

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2011-324
(22) Přihlášeno: 01.06.2011
(40) Zveřejněno: 20.06.2012
(Věstník č. 25/2012)
(47) Uděleno: 09.05.2012
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 20.06.2012
(Věstník č. 25/2012)

(11) Číslo dokumentu:

303 252

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Salic A., Mitchison T.J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105, 2415-2420.; Bradford J.A., Clarke S.T. Dual-pulse labeling using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) in flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, 2011, 55, Chapter 7, Unit 7.38.; Buck S.B. et al. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *BioTechniques* 2008, 44, 927-929.; Li K. et al. Fluorogenic "click" reaction for labeling and detection of DNA in proliferating cells. *BioTechniques* 2010, 49, 525-527.; Cappella P. et al. A novel method based on click chemistry, which overcomes limitations of cell cycle analysis by classical determination of BrdU incorporation, allowing multiplex antibody staining. *Cytometry* 2008, 73, 626-636.; Jao C.Y., Salic A. Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105, 15779-15784.; Chehrehasa F. et al. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *Journal of Neuroscience Methods* 2009, 177, 122-130.; Zeng C. et al. Evaluation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult nervous system. *Brain Research* 2010, 1319, 21-32..

(73) Majitel patentu:

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

(72) Původce:

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

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

Způsob eliminace antigenních vlastností 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu a 5-ethynyluridinu při detekci nukleových kyselin

(57) Anotace:

Popsaný způsob dovozuje efektivně eliminovat 5-ethynyl-2'-deoxyuridin inkorporovaný v DNA nebo 5-ethynyluridin inkorporovaný v RNA jako antigen, který je rozeznáván protilátkami, primárně namířenými proti strukturně podobným molekulám. Příkladem takových molekul jsou 5-brom-2'-deoxyuridin, 5-chlor-2'-deoxyuridin, 5-jod-2'-deoxyuridin či 5-bromuridin a 5-fluoruridin. Způsob je založen na reakci 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu v DNA nebo 5-ethynyluridinu v RNA s malými azidovanými molekulami v prostředí s měďnými ionty, prováděné před reakcí s protilátkou, rozeznávající 5-ethynyl-2'-deoxyuridin a 5-ethynyluridin.

CZ 303252 B6

Způsob eliminace antigenních vlastností 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu a 5-ethynyluridinu při detekci nukleových kyselin

5 Oblast techniky

Vynález se týká způsobu eliminace 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu a 5-ethynyluridinu jako antigenů rozeznávaných protilátkami, reagujícími s uvedenými molekulami. Příkladem takových protilátek, které reagují s molekulou 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu nebo 5-ethynyluridinu, jsou některé
10 protilátky rozeznávající analogy thymidinu, jako 5-brom-2'-deoxyuridin, 5-chlor-2'-deoxyuridin, 5-jod-2'-deoxyuridin, 5-bromuridin nebo 5-fluoruridin. Tento přístup dovolu je cíleně eliminovat antigenní vlastnosti 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu a 5-ethynyluridinu, které by komplikovaly například detekci replikované DNA nebo nově syntetizované RNA.

15

Dosavadní stav techniky

Použití systémů, založených na reakci nukleosidů v DNA nebo RNA se specifickými protilátkami, je běžné jak v základním, tak aplikovaném výzkumu. Příkladem takto používaných nukleosidů jsou 5-brom-2'-deoxyuridin (BrdU), 5-chlor-2'-deoxyuridin (CldU), 5-jod-2'-deoxyuridin (IdU), 5-bromuridin (BrU) nebo 5-fluoruridin (FU). Jejich použití dovolu je např. rychlou analýzu buněčných populací z hlediska jejich proliferační aktivity. Další využití uvedených systémů zahrnuje izolace fragmentů DNA značených modifikovanými nukleosidy. Své uplatnění mají i ve výzkumu DNA replikace a transkripce. Jednou z nových metod, používaných právě pro
20 detekci replikované DNA nebo nově syntetizované RNA, je použití 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu (EdU) a 5-ethynyluridinu (EU) a jejich následná detekce pomocí tzv. click reakce (Jao and Salic, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008, 105, 15779 až 15784; Salic and Mitchison, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008, 105, 2415 až 2420; Chehrehas et al., Journal of Neuroscience Methods 2009, 177, 122 až 130). Ta spočívá v reakci alkynu s azidoderivátem fluorochromu nebo biotinu nebo digoxigeninu či jiné relativně velké molekuly, která později slouží k detekci EdU v prostředí jed-
30 nomocných iontů mědi. K azidům mohou být případně připojeny i jiné molekuly, které slouží jako značky. Příkladem je BrdU-azid (Cappella P. et al., Cytometry 2008, 73, 626 až 63), který se detekuje pomocí anti-BrdU protilátky bez potřeby použití HCl pro denaturaci DNA.

Současná detekce BrdU (alternativně i CldU nebo IdU) pomocí protilátek a EdU prostřednictvím azidovaných fluorochromů, případně např. azidovaného biotinu, digoxigeninu nebo jiné relativně velké molekuly, která později slouží k detekci EdU, je však podle našich zjištění komplikována několika skutečnostmi. Tyto skutečnosti komplikují i současnou detekci BrU nebo FU a EU. Hlavní nevýhodou je fakt, že jak EdU, tak i EU jsou zpravidla rozeznávány protilátkami, které
40 reagují se strukturně podobnými molekulami, jakými jsou právě BrdU, CldU, IdU, BrU nebo FU. Jednou z výjimek je klon MoBu-1 (Bradford and Clarke, Current Protocols in Cytometry, 2011, 55, chapter, 7, unit 7.38). Navíc při click reakci, v níž reagují EdU v DNA nebo EU v RNA s velkými azidovanými molekulami, reagují tyto azidované molekuly jen s částí molekul EdU nebo EU, pravděpodobně ze sterických důvodů. Velká část EdU nebo EU tak zůstává v DNA nebo
45 RNA neoznačena a může reagovat s protilátkami, pro které je důležitá oblast v okolí polohy 5 uracilové části molekuly EdU nebo EU. Po reakci s azidovanou molekulou je však tato oblast pro protilátku nedostupná. Ačkoli podle našich výsledků lze molekuly inkorporovaného EdU přeměnit na 5-acetyl-2'-deoxyuridin (AdU) pomocí koncentrovaných roztoků kyselin, tento krok s sebou přináší jen částečné řešení uvedeného problému. Pro úplnou přeměnu je nutné použít vysoce
50 koncentrované kyseliny, což vede ve svém důsledku k rozsáhlému poškození buněčné struktury. Navíc řada protilátek proti BrdU, CldU a IdU současně rozeznává i AdU. V případě EU pak nelze tento přístup použít vůbec, neboť použitím koncentrovaných kyselin dojde k celkové degradaci RNA.

Podstata vynálezu

Podle tohoto vynálezu je řešením výše zmíněných problémů použití malých azidovaných ne-
 5 fluoreskujících molekul, které vzhledem ke svým rozměrům reagují s inkorporovaným EdU nebo
 EU daleko účinněji než relativně velké molekuly azidovaných fluorochromů, případně např. azi-
 dovaného biotinu, digoxigeninu nebo jiné relativně velké molekuly běžně používaných k detek-
 cím EdU/EU. Nespornou výhodou navrhovaných molekul je rovněž skutečnost, že nefluoreskují
 10 a tudíž jejich případná vazba na DNA, RNA nebo proteiny nevede ke zvýšení pozadí. Použít lze
 tyto malé molekuly: azidomethylfenylsulfid, 2-azidoethanol, azidomethylbenzylsulfid, azido-
 methylmethylsulfid, 3-azido-1,2-propandiol, 1,3-diazido-2-propanol, 3-azido-2-propanol, 3-
 azidopropanol, 1,3-diazidopropan, 1,2-diazidoethan, 2-(2-azidoethoxy)ethanol, 8-azido-3,6-
 15 dioxaoctanol, 11-azido-3,6,9-trioxaundekanol, 2-azidoethylamin, 3-azidopropylamin, 4-azido-
 butylamin, 5-azidopentylamin, 6-azidoethylamin, 2-(2-azidoethoxy)ethylamin, 8-azido-3,6-
 dioxaoctylamin, 11-azido-3,6,9-trioxaundecylamin, N-(2-azidoethyl)dimethylamin, N-(3-
 azidopropyl)dimethylamin, N-(4-azidobutyl)dimethylamin, N-(5-azidopentyl)dimethylamin, N-
 (6-azidoethyl)dimethylamin, N-(5-azido-3-oxapentyl)dimethylamin, N-(8-azido-3,6-dioxa-
 20 oktyl)dimethylamin, N-(11-azido-3,6,9-trioxaundecyl)dimethylamin, dále chloridy, bromidy,
 jodidy, sulfáty, chloristany, tosyláty, mesyláty, nitráty, tetrafluorboráty a hexafluorfosfáty, N-(2-
 azidoethyl)trimethylamonia, N-(3-azidopropyl)trimethylamonia, N-(4-azidobutyl)trimethyl-
 amonia, N-(5-azidopentyl)trimethylamonia, N-(6-azidoethyl)trimethylamonia, N-(5-azido-3-
 oxapentyl)trimethylamonia, N-(8-azido-3,6-dioxaoctyl)trimethylamonia či N-(11-azido-3,6,9-
 25 trioxaundecyl)trimethylamonia, nebo jejich kombinaci. Při eliminaci nezreagovaného EdU/EU se
 využije rovněž princip click reakce, při němž reakce mezi terminálním ethynylem molekuly EdU
 (EU) a azidoskupinou malé molekuly probíhá v prostředí obsahující měďné ionty. Je to stejný
 princip, jaký se využívá i při detekcích EdU v DNA nebo EU v RNA. Reakce s malou nefluores-
 kující azidovanou molekulou se provede až po reakci s azidovanou molekulou s fluorochromem
 nebo s biotinem či digoxigeninem nebo s jinou relativně velkou molekulou, která později slouží
 30 k detekci EdU. Tento přístup umožňuje účinně eliminovat antigenní vlastnosti EdU (EU) vůči
 protilátkám, které by jinak s těmito molekulami reagovaly. Jedná se o protilátky, pro jejichž
 vazbu na uvedené molekuly analogů thymidinu je důležitá jejich modifikace v pozici 5, tedy
 protilátky specificky reagující např. s BrdU, CldU, IdU nebo BrU, případně FU.

Podstatou předkládaného vynálezu je tedy způsob eliminace 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu a 5-
 35 ethynyluridinu jako antigenů, rozeznávaných protilátkami reagujícími s uvedenými molekulami
 při detekci nukleových kyselin, vyznačující se tím, že vzorky obsahující DNA s inkorporovaným
 5-ethynyl-2'-deoxyuridem nebo RNA s inkorporovaným 5-ethynyluridem se ve vodných
 roztocích obsahujících měďné ionty inkubují s malou azidovanou nefluoreskující sloučeninou
 40 zvolenou ze skupiny, zahrnující azidomethylfenylsulfid, 2-azidoethanol, azidomethylbenzyl-
 sulfid, azidomethylmethylsulfid, 3-azido-1,2-propandiol, 1,3-diazido-2-propanol, 3-azido-2-
 propanol, 3-azidopropanol, 1,3-diazidopropan, 1,2-diazidoethan, 2-(2-azidoethoxy)ethanol, 8-
 azido-3,6-dioxaoctanol, 11-azido-3,6,9-trioxaundekanol, 2-azidoethylamin, 3-azidopropyl-
 amin, 4-azidobutylamin, 5-azidopentylamin, 6-azidoethylamin, 2-(2-azidoethoxy)ethylamin,
 8-azido-3,6-dioxaoctylamin, 11-azido-3,6,9-trioxaundecylamin, N-(2-azidoethyl)dimethyl-
 45 amin, N-(3-azidopropyl)dimethylamin, N-(4-azidobutyl)dimethylamin, N-(5-azidopentyl)di-
 methylamin, N-(6-azidoethyl)dimethylamin, N-(5-azido-3-oxapentyl)dimethylamin, N-(8-
 azido-3,6-dioxaoctyl)dimethylamin, N-(11-azido-3,6,9-trioxaundecyl)dimethylamin, dále
 chloridy, bromidy, jodidy, sulfáty, chloristany, tosyláty, mesyláty, nitráty, tetrafluorboráty
 a hexafluorfosfáty, N-(2-azidoethyl)trimethylamonia, N-(3-azidopropyl)trimethylamonia, N-
 50 (4-azidobutyl)trimethylamonia, N-(5-azidopentyl)trimethylamonia, N-(6-azidoethyl)trimethyl-
 amonia, N-(5-azido-3-oxapentyl)trimethylamonia, N-(8-azido-3,6-dioxaoctyl)trimethyl-
 amonia či N-(11-azido-3,6,9-trioxaundecyl)trimethylamonia, nebo jejich kombinace, čímž se
 účinně blokuje interakce 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu nebo 5-ethynyluridinu s protilátkami namí-
 řenými proti strukturně podobným molekulám.

Význakem uvedeného způsobu eliminace 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu a 5-ethynyluridinu jako antigenů, rozeznávaných protilátkami reagujícími s uvedenými molekulami při detekci nukleových kyselin je skutečnost, že reakce s malou nefluoreskující azidovanou molekulou se provede mezi dvěma reakcemi, běžně používanými při detekci nukleových kyselin, tedy následně po reakci nukleových kyselin s azidovanou molekulou s fluorochromem nebo biotinem či digoxigeninem případně jinou relativně velkou molekulou, která později slouží k detekci EdU a před reakcí specifických protilátek vůči nukleosidům obsaženým v detekovaných nukleových kyselinách.

Využití uvedeného přístupu lze předpokládat při současné lokalizaci BrdU (alternativně i CldU nebo IdU) s EdU nebo BrU či FU s EU, případně EdU nebo EU s dalšími nukleosidy, při jejichž detekci bude nutné potlačit schopnost protilátek rozeznávat EdU nebo EU. Předkládaný vynález bude tedy nejprůnosnější při výrobě sad dodávaných pro základní výzkum, jako např. sady pro detekci replikované DNA nebo nově syntetizované RNA. Nespornou výhodou tohoto vynálezu je možnost použití širokého spektra protilátek proti BrdU, CldU, IdU, FU nebo BrU a případně i dalších nukleosidů bez potřeby selekce těch protilátek, které nevykazují afinitu vůči EdU nebo EU či AdU.

Autorům přihlášky není známo, že by tento přístup byl někdy použit pro eliminaci EdU nebo EU jako antigenu, který reaguje s protilátkami, které rozeznávají tyto molekuly.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1. Detekce EdU pomocí protilátky namířené proti BrdU bez použití popsaného vynálezu pro eliminaci EdU.

a) Detekce EdU pomocí azidovaného fluorochromu

b) Detekce EdU pomocí protilátky

Obr. 2. Detekce EdU pomocí protilátky, namířené proti BrdU, po použití předloženého vynálezu k eliminaci EdU.

a) Detekce EdU pomocí azidovaného fluorochromu

b) Detekce EdU pomocí protilátky

Příklady provedení vynálezu

HeLa	buněčná linie lidských epiteliálních buněk
DMEM	Dulbeccova modifikace Eaglova média
PBS	fosfátem pufrovaný fyziologický roztok
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
CldU	5-chloro-2'-deoxyuridin
IdU	5-jodo-2'-deoxyuridin
FU	5-fluoruridin
BrU	5-bromuridin
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridin
EU	5-ethynyluridin
S-MEM	modifikace Eaglova minimálního média pro suspenzní buňky

Příklad 1

5 Eliminace EdU jako antigenu v buňkách přisedlých na podložní skla pomocí nefluoreskujících azidovaných látek.

10 Následující postup popisuje eliminaci EdU jako antigenu v HeLa buňkách přisedlých na podložních sklíčkách, ve kterých se provádí současná lokalizace EdU s BrdU, CldU nebo IdU, anebo v buňkách, ve kterých se provádí eliminace EdU v DNA bez inkorporovaného BrdU, CldU nebo IdU. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

15 A) Lidské HeLa buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v Petriho miskách na kruhových sklech o průměru 13 mm v růstovém médiu DMEM s L-glutaminem, doplněném 10% (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1% (obj./obj.) gentamicinem a 0,85 g/l NaHCO₃ v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C.

20 B) Druhý den po pasáži byl do růstového média přidán EdU v konečné koncentraci 2 μmol.l⁻¹. Vzorky byly inkubovány 10 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Dále následoval krok C. Alternativně bylo růstové médium obsahující EdU odstraněno a nahrazeno stejným množstvím média stejného složení bez EdU. Vzorky byly inkubovány 3 hodiny v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Po třech hodinách byl do média přidán BrdU v konečné koncentraci 2 μmol.l⁻¹. Vzorky byly inkubovány 10 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Namísto BrdU byl alternativně do růstového média přidán CldU nebo IdU ve stejné koncentraci jako BrdU. Pak následoval krok C.

C) Následně bylo růstové médium odstraněno a nahrazeno pufrém (1x PBS, složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 1 až 2 ml pufru na 4 cm² plochy).

30 D) Pufr byl odstraněn a vzorky byly 10 minut fixovány 2% (hmotnost/obj.) roztokem formaldehydu v 1x PBS (pH 7,4; 1 až 2 ml fixačního roztoku na 4 cm² plochy).

35 Alternativně byly vzorky fixovány methanolem a následně acetonem. V tomto případě byla skla se vzorky nejdříve inkubována 10 minut v methanolu při teplotě -20 °C (přibližně 1 až 2 ml methanolu na 4 cm² plochy) a následně ponořena na 30 sekund do kádinky s 50 ml acetonu o teplotě místnosti; skla se vzorky pak byla usušena a po usušení vložena do Petriho misky s 1x PBS. V případě použití methanolu a acetonu následoval krok G).

40 E) Roztok formaldehydu byl odstraněn a vzorky byly převrstveny 1x PBS (přibližně 1 až 2 ml 1x PBS na 4 cm² plochy). Po 5 minutách byl pufr odstraněn a nahrazen novým o stejném složení. Tento krok byl opakován ještě jednou.

45 F) Následně byl pufr odstraněn. Vzorky byly 10 minut permeabilizovány 0,2% (obj./obj.) roztokem Tritonu X-100 v 1x PBS (přibližně 1 až 2 ml permeabilizačního roztoku na 4 cm² plochy). Po odstranění permeabilizačního roztoku byly vzorky převrstveny 1x PBS (přibližně 1 až 2 ml 1x PBS na 4 cm² kultivační plochy).

G) Po 5 minutách byl roztok 1x PBS odstraněn a nahrazen stejným množstvím téhož roztoku. Tento krok byl opakován ještě jednou.

50 H) Z misek byl odstraněn roztok 1x PBS, vzorky byly převrstveny stejným množstvím 0,5x PBS, po 1 minutě byl roztok 0,5x PBS odstraněn a nahrazen stejným množstvím 0,25x PBS. Nakonec byl uvedený roztok ze vzorků odstraněn a vzorky byly převrstveny destilovanou vodou (přibližně 1 až 2 ml vody na 4 cm² kultivační plochy). Po 5 minutách byla voda odstraněna a nahrazena stejným množstvím destilované vody. Pak byla skla se vzorky vyjmuta pomocí pinzety

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

5 I) Následně byl přebytek vody ze vzorků odsát pomocí filtračního papíru tak, že byl filtrační papír jemně přiložen k hraně skla a skla se vzorky byla přemístěna na 50 µl kapku inkubačního roztoku 1 s azidovanou značící látkou (IR-1; složení roztoku je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie) a inkubována 30 minut.

10 J) Po inkubaci byly vzorky přeneseny na kapku destilované vody (50 µl). Po 5 minutách byly vzorky přeneseny na novou stejně velkou kapku destilované vody. Tento krok byl opakován ještě jednou.

15 K) Bod K byl alternativně proveden podle popisu v bodu K 1 nebo K 2 pro vzorky značené EdU a BrdU (nebo CldU nebo IdU), nebo podle popisu v bodu K 3 pro vzorky značené výhradně EdU.

K 1

20 a) Následně byl přebytek vody ze vzorků odsát pomocí filtračního papíru tak, že byl filtrační papír jemně přiložen k hraně skla a skla se vzorky byla přemístěna do inkubačního roztoku 2 v Petriho misce (IR-2; 1,5 ml roztoku na 9 cm² plochy, složení inkubačního roztoku je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie). Alternativně byla Petriho miska zcela zaplněna IR-2. Tím došlo k minimalizaci provzdušňování směsi. V dalším případě byla plná Petriho miska po uzavře-
25 ní utěsněna omotáním parafilmem po celém obvodu, nebo byla směs po dobu inkubace probublá-
vána dusíkem. Skla byla umístěna do Petriho misek tak, že směřovala vzorky nahoru do roztoku.

b) Petriho misky se vzorky na sklech byly přemístěny na třepačku (PS-M3D, Grant-Bio) a zde byly inkubovány alternativně po dobu 10 nebo 30 minut při rychlosti 30 otáček/minutu.

30 c) Inkubační roztok byl odstraněn a vzorky byly převrstveny destilovanou vodou (přibližně 1 až 2 ml vody na 4 cm² plochy). Po jedné minutě byla voda odstraněna a nahrazena stejným množstvím vody. Tento krok byl opakován ještě jednou.

35 d) Voda byla odstraněna a nahrazena vymývacím roztokem (1,5 ml roztoku na 9 cm² plochy). Složení vymývacího roztoku je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie. Petriho misky se vzorky na sklech byly přemístěny na třepačku a zde byly inkubovány do odbarvení, minimálně ale 30 minut, nebo v případě nezabarvených vzorků 30 minut. V průběhu vymývání byla skla
40 vždy po 10 minutách nadzvednuta pinzetou tak, aby došlo k vymytí prostoru pod skly a rovněž
spodní strany skla. Skla byla v průběhu nadzvedávání zcela ponořena v roztoku.

e) Vymývací roztok byl odstraněn a vzorky byly převrstveny destilovanou vodou (přibližně 1 až 2 ml vody na 4 cm² plochy). Po 2 minutách byla voda odstraněna a nahrazena stejným množst-
vím vody. Tento krok byl opakován ještě jednou.

45 f) Následně byly alternativně provedeny kroky I) nebo II) po kterých pak následoval bod L.

I)

50 Z misek byla odstraněna voda, vzorky byly převrstveny stejným množstvím 100 mmol.l⁻¹ Tris-Cl (pH 7,4), po jedné minutě byl roztok odstraněn a nahrazen stejným množstvím roztoku stejného složení. Tento krok byl ještě třikrát opakován. Dále byla skla se vzorky vyjmuta pomocí pinzety z Petriho misky a přebytek pufru byl odsát pomocí filtračního papíru tak, že skla se vzorky byla položena stranou bez vzorků na filtrační papír. Skla se vzorky byla položena na kapky

100 mmol.l⁻¹ Tris-Cl (pH 7,4) na parafinu (50 µl/kapka). Skla směřovala vrstvou se vzorky směrem dolů do kapky.

II)

5

Skla se vzorky byla vyjmuta pomocí pinzety z Petriho misky a přebytek vody byl odsát pomocí filtračního papíru tak, že skla byla položena stranou bez vzorků na filtrační papír. Skla se vzorky pak byla položena na kapky destilované vody na parafilmu (50 µl/kapka). Skla směřovala vrstvou se vzorky směrem dolů do kapky vody. Vzorky pak byly inkubovány 30 minut s exonukleázou III (složení roztoku je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie) na kapkách o velikosti 20 µl. Následně byla skla se vzorky přenesena na kapku 100 mmol.l⁻¹ Tris-Cl (pH 7,4, 50 µl). Po 2 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku roztoku stejného složení. Tento krok byl ještě třikrát opakován.

10

15 K 2

a) Následně byl přebytek vody ze vzorků odsát pomocí filtračního papíru tak, že filtrační papír byl jemně přiložen k hraně skla a skla se vzorky byla přemístěna do Petriho misek se 4 mol.l⁻¹ kyselinou chlorovodíkovou nebo 0,07 mol.l⁻¹ hydroxidem sodným (přibližně 1 až 2 ml roztoku kyseliny nebo hydroxidu na 4 cm² plochy), přičemž strana se vzorky směřovala nahoru do roztoku. Vzorky v kyselině chlorovodíkové byly inkubovány 20 minut při teplotě 25 °C. Vzorky v hydroxidu sodném byly inkubovány 3 minuty při teplotě 25 °C.

20

b) Z misek byl odstraněn roztok kyseliny nebo hydroxidu, vzorky byly převrstveny stejným množstvím 100 mmol.l⁻¹ Tris-Cl (pH 7,4), po 1 minutě byl roztok nahrazen stejným množstvím roztoku stejného složení a tento krok ještě třikrát opakován.

25

c) Skla se vzorky pak byla vyjmuta pomocí pinzety z Petriho misky a přebytek roztoku byl odsát pomocí filtračního papíru tak, že skla se vzorky byla položena stranou bez vzorků na filtrační papír. Poté byla skla se vzorky položena na kapky 100 mmol.l⁻¹ Tris-Cl (pH 7,4; 50 µl) na parafilmu. Skla směřovala se vzorky směrem dolů do kapky vody.

30

K 3

35 V případě vzorků značených jenom EdU následoval po bodu J okamžitě bod L.

L) Následně byl přebytek vody ze vzorků odsát pomocí filtračního papíru tak, že byl filtrační papír jemně přiložen k hraně skla a skla se vzorky byla poté přemístěna na kapku (50 µl) inkubačního roztoku 3 (IR-3; složení roztoku je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie) a inkubovány alternativně 1 minutu, 30 minut nebo 3 hodiny.

40

M) Po inkubaci byly vzorky přeneseny na kapku 100 mmol.l⁻¹ Tris-Cl (pH 7,4, 50 µl) a inkubovány 10 minut. Tento krok byl opakován ještě dvakrát.

45

Příklad 2

Eliminace EdU jako antigenu pomocí nefluoreskujících azidovaných látek v tkáních.

50

Následující postup popisuje eliminaci EdU v jaterní tkáni třídenních potkanů, ve které se provádí současná lokalizace EdU s BrdU, CldU nebo IdU, nebo v tkáni, ve které se provádí eliminace EdU v DNA bez inkorporovaného BrdU, CldU nebo IdU. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

A) Třídenní potkání samci byli usmrceni dekapitací a následně jim byla vyjmuta játra. Játra byla nakrájena na malé kousky (3 mm – nejdelší rozměr) a položena do Petriho misek s HeLa buňkami inkubovanými jeden den v růstovém médiu DMEM s L-glutaminem, doplněném 10% (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1% (obj./obj.) gentamicinem a 0.85 g/l NaHCO₃.

B) Do růstového média byl přidán EdU v konečné koncentraci 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Vzorky byly inkubovány 10 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Dále následoval krok C. Alternativně bylo růstové médium obsahující EdU odstraněno a nahrazeno stejným množstvím média stejného složení bez EdU. Kousky jater byly inkubovány 3 hodiny v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Po třech hodinách byl do média přidán BrdU v konečné koncentraci 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Kousky jater byly inkubovány 10 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Alternativně byl do růstového média namísto BrdU přidán CldU nebo IdU ve stejné koncentraci jako BrdU. Pak následoval krok C.

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

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

E) V dalších krocích bylo postupováno dle kroků uvedených v Příkladu 1 (D–M).

Příklad 3

Eliminace EdU jako antigenu pomocí nefluoreskujících azidovaných látek v suspenzních buňkách.

Následující postup popisuje eliminaci EdU v suspenzních HeLa S3 buňkách, u kterých se EdU lokalizuje současně s BrdU, CldU nebo IdU, nebo v buňkách, v nichž se provádí eliminace EdU v DNA bez inkorporovaného BrdU, CldU nebo IdU. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

A) Lidské HeLa S3 buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v kultivačních lahvích (objem lahvi byl 50 ml), které byly třepány, v růstovém médiu S–MEM (modifikace Eaglova minimálního média pro suspenzní buňky, Sigma) s 2 mmol.l⁻¹ L-glutaminem a s 10% (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1% (obj./obj.) gentamicinem a 0,22% (hmotnost/obj.) NaHCO₃ v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Buněčná suspenze obsahovala přibližně 5 až 8 x 10⁵ buněk na 1 mililitr.

B) Druhý den po pasáži byl do růstového média přidán EdU v konečné koncentraci 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Vzorky byly inkubovány 10 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C.

C) Následně byla suspenze buněk přenesena do 15mililitrové centrifugační zkumavky a vzorky byly odstředovány 1 minutu při 180 g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 μl média) a ke vzorkům bylo přidáno nové médium (10 ml). Vzorky byly rozsuspendovány a následně opět odstředovány 1 minutu při 180 g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 μl média) a k peletu vzorků bylo přidáno 10 ml nového média. Pelet vzorků byl rozsuspendován. Dále následoval buď bod E), nebo byly vzorky inkubovány 3 hodiny v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C a následoval bod D).

D) Po třech hodinách byl do růstového média přidán BrdU v konečné koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Vzorky byly inkubovány 10 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO_2 při 37°C . Alternativně byl do růstového média namísto BrdU přidán CldU nebo IdU ve stejné koncentraci jako BrdU. Následně byly vzorky odstředovány 1 minutu při 180 g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 μl média) a ke vzorkům bylo přidáno nové médium (10 ml). Vzorky byly rozsuspendovány a následně opět odstředovány 1 minutu při 180 g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 μl média) a k peletu vzorků bylo přidáno 10 ml nového média. Pelet vzorků byl rozsuspendován.

E) Vzorky byly rozsuspendovány a následně opět odstředovány 1 minutu při 180 g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 μl média) a k peletu vzorků byl přidán 1 ml nového média. Pelet vzorků byl rozsuspendován. 50 μl kapka suspenze buněk byla přenesena na kruhová skla o průměru 13 mm, potažené vrstvou poly-L-lysinu (způsob přípravy těchto skel je popsán v části Použité roztoky a chemikálie). Po 2 minutách byl přebytek média odsát pomocí filtračního papíru tak, že byl filtrační papír jemně přiložen k hraně skla. Skla byla položena do 2% (hmotnost/obj.) roztoku formaldehydu v Petriho misce a skla se vzorky byla fixována 10 minut. Skla byla umístěna do Petriho misek tak, že směřovala vzorky nahoru do roztoku.

F) V dalších krocích bylo postupováno podle bodů E–M příkladu 1.

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

Příklad 4

Eliminace EdU jako antigenu pomocí nefluoreskujících azidovaných látek v buňkách přisedlých na podložní skla, suspenzních buňkách a tkáních před inkubací, zpřístupňující pyrimidinové nukleosidy.

Následující postup popisuje alternativní eliminaci EdU jako antigenu v HeLa buňkách přisedlých na podložních sklíčkách, suspenzních HeLa S3 buňkách nebo v jaterní tkáni třídenních potkanů, u kterých se EdU lokalizuje současně s BrdU, CldU nebo IdU, anebo v buňkách, v nichž se eliminuje EdU v DNA bez inkorporovaného BrdU, CldU nebo IdU. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti a následovaly po sobě bez dalších prodlev.

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

Po bodu J příkladu 1 následovala nejdříve inkubace vzorků v IR–3 podle bodu L příkladu 1: Nejprve byl přebytek vody ze vzorků odsát pomocí filtračního papíru tak, že byl filtrační papír jemně přiložen k hraně skla a skla se vzorky byla přemístěna na kapku (50 μl) IR–3 (složení roztoku je uvedeno v části Použité roztoky a chemikálie). Vzorky zde byly inkubovány alternativně 1 minutu, 30 minut nebo 3 hodiny. Po inkubaci byly vzorky přeneseny na kapku destilované vody (50 μl). Po 5 minutách byly vzorky přeneseny na novou stejně velkou kapku destilované vody. Tento krok byl opakován ještě jednou. Pak následoval bod K a po něm bod M podle příkladu 1.

Příklad 5

5 Eliminace EU jako antigenu pomocí nefluoreskujících azidovaných látek v buňkách přisedlých na podložní skla, suspenzních buňkách a tkáních.

Následující postup popisuje eliminaci EU jako antigenu v HeLa buňkách přisedlých na podložních sklíčkách, suspenzních HeLa S3 buňkách nebo v jaterní tkáni třídenních potkanů, u kterých se EU lokalizuje současně s BrU, případně FU, anebo v buňkách, v nichž se eliminuje EU v DNA
10 bez inkorporovaného BrU nebo FU. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

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

15 Vzorky byly místo s EdU inkubovány s EU, a to v konečné koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vzorky byly stejně jako v případě EdU inkubovány 10 minut. Vzorky nebyly inkubovány s BrdU, CldU nebo IdU, ale byly inkubovány s BrU nebo FU v koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Byl zcela vynechán bod K.

20 Alternativně jsme použili postup popsáný v příkladu 4. V tomto případě byly vzorky rovněž místo s EdU inkubovány s EU, a to v konečné koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vzorky byly stejně jako v případě EdU inkubovány 10 minut. Vzorky nebyly inkubovány s BrdU, CldU nebo IdU, ale byly inkubovány s BrU nebo FU v koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

25 Byl zcela vynechán bod K.

Použité roztoky a chemikálie:

30 1. Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS)

10x PBS (desetinásobně koncentrovaný roztok PBS):

1,4 mol.l⁻¹ NaCl
26 mmol.l⁻¹ KCl
35 90 mmol.l⁻¹ Na₂HPO₄
14 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄

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

40 1x PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok v obvyklé koncentraci)
0,5x PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok v poloviční koncentraci)
0,25x PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok ve čtvrtinové koncentraci)

2. Inkubační roztok 1 (IR-1):

45

A.

a. Destilovaná voda

b. 100 mmol.l⁻¹ Tris-Cl, pH 7,4

50 c. 10 mmol.l⁻¹ askorbát sodný

- d. 4 mmol.l⁻¹ síran měďnatý
- e. 20 μmol.l⁻¹ tetramethylrhodamin–azid (TAMRA–azid)

5 Zmíněné složky IR byly přidávány v uvedeném pořadí.

B.

- f. Destilovaná voda
- 10 g. 100 mmol.l⁻¹ Tris–Cl, pH 7,4
- h. 10 mmol.l⁻¹ askorbát sodný
- i. 4 mmol.l⁻¹ síran měďnatý
- j. 20 μmol.l⁻¹ biotin–azid

15 Zmíněné složky IR byly přidávány v uvedeném pořadí.

2. *Inkubační roztok 2 (IR–2):*

- a. Destilovaná voda
- 20 b. 10 mmol.l⁻¹ askorbát sodný
- c. 4 mmol.l⁻¹ síran měďnatý

Zmíněné složky IR byly přidávány v uvedeném pořadí.

25 3. *Inkubační roztok 3 (IR–3):*

- a. Destilovaná voda
- b. 100 mmol.l⁻¹ Tris–Cl, pH 7,4
- c. 10 mmol.l⁻¹ askorbát sodný
- 30 d. 4 mmol.l⁻¹ síran měďnatý
- e. Alternativně 0,001; 2 nebo 100 mmol.l⁻¹ azidomethylfenylsulfid

Zmíněné složky IR byly přidávány v uvedeném pořadí.

35 Alternativně byl namísto azidomethylfenylsulfidu použit 2–azidoethanol, azidomethylbenzylsulfid, azidomethylmethylsulfid, 3–azido–1,2–propandiol, 1,3–diazido–2–propanol, 3–azido–2–propanol, 3–azidopropanol, 1,3–diazidopropan, 1,2–diazidoethan, 2–(2–azidoethoxy)ethanol, 8–azido–3,6–dioxaoctanol, 11–azido–3,6,9–trioxaundekanol, 2–azidoethylamin, 3–azidopropylamin, 4–azidobutylamin, 5–azidopentylamin, 6–azidohexylamin, 2–(2–azidoethoxy)ethylamin, 40 8–azido–3,6–dioxaoctylamin, 11–azido–3,6,9–trioxaundecylamin, N–(2–azidoethyl)dimethylamin, N–(3–azidopropyl)dimethylamin, N–(4–azidobutyl)dimethylamin, N–(5–azidopentyl)dimethylamin, N–(6–azidohexyl)dimethylamin, N–(5–azido–3–oxapentyl)dimethylamin, N–(8–azido–3,6–dioxaoctyl)dimethylamin, N–(11–azido–3,6,9–trioxaundecyl)dimethylamin, dále chloridy, bromidy, jodidy, sulfáty, chloristany, tosyláty, mesyláty, nitráty, tetrafluorboráty a hexafluorfosfáty, N–(2–azidoethyl)trimethylamonia, N–(3–azidopropyl)trimethylamonia, N–(4–azidobutyl)trimethylamonia, N–(5–azidopentyl)trimethylamonia, N–(6–azidohexyl)trimethylamonia, N–(5–azido–3–oxapentyl)trimethylamonia, N–(8–azido–3,6–dioxaoctyl)trimethylamonia či N–(11–azido–3,6,9–trioxaundecyl)trimethylamonia ve stejné koncentraci jako azidomethylfenylsulfid, nebo byla použita kombinace uvedených látek.

4. *Vymývací roztok:*

- a. 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,4
- b. 100 mmol.l⁻¹ NaCl

5. *Roztok exonukleázy III:*

- a) Destilovaná voda

b) 1x pufr pro exonukleázu III (Fermentas, 2 µl 10x koncentrovaného pufru do 20 µl směsi), tento pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný. Složení 10x koncentrovaného pufru je následující: 660 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0 při 30 °C), 6,6 mmol.l⁻¹ MgCl₂.

- c) 1U/µl Exonukleáza III (Fermentas)

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

6. *Příprava polylysinových skel pro ukotvení suspenzních buněk*

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

Průmyslová využitelnost

Způsob eliminace EdU a EU jako antigenu rozeznávaného protilátkami reagujícími s uvedenými molekulami je využitelný v případech, kdy je nutné provádět několikanásobné detekce pomocí protilátek namířených proti strukturně podobné, současně detekované molekule. Jedná se např. o současnou lokalizaci BrdU a EdU nebo BrU a EU. V této souvislosti je možné mimo jiné předpokládat včlenění této procedury a jednotlivých použitých látek do sad pro detekci DNA nebo RNA.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob eliminace 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu a 5-ethynyluridinu jako antigenů, rozeznávaných protilátkami reagujícími s uvedenými molekulami při detekci nukleových kyselin, vyznačující se tím, že vzorky obsahující deoxyribonukleovou kyselinu s inkorporovaným 5-ethynyl-2'-deoxyuridinem nebo ribonukleovou kyselinu s inkorporovaným 5-ethynyluridinem se ve vodných roztocích obsahujících měďné ionty inkubují s malou azidovanou ne fluoreskující sloučeninou zvolenou ze skupiny, zahrnující azidomethylfenylsulfid, 2-azidoethanol, azidomethylbenzylsulfid, azidomethylmethylsulfid, 3-azido-1,2-propandiol, 1,3-diazidoethanol, 3-azido-2-propanol, 3-azidopropanol, 1,3-diazidopropan, 1,2-diazidoethanol, 2-(2-azidoethoxy)ethanol, 8-azido-3,6-dioxaoktanol, 11-azido-3,6,9-trioxaundekanol, 2-azidoethylamin, 3-azidopropylamin, 4-azidobutylamin, 5-azidopentylamin, 6-azidohexylamin, 2-(2-azidoethoxy)ethylamin, 8-azido-3,6-dioxaoktylamin, 11-azido-3,6,9-trioxaundecylamin, N-(2-

azidoethyl)dimethylamin, N-(3-azidopropyl)dimethylamin, N-(4-azidobutyl)dimethylamin, N-(5-azidopentyl)dimethylamin, N-(6-azidoheptyl)dimethylamin, N-(5-azido-3-oxapentyl)dimethylamin, N-(8-azido-3,6-dioxaoctyl)dimethylamin, N-(11-azido-3,6,9-trioxaundecyl)dimethylamin, dále chloridy, bromidy, jodidy, sulfáty, chloristany, tosyláty, mesyláty, nitráty, tetrafluorboráty a hexafluorofosfáty, N-(2-azidoethyl)trimethylamonia, N-(3-azidopropyl)trimethylamonia, N-(4-azidobutyl)trimethylamonia, N-(5-azidopentyl)trimethylamonia, N-(6-azidoheptyl)trimethylamonia, N-(5-azido-3-oxapentyl)trimethylamonia, N-(8-azido-3,6-dioxaoctyl)trimethylamonia, N-(11-azido-3,6,9-trioxaundecyl)trimethylamonia nebo jejich kombinace, čímž se účinně blokuje interakce 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu nebo 5-ethynyluridinu s protilátkami namířenými proti strukturně podobným molekulám.

2. Způsob eliminace 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu a 5-ethynyluridinu jako antigenů, rozeznávaných protilátkami reagujícími s uvedenými molekulami při detekci nukleových kyselin podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že reakce s malou nefluoreskující azidovanou molekulou se provede mezi dvěma reakcemi, používanými při detekci nukleových kyselin, tedy

- následně po reakci nukleových kyselin s azidovanou molekulou nesoucí fluorochrom nebo biotin nebo digoxigenin nebo jinou relativně velkou molekulu, která později slouží k detekci EdU a
- před reakcí specifických protilátek vůči nukleosidům obsaženým v detekovaných nukleových kyselinách.

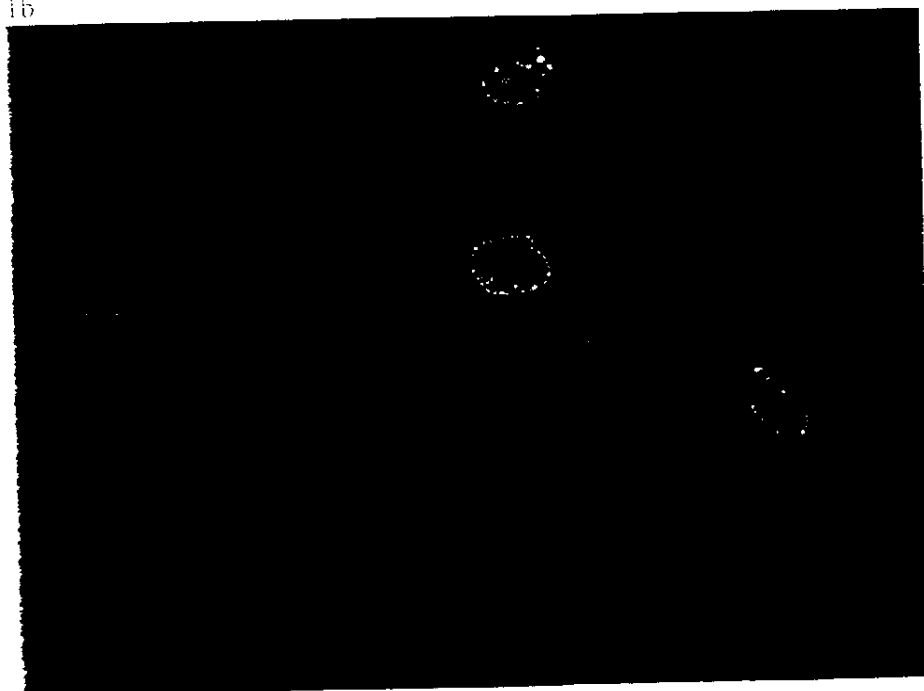
2 výkresy

Обр. 1

1а



1б

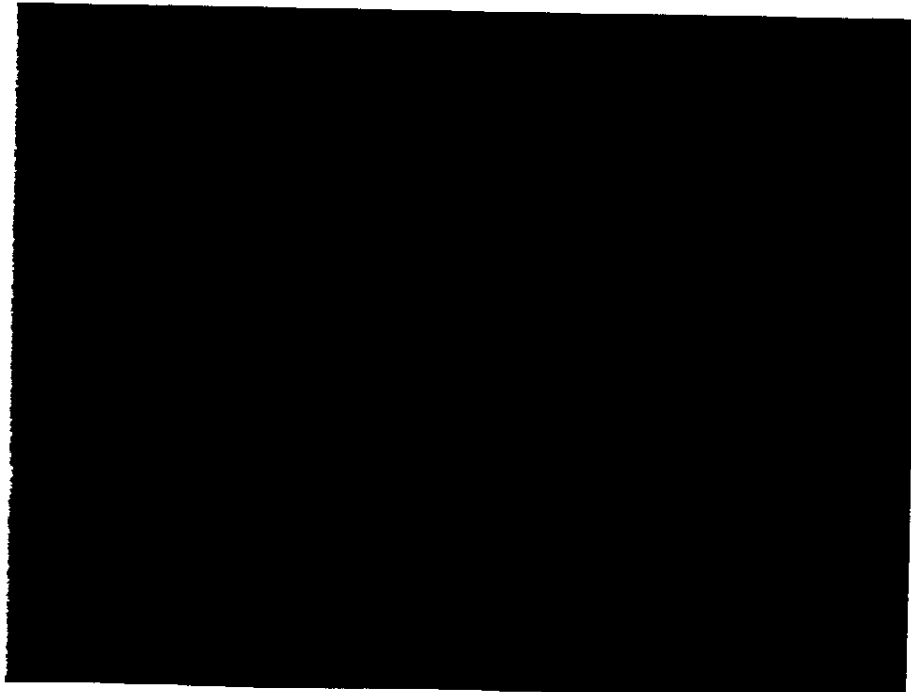


Obr. 2

2a



2b



Konec dokumentu