

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **227811**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **408727**

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

(22) Data zgłoszenia: **30.06.2014**

(54) **Zestaw diagnostyczny i sposób jednoczesnego wykrywania mutacji w obrębie genu NF1 dla grupy pacjentów z podejrzeniem choroby Recklinghausena**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
04.01.2016 BUP 01/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.01.2018 WUP 01/18

(73) Uprawniony z patentu:
GENOMED SPÓŁKA AKCYJNA, Warszawa, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
**ANNA BOGUSZEWSKA-CHACHULSKA,
Warszawa, PL
MARIUSZ KRAWCZYK, Raszyn, PL
ANNA WĄSOWSKA, Tarnowskie Góry, PL
MAREK ZAGULSKI, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Iwona Płodzich-Hennig

PL 227811 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zestaw diagnostyczny i sposób jednoczesnego wykrywania mutacji w obrębie genu *NF1* dla grupy pacjentów z podejrzeniem choroby Recklinghausena.

Choroba Recklinghausena to choroba wywoływana przez mutacje w obrębie genu *NF1*, kodującego białko neurofibrominy, zlokalizowanego na chromosomie 17q11.2. Jest to gen o jednym z najwyższych współczynników występowania mutacji spontanicznych, co sprawia, że ich wykrycie jest szczególnie trudne.

Obraz kliniczny zmian wywoływanych przez mutacje w obrębie genu *NF1* jest bardzo zróżnicowany, począwszy od zmian skórnych w postaci plam koloru kawy z mlekiem (*café-au-lait*), czy piegów w okolicach pach i pachwin po glejaka nerwu wzrokowego, patrz: *Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1)*; M. Shen i in. *J. Med. Genet.* 1996; 33:2–17. Ponieważ postawienie prawidłowego rozpoznania wyłącznie na podstawie objawów klinicznych choroby nie jest możliwe, stąd w diagnostyce neurofibromatozy typu I stosuje się różnego rodzaju metody analizy mutacji genu *NF1*.

W amerykańskim zgłoszeniu patentowym US20030134272 A1 ujawniono sposób analizy mutacji, w którym poprzez stymulację fitohemaglutyniną izolowanych z krwi obwodowej pacjenta limfocytów uzyskuje się B-limfoblastoidalną transformowaną EBV linię komórkową. Po izolacji RNA z tej linii komórkowej dokonuje się syntezy i amplifikacji cDNA poprzez reakcję RT-PCR i analizy cDNA za pomocą sekwencjonowania. Za pomocą sposobu ujawnionego w tym zgłoszeniu nie można dokonać masowej analizy wszystkich mutacji.

W międzynarodowym zgłoszeniu patentowym WO03074740 A1 ujawniono sposób analizy mutacji, przy czym uniwersalna w założeniu twórców rozwiązania metoda pozwala na wykrywanie pojedynczych, znanych już mutacji, a zatem nie jest odpowiednia do wykrywania nowopowstałych mutacji, które jeszcze nie są znane.

Patent amerykański US6238861 B1 ujawnia ogólny proces identyfikacji sekwencji genu *NF1*. W diagnozowaniu choroby wykorzystuje się standardowe sekwencjonowanie, przy czym ujawnienie nie zapewnia gotowego zestawu diagnostycznego a jedynie przedstawia ogólny zestaw technik, opartych na reakcji PCR i klasycznym sekwencjonowaniu.

Z kolei w amerykańskim zgłoszeniu patentowym US56005799 A ujawniono metodę wykrywania mutacji somatycznych w genie *NF1*, związanych z nieprawidłową regulacją białka *ras* u pacjentów z chorobą nowotworową. Metoda ta ujawnia analizę jedynie mutacji somatycznych i jest dedykowana określonej grupie pacjentów.

Znane w stanie techniki sposoby wykrywania mutacji w obrębie genu *NF1* wymagają szeregu czynności przygotowawczych i muszą być prowadzone osobno dla każdego z pacjentów, co sprawia, że analiza mutacji genu *NF1* jest wysoce czasochłonna i kosztowna.

Poza tym, mutacje w obrębie genu *NF1* są wykrywane z podobną częstością w różnych eksonach, dlatego też pełna analiza mutacji w obrębie tego genu musi obejmować wszystkie 58 fragmentów kodujących.

Celem wynalazku jest dostarczenie zestawu diagnostycznego do wykrywania mutacji w obrębie genu *NF1*, który obejmuje pełną analizę mutacji w obrębie sekwencji kodujących oraz intronowych, odpowiedzialnych za splicing, dla tego genu a przy tym umożliwia szybkie i jednoczesne przeprowadzenie analizy dla wielu próbek pacjentów, przez co znacząco obniża się koszty analizy i zwiększa dostępność wykorzystania tej metody diagnostycznej jako rutynowego postępowania w diagnostyce choroby Recklinghausena.

Nieoczekiwanie został on zrealizowany zgodnie z niniejszym wynalazkiem.

Przedmiotem wynalazku jest zestaw primerów do wykrywania mutacji w obrębie genu *NF1* u pacjentów z podejrzeniem choroby Recklinghausena, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące pule primerów:

— Grupa 1, obejmuje primery dla 20 amplikonów

NFI_1_1_F: ACTCCACAGACCCTCTCCTTG

NFI_1_1_R: CTGGGATAAAGGGGATGGAG

NFI_2_1_F: AAGCTGTTAACGTGTTTTTTTTTTC

NFI_2_1_R: AAGAAAAGAAAGCAAATCCCC

NFI_3_1_F: TCTGGGAGGTAAAATGGAAGA

NFI_3_1_R: TTGTCTGTCACCAGGTCAGC

NFI_4_1_F: TTTTGTCTGTGTGTGTGTTTGA

NFI_4_1_R: GGGGCAAAAGAACTTGTCTC

NFI_5_1_F: AGATGATGTCTTGCTATGTTGC

NFI_5_1_R: AAATGCTCATTTTCTCTACTGC

NFI_6_1_F: TCCAAGGCATATTTGCTGTTT

NFI_6_1_R: ACCCAGTTCCAAAATGCCTA

NFI_8_1_F: TGTTGCCCTTGGGTTTTTAC

NFI_8_1_R: AAATCTTTGTTTCATTGCCTGGT

NFI_9_1_F: TTGCTATAATATTAGCTACATCTGGAA

NFI_9_1_R: AGAGTCAGAACTTTAATGTTAGCAATTATC

NFI_16_1_F: ACACTTTGATAACTGTTTCTCT

NFI_16_1_R: AACACTTTAGTAATCTCTCACC

NFI_18_1_F: GTCTTCCACCCTTGACTCTC

NFI_18_1_R: GCTACTTGAATTTCCCCTGT

NFI_19_1_F: GCTCTTCCCTACTCCTTTTGG

NFI_19_1_R: TTTCTGTTGCTAAGGGCATA

NFI_27_1_F: CAAAACCTAGAGAACTGGCATGT

NF1_27_1_R: CATCTTTCTTCTGGCTCTGAAA
NF1_29_1_F: AGACTCCATGCAGACTCTCTTC
NF1_29_1_R: TTAATGATCAAGGGGAGAAGG
NF1_37_1_F: TGAATCCAGACTTTGAAGAATTGTT
NF1_37_1_R: CTAGGGAGGCCAGGATATAGTCTAGT
NF1_38_1_F: GTGGGAACTCTTCCTTAAATGG
NF1_38_1_R: ACCTACCGTAAACTCGGGTCAG
NF1_42_2_F: TTAGCACGCTACATGCTGATG
NF1_42_2_R: GCACTGAGTATTCCGCTTATGG
NF1_43_1_F: GAGGTTTGATTTAGGGAACATGA
NF1_43_1_R: CCAATAACACAGTCCATGCAA
NF1_46_1_F: CCAAGATCACCATAGCATGAGA
NF1_46_1_R: TGAAAGAAAGTAACATTCAACACTGA
NF1_51_1_R: GGCATCAAAAACCTTTGCTACAC
NF1_51_1_F: CCTAGGGATACACCAAGAGTTTG
NF1_55_1_F: TGAAGAAATGCCCCAGAAAG
NF1_55_1_R: TGTC AACCAGTTACATTGGACA

— Grupa 2, obejmuje primery dla 20 amplikonów

NF1_7_1_F: AGGTTGCGCAGTTAGCAGTT
NF1_7_1_R: TTGCTCCAAGGAAAGGAAGA
NF1_10_1_F: TTCTTCTGGCAGCTGGATTT
NF1_10_1_R: TGAAGCCAAAAGAACAGCA
NF1_12_1_F: ATGGTGTGTGTTTGCATGGT
NF1_12_1_R: AGAGGAAATGAAGGACCCATT
NF1_13_2_F: TCCTGAGTCTTATGTCTGATACCATG
NF1_13_2_R: TTGGCGTTTCAGCTAAACCC
NF1_15_1_F: TCCAGTGTTATGTTTACCAAAAATG

NF1_15_1_R: CATTTCATCGAAAGCATTGGT
NF1_20_1_F: ACTTGGCTGTAGCTGATTGA
NF1_20_1_R: ACTTTACTGAGCGACTCTTGAA
NF1_21_2_F: TGGATAAAGCATAATTTGTCAAGT
NF1_21_2_R: TCTCTTATTTTTTCACCTTTCTCTATGA
NF1_23_1_F: TTTAGAATGCCTTCTCTTTTGTCT
NF1_23_1_R: TGCTCTCTTTTCATGTCCTCCT
NF1_25_1_F: TTTGGGTTGTGCTAATAATTTGTTT
NF1_25_1_R: TTCCTATCCTAGTCCTGTCATGG
NF1_28_1_F: TTTGCCTTAATTTAGCAAGTGG
NF1_28_1_R: CCTACAGAAATGCACGAATAGG
NF1_35_1_F: GGATTGAAGTAGACATGGTCCTG
NF1_35_1_R: GTTGGATTCCCCAAACATGG
NF1_36_1_F: CCCTTTAGAATGCCTGTTGC
NF1_36_1_R: CCCTGCTATATGCTCCCAAG
NF1_39_2_F: TTAAAAATCGAGGGCCAGTTAC
NF1_39_2_R: AAGTGGTCCAGAGGTGTGTAAAG
NF1_40_1_F: TTTTCCCCGAATTCTTTATG
NF1_40_1_R: TCCCTAGTGTCTAGCGCAGT
NF1_41_1_F: GCCTCAGGTAAAATAGAATTTTCAT
NF1_41_1_R: GTCAATTATTTTGCACATCCTTCCA
NF1_44_1_F: CACTTGCATGGACTGTGTTATTGGT
NF1_44_1_R: AGCTCTTGGTTGCAGGGATGGAT
NF1_49_1_F: GGAAGAAGACCTCAGCAGATGC
NF1_49_1_R: CAACCGCCAAAAAACCTATAGG
NF1_54_1_F: GGAGGCCCTTAAATATTA AAAACA
NF1_54_1_R: TCTCATTTT GCCCTCTTTGC

NF1_57_2_F: TTCTTGATGCCTTGATTGACAC

NF1_57_2_R: TCAACCTTGGAATATCATGTGG

NF1_58_1_F: TGCACAGACAAAATCGCCTA

NF1_58_1_R: CAAACCGGATGGGTTCATTA

— Grupa 3, obejmuje primery dla 10 amplikonów

NF1_11_1_F: TTGAAGTTCGTTTCAAGACC

NF1_11_1_R: ACGCAAAGAAAAGAAAGAAAA

NF1_14_1_F: GCCACTACCTCCCAAAGTCC

NF1_14_1_R: GATACAAAGCAAGTAAACCCCTTC

NF1_17_1_F: CTCTTGGTTGTCAGTGCTTC

NF1_17_1_R: CAGAAAACAAACAGAGCACAT

NF1_22_1_F: GTGTATGGGTACGAGTGTCTGC

NF1_22_1_R: AACGTACACA ACTTCTGGCTACC

NF1_24_1_F: CGTCATGTCACTTAGGTTATCTGG

NF1_24_1_R: TTTCAAACACAAAAGTTTGACATC

NF1_26_1_F: TCGCGAGAGAGGAGAGAAAC

NF1_26_1_R: TGTGGACAAACAGATGCAAA

NF1_33_1_F: TTTGGGAAGGTTAGAAACACTAC

NF1_33_1_R: CAAGCTATGTCTTGACCTAGAGC

NF1_34_1_F: GTGTGAACAAGCCCTCCATA

NF1_34_1_R: CCCAAAGAGCAAATCTGTGA

NF1_50_1_F: TGCACATTTAACAGGTA CTATGCTC

NF1_50_1_R: TCACTTACTCTTCCTAGGCCATC

NF1_52_1_F: TGGGAACAAAACCCTTTGAG

NF1_52_1_R: TTTTGAGAAATGGCAAACG

— Grupa 4, obejmuje primery dla 9 amplikonów

NFI_13_1_F: AACGATTTTCATTGTTTTGTTAAGC
NFI_13_1_R: CTTATAGCTTCTTGTCTCCAGGTCTG
NFI_30_1_F: CGTTGCACTTGGCTTAATGT
NFI_30_1_R: CCACACACCATCAGCAGCTA
NFI_31_1_F: TTTTGTGATTCCATTTGTGTT
NFI_31_1_R: TGAAAGCTATTTTGTGCCAGA
NFI_38_2_F: ACAAAGTCCTAGGGCAATCAG
NFI_38_2_R: TAACCAACACTGCATACCTTCC
NFI_39_1_F: TTGGA ACTATAAGGAAAAATACGTTT
NFI_39_1_R: AGGGTTTTCTTTGAATTCTCTTAGA
NFI_42_1_F: GTGCTAAA ACTTTGAGTCCCATGT
NFI_42_1_R: ATAATCTATATTGATCAGGTGAAGTA
NFI_45_1_F: ATGCATATTGTTGAAAATACAGCTA
NFI_45_1_R: TTTCATTGACCTCAAATTTAAACG
NFI_56_1_F: TGGTTGACAACTTTTTATGCTGA
NFI_56_1_R: ATACACACACCCCAACACCA
NFI_57_1_F: ATATTTTGGCTTCAGATGGG
NFI_57_1_R: TTGGTGTCTTATATTGTTGCTCAA

— Grupa 5, obejmuje primery dla 3 amplikonów

NFI_21_1_R: ATTGGATACAGAGCAGGAC
NFI_21_1_F: CATGTGAGTGGAGGAGGA
NFI_32_1_F: TGCAAAGTTTGACCTTTGAACT
NFI_32_1_R: CAAAAGCACATAACTGAAAACCA
NFI_47_1_F: CCCCAAAGAGAAAACATGG
NFI_47_1_R: GCTGGTAAGGAAATATACTCACAATAA

— Grupa 6, obejmuje primery dla 2 amplikonów

NF1_48_1_F: TGTTCCTGTGGTTTTCTGCAGTC

NF1_48_1_R: ATTACAGACGTGAGCCACCA

NF1_53_1_F: CTAAAGAAAGCTGTTGAATTTTAGAAG

NF1_53_1_R: GGCTGAATTGTTATCTGTTTGG

Korzystnie stężenia poszczególnych primerów w danej grupie mieszczą się w zakresie od 1 do 10 μM , zaś objętość puli uzupełniana jest wodą do wartości objętości końcowej 200 μl . Szczególnie korzystnie stężenie puli primerów w grupie 1 wynosi od 1 do 8 μM , w grupie 2 wynosi od 1 do 6 μM , w grupie 3 wynosi od 1 do 10 μM , w grupie 4 wynosi od 1,5 do 8 μM , w grupie 5 wynosi 1 μM , w grupie 6 wynosi od 1 do 1,5 μM .

Długości fragmentów poszczególnych amplikonów przedstawiono w tabeli 1.

Amplikon	długość [pary zasad]
NF1_1_1	457
NF1_2_1	228
NF1_3_1	364
NF1_4_1	414
NF1_5_1	469
NF1_6_1	511
NF1_7_1	535
NF1_8_1	473
NF1_9_1	355
NF1_10_1	435
NF1_11_1	272
NF1_12_1	383
NF1_13_1	275
NF1_13_2	248
NF1_14_1	485
NF1_15_1	569
NF1_16_1	348
NF1_17_1	261
NF1_18_1	387
NF1_19_1	191
NF1_20_1	247
NF1_21_1	341
NF1_21_2	551
NF1_22_1	455
NF1_23_1	300
NF1_24_1	334

NF1_25_1	366
NF1_26_1	430
NF1_27_1	422
NF1_28_1	428
NF1_29_1	423
NF1_30_1	334
NF1_31_1	326
NF1_32_1	370
NF1_33_1	410
NF1_34_1	534
NF1_35_1	441
NF1_36_1	379
NF1_37_1	644
NF1_38_1	470
NF1_38_2	428
NF1_39_1	321
NF1_39_2	419
NF1_40_1	372
NF1_41_1	446
NF1_42_1	415
NF1_42_2	431
NF1_43_1	493
NF1_44_1	364
NF1_45_1	328
NF1_46_1	307
NF1_47_1	416
NF1_48_1	436
NF1_49_1	303
NF1_50_1	381
NF1_51_1	453
NF1_52_1	439
NF1_53_1	362
NF1_54_1	319
NF1_55_1	460
NF1_56_1	427
NF1_57_1	339
NF1_57_2	416
NF1_58_1	402

Dobór zestawów primerów w każdej z grup w sposób, obejmujących zarówno eksony jak i części intronowe odpowiedzialne za splicing, a także dopasowanie odpowiedniej długości fragmentów amplikonów stanowią o przewadze rozwiązania według wynalazku nad rozwiązaniami znanymi ze stanu techniki, gdyż pozwalają na dokonanie pełnej oceny mutacji, które zostały już wcześniej zidentyfikowane, jak również nowych, dotychczas niezidentyfikowanych mutacji. W rozwiązaniu według wynalazku istotny jest także dobór stężeń końcowych primerów w puli. W wyniku prac badawczych twórcy wynalazku ustalili, że korzystne stężenia primerów w zestawie według wynalazku dla danej grupy mieszczą się w zakresie od 1 do 10 μ M.

Zestaw według wynalazku został tak zaprojektowany, by przy jego pomocy można było dokonać pełnej diagnostyki mutacji obszaru kodującego genu *NF1*, optymalny pod względem dokładności wykrywania mutacji i czasochłonności analizy.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania mutacji w obrębie genu *NF1* u pacjentów z podejrzeniem choroby Recklinghausena, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- izolację DNA z próbki krwi żyłnej lub śliny pacjenta
- przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla każdego zestawu primerów z grup 1–6, przy czym
 - Grupa 1, obejmuje primery dla 20 amplikonów

NF1_1_1_F: ACTCCACAGACCCTCTCCTTG

NF1_1_1_R: CTGGGATAAAGGGGATGGAG

NF1_2_1_F: AAGCTGTTAACGTGTTTTTTTTTTC

NF1_2_1_R: AAGAAAAGAAAGCAAATTCCCC

NF1_3_1_F: TCTGGGAGGTAAAATGGAAGA

NF1_3_1_R: TTGTCTGTCACCAGGTCAGC

NF1_4_1_F: TTTTGTCTGTGTGTGTGTTTGA

NF1_4_1_R: GGGGCAAAGAACTTGTCTC

NF1_5_1_F: AGATGATGTCTTGCTATGTTGC

NF1_5_1_R: AAATGCTCATTCTCTACTGC

NFI_6_1_F: TCCAAGGCATATTTGCTGTTT
NFI_6_1_R: ACCCAGTTCCAAAATGCCTA
NFI_8_1_F: TGTTGCCCTTGGGTTTTTAC
NFI_8_1_R: AAATCTTTGTTCATTGCCTGGT
NFI_9_1_F: TTGCTATAATATTAGCTACATCTGGAA
NFI_9_1_R: AGAGTCAGAACTTTAATGTTAGCAATTATC
NFI_16_1_F: ACACTTTGATAACTGTTTCTCT
NFI_16_1_R: AACACTTTAGTAATCTCTCACC
NFI_18_1_F: GTCTTCCACCCTTGACTCTC
NFI_18_1_R: GCTACTTGAATTTCCCCTGT
NFI_19_1_F: GCTCTTCCTACTCCTTTTGG
NFI_19_1_R: TTTCTGTTGCTAAGGGCATA
NFI_27_1_F: CAAAACCTAGAGAACTGGCATGT
NFI_27_1_R: CATCTTTCTTCTGGCTCTGAAA
NFI_29_1_F: AGACTCCATGCAGACTCTCTTC
NFI_29_1_R: TTAATGATCAAGGGGAGAAGG
NFI_37_1_F: TGAATCCAGACTTTGAAGAATTGTT
NFI_37_1_R: CTAGGGAGGCCAGGATATAGTCTAGT
NFI_38_1_F: GTGGGAACTCTTCCTTAAATGG
NFI_38_1_R: ACCTACCGTAAACTCGGGTCAG
NFI_42_2_F: TTAGCACGCTACATGCTGATG
NFI_42_2_R: GCACTGAGTATTCCGCTTATGG
NFI_43_1_F: GAGGTTTGATTTAGGGAACATGA
NFI_43_1_R: CCAATAACACAGTCCATGCAA
NFI_46_1_F: CCAAGATCACCATAGCATGAGA
NFI_46_1_R: TGAAAGAAAGTAACATTCAACACTGA
NFI_51_1_R: GGCATCAAAAACCTTTGCTACAC

NFI_51_1_F: CCTAGGGATACACCAAGAGTTTG

NFI_55_1_F: TGAAGAAATGCCCCAGAAAG

NFI_55_1_R: TGTCAACCAGTTACATTGGACA

— Grupa 2, obejmuje primery dla 20 amplikonów

NFI_7_1_F: AGGTTGCGCAGTTAGCAGTT

NFI_7_1_R: TTGCTCCAAGGAAAGGAAGA

NFI_10_1_F: TTCTTCTGGCAGCTGGATTT

NFI_10_1_R: TGAAGCCAAAAAGAACAGCA

NFI_12_1_F: ATGGTGTGTGTTTGCATGGT

NFI_12_1_R: AGAGGAAATGAAGGACCCATT

NFI_13_2_F: TCCTGAGTCTTATGTCTGATACCATG

NFI_13_2_R: TTGGCGTTTCAGCTAAACCC

NFI_15_1_F: TCCAGTGTTATGTTTACCAAAAATG

NFI_15_1_R: CATTCATCGAAAGCATTGGT

NFI_20_1_F: ACTTGGCTGTAGCTGATTGA

NFI_20_1_R: ACTTTACTGAGCGACTCTTGAA

NFI_21_2_F: TGGATAAAGCATAATTTGTCAAGT

NFI_21_2_R: TCTCTTATTTTTTCACCTTTCTCTATGA

NFI_23_1_F: TTTAGAATGCCTTCTCTTTTGTCT

NFI_23_1_R: TGCTCTCTTTTCATGTCCTCCT

NFI_25_1_F: TTTGGGTTGTGCTAATAATTTGTTT

NFI_25_1_R: TTCCTATCCTAGTCCTGTCATGG

NFI_28_1_F: TTTGCCTTAATTTAGCAAGTGG

NFI_28_1_R: CCTACAGAAATGCACGAATAGG

NFI_35_1_F: GGATTGAAGTAGACATGGTCCTG

NFI_35_1_R: GTTGGATTCCCCAAACATGG

NFI_36_1_F: CCCTTTAGAATGCCTGTTGC

NFI_36_1_R: CCCTGCTATATGCTCCCAAG
NFI_39_2_F: TTAAAAATCGAGGGCCAGTTAC
NFI_39_2_R: AAGTGGTCCAGAGGTGTGTAAG
NFI_40_1_F: TTTTCCCCGAATTCTTTATG
NFI_40_1_R: TCCCTAGTGTCTAGCGCAGT
NFI_41_1_F: GCCTCAGGTAAAATAGAATTTTCAT
NFI_41_1_R: GTCAATTATTTTGCACATCCTTCCA
NFI_44_1_F: CACTTGCATGGACTGTGTTATTGGT
NFI_44_1_R: AGCTCTTGGTTGCAGGGATGGAT
NFI_49_1_F: GGAAGAAGACCTCAGCAGATGC
NFI_49_1_R: CAACCGCCAAAAACCTATAGG
NFI_54_1_F: GGAGGCCCTTAAATATTA AAAACA
NFI_54_1_R: TCTCATTTT GCCCTCTTTGC
NFI_57_2_F: TTCTTGATGCCTTGATTGACAC
NFI_57_2_R: TCAACCTTGGAATATCATGTGG
NFI_58_1_F: TGCACAGACAAAATCGCCTA
NFI_58_1_R: CAAACCGGATGGGTTTCATTA

— Grupa 3, obejmuje primery dla 10 amplikonów

NFI_11_1_F: TTGAAGTTCGTTTCAAGACC
NFI_11_1_R: ACGCAAAGAAAAGAAAGAAAA
NFI_14_1_F: GCCACTACCTCCCAAAGTCC
NFI_14_1_R: GATACAAAGCAAGTAAACCCCTTC
NFI_17_1_F: CTCTTGGTTGTCAGTGCTTC
NFI_17_1_R: CAGAAAACAAACAGAGCACAT
NFI_22_1_F: GTGTATGGGTACGAGTGTCTGC
NFI_22_1_R: AACGTACACA ACTTCTGGCTACC
NFI_24_1_F: CGTCATGTC ACTTAGGTTATCTGG

NFI_24_1_R: TTTCAAACACAAAAGTTTGACATC
NFI_26_1_F: TCGCGAGAGAGGAGAGAAAC
NFI_26_1_R: TGTGGACAAACAGATGCAAA
NFI_33_1_F: TTTGGGAAGGTTAGAAACACTAC
NFI_33_1_R: CAAGCTATGTCTTGACCTAGAGC
NFI_34_1_F: GTGTGAACAAGCCCTCCATA
NFI_34_1_R: CCCAAAGAGCAAATCTGTGA
NFI_50_1_F: TGCACATTTAACAGGTACTATGCTC
NFI_50_1_R: TCACTTACTCTTCCTAGGCCATC
NFI_52_1_F: TGGGAACAAAACCCTTTGAG
NFI_52_1_R: TTTTGAGAAATGGCAAACG

— Grupa 4, obejmuje primery dla 9 amplikonów

NFI_13_1_F: AACGATTTTCATTGTTTTGTTAAGC
NFI_13_1_R: CTTATAGCTTCTTGTCTCCAGGTCTG
NFI_30_1_F: CGTTGCACTTGGCTTAATGT
NFI_30_1_R: CCACACACCATCAGCAGCTA
NFI_31_1_F: TTTTTGTTGATTCCATTTGTGTT
NFI_31_1_R: TGAAAGCTATTTTGTGCCAGA
NFI_38_2_F: ACAAAGTCCTAGGGCAATCAG
NFI_38_2_R: TAACCAACACTGCATACCTTCC
NFI_39_1_F: TTGGA ACTATAAGGAAAATACGTTT
NFI_39_1_R: AGGGTTTTCTTTGAATTCTCTTAGA
NFI_42_1_F: GTGCTAAA ACTTTGAGTCCCATGT
NFI_42_1_R: ATAATCTATATTGATCAGGTGAAGTA
NFI_45_1_F: ATGCATATTGTTGAAAATACAGCTA
NFI_45_1_R: TTTCATTGACCTCAAATTTAAACG
NFI_56_1_F: TGGTTGACAACTTTTTATGCTGA

NF1_56_1_R: ATACACACACCCCAACACCA

NF1_57_1_F: ATATTTTTGGCTTCAGATGGG

NF1_57_1_R: TTGGTGTCTTATATTGTTGCTCAA

— Grupa 5, obejmuje primery dla 3 amplikonów

NF1_21_1_R: ATTGGATACAGAGCAGGAC

NF1_21_1_F: CATGTGAGTGGAGGAGGA

NF1_32_1_F: TGCAAAGTTTGACCTTTGAACT

NF1_32_1_R: CAAAAGCACATAACTGAAAACCA

NF1_47_1_F: CCCCAAAGAGAAAACATGG

NF1_47_1_R: GCTGGTAAGGAAATATACTCACAATAA

— Grupa 6, obejmuje primery dla 2 amplikonów

NF1_48_1_F: TGTTCTGTGGTTTTCTGCAGTC

NF1_48_1_R: ATTACAGACGTGAGCCACCA

NF1_53_1_F: CTAAAGAAAGCTGTTGAATTTTAGAAG

NF1_53_1_R: GGCTGAATTGTTATCTGTTTGG

- przeprowadzenie reakcji multiplex PCR
- przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania genomowego
- sekwencjonowanie genomowe
- bioinformatyczna analiza danych.

Sposób wykrywania mutacji według wynalazku zapewnia dokonanie pełnej oceny mutacji występujących w regionach kodujących oraz w intronach, w częściach flankujących eksony genu *NF1* i – zarówno mutacji, które zostały już wcześniej zidentyfikowane, jak również nowych, dotychczas niezidentyfikowanych, co ma szczególnie doniosłe znaczenie w diagnostyce choroby Recklinghause- na. Diagnostyka mutacji genu *NF1* sposobem według wynalazku pozwala na wczesne wykrycie zmian w obrębie genu *NF1* i podjęcie terapii na wczesnym etapie rozwoju choroby, jeszcze przed pełnym wystąpieniem jej objawów.

Ze względu na fakt, iż diagnostyka mutacji genu *NF1* sposobem według wynalazku wykorzystuje technologię multipleksowania produktów PCR w połączeniu z odczytem na wysokoprzepustowych maszynach genomowych możliwa jest jednoczesna analiza tego genu dla wielu pacjentów, przez co znacząco obniża się koszty i czas trwania tej analizy.

Jest to szczególnie ważne w przypadku chorób genetycznych, bowiem kompleksowe odczytanie sekwencji genów istotnych dla prawidłowej diagnozy jednocześnie dla wielu pacjentów znacząco zwiększa dostępność tej metody i w konsekwencji pozwala objąć badaniem nie tylko pacjentów, u których istnieje podejrzenie choroby Recklinghausena, ale również włączyć w takie badanie członków ich rodzin. Dzięki temu, że jednostkowy koszt analizy ulega obniżeniu, gdy bada się jednocześnie próbki od wielu pacjentów na raz, sposób według wynalazku może przyczynić się do szybszego wykrywania choroby Recklinghausena, a tym samym do podjęcia terapii lub zapobiegania rozwojowi skutków wywołanych przez tę chorobę zanim wystąpią jej objawy.

Sposób wykrywania mutacji według wynalazku dla pacjenta jest bardzo komfortowy. Próbkę materiału genetycznego do badania pobiera się ze śliny lub krwi żyłnej pacjenta. W przypadku pobie-

W ten sposób w końcowej puli danej próbki (pacjenta) uzyskano 10 ng każdego amplikonu.

7. Obliczono końcowe stężenie (c) puli:

$$c \text{ puli} = \text{suma amplikonów} \cdot 10 / \text{całkowita objętość puli}$$

8. Do oczyszczania pobrano 200 ng amplikonów każdej próbki (pacjenta).

$$V = 200 / c \text{ puli}$$

9. Jeśli wyliczona ilość jest większa niż faktyczna, bierze się całość puli.

10. Prowadzono oczyszczanie amplikonów z użyciem odczynnika AMPure XP Beads (1,5x objętości). Eluowano amplikony w 42,5 μ l wody Milli-Q® (ultraczysta woda typu 1, uzyskiwana w urządzeniu firmy MilliporeCorp.)

B. Przygotowanie biblioteki fragmentów DNA przygotowanej do sekwencjonowania genomowego z użyciem odczynników dostarczonych przez producenta (Illumina) lub odpowiedników

Niniejszy protokół przedstawia przygotowanie biblioteki z użyciem odczynników NEBNext® DNA Library Prep Master Mix for Illumina oraz NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina.

a) WYKAŃCZANIE KOŃCÓW

Mieszanina reakcyjna:

DNA	42,5 μ l
NEBNext End Repair Reaction Buffer (10X)	5 μ l
NEBNext End Repair Enzyme Mix	2,5 μ l
	<hr/>
	50 μ l

Inkubowano przez 30 minut w temperaturze 20°C. Oczyszczano z użyciem odczynnika AMPure XP Beads (1,6x objętości). Eluowano w 21 μ l wody Milli-Q®.

b) ADENYLACJA NA 3' KOŃCU

Mieszanina reakcyjna:

DNA	21 μ l
NEBNext dA-Tailing Reaction Buffer (10X)	2,5 μ l
Klenow Fragment (3' → 5' exo-)	1,5 μ l
	<hr/>
	25 μ l

Inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C.

Oczyszczano z użyciem odczynnika AMPure XP Beads (1,6x objętości). Eluowano w 17,25 μ l wody Milli-Q®.

c) LIGACJA ADAPTORÓW

Mieszanina reakcyjna:

DNA	17 μ l
Quick Ligation Reaction Buffer (5X)	5 μ l
Quick T4 DNA Ligase	2,5 μ l
NEBNext Adaptor	0,5 μ l
	<hr/>
	25 μ l

Inkubowano przez 15 minut w temperaturze 20°C.

Dodano 1,5 μ l USER™ enzyme mix, wymieszano przez pipetowanie.

Inkubowano przez 15 minut w 37°C.

Oczyszczono z użyciem odczynnika AMPure XP Beads (1,4x objętości).

Eluowano w 25 μ l wody Milli-Q®.

Oczyszczono ponownie z użyciem odczynnika AMPure XP Beads (1,0x objętości). Eluowano w 20 μ l wody Milli-Q®

d) AMPLIFIKACJA PCR

Mieszanina reakcyjna:

DNA	20 μ l
Universal PCR Primer (25 μ M)	0,5 μ l
Index Primer (25 μ M)	0,5 μ l
NebNext High-Fidelity 2X PCR MasterMix	21 μ l
	<hr/>
	42 μ l

Składniki reakcji pipetowano w temperaturze 4°C.

Warunki reakcji PCR:

98°C		30 s
	8 cykli	
98°C		10 s
65°C		30 s
	72°C	30 s
72°C		5 min
4°C		hold

Oczyszczono z użyciem AMPure XP Beads (1,0x objętości). Eluowano w 25 µl wody Milli-Q®.

Zmierzono stężenia bibliotek metodą fluorescencyjną (PicoGreen®). Na fig. 1 rysunku przedstawiono wynik elektroforezy na urządzeniu Agilent 2100 Bioanalyzer poszczególnych pul amplikonów uzyskanych sposobem według wynalazku oraz przygotowanej biblioteki do sekwencjonowania.

C. Sekwencjonowanie genomowe w urządzeniu MISEQ (Illumina)

Sekwencjonowanie prowadzone jest zgodnie z protokołem producenta (Illumina) z wykorzystaniem zestawu odczynników dostarczonych przez producenta (Illumina).

D. Analiza informatyczna danych z sekwencjonowania

Dane uzyskane w wyniku sekwencjonowania poddane są najpierw kontroli jakości. Usuwane są sekwencje adaptorów używanych w procesie sekwencjonowania oraz usuwane są fragmenty odczytów, których średnia lokalna jakość <20. Dalsza analiza jest wykonywana z wykorzystaniem zarówno oprogramowania ogólnie dostępnego, jak i komercyjnego. W każdym przypadku jako wynik uzyskuje się listę wariantów o wysokiej jakości (>=30). Do oznaczenia stopnia patogenności każdego wariantu wykorzystywane są bazy danych, takie jak dbSNP, ClinVar.

E. Walidacja metody

W celu zwalidowania metody diagnostycznej przeprowadzono badania klasyczną metodą sekwencjonowania Sangera. Mutacje wykryte za pomocą sposobu według wynalazku były zgodne w wynikami metody klasycznej, co świadczy o prawidłowości i powtarzalności metody według wynalazku w wykrywaniu mutacji w obrębie genu *NF1*.

Wynik identyfikacji mutacji przy wykorzystaniu sekwencjonowania genomowego sposobem według wynalazku przedstawiono na Fig. 2 rysunku. Przy użyciu zestawu według wynalazku, za pomocą sposobu według wynalazku wykryto następujące mutacje przedstawione w Tab. 1.

T a b e l a 1. Wykryte mutacje

Położenie	znana	nowa
<i>NF1</i> :NM_000267.3:exon39:c.C5839T:p.R1947X	+	
<i>NF1</i> : NM_000267.3:c.6756+1G>T		+
<i>NF1</i> : NM_000267.3:exon20:c.G2330C:p.W777S	+	
<i>NF1</i> : NM_000267.3:exon37:c.C5242T:p.R1748X	+	
<i>NF1</i> : NM_000267.3:exon44:c.C6709T:p.R2237X	+	
<i>NF1</i> : NM_000267.3:exon28:c.C3826T:p.R1276X	+	
<i>NF1</i> : NM_000267:exon18:c.2154_2155insA:p.D718fs		+
<i>NF1</i> : NM_000267:exon10:c.1131_1134del:p.377_378del		+

Zastrzeżenia patentowe

1. Zestaw primerów do wykrywania mutacji w obrębie genu *NF1* u pacjentów z podejrzeniem choroby Recklinghausena, **znamienny tym**, że obejmuje następujące pule primerów, gdzie — **Grupa 1, obejmuje primery dla 20 amplikonów**

NF1_1_1_F: ACTCCACAGACCCTCTCCTTG

NF1_1_1_R: CTGGGATAAAGGGGATGGAG

NF1_2_1_F: AAGCTGTTAACGTGTTTTTTTTTTC

NF1_2_1_R: AAGAAAAGAAAGCAAATTCCCC

NF1_3_1_F: TCTGGGAGGTAAAATGGAAGA

NF1_3_1_R: TTGTCTGTCACCAGGTCAGC

NF1_4_1_F: TTTTGTTCTGTGTGTGTGTTGA

NF1_4_1_R: GGGGCAAAGAAGAACTTGTCTC

NF1_5_1_F: AGATGATGTCTTGCTATGTTGC

NF1_5_1_R: AAATGCTCATTCTCTACTGC

NF1_6_1_F: TCCAAGGCATATTTGCTGTTT

NF1_6_1_R: ACCCAGTTCCAAAATGCCTA

NF1_8_1_F: TGTTGCCCTTGGGTTTTTAC

NF1_8_1_R: AAATCTTTGTTTCATTGCCTGGT

NF1_9_1_F: TTGCTATAATATTAGCTACATCTGGAA

NF1_9_1_R: AGAGTCAGAAGCTTTAATGTTAGCAATTATC

NF1_16_1_F: AACTTTGATAACTGTTTCTCT

NF1_16_1_R: AACACTTTAGTAATCTCTCACC

NF1_18_1_F: GTCTTCCACCCTTGACTCTC

NF1_18_1_R: GCTACTTGAATTTCCCCTGT

NF1_19_1_F: GCTCTTCCTACTCCTTTTGG

NF1_19_1_R:TTTCTGTTGCTAAGGGCATA
NF1_27_1_F:CAAAACCTAGAGAACTGGCATGT
NF1_27_1_R:CATCTTTCTTCTGGCTCTGAAA
NF1_29_1_F:AGACTCCATGCAGACTCTCTTC
NF1_29_1_R:TTAATGATCAAGGGGAGAAGG
NF1_37_1_F:TGAATCCAGACTTTGAAGAATTGTT
NF1_37_1_R:CTAGGGAGGCCAGGATATAGTCTAGT
NF1_38_1_F:GTGGGAACTCTTCCTTAAATGG
NF1_38_1_R:ACCTACCGTAAACTCGGGTCAG
NF1_42_2_F:TTAGCACGCTACATGCTGATG
NF1_42_2_R:GCACTGAGTATTCCGCTTATGG
NF1_43_1_F:GAGGTTTGATTTAGGGAAACATGA
NF1_43_1_R:CCAATAACACAGTCCATGCAA
NF1_46_1_F:CCAAGATCACCATAGCATGAGA
NF1_46_1_R:TGAAAGAAAGTAACATTCAACACTGA
NF1_51_1_R:GGCATCAAAAACCTTTGCTACAC
NF1_51_1_F:CCTAGGGATACACCAAGAGTTTG
NF1_55_1_F:TGAAGAAATGCCCCAGAAAG
NF1_55_1_R:TGTCAACCAGTTACATTGGACA

— **Grupa 2, obejmuje primery dla 20 amplikonów**

NF1_7_1_F: AGGTTGCGCAGTTAGCAGTT
NF1_7_1_R: TTGCTCCAAGGAAAGGAAGA
NF1_10_1_F: TTCTTCTGGCAGCTGGATTT
NF1_10_1_R:TGAAGCCAAAAAGAACAGCA
NF1_12_1_F: ATGGTGTGTGTTTGCATGGT
NF1_12_1_R:AGAGGAAATGAAGGACCCATT
NF1_13_2_F: TCCTGAGTCTTATGTCTGATACCATG

NF1_13_2_R: TTGGCGTTTCAGCTAAACCC
NF1_15_1_F: TCCAGTGTTATGTTTACCAAAAATG
NF1_15_1_R: CATTTCATCGAAAGCATTGGT
NF1_20_1_F: ACTTGGCTGTAGCTGATTGA
NF1_20_1_R: ACTTTACTGAGCGACTCTTGAA
NF1_21_2_F: TGGATAAAGCATAATTTGTCAAGT
NF1_21_2_R: TCTCTTATTTTTCACCTTCTCTATGA
NF1_23_1_F: TTTAGAATGCCTTCTCTTTTGTCT
NF1_23_1_R: TGCTCTCTTTTCATGTCCTCCT
NF1_25_1_F: TTTGGGTTGTGCTAATAATTTGTTT
NF1_25_1_R: TTCCTATCCTAGTCCTGTCATGG
NF1_28_1_F: TTTGCCTTAATTTAGCAAGTGG
NF1_28_1_R: CCTACAGAAATGCACGAATAGG
NF1_35_1_F: GGATTGAAGTAGACATGGTCCTG
NF1_35_1_R: GTTGGATTCCCCAAACATGG
NF1_36_1_F: CCCTTTAGAATGCCTGTTGC
NF1_36_1_R: CCCTGCTATATGCTCCCAAG
NF1_39_2_F: TTAAAAATCGAGGGCCAGTTAC
NF1_39_2_R: AAGTGGTCCAGAGGTGTGTAAG
NF1_40_1_F: TTTTCCCCGAATTCTTTATG
NF1_40_1_R: TCCCTAGTGTCTAGCGCAGT
NF1_41_1_F: GCCTCAGGTAAAATAGAATTTTCAT
NF1_41_1_R: GTCAATTATTTTGCACATCCTTCCA
NF1_44_1_F: CACTTGCATGGACTGTGTTATTGGT
NF1_44_1_R: AGCTCTTGGTTGCAGGGATGGAT
NF1_49_1_F: GGAAGAAGACCTCAGCAGATGC
NF1_49_1_R: CAACCGCCAAAAAACCTATAGG

NFI_54_1_F: GGAGGCCCTTAAATATTA AAAACA

NFI_54_1_R: TCTCATTTTGCCCTCTTGC

NFI_57_2_F: TTCTTGATGCCTTGATTGACAC

NFI_57_2_R: TCAACCTTGGAATATCATGTGG

NFI_58_1_F: TGCACAGACAAAATCGCCTA

NFI_58_1_R: CAAACCGGATGGGTTTCATTA

— **Grupa 3, obejmuje primery dla 10 amplikonów**

NFI_11_1_F: TTGAAGTTCGTTTCAAGACC

NFI_11_1_R: ACGCAAAGAAAAGAAAGAAAA

NFI_14_1_F: GCCACTACCTCCCAAAGTCC

NFI_14_1_R: GATACAAAGCAAGTAAACCCCTTC

NFI_17_1_F: CTCTTGGTTGTCAGTGCTTC

NFI_17_1_R: CAGAAAACAAACAGAGCACAT

NFI_22_1_F: GTGTATGGGTACGAGTGTCTGC

NFI_22_1_R: AACGTACACA ACTTCTGGCTACC

NFI_24_1_F: CGTCATGTC ACTTAGGTTATCTGG

NFI_24_1_R: TTTCAAACACAAAAGTTTGACATC

NFI_26_1_F: TCGCGAGAGAGGAGAGAAAC

NFI_26_1_R: TGTGGACAAACAGATGCAAA

NFI_33_1_F: TTTGGGAAGGTTAGAAACACTAC

NFI_33_1_R: CAAGCTATGTCTTGACCTAGAGC

NFI_34_1_F: GTGTGAACAAGCCCTCCATA

NFI_34_1_R: CCCAAAGAGCAAATCTGTGA

NFI_50_1_F: TGCACATTTAACAGGTACTATGCTC

NFI_50_1_R: TCACTTACTCTTCCTAGGCCATC

NFI_52_1_F: TGGGAACAAAACCCTTTGAG

NFI_52_1_R: TTTTGAGAAATGGCAAACG

— **Grupa 4, obejmuje primery dla 9 amplikonów**

NF1_13_1_F: AACGATTTTCATTGTTTTGTAAAGC

NF1_13_1_R: CTTATAGCTTCTTGTCTCCAGGTCTG

NF1_30_1_F: CGTTGCACTTGGCTTAATGT

NF1_30_1_R: CCACACACCATCAGCAGCTA

NF1_31_1_F: TTTTTGTTGATTCCATTGTGT

NF1_31_1_R: TGAAAGCTATTTTGTGCCAGA

NF1_38_2_F: ACAAAGTCCTAGGGCAATCAG

NF1_38_2_R: TAACCAACACTGCATACCTTCC

NF1_39_1_F: TTGGA ACTATAAGGAAAAATACGTTT

NF1_39_1_R: AGGGTTTTCTTTGAATTCTCTTAGA

NF1_42_1_F: GTGCTAAACTTTGAGTCCCATGT

NF1_42_1_R: ATAATCTATATTGATCAGGTGAAGTA

NF1_45_1_F: ATGCATATTGTTGAAAATACAGCTA

NF1_45_1_R: TTTCATTGACCTCAAATTTAAACG

NF1_56_1_F: TGGTTGACAACTTTTTATGCTGA

NF1_56_1_R: ATACACACACCCCAACACCA

NF1_57_1_F: ATATTTTTGGCTTCAGATGGG

NF1_57_1_R: TTGGTGTCTTATATTGTTGCTCAA

— **Grupa 5, obejmuje primery dla 3 amplikonów**

NF1_21_1_R: ATTGGATACAGAGCAGGAC

NF1_21_1_F: CATGTGAGTGGAGGAGGA

NF1_32_1_F: TGCAAAGTTTGACCTTTGAACT

NF1_32_1_R: CAAAAGCACATAACTGAAAACCA

NF1_47_1_F: CCCCAAAGAGAAAACATGG

NF1_47_1_R: GCTGGTAAGGAAATATACTACAATAA

— **Grupa 6, obejmuje primery dla 2 amplikonów**

NF1_48_1_F: TGTTCTGTGGTTTTCTGCAGTC

NF1_48_1_R: ATTACAGACGTGAGCCACCA

NF1_53_1_F: CTAAAGAAAGCTGTTGAATTTAGAAG

NF1_53_1_R: GGCTGAATTGTTATCTGTTTGG

2. Zestaw primerów według zastrz. 1, **znamienny tym**, że końcowe stężenie puli primerów wynosi od 1 do 10 μM , korzystnie w grupie 1 wynosi od 1 do 8 μM , korzystnie w grupie 2 wynosi od 1 do 6 μM , korzystnie w grupie 3 wynosi od 1 do 10 μM , korzystnie w grupie 4 wynosi od 1,5 do 8 μM , korzystnie w grupie 5 wynosi 1 μM , korzystnie w grupie 6 wynosi od 1 do 1,5 μM .
3. Sposób wykrywania mutacji w obrębie genu *NF1* u pacjentów z podejrzeniem choroby Recklinghausena, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - Izolację DNA z próbki materiału biologicznego
 - Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla każdego zestawu primerów, jak określono w zastrz. 1
 - Przeprowadzenie reakcji multiplex PCR
 - Sekwencjonowanie genomowe
 - Informatyczna analiza danych
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że próbkę materiału genetycznego stanowi ślina lub krew żylna pacjenta.

Rysunki

a) Electrophoresis File Run Summary

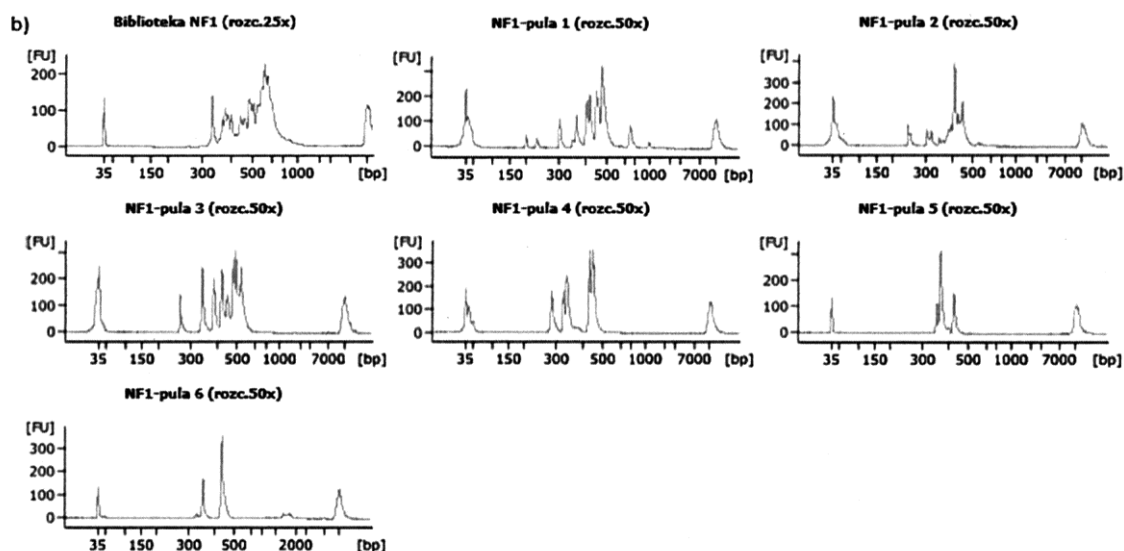
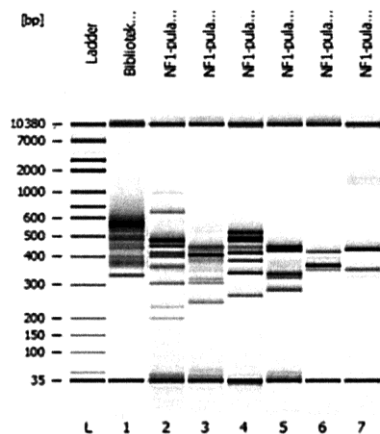


Fig.1 Wynik elektroforezy na urządzeniu Agilent Bioanalyzer.

a) Elektroforegramy: Ścieżka L- marker wielkości, ścieżka 1- przygotowana biblioteka do sekwencjonowania genomowego, ścieżki 2-7 odpowiadają kolejno pulom ampikonów z reakcji multipleks PCR;

b) Wykresy rozkładów wielkości ampikonów biblioteki do sekwencjonowania genomowego oraz poszczególnych pul ampikonów.

