

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 016

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-183**
(22) Přihlášeno: **13.03.2015**
(40) Zveřejněno: **21.09.2016**
(Věstník č. 38/2016)
(47) Uděleno: **04.10.2017**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **15.11.2017**
(Věstník č. 46/2017)

(56) Relevantní dokumenty:
Anna Ligasová, et al: Atomic Scissors: A New Method of Tracking the 5-Bromo-2'-Deoxyuridine-Labeled DNA In Situ 2012 PLoS One, DOI: 10.1371/journal.pone.0052584; Složení vakcín: http://www.vakciny.net/principy_ockovani/pr_13.htm, 7.10.2013; Ivona Vychodilová: OPTIMALIZACE PROTILÁTEK PRO POUŽITÍ V CHROMATINOVÉ IMUNOPRECIPITACI, Bakalářská práce 2011. CZ 303 251 B6; CZ 303 252 B6.

(73) Majitel patentu:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ

(72) Původce:
RNDr. Karel Koberna, CSc., Velký Újezd, CZ
RNDr. Anna Ligasová, Ph.D., Velký Újezd, CZ

(54) Název vynálezu:
**Způsob stabilizace protilátek
rozeznávajících 5-bromo-2'-deoxyuridin
a/nebo 5-chloro-2'-deoxyuridin a/nebo 5-
jodo-2'-deoxyuridin v místech inkorporace
těchto nukleosidů do DNA po působení
jednomocnou mědi a/nebo exonukleázou III**

(57) Anotace:
Způsob dovoluje efektivně stabilizovat protilátky rozeznávající 5-bromo-2'-deoxyuridin a/nebo 5-chloro-2'-deoxyuridin a/nebo 5-jodo-2'-deoxyuridin v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů do DNA po působení jednomocnou mědi a/nebo exonukleázou III. Způsob spočívá v inkubaci vzorků, po působení jednomocnou mědi a/nebo exonukleázou III a inkubaci s protilátkou, v roztoku formaldehydu a je využitelný jak v případě, že jsou použity systémy založené na dvou protilátkách, tak systémy založené na protilátce konjugované s různými látkami např. fluorochromy.

CZ 307016 B6

Způsob stabilizace protilátek rozeznávajících 5-bromo-2'-deoxyuridin a/nebo 5-chloro-2'-deoxyuridin a/nebo 5-jodo-2'-deoxyuridin v místech inkorporace těchto nukleosidů do DNA po působení jednomocnou mědi a/nebo exonukleázou III

5

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu stabilizace protilátek rozeznávajících 5-bromo-2'-deoxyuridin a/nebo 5-chloro-2'-deoxyuridin a/nebo 5-jodo-2'-deoxyuridin ve dvouřetězcové DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů do DNA po působení jednomocnou mědi a/nebo exonukleázou III.

10

Dosavadní stav techniky

Použití systémů pro detekci značené DNA založených na reakci specifické protilátky a značících nukleosidů, které jsou součástí DNA, se specifickými protilátkami je běžné jak v základním, tak aplikovaném výzkumu. Nejčastějším příkladem takto používaných nukleosidů je 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), 5-chloro-2'-deoxyuridin (CldU) nebo 5-jodo-2'-deoxyuridin (IdU), dále jen "značené nukleosidy". Použití značených nukleosidů dovoluje např. rychlou analýzu buněčných populací z hlediska jejich proliferační aktivity.

20

Jelikož tyto specifické značící nukleosidy jsou ve struktuře dvouřetězcové DNA zpravidla nepřístupné pro reakci s protilátkou, jsou pro jejich zpřístupnění v buňkách a tkáních používány speciální kroky (např. *Genes Dev*, 14, 2855–2868; *J Cell Sci*, 115, 4037–4051; *PLoS One*, 7, e52584), které jsou naprosto klíčové pro následující detekce značené dvouřetězcové DNA. Příkladem těchto kroků je použití roztoků kyseliny chlorovodíkové (depurinace), hydroxidu sodného (rozvolnění struktury DNA v důsledku deprotonace nukleobází), použití DNázy I nebo směsi DNázy I a exonukleázy, použití jednomocných iontů mědi nebo kombinace jednomocných iontů mědi a následného použití exonukleázy. V závislosti na typu zpřístupnění a intenzitě působení dochází k menším nebo větším poškozením DNA a dalších buněčných struktur, přičemž systémy založené na enzymatickém přístupu, případně založené na působení mědi jsou především s ohledem na nižší stupeň poškození buněčné struktury výhodnější než systémy založené na působení kyseliny nebo hydroxidu.

30

35

Podstata vynálezu

Naše výsledky ukázaly, že veškeré systémy založené na působení mědi a/nebo na použití exonukleázy III jsou velice citlivé ke kvalitě použité protilátky. Obecně protilátky s nižší afinitou vůči značeným nukleosidům neposkytují dostatečný signál, případně je tento signál velice nestabilní a v průběhu času dochází k jeho ztrátě. Předkládaná přihláška vynálezu popisuje postup umožňující efektivní stabilizaci protilátek v místech inkorporace značených nukleosidů při použití systémů pro zpřístupnění značených nukleosidů pomocí měďných iontů a/nebo exonukleázy III. Systém je založen na inkubaci vzorku se značenými nukleosidy v buněčné DNA v roztoku obsahujícím formaldehyd. Tento krok je použit po ovlivnění buněk nebo tkání měďnými ionty a/nebo exonukleázou III a reakci s protilátkami rozeznávajícími BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU. Příklady provedení zahrnují jak případ, kdy je použit protilátkový systém založený na dvou protilátkách, kdy je v prvním kroku provedena reakce s tzv. primární protilátkou, která specificky rozeznává BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU (dále jen primární protilátka), následně je tato protilátka stabilizována v místě inkorporace značeného nukleosidů pomocí roztoku formaldehydu a pak je provedena reakce s druhou, tzv. sekundární protilátkou (dále jen sekundární protilátka), která specificky rozeznává primární protilátku, tak i případ, kdy je použita protilátka rozeznávající BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU a tato protilátka je konjugována s dalšími látkami např. typu fluorochromů nebo biotinu nebo dalšími látkami. Výsledky ukázaly, že stabilizační krok založený na inkubaci vzorků v roztoku formaldehydu zpravidla negativně neovlivňuje následnou reakci

50

55

primárních protilátek se sekundárními protilátkami a rovněž je plně slučitelný s detekcí pomocí protilátek konjugovaných s dalšími látkami např. typu fluorochromů nebo biotinu nebo dalšími látkami. Příklady provedení demonstrují, že přístup je využitelný ve všech situacích, kdy je použita jednomocná měď a/nebo exonukleáza III jako součást protokolu pro odhalení značených nukleosidů v buněčné DNA. To zahrnuje veškeré případy, kdy jsou měďné ionty použity samostatně nebo v kombinaci s exonukleázou III, tak případy, kdy je exonukleáza III použita samostatně např. v případě řezů nebo v kombinaci např. s kyselinou případně s DNázou I.

Objasnění výkresu

Obr. 1 Na obrázku jsou znázorněny výsledky detekce BrdU inkorporovaného v buněčné DNA po použití jednomocné mědi a exonukleázy III s použitím (plus) nebo bez použití (mínus) stabilizačního kroku pomocí formaldehydu (FA). Pro detekci BrdU bylo použito několik různých klonů primárních protilátek proti BrdU. Protilátky byly nebo nebyly po reakci fixovány formaldehydem a následně byly detekovány pomocí sekundární protilátky konjugované s fluorochromem. Graf ukazuje signál v jádrech replikujících buněk (buněk obsahujících BrdU). Z grafu je patrné, že působení formaldehydu výrazně zvyšuje signál u všech použitých protilátek.

Příklady uskutečnění vynálezu

Seznam použitých zkratk

HeLa	buněčná linie lidských epitelálních 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
S-MEM	modifikace Eaglova minimálního média pro suspenzní buňky
HCl	kyselina chlorovodíková

Příklad 1

Stabilizace protilátek rozeznávajících BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů po působení měďnými ionty a exonukleázou III v buňkách přisedlých na podložních skličkách.

Následující postup popisuje stabilizaci protilátek namířených proti BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v HeLa buňkách přisedlých na podložních skličkách po působení měďnými ionty a exonukleázou III. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

A) Lidské HeLa buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v Petriho miskách na kruhových sklech o průměru 12 mm v růstovém médiu DMEM s L-glutaminem (Gibco) s 10% (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1% (obj./obj.) gentamicinem a 3,7 g/l NaHCO₃ v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C.

B) Druhý den po pasáži byl do růstového média přidán BrdU v konečné koncentraci 10 μmol.l⁻¹. Vzorky byly inkubovány alternativně 10, 20, 30 nebo 60 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂

při 37 °C. Alternativně byl do růstového média přidán CldU nebo IdU ve stejné koncentraci jako BrdU.

5 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).

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).

10 Alternativně byly vzorky fixovány metanolem a následně acetonem. V tomto případě byla skla se vzorky nejdříve inkubována 10 minut v metanolu při teplotě –20 °C (přibližně 1 až 2 ml metanolu 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 položena do Petriho misky s 1x PBS. V případě použití metanolu a acetonu následoval krok G).

15 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.

20 F) Následně byl pufr odstraněn. Vzorky byly 10 minut permeabilizovány alternativně v 0,1% nebo 0,2% nebo 0,5% (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 plochy).

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

30 H) Z misek byl odstraněn roztok 1x PBS, vzorky byly převrstveny stejným množstvím roztoku obsahujícím 10 mmol.l^{–1} askorbátu sodného, 4 mmol.l^{–1} síranu měďnatého, 20 mmol.l^{–1} glycinu a 100 mmol.l^{–1} chloridu sodného.

I) Petriho misky se vzorky na sklech byly přemístěny na třepačku (Thermomixer comfort, Eppendorf) a zde byly inkubovány 10 minut při rychlosti 300 otáček/minutu.

35 J) Inkubační roztok byl odstraněn a vzorky byly převrstveny roztokem 100 mmol.l^{–1} tris-(hydroxymetyl)aminometamin s HCl (dále jen 100 mmol.l^{–1} Tris–HCl), pH 7,5 (přibližně 1 až 2 ml roztoku na 4 cm² plochy). Po jedné minutě byl roztok 100 mmol.l^{–1} Tris–HCl odstraněn a nahrazen stejným množstvím roztoku 100 mmol.l^{–1} Tris–HCl. Tento krok byl opakován ještě jednou.

40 K) Petriho misky se vzorky na sklech byly přemístěny na třepačku (Thermomixer comfort, Eppendorf) a zde byly inkubovány 10 minut při rychlosti 300 otáček/minutu.

45 L) Skla se vzorky 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. Skla se vzorky byla položena na kapky 100 mmol.l^{–1} Tris–HCl, pH 7,5 na parafilmu (50 µl/kapka). Skla směřovala vrstvou se vzorky směrem dolů do kapky.

50 M) Následně byly vzorky inkubovány 30 minut s myší protilátkou rozeznávající BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU (konečná koncentrace protilátky byla alternativně 0,1; 1; 10; 100 a 200 µg/ml) a exonukleázou III (konečná koncentrace 1U/ µl, Fermentas; viz část Použité roztoky a chemikálie) v roztoku 1x pufru pro exonukleázu III (66 mmol.l^{–1} Tris (pH 8,0 při 30 °C), 0,66 mmol.l^{–1} MgCl₂; viz část Použité roztoky a chemikálie) na kapkách o velikosti 20 µl.

N) Skla se vzorky byla přenesena na kapku roztoku 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5. Po 5 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku roztoku 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5, alternativně byl tento krok vynechán a pokračovalo se krokem O.

O) Skla se vzorky byla přenesena na kapku roztoku 1x PBS. Po 5 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku roztoku 1x PBS. Tento krok byl ještě jednou opakován. Alternativně byl tento krok vynechán nebo spočíval jen v jediném přenesení na kapku 1x PBS.

P) Skla se vzorky byla okamžitě přenesena na kapku roztoku alternativně 0,1%; 0,5%; 1%; 2%; 10% nebo 20% formaldehydu v 1x PBS a inkubována alternativně po dobu 1,10 nebo 60 minut.

R) Skla se vzorky byla přenesena na kapku roztoku 1x PBS. Po 5 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku roztoku 1x PBS. Tento krok byl ještě jednou opakován.

Q) Skla se vzorky byla přenesena na kapku roztoku 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5. Po 5 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku roztoku 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5. Tento krok byl ještě jednou opakován. Alternativně byl místo Tris-HCl použit 1x PBS.

R) Skla se vzorky byla inkubována 30 minut s kozí anti-mýší protilátkou konjugovanou s fluorochromem Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, ředění 1:100 ve 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5) na kapkách o velikosti 20 µl. Alternativně byl namísto Tris-HCl použit 1xPBS.

S) Skla se vzorky byla přenesena na kapku 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5 (50 µl). Po 5 minutách byla skla s buňkami přenesena na novou kapku 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5. Tento krok byl ještě třikrát opakován. Alternativně byl namísto Tris-HCl použit 1x PBS. Následně byla skla se vzorky přenesena na kapku destilované vody (50 µl). Po 5 minutách byla skla se vzorky přenesena na novou kapku destilované vody. Tento krok byl ještě třikrát opakován.

T) Nakonec byla voda ze skel odsáta pomocí filtračního papíru, skla byla položena na nový filtrační papír vzorky nahoru a usušena.

U) Po usušení byla skla položena na kapičky (2 µl) připraveného roztoku 50% glycerinu na podložním skle. Vzorky směřovaly do kapičky roztoku. Jemným tlakem pomocí pinzety na horní stranu skel se vzorky došlo k roztažení roztoku po celé ploše skel. Signál byl detekován pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Příklad 2

Stabilizace protilátek rozeznávajících BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů po působení měďnými ionty a exonukleázou III ve tkáních.

Následující postup popisuje stabilizaci protilátek namířených proti BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU ve tkáních po působení měďnými ionty a exonukleázou III. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

A) Třídenní potkaní 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 (Dulbeccova modifikace Eaglova média, Gibco) s 10% (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1% (obj./obj.) gentamicinem a 3,7 g/l NaHCO₃. Do média s kousky jater byl přidán BrdU v konečné

koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a játra byla v tomto médiu inkubována 30 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO_2 při 37 °C. Alternativně byl do růstového média namísto BrdU přidán IdU nebo CldU ve stejné koncentraci jako BrdU.

- 5 B) Následně bylo růstové médium odstraněno a kousky jater byly převrstveny pufr (1x PBS, složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 1 až 2 ml pufru na 4 cm^2 plochy). Po 5 minutách byl pufr odstraněn a nahrazen stejným množstvím 1x PBS stejného složení. Tento krok byl ještě jednou opakován.
- 10 C) Kousek jater byl dán mezi dvě kruhová skla o průměru 12 mm potažená 1% (hmotnost/obj.) želatinou a tkáň byla roztažena po povrchu skel pomocí jemného tlaku pinzetou na sklo. Skla byla oddělena a obě byla dána do Petriho misky s 1x PBS a to tak, že skla směřovala vzorky tkání nahoru do roztoku.
- 15 D) V dalších krocích bylo postupováno dle kroků uvedených v Příkladu 1 (D až U).

Příklad 3

- 20 Stabilizace protilátek rozeznávajících BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů po působení měďnými ionty a exonukleázou III v suspenzních buňkách fixovaných formaldehydem.

Následující postup popisuje stabilizaci protilátek namířených proti BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU po působení měďnými ionty a exonukleázou III v suspenzních buňkách fixovaných formaldehydem. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

- 30 A) Lidské HeLa S3 buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v kultivačních lahvích (objem lahví 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 5% (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories) a 1% (obj./obj.) gentamycinem v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO_2 při 37 °C. Buněčná suspenze obsahovala přibližně 5 až 8 x 10 buněk na 1 mililitr.

- 35 B) Druhý den po pasáži byl do růstového média přidán BrdU v konečné koncentraci 10 mmol.l^{-1} . Vzorky byly inkubovány 10 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO_2 při 37 °C. Alternativně byl do růstového média přidán CldU nebo IdU ve stejné koncentraci jako BrdU.

- 40 C) Následně byla suspenze buněk přenesena do 15 mililitrové centrifugační zkumavky a vzorky byly odstředovány 1 minutu při 180g. 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 180g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 μl média) a k peletu vzorků byl přidán 1 ml nového média. Pelet vzorků byl rozsuspendován.

- 45 D) 50 μl kapka suspenze buněk byla přenesena na kruhová skla o průměru 13 mm potažená 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 vzorky byly fixovány 10 minut. Skla byla umístěna do Petriho misek tak, že směřovala vzorky nahoru do roztoku.
- 50

E) V dalších krocích bylo postupováno podle bodů E až S Příkladu 1.

Navržený postup lze použít i při práci se suspenzí buněk po celou dobu jejich zpracování například pro FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). V tomto případě bylo postupováno dle bodu A až C Příkladu 3, následně podle bodu D až S Příkladu 1 s tím, že při odstraňování veškerých roztoků, přidávání nových a při promývání byly buňky odstředovány 1 minutu při 180g, následně byl odstraněn supernatant (ve zkumavce bylo ponecháno 200 μ l 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 bodu D byl použit jen formaldehyd. V bodu S nebyla použita voda, ale buňky byly ponechány ve 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5. V průběhu těchto kroků byly buňky třepány na třepáče (Vortex Wizard, VELP Scientifica, při 300 otáčkách za minutu).

Příklad 4

Stabilizace protilátek rozeznávajících BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů po působení měďnými ionty v buňkách přisedlých na podložních sklíčkách.

Následující postup popisuje stabilizaci protilátek namířených proti BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU po působení měďnými ionty v buňkách přisedlých na podložních sklíčkách. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

Bylo postupováno stejně jako v Příkladu 1 s tím rozdílem, že v bodu M byly vzorky inkubovány 30 minut s myší anti-bromodeoxyuridinovou protilátkou bez exonukleázy III v roztoku 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5.

Příklad 5

Stabilizace protilátek rozeznávajících BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů po působení měďnými ionty ve tkáních.

Následující postup popisuje stabilizaci protilátek namířených proti BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU nukleosidů po působení měďnými ionty ve tkáních. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

Bylo postupováno stejně jako v Příkladu 2 s tím rozdílem, že inkubace s myší anti-bromodeoxyuridinovou protilátkou probíhala bez exonukleázy III v roztoku 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5.

Příklad 6

Stabilizace protilátek rozeznávajících BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů po působení měďnými ionty v suspenzních buňkách.

Následující postup popisuje stabilizaci protilátek namířených proti BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU po působení měďnými ionty v suspenzních buňkách. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

Bylo postupováno stejně jako v Příkladu 3 s tím rozdílem, že inkubace s myší anti-bromodeoxyuridinovou protilátkou probíhala bez exonukleázy III v roztoku 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl a 100 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5.

5

Příklad 7

Stabilizace protilátek rozeznávajících BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů po působení nízkou koncentrací kyseliny chlorovodíkové (HCl) a exonukleázou III v buňkách pěstovaných na podložních sklech, tkáních a v suspenzních buňkách.

Následující postup popisuje stabilizaci protilátek namířených proti BrdU, CldU nebo IdU po působení nízkou koncentrací kyseliny chlorovodíkové a exonukleázou III v buňkách pěstovaných na podložních sklech, tkáních a v suspenzních buňkách.

15

Bylo postupováno podle Příkladů 1 až 3 s těmito rozdíly:

Namísto roztoku obsahujícího 10 mmol.l⁻¹ askorbátu sodného, 4 mmol.l⁻¹ síranu měďnatého, 20 mmol.l⁻¹ glycinu a 100 mmol.l⁻¹ chloridu sodného byl použit roztok 50 mmol.l⁻¹ HCl, ve kterém byly vzorky třepány 20 minut při teplotě 24 °C.

20

Příklad 8

Stabilizace protilátek rozeznávajících BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů po působení DNázou I a exonukleázou III v buňkách pěstovaných na podložních sklech, tkáních a v suspenzních buňkách.

Následující postup popisuje stabilizaci protilátek namířených proti BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU po působení DNázou I a exonukleázou III v buňkách pěstovaných na podložních sklech, tkáních a v suspenzních buňkách.

30

Bylo postupováno podle Příkladů 1 až 3 s těmito rozdíly:

Po promytí vzorků v 1x PBS (bod G, Příklad 1) byla v případě vzorků na sklech skla se vzorky 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. Skla se vzorky byla položena na kapky 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 na parafilmu (50 µl/kapka). Skla směřovala vrstvou se vzorky směrem dolů do kapky. Následně byly vzorky inkubovány 30 minut s DNázou I (20 U/ml, Fermentas; viz část Použité roztoky a chemikálie) v roztoku 10 mmol.l⁻¹ Tris (pH 7,5 při 25 °C), 2,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 0,1 mmol.l⁻¹ CaCl₂ na kapkách o velikosti 20 µl. Poté byly vzorky promyty stejně jako v bodu G Příkladu 1 v 1x PBS. Následně bylo pokračováno 30 minutovou inkubací s myší anti-bromodeoxyuridinovou protilátkou a exonukleázou III (1U/ µl, Fermentas) v roztoku 66 mmol.l⁻¹ Tris (pH 8,0 při 30 °C), 0,66 mmol.l⁻¹ MgCl₂ na kapkách o velikosti 20 µl a dále dle bodu N až U Příkladu 1.

40

45

Příklad 9

Stabilizace protilátek rozeznávajících BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů alternativně po působení měďnými ionty a/nebo exonukleázou III, nízkou koncentrací HCl a exonukleázou III nebo DNázou I a exonukleázou III v buňkách pěstovaných na podložních sklech, tkáních a v suspenzních buňkách za použití protilátky, která je přímo konjugovaná s fluorochromy.

55

Následující postup popisuje stabilizaci protilátek namířených proti BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU alternativně po působení měďnými ionty a/nebo exonukleázou III, nízkou koncentrací HCl a exonukleázou III nebo DNázou I a exonukleázou III v buňkách pěstovaných na podložních sklech, tkáních a v suspenzních buňkách.

5

Bylo postupováno podle Příkladů 1 až 8 s těmito rozdíly:

Byla použita myší protilátka namířená proti BrdU, která byla konjugovaná alternativně s fluorochromem FITC (Fluorescein isothiocyanát) nebo Tetrametylrodaminem nebo cyaninovým fluorochromem Cy5 nebo Cy3 a bod Q a R byl ve všech případech vynechán.

10

Příklad 10

15 Stabilizace protilátek rozeznávajících BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů po působení nízkou koncentrací kyseliny chlorovodíkové a exonukleázou III v suspenzních buňkách fixovaných etanolem.

20 Následující postup popisuje stabilizaci protilátek namířených proti BrdU /nebo CldU a/nebo IdU po působení měďnými ionty a exonukleázou III v suspenzních buňkách fixovaných etanolem. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

25 A) Lidské HeLa S3 buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v kultivačních lahvích (objem lahví 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, 5% (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories) a 1% (obj./obj.) gentamicinem v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Buněčná suspenze obsahovala přibližně 5 až 8 x 10⁵ buněk na 1 mililitr.

30 B) Druhý den po pasáži byl do růstového média přidán BrdU v konečné koncentraci 10 mmol.l⁻¹. Vzorky byly inkubovány 10 minut v atmosféře s 5% (obj./obj.) CO₂ při 37 °C. Alternativně byl do růstového média přidán CldU nebo IdU ve stejné koncentraci jako BrdU.

35 C) Následně byla suspenze buněk obsahující asi 0,5 až 1,5 miliónu buněk přenesena do centrifugační zkumavky a vzorky byly odstředovány 1 minutu při 180g. Supernatant byl odstraněn.

40 D) Ke vzorkům bylo přidáno 2 ml 70% (obj./obj.) etanolu vychlazeného v ledové lázni. Po 5 minutách inkubace na pokojové teplotě byly ke vzorkům přidány 2 ml roztoku 1x PBS. Vzorky byly rozsuspendovány a následně odstředovány 1 minutu při 180g. Supernatant byl odstraněn, ke vzorkům byly přidány 2 ml nového roztoku 1x PBS, vzorky byly rozsuspendovány a následně opět odstředeny. Tento krok byl opakován ještě jednou.

45 E) Supernatant byl odstraněn. Ke vzorkům bylo přidáno 2 ml alternativně 20, 40, 80 a 160 mmol.l⁻¹ HCl. Vzorky byly přemístěny na třepačku (Thermomixer comfort, Eppendorf) a zde byly inkubovány alternativně 1, 2, 5, 10, 20, 30 nebo 60 minut při rychlosti 300 otáček/minutu. V některých provedeních inkubace v roztoku kyseliny proběhla bez třepání.

50 F) Vzorky byly odstředovány 1 minutu při 180g. Supernatant byl odstraněn, ke vzorkům byly přidány 2 ml 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5. Tento krok byl opakován ještě jednou. Alternativně byl namísto roztoku Tris-HCl použit roztok 1x PBS.

55 G) Vzorky byly odstředovány 1 minutu při 180g. Supernatant byl odstraněn. Ke vzorkům bylo přidáno alternativně 100, 200 nebo 500 µl roztoku myší protilátky rozeznávající BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU (konečná koncentrace protilátky byla alternativně 0,1; 1; 10, 100 a 200 µg/ml) konjugované s fluorochromem a exonukleázou III (konečná koncentrace alternativně 0,2; 1 nebo

10 U/ μ l, Fermentas) v roztoku 1x pufru pro exonukleázu III (66 mmol.l⁻¹ Tris (pH 8,0 při 30 °C), 0,66 mmol.l⁻¹ MgCl₂). Vzorky byly inkubovány alternativně při teplotě 10, 20, 25, 37 nebo 40 °C na třepačce při rychlosti 300 otáček/minutu.

5 H) Ke vzorkům byly přidány 2 ml 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5. Vzorky byly odstředovány 1 minutu při 180g. Supernatant byl odstraněn, k peletě vzorků byly přidány 2 ml mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5. Tento krok byl opakován ještě jednou. Alternativně byl namísto roztoku Tris-HCl použit roztok 1x PBS. V některých provedeních následoval ihned po prvním přidání 1 ml 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 nebo 1 x PBS krok I.

10 I) Vzorky byly odstředovány 1 minutu při 180g. Supernatant byl odstraněn. Ke vzorkům byly přidány 2 ml 2% formaldehydu v 1x PBS a vzorky byly inkubovány po dobu 10 minut na pokojové teplotě.

15 J) Vzorky byly odstředovány 1 minutu při 180g. Supernatant byl odstraněn. Ke vzorkům byly přidány 2 ml 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5. Vzorky byly odstředovány 1 minutu při 180g. Supernatant byl odstraněn, k peletě vzorků byly přidány 2 ml 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5. Tento krok byl opakován ještě jednou. Alternativně byl namísto roztoku Tris-HCl použit roztok 1x PBS.

20 Použité roztoky a chemikálie:

1. Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS)

25 10x PBS (desetinásobně koncentrovaný roztok PBS):

1,4 mol.l⁻¹ NaCl

26 mmol.l⁻¹ KCl

90 mmol.l⁻¹ Na₂HPO₄

30 14 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄

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

35 1x PBS (fosfátem pufrovaný fyziologický roztok připravený desetinásobným ředěním 10x PBS)

2. Příprava polylysinových skel pro ukotvení suspenzních buněk

40 Kruhová skla s průměrem 12 mm byla vložena do 50 ml kádinky s 20 ml 96% (obj./obj.) etanolu. Po 10 minutách byla pomocí pinzety přenesena do Petriho misky vyložené filtračním papírem a usušena. Skla byla následně na dobu 1 minuty ponořena do 0,01% (hmotnost/obj.) roztoku poly-L-lysinu v DMEM, následně byla ponořena na 30 sekund do 1x PBS a pak ještě jednou na 30 sekund do nového 1x PBS. Tento krok byl ještě 3x opakován.

45 Nakonec byla skla položena na filtrační papír a usušena.

3. Roztok exonukleázy III s protilátkou:

Destilovaná voda

50

1x pufr pro exonukleázu III (Fermentas, 2 μ l 10x koncentrovaného pufru do 20 μ l 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.

Exonukleáza III (200 U/μl, Fermentas), konečná koncentrace 1 U/μl

Myší anti–bromodeoxyuridinová protilátka (ředění dle návodu dodavatele protilátky)

5

Definice jednotky exonukleázy III

Jedna jednotka (U) enzymu uvolní za 30 minut 1 nmol 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 sonikované DNA z E. coli.

10

4. Roztok DNázy I:

Destilovaná voda

15

1 x pufr pro DNázu I (Fermentas, 2 μl 10x koncentrovaného pufru do 20 μl směsi), tento pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný, složení 10x koncentrovaného pufru je následující: 100 mmol.l⁻¹ Tris–HCl (pH 7,5 při 25 °C), 25 mmol.l⁻¹ MgCl₂ a 1 mmol.l⁻¹ CaCl₂.

20

DNáza I (1 U/μl, Fermentas), konečná koncentrace 20 U/μl

Myší anti–bromodeoxyuridinová protilátka (ředění dle návodu dodavatele protilátky)

Definice jednotky exonukleázy III

25

Jedna jednotka (U) enzymu úplně degraduje 1 μg plazmidové DNA za 10 minut při 37 °C. Enzymatická aktivita byla měřena v následující směsi: 10 mmol.l⁻¹ Tris–HCl (pH 7,5 při 25 °C), 2,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 0,1 mmol.l⁻¹ CaCl₂ a 1 μg pUC19 DNA

30

Průmyslová využitelnost

Způsob stabilizace protilátek rozeznávající BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech inkorporace těchto nukleosidů podle předkládaného vynálezu lze využít v případech, kdy je důležité šetrné zpřístupnění těchto nukleosidů ve struktuře DNA pro reakci se specifickými protilátkami a tyto protilátky přitom pro efektivní reakci s BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU běžně vyžadují zpřístupňující kroky, které výrazně poškozují DNA a buněčnou strukturu, přičemž protokoly založené na použití jednomocné mědi a/nebo exonukleáze bez použití námi popsaného přístupu poskytují nízký nebo žádný signál. V této souvislosti je možné mimo jiné předpokládat včlenění tohoto způsobu do komerčně dostupných sad pro detekci replikace DNA.

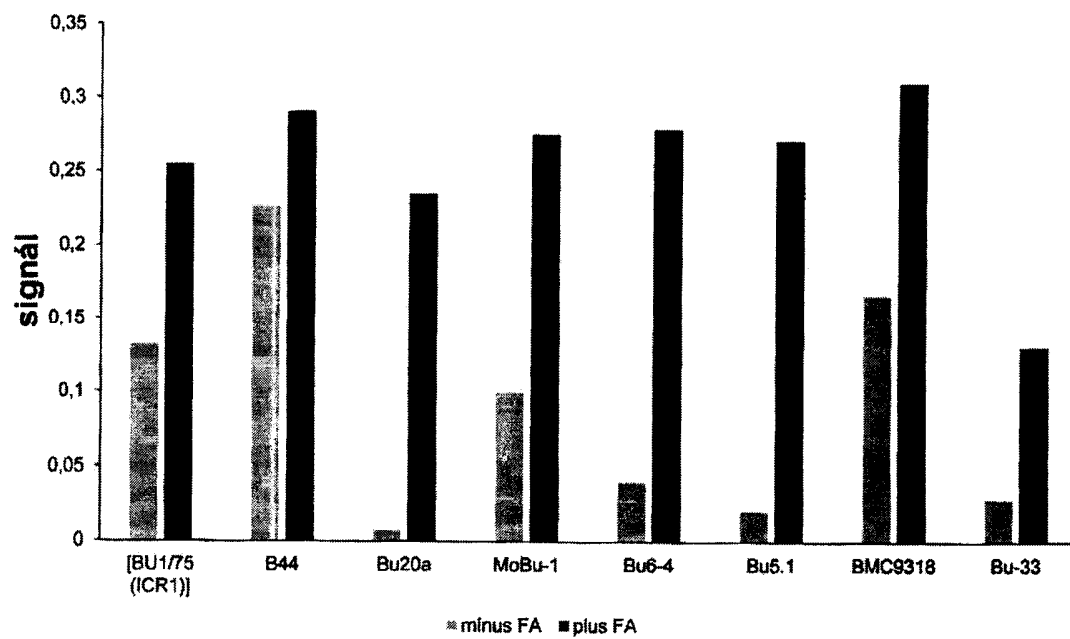
40

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 **1.** Způsob stabilizace protilátek rozeznávají 5–bromo–2'–deoxyuridin (BrdU) a/nebo 5–chloro–
2'–deoxyuridin (CldU) a/nebo 5–jodo–2'–deoxyuridin (IdU) v DNA v místech lokalizace těchto
nukleosidů po působení jednomocnou mědí a/nebo exonukleázou III, **v y z n a ě n é t í m**, že
vzorky s DNA, která obsahuje BrdU, IdU nebo CldU, se po působení jednomocnou mědí a/nebo
10 exonukleázou III a inkubací s protilátkou rozeznávající BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU inkubují
v roztoku formaldehydu.
- 15 **2.** Způsob stabilizace protilátek rozeznávající BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech
lokalizace těchto nukleosidů po působení jednomocnou mědí a/nebo exonukleázou III podle
nároku 1, **v y z n a ě n é t í m**, že jako vzorky jsou použity buňky nebo tkáně.
- 20 **3.** Způsob stabilizace protilátek rozeznávající BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA v místech
inkorporace těchto nukleosidů po působení jednomocnou mědí a/nebo exonukleázou III, podle
nároků 1 a 2, **v y z n a ě n é t í m**, že jsou použity nekonjugované protilátky nebo protilátky
konjugované s dalšími látkami, s výhodou vybranými ze skupiny fluorochromů.

1 výkres

Obrázek 1



Konec dokumentu
