

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA GOSPODARSKI RAZVOJ IN TEHNOLOGIJO
URAD RS ZA INTELEKTUALNO LASTNINO

(10) **SI/EP 2591125 T1**

(12)

PREVOD ZAHTEVKOV EVROPSKEGA PATENTA

(21) Številka predmeta: **201131467**

(51) Int. Cl. (2018.01)

(22) Datum prijave: **08.07.2011**

C12Q 1/00

(46) Datum objave prevoda zahtevkov:

31.08.2018

(96) Evropska patentna prijava:

08.07.2011 EP 11736190.7

(30) Prednostna pravica:

09.07.2010 US 362778 P

(87) Objava mednarodne patentne prijave:

WO 2012/005595, 12.01.2012

(86) Mednarodna patentna prijava:

08.07.2011 WO PCT/NL2011/050504

(97) Objava evropskega patenta:

EP 2591125 B1, 04.04.2018

(72) Izumiteljja: **VAN MIN Max Jan, 2497 ZJ Den Haag, NL;**
DE LAAT Wouter Leonard, 3584 CT Utrecht, NL

(73) Imetnik: **Cergentis B.V.,**
Yalelaan 62, 3584 CM Utrecht, NL

(74) Zastopnik: **ZIVKO MIJATOVIC & PARTNERS, d.o.o., Ulica stare pravde 10, 1000 Ljubljana, SI**

(54) **STRATEGIJE SEKVENCIRANJA V3-D GENOMSKE REGIJE KI NAS ZANIMA**

SI/EP 2591125 T1

**STRATEGIJE SEKVENCIRANJA V3-D GENOMSKE REGIJE KI NAS ZANIMA
PATENTNI ZAHTEVKI**

1. Metoda za izdelavo sosednje (ang.«contig») genomske regije, ki nas zanima, ki obsega ciljno nukleotidno sekvenco, fragmentirajočo zamreženo DNA, ligacijo fragmentirane zamrežene DNA, reverzija zamreženja in določanje vsaj dela sekvenc ligiranih fragmentov DNA, ki vsebujejo fragment DNA s tarčno nukleotidno sekvenco, in uporabo določenih sekvenc za izgradnjo sosednje genomske regije, ki nas zanima.
2. Metoda za izdelavo sosednje genomske regije, ki nas zanima, ki obsega ciljno nukleotidno sekvenco, ki obsega korake:
 - a) zagotavljanje vzorca zamrežene DNA;
 - b) fragmentiranje zamrežene DNA;
 - c) ligacija fragmentirane zamrežene DNA;
 - d) reverzija zamreženja;
 - e) po izbiri fragmentiranje DNA iz koraka d), prednostno z restrikcijskim encimom;
 - f) po izbiri, ligiranje fragmentirane DNA iz koraka d) ali e) na vsaj en adapter;
 - g) po izbiri in prednostno pomnoževanje (ang.«amplifying») ligiranih fragmentov DNA iz koraka d) ali e), ki obsegajo fragment DNA s ciljno



nukleotidno sekvenco, ki uporablja vsaj en primer, ki hibridizira na ciljno nukleotidno sekvenco, ali pomnoževanje ligiranih fragmentov DNA iz koraka f) z uporabo vsaj enega primerja, ki hibridizira do ciljne nukleotidne sekvence in vsaj enega primerja, ki hibridizira vsaj en adapter;

h) določanje vsaj dela zaporedja (pomnoženih) ligiranih fragmentov DNA iz koraka d), e), f) ali g) ki obsega fragment DNA s ciljno nukleotidno sekvenco, prednostno z uporabo visoko zmogljivega sekvencioniranja;

i) zgraditi sosednjo genomske interesne regije iz določenih sekvenc.

3. Metoda za izdelavo sosednje genomske regije, ki nas zanima, ki obsega ciljno nukleotidno sekvenco, ki obsega korake:

a) zagotavljanje vzorca zamrežene DNA;

b) fragmentiranje zamrežene DNA;

c) ligacija fragmentirane zamrežene DNA;

d) reverzija zamreženja;

e) po izbiri fragmentiranje DNA iz koraka d), prednostno z restrikcijskim encimom;

f) cirkularizacija DNA iz koraka d) ali e);

g) po izbiri in prednostno pomnoževanje krožne (ang.«circularised») DNA ki obsega fragment DNA s ciljno nukleotidno sekvenco, ki uporablja vsaj en primer, ki hibridizira na ciljno nukleotidno sekvenco,

h) določanje vsaj dela zaporedja (pomnoženih) ligiranih fragmentov DNA, ki obsega fragment DNA s ciljnim nukleotidom, z uporabo visoko zmogljivega sekvencioniranja;



i) zgraditi sosednjo genomske interesne regije iz določenih sekvenc.

4. Metoda za izdelavo sosednje genomske regije, ki nas zanima po zahtevkih 2 ali 3, kjer genomska regija, ki nas zanima poleg tega obsega še eno ali več ciljnih nukleotidnih zaporedij in kjer v koraku pomnoževanja (g) je predviden primer, ki hibridizira s ciljnim nukleotidnim zaporedjem in so en ali več primerji zagotovljeni za ustrezen en ali več dodatnih ciljnih nukleotidov, kjer so ligirani fragmenti DNA pomnoženi, ali je krožna DNA pomnožena z uporabo primerjev.
5. Metoda po katerem koli od zahtevkov 2-4, kjer korak fragmentiranja b) obsega sonikacijo, ki ji sledi encimsko popravilo koncev DNA (ang.«enzymatic DNA end repair«).
6. Metoda po katerem koli od zahtevkov 2-4, kjer korak fragmentiranja b) obsega fragmentiranje z restrikcijskim encimom.
7. Metoda po zahtevku 5 ali 6, pri čemer se korak ligacije c) izvede v prisotnosti adapterja, ligacijske adapterske sekvence med fragmenti.
8. Metoda po zahtevku 6 ali 7, kjer v koraku b) obdelamo množico podvzorcev in za vsak podvzorec se uporabljajo restrikcijski encimi z različnimi mesti prepoznavanja.

9. Metoda po zahtevku 8, kjer korak fragmentacije e) obsega restrikcijski encim s prepoznavno sekvenco, ki je daljša od prepoznavne sekvence restrikcijskega encima iz koraka b).
10. Metoda po katerem koli od prejšnjih zahtevkov, kjer so sekvence več genomske regije, ki nas zanimajo določene.
11. Metoda po katerem koli od zahtevkov 2-10, pri katerem se pred ali po koraku amplifikacije g) izvede korak izbire velikosti, pri čemer se prednostno,
- korak izbire velikosti izvede z gelsko ekstrakcijsko kromatografijo (ang.«gel extraction chromatography»), gelsko elektroforezo ali gradientno centrifugacijo (ang.« density gradient centrifugation»); in/ali,
- DNA izbere izmed velikosti med 20-20,000 baznih parov, prednostno 50-10,000 baznih parov, najbolj prednostno med 100-3000 baznih parov.
12. Metoda po katerem koli od prejšnjih zahtevkov, kjer so (pomnoženi) ligirani fragmenti DNA, ki obsegajo ciljno nukleotidno sekvenco zajeti s sondo (ang.«capture probe»), da se ločijo (pomnoženi) ligirani fragmenti DNA, ki obsegajo: ciljno nukleotidno sekvenco iz (pomnoženih) ligiranih fragmentov DNA, ki ne vsebujejo ciljnih nukleotidnih sekvence.
13. Metoda po zahtevku 12, pri čemer se za več ciljnih nukleotidnih zaporedij uporabi več sond.



14. Metoda po katerem koli od zahtevkov 2-13, pri čemer je ploidnost v celici genomske regije, ki nas zanima večja od 1, za vsako ploidnost se v koraku i) vnese sosednja.
15. Metoda po katerem koli od zahtevkov 2-13, pri čemer korak i) graditve soseske obsega korake:
- 1) identificiranje fragmentov DNA iz koraka b);
 - 2) dodelitev fragmentov DNA genomske regiji;
 - 3) zgraditi sosesko za genomske regije.
16. Metoda po zahtevku 15, kjer korak 2) dodeljevanja fragmentov genomske regiji obsega identificiranje različnih ligacijskih produktov iz koraka f) in povezovanje različnih ligacijskih produktov z identificiranimi fragmenti.
17. Metoda po katerem koli od zahtevkov od 2-16, pri čemer korak izdelave soseske obsega poravnavo določenih sekvenc DNA fragmentov iz koraka b) do referenčne sekvence.