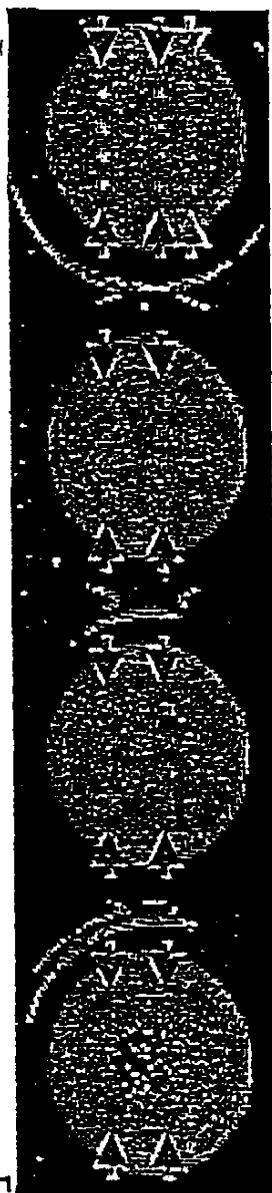


OBR. 10

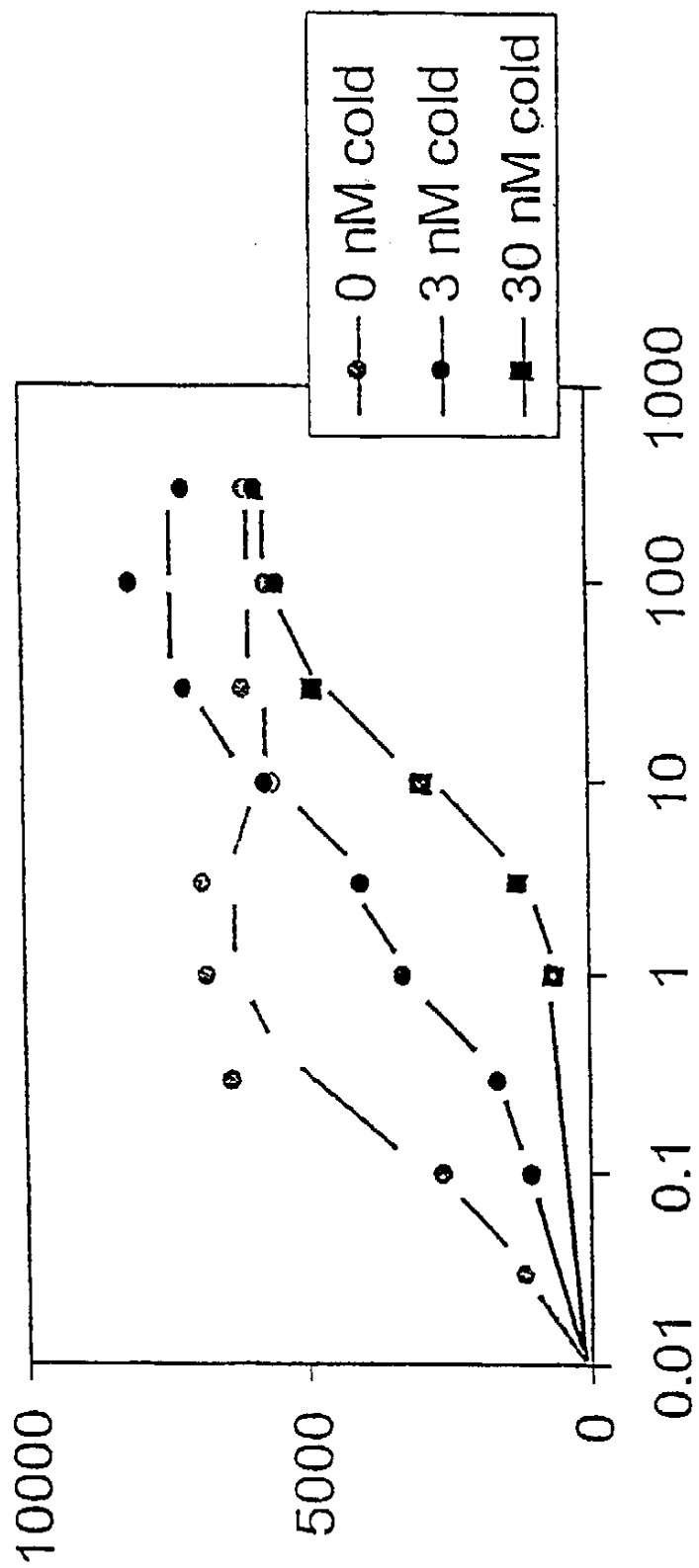


OBR. 11

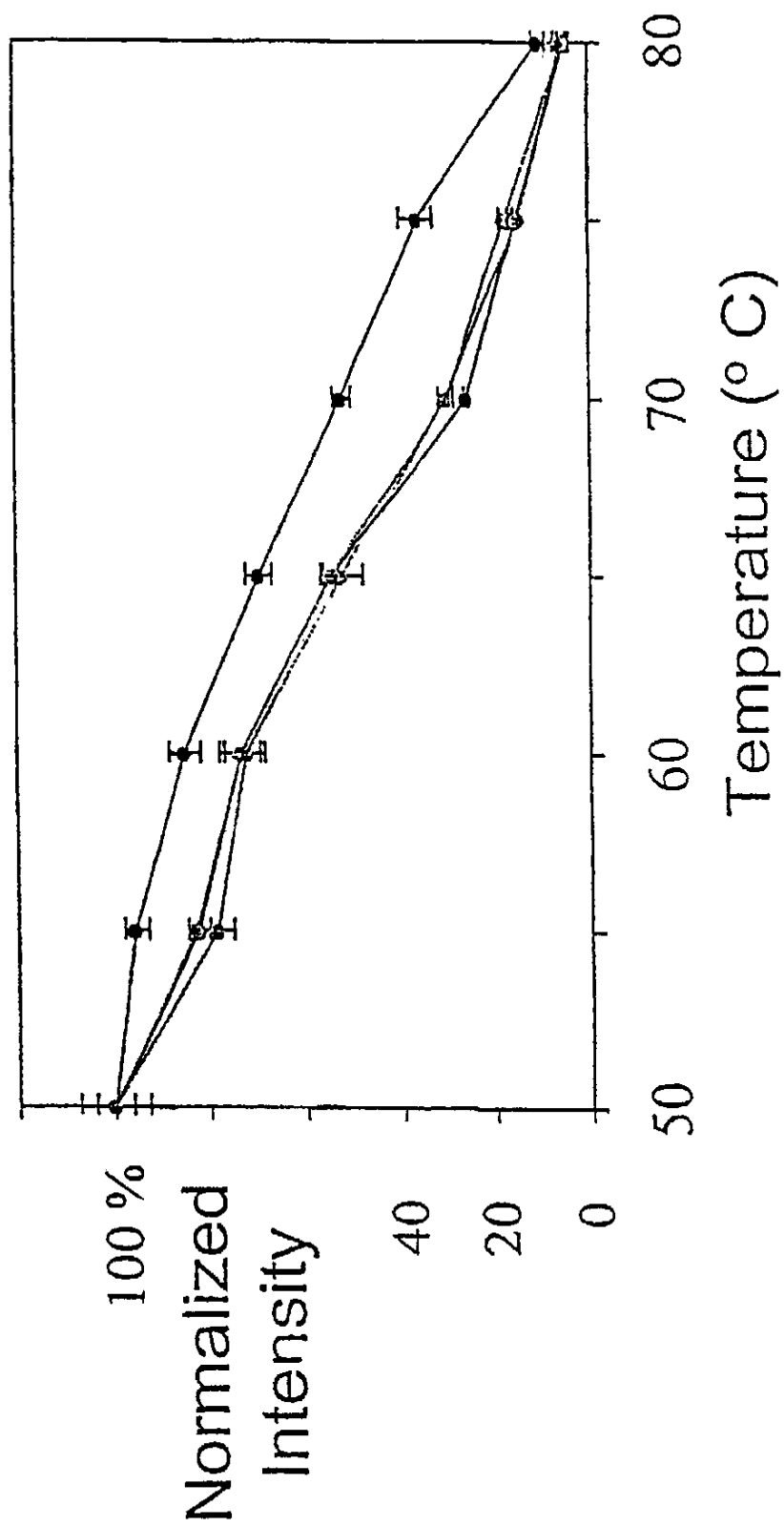
[Target]: 0.0 1.1 3.3 10.0 pM



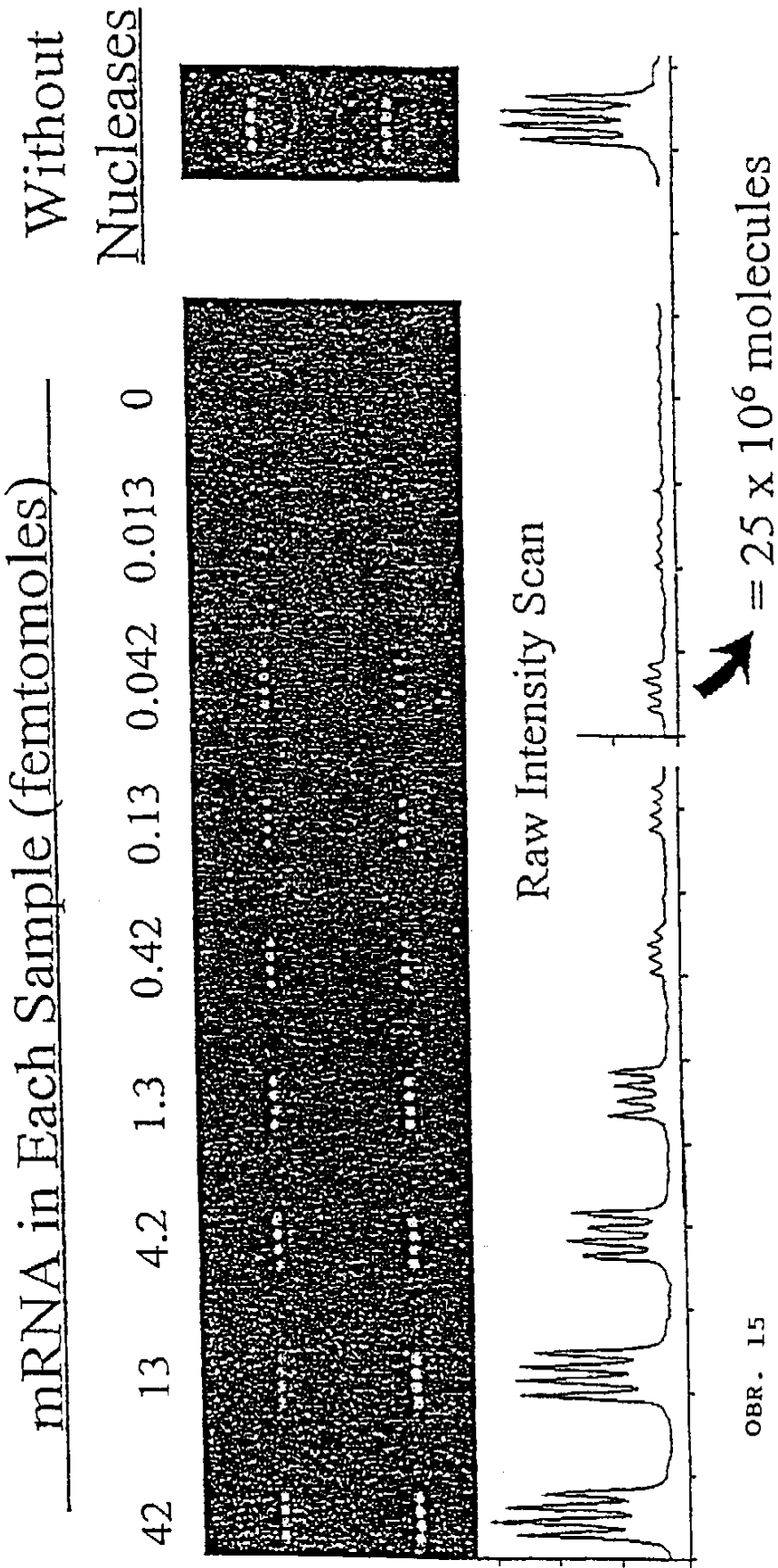
OBR. 12



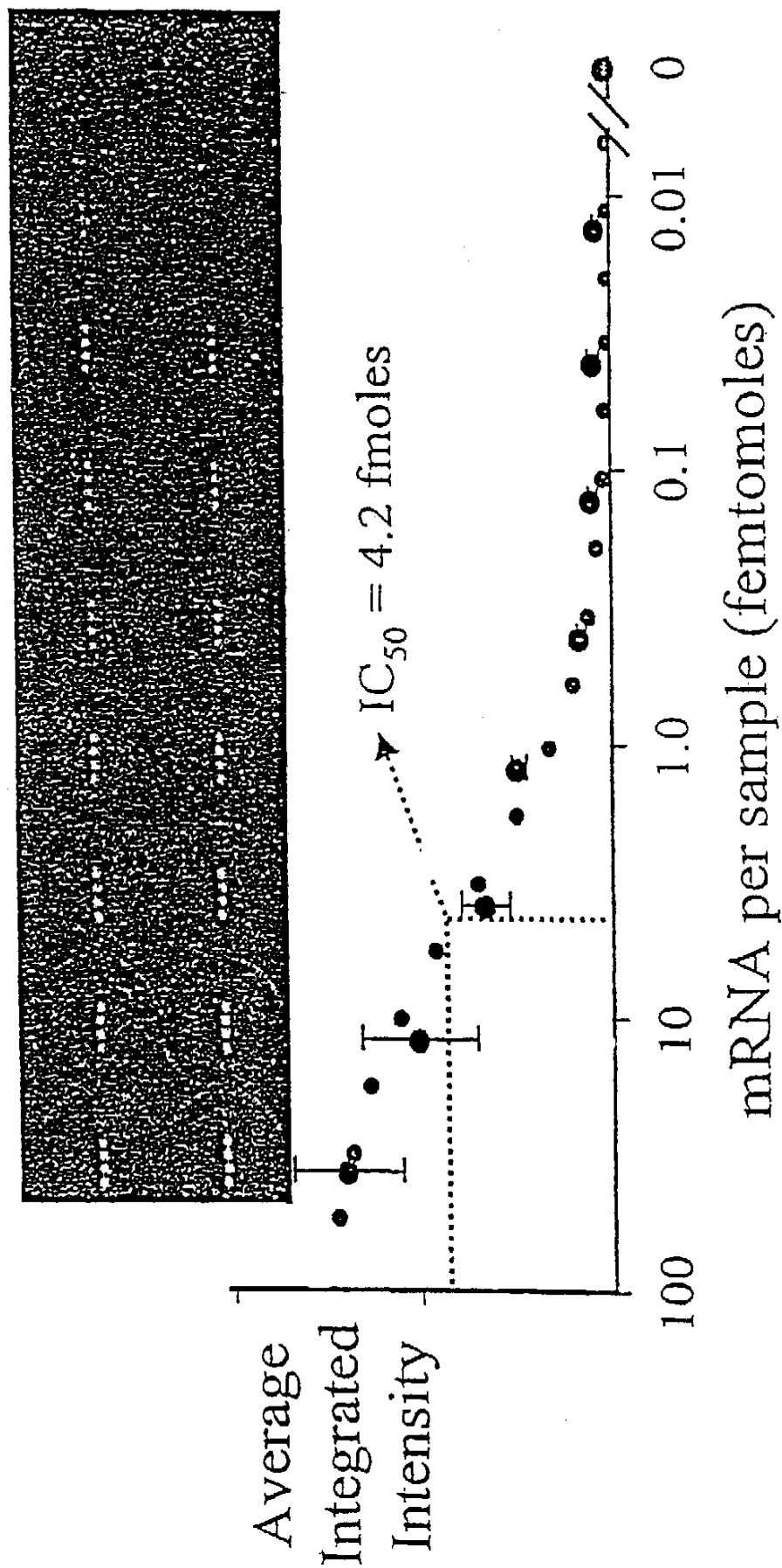
OBR. 13



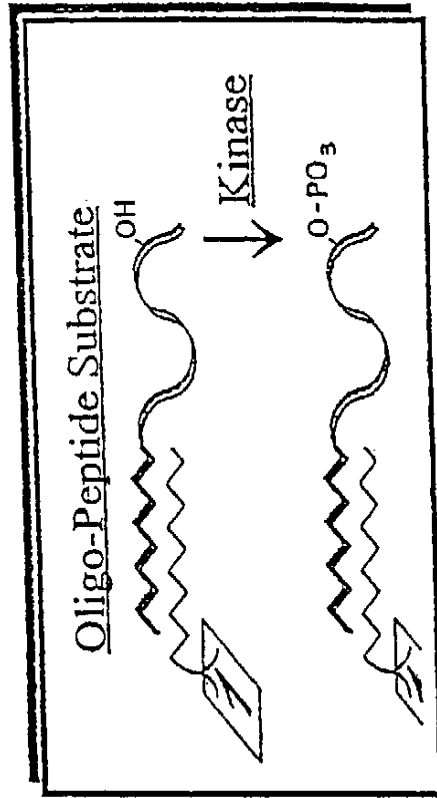
OBR. 14



OBR. 15



OBR. 16

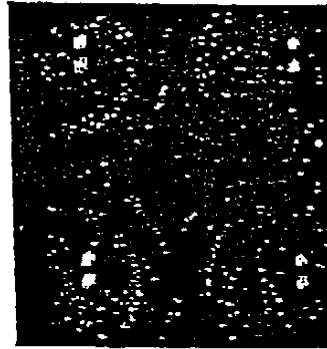
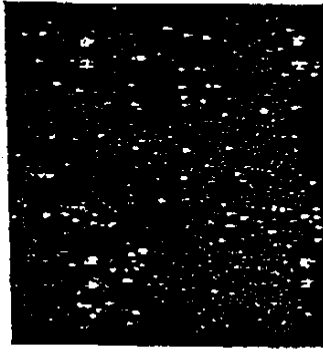


Concentration of Oligo-Peptide
10 nM 3 nM

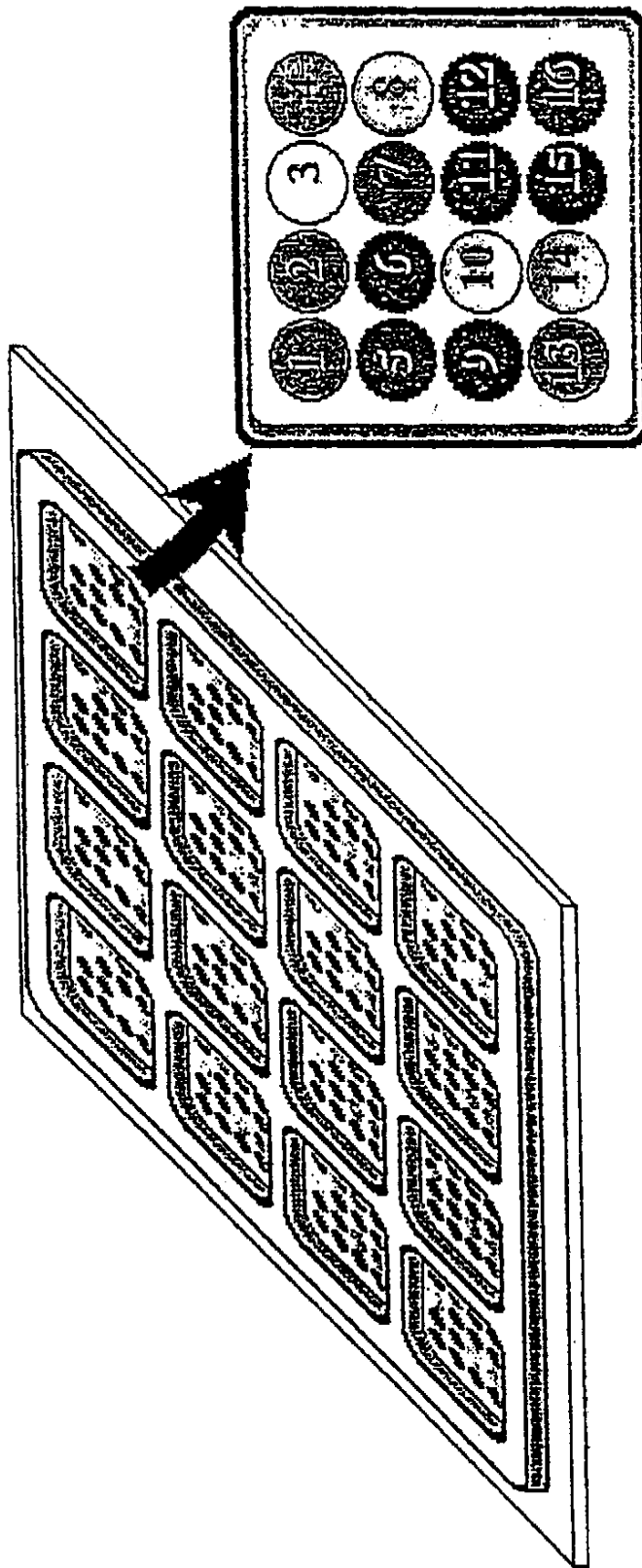
Phosphorylated
 Chimera

Partially*

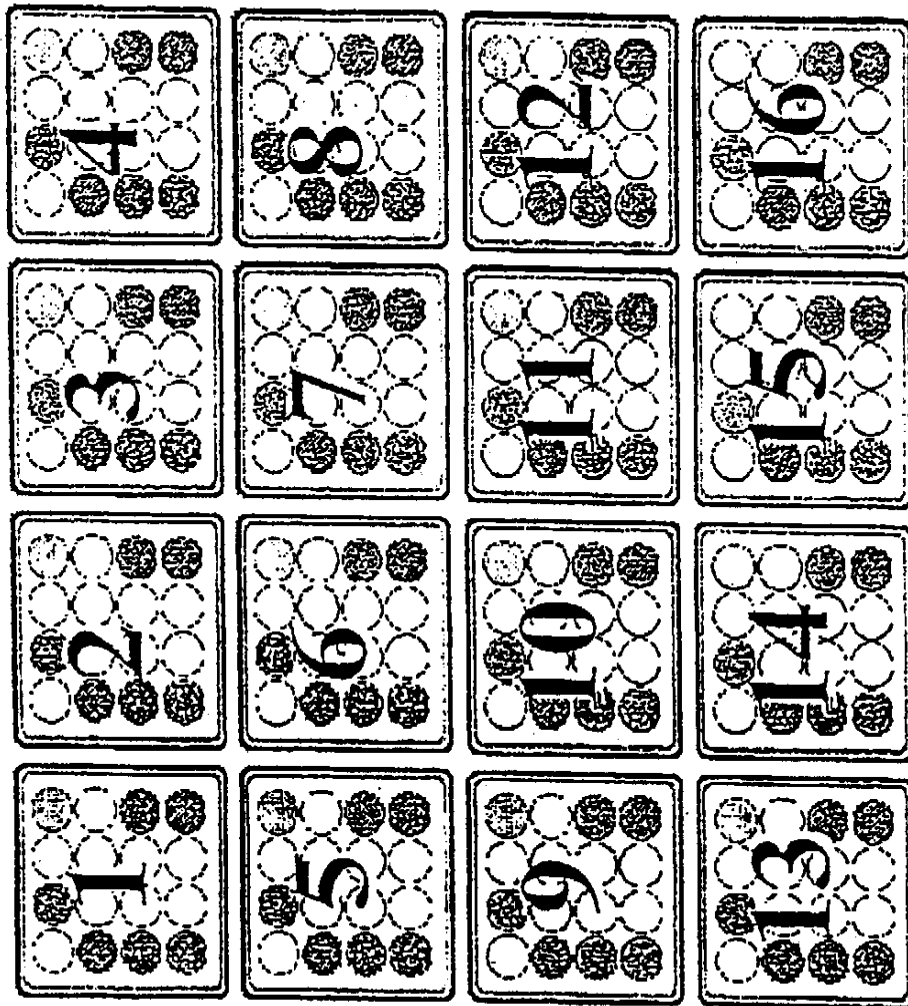
De-Phosphorylated



OBR. 17



OBR. 18



OBR. 19

Assigned

Linkage

1	---	3	4
5	6	7	8
9	10	11	
12 ---- 16			

OBR. 20b

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16

OBR. 20a

Gene X (mRNA)

probe 1 detector
oligonucleotide 1

EST 1

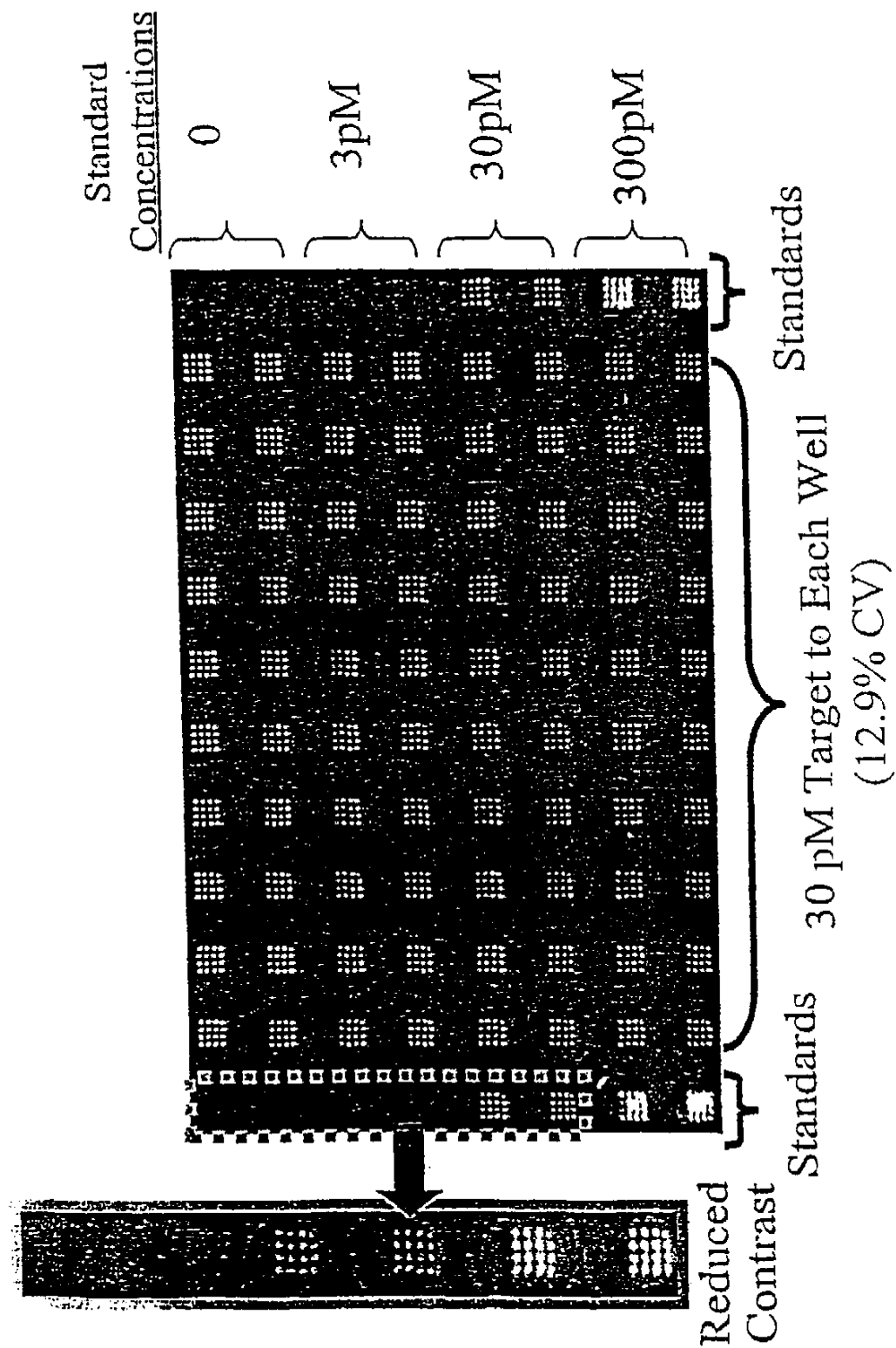
probe 2 detector
oligonucleotide 2

EST 2

probe 6 detector
oligonucleotide 6

EST 6

OBR. 21

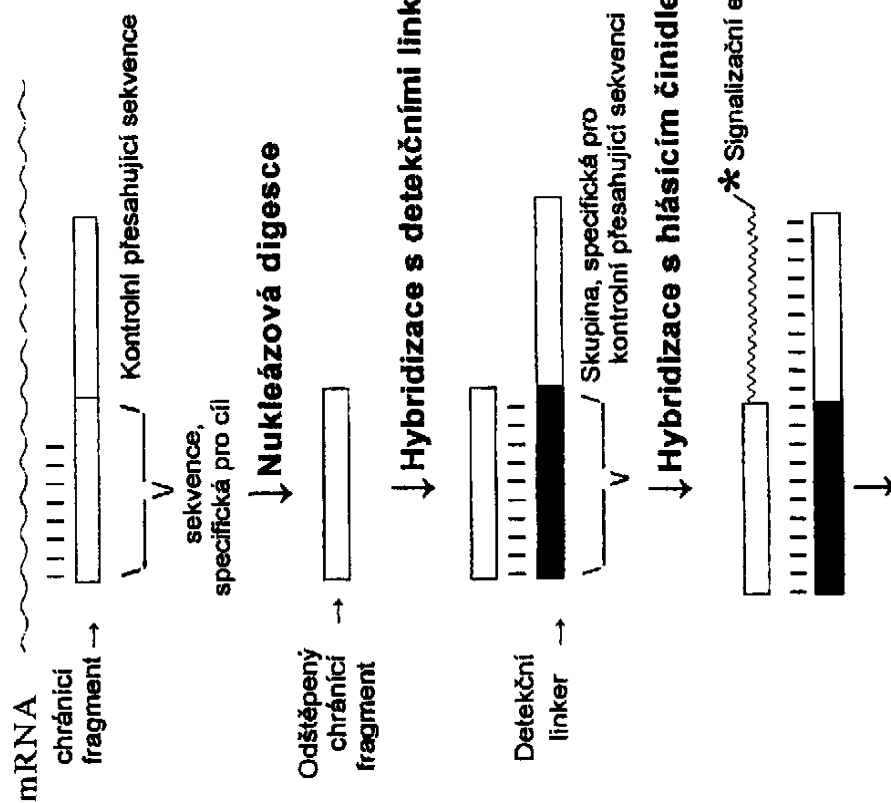


OBR. 22

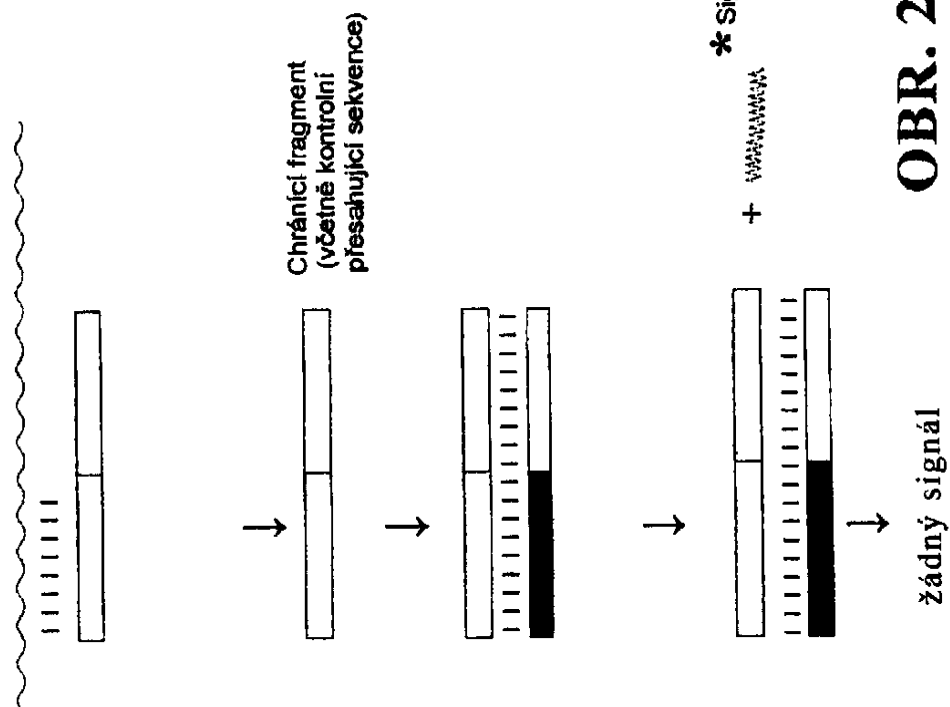
OBR 23



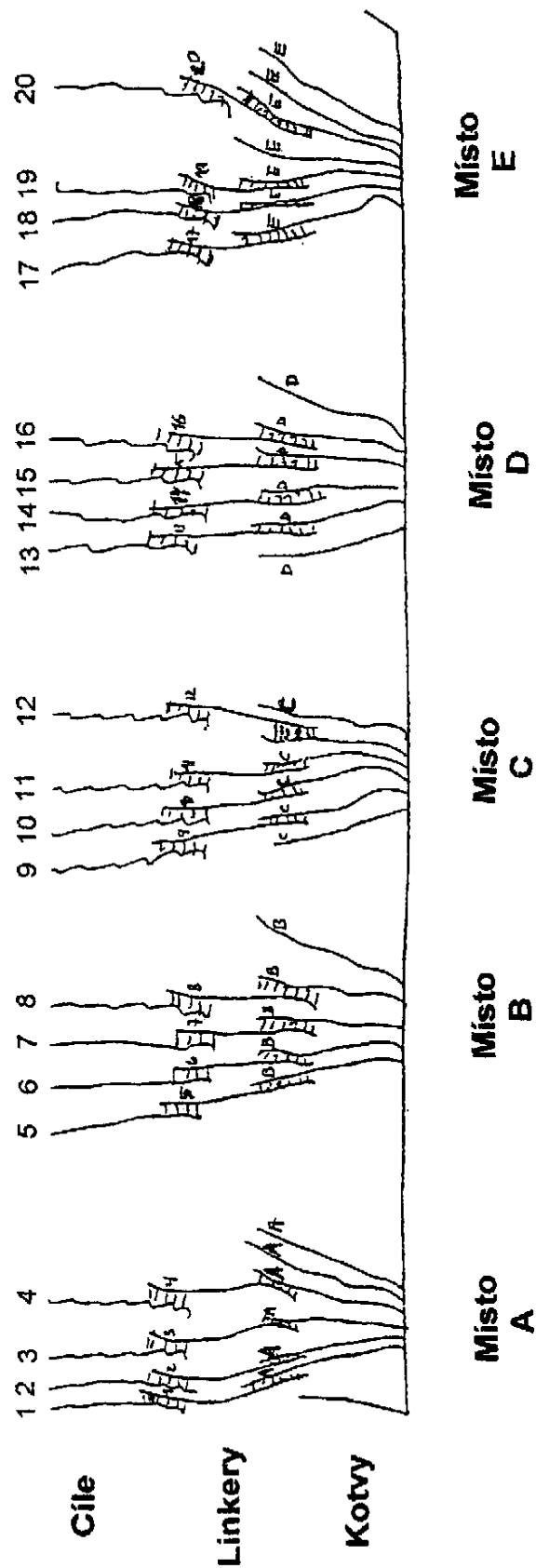
Úplná nukleázová digeste



Neúplná nukleázová digeste



OBR. 24



OBR 25

Konec dokumentu