

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.06.2010**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **20.07.2011**
(Věstník č. 29/2011)

(21) Číslo dokumentu:

2010-441

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Masarykova univerzita, Brno, CZ

(72) Původce:

Tichý Boris MVDr., Šlapanice, CZ

Šupíková Jana Mgr., Krnov, CZ

Pospíšilová Šárka Doc. RNDr. Ph.D., Brno, CZ

Mayer Jiří Prof. MUDr. CSc., Brno, CZ

(74) Zástupce:

RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle 3, Praha 5,
15000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob detekce chromozomální translokace
t(11;14)(q13;q32) a oligonukleotidy pro
použití při tomto způsobu**

(57) Anotace:

Způsob detekce chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32) spočívá v tom, že se v DNA získané ze vzorků biologického materiálu detekuje přítomnost translokace t(11;14)(q13;q32) metodou multiplexní PCR dalekého dosahu (multiplex long-range PCR) s pomocí sad primerů pokrývajících oblasti na chromozómech 11 a 14, v nichž obvykle dochází ke zlomu. Způsob umožňuje detekci ve většině vzorků, ve kterých je translokace přítomna a umožňuje rychlou charakterizaci místa zlomu pro návrh specifických detekčních sad ke sledování minimální zbytkové nemoci.

CZ 2010 - 441 A3

Způsob detekce chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32) a oligonukleotidy pro použití při tomto způsobu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu detekce chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32) a charakterizace místa zlomu metodou multiplexní long-range PCR z biologických vzorků odebraných z těla pacientů, zejména ze vzorků tkáně lymfatické uzliny, kostní dřeně a krve. Dále se týká nových oligonukleotidů, vhodných pro použití při tomto způsobu.

Dosavadní stav techniky

Nádorová onemocnění jsou často provázena cytogenetickými aberacemi jako jsou delece nebo amplifikace chromozomů nebo jejich úseků nebo chromozomální translokace, při kterých dochází k výměně genetického materiálu mezi nehomologními chromozómy. Jednou z těchto aberací je i chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32), která je nejčastěji detekována u vzorků lymfomu plášťových buněk (Mantle Cell Lymphoma, MCL). Důsledkem této translokace je přemístění genu *CCND1* ležícího na chromozómu 11q13 do blízkosti zesilovače transkripce genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (*IGH*), který leží na chromozómu 14q32 (Obr.1). Gen *CCND1* (dříve označovaný i jako *BCL1* nebo *PRAD1*) kóduje informaci pro tvorbu proteinu cyklin D1. Cyklin D1 je protoonkogen, který sehrává významnou roli v regulaci buněčného cyklu, kde spolu s ostatními proteiny řídí přechod mezi jednotlivými fázemi cyklu. Gen *IGH* kóduje informaci pro syntézu těžkého řetězce imunoglobulinu, který je spolu s lehkým řetězem součástí sekretovaných i na membránu vázaných protilátek vytvářených B-lymfocyty a plazmatickými buňkami. Následkem této translokace dochází k nadměrné expresi cyklinu D1 a následné poruše regulace buněčného cyklu.

Translokace t(11;14)(q13;q32) bývá detekována u téměř všech vzorků MCL, méně často pak u jiných B-lymfoproliferací. Bylo popsáno několik způsobů detekce t(11;14)(q13;q32). Nejspolehlivějším je vyšetření interfázických chromozómů pomocí fluorescenční in-situ hybridizace (FISH) (Detection of t(11;14) using interphase molecular cytogenetics in mantle cell lymphoma and atypical chronic lymphocytic leukemia. Avet-Loiseau H, Garand R,

Gaillard F, Daviet A, Mellerin MP, Robillard N, Bouyge I, Arcot S, Batzer M, Talmant P, Harousseau JL, Milpied N, Bataille R. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998 Oct;23(2):175-82) s použitím dvou různě značených hybridizačních sond (jedna pro chromozóm 11 a druhá pro chromozóm 14). Z cytogenetických metod je použitelná i karyotypizace nebo M-FISH (multicolor FISH) (Detection of diagnostically critical, often hidden, anomalies in complex karyotypes of haematological disorders using multicolour fluorescence in situ hybridization. Jalal SM, Law ME, Starnberg J, Fonseca R, Seely JR, Myers WH, Hanson CA. *Br J Haematol*. 2001 Mar;112(4):975-80). Mezi metody molekulární biologie pro detekci t(11;14)(q13;q32) patří Southernův přenos (Bcl-1 gene rearrangements in B cell lymphoma. Ince C, Blick M, Lee M, Pathak S, Vadhan-Raj S, Selvanayagam P, Gutterman JU, Cabanillas F. *Leukemia*. 1988 Jun;2(6):343-6), PCR (Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. Rimokh R, Berger F, Delsol G, Digonnet I, Rouault JP, Tignaud JD, Gadoux M, Coiffier B, Bryon PA, Magaud JP. *Blood*. 1994 Apr 1;83(7):1871-5) a inverzní long-range PCR (Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. Willis TG, Jadayel DM, Coignet LJ, Abdul-Rauf M, Treleaven JG, Catovsky D, Dyer MJ. *Blood*. 1997 Sep 15;90(6):2456-64.). Metoda Southernova přenosu spočívá v hybridizaci radioaktivně nebo fluorescenčně značených sond s elektroforeticky rozdělenou a na membránu přenesenou vysokomolekulární genomovou DNA. Touto metodou lze translokaci pouze detekovat. PCR dokáže translokaci nejen detekovat, ale po sekvenaci i charakterizovat. Metoda je vysoce citlivá (dokáže detekovat přibližně 1 buňku s translokací mezi 100.000 zdravých buněk), dokáže však zachytit pouze ty translokace, kde zlomové místo na chromozómu 11 leží v oblasti tzv. MTC (Major Translocation Cluster). Translokace se zlomovým místem v MTC však představují pouze 30-40 % ze všech t(11;14)(q13;q32) detekovaných u MCL. Inverzní long-range PCR je navržena tak, aby dokázala zachytit a charakterizovat prakticky všechny translokace bez ohledu na pozici místa zlomu. Tato metoda je však poměrně složitá, zahrnuje několik různých kroků jako je restrikční štěpení, cirkularizace produktů restrikčního štěpení, Southernův přenos, long-range PCR a klonování amplifikačních produktů do bakterií.

Předkládaný vynález umožňuje častější PCR detekci translokace t(11;14)(q13;q32) bez nutnosti využití náročných metod jako je Southernův přenos. Předkládaný vynález zjednodušuje určení sekvence místa zlomu translokace t(11;14)(q13;q32).

Cílem předkládaného vynálezu je doplnit a případně nahradit stávající způsob PCR detekce

translokace t(11;14)(q13;q32) novou metodou multiplexní long-range PCR.

Podstata vynálezu

Vynález se týká nového způsobu PCR detekce zlomového místa translokace t(11;14)(q13;q32), která zvyšuje četnost zachytu až na 80 % při zachování technické nenáročnosti. Předmětem vynálezu je metoda multiplexní long-range PCR se speciálně navrženým souborem oligonukleotidových primerů určená pro detekci zlomového místa translokace t(11;14)(q13;q32) v DNA získané z biologického vzorku získaného z těla pacienta, a použití metody multiplexní long-range PCR pro detekci zlomového místa translokace t(11;14)(q13;q32) v DNA získané z biologického vzorku získaného z těla pacienta. Pod pojmem long-range PCR se rozumí metoda polymerázové řetězové reakce (PCR), která využívá speciální enzym schopný účinně amplifikovat dlouhé úseky molekuly DNA (delší než 5 tisíc párů bazí, tj. 5 kb). Pojmem multiplexní je označováno použití více než dvou primerů v jedné reakci. Podstata metody spočívá v PCR amplifikaci úseku genomové DNA, který zahrnuje zlomové místo, tj. souvislý úsek molekuly DNA skládající se ze sekvence pocházející z chromozómu 11 i sekvence pocházející z chromozómu 14.

Předmětem vynálezu je způsob detekce zlomového místa translokace t(11;14)(q13;q32) metodou multiplexní PCR dalekého dosahu (multiplexní long-range PCR) v DNA získané ze vzorků biologického materiálu, jehož podstata spočívá v tom, že

- a) se připraví primery F1 až Fn, kde n je nejvýše 140, komplementární k úsekům ležícím v oblasti chromozómu 11 v rozsahu -5000 až +420000 bazí od počátku transkripce genu *CCND1* směrem k centroměře, přičemž úseky ležící v této oblasti, k nimž jsou komplementární uvedené primery F1 až Fn, jsou od sebe vzájemně vzdáleny alespoň 1,7 kb, s výhodou 1,7 až 7,6 kb, výhodněji 3,5 až 5,5 kb, a primery F jsou s výhodou číslovány postupně ve směru od počátku transkripce *CCND1* k centroměře,
- b) se připraví primery J1 až J6, které jsou komplementární k úsekům oblasti chromozómu 14, v níž leží geny pro J segmenty těžkého řetězce imunoglobulinu, přičemž úsek, k němuž je komplementární primer J1, leží mezi geny *IGHJ1* a *IGHJ2*, úsek, k němuž je komplementární primer J2, leží mezi geny *IGHJ2* a *IGHJ3*, úsek, k němuž je komplementární primer J3, leží mezi geny *IGHJ3* a *IGHJ4*, úsek, k němuž je komplementární primer J4, leží mezi geny *IGHJ4* a *IGHJ5*, úsek, k němuž je

komplementární primer J5, leží mezi geny *IGHJ5* a *IGHJ6* a úsek, k němuž je komplementární primer J6, leží mezi geny *IGHJ6* a *IGHC*,

- c) primery F1 až Fn se zkombinují s primerem J6 do reakcí multiplexní PCR dalekého dosahu, tak, že vzdálenost mezi nejbližšími primery F ve stejné reakci je alespoň 15 kb,
- d) provedou se reakce multiplexní PCR dalekého dosahu s DNA získanou z biologického vzorku získaného z těla pacienta,
- e) určí se primer F nejbližší zlomovému místu, který poskytl pozitivní reakci, ve výhodném provedení tedy primer s nejvyšším číslem, který poskytl pozitivní reakci,
- f) primer F, který je nejbližší zlomovému místu, se zkombinuje do nové sady reakcí multiplexní PCR dalekého dosahu s primery J1 až J6, a to tak, aby v každé reakci byl primer F, který je nejbližší zlomovému místu, a jeden z primerů J1 až J6,
- g) provedou se reakce PCR dalekého dosahu s DNA získanou z biologického vzorku získaného z těla pacienta,
- h) určí se primer J s nejnižším číslem, který poskytl pozitivní reakci, a který je tedy nejbližší zlomovému místu,
- i) stanoví se sekvence úseku mezi primerem F, který je nejbližší zlomovému místu, a primerem J, který je nejbližší zlomovému místu, s výhodou se sekvence tohoto úseku stanoví metodami PCR a sekvencování.

Biologickým vzorkem může být s výhodou vzorek periferní krve, vzorek kostní dřeně nebo vzorek tkáně, zejména může být vzorkem tkáně vzorek lymfatické uzliny.

Primery F1 až Fn (primery F) tedy mají být navrženy tak, aby pokrývaly oblast, v níž dochází ke zlomu na chromozómu 11. Obvykle ke zlomu dochází blíže ke genu *CCND1* než 420 kb, proto primery F nemusí pokrývat celou tuto oblast, mohou pokrývat jen část této oblasti blíže ke genu *CCND1*. Rozdělení primerů F do reakcí pro multiplexní PCR má být takové, aby se v žádné reakci neamplifikoval víc než jeden řetězec, toho lze dosáhnout tak, že minimální vzdálenost mezi primery v jedné reakci je 15 kb.

Ve výhodném provedení vynálezu je *n* menší nebo rovno 95 a v kroku c) jsou primery zkombinovány do nejvýše 12 reakcí multiplexní PCR dalekého dosahu.

Primery J1 až J6 (primery J) mají být navrženy tak, aby pokrývaly oblast chromozómu 14, v níž leží geny pro J segmenty těžkého řetězce imunoglobulinu.

S výhodou se jako F primery pro multiplexní PCR dalekého dosahu použijí oligonukleotidy mající alespoň 80% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující:

GGAGAAGGTCCTCCAAGCCGATATCCCTGCAGACG	(F1, SEQ ID NO. 1),
TCCATTGTTAAGCCCTTAAGTCGCCCCGGGAAAACG	(F2, SEQ ID NO. 2),
CAAAGATACTGGTGAGCCCTGCTGGCGGTGATGG	(F3, SEQ ID NO. 3),
CCAGGCTGAGCCACAGCAGTAGCAAGGGACAAAGG	(F4, SEQ ID NO. 4),
CCTTCAGCTGGTTCGCAGGTGTCTAACGATTTTCG	(F5, SEQ ID NO. 5),
GGAAGCTCTAGGGTTTGCAACAGGGCCTGGGAAGG	(F6, SEQ ID NO. 6),
CCGTGGTCACGCCACCACCACTTGCTAATATGACG	(F7, SEQ ID NO. 7),
CTGGGATGAGGTGCACATGGAAAATGAGGCATTGG	(F8, SEQ ID NO. 8),
CGTGCACCGTACCGGAGTTTGTGGATGACTCTAGC	(F9, SEQ ID NO. 9),
ACCGTGGTCTTGACATGTAGGGACCTCATCAAGG	(F10, SEQ ID NO. 10),
CAGGTACTCCATGCGCCTTTGGTTTGCAGGTGAGG	(F11, SEQ ID NO. 11),
GGAGACAAGAGTGTTTGCCGCCTGTCATGGTGAGC	(F12, SEQ ID NO. 12),
ATCCACTGGGTCCATAATCCTAGGCCAGCCATGC	(F13, SEQ ID NO. 13),
CCCAGTGGAGTGGGTGCTGAGTGTGTGATACTTGG	(F14, SEQ ID NO. 14),
AGAGGTCCAGAAGTTGGTGTGGCCATCATGTCAGG	(F15, SEQ ID NO. 15),
CGCAACCAGCCTGGCACTGATAAGAAGCACAGAGG	(F16, SEQ ID NO. 16),
GTAGACAGGAGAGCCCCGGAAGATGTGACCCACTGC	(F17, SEQ ID NO. 17),
CAGCTGGAAACAGCTCAGTCTGGGACCACAACACC	(F18, SEQ ID NO. 18),
AATAACGTGGGTGCTCGTCTCTCCCTGCCACAAGG	(F19, SEQ ID NO. 19),
AGGGCTCTTTCTCCAGTGAAGGGTCCTCGCCTTGG	(F20, SEQ ID NO. 20),
GAGGGGATTTTCGAGGCTCTAGGGTCCAAGAAGTGG	(F21, SEQ ID NO. 21),
CAGGAGCCACGCCGAAGTGTCAGATGTACCTCACC	(F22, SEQ ID NO. 22),
GGGTGGCTCCATTCTTGGTTGTAGGCTGGTGAGG	(F23, SEQ ID NO. 23),
ACGCAAGCCCGTGAGCTGTGTCTTCTTTGTCTGG	(F24, SEQ ID NO. 24),
CAGCCCCTTTGCTCTCAATGCTCCCTAAGCAGTGG	(F25, SEQ ID NO. 25),
GGTCACATTACAGAACCCAGGTCTCCAGAAAGC	(F26, SEQ ID NO. 26),
GTGCCTGTGCCATGGGACTGATTAGGTATTGATGG	(F27, SEQ ID NO. 27),

CAGGGGAAGGCTACACGCTGCTTCAAAGTCACAGC	(F28, SEQ ID NO. 28),
CATCTGGGATTCTTGGAAGGTGGGAAGCAGACAGG	(F29, SEQ ID NO. 29),
CTTGGTGGGACTTTGTGACACCAGGAGGCAGAGC	(F30, SEQ ID NO. 30),
CACACCC'TGCTGAAGAGTCCCCTTTGCTCTCAAGG	(F31, SEQ ID NO. 31),
GCCCTGCAGAAGCAGTGGTGAACATCCAAAGATGG	(F32, SEQ ID NO. 32),
TTCAGCCCTGGACACTGCAAATTGTTCCCTTGAGC	(F33, SEQ ID NO. 33),
AAAGCACGGATAATGCTGCCGGAAGTTGGTTCTGC	(F34, SEQ ID NO. 34),
CAACCCACAGCATTCCAGGAGGCTTCAGTGTGAGC	(F35, SEQ ID NO. 35),
CAGTTCTCGCATGAGATCCAGACTCAGGCATGTGG	(F36, SEQ ID NO. 36),
TCACAGACAAGTCCCGACGCTGTTCTACCTTCAGC	(F37, SEQ ID NO. 37),
CAGCATGCCAAGGGGACGACAACATTGACTCTGG	(F38, SEQ ID NO. 38),
TGAGCGCCTATGGGGTGCCAGATACATGACAAAGG	(F39, SEQ ID NO. 39),
CTGCTTCCTCCCAGCTCTTGAGTCCCTCATTTTCC	(F40, SEQ ID NO. 40),
ACCACCACCTTCCAGAAACGCCTCATTTTCTTGG	(F41, SEQ ID NO. 41),
CCCTTCCACCCAATGGCAAGGTTCAAGTTGGTAGC	(F42, SEQ ID NO. 42),
AGCCAGCACTGCCAACCCTTTGCCTAGGGTGTTGG	(F43, SEQ ID NO. 43),
TCCTGTCCCTTAGCCAGCACCTGGTGTAGGAATGC	(F44, SEQ ID NO. 44),
AGGAGGAAATGAGACCCCGTGTGTGAGGGTTCAGG	(F45, SEQ ID NO. 45),
ATCAGCTGAGGTGCCTTCTGTTGCCTGAGTGTTC	(F46, SEQ ID NO. 46),
CTCCCCACAGGTATAGCTCTATGTGGGCCCTTTGC	(F47, SEQ ID NO. 47),
GAGAAAGGGGAGTCCACGTGGGAAGCTCAGATGC	(F48, SEQ ID NO. 48),
TCTGGTTCAAGTCGCTGCTGGTTTGGGTTTCAGAGC	(F49, SEQ ID NO. 49),
GAGGTAAATGACGTGCTGGTGGCCATGGTGTGG	(F50, SEQ ID NO. 50),
AGACCCTGCTCGTCAGTGTGCTGTGTGACGTTAGC	(F51, SEQ ID NO. 51),
CATGCCTTCTGTTACCCGAGACCCACAGTCTGC	(F52, SEQ ID NO. 52),
ATGTTGCCACGGAAATTCTAATCCCTCCCATCAGG	(F53, SEQ ID NO. 53),
GCGCAGATGCTATAAATCACCTGTGACGGGCTTGG	(F54, SEQ ID NO. 54),
TTGCACACAGGGTTATTGATGAGTTCGGGGAGTGC	(F55, SEQ ID NO. 55),
GATCCCGGACCCCTAATTAGACCGTCCCATCTTCC	(F56, SEQ ID NO. 56),
TGCTAGCCCCACAACAAGACCCAGCTATCTTTGC	(F57, SEQ ID NO. 57),
GCATGCTCATCAACTCACATGGGTGCCCTTGACC	(F58, SEQ ID NO. 58),
CCATGTGTGTCTGGGGTTTCTGCAAGGGGAATGC	(F59, SEQ ID NO. 59),
GAACGTGGGTGTGTGTGTCCAATGCACAGTTGAGG	(F60, SEQ ID NO. 60),

AGGCCCTAGGGAGGAACATGAGGCTGGAAACAAGC	(F61, SEQ ID NO. 61),
TGCTGAACCAATTTCCGCCCCATTTCTGTTCAGTCC	(F62, SEQ ID NO. 62),
CAGGTGTGGCGGTACTGAGCTTTGAAACGGACAGG	(F63, SEQ ID NO. 63),
GTGGCCTCTGTAGAATGTGACCTCGTCCCTCATGG	(F64, SEQ ID NO. 64),
GGCCAGAGGCTGATCTAACATTCCGAGGCCAACC	(F65, SEQ ID NO. 65),
CTGCACAGAAATCCCCAGCTTAGAGCTGCACTTCG	(F66, SEQ ID NO. 66),
ATTTCCGGGCATTTGCAGCACAGCATCTCAAGG	(F67, SEQ ID NO. 67),
TGTCACCCCATCGTGCCCCCTAGTTCAACTCACACC	(F68, SEQ ID NO. 68),
GGGTCCCTACACCACCTTGTTCTTGCTCTGTGACC	(F69, SEQ ID NO. 69),
CTAAAGAAGGCAGCAGCTGCTCAGGAAGGCAGCAGG	(F70, SEQ ID NO. 70),
GAGGTGCAGCGGTCACCTTCTGGTCTCACTTTGTCC	(F71, SEQ ID NO. 71),
AGAGGGGACACTGTCGTCATCTCCTCCCATGTACC	(F72, SEQ ID NO. 72),
AAGGCTGCAITCTATCGCACAGGTTCTCCGACTGC	(F73, SEQ ID NO. 73),
AGCTTTGCCCCGGGTTCTGAATTCAGGAGACCTGG	(F74, SEQ ID NO. 74),
ACATGAGGGTTGGCAGCACATCTCGACCTCTGTCC	(F75, SEQ ID NO. 75),
CAAGTGGGAACCTCCTTTTCATGGAGACCAGGCTTGC	(F76, SEQ ID NO. 76),
GGGGATGTTCTCTGCCAATTAGAGCCACGGGTTGG	(F77, SEQ ID NO. 77),
GGGGACCTGGAGTAGGGGTTTTAGCCTCCTGAACC	(F78, SEQ ID NO. 78),
CAATCAGGCCCAAGGCACTCATCACCAAATCTGC	(F79, SEQ ID NO. 79),
TTGGAGCCGTGGGATAATGATCAGCTGCTTCTCG	(F80, SEQ ID NO. 80),
TGTCTCCAGGATGGTGGAGTCCTTAGTCCCGTTCC	(F81, SEQ ID NO. 81),
GGAGCTGAACTTGCGTGTCCCTCCAGCCTCTAACC	(F82, SEQ ID NO. 82),
ACCGTGGTGGATGCTGGACTATGACCAGAGACAGG	(F83, SEQ ID NO. 83),
AAACTCAGTCGTTCTGTGATGGGCCCCAGGAATGG	(F84, SEQ ID NO. 84),
CAAAAGGCATCGTGTACAGAATGGGCGACAACAGG	(F85, SEQ ID NO. 85),
CACGGCGTGTTCCTCAAGGATAGCTGACAAAGG	(F86, SEQ ID NO. 86),
AATTCACCACTGCTTAGCCCAGAGAGGCGCAGAGG	(F87, SEQ ID NO. 87),
TGCGATGAATAATGGTAGCCTCGTGGCATCTGTCC	(F88, SEQ ID NO. 88),
TCCGAGCTCAACTCCAAAGCTCCTTGACCCCATCC	(F89, SEQ ID NO. 89),
CAGCCCTCAGTCGTGGCTGTGAGCTCTAGAACAGG	(F90, SEQ ID NO. 90),
GAATGCCAGCCGCATCCTCAAATACCCCTCATACC	(F91, SEQ ID NO. 91),
ATTCCTGCATCCCTGCACTCGGTGGCCTTAATAGG	(F92, SEQ ID NO. 92),
GAGCAATTTGACTGCCCCCTCATTTGACACACAACG	(F93, SEQ ID NO. 93),

GGCTGAGTCTCGATCCCAAAGCTCTCTCCCAGACC (F94, SEQ ID NO. 94),
 GCTTATCATGCATCAGCTTGCCATGGCTCCACAGG (F95, SEQ ID NO. 95).

S výhodou se jako J primery pro multiplexní PCR dalekého dosahu použijí oligonukleotidy mající alespoň 80% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující:

CCGCCCTCCTGCCGACCTCCTTTGCTGAGCACC (J1, SEQ ID NO. 96),
 CCTGCTTGCTACCTGTGGAGGGTCCCTGACGGG (J2, SEQ ID NO. 97),
 CCCAGTTCCCAAAGAAAGGCCTTCTGCTGAACG (J3, SEQ ID NO. 98),
 GCATCTGGAGCCCTTGCCCCTCGTCTGTGTGG (J4, SEQ ID NO. 99),
 CCTGAGAATGCTCCAGGTGAAGCGGAGAGAGG (J5, SEQ ID NO. 100),
 CCTCAGCCATCACTAAGACCCCTGGTTTGTTCAGG (J6, SEQ ID NO. 101).

Sekvence s 80% identitou k uvedeným sekvencím jsou zejména sekvence lišící se zkrácením nebo prodloužením sekvence až o 7 nukleotidů na 3' a/nebo 5' konci nebo záměnou až 4 nukleotidů nebo kombinací zkrácení/prodloužení se záměnou nukleotidů.

Předmětem předloženého vynálezu je také použití oligonukleotidů vybraných ze skupiny zahrnující sekvence mající alespoň 80% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí vybranou ze skupiny

GGAGAAGGTCCTCCAAGCCGATATCCCTGCAGACG (F1),
 TCCATTGTTAAGCCCTTAAGTCGCCCCGGGAAAACG (F2),
 CAAAGATACTGGTGAGCCCTGCTGGCGGTGATGG (F3),
 CCAGGCTGAGCCACAGCAGTAGCAAGGGACAAAGG (F4),
 CCTTCAGCTGGTTCGCAGGTGTCTAACGATTTTCG (F5),
 GGAAGCTCTAGGGTTTGCAACAGGGCCTGGGAAGG (F6),
 CCGTGGTCACGCCACCACCACTTGCTAATATGACG (F7),
 CTGGGATGAGGTGCACATGGAAAATGAGGCATTGG (F8),
 CGTGCACCGTACCGGAGTTTGTGGATGACTCTAGC (F9),
 ACCGTGGTCTTGACATGTAGGGACCTCATCAAGG (F10),
 CAGGTACTCCATGCGCCTTTGGTTTGCAGGTGAGG (F11),
 GGAGACAAGAGTGTGTTGCCGCCTGTCATGGTGAGC (F12),
 ATTCCACTGGGTCCATAATCCTAGGCCAGCCATGC (F13),

30457

CCCAGTGGAGTGGGTGCTGAGTGTGTGATACTTGG	(F14),
AGAGGTCCAGAAGTTGGTGTGGCCATCATGTCAGG	(F15),
CGCAACCAGCCTGGCACTGATAAGAAGCACAGAGG	(F16),
GTAGACAGGAGAGCCCGGAAGATGTGACCCACTGC	(F17),
CAGCTGGAAACAGCTCAGTCTGGGACCACAACACC	(F18),
AATAACGTGGGTGCTCGTCTCTCCCTGCCACAAGG	(F19),
AGGGCTCTTTCTCCAGTGAAGGGTCCTCGCCTTGG	(F20),
GAGGGGATTTTCGAGGCTCTAGGGTCCAAGAAGTGG	(F21),
CAGGAGCCACGCCGAAGTGTGAGATGTACCTCACC	(F22),
GGGTGGCTCCATTCTTGGTTGTAGGCTGGTGAGG	(F23),
ACGCAAGCCCGTGAGCTGTGTCTTCTTTGTCTGG	(F24),
CAGCCCCTTTGCTCTCAATGCTCCCTAAGCAGTGG	(F25),
GGTCACATTCACAGAACCCCAGGTCTCCAGAAAGC	(F26),
GTGCCTGTGCCATGGGACTGATTAGGTATTGATGG	(F27),
CAGGGGAAGGCTACACGCTGCTTCAAAGTCACAGC	(F28),
CATCTGGGATTCTTGGAAGGTGGGAAGCAGACAGG	(F29),
CTTGGTGGGACTTTGTGACACCAGGAGGCAGAGC	(F30),
CACACCCTGCTGAAGAGTCCCCTTTGCTCTCAAGG	(F31),
GCCCTGCAGAAGCAGTGGTGAACATCCAAAGATGG	(F32),
TTCAGCCCTGGACACTGCAAATTGTTCCCTTGAGC	(F33),
AAAGCACGGATAATGCTGCCGGAAGTTGGTTCTGC	(F34),
CAACCCACAGCAITCCAGGAGGCTTCAGTGTGAGC	(F35),
CAGTTCTCGCATGAGATCCAGACTCAGGCATGTGG	(F36),
TCACAGACAAGTCCCGACGCTGTTCTACCTTCAGC	(F37),
CAGCATGCCAAGGGGACGACAACATTGACTCTGG	(F38),
TGAGCGCCTATGGGGTGCCAGATACATGACAAAGG	(F39),
CTGCTTCCTCCCAGCTCTTGAGTCCCTCATTTTCC	(F40),
ACCACCACCTTCCAGAAACGCCTCATTTTCTTGG	(F41),
CCCTTCCACCCAATGGCAAGGTTTCAGGTTGGTAGC	(F42),
AGCCAGCACTGCCAACCCTTTGCCTAGGGTGTTGG	(F43),
TCCTGTCCCTTAGCCAGCACCTGGTGTAGGAATGC	(F44),
AGGAGGAAATGAGACCCCGTGTGTGAGGGTTCAGG	(F45),
ATCAGCTGAGGTGCCTTCTGTTGCCTGAGTGTTGC	(F46),

CTCCCCACAGGTATAGCTCTATGTGGGCCCTTTGC	(F47),
GAGAAAGGGGAGTCCACGTGGGAAGCTCAGATGC	(F48),
TCTGGTTCAAGTCGCTGCTGGTTTGGGTTCAGAGC	(F49),
GAGGTAAATGACGTGCTGGTGGCCATGGTGTGG	(F50),
AGACCCTGCTCGTCAGTGTGCTGTGTGACGTTAGC	(F51),
CATGCCTTCTGTTCACCCGAGACCCACAGTCTGC	(F52),
ATGTTGCCACGGAAATTCTAATCCCTCCCATCAGG	(F53),
GCGCAGATGCTATAAATCACCTGTGACGGGCTTGG	(F54),
TTGCACACAGGGTTATTGATGAGTTCGGGGAGTGC	(F55),
GATCCCGGACCCCTAATTAGACCGTCCCATCTTCC	(F56),
TGCTAGCCCCACAACAAGACCCAGCTATCTTTGC	(F57),
GCA TGCTCATCAACTCACATGGGTGCCCTTGACC	(F58),
CCATGTGTGTCTGGGGTTTCTGCAAGGGGAATGC	(F59),
GAACGTGGGTGTGTGTGTCCAATGCACAGTTGAGG	(F60),
AGGCCCTAGGGAGGAACATGAGGCTGGAAACAAGC	(F61),
TGCTGAACCAATTTCCGCCCATTTCCCTGTTCAGTCC	(F62),
CAGGTGTGGCGGTACTGAGCTTTGAAACGGACAGG	(F63),
GTGGCCTCTGTAGAATGTGACCTCGTCCCTCATGG	(F64),
GGCCAGAGGCTGATCTAACATTTCCGAGGCCAACC	(F65),
CTGCACAGAAATCCCCAGCTTAGAGCTGCACTTCG	(F66),
ATTTCCGGGCATTTGCAGCACAGCATCTCAAGG	(F67),
TGTCACCCCATCGTGCCCCCTAGTTCAACTCACACC	(F68),
GGGTCCCTACACCACCTTGTTCTTGCTCTGTGACC	(F69),
CTAAAGAAGGCAGCAGCTGCTCAGGAAGGCAGCAGG	(F70),
GAGGTGCAGCGGTCACTTCTGGTCTCACTTTGTCC	(F71),
AGAGGGGACACTGTGTCATCTCCTCCCATGTACC	(F72),
AAGGCTGCATTCTATCGCACAGGTTCTCCGACTGC	(F73),
AGCTTTGCCCCGGGTTTCTGAATTCAGGAGACCTGG	(F74),
ACATGAGGGTTGGCAGCACATCTCGACCTCTGTCC	(F75),
CAAGTGGGAACCTCCTTTCATGGAGACCAGGCTTGC	(F76),
GGGGATGTTCTCTGCCAATTAGAGCCACGGGTG	(F77),
GGGGACCTGGAGTAGGGGTITTAGCCTCCTGAACC	(F78),
CAATCAGGCCCAAGGCACTCATCACCAAATCTGC	(F79),

TTGGAGCCGTGGGATAATGATCAGCTGCTTCTCG	(F80),
TGTCTCCAGGATGGTGGAGTCCTTAGTCCCGTTCC	(F81),
GGAGCTGAAC TTGCGTGTCTCCAGCCTCTAACC	(F82),
ACCGTGGTGGATGCTGGACTATGACCAGAGACAGG	(F83),
AAACTCAGTCGTTCTGTGATGGGCCCCAGGAATGG	(F84),
CAAAAGGCATCGTGTACAGAATGGGCGACAACAGG	(F85),
CACGGCGTGTTCCTCAAGGATAGCTGACAAAGG	(F86),
AATTCACCACTGCTTAGCCAGAGAGGCGCAGAGG	(F87),
TGCGATGAATAATGGTAGCCTCGTGGCATCTGTCC	(F88),
TCGGAGCTCAACTCCAAAGCTCCTTGACCCCATCC	(F89),
CAGCCCTCAGTCGTGGCTGTGAGCTCTAGAACAGG	(F90),
GAATGCCAGCCGCATCCTCAAATACCCCTCATACC	(F91),
ATTCCTGCATCCCTGCACTCGGTGGCCTTAATAGG	(F92),
GAGCAATTTGACTGCCCTCATTTGACACACAACG	(F93),
GGCTGAGTCTCGATCCCAAAGCTCTCTCCAGACC	(F94),
GCTTATCATGCATCAGCTTGCCATGGCTCCACAGG	(F95),
CCGCCCTCCTGCCGACCTCCTTTGCTGAGCACC	(J1),
CCTGCTTGCTACCTGTGGAGGGTCCCTGACGGG	(J2),
CCCAGTTCCCAAAGAAAGGCCTTCTGCTGAACG	(J3),
GCATCTGGAGCCCTTGCCCCTCGTCTGTGTGG	(J4),
CCTGAGAATGCTCCAGGTGAAGCGGAGAGAGG	(J5),
CCTCAGCCATCACTAAGACCCCTGGTTTGTTCAGG	(J6)

pro *in vitro* stanovení zlomového místa chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32).

Dalším předmětem předloženého vynálezu je sada pro detekci translokace t(11;14)(q13;q32) metodou PCR dalekého dosahu (long-range PCR), jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje primery F1 až Fn, kde n je nejvýše 140, komplementární k úsekům oblasti chromozómu 11 v rozsahu -5000 až +420000 bází od počátku transkripce genu CCND1 směrem k centroměře, přičemž úseky této oblasti, k nimž jsou komplementární uvedené primery F1 až Fn, jsou od sebe vzájemně vzdáleny alespoň 1,7 kb, s výhodou 1,7 až 7,6 kb, výhodněji 3,5 až 5,5 kb, a primery F jsou s výhodou číslovány postupně ve směru od počátku transkripce CCND1 k

30 417

centromere,

a primery J1 až J6, které jsou komplementární k úsekům oblasti chromozómu 14, v níž leží geny pro J segmenty těžkého řetězce imunoglobulinu, přičemž úsek, k němuž je komplementární primer J1, leží mezi geny IGHJ1 a IGHJ2, úsek, k němuž je komplementární primer J2, leží mezi geny IGHJ2 a IGHJ3, úsek, k němuž je komplementární primer J3, leží mezi geny IGHJ3 a IGHJ4, úsek, k němuž je komplementární primer J4, leží mezi geny IGHJ4 a IGHJ5, úsek, k němuž je komplementární primer J5, leží mezi geny IGHJ5 a IGHJ6 a úsek, k němuž je komplementární primer J6, leží mezi geny IGHJ6 a IGHC.

Ve výhodném provedení vynálezu obsahuje sada 95 primerů F, rozdělených do 12 nádobek tak, že vzdálenost mezi nejbližšími primery F ve stejné reakci je alespoň 15 kb, a 6 primerů J, každý z nich v samostatné nádobce.

V jiném výhodném provedení vynálezu obsahuje sada 60 primerů F, rozdělených do 10 nádobek tak, že vzdálenost mezi nejbližšími primery F ve stejné reakci je alespoň 15 kb, a 6 primerů J, každý z nich v samostatné nádobce.

Předkládaný vynález tedy ve výhodném provedení zahrnuje soubor speciálně pro long-range PCR navržených oligonukleotidových primerů. Soubor se skládá z 95 primerů (F1 až F95, F primery) komplementárních k ~400 kb dlouhému úseku chromozómu 11, který leží v blízkosti genu CCND1 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?org=Human&db=hg18&position=chr11%3A68665053-69188423>) a 6 primerů (J1 až J6, J primery) komplementárních s částí chromozómu 14 v oblasti kde leží geny pro J segmenty těžkého řetězce imunoglobulinu (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?org=Human&db=hg18&position=chr14%3A105400000-105402800>). Primery F1 až F95 jsou navrženy tak, aby vzdálenost mezi dvěma sousedícími primery byla v rozmezí 1,7 až 7,6 kb (Obr. 2). Primery F1 až F95 mohou například být zkombinovány s primerem J6 do 12 multiplexních long-range reakcí (A až L) tak, aby v každé z reakcí v případě přítomnosti translokace docházelo k amplifikaci pouze jednoho úseku DNA (Tab. 1). Amplifikace pouze jednoho DNA fragmentu je zajištěna dostatečnou vzdáleností mezi primery F použitými v jednotlivých reakcích. Vzdálenost mezi nejbližšími primery F ve stejné reakci je nejméně 15 tisíc bází, což při reakčních podmínkách long-range PCR zabraňuje účinné amplifikaci velmi dlouhých fragmentů (Obr. 3). Primery F1 až F95 jsou navrženy a zkombinovány tak, aby v

případě přítomnosti translokace došlo k amplifikaci zlomového místa a okolních úseků DNA v jedné až třech ze dvanácti reakcí. F primery jsou rozděleny do reakcí tak, aby v případě přítomnosti translokace a současné amplifikace zlomového místa ve dvou a více reakcích umožňovaly ve většině případů identifikaci použitých primerů a tím přibližné určení polohy místa zlomu na chromozómu 11 (Tab. 1). Primery J1 až J6 jsou navrženy tak, aby umožnily přesnější lokalizaci místa zlomu na chromozómu 14 (Obr. 3). Primery J1 až J6 zároveň slouží jako primery pro sekvenování místa zlomu. Primery J1 až J6 jsou využívány v druhé sadě multiplex reakcí, kdy jsou jednotlivě zkombinovány s primery F1 až F95 na základě výsledku první sady multiplex PCR reakcí (Obr. 4).

Tabulka 1

Reakce	F primery
A	F1, F8, F28, F37, F55, F74, F81, F91
B	F3, F10, F16, F52, F61, F72, F83, F90, F95
C	F12, F21, F30, F50, F59, F68, F78, F89
D	F20, F35, F45, F51, F57, F70, F75, F82, F87
E	F2, F18, F27, F39, F47, F66, F92
F	F5, F14, F32, F41, F53, F63, F69, F86
G	F6, F22, F34, F44, F49, F56, F84
H	F11, F26, F33, F60, F67, F77
I	F9, F23, F29, F48, F58, F65, F71
J	F15, F24, F36, F42, F54, F64, F80, F88, F93
K	F1, F7, F13, F19, F31, F38, F43, F62, F76
L	F4, F25, F40, F46, F73, F79, F85, F94

Primery F1 až F95, jejichž sekvence jsou zde uvedeny, dovolují pokrýt rovnoměrně oblast chromozómu 11 v rozsahu -5000 až +420000 bází od počátku transkripce genu *CCND1* směrem k centromere. Vzhledem k tomu, že ke zlomu na chromozómu 11 velmi často dochází výrazně blíže, je možno použít jen část těchto primerů s nižšími pořadovými čísly, např. jen F1 až F60.

Přehled obrázků

Obr. 1 znázorňuje schématické znázornění translokace t(11;14)(q13;q32). Následkem zlomů v

původních chromozómech 11 a 14 a následné fúze dochází ke vzniku dvou fúzních chromozomů, z nichž jeden nese gen *CCND1* translokovaný do blízkosti *IGH* lokusu, ve kterém leží velmi silný zesilovač transkripce.

Obr. 2 ukazuje příkladné schéma rozmístění primerů pro detekci translokace t(11;14)(q13;q32) metodou multiplexní long-range PCR. a) Rozmístění primerů na chromozómu 11. Primery pokrývají oblast ~400kb centromericky od pozice genu *CCND1*. b) Rozmístění primerů na chromozómu 14. Jednotlivé primery jsou lokalizovány centromericky od *IGHJ* segmentů. c) Příklad, kdy ke zlomu dojde v segmentu *IGHJ5* na chromozómu 14 a v úseku DNA mezi primery F5 a F6 na chromozómu 11.

Obr. 3 ukazuje schéma průběhu reakcí pro příklad, kdy ke zlomu dojde v segmentu *IGHJ5* na chromozómu 14 a v úseku DNA mezi primery F5 a F6 na chromozómu 11. a) V první sadě reakcí dochází díky parametrům reakce k amplifikaci tří úseků DNA vymezených primery J6 až F3, J6 až F4 a J6 až F5. Díky rozmístění F primerů do jednotlivých reakcí jsou tyto produkty amplifikovány každý v jiné reakci. b) Na základě výsledků první sady reakcí je DNA ve druhé sadě reakcí amplifikována s primery J1 až J6 a F primery, které poskytují nejkratší produkt (v tomto příkladu směs primerů obsahující primer F5). Ve druhé sadě dávají pozitivní reakci (tj. amplifikovaný úsek DNA) pouze reakce s primery J6 a J5. Primer J5, který dává kratší amplifikační produkt, je pak použit pro sekvencování místa zlomu.

Obr. 4 ukazuje schéma vyšetření vzorku na translokaci t(11;14)(q13;q32) metodou multiplex long-range – příklad. A) Vzorek DNA je nejdříve vyšetřen sadou dvanácti multiplex long-range PCR reakcí, ve kterých jsou primery F1 až F95 v kombinaci s primerem J6. Amplifikační produkty jsou detekovány metodou agarosové elektroforézy, v příkladu je vyznačena přítomnost amplifikačního produktu v reakcích C a I, kratší produkt byl získán v reakci C. B) Vzorek je vyšetřen druhou sadou 6 reakcí, ve kterých jsou zkombinovány F primery použité v reakci C s jednotlivými primery J1 až J6. Amplifikační produkty jsou detekovány metodou agarosové elektroforézy, v příkladu je vyznačena přítomnost amplifikačního produktu v reakcích IV, V a VI, nejkratší produkt byl detekován v reakci IV. C) Amplifikační produkt z reakce IV je poté sekvencován s použitím primeru J4 jako sekvenačního primeru.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Byla provedena analýza 16 vzorků DNA získaných z biopsií mízních uzlin pacientů s lymfomem plášťové zóny. Tyto vzorky byly negativní při vyšetření na přítomnost translokace t(11;14)(q13;q32) při použití dosavadní PCR metody určené pro amplifikaci zlomových míst lokalizovaných v MTC. Každý vzorek byl nejdříve otestován sadou 12 multiplex long-range PCR reakcí A až L (viz Tabulka 1). K detekci amplifikačních produktů byla použita agarózová elektroforéza. V případě positivity byl vzorek otestován sadou 6 multiplex long-range PCR reakcí (I až VI), kombinujících F primery použité v pozitivní reakci dávající nejkratší amplifikační produkt s jednotlivými primery J1 až J6. Pro sekvencování byl pak použit produkt a příslušný primer J1 až J6 z reakcí I až VI dávajících nejkratší amplifikační produkt (Obr. 3 a 4).

Složení reakčních směsí je uvedeno v tabulkách 2a a 2b.

Tabulka 2a

Komponenta	Koncentrace	Množství (μl)	Dodavatel
H ₂ O		16,2	
LA PCR buffer II (Mg ²⁺ plus)	10x	4	TaKaRa
dNTP směs	2,5mM	6,4	TaKaRa
LA Taq HS polymeráza	5U/μl	0,4	TaKaRa
J primer	2μM	4	
Směs F primerů	2μM každý	4	
DNA		5	

Tabulka 2b

Komponenta	Koncentrace	Množství (μl)	Dodavatel
H ₂ O		19,5	
Phusion HF buffer	5x	8	Finnzymes
dNTP směs	10mM	0,8	Finnzymes
Phusion polymeráza	2U/μl	0,7	Finnzymes
J primer	2 μM	4	
Směs F primerů	2μM každý	2	
DNA		5	

Při tomto reakčním profilu:

- 1: 95°C/30s
- 2: 98°C /30s
- 3: 72°C /7min
- 4: jdi na krok 2, 32x
- 5: 72°C 10min

Z 16 testovaných vzorků byl amplifikační produkt získán v 11 případech (69 %). U těchto 11 pozitivních vzorků byla místa zlomu amplifikována ve třech různých reakcích A – L ve 2 případech, ve dvou různých reakcích v 5 případech a pouze v jedné z reakcí ve 4 případech.

Druhá sada reakcí pak identifikovala u těchto 11 pozitivních vzorků použití těchto J segmentů genu těžkého imunoglobulinového řetězce: *IGHJ6* (pozitivní pouze reakce VI s J6 primerem) - 3 vzorky, *IGHJ5* (pozitivní reakce V a VI) - 1 vzorek, *IGHJ4* (pozitivní reakce IV, V a VI) - 6 vzorků, *IGHJ3* (pozitivní reakce III, IV, V a VI) - 1 vzorek. J segmenty těžkého imunoglobulinového řetězce *IGHJ1* a *IGHJ2* nebyly využity u žádného z pozitivních vzorků (viz Tabulka 3).

Tabulka 3

Číslo vzorku	Pozitivní reakce z reakcí A až L	Primer F nejbližší zlomovému místu	Pozitivní reakce z reakcí I až VI	Primer J nejbližší zlomovému místu
1	E	F2	III - VI	J3
2	E	F2	V, VI	J5
3	B, I	F10	VI	J6
4	C, D, K	F21	VI	J6
5	H	F26	IV - VI	J4
6	H, L	F26	IV - VI	J4
7	D, G, J	F34	IV - VI	J4
8	E, K	F39	IV - VI	J4
9	K, G	F43	VI	J6
10	F, J	F15	IV-VI	J4
11	H	F26	IV-VI	J4

Vzorky DNA izolované z kostní dřeně pacientů s lymfomem z buněk pláštěvé zóny byly vyšetřeny na přítomnost translokace t(11;14)(q13;q32) metodou multiplexní long-range PCR popsanou v příkladu 1 s tou změnou, že jako F primery byly použity pouze oligonukleotidy F1 až F60 rozdělené dle stejných pravidel do 10 multiplexních long-range PCR reakcí A - J (Tab. 4). Pro amplifikaci byly použity obdobné reakční podmínky jako v příkladu 1 (Tab. 2b). Celkem bylo vyšetřeno 20 vzorků, z toho pozitivní výsledek byl získán v 5 případech (25 %) (viz Tabulka 5). Celkově nižší míra záchytu je dána především nižším počtem nádorových buněk ve vzorcích kostní dřeně, především u vzorků odebraných po započetí terapie.

Tabulka 4

Reakce	F primery
A	F10, F21, F30, F38, F45, F53
B	F1, F9, F26, F33, F48, F57
C	F2, F8, F15, F23, F35, F43
D	F6, F18, F34, F39, F44, F50, F60
E	F12, F17, F24, F42, F51, F56
F	F3, F11, F29, F36, F49
G	F22, F27, F32, F40, F47, F52
H	F4, F14, F20, F41, F54, F59
I	F5, F13, F19, F28, F46, F55
J	F7, F16, F25, F31, F37, F58

Tabulka 5

Číslo vzorku	Pozitivní reakce z reakcí A až J	Primer F nejbližší zlomovému místu	Pozitivní reakce z reakcí I až VI	Primer J nejbližší zlomovému místu
1	F, H	F4	IV - VI	J4
2	J, G	F32	V, VI	J5
3	C, F	F36	V, VI	J5
4	C, F, J	F36	IV - VI	J4
5	H, J	F59	IV - VI	J4

Sekvenace amplifikačních produktů získaných v příkladech 1 a 2 s příslušným sekvenačním primerem J1 až J6 vedla ve všech 11 provedených případech k získání sekvence a přesné charakterizaci a lokalizaci místa zlomu jak na chromozómu 11 tak i na chromozómu 14. Tyto sekvence pak byly použity k návrhu specifických qPCR (kvantitativní PCR) detekčních sad, umožňujících detekci minimální zbytkové nemoci (MRD, Minimal Residual Disease). Tyto detekční sady sestávají z 6 oligonukleotidových primerů RQJ1 až RQJ6 odvozených ze sekvence chromozómu 14 v jednotlivých *IGHJ* segmentech a duálně značené oligonukleotidové sondy (TaqMan® technologie) komplementárních k několika úsekům DNA v oblasti *IGHJ* segmentů na chromozómu 14 (Real-time polymerase chain reaction estimation of bone marrow tumor burden using clonal immunoglobulin heavy chain gene and bcl-1/JH rearrangements in mantle cell lymphoma. Andersen NS, Donovan JW, Zuckerman A, Pedersen L, Geisler C, Gribben JG. Exp Hematol. 2002 Jul;30(7):703-1). Vhodný primer RQJ je vybrán na základě *IGHJ* segmentu, identifikovaného sekvenací místa zlomu. Jako druhý primer (RQF) jsou použity individuálně navržené pacient-specifické oligonukleotidy komplementární k sekvenci místa zlomu translokace t(11;14)(q13;q32) identifikované v příkladech 1 a 2.

Bylo testováno 5 detekčních sad pro real-time kvantitativní PCR. Bylo navrženo 5 pacient-specifických primerů RQF1 až 5, které byly zkombinovány s vhodnými primery RQJ1 až 6 (Tabulka 6).

Tabulka 6

Vzorek	Primer RQJ	Primer RQF	Sekvence primeru RQF
1	RQJ4	RQF1	GTGCCACACTGCCAGTATACG
2	RQJ4	RQF2	CATTCGGTCCTCGGTGTTCC
3	RQJ3	RQF3	CCTGGACCACGTAAGGGC
4	RQJ6	RQF4	GAGCGCAGAGAATACGGTATGG
5	RQJ4	RQF5	GGAATCTAGTACAGGGTCG

Primery RQF byly navrženy tak, aby jejich teplota tání (T_m) odpovídala primerům RQJ. Tyto sady pak byly otestovány na pozitivních a negativních vzorcích. Jako pozitivní vzorek byla vždy použita DNA z příkladů 1 a 2, ve které byla translokace t(11;14)(q13;q32) identifikována, jako negativní kontrola byl použit směsný vzorek DNA dobrovolníků negativních na t(11;14)(q13;q32). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 7, amplifikace probíhala při

tomto reakčním profilu:

- 1: 95 °C/15 min
- 2: 95 °C /20 s
- 3: 60 °C /1 min
- 4: jdi na krok 2, 49x

Tabulka 7

Komponenta	Koncentrace	Množství (μl)	Dodavatel.
H ₂ O		5,3	
Primer RQJ	10μM	1	
Primer RQF	10μM	1	
TaqMan probe	25μM	0,2	
AB gene universal mastermix	2x	12,5	AB Gene
DNA	50 ng/μL	5	

Ve všech případech byla získána specifická amplifikační křivka v pozitivních vzorcích a žádná nebo pouze minimální v negativním vzorku.

Průmyslová využitelnost

Stanovení zlomového místa translokace t(11;14)(q13;q32) je důležité zejména proto, že umožňuje navrhnout specifické qPCR (kvantitativní PCR) detekční sady, umožňující detekci minimální zbytkové nemoci (MRD, Minimal Residual Disease). Tyto detekční sady sestávají z 6 oligonukleotidových primerů odvozených ze sekvence chromozómu 14 v jednotlivých *IGHJ* segmentech a duálně značených oligonukleotidových sond (TaqMan® technologie) komplementárních k několika úsekům DNA v oblasti *IGHJ* segmentů na chromozómu 14 (Real-time polymerase chain reaction estimation of bone marrow tumor burden using clonal immunoglobulin heavy chain gene and bcl-1/JH rearrangements in mantle cell lymphoma. Andersen NS, Donovan JW, Zuckerman A, Pedersen L, Geisler C, Gribben JG. Exp Hematol. 2002 Jul;30(7):703-1). Vhodný primer je vybrán na základě *IGHJ* segmentu, identifikovaného sekvenací místa zlomu. Jako druhý primer se použijí individuálně navržené pacient-specifické oligonukleotidy komplementární k sekvenci místa zlomu translokace t(11;14)(q13;q32) identifikovaného způsobem podle předkládaného vynálezu.

24/11

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob detekce zlomového místa translokace t(11;14)(q13;q32) metodou multiplexní PCR dalekého dosahu v DNA získané ze vzorků biologického materiálu, vyznačený tím, že

- a) se připraví primery F1 až Fn, kde n je nejvýše 140, komplementární k úsekům ležícím v oblasti chromozómu 11 v rozsahu -5000 až +420000 bází od počátku transkripce genu *CCND1* směrem k centromere, přičemž úseky ležící v této oblasti, k nimž jsou komplementární uvedené primery F1 až Fn, jsou od sebe vzájemně vzdáleny alespoň 1,7 kb, s výhodou 1,7 až 7,6 kb, výhodněji 3,5 až 5,5 kb, a primery F jsou s výhodou číslovány postupně ve směru od počátku transkripce *CCND1* k centromere,
- b) se připraví primery J1 až J6, které jsou komplementární k úsekům oblasti chromozómu 14, v níž leží geny pro J segmenty těžkého řetězce imunoglobulinu, přičemž úsek, k němuž je komplementární primer J1, leží mezi geny *IGHJ1* a *IGHJ2*, úsek, k němuž je komplementární primer J2, leží mezi geny *IGHJ2* a *IGHJ3*, úsek, k němuž je komplementární primer J3, leží mezi geny *IGHJ3* a *IGHJ4*, úsek, k němuž je komplementární primer J4, leží mezi geny *IGHJ4* a *IGHJ5*, úsek, k němuž je komplementární primer J5, leží mezi geny *IGHJ5* a *IGHJ6* a úsek, k němuž je komplementární primer J6, leží mezi geny *IGHJ6* a *IGHC*,
- c) primery F1 až Fn se zkombinují s primerem J6 do reakcí multiplexní PCR dalekého dosahu tak, že vzdálenost mezi nejbližšími primery F ve stejné reakci je alespoň 15 kb,
- d) provedou se reakce multiplexní PCR dalekého dosahu s DNA získanou z biologického vzorku získaného z těla pacienta,
- e) určí se primer F nejbližší zlomovému místu, který poskytl pozitivní reakci, ve výhodném provedení tedy primer s nejvyšším číslem, který poskytl pozitivní reakci,
- f) primer F, který je nejbližší zlomovému místu, se zkombinuje do nové sady reakcí multiplexní PCR dalekého dosahu s primery J1 až J6, a to tak, aby v každé reakci byl primer F, který je nejbližší zlomovému místu, a jeden z primerů J1 až J6,
- g) provedou se reakce PCR dalekého dosahu s DNA získanou z biologického vzorku získaného z těla pacienta,
- h) určí se primer J s nejnižším číslem, který poskytl pozitivní reakci, a který je tedy nejbližší zlomovému místu,

GGAGAAGGTCCTCCAAGCCGATATCCCTGCAGACG (F1),
TCCATTGTAAAGCCCTTAAGTCGCCCCGGGAAAACG (F2),
CAAAGATACTGGTGAGCCCTGCTGGCGGTGATGG (F3),
CCAGGCTGAGCCACAGCAGTAGCAAGGGACAAAGG (F4),
CCTTCAGCTGGTTCGCAGGTGTCTAACGATTTTCG (F5),
GGAAGCTCTAGGGTTTGCAACAGGGCCTGGGAAGG (F6),
CCGTGGTCACGCCACCACCACTTGCTAATATGACG (F7),
CTGGGATGAGGTGCACATGGAAAATGAGGCATTGG (F8),
CGTGCACCGTACCGGAGTTTGTGGATGACTCTAGC (F9),
ACCGTGGTCTTGCACATGTAGGGACCTCATCAAGG (F10),
CAGGTACTCCATGCGCCTTTGGTTTGCAGGTGAGG (F11),
GGAGACAAGAGTGTTTGCCGCCTGTCATGGTGAGC (F12),
ATTCCACTGGGTCCATAATCCTAGGCCAGCCATGC (F13),
CCCAGTGGAGTGGGTGCTGAGTGTGTGATACTTGG (F14),
AGAGGTCCAGAAGTTGGTGTGGCCATCATGTCAGG (F15),
CGCAACCAGCCTGGCACTGATAAGAAGCACAGAGG (F16),
GTAGACAGGAGAGCCCCGGAAGATGTGACCCACTGC (F17),
CAGCTGGAAACAGCTCAGTCTGGGACCACAACACC (F18),
AATAACGTGGGTGCTCGTCTCTCCCTGCCACAAGG (F19),
AGGGCTCTTTCTCCAGTGAAGGGTCCTCGCCTTGG (F20),

GAGGGGATTTCGAGGCTCTAGGGTCCAAGAAGTGG	(F21),
CAGGAGCCACGCCGAAGTGTGATGTACCTCACC	(F22),
GGGTGGCTCCATTCTTGGTTGTAGGCTGGTGAGG	(F23),
ACGCAAGCCCGTGAGCTGTGTCTTCTTTGTCTGG	(F24),
CAGCCCCTTTGCTCTCAATGCTCCCTAAGCAGTGG	(F25),
GGTCACATTCACAGAACCCCAAGTCTCCAGAAAGC	(F26),
GTGCCTGTGCCATGGGACTGATTAGGTATTGATGG	(F27),
CAGGGGAAGGCTACACGCTGCTTCAAAGTCACAGC	(F28),
CATCTGGGATTCTTGGAAGGTGGGAAGCAGACAGG	(F29),
CTTGGTGGGACTTTGTGACACCAGGAGGCAGAGC	(F30),
CACACCCTGCTGAAGAGTCCCCTTTGCTCTCAAGG	(F31),
GCCCTGCAGAAGCAGTGGTGAACATCCAAAGATGG	(F32),
TTCAGCCCTGGACACTGCAAATTGTTCCCTTGAGC	(F33),
AAAGCACGGATAATGCTGCCGGAAGTTGGTTCTGC	(F34),
CAACCCACAGCATTCCAGGAGGCTTCAGTGTGAGC	(F35),
CAGTTCTCGCATGAGATCCAGACTCAGGCATGTGG	(F36),
TCACAGACAAGTCCCGACGCTGTTCTACCTTCAGC	(F37),
CAGCATGCCAAGGGGACGACAACATTGACTCTGG	(F38),
TGAGCGCCTATGGGGTGCCAGATACATGACAAAGG	(F39),
CTGCTTCCTCCCAGCTCTTGAGTCCCTCATTTTCC	(F40),
ACCACCACCTTCCAGAAACGCCTCATTTTCTTGG	(F41),
CCCTTCCACCCAATGGCAAGGTTCAAGTTGGTAGC	(F42),
AGCCAGCACTGCCAACCCTTTGCCTAGGGTGTTGG	(F43),
TCCTGTCCCTTAGCCAGCACCTGGTGTAGGAATGC	(F44),
AGGAGGAAATGAGACCCCGTGTGTGAGGGTTCAGG	(F45),
ATCAGCTGAGGTGCCTTCTGTTGCCTGAGTGTTC	(F46),
CTCCCCACAGGTATAGCTCTATGTGGGCCCTTTGC	(F47),
GAGAAAGGGGAGTCCACGTGGGAAGCTCAGATGC	(F48),
TCTGGTTCAAGTCGCTGCTGGTTTGGGTTTCAGAGC	(F49),
GAGGTTAAATGACGTGCTGGTGGCCATGGTGTGG	(F50),
AGACCCTGCTCGTCAGTGTGCTGTGTGACGTTAGC	(F51),
CATGCCTTCTGTTACCCGAGACCCACAGTCTGC	(F52),
ATGTTGCCACGGAAATCTAATCCCTCCCATCAGG	(F53),

GCGCAGATGCTATAAATCACCTGTGACGGGCTTGG	(F54),
TTGCACACAGGGTTATTGATGAGTTCGGGGAGTGC	(F55),
GATCCCGGACCCCTAATTAGACCGTCCCATCTTCC	(F56),
TGCTAGCCCCACAACAAGACCCAGCTATCTTTGC	(F57),
GCATGCTCATCAACTCACATGGGTGCCCTTGACC	(F58),
CCATGTGTGTCTGGGGTTTCTGCAAGGGGAATGC	(F59),
GAACGTGGGTGTGTGTGTCCAATGCACAGTTGAGG	(F60),
AGGCCCTAGGGAGGAACATGAGGCTGGAAACAAGC	(F61),
TGCTGAACCATTTCGCCCCATTTCCTGTTCAAGTCC	(F62),
CAGGTGTGGCGGTACTGAGCTTTGAAACGGACAGG	(F63),
GTGGCCTCTGTAGAATGTGACCTCGTCCCTCATGG	(F64),
GGCCAGAGGCTGATCTAACATTCCGAGGCCAACC	(F65),
CTGCACAGAAATCCCCAGCTTAGAGCTGCACTTCG	(F66),
ATTTCGGGCATTTGCAGCACAGCATCTCAAGG	(F67),
TGTCACCCCATCGTGCCCCTAGTTCAACTCACACC	(F68),
GGGTCCCTACACCACCTTGTTCTTGCTCTGTGACC	(F69),
CTAAAGAAGGCAGCAGCTGCTCAGGAAGGCAGCAGG	(F70),
GAGGTGCAGCGGTCACTTCTGGTCTCACTTTGTCC	(F71),
AGAGGGGACACTGTGTCATCTCCTCCCATGTACC	(F72),
AAGGCTGCATTCTATCGCACAGGTTCTCCGACTGC	(F73),
AGCTTTGCCCCGGGTTCTGAATTCAGGAGACCTGG	(F74),
ACATGAGGGTTGGCAGCACATCTCGACCTCTGTCC	(F75),
CAAGTGGAACCTCTTTTCATGGAGACCAGGCTTGC	(F76),
GGGGATGTTCTCTGCCAATTAGAGCCACGGGTGG	(F77),
GGGGACCTGGAGTAGGGGTTTTAGCCTCCTGAACC	(F78),
CAATCAGGCCCAAGGCACTCATCACCAAATCTGC	(F79),
TTGGAGCCGTGGGATAATGATCAGCTGCTTCTCG	(F80),
TGTCTCCAGGATGGTGGAGTCCTTAGTCCCGTTCC	(F81),
GGAGCTGAACCTGCGTGTCTCCTCCAGCCTCTAACC	(F82),
ACCGTGGTGGATGCTGGACTATGACCAGAGACAGG	(F83),
AAACTCAGTCGTTCTGTGATGGGCCCCAGGAATGG	(F84),
CAAAAGGCATCGTGTACAGAAATGGGCGACAACAGG	(F85),
CACGGCGTGTTCCTCAAGGATAGCTGACAAAGG	(F86),

34934

AATTCACCACTGCTTAGCCCAGAGAGGCGCAGAGG (F87),
 TGCATGAATAATGGTAGCCTCGTGGCATCTGTCC (F88),
 TCGGAGCTCAACTCCAAAGCTCCTTGACCCCATCC (F89),
 CAGCCCTCAGTCGTGGCTGTGAGCTCTAGAACAGG (F90),
 GAATGCCAGCCGCATCCTCAAATACCCCTCATACC (F91),
 ATTCCTGCATCCCTGCACTCGGTGGCCTTAATAGG (F92),
 GAGCAATTTGACTGCCCCCTCATTTGACACACAACG (F93),
 GGCTGAGTCTCGATCCCAAAGCTCTCTCCCAGACC (F94),
 GCTTATCATGCATCAGCTTGCCATGGCTCCACAGG (F95).

5. Způsob podle nároku 1, vyznačený tím, že se jako J primery pro multiplexní PCR dalekého dosahu použijí oligonukleotidy mající alespoň 80% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující:

CCGCCCTCCTGCCGACCTCCTTTGCTGAGCACC (J1),
 CCTGCTTGCTACCTGTGGAGGGTCCCTGACGGG (J2),
 CCCAGTTCCCAAAGAAAGGCCTTCTGCTGAACG (J3),
 GCATCTGGAGCCCTTGCCCCCTCGTCTGTGTGG (J4),
 CCTGAGAATGCTCCAGGTGAAGCGGAGAGAGG (J5),
 CCTCAGCCATCACTAAGACCCCTGGTTTGTTCAGG (J6).

6. Použití oligonukleotidů vybraných ze skupiny zahrnující sekvence mající alespoň 80% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující

GGAGAAGGTCCTCCAAGCCGATATCCCTGCAGACG (F1),
 TCCAATTGTTAAGCCCTTAAGTCGCCCCGGGAAAACG (F2),
 CAAAGATACTGGTGAGCCCTGCTGGCGGTGATGG (F3),
 CCAGGCTGAGCCACAGCAGTAGCAAGGGACAAAGG (F4),
 CCTTCAGCTGGTTCGCAGGTGTCTAACGATTTTCG (F5),
 GGAAGCTCTAGGGTTTGCAACAGGGCCTGGGAAGG (F6),
 CCGTGGTCACGCCACCACCTTGCTAATATGACG (F7),
 CTGGGATGAGGTGCACATGGAAAATGAGGCATTGG (F8),
 CGTGCACCGTACCGGAGTTTGTGGATGACTCTAGC (F9),
 ACCGTGGTCTTGACATGTAGGGACCTCATCAAGG (F10),
 CAGGTACTCCATGCGCCTTTGGTTTGCAGGTGAGG (F11).

2047

GGAGACAAGAGTGTTTGCCGCCTGTCATGGTGAGC (F12),
 ATTCCACTGGGTCCATAATCCTAGGCCAGCCATGC (F13),
 CCCAGTGGAGTGGGTGCTGAGTGTGTGATACTTGG (F14),
 AGAGGTCCAGAAGTTGGTGTGGCCATCATGTCAGG (F15),
 CGCAACCAGCCTGGCACTGATAAGAAGCACAGAGG (F16),
 GTAGACAGGAGAGCCCCGGAAGATGTGACCCACTGC (F17),
 CAGCTGGAAACAGCTCAGTCTGGGACCACAACACC (F18),
 AATAACGTGGGTGCTCGTCTCTCCCTGCCACAAGG (F19),
 AGGGCTCTTTCTCCAGTGAAGGGTCCTCGCCTTGG (F20),
 GAGGGGATTTTCGAGGCTCTAGGGTCCAAGAAGTGG (F21),
 CAGGAGCCACGCCGAAGTGTGAGATGTACCTCACC (F22),
 GGGTGGCTCCATTCTTGGTTGTAGGCTGGTGAGG (F23),
 ACGCAAGCCCGTGAGCTGTGTCTTCTTTGTCTGG (F24),
 CAGCCCCTTTGCTCTCAATGCTCCCTAAGCAGTGG (F25),
 GGTCACATTCACAGAACCCCAGGTCTCCAGAAAGC (F26),
 GTGCCTGTGCCATGGGACTGATTAGGTATTGATGG (F27),
 CAGGGGAAGGCTACACGCTGCTTCAAAGTCACAGC (F28),
 CATCTGGGATTCTTGGAAGGTGGGAAGCAGACAGG (F29),
 CTTGGTGGGACTTTGTGACACCAGGAGGCAGAGC (F30),
 CACACCCTGCTGAAGAGTCCCCTTTGCTCTCAAGG (F31),
 GCCCTGCAGAAGCAGTGGTGAACATCCAAAGATGG (F32),
 TTCAGCCCTGGACACTGCAAATTGTTCCCTTGAGC (F33),
 AAAGCACGGATAATGCTGCCGGAAGTTGGTTCTGC (F34),
 CAACCCACAGCATTCCAGGAGGCTTCAGTGTGAGC (F35),
 CAGTTCTCGCATGAGATCCAGACTCAGGCATGTGG (F36),
 TCACAGACAAGTCCCGACGCTGTTCTACCTTCAGC (F37),
 CAGCATGCCAAGGGGACGACAACATTGACTCTGG (F38),
 TGAGCGCCTATGGGGTGCCAGATACATGACAAAGG (F39),
 CTGCTTCCTCCCAGCTCTTGAGTCCCTCATTTTCC (F40),
 ACCACCACCTTCCAGAAACGCCTCATTTTCTTGG (F41),
 CCCTTCCACCCAATGGCAAGGTTTCAGGTTGGTAGC (F42),
 AGCCAGCACTGCCAACCCTTTGCCTAGGGTGTGG (F43),
 TCCTGTCCCTTAGCCAGCACCTGGTGTAGGAATGC (F44),

AGGAGGAAATGAGACCCCGTGTGTGAGGGTTCAGG	(F45),
ATCAGCTGAGGTGCCTTCTGTTGCCTGAGTGTTGC	(F46),
CTCCCCACAGGTATAGCTCTATGTGGGCCCTTTGC	(F47),
GAGAAAGGGGAGTCCACGTGGGAAGCTCAGATGC	(F48),
TCTGGTTCAAGTCGCTGCTGGTTTGGGTTCAGAGC	(F49),
GAGGTTAAATGACGTGCTGGTGGCCATGGTGTGG	(F50),
AGACCCTGCTCGTCAGTGTGCTGTGTGACGTTAGC	(F51),
CATGCCTTCTGTTCACCCGAGACCCACAGTCTGC	(F52),
ATGTTGCCACGGAAATTCTAATCCCTCCCATCAGG	(F53),
GCGCAGATGCTATAAATCACCTGTGACGGGCTTGG	(F54),
TTGCACACAGGGTTATTGATGAGTTCGGGGAGTGC	(F55),
GATCCCGGACCCCTAATTAGACCGTCCCATCTTCC	(F56),
TGCTAGCCCCACAACAAGACCCAGCTATCTTTGC	(F57),
GCATGCTCATCAACTCACATGGGTGCCCTTGACC	(F58),
CCATGTGTGTCTGGGGTTTCTGCAAGGGGAATGC	(F59),
GAACGTGGGTGTGTGTGTCCAATGCACAGTTGAGG	(F60),
AGGCCCTAGGGAGGAACATGAGGCTGGAAACAAGC	(F61),
TGCTGAACCAATTCCGCCCAATTCCTGTTCAGTCC	(F62),
CAGGTGTGGCGGTACTGAGCTTTGAAACGGACAGG	(F63),
GTGGCCTCTGTAGAATGTGACCTCGTCCCTCATGG	(F64),
GGCCAGAGGCTGATCTAACATTCCGAGGCCAACC	(F65),
CTGCACAGAAATCCCCAGCTTAGAGCTGCACTTCG	(F66),
ATTTCGGGCATTTGCAGCACAGCATCTCAAGG	(F67),
TGTCACCCCATCGTGCCCCCTAGTTCAACTCACACC	(F68),
GGGTCCCTACACCACCTTGTTCTTGCTCTGTGACC	(F69),
CTAAAGAAGGCAGCAGCTGCTCAGGAAGGCAGCAGG	(F70),
GAGGTGCAGCGGTCACTTCTGGTCTCACTTTGTCC	(F71),
AGAGGGGACACTGTCGTCATCTCCTCCCATGTACC	(F72),
AAGGCTGCATTCTATCGCACAGGTTCTCCGACTGC	(F73),
AGCTTTGCCCCGGGTTCTGAATTCAGGAGACCTGG	(F74),
ACATGAGGGTTGGCAGCACATCTCGACCTCTGTCC	(F75),
CAAGTGGGAACCTCCTTTCATGGAGACCAGGCTTGC	(F76),
GGGGATGTTCTCTGCCAATTAGAGCCACGGGTG	(F77),

34289

GGGGACCTGGAGTAGGGGTTTTCAGCCTCCTGAACC	(F78),
CAATCAGGCCCAAGGCACTCAACACCAAATCTGC	(F79),
TTGGAGCCGTGGGATAATGATCAGCTGCTTCTCG	(F80),
TGTCTCCAGGATGGTGGAGTCCTTAGTCCCGTCC	(F81),
GGAGCTGAACTTGCGTGTCCCTCCCAGCCTCTAACC	(F82),
ACCGTGGTGGATGCTGGACTATGACCAGAGACAGG	(F83),
AAACTCAGTCGTTCTGTGATGGGCCCCAGGAATGG	(F84),
CAAAAGGCATCGTGTACAGAAATGGGCGACAACAGG	(F85),
CACGGCGTGTTCCTCAAGGATAGCTGACAAAGG	(F86),
AATTCACCACTGCTTAGCCCAGAGAGGCGCAGAGG	(F87),
TGCGATGAATAATGGTAGCCTCGTGGCATCTGTCC	(F88),
TCCGAGCTCAACTCCAAAGCTCCTTGACCCCATCC	(F89),
CAGCCCTCAGTCGTGGCTGTGAGCTCTAGAACAGG	(F90),
GAATGCCAGCCGCATCCTCAAATACCCCTCATAACC	(F91),
ATTCCTGCATCCCTGCACTCGGTGGCCTTAATAGG	(F92),
GAGCAATTTGACTGCCCTCATTTGACACACAACG	(F93),
GGCTGAGTCTCGATCCCAAAGCTCTCTCCCAGACC	(F94),
GCTTATCATGCATCAGCTTGCCATGGCTCCACAGG	(F95),
CCGCCCTCCTGCCGACCTCCTTTGCTGAGCACC	(J1),
CCTGCTTGCTACCTGTGGAGGGTCCCTGACGGG	(J2),
CCCAGTTCCCAAAGAAAGGCCTTCTGCTGAACG	(J3),
GCATCTGGAGCCCTTGCCCCTCGTCTGTGTGG	(J4),
CCTGAGAATGCTCCAGGTGAAGCGGAGAGAGG	(J5),
CCTCAGCCATCACTAAGACCCCTGGTTTGTTTCAGG	(J6)

pro *in vitro* stanovení zlomového místa chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32).

7. Sada pro detekci translokace t(11;14)(q13;q32) metodou multiplexní PCR dalekého dosahu, vyznačená tím, že obsahuje primery F1 až Fn, kde n je nejvýše 140, komplementární k úsekům oblasti chromozómu 11 v rozsahu -5000 až +420000 bazí od počátku transkripce genu CCND1 směrem k centromere, přičemž úseky této oblasti, k nimž jsou komplementární uvedené primery F1 až Fn, jsou od sebe vzájemně vzdáleny alespoň 1,7 kb, s výhodou 1,7 až 7,6 kb, výhodněji 3,5 až 5,5 kb, a primery F jsou s výhodou číslovány postupně ve směru od počátku transkripce CCND1 k centromere,

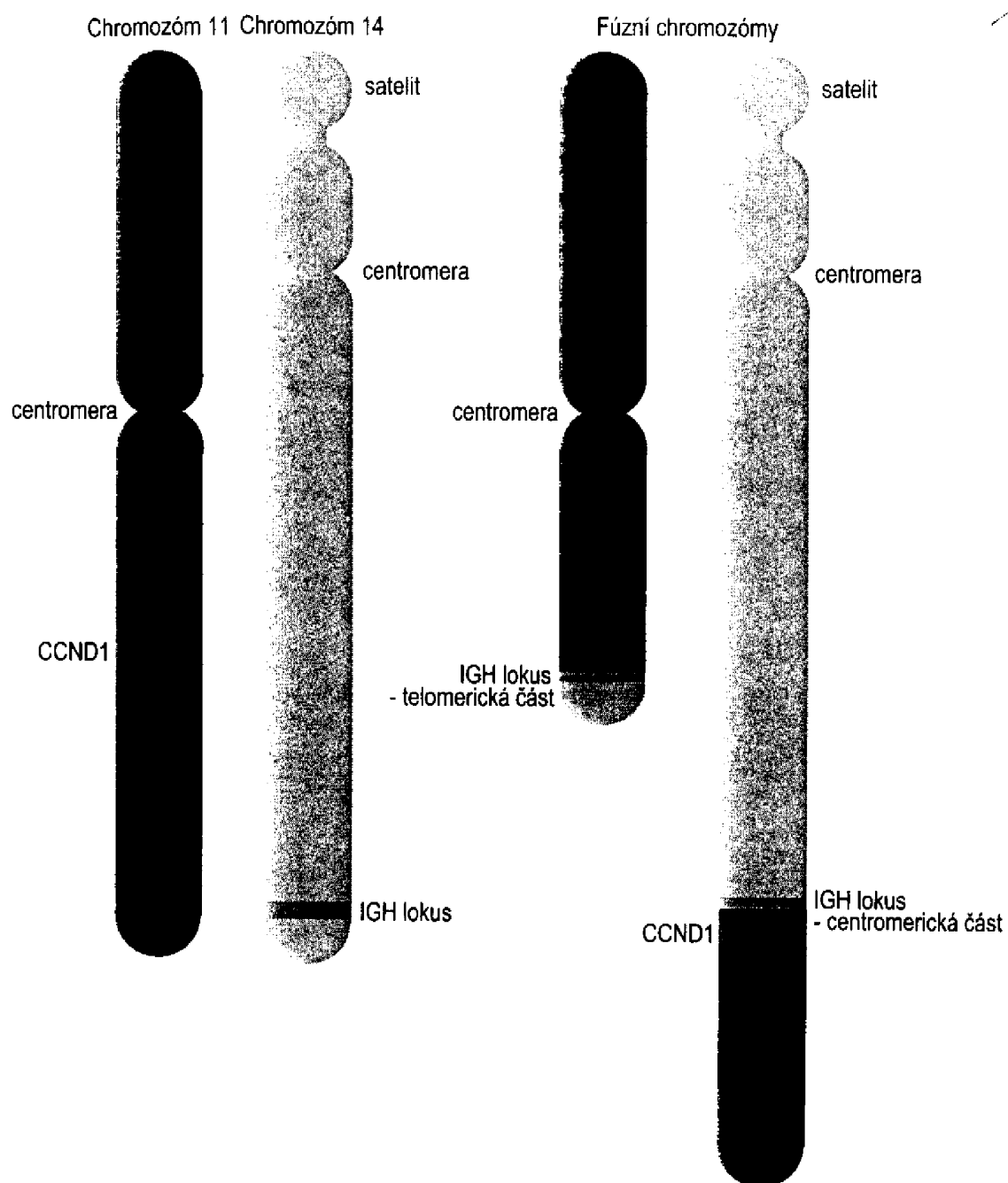
a primery J1 až J6, které jsou komplementární k úsekům oblasti chromozómu 14, v níž leží geny pro J segmenty těžkého řetězce imunoglobulinu, přičemž úsek, k němuž je komplementární primer J1, leží mezi geny IGHJ1 a IGHJ2, úsek, k němuž je komplementární primer J2, leží mezi geny IGHJ2 a IGHJ3, úsek, k němuž je komplementární primer J3, leží mezi geny IGHJ3 a IGHJ4, úsek, k němuž je komplementární primer J4, leží mezi geny IGHJ4 a IGHJ5, úsek, k němuž je komplementární primer J5, leží mezi geny IGHJ5 a IGHJ6 a úsek, k němuž je komplementární primer J6, leží mezi geny IGHJ6 a IGHC.

8. Sada podle nároku 7, vyznačená tím, že obsahuje 95 primerů F, rozdělených do 12 nádobek tak, že vzdálenost mezi nejbližšími primery F ve stejné reakci je alespoň 15 kb, a 6 primerů J, každý z nich v samostatné nádobce.

9. Sada podle nároku 7, vyznačená tím, že obsahuje 60 primerů F, rozdělených do 10 nádobek tak, že vzdálenost mezi nejbližšími primery F ve stejné reakci je alespoň 15 kb, a 6 primerů J, každý z nich v samostatné nádobce.

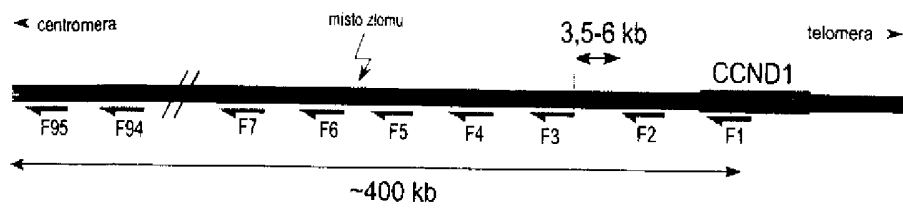
30451

Obr. 1

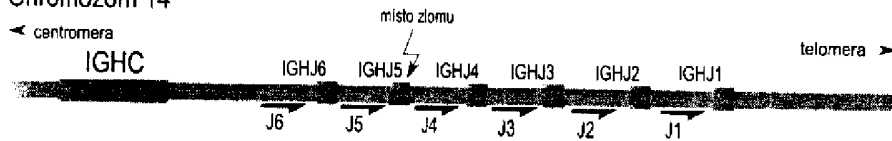


Obr. 2

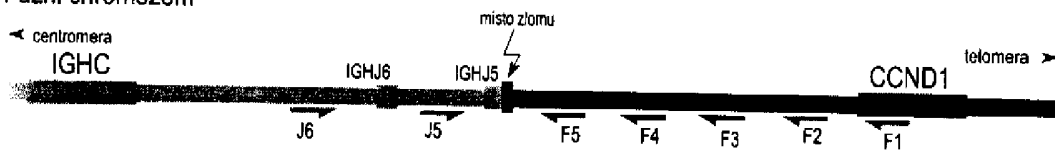
a) Chromozóm 11



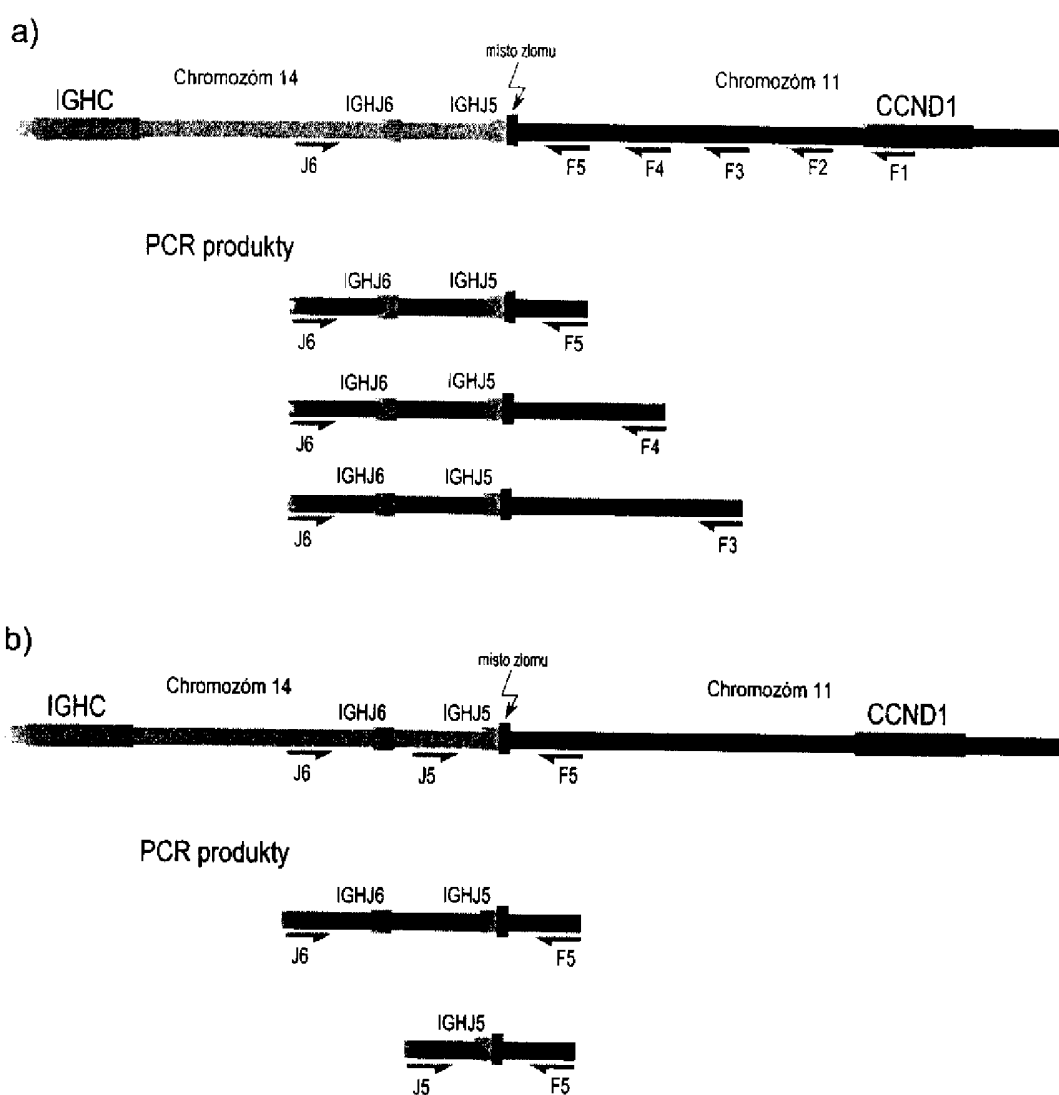
b) Chromozóm 14



c) Fúzní chromozóm

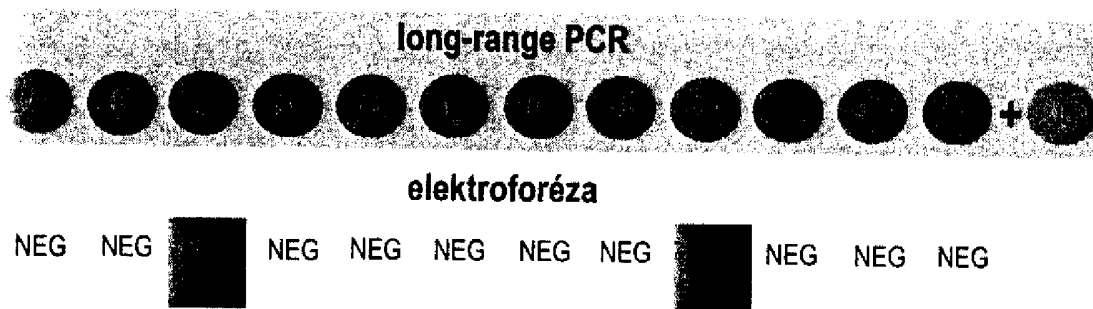


Obr. 3

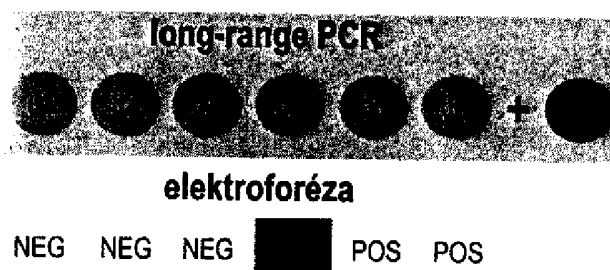


Obr. 4

A)



B)



C)



Sequence Listing.ST25
SEQUENCE LISTING

PU 2010-44

32957

<110> Masarykova univerzita

<120> způsob detekce chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32) a oligonukleotidy pro použití při tomto způsobu

<130> P

<160> 101

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 1
ggagaagggtc ctccaagccg atatccctgc agacg 35

<210> 2
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 2
tccattgtta agcccttaag tcgcccggga aaacg 35

<210> 3
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 3
caaagatact ggtgagccct gctggcggtg atgg 34

<210> 4
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 4
ccaggctgag ccacagcagt agcaagggac aaagg 35

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

Sequence Listing.ST25

<400> 5
ccttcagctg gttcgcaggt gtctaacgat tttcg 35

<210> 6
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 6
ggaagctcta gggtttgcaa cagggcctgg gaagg 35

<210> 7
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 7
ccgtggtcac gccaccacca cttgctaata tgacg 35

<210> 8
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 8
ctgggatgag gtgcacatgg aaaatgaggc attgg 35

<210> 9
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 9
cgtgcaccgt accggagttt gtggatgact ctacg 35

<210> 10
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 10
accgtggtct tgcacatgta gggacctcat caagg 35

<210> 11
<211> 35
<212> DNA

Sequence Listing.ST25

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 11
caggtactcc atgcgccttt ggtttgcagg tgagg 35

<210> 12
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 12
ggagacaaga gtgtttgccg cctgtcatgg tgagg 35

<210> 13
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 13
attccactgg gtccataatc ctaggccagc catgc 35

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 14
cccagtgagg tgggtgctga gtgtgtgata cttgg 35

<210> 15
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 15
agaggtccag aagttggtgt ggccatcatg tcagg 35

<210> 16
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 16
cgcaaccagc ctggcactga taagaagcac agagg 35

Sequence Listing.ST25

<210> 17
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 17
 gtagacagga gagcccggaa gatgtgaccc actgc

35

<210> 18
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 18
 cagctggaaa cagctcagtc tgggaccaca acacc

35

<210> 19
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 19
 aataacgtgg gtgctcgtct ctccctgcc aagg

35

<210> 20
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 20
 agggctcttt ctccagtga gggcctcgc cttgg

35

<210> 21
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 21
 gaggggattt cgaggctcta gggccaaga agtgg

35

<210> 22
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

Sequence Listing.ST25

<400> 22	
caggagccac gccgaagtgt cagatgtacc tcacc	35
<210> 23	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 23	
gggtggctcc attcttggtt gtaggctggt gagg	34
<210> 24	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 24	
acgcaagccc gtgagctgtg tcttcttgt ctgg	34
<210> 25	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 25	
cagccccctt gctctcaatg ctccctaagc agtgg	35
<210> 26	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 26	
ggtcacattc acagaacccc aggtctccag aaagc	35
<210> 27	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 27	
gtgcctgtgc catgggactg attaggtatt gatgg	35
<210> 28	
<211> 35	
<212> DNA	

Sequence Listing.ST25

```

<213> Artificial
<220>
<223> Primer
<400> 28
caggggaagg ctacacgctg cttcaaagtc acagc
35

<210> 29
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Primer
<400> 29
catctgggat tcttgaagg tgggaagcag acagg
35

<210> 30
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Primer
<400> 30
cttggtagga ctttgtgaca ccaggaggca gagc
34

<210> 31
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Primer
<400> 31
cacaccctgc tgaagagtcc ctttgctct caagg
35

<210> 32
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Primer
<400> 32
gccctgcaga agcagtggcg aacatccaaa gatgg
35

<210> 33
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Primer
<400> 33
ttcagccctg gacactgcaa attgttcct tgagc
35

```

Sequence Listing.ST25

```

<210> 34
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 34
aaagcacgga taatgctgcc ggaagttggt tctgc
35

<210> 35
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 35
caaccacag cattccagga ggcttcagtg tgagc
35

<210> 36
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 36
cagttctcgc atgagatcca gactcaggca tgtgg
35

<210> 37
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 37
tcacagacaa gtcccgcgc tgttctacct tcagc
35

<210> 38
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 38
cagcatgcc aaggggacgac aacattgact ctgg
34

<210> 39
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

```

Sequence Listing.ST25

```

<400> 39
tgagcgccta tggggtgcca gatacatgac aaagg          35

<210> 40
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 40
ctgcttcctc ccagctcttg agtccctcat ttccc          35

<210> 41
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 41
accaccacct tccagaaacg cctcattttc ttgg          34

<210> 42
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 42
cccttcacc caatggcaag gttcaggttg gttagc          35

<210> 43
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 43
agccagcact gccaaccctt tgcctagggt gttgg          35

<210> 44
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 44
tcctgtcct tagccagcac ctggtgtagg aatgc          35

<210> 45
<211> 35
<212> DNA

```

Sequence Listing.ST25

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 45
aggaggaaat gagaccccggt gtgtgagggt tcagg 35

<210> 46
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 46
atcagctgag gtgccttctg ttgcctgagt gttgc 35

<210> 47
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 47
ctccccacag gtatagctct atgtgggccc ttgac 35

<210> 48
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 48
gagaaaagggg agtccacgtg ggaagctcag atgc 34

<210> 49
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 49
tctggttcaa gtcgctgctg gtttgggttc agagc 35

<210> 50
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 50
gagggttaaat gacgtgctgg tggccatggt gtgg 34

Sequence Listing.ST25

```

<210> 51
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 51
agaccctgct cgtcagtgtg ctgtgtgacg ttagc
35

<210> 52
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 52
catgccttct gttcacccga gaccacagc ctgc
34

<210> 53
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 53
atgttgccac ggaaattcta atccctccca tcagg
35

<210> 54
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 54
gcgcatgac tataaatcac ctgtgacggg cttgg
35

<210> 55
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 55
ttgcacacag gggtattgat gagttcgggg agtgc
35

<210> 56
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

```

Sequence Listing.ST25

<400> 56	
gatcccgac ccctaattag accgtcccat cttcc	35
<210> 57	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 57	
tgctagcccc acaacaagac ccagctatct ttgc	34
<210> 58	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 58	
gcatgctcat caactcacat ggggtgccctt gacc	34
<210> 59	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 59	
ccatgtgtgt ctgggggtttc tgcaagggga atgc	34
<210> 60	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 60	
gaacgtgggt gtgtgtgtcc aatgcacagt tgagg	35
<210> 61	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 61	
aggccctagg gaggaacatg aggctggaaa caagc	35
<210> 62	
<211> 35	
<212> DNA	

Sequence Listing.ST25

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 62
tgctgaacca tttccgcca tttctgttc agtcc 35

<210> 63
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 63
caggtgtggc ggtactgagc tttgaaacgg acagg 35

<210> 64
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 64
gtggcctctg tagaatgtga cctcgtccct catgg 35

<210> 65
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 65
ggccagaggg tgatctaaca ttccgaggcc aacc 34

<210> 66
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 66
ctgcacagaa atccccagct tagagctgca cttcg 35

<210> 67
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 67
atttccgggc attgcagca cagcatctca agg 33

Sequence Listing.ST25

```

<210> 68
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 68
tgtcaccca tcgtgccct agttcaactc acacc
35

<210> 69
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 69
gggtccctac accaccttgt tcttgctctg tgacc
35

<210> 70
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 70
ctaaagaagg cagcagctgc tcaggaaggc agcagg
36

<210> 71
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 71
gagggtgcagc ggtcacttct ggtctcactt tgtcc
35

<210> 72
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 72
agaggggaca ctgtcgatc ctctcccat gtacc
35

<210> 73
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

```

Sequence Listing.ST25

<400> 73	
aaggctgcat tctatcgac aggttctccg actgc	35
<210> 74	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 74	
agctttgccc gggttcctga attcaggaga cctgg	35
<210> 75	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 75	
acatgagggg tggcagcaca tctcgacctc tgtcc	35
<210> 76	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 76	
caagtgggaa ctcctttcat ggagaccagg cttgc	35
<210> 77	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 77	
ggggatgttc tctgccaatt agagccacgg gttgg	35
<210> 78	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 78	
ggggacctgg agtaggggtt ttagcctcct gaacc	35
<210> 79	
<211> 34	
<212> DNA	

Sequence Listing.ST25

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 79
caatcaggcc caaggcactc atcaccaaatt ctgc 34

<210> 80
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 80
ttggagccgt gggataatga tcagctgctt ctcg 34

<210> 81
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 81
tgtctccagg atgggtggagt ccttagtccc gttcc 35

<210> 82
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 82
ggagctgaac ttgcgtgtcc tcccagcctc taacc 35

<210> 83
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 83
accgtggtgg atgctggact atgaccagag acagg 35

<210> 84
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 84
aaactcagtc gttctgtgat gggccccagg aatgg 35

Sequence Listing.ST25

```

<210> 85
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 85
caaaaggcat cgtgtacaga atgggcgaca acagg
35

<210> 86
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 86
cacggcgtgt tccccctcaag gatagctgac aaagg
35

<210> 87
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 87
aattcaccac tgcttagccc agagaggcgc agagg
35

<210> 88
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 88
tgcgatgaat aatggtagcc tcgtggcatc tgtcc
35

<210> 89
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 89
tcggagctca actccaaagc tccttgaccc catcc
35

<210> 90
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

```

Sequence Listing.ST25

```

<400> 90
cagccctcag tcgtggctgt gagctctaga acagg
35

<210> 91
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 91
gaatgccagc cgcacccctca aatacccttc atacc
35

<210> 92
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 92
attcctgcac cctgcactc ggtggcctta atagg
35

<210> 93
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 93
gagcaatttg actgcccctc atttgacaca caacg
35

<210> 94
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 94
ggctgagtct cgatcccaaa gctctctccc agacc
35

<210> 95
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 95
gcttatcatg catcagcttg ccatggctcc acagg
35

<210> 96
<211> 33
<212> DNA

```

Sequence Listing.ST25

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 96
ccgccctcct gccgacctcc ttgctgagc acc 33

<210> 97
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 97
cctgcttgct acctgtggag ggtccctgac ggg 33

<210> 98
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 98
cccagttccc aaagaaaggc cttctgctga acg 33

<210> 99
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 99
gcatctggag cccttgcccc tcgtctgtgt gg 32

<210> 100
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 100
cctgagaatg ctccaggatga agcggagaga gg 32

<210> 101
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 101
cctcagccat cactaagacc cctggtttgt tcagg 35