

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

291 877

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: 1994 - 669
(22) Přihlášeno: 24.09.1992
(30) Právo přednosti:
24.09.1991 EP 1991/91402542
(40) Zveřejněno: 15.12.1994
(Věstník č. 12/1994)
(47) Uděleno: 10.04.2003
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 18.06.2003
(Věstník č. 6/2003)
(86) PCT číslo: PCT/EP92/02216
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 93/006239

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. 7:

C 12 Q 1/68

(73) Majitel patentu:

Keygene N.V., Wageningen, NL;

identifikují nebo izolují.

(72) Původce vynálezu:

Zabeau Marc, Gent, BE;
Vos Pieter, Renkum, NL;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název vynálezu:

Způsob amplifikace přinejmenším jednoho restrikčního fragmentu z výchozí DNA a způsob přípravy sestavy amplifikovaných restrikčních fragmentů

(57) Anotace:

Způsob amplifikace přinejmenším jednoho restrikčního fragmentu z výchozí DNA, při kterém se (a) výchozí DNA štěpí přinejmenším jednou restrikční endonukleázou a získají se restrikční fragmenty, (b) tyto fragmenty se ligují s alespoň jedním syntetickým dvouřetězcovým oligonukleotidovým adaptorem, jehož jeden konec je kompatibilní pro ligaci s jedním nebo oběma konci restrikčních fragmentů, čímž se připraví označené restrikční fragmenty, (c) tyto fragmenty se za hybridizačních podmínek přivedou do kontaktu s alespoň jedním oligonukleotidovým primerem, přičemž tento primer nebo primery obsahují nukleotidovou sekvenci párující s částí rozpoznávací sekvence restrikční endonukleázy přítomné v označeném restrikčním fragmentu a také párující s částí adaptorové sekvence, přičemž alespoň jeden z uvedených primerů obsahuje na svém 3'-konci zvolenou sekvenci obsahující přinejmenším jeden nukleotid umístěný bezprostředně vedle nukleotidů účastnících se vytvoření dané rozpoznávací sekvence, (d) označené restrikční fragmenty hybridizované na uvedený primer nebo primery se amplifikují v přítomnosti požadovaných nukleotidů a DNA polymerázy nebo se provede elongace těchto hybridizovaných primerů podél označených restrikčních fragmentů, a (e) amplifikované nebo elongované DNA fragmenty získané ve stupni (d) se

CZ 291877 B6

Způsob amplifikace přinejmenším jednoho restričního fragmentu z výchozí DNA a způsob přípravy sestavy amplifikovaných restričních fragmentů

5 Oblast techniky

Vynález se týká způsobu selektivní amplifikace přinejmenším jednoho restričního fragmentu aplikací otisků DNA a použití DNA markerů v řadě různých aplikací včetně křížení rostlin a živočichů, identifikace kultivarů, v diagnostickém lékařství, při diagnóze různých chorob u rostlin i u živočichů, při identifikaci geneticky podmíněných chorob u člověka, při analýze příbuzenských vztahů, v kriminalistice a při určování typů mikroorganismů. Kromě toho do rozsahu řešení náleží způsob přípravy sestavy amplifikovaných restričních fragmentů.

Konkrétně je možno uvést, že se vynález týká způsobů aplikaci otisků DNA a detekce specifického značení DNA v genomech od mikroorganismů až k vyšším rostlinám, živočichům a člověku. S vynálezem rovněž souvisí syntetické molekuly DNA a produkty na jejich bázi pro použití v různých oborech.

20 Dosavadní stav techniky

Využívání otisků DNA, stejně jako další metody pro mapování genů, identifikaci a analýzu DNA se týkají charakterizace podobnosti nebo odlišnosti genetického základu nebo genomu jednotlivce, variety nebo rasy nebo druhy. Obecným pravidlem je, že čím bližší je genetická příbuznost, tím větší je podobnost genomů, v důsledku toho budou odlišnosti genomů vzácnější. Tyto podobnosti nebo odlišnosti je možno odhalit analýzou DNA po jejím rozštěpení pomocí restričních endonukleáz. Restriční endonukleázy jsou enzymy, které rozpoznávají krátké řetězce nukleotidů, obvykle 4 až 8 bází. Jejich působením dochází k rozštěpení obou řetězců DNA za vzniku fragmentů DNA s určitou délkou. Vzhledem k vysoké specifičnosti těchto řetězců je DNA štěpena restričními endonukleázami velmi specifickým způsobem. Výsledkem je, že vzniká reprodukovatelná sestava fragmentů. Fragmenty DNA je možno frakcionovat podle jejich vzniku typických pásů, které tvoří otisk DNA v genetickém základu organismu.

V případě, že se porovnávají otisky velmi blízké příbuzných druhů, variet nebo ras mohou být získány otisky totožné nebo velmi podobné. V případě, že jsou pozorovány rozdíly u jinak identických otisků DNA, hovoří se o polymorfii DNA. Jde o nové fragmenty DNA, které se objevují v otisku. DNA je pak v této poloze polymorfní a nový fragment DNA je možno využít jako DNA marker. Polymorfie DNA detekovaná v otiscích DNA získaných pomocí štěpení restričními enzymy může být způsobena kteroukoliv z následujících změn v řetězci DNA: mutace, které odstraní rozpoznávací místo restriční endonukleázy, mutace, jejichž důsledkem je vznik nových rozpoznávacích míst, inserce, delece nebo inverze mezi dvěma restričními místy.

Polymorfismus DNA tohoto typu se obecně označuje jako RFLP, polymorfismus délky restričních fragmentů („*Restriction Fragment Length Polymorphisms*“). Takové změny, které jsou důsledkem mutací se budou chovat jako neškodné genetické markery v případě, že se budou dělit dědičností Mendelova typu. V důsledku toho je možno polymorfismus DNA využít jako genetické markery obdobným způsobem jako jakékoliv jiné genetické markery: při průkazu rodičovství, při genetických studiích, týkajících se dědičnosti různých vlastností a také v různých případech identifikace jednotlivců.

V případě téměř všech živých organismů s výjimkou virů vzniká při restričním štěpení veškeré DNA genomu organismu tak velké množství pásů, že není možné vyhodnotit obsah všech těchto pásů. Z tohoto důvodu jsou všechny metody pro detekování DNA založeny na principu, při jehož provádění se vizualizuje jen malá frakce fragmentů DNA, takže vzniká jednoduchá sestava pásů, která tvoří otisk DNA.

Nejrozšířenější postup spočívá v tom, že se DNA organismu rozštěpí působením restričních endonukleáz, restriční fragmenty se podrobí frakcionaci při použití elektroforézy na gelu, fragmenty frakcionované DNA se přenesou a naváží na membrány, načež se membrána hybridizuje specifickým fragmentem DNA („sonda“). Fragment DNA vytvoří dvojřetězcovou molekulu DNA s DNA fragmentem (nebo fragmenty) na membráně s obsahem komplementárních nukleotidových řetězců. V případě, že je sonda opatřena značkou s vizualizovatelným markerem, je možno vizualizovat také fragment DNA, s nímž je sonda spojena. Tento postup se obvykle označuje jako hybridizace Southernova typu nebo Southern blot. V případě, že je možno prokázat rozdíly ve velikosti odpovídajících restričních fragmentů, na něž se sonda váže v blízké příbuzných molekulách DNA genomu, označují se tyto rozdíly jako polymorfismus, specifický polymorfismus délky restričních fragmentů. Rozdíly v délce restričních fragmentů odpovídají různým alelovým formám genetického místa, které jsou rozpoznávány sondou. Přestože je Southernova metoda otiskována DNA široce používána, je tato metoda velmi pracná a velmi náročná na čas.

Mimoto má tato metoda malou rozlišovací schopnost a je tedy možno ji použít pouze k vyhodnocování jednotlivých míst nebo malého množství míst maximálně v jedné reakci.

Technika PCR (řetězová reakce s použitím polymerázy) je metoda pro syntézu specifických fragmentů DNA in vitro. Metoda je založena na použití specifických oligonukleotidů, které se mohou vázat na určité specifické řetězce v molekule DNA a na použití DNA-polymerázy, stále při vyšší teplotě. Oligonukleotidy jsou zkonstruovány tak, že se mohou vázat na opačné konce řetězců DNA a slouží jako primery při syntéze DNA takovým způsobem, že každý z nich povede k syntéze nových řetězců DNA. To znamená, že v průběhu jednoho cyklu syntézy se vytvoří mezi primery úplná kopie molekuly DNA, přičemž DNA mezi primery je zdvojená. V průběhu každého cyklu syntézy DNA tak dochází ke zdvojení množství DNA, což vede k amplifikaci DNA mezi oběma primery. V důsledku toho může technika PCR umožnit syntézu přesného segmentu DNA při použití jen malého množství „substrátové DNA“.

Podstata vynálezu

Podstata vynálezu tvoří nový způsob amplifikace restričních fragmentů, které byly získány po rozštěpení DNA určitého organismu pomocí alespoň jednoho restričního enzymu, při použití PCR. Při této nové aplikaci metody PCR nejsou použité nukleotidy namířeny proti známému řetězci DNA, avšak jsou zkonstruovány tak, že rozpoznávají zakončení restričního fragmentu. K tomuto účelu je zapotřebí modifikovat tato zakončení restričních fragmentů navázáním oligonukleotidových linkerů (adaptorů). Důvodem pro toto opatření je skutečnost, že konce restričních enzymů mají obvykle pouze několik nukleotidů (2 až 8 nukleotidů), což je příliš málo pro použití těchto struktur jako primerů při amplifikaci pomocí PCR.

Vynález se tedy týká způsobu amplifikace přinejmenším jednoho restričního fragmentu z výchozí DNA, přičemž podstata tohoto postupu spočívá v tom, že se

- (a) výchozí DNA štěpí přinejmenším jednou restriční endonukleázou a získají se restriční fragmenty,
- (b) získané restriční fragmenty se ligují s alespoň jedním syntetickým dvouřetězcovým oligonukleotidovým adaptorem, jehož jeden konec je kompatibilní pro ligaci s jedním nebo oběma konci restričních fragmentů, čímž se připraví označené restriční fragmenty,
- (c) získané označené restriční fragmenty se za hybridizačních podmínek přivedou do kontaktu s alespoň jedním oligonukleotidovým primerem, přičemž tento primer nebo primery obsahují nukleotidovou sekvenci párující s částí rozpoznávací sekvence restriční endonukleázy přítomné

v označeném restriční fragmentu a také párující s částí adaptorové sekvence, přičemž alespoň jeden z uvedených primerů obsahuje na svém 3'-konci zvolenou sekvenci obsahující přinejmenším jeden nukleotid umístěný bezprostředně vedle nukleotidů účastnících se vytvoření dané rozpoznávací sekvence,

5

(d) označené restriční fragmenty hybridizované na uvedený primer nebo primery se amplifikují v přítomnosti požadovaných nukleotidů a DNA polymerázy nebo se provede elongace těchto hybridizovaných primerů podél označených restričních fragmentů, a

10

(e) amplifikované nebo elongované DNA fragmenty získané ve stupni (d) se identifikují nebo izolují.

15

Ve výhodném provedení tohoto postupu primer nebo primery obsahují sekvence, které mají stejnou nukleotidovou sekvenci jako terminální části řetězců na koncích uvedených označených restričních fragmentů, včetně nukleotidů účastnících se tvorby rozpoznávací sekvence pro uvedenou restriční endonukleázu a včetně přinejmenším části nukleotidů přítomných v ligovalných adaptorech, přičemž přinejmenším jeden z uvedených primerů má na svém 3'-konci zvolenou sekvenci obsahující přinejmenším jeden nukleotid umístěný bezprostředně vedle nukleotidů účastnících se vytvoření rozpoznávací sekvence pro uvedenou restriční endonukleázu.

20

25

Podle dalšího výhodného provedení mají primer nebo primery sekvence přesně párující s konstantní DNA sekvencí, tvořenou částí rozpoznávací sekvence restriční endonukleázy a sekvencí adaptoru. Při tomto postupu přinejmenším jeden primer obsahuje výhodně zvolenou sekvenci 1 až 10 nukleotidů. Podle dalšího výhodného provedení primery obsahují 10 až 50 nukleotidů a rozpoznávací sekvence restriční endonukleázy obsahuje 4 až 8 nukleotidů.

30

Rovněž je při provádění postupu podle vynálezu výhodné, jestliže nukleotidová sekvence primerů párující s adaptorem obsahuje 10 až 30 nukleotidů.

35

Adaptory jsou výhodně konstruovány takovým způsobem, že odpovídající rozpoznávací sekvence endonukleázy není při hybridizaci adaptoru na označené restriční fragmenty rekonstruována, přičemž primer nebo primery představují oligonukleotidy obsahující konstantní sekvenci přesně párující s alespoň jedním koncem sekvence alespoň jednoho označeného restričního fragmentu ve směsi, přičemž tato konstantní sekvence dané restriční endonukleázy a přinejmenším jeden z uvedených primerů obsahuje na svém 3'-konci nukleotidové sekvence účastnící se tvorby rozpoznávací sekvence 1 až 10 dalších zvolených nukleotidů.

40

Sekvence nukleových kyselin ve výchozí DNA je podle dalšího výhodného provedení alespoň zčásti neznámá.

45

Při provádění postupu podle vynálezu je výhodné, jestliže se použijí nejméně dvě od sebe odlišné restriční endonukleázy.

Podle dalšího výhodného provedení postupu podle vynálezu všechny primery obsahují stejnou konstantní nukleotidovou sekvenci. Rovněž je výhodné jestliže při provádění tohoto postupu podle vynálezu použije směs různých primerů. Přinejmenším jeden primer obsahuje výhodně na svém 3'-konci 1, 2 nebo 3 zvolené nukleotidy.

50

Podle dalšího výhodného provedení postupu podle vynálezu se ve stupni (a) použijí dvě odlišné restriční endonukleázy, přičemž přinejmenším jeden dvouřetězcový syntetický oligonukleotid použitý jako adaptor pro jednu z endonukleáz je biotinylován.

Podle dalšího výhodného provedení postupu podle vynálezu je alespoň jeden primer značený. Počet selektivních nukleotidů se výhodně volí k omezení počtu amplifikovaných restričních fragmentů na 5 až 200.

5 Ve výhodném provedení se podle vynálezu jako výchozí DNA k amplifikaci použije DNA genomu z lidského nebo živočišného vzorku, zvláště z tkáně nebo z krevního vzorku, přičemž je rovněž výhodné, jestliže se k amplifikaci použije DNA genomu rostliny nebo rostlinné tkáně. Podle dalšího výhodného provedení se jako výchozí DNA k amplifikaci použije DNA mikroorganismu.

10 Tento postup podle předmětného vynálezu může sloužit i identifikaci polymorfizmu DNA genomu mikroorganismu, rostliny nebo živočicha, včetně člověka, nebo fragmentů DNA, vzájemně nebo ve vztahu k odpovídající předem stanovené standardní DNA.

15 Kromě toho postup podle vynálezu může sloužit k identifikaci polymorfizmu DNA souvisejícího s geneticky podmíněnými vlastnostmi u člověka, nebo geneticky podmíněnými vlastnostmi u živočichů nebo pro identifikaci geneticky podmíněných vlastností u rostlin a pro identifikaci značení DNA na bázi tohoto polymorfizmu DNA.

20 Podle dalšího výhodného provedení postupu podle vynálezu se srovnávají alespoň dva nebo více amplifikovaných nebo elongovaných fragmentů DNA, identifikované nebo generované ve stupni (e) uvedeného způsobu pro detekci podobnosti mezi rostlinnými nebo živočišnými varietami, druhy, kultivary, mikroorganismy, nebo pro hodnocení genetické odlišnosti a charakteristiky uvedených rostlinných nebo živočišných variet, druhů, kultivarů, mikroorganismů.

25 Amplifikované nebo elongované fragmenty DNA produkované ve stupni (e) se ve výhodném provedení identifikují nebo izolují ve formě DNA otisků.

30 Identifikace DNA markerů vázaných s genetickým znakem vhodně zahrnují identifikaci polymorfizmu mezi výchozími DNA ze stejných živočišných druhů s odlišnými genetickými znaky a uvedení tohoto polymorfizmu do korelace s fenotypem uvedeného genetického znaku.

Výhodně postup amplifikace podle předmětného vynálezu dále zahrnuje stupně:

35 (f) izoluje se alespoň jeden identifikovaný nebo regenerovaný DNA fragment ve stupni (e),

(g) stanoví se nukleotidová sekvence prvních 8 až 10 nukleotidových zbytků vnitřně přiléhajících na rozpoznávací sekvenci restriční endonukleázy na obou koncích uvedených DNA fragmentů,

40 (h) zkonstruují se oligonukleotidové primery s nukleotidovou sekvencí podle primerů ze stupně (c) z nároku 1, přičemž zvolená sekvence nukleotidů obsahuje 5 až 10 nukleotidových zbytků odpovídajících prvním 8 až 12 nukleotidových zbytků vnitřně přiléhajících k restričním místům na obou koncích DNA fragmentu.

45 Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží postup přípravy sestavy amplifikovaných restričních fragmentů, jehož podstata spočívá v tom, že se

50 (a) amplifikuje podskupina restričních fragmentů ze směsi restričních fragmentů, získaných z výchozí DNA při použití způsobu podle některého z nároků 1 až 15,

(b) amplifikované prodloužené restriční fragmenty se od sebe oddělí,

(c) amplifikované restriční fragmenty se identifikují.

55

Tyto metody podle vynálezu mohou sloužit pro identifikaci polymorfizmu mezi různými výchozími DNA pocházejícími ze stejné skupiny živých organismů, přičemž podstata tohoto řešení spočívá v tom, že se identifikují rozdíly mezi amplifikovanými restrikčními fragmenty různých výchozích DNA.

5

Vynález je založen na použití nové aplikace PCR–reakce pro amplifikaci jednoho nebo většího počtu restrikčních fragmentů, získaných z komplexní směsi fragmentů DNA, získaných rozštěpením molekul DNA genomu působením restrikčních endonukleáz. Jednou ze zvláštních výhod vynálezu je umožnění amplifikace restrikčních fragmentů DNA v situacích, v nichž řetězec nukleotidů na 5'–konci a 3'–konci není stanoven. V takových případech není možno definovat obvyklé řetězce specifických primerů, hybridizující na každý ze řetězců restrikčního fragmentu, který má být amplifikován a není tedy možno použít žádnou ze známých amplifikačních metod.

10

Metodou podle vynálezu je možno použít například dvěma různými způsoby, které vedou ke dvěma různým typům konečných aplikací těchto postupů:

15

(1) Metody pro otiskování DNA genomů tak, že se náhodně vybere podskupina jednoho nebo většího počtu restrikčních fragmentů, které mají být amplifikovány metodou PCR. Vynález rovněž zahrnuje syntetické oligonukleotidy pro použití při provádění těchto postupů a některé aplikace uvedených metod, kterými mohou být například použití v kriminalistice pro otiskování DNA, identifikace mikroorganismů, identifikace odrůd, analýza plemen a vyšetřování DNA markerů vázaných na genetické prvky.

20

(2) Metody pro identifikaci jednoho nebo většího počtu předem vybraných fragmentů DNA, které mohou být polymorfní, při použití PCR–amplifikace. Vynález rovněž zahrnuje specifické syntetické oligonukleotidy použitelná k provádění těchto postupů a některé aplikace těchto metod, kterými mohou být například seriové vyšetřování geneticky podmíněných chorob u lidí, sledování dědičnosti agronomicky využitelných vlastností u rostlin a u živočichů při chovu a průkaz původce u infekčních onemocnění.

25

30

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je obecně graficky znázorněn způsob PCR–amplifikace označených restrikčních fragmentů, získaných štěpením DNA genomu působením restrikčních endonukleáz.

35

Na obr. 2 je znázorněn způsob ligace adaptorů na odlišné konce restrikčních fragmentů: posunutá zakončení a vyplněná zakončení.

Na obr. 3 je znázorněn PCR–amplifikace označených restrikčních fragmentů. Oblasti, označené orámováním, jsou adaptory, které jsou ligovány na restrikční fragmenty a primery, které jsou použity při provádění PCR–amplifikace. Šipky označují směr syntézy DNA.

40

Na obr. 4 je graficky znázorněno provádění PCR–amplifikace na označených restrikčních fragmentech.

45

Na obr. 5 je obecně znázorněna konstrukce selektivních primerů, které je možno použít při uskutečnění PCR–amplifikace označených restrikčních fragmentů. Šipkami jsou označeny obrácené opakující se řetězce na koncích restrikčních fragmentů. Selektivita primerů je ilustrována na dvou příkladech, v jednom z nich dochází k přesnému souladu a ve druhém z nich k úplnému nesouladu mezi selektivní sekvencí a sekvencí restrikčního fragmentu matricové DNA.

50

Na obr. 6 je znázorněn princip uskutečnění PCR–amplifikace při použití PCR–primeru, který volí molekuly matricové DNA s trinukleotidovým řetězcem, uloženým v bezprostřední blízkosti řetězce adaptoru.

- 5 Na obr. 7 je znázorněn průběh selektivní PCR–amplifikace, prováděné na označených restrikčních fragmentech.

Na obr. 8 je znázorněn princip amplifikace specifické pro fragmenty při použití kombinace dvou PCR–primerů, z nichž každý obsahuje 6 selektivních bází. Každý z primerů vytváří dvouřetězcovou strukturu v různých řetězcích restrikčních fragmentů, takže vzniká komplex primer/matrice, z něhož může být zahájena syntéza DNA, jak je naznačeno šipkami.

Na obr. 9 jsou znázorněny obecné prvky řetězce, které jsou rozpoznávány při provádění amplifikace, selektivní pro restrikční fragmenty včetně dvou nukleotidových řetězců, které jsou rozpoznávány a včetně vzdálenosti, která oba tyto řetězce od sebe odděluje.

Na obr. 10 jsou znázorněny typy variací nukleotidových sekvencí, které je možno prokázat při postupu identifikace polymorfizmu délky amplifikovaných fragmentů.

- 20 Na obr. 11 je znázorněn 1,0% agarozový gel s analýzou výsledků, získaných amplifikací DNA rajčete po rozštěpení restrikčním enzymem PstI při použití primerů se zvyšující se selektivitou.

Na obr. 12 je znázorněn 1,0% agarozový gel s analýzou výsledků, získaných specifickou amplifikací tří navzájem odlišných fragmentů DNA rajčete po rozštěpení restrikčním enzymem PstI při použití primerů, specifických pro fragmenty.

Na obr. 13 je znázorněn gel, obsahující 2,5 % polyakrylamidu a 1 % agarozy s DNA otisky, získanými selektivní amplifikací restrikčních fragmentů u dvou linií rajčat.

- 30 Na obr. 14 je znázorněna část 4,5% denaturačního polyakrylamidového gelu s DNA otisky ze 4 linií rajčat při použití SRFA a kombinace restrikčních enzymů PstI/Msel.

Na obr. 15 je znázorněna část 4,5% denaturačního polyakrylamidového gelu s DNA otisk z 10 linií Lactuca při použití SRFA a kombinace restrikčních enzymů PstI/Msel.

- 35 Na obr. 16 je znázorněn část 4,5% denaturačního polyakrylamidového gelu pro 2 linie kukuřice při použití SRFA a kombinace restrikčních enzymů PstI/TaqI a EcoRI/TaqI.

Na obr. 17 je znázorněna část 4,5% denaturačního polyakrylamidového gelu s DNA otisky ze 26 kmenů *Xanthomonas Campestris* s použitím SRFA a kombinace restrikčních enzymů ApaI/TaqI.

Na obr. 18 je znázorněna část 4,5% denaturačního polyakrylamidového gelu a DNA otisky, odebranými různým jednotlivcům 4 druhů domácích zvířat: použita byla kuřata, vepř, kráva a kuň, postup byl uskutečněn při použití SRFA a kombinace restrikčních enzymů SseI/Msel.

45 V popisu předmětného vynálezu a v následujících příkladech je užitá celá řada pojmů. Aby bylo možno zajistit jasné porozumění popisné části i patentových nároků včetně rozsahu vynálezu, bude dále osvětlena řada pojmů:

- 50 Restrikční endonukleáza nebo restrikční enzym je enzym, který rozpoznává specifickou sekvenci (rozpoznávací sekvence nebo místo) ve dvouřetězcové molekule DNA, přičemž při použití tohoto enzymu dojde ke štěpení obou řetězců molekuly DNA v každém z těchto rozpoznávacích míst.

– Restrikční fragmenty: molekuly DNA, produkované štěpením působením restrikční endonukleázy se označují jako restrikční fragmenty. Jakýkoliv daný genom se bude štěpit určitou

restrikční endonukleázou na určitou vymezenou skupinu restrikčních fragmentů. Fragmenty DNA, které jsou výsledkem štěpení restrikční endonukleázou je možno rozdělit a identifikovat pomocí gelové elektroforézy.

- 5 – Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP): DNA genomu dvou blízkých příbuzných organismů, bude vykazovat určité rozdíly mezi složením jednotlivých nukleotidových řetězců na řadě míst. V případě, že se tyto rozdíly vyskytnou v rozpoznávacím místě pro určitou restrikční endonukleázu, nebude se tato modifikovaná rozpoznávací sekvence štěpit v tomto místě. Stejným způsobem ovšem může dojít také k takové modifikaci řetězce, při níž vznikne nová rozpoznávací sekvence, která neexistuje u jiných organismů, a v tomto místě pak dojde ke štěpení řetězce DNA příslušným restrikčním enzymem. Alternativně bude inserce nebo delece nukleotidů vyskytující se v jednom organismu mezi dvěma rozpoznávacími místy pro restrikční endonukleázu modifikovat vzdálenost mezi těmito rozpoznávacími místy. V důsledku těchto skutečností může při štěpení DNA dvou organismů dojít ke vzniku restrikčních fragmentů s různou délkou. Dojde tedy k polymorfismu v délce restrikčních fragmentů, produkovaných štěpením DNA dvou uvedených organismů.
- 10 – Gelová elektroforéza: Aby bylo možno prokázat přítomnost restrikčních fragmentů je zapotřebí použít analytické metody pro frakcionaci molekul DNA s dvojitým řetězcem podle rozměrů těchto fragmentů. Nejběžnější užívanou technikou pro dosažení této frakcionace je elektroforéza na gelu. Rychlost, s níž se fragmenty DNA v takovém gelu pohybují závisí na jejich velikosti. Znamená to, že čím je fragment větší, tím kratší je jeho dráha od společného počátku. Fragmenty DNA frakcionované elektroforézou na gelu je možno přímo vizualizovat například barvením v případě, že množství odlišných fragmentů ve vzorku není veliké.
- 15 – Syntetické oligonukleotidy: jednořetězcové molekuly DNA obsahující s výhodou 10 až 50 bází a syntetizované chemickou cestou se označují jako syntetické oligonukleotidy. Obecně jsou tyto syntetické molekuly DNA konstruovány tak, aby obsahovaly jediný nukleotidový řetězec, přestože je možno syntetizovat skupiny molekul, které mají příbuzné řetězce a které současně mají odlišné složení nukleotidů ve specifických polohách v rámci nukleotidového řetězce. Pojem syntetického oligonukleotidu tedy bude užíván pro ty molekuly DNA, které mají jedinečnou nukleotidovou sekvenci. Pojem smíšené oligonukleotidy bude dále užíván pro skupiny příbuzných syntetických oligonukleotidů.
- 20 – Ligace: enzymatické reakce, katalyzovaná enzymem ligázou, při níž jsou dvě dvouřetězcové molekuly DNA spolu kovalentně spojeny se označuje jako ligace (vazba). Obecně jsou spolu oba řetězce DNA kovalentně spojeny, je však také možné zabránit ligaci jednoho z těchto dvou řetězců chemickou nebo enzymatickou modifikací jednoho z obou zakončení. V tomto případě dojde ke kovalentní vazbě pouze na jednom z těchto dvou řetězců DNA.
- 25 – Adaptory: krátké dvouřetězcové molekuly DNA s omezeným počtem párů bází, například 10 až 30 párů bází, zkonstruované takovým způsobem, aby bylo možno je navázat na konce restrikčních fragmentů. Adaptory jsou složeny ze dvou syntetických oligonukleotidů, jejichž nukleotidové řetězce jsou vzájemně částečně komplementární. V případě, že se tyto dva syntetické oligonukleotidy smísí, vytvoří strukturu s dvojitým řetězcem v roztoku za příslušných podmínek. Jedno ze zakončení molekuly adaptoru je konstruováno tak, že může být navázáno na zakončení restrikčního fragmentu, druhé z obou zakončení je konstruováno tak, že není možné je navázat.
- 30 – PCR–reakce, řetězová reakce s použitím polymerázy: jde o enzymatickou reakci, při níž jsou fragmenty DNA syntetizovány ze substrátové DNA in vitro. Při reakci se užívá dvou syntetických oligonukleotidů, jejichž řetězce jsou komplementární vzhledem k nukleotidovému řetězci v molekulách DNA, které jsou od sebe odděleny několika sty až několika tisíci páry bází a dále se užívá DNA–polymerázy, odolné proti působení tepla. Řetězcová reakce například může být tvořena sérií 10 až 30 cyklů. V každém z těchto cyklů je DNA substrátu nejprve denaturována při

vysoké teplotě. Po zchlazení materiálu budou syntetické oligonukleotidy, které jsou přítomny ve velkém přebytku, v roztoku vytvářet dvojřetězcové struktury s molekulami substrátové DNA na specifických místech molekul substrátové DNA, které mají komplementární nukleotidové sekvence. Komplexy oligonukleotid-substrátová DNA pak budou sloužit jako iniciační místa pro další syntézu DNA, katalyzovanou enzymem DNA-polymerázou. Tímto způsobem je syntetizován nový řetězec DNA, který je komplementárním řetězcem pro původní řetězec substrátové DNA.

– Amplifikace DNA: Pod tímto pojmem se označuje způsob syntézy nových molekul DNA s dvojitým řetězcem in vitro při použití PCR-reakce tak, jak byla vysvětlena v předchozím odstavci. Produkty této PCR-reakce se pak označují jako amplifikované fragmenty DNA.

– Primery: Obecně se termín primer užívá pro řetězec DNA, který může podnítit syntézu nového řetězce DNA. DNA-polymeráza nemůže totiž syntetizovat novou DNA bez primerů. Může pouze prodlužovat existující řetězec DNA při reakci, v níž je komplementární řetězec použit jako matrice, která řídí pořadí, v němž budou nukleotidy navázány. Jako primery budou v následujícím testu označovány molekuly syntetických oligonukleotidů, které se užívají při PCR-reakci k zahájení reakce.

– Southernova hybridizace: Účelem Southernovy hybridizace, která se často označuje také jako Southern blot je fyzikální přenos DNA frakcionované na agarozovém gelu za nosič, například na nylonovou membránu nebo na nitrocelulóзовý filtrační papír za současného uchování relativní polohy fragmentů DNA tak, jak k ní došlo v průběhu frakcionačního postupu. Postupem, jehož se využívá pro přenos z agarozového gelu na nosič je kapilární síla.

– Hybridizace nukleových kyselin: Hybridizace nukleových kyselin se užívá k detekci příbuzných řetězců DNA hybridizace jednořetězcové DNA na nosiči, například na nylonové membráně nebo na nitrocelulóзовém filtračním papíru. Molekuly nukleových kyselin, které mají komplementární řetězce budou znovu vytvářet svou strukturu s dvojitým řetězcem v případě, že budou smíseny v roztoku za příslušných podmínek. Dvojitá struktura řetězce se vytvoří mezi dvěma komplementárními nukleovými kyselinami s jednoduchým řetězcem i v případě imobilizace na nosiči. V průběhu Southernovy hybridizace k této situaci dochází.

– Hybridizační sonda: aby bylo možno detekovat určitý řetězec DNA při Southernově hybridizaci, nechá se reagovat značená molekula DNA neboli hybridizační sonda s frakcionovanou DNA, vázanou na nosič, například na nylonovou membránu nebo na nitrocelulóзовý filtrační papír. Oblasti filtru, které nesou řetězce DNA, komplementární ke značené sondě DNA budou samovolně označeny v důsledku nové vazby. Ty oblasti filtru, které takové značení obsahují je pak možno detekovat v závislosti na typu použitého značení. Hybridizační sonda je obvykle získána molekulárním klonováním specifického řetězce DNA z genomu kukuřice.

Vynález se specificky týká způsobu a prostředků pro aplikaci PCR-reakce pro detekci polymorfizmu restrikčních fragmentů (RFP) včetně polymorfizmu v jejich délce. Vynález poskytuje metodu pro detekci RFP, syntetické oligonukleotidy pro použití při provádění tohoto postupu podle vynálezu a kity obsahující prostředky k detekci RFP, přičemž postupy podle vynálezu je možno aplikovat při pěstování rostlin a chovu živočichů včetně hospodářských zvířat, dále je možno vynález použít při diagnostice geneticky podmíněných onemocnění, identifikaci organismů, typování v kriminalistice apod.

Ve specifickém provedení poskytuje vynález prostředky pro identifikaci restrikčních fragmentů určitého genomu nebo skupin restrikčních fragmentů z genomů různých organismů, mikroorganismů, rostlin, živočichů nebo lidí v případě, že tyto skupiny genomů jsou určitým způsobem geneticky vázány s určitými vlastnostmi nebo společně vytvářejí typ genomu, který je možno využít k identifikaci organismu, variety nebo jednotlivce.

55

Obecný postup podle vynálezu pro produkci a pro identifikaci restrikčních fragmentů zahrnuje použití restrikční endonukleázy, ligaci syntetických oligonukleotidů na tyto restrikční fragmenty a PCR–amplifikaci těchto restrikčních fragmentů, jak je znázorněno na obr. 1. Restrikční endonukleáza štěpí molekuly DNA genomu na specifických místech, rozpoznávacích místech za vzniku restrikčních fragmentů.

PCR–amplifikace restrikčních fragmentů je možno bez ohledu na to, zda je znám nukleotidový řetězec nebo zakončení restrikčních fragmentů uskutečnit podle vynálezu tak, že se nejprve na konce restrikčních fragmentů ligují syntetické oligonukleotidy (adaptory), takže každý restrikční fragment je opatřen dvěma označenými fragmenty, která slouží jako podklad pro zakotvení primerů, užitých při PCR–amplifikaci.

Po působení restrikčních enzymů vznikají buď rovná zakončení, v nichž vyvážejí terminální nukleotidy obou řetězců pár bází, nebo nepravidelně prodloužená zakončení, v nichž jeden ze dvou řetězců je na krátkou vzdálenost prodloužen (obr. 2). V případě restrikčních fragmentů se zarovnanými konci se užívají adaptory s jedním zarovnaným koncem. V případě nepravidelně zakončených restrikčních fragmentů se užívají adaptory s prodlouženým jedním řetězcem, komplementárním k prodlouženému řetězci restrikčního fragmentu. Užívají se tedy pro každý typ restrikčního fragmentu specifické adaptory, které se liší pouze na jednom ze zakončení tak, aby adaptor mohl být navázán na restrikční fragment. V typických případech jsou použité adaptory tvořeny dvěma syntetickými oligonukleotidy, které jsou částečně komplementární navzájem a které mají délku obvykle přibližně 10 až 30 nukleotidů, s výhodou 12 až 22 nukleotidů a které vytvářejí struktury s dvojitým řetězcem při vzájemném smísení v roztoku. Při použití enzymu ligázy jsou adaptory ligovány na směs restrikčních fragmentů. V případě, že se užije velkého molárního přebytku adaptoru ve srovnání s množstvím restrikčních fragmentů, je možno zajistit, že všechny restrikční fragmenty budou opatřeny adaptory na obou svých koncích. Restrikční fragmenty, připravené tímto způsobem se označují jako označené restrikční fragmenty a postup jímž se tyto fragmenty získávají, bude dále označován jako označování restrikčních fragmentů.

Adaptory mohou sloužit jako matrice pro primer se svrchu definovanými vlastnostmi, použité při následující PCR amplifikační reakci. Ve vhodném provedení vynálezu nese restrikční fragment na obou svých koncích tentýž adaptor a je tedy možno při amplifikaci těchto restrikčních fragmentů použít jediný primer, jak je znázorněno na obr. 3. Vzhledem k tomu, že v takovém případě jsou všechny restrikční fragmenty označeny stejným způsobem, je zřejmé, že při PCR–amplifikaci směsi těchto označených restrikčních fragmentů dojde k jejich amplifikaci synchronním způsobem. V dalším možném provedení lze užít ke štěpení DNA dva různé restrikční enzymy, na konce restrikčních fragmentů pak lze ligovat dva odlišné adaptory. V tomto případě je možno k amplifikaci uvedených restrikčních fragmentů použít dva různé PCR primery. V dalším výhodném provedení při použití dvou restrikčních enzymů je možno pro jedno ze zakončení použít biotinylovaný adaptor. Tímto způsobem je pak možno z komplexní směsi restrikčních fragmentů oddělit ty restrikční fragmenty, které alespoň na jednom svém konci nesou zakončení pro tento restrikční enzym při použití obvyklých postupů pro izolaci biotinylovaných molekul. Tento stupeň zmenšuje složitost výchozí směsi restrikčních fragmentů a tvoří stupeň v němž je možno směs před PCR amplifikací obohatit snížením počtu řetězců, které připadají pro amplifikaci v úvahu. Současná amplifikace několika různých fragmentů se často označuje jako mnohočetná PCR–reakce. Princip pro mnohočetnou amplifikaci restrikčních fragmentů je znázorněn na obr. 4.

Vynález je dále založen na definici specificky konstruovaných primerů a specifických metod pro směřování PCR–amplifikační reakce tak, že je možno dosáhnout řízené amplifikace a ve zvláštním provedení vynálezu může dojít pouze k amplifikaci malé podskupiny označených restrikčních fragmentů z těchto fragmentů, které jsou k dispozici.

Obecně je možno uvést, že materiál, získaný rozštěpením, zvláště DNA genomu živočicha, rostliny nebo člověka, restrikční endonukleázou obsahuje velké množství restrikčních fragmentů.

Počet těchto restrikčních fragmentů závisí na rozměru genomu a na frekvenci výskytu rozpoznávacího místa pro restrikční endonukleázu v genomu, což je opět primárně určováno počtem nukleotidů tomto rozpoznávacím místě. Počet nukleotidů v rozpoznávacích (cílových) místech běžně užívaných restrikčních endonukleáz se pohybuje v rozmezí 4 až 8. Rozměry genomu v organismu se mohou široce měnit od několika milionů párů bází v případě mikroorganismu do několika bilionů párů bází v případě rostlin a živočichů. To znamená, že se počet restrikčních fragmentů, získaných po rozštěpení molekul DNA restrikčním enzymem může měnit od několika se do několika milionů. Obecně je možno uvést, že počet restrikčních fragmentů je tak velký, že není možné identifikovat jednotlivé restrikční fragmenty v materiálu, získaném rozštěpením DNA genomu frakcionací gelovou elektroforézou. Z takového materiálu se obvykle získá nepřehledná směs překrývajících se pásů, která má vzhled nátěru.

Při PCR-amplifikaci označených restrikčních fragmentů by měla rovněž vzniknout taková nepřehledná směs pásů vzhledem k tomu, že by mělo dojít při PCR-reakci k synchronní koamplifikaci všech restrikčních fragmentů. Ve výhodném provedení vynálezu, které je možno použít pro DNA genomu velkých rozměrů je možno použít obecného postupu, který vede k omezení počtu restrikčních fragmentů, k jejichž amplifikaci má dojít. To je možno uskutečnit předběžným výběrem podskupiny označených (opatřených značkou) restrikčních fragmentů tak, že v průběhu amplifikační reakce PCR bude amplifikován jen relativně malý počet těchto označených restrikčních fragmentů.

Selektivní princip, definovaný v tomto provedení podle vynálezu spočívá ve zvláštní konstrukci oligonukleotidů, které budou použity jako primery pro PCR-amplifikaci, tak, jak je podrobněji znázorněno na obr. 5.

Označené restrikční fragmenty (opatřené značkou) mají následující obecnou strukturu: jde o variabilní řetězec DNA (odpovídající restrikčnímu fragmentu před jeho označením), který je na obou svých stranách opatřen obráceným řetězcem DNA (konstantní řetězec). Obrácený řetězec DNA (konstantní řetězec) DNA je složen z části rozpoznávacího (cílového) místa pro restrikční endonukleázu a z řetězce adaptoru, navázaného na oba konce restrikčního fragmentu. Variabilní řetězec restrikčního fragmentu, který je uložen mezi konstantními řetězci DNA je obvykle neznámý a bude tedy mít náhodné složení řetězce. V důsledku toho bude ve velké směsi restrikčních fragmentů nukleotidový řetězec, obklopující konstantní řetězec DNA mít zcela náhodné složení.

Z tohoto důvodu se vynález týká rovněž specifických PCR-primerů, které jsou tvořeny konstantní částí nukleotidového řetězce, která se při amplifikaci vztahuje k omezené podskupině získaných restrikčních fragmentů, a variabilní část řetězce. V konstantní části řetězce je řetězec nukleotidů konstruován tak, aby primer měl sekvenci přesně párující s konstantním řetězcem DNA jednoho z řetězců DNA na konci restrikčního fragmentu. Variabilní část řetězce pak je tvořena náhodně zvoleným nukleotidovým řetězcem s obsahem 1 až 10 bází.

Pod pojmem „variabilní řetězec“ se přesněji rozumí řetězec, který je tvořen vybranými nukleotidy, které vytvoří řetězec, který pak zůstane stálý pro účely amplifikace podskupiny restrikčních fragmentů. Ve zvláštním provedení vynálezu je možno použít několika odlišných primerů. V takovém případě mohou primery mít tentýž stálý řetězec a variabilní řetězce mohou být vytvořeny vybranými bázemi, které jsou u takto vytvořených primerů od sebe navzájem odlišné.

Je to právě tato adice těchto variabilních (zvolených) řetězců na 3'-zakončení primerů, která řídí předběžnou selekci označených restrikčních fragmentů, které budou amplifikovat v následujícím PCR-stupni: v případě, že se PCR-reakce uskuteční za příslušných podmínek, zahájí primery syntézu DNA pouze na těch označených restrikčních fragmentech, v nichž může variabilní řetězec DNA přesně párovat s řetězcem matrice označeného restrikčního fragmentu, jak je znázorněno na obr. 5.

- Tato selekce je determinována počtem nukleotidů ve variabilním řetězci primeru. Selektivita primerů se zvyšuje s počtem nukleotidů ve variabilní části řetězce. K označení nukleotidů ve variabilní části řetězce bude také užíván pojem „selektivní báze“, aby bylo zřejmé, že selekce těchto bází činí primer selektivním. Je zřejmé, že označený restriční fragment bude amplifikován pouze v tom případě, že selektivní báze použitého primeru bude rozpoznávat oba komplementární řetězce na koncích fragmentu. V případě, že primer odpovídá pouze jednomu zakončení, bude amplifikace spíše lineární než exponenciální a produkt nebude možno prokázat.
- Je možné předem stanovit stupeň selektivity, jehož je možno dosáhnout při použití variabilních řetězců s různým počtem selektivních bází, při použití obecného vzorce 4^{2n} , v němž n znamená počet selektivních bází: při použití jedné selektivní báze dojde k amplifikaci jednoho ze 16 prodloužených fragmentů, při použití dvou selektivních bází jednoho z 256 označených fragmentů, při použití tří selektivních bází jednoho z 4096 fragmentů, při použití 4 selektivních bází jednoho z 65 536 fragmentů atd. Jedno z výhodných provedení vynálezu tudíž umožňuje selektivně amplifikovat náhodnou podskupinu označených restričních fragmentů z jakéhokoliv rozštěpeného vzorku DNA genomu bez ohledu na počet fragmentů, který vznikne působením restričního enzymu.
- Ve výhodném provedení je počet selektivních nukleotidů volen tak, že počet restričních fragmentů, které budou amplifikovány je omezen na 5 až 200. Přestože tento počet je možno vypočítat dělením počtu fragmentů vzorce 4^{2n} , přesná předpověď není možná vzhledem k tomu, že ne všechny restriční fragmenty je možno amplifikovat se stejnou účinností. V praxi to znamená, že po amplifikaci je možno prokázat menší než teoreticky očekávané množství fragmentů. Je také nutno zdůraznit, že je možno užít směs dvou nebo většího počtu primerů. To umožní navíc k amplifikaci fragmentů, rozpoznávaných každým primerem, ještě amplifikaci fragmentů, které jsou rozpoznávány oběma primery. Konečně by mělo být zdůrazněno, že selekce, založená na tvorbě párů bází mezi selektivními nukleotidy primeru a komplementární matricí je silně ovlivněna teplotou, která se volí pro vazbu při PCR-reakci. V případě, že tato teplota je nižší než nebo příliš blízká teplotě tání komplexu primeru a matrice, budou primery napojovat řetězce matrice, které si přesně neodpovídají, takže v komplexu se objeví místa, v nichž se nevytvoří správné páry bází. K tomu by nemělo docházet, protože tento stav vede k amplifikaci daleko většího množství fragmentů, než bylo předpokládáno a získají se daleko variabilnější výsledky.
- Produkty PCR-reakce, které je možno získat v rámci vynálezu je možno identifikovat s použitím standardních frakcionačních metod pro dělení molekul DNA na základě jejich velikosti s následným barvením molekul DNA příslušnými činidly. Je také možno postupovat tak, že se primery použité pro PCR-amplifikaci označí vhodnou radioaktivně značenou látkou nebo fluorescenčním chromoforem tak, aby byla možná identifikace reakčního produktu po frakcionaci na základě velikostí molekul. Ve výhodném provedení podle vynálezu jsou PCR-produkty frakcionovány elektroforézou na gelu při použití standardních gelových maticí, jako jsou například agarosa, polyakrylamidový gel nebo směs agarozy a polyakrylamidu. PCR-produkty, získané způsobem podle vynálezu budou dále označovány jako amplifikované restriční fragmenty (ARF).
- Prostředky a metody podle vynálezu je možno použít k produkci skupin ARF z jakéhokoliv složitého genomu po jeho rozštěpení restričními enzymy. Vynález umožňuje uvést do souladu počet získaných restričních fragmentů s frakcionačním gelovým systémem, jehož bude použito k dělení ARF. Ve specifickém provedení vynálezu jsou selektivní primery zkonstruovány tak, aby vzniklo 5 až 10 ARF, které se pak dělí elektroforézou na agarozovém gelu. V dalším specifickém provedení se užívá selektivních primerů, které jsou konstruovány pro vznik 20 až 50 ARF, které se pak dělí systémem elektroforézy na gelu s vysokou rozlišovací schopností, například na polyakrylamidovém gelu nebo na gelu s obsahem směsi agarozy a polyakrylamidu.

V jednom z výhodných provedení se volí enzym nebo enzymy tak, že se získají restriční fragmenty s velikostí 20 až 1000 párů bází vzhledem k tomu, že, jak je obecně známo pro PCR-amplifikaci, dochází k neúčinnější amplifikaci právě v případě této velikosti fragmentů. Přestože je možno celou řadu fragmentů podrobit frakcionaci na různých standardních gelových matricích, nejlepších výsledků je možno dosáhnout frakcionaci na denaturačním polyakrylamidovém gelu, tak, jak se běžně používá pro analýzu řetězce DNA.

Podle vynálezu je možno získat různé skupiny ARF pro každý selektivní primer v průběhu PCR-amplifikační reakce. ARF, identifikované po tomto dělení představuje dobře reprodukovatelné otisky DNA genomu. Takovéto otisky mohou mít různé použití, například otisky pro kriminalistické účely, pro diagnostickou identifikaci organismů a také pro identifikaci druhů, ras, variet nebo jednotlivců. Úroveň identifikace je možno stanovit podle stupně podobnosti (stupně variability) u různých členů specifické skupiny. Variabilita nebo podobnost je určována stupněm variace nukleotidového složení příbuzných genomů. Základním principem, v němž vynález vychází je skutečnost, že v každém amplifikovaném restričním fragmentu je možno zjistit dva nukleotidové řetězce, které jsou od sebe odděleny řetězcem s určitou danou délkou, jak je zřejmé z obr. 9. Každý ze dvou nukleotidových řetězců je tvořen dvěma částmi:

- (a) rozpoznávacím místem (cílovým místem) pro restriční endonukleázu,
- (b) a nukleotidovým řetězcem, přilehlým k rozpoznávacímu místu a nacházejícím se v selektivním primeru.

V příbuzných organismech, druzích, varietách, rasách nebo u příbuzných jednotlivců jsou uvedené řetězce a jejich relativní vzdálenosti konzervovány v menší nebo větší míře. To znamená, že uvedené otisky představují bázi pro stanovení stupně příbuznosti mezi řetězci v genomech. Na druhé straně je možno využít rozdíly v ARF ke vzájemnému odlišení genomů. Specifické výhody vynálezu ve srovnání s jinými postupy pro otiskování genomů je vysoká rozlišovací schopnost, jíž je tímto postupem možno dosáhnout: je totiž možno současně srovnávat několik desítek nebo i stovek ARF.

Další zvláštní možností aplikace je seriové vyšetření nebo identifikace polymorfismu restričních fragmentů (RFP). Změny v nukleotidovém složení DNA genomu často vedou k polymorfismu restričních fragmentů: navíc zařazené nebo vypuštěné části pak ovlivní velikost restričních fragmentů, které je obsahují, jak je zřejmé z obr. 8, změny v nukleotidech pak mohou mít za následek zrušení rozpoznávacího (cílového) místa pro působení restriční endonukleázy nebo vznik nového rozpoznávacího místa pro tento enzym, jak je zřejmé z obr. 11. Nejužívanějším postupem pro identifikaci takových změn je metoda Southern blot, při níž se používá klonovaných sond DNA, kde o techniku, která se často označuje jako detekce polymorfismu délky restričních fragmentů, RFLP. Tato metoda zahrnuje extenzivní seriové vyšetření náhodně klonovaných fragmentů DNA při provádění Southern blot, tak aby bylo možno prokázat asociaci RFLP v různých genomech. V souladu s prováděním postupu podle vynálezu je možno RFP identifikovat přímým srovnáním ARF, získaných z různých genomů. V principu je postup podle vynálezu v případě detekce RFP citlivější vzhledem k tomu, že nedochází pouze k detekci rozdílů mezi rozpoznávacími místy pro restriční endonukleázu, nýbrž také k detekci rozdílů v přilehlých nukleotidových řetězcích, obsažených v selektivních PCR-primerech. V důsledku toho představuje postup podle vynálezu v současné době nejvýhodnější postup pro detekci RFLP.

RFLP je nyní možno využít pro různé aplikace včetně otisků ke kriminalistickým účelům, ke sledování dědičně podmíněných onemocnění u lidí a ke sledování dědičnosti z agronomického hlediska sledovaných vlastností u rostlin a při chovu hospodářských a jiných zvířat. Základním principem je, že určitý polymorfismus DNA je úzce spojen se specifickými genetickými vlastnostmi a je možno jej využít ke sledování přítomnosti nebo nepřítomnosti specifických genetických vlastností.

V souladu s postupem podle vynálezu je možno analýzu ARF využít k definici genetického spojení polymorfních ARF se specifickými genetickými vlastnostmi. Polymorfní ARF tohoto typu bude dále označovány názvem polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) k odlišení těchto fragmentů od polymorfizmu DNA typu RFLP, tak, jak je možno jej prokázat s použitím metody Southern blot při použití klonovaných sond DNA.

Jedna ze zvláštních aplikací vynálezu spočívá v detekci AFLP ve spojení se specifickými genetickými vlastnostmi. Aplikace zahrnuje analýzu ARF vzorků získaných při použití odlišných specifických primerů v materiálu, který byl získán působením restričních enzymů na DNA genomu blízké příbuzných jednotlivců s odlišnými genetickými vlastnostmi a použití analytických postupů, jimiž je možno zjistit korelaci mezi dědičností jednoho nebo většího počtu AFLP a genotypu, projevujícího se specifickými genetickými vlastnostmi.

Ve druhém výhodném provedení zahrnuje vynález použití postupu podle vynálezu pro identifikaci jednoho nebo většího počtu specifických restričních fragmentů. Určitý specifický restriční fragment je možno amplifikovat z komplexní směsi označených restričních fragmentů tak, že se nejprve stanoví nukleotidový řetězec prvních 8 až 12 bází na každém konci restričního fragmentu. Na základě těchto sekvencí je pak možno konstruovat dva primery vždy s obsahem 5 až 10 nukleotidů, s řetězcem komplementárním k řetězci v bezprostřední blízkosti místa působení restričního enzymu v komplementárním řetězci restričního fragmentu. Při použití skupin takových primerů je po PCR-amplifikaci možno získat jediný amplifikovaný fragment. Restričním fragmentem, použitým při tomto postupu může být buď klonovaný restriční fragment, nebo amplifikovaný restriční fragment. Vzhledem k tomu, že celou řadu restričních fragmentů není možno příliš účinně amplifikovat, spočívá výhodný postup podle vynálezu pro identifikaci polymorfních DNA markerů v tom, že se nejprve pro identifikaci polymorfních DNA markerů v tom, že se nejprve amplifikuje náhodně zvolená skupina fragmentů a identifikují se AFLP, poskytující po PCR-amplifikaci silné pásy. Tyto vzorky je pak možno charakterizovat analýzou řetězce k vytvoření specifických primerů pro restriční fragmenty. V typických případech je možno AFLP izolovat vyříznutím odpovídajícího pásu DNA z gelu a pak stanovit nukleotidový řetězec na obou koncích k průkazu řetězce prvních 5 až 10 nukleotidů, bezprostředně přiléhajících k rozpoznávacímu místu restriční endonukleázy. Jakmile jsou tyto nukleotidové řetězce známy, je možno zkonstruovat specifické primery pro restriční fragmenty, které budou amplifikovat pouze jediný restriční fragment z rozštěpené DNA genomu. V tomto specifickém provedení vynálezu je možno použít pro detekci specifického restričního fragmentu dvou od sebe odlišných selektivních primerů. V každém ze dvou selektivních primerů se pak selektivní báze volí tak, že jsou komplementární vzhledem k řetězci nukleotidů, který je bezprostředně vázán na označené místo pro restriční endonukleázu, jak je znázorněno na obr. 8. Počet selektivních bází pro každý primer závisí na komplexnosti směsi fragmentů po působení restričních endonukleáz.

Technika PCR se v posledních několika letech nesmírně rozvinula a rychle se stává jednou z nejužívanějších metod v lidském diagnostickém lékařství. Použití tohoto postupu zahrnuje mimo jiné detekci infekčních onemocnění a dědičně podmíněných onemocnění. Každá diagnostická zkouška je založena na použití dvou specifických syntetických oligonukleotidů, které se užívají jako primery při provádění PCR-reakce za získání jednoho nebo většího počtu fragmentů DNA se specifickou délkou. Při detekci onemocnění je zkouška schopna prokázat existenci i jen jediné molekuly DNA ve vzorku, která poskytuje charakteristický fragment. V případě geneticky podmíněných onemocnění se primery konstruují tak, že jejich produkty mohou rozlišovat mezi normální a chorobou pozměněnými alelami. Rozlišení je možné na základě odlišnosti řetězce v segmentu DNA genomu který je komplementární k primeru nebo na základě odlišné vzdálenosti mezi oběma primery.

Vzhledem k tomu, že primery mají nesmírně vysoký stupeň specifičnosti, přičemž je možné sledovat současně různá onemocnění, se tento postup často označuje jako PCR multiplex. Tento postup však trpí omezením, které spočívá v tom, že je možnou současně sledovat jen několik,

obvykle 5 až 8 různých onemocnění. Vědeckým podkladem tohoto omezení je skutečnost, že optimální podmínky pro PCR–amplifikaci (teplota pro vazbu, koncentrace hořčičných iontů, koncentrace primeru) se podstatně mění v závislosti na použitém páru primerů. V případě PCR multiplex je proto často nutné volit kompromisní podmínky, při nichž všechny primery mohou poskytnout zjistitelné produkty. Kromě svrchu uvedeného jevu existuje ještě velký rozdíl mezi účinností amplifikace různých fragmentů. V důsledku obou uvedených omezení často může dojít k tomu, že produkty některých párů primerů nejsou při provádění PCR multiplex prokazatelné.

Postup podle vynálezu v podstatě odstraňuje svrchu uvedená omezení PCR multiplex vzhledem k tomu, že všechny primery, použité při provádění tohoto postupu mají podstatnou část svého nukleotidového řetězce společnou. Mimoto dochází při selekci AFLP k selekci DNA markerů, k jejichž amplifikaci dochází se stejnou účinností. To znamená, že v případě optimálních podmínek pro uskutečnění PCR–amplifikace pro různé selektivní primery dochází k daleko menším variacím, než jaké je možno pozorovat v případě běžně užívaných primerů, specifických pro určitý řetězec. V podstatě tedy jde o ideální kompromis mezi počtem bází syntetického oligonukleotidu, jehož je zapotřebí k dosažení požadované specifčnosti při detekci jediného určitého fragmentu DNA dané velikosti ve složitém genomu, tak jak bylo svrchu vypočítáno a mezi délkou a složením oligonukleotidu, které jsou optimální pro účinnou PCR–amplifikaci. Postup podle vynálezu proto představuje dosud nejvýhodnější postup pro PCR multiplex.

Vynález tedy poskytuje obecnou metodu izolování DNA markerů z jakéhokoliv genomu a pro použití těchto DNA markerů ve všech myslitelných aplikacích otisků DNA.

25 Příklady provedení vynálezu

Postup podle vynálezu bude v dalším blíže objasněn s pomocí konkrétních příkladů, které jsou ovšem pouze ilustrativní a nijak neomezují rozsah předmětného vynálezu.

30

Příklad 1

Selektivní amplifikace restričních fragmentů DNA z rajčete při použití PstI.

35 A) Izolace a modifikace DNA

40 Celková DNA z rajčete (*Lycopersicon esculentum* c.v. Moneyamarker) byla izolována z mladých listů metodou podle publikace Bernatzki a Tansley, *Theor. Appl. Genet.* 72, 314 – 321. Typický výtěžek byl 50 až 100 mikrogramů DNA na 1 gram čerstvých listů. DNA byla rozštěpena při použití enzymu PstI (Pharmacia) a na získané restriční fragmenty byly navázány adaptory PstI s dvojitým řetězcem (ds) dále popsaným způsobem. Tyto adaptory měly následující strukturu

5- CTCGTAGACTGCGTACATGCA - 3

3- CATCTGACGCATGT - 5

3'–TGCA–přečnickující zakončení v těchto adaptorech se váže na prodloužená zakončení, vytvořená působením PstI. Po navázání na tento adaptor nedochází k obnovení rozpoznávacího místa pro PstI, řetězce CTGCAG vzhledem k tomu, že 5'–C–zakončení je nahrazeno A. Vazná reakce byla navržena takovým způsobem, že konečným výsledkem je téměř výlučně molekula s vazbou fragmentu DNA na adaptor. Tohoto cíle bylo dosaženo tak, že 1) byly užity nefosforylované adaptory, vylučující vzájemnou vazbu adaptoru na adaptoru a 2) vazba a restriční reakce byly provedeny současně. Druhé z uvedených opatření zajistí, že dojde

k restrikci jakéhokoliv produktu, který je vytvořen vazbou dvou restrikčních fragmentů navzájem a tím dojde k téměř úplnému vyloučení tohoto typu produktů. Produkty, vytvořené vazbou adaptoru na restrikční fragment nemohou být restrikčním enzymem rozštěpeny vzhledem k tomu, že u těchto produktů nedochází ke znovuvytvoření místa štěpení pro enzym PstI. Při vazbě adaptoru byly použity následující reakční podmínky:

- 2 mikrogramy DNA z rajčete
- 0,2 mikrogramu adaptoru
- 20 jednotek PstI
- 1 jednotka T4 DNA-ligázy
- 10 mM Tris.HAc o pH 7,5, 10 mM MgAc, 50 mM KAc,
- 2 mM dithiothreitolu, 0,5 mM ATP

Reakce k uskutečnění vazby se provádí v reakčním objemu 20 mikrolitrů celkem 3 hodiny při teplotě 37 °C. Po vazbě adaptoru se nenavázané řetězce adaptoru odstraní selektivním vysrážením. K tomuto účelu se objem reakční směsi zvýší na 100 mikrolitrů a přidá se NH₄ do konečné koncentrace 2,5 M. Pak se přidá ještě 100 mikrolitrů ethanolu s teplotou -20 °C a směs se inkubuje 5 minut při teplotě místnosti. Pak se DNA oddělí odstředěním celkem 10 minut při 14 000 otáčkách za minutu v chlazené Eppendorfově odstředivce při teplotě 4 °C. Usazenina DNA se pak jednou promyje 0,5 ml 70% ethanolu při teplotě místnosti a pak se rozpustí ve 40 mikrolitrech T0,1E (10 mM Tris.HCl o pH 8,0, 0,1 mM EDTA). DNA se pak skladuje při teplotě -20 °C. Selektivní srážení, tak, jak bylo popsáno účinně odstraní nenavázané adaptory z reakční směsi, současně však dochází také ke ztrátě malých fragmentů DNA (200 párů bází a menší).

B) Amplifikační reakce

DNA, připravená svrchu uvedeným způsobem byla užita jako matrice pro amplifikaci PstI-fragmentů. Reakční směs pro PCR-reakci v tomto případě obsahovala následující složky:

- 1 ng matricové DNA
- 150 ng primeru
- 1 jednotku Taq DNA-polymerázy (Perkin Elmer)
- 200 mikromol všech čtyř dNTP
- 10 mM Tris.HCl o pH 8,5, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl
- H₂O do celkového objemu 50 mikrolitrů

Reakční směs byla převrstvena 20 mikrolitry lehkého minerálního oleje, aby nedošlo k odpařování v průběhu amplifikační reakce. PCR-reakce byla uskutečněna na zařízení Perkin Elmer Thermal Cycler při použití následujících typů cyklů: 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 60 °C, pak vzestup teploty od 60 do 72 °C rychlostí 1 °C za 5 sekund a 2,5 minuty při 72 °C. Bylo uskutečněno celkem 33 cyklů. Po ukončení reakce bylo přidáno 20 mikrolitrů chloroformu a 10 mikrolitrů barviva, v tomto případě 50% sacharóza s 0,1 % barviva Oraž G (Merck). Barvivo bylo důkladně promíseno s reakční směsí a směs byla krátce odstředěna k odstranění organické fáze (minerální olej a chloroform) z reakční směsi, doplněné barvivem. Pak bylo 20 mikrolitrů reakční směsi analyzováno na 0,1% agarozovém gelu.

C) Amplifikace DNA z rajčete při použití primerů se zvyšující se selektivitou

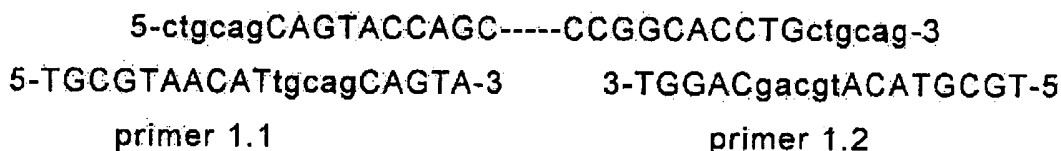
DNA rajčete byla rozštěpena působením restrikčního enzymu PstI a zakončení byla prodloužena při použití PstI-adaptoru za svrchu uvedených podmínek. Byly zvoleny čtyři odlišné primery s následujícími řetězci:

E) Selektivní amplifikace jediného restrikčního fragmentu

Pro 3 náhodně zvolené PstI-fragменты DNA rajčete byly zkonstruovány tři skupiny primerů, šlo o fragmenty, z nichž byl znám řetězec, těsně sousedící s místem působení enzymu PstI. Skupiny primerů s obsahem 5 selektivních nukleotidů byly zkonstruovány následujícím způsobem:

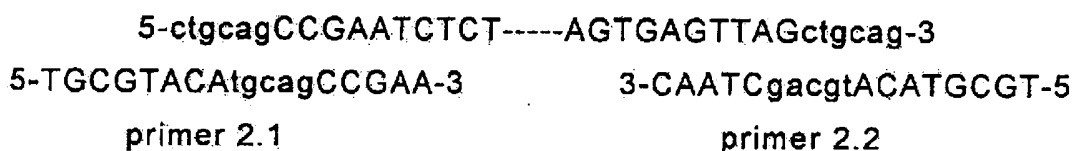
Skupina primerů 1

10 Řetězec 1



Skupina primerů 2

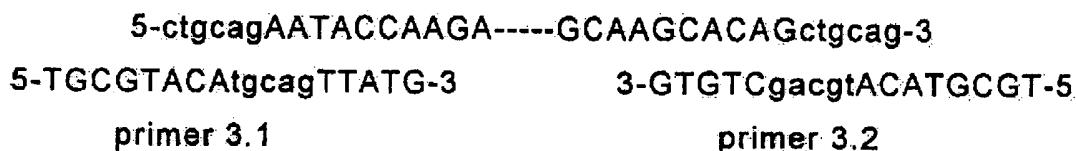
Řetězec 2:



15

Skupina primerů 3

Řetězec 3:



20 DNA rajčete byla rozštěpena enzymem PstI a na zakončení restrikčních fragmentů byly navázány adaptory svrchu uvedeným způsobem. Tato DNA byla pak užita jako matrice při PCR-reakci s použitím skupin primerů 1, 2 nebo 3 a za svrchu uvedených podmínek. Produkty z každé PCR-reakce byly analyzovány na 1,0% agarozovém gelu. Výsledek je znázorněn na obr. 12. Na obr. 12 je znázorněno 13 drah, z nichž ve drahách 1, 2, 12 a 13 se nachází značící DNA. Velikost
25 molekul této značící DNA (v kilobázích, kb) je uvedena na obou stranách gelu. Ve drahách 3, 6 a 9 je znázorněna DNA plazmidu s každým ze tří fragmentů o restrikci enzymem PstI za vzniku fragmentu vektoru, pUC18 (Yanisch-Perron a další, Gene 33, 103–119) a vloženého PstI-fragmentu. Ve drahách 4 a 5 je produkt amplifikace při použití skupiny primerů 1, 5 ft odpovídající DNA plazmidu a 1 ng celkové DNA genomu. Ve drahách 7 a 8 je znázorněna
30 amplifikace při použití skupiny primerů 2, DNA plazmidu a celkové DNA genomu a v drahách 10 a 11 je znázorněna amplifikace při použití skupiny 3 primerů. Znázorněné výsledky prokazují, že je možné dosáhnout amplifikace jediného PstI-fragmentu ze směsi alespoň 20 000 fragmentů

při použití selektivní amplifikace fragmentů s použitím primerů, obsahujících 5 selektivních nukleotidů.

F) Identifikace polymorfizmu DNA s použitím SRFA

5

V předchozích kapitolách bylo jasně prokázáno, že při použití selektivní amplifikace restrikčních fragmentů je tyto fragmenty možno amplifikovat, a to buď náhodným způsobem, nebo může jít o amplifikaci specifických restrikčních fragmentů v případě, že je k dispozici informace o složení řetězce. Mělo by tedy být možné prokázat polymorfizmus cílových restrikčních míst mezi dvěma jednotlivci téhož druhu. Tato metoda bude dále popsána pro dvě linie rajčat, které jsou si velmi příbuzné, avšak liší se přítomností genu pro odolnost proti nematodům na kořenech rostlin, *Mi*, v jedné z uvedených linií. Tento gen *Mi* má svůj původ v *Lycopersicon peruvianum*, což je vzdáleně příbuzný druh vzhledem k požitelným rajčatům *Lycopersicon esculentum*. Tento gen byl uložen do rajčat *L. esculentum* křížením a následným dvanáctinásobným zpětným křížením s původní rostlinou *L. esculentum* a pak selekcí na přítomnost genu *Mi*. Z uvedeného důvodu se obě použité linie rajčat od sebe liší pouze malou částí svého genetického materiálu, to znamená genem *Mi* a oblastí v jeho bezprostřední blízkosti. Bylo vypočítáno, že oblast *Mi* tvoří méně než 1 % genomu této linie při použití klasických genetických metod.

20

DNA byla izolována ze dvou linií rajčat (linie 83M-71392, *Mi*-senzitivní a linie 83M-71398, *Mi*-odolná, obě byly získány od De Riter Seeds, Bleiswijk, Nizozemí), tyto linie byly rozštěpeny působením restrikčního enzymu *Pst*I a opatřeny adaptory svrchu uvedeným způsobem. Pak byl proveden velký počet amplifikačních reakcí při použití primerů, které se od sebe lišily ve svém prodloužení obsahem selektivních nukleotidů. Byly užity tři selektivní nukleotidy a kromě jednotlivých primerů byly použity také kombinace dvou různých primerů. Výsledky reakcí byly analyzovány na gelech se směsí polyakrylamidu a agarozy, bylo užito 2,5 % polyakrylamidu a 1,0 % agarozy při poměru akrylamidu k bisakrylamidu 20:1. Analýza byla uskutečněna na gelu, uloženém v jednotce Proteam II (Biorad) při použití dělicích přepážek 1,5 mm. Bylo užito celkem 16 různých primerů v 16 reakcích, v nichž byl použit vždy jeden primer a ve 120 reakcích, při nichž byly použity všechny možné kombinace dvou primerů. Typický příklad gelu se šesti těmito kombinacemi je znázorněn na obr. 13. Dráhy 1 a 14 tohoto gelu obsahují značící DNA, velikost molekul v kilobázích je uvedena na pravé straně gelu. Ve drahách 2 a 3, 4 a 5, 6 a 7 atd. jsou uloženy produkty amplifikace při použití specifického primeru nebo při použití páru primerů při odebrání materiálů ze svrchu uvedených dvou linií rajčat. Při sériovém vyšetřování materiálu na polymorfizmus cílových míst pro působení restrikčních enzymů byla získána řada fragmentů, z nichž tři fragmenty byly obsaženy ve velkém množství, tyto fragmenty jsou znázorněny ve drahách 9, 11 a 12 na obr. 13 (znázornění pomocí malého kroužku). Je pravděpodobné, že polymorfnní pásy ve drahách 9 a 11 jsou totožné vzhledem k tomu, že při obou reakcích byl použit tentýž primer (rozdíl spočívá pouze v použití druhého primeru ve dráze 11). Oba polymorfnní fragmenty v drahách 11 a 12 byly z gelu vyříznuty, gel byl rozrušen protlačením jehlou velikosti 18 a DNA byla z gelu vymyta elucí pomocí difuze ve 200 mikrolitrech 100 mM tris.HCl o pH 8,0, 10 mM EDTA. 2 mikrolitry materiálu byly použity pro replifikaci uvedených fragmentů, jak již bylo svrchu popsáno. Ve 200 ng každého fragmentu byla vyplněna zakončení při použití T4-DNA-polymerázy a pak byl materiál navázán na 100 ng plazmidového vektoru pUC18 (Yanisch-Perron a další, Gene 33, 103-119) po rozštěpení enzymem *Sma*I. Směs, získaná vazbou, byla užita k transformaci *E. coli* a pro každý fragment byl zvolen jeden klon rekombinantní *E. coli* pro analýzu řetězce. Všechny uvedené manipulace byly prováděny při použití standardních postupů podle publikace Sambrook, Fritsch a Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

50

Byly syntetizovány dvě skupiny primerů s obsahem šesti selektivních nukleotidů na bázi řetězců svrchu uvedených dvou fragmentů. Bylo možno amplifikovat každý fragment specificky při použití uvedených skupin primerů. Byly amplifikovány pouze fragmenty z té linie rajčat, z níž pocházely. To znamená, že u uvedených skupin primerů bylo možno pozorovat tentýž

polymorfizmu, jaký byl původně prokázán u primerů s obsahem tří selektivních nukleotidů, které byly užity k průkazu tohoto polymorfizmu.

5 **Příklad 2**

Selektivní amplifikace restričních fragmentů DNA rajčete při použití dvou restričních enzymů

10 V příkladu 1 byl osvětlen princip selektivní amplifikace restričních fragmentů (SRDA) při použití DNA rajčete a restričního enzymu PstI. V tomto případě bude popsána amplifikace typu SRDA při použití dvou restričních enzymů, PstI a MseI.

Izolace a modifikace DNA

15 Veškerá DNA rajčete byla izolována z mladých lístků způsobem, který byl popsán v příkladu 1. Dva páry tak zvaných izogenických linií byly použity jako zdroj DNA a byly označeny Gem^R a Gem^S a GCR26 a GCR151 (tyto linie jsou popsány v následujících publikacích: Denby a Williams, 1962, Can. J. Plant Sci. 42, 681–685, Smith a Ritchie, 1983, Plant. Mol. Biol. Rep., 1, 41–45). Dva vzorky, jeden z každého páru izogenických linií jsou geneticky velmi podobné,
20 avšak liší se od sebe přítomností řetězce pro odolnost proti patogenní houbě *Verticillium albo-atratum*.

Prvním stupněm při modifikaci vzorků DNA bylo štěpení těchto vzorků při použití dvou restričních enzymů, PstI a MseI. Rozštěpení DNA a také následné navázání adaptorů na fragmenty DNA bylo prováděno v tomtéž pufru, označeném RL-pufr (pufr pro restrikci a vazbu),
25 pufr obsahoval následující složky: 10 mM Tris.HAc, 10 mM MgAc, 50 mM KAc a 5 mM DTT, pH 7,5.

Štěpení DNA restričními enzymy PstI a MseI

30

Štěpení DNA bylo prováděno při použití následujících materiálů:

2,5 mikrogramů DNA
12,5 jednotek PstI (Pharmacia, 10 jednotek/mikrolitr)
35 12,5 jednotek MseI (N.E. Biolabs, 4 jednotky/mikrolitr)
5,0 mikrolitr 10 x RL-pufr
H₂O do 50 mikrolitrů

Inkubace reakční směsi byla prováděna jednu hodinu při teplotě 37 °C.

40

Následujícím stupněm při modifikaci DNA byla vazba molekul adaptorů na zakončení fragmentů DNA. Nejprve bylo zapotřebí připravit příslušné molekuly adaptorů s dvojitými řetězci dále uvedeným způsobem.

45 **Příprava adaptorů**

Adaptor MseI má následující řetězec:

5-GACGATGAGTCCTGAG-3

3-TACTCAGGACTCAT-5

Pro přípravu roztoku 50 pmol/mikrolitr tohoto adaptoru bylo smíseno 8 mikrogramů, 1430 pmol 16-meru s řetězcem nukleotidů 5-GACGATGAGTCCTGAG-3 s 7 mikrogramy, 1430 pmol 14-meru 5-TACTCAGGACTCAT-3 v celkovém objemu 28,6 mikrolitrů vody.

5

Adaptor PstI má následující řetězec:

5-bio-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3

3-CATCTGACGCATGT-5

Pro přípravu roztoku 5 pmolu/mikrolitr tohoto adaptoru bylo smíseno 5,25 mikrogramu, 715 pmol biotinylovaného 21-meru 5-bio-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3 s 3,5 mikrogramy, 715 pmolu 14-meru 5-TGTACGCAGTCTAC-3 v celkovém objemu 143 mikrolitrů vody.

10

Vazba molekuly adaptoru

15 K rozštěpené DNA bylo přidáno 10 mikrolitrů směsi, která obsahovala následující složky:

1 mikrolitr PstI bio-adaptoru (= 5 pmol)

1 mikrolitr MseI adaptoru (= 50 pmol)

1,2 mikrolitru 10 mM ATP

20

1 mikrolitr 10 x RL-pufu

1 jednotka T4 DNA-ligázy (Pharmacia, 5 jednotek/mikrolitr)

H₂O do 10 mikrolitrů

25

Výsledná reakční směs v množství 60 mikrolitrů byla inkubována celkem 3 hodiny při teplotě 37 °C.

30

Adaptory byly navrženy takovým způsobem, aby po ukončení vazby nedošlo k opětovnému vzniku míst působení restričního enzymu, užitého ke štěpení. Tak je možno zabránit vzájemné vazbě restričních fragmentů vzhledem k tomu, že restriční enzymy si v průběhu vazebné reakce uchovávají svoji účinnost. Vzájemná vazba adaptorů není uskutečnitelná z toho důvodu, že adaptory nejsou fosforylovány, jak je již podrobněji vysvětleno v příkladu 1.

Selekce biotinylovaných fragmentů

35

Příprava matricové DNA pro SRFA s použitím dvou restričních enzymů obvykle zahrnuje ještě další stupeň, který není užit v případě, že se SRFA provádí s použitím pouze jednoho enzymu. V tomto stupni se fragmenty DNA, na něž byl navázán biotinylovaný adaptor, oddělí od všech zbývajících fragmentů.

40

Biotinylované fragmenty se v tomto stupni oddělí od nebiotinylovaných fragmentů (fragmenty MseI-MseI) vazbou na paramagnetické streptavidinové kuličky (Dynal). 10 mikrolitrů kuliček se 1x promyje 100 mikrolitry STEX (100 mM NaCl, 10 mM tris.HCl, 1mM EDTA, 0,1 % Tritonu X-100 o pH 8,0) a pak se materiál znovu uvede do suspenze ve 140 mikrolitrech STEX. Pak se kuličky přidají ke směsi, v níž proběhla vazba, do konečného objemu 200 mikrolitrů. Směs se pak inkubuje 30 minut za opatrného míchání při teplotě místnosti, aby došlo k vazbě biotinylovaných fragmentů na kuličky. Pak se kuličky oddělí tak, že se zkumavky, které je obsahují,

45

přidrží v blízkosti magnetu. Tak nemohou kuličky být odpipetovány při přenášení supernatantu do jiné zkumavky. Kuličky se 1x promyjí a pak se přenesou do nové zkumavky. Pak se kuličky ještě 3x promyjí při použití 200 mikrolitrů STEX. Nakonec se kuličky znovu uvedou do suspenze ve 200 mikrolitrech TO1.E (10 mM tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) a přenesou se do nové zkumavky. DNA se uchovává při teplotě 4 °C.

DNA, rozštěpená působením restričních enzymů a opatřená adaptory, navázaná na paramagnetické streptavidinové kuličky a zbavená fragmentů Msel–Msel bude v následujících stupních označována jako matricová DNA.

Amplifikace fragmentů PstI–Msel

Matricová DNA, připravená svrchu uvedeným způsobem by měla obsahovat všechny fragmenty PstI–Msel z uvedených linií rajčat a mimoto ještě malé množství fragmentů PstI–PstI, prostých vnitřních fragmentů Msel. V tomto pokusu byl větší počet těchto fragmentů PstI–Msel vizualizován amplifikací v podstatě způsobem, který byl popsán v příkladu 1: Analýza produktů amplifikace na gelu byla uskutečněna na denaturačním akrylamidovém gelu podle Maxam a Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560–564 vzhledem k tomu, že fragmenty, získané při uvedeném postupu byly mnohem menší než fragmenty, které byly popsány v příkladu 1. Mimoto tyto typy gelů umožňují oddělení až 100 páسů v jedné dráze, což je přibližně 10x tolik jako v případě agarozových gelů z příkladu 1. Fragmenty byly vizualizovány označením jednoho z PCR–primerů na 5'–zаконčení pomocí (³²P)ATP a polynukleotidkinázy.

Značení PCR–primeru

Primer, který byl vybrán pro značení byl 19–mer se vzorcem 5–GATGAGTCCTGAGTA–Agaа–3, který byl označen jako Msel–primer–1 a v němž jsou selektivní nukleotidy označeny malými písmeny. Značení bylo uskutečněno při použití následujících materiálů:

3,0 mikrolitrů 18–neru (z roztoku 50 ng/mikrolitr = 150 ng) 5,0 mikrolitrů ³²P–APT (z roztoku 10 mikroCi/mikrolitr = 50 mikroCi) 3,0 mikrolitrů 250 mM tris.HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM DTT, pH 7,5 0,5 mikrolitrů T4 DNA–kinázy (Pharmacia, 10 jednotek/mikrolitr) 18,5 mikrolitrů vody.

Byl získán celkový objem 30 mikrolitrů směsi, která byla inkubována 30 minut při teplotě 37 °C. V každé PCR byl přidán 1 mikrolitr tohoto 5'–značeného primeru.

Bylo provedeno celkem 28 PCR–reakcí, v nichž byla každá ze 4 matricových DNA amplifikována pomocí sedmi kombinací primerů. Každá kombinace primerů obsahovala tentýž Msel–primer (svrchu popsáný Msel–primer–1), avšak měnily se PstI–primery. Bylo vybráno celkem 7 různých primerů (stejně jako v případě Msel–primeru jsou selektivní nukleotidy označeny pomocí malých písmen):

PstI–primer-1: 5-GACTGCGTACATGCAGga-3

PstI–primer-2: 5-GACTGCGTACATGCAGgt-3

PstI–primer-3: 5-GACTGCGTACATGCAGgg-3

PstI–primer-4: 5-GACTGCGTACATGCAGag-3

PstI–primer-5: 5-GACTGCGTACATGCAGat-3

PstI–primer-6: 5-GACTGCGTACATGCAGct-3

PstI–primer-7: 5-GACTGCGTACATGCAGta-3

Všechny PCR–primery byly rozpuštěny ve vodě v koncentraci 50 ng/mikrolitr.

Amplifikační reakce

5 Směs pro uskutečnění PCR obsahovala tyto složky:

2,0 mikrolitrů matricové DNA

1,0 mikrolitrů 5' značeného Msel–primeru (5 ng)

0,5 mikrolitrů neznačeného Msel–primeru (25 ng)

10 0,6 mikrolitrů PstI–primeru (30 ng)

2,0 mikrolitrů 100 mM tris.HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,5

0,8 mikrolitru 5 mM dNTP

0,1 mikrolitru Taq–polymerázy (Cetus Perkin Elmer, 5 jednotek na mikrolitr)

13,0 mikrolitru vody

15

Všechny reakční složky byly dobře promíseny a podstatná složka PCR, obvykle enzym, byla přidána jako poslední. Pak byla reakce co nejdříve zahájena.

Amplifikace byla uskutečněna při použití zařízení Perkin Elmer k provádění tepelných cyklů. Bylo užito následujícího profilu jednotlivých cyklů:

20

1 cyklus: denaturace: 30 s při 94 °C

vazba: 30 s při 65 °C

prodloužení: 30 s při 72 °C

25

11 cyklů: denaturace: 30 s při 94 °C

vazba: teplota se snižuje o 0,7 °C v každém cyklu

64,3 °C, 63,6 °C, 62,9 °C, 62,2 °C, 61,5 °C, 60,8 °C, 61,1 °C, 59,4 °C, 58,7 °C, 58,0 °C, 57,3 °C.

Při každé teplotě inkubace 30 sekund.

30

prodloužení: 60 sekund při 72 °C

23 cyklů: denaturace: 30 s při 94 °C

vazba: 30 s při 56 °C

prodloužení 60 s při 72 °C

35

Analýza amplifikovaných fragmentů na gelu

Reakční produkty byly analyzovány na 4,5% denaturačních polyakrylamidových gelech. Byly použity gely s rozměrem 50 x 38 cm, kazety pro přípravu těchto gelů byly získány od Biorad. Bylo užito vždy 100 ml roztoku gelu s obsahem 4,5 % akrylamidu, 0,225 % bisakrylamidu, 40 7,5 M močoviny, 50 mM tris, 50 mM kyseliny borité, 1 mM EDTA, pH 8,3. 100 ml roztoku gelu bylo smíseno s 500 mikrolitry 10% persíranu amonného a 100 mikrolitry TEMED těsně přes odlitím gelu. Jako pufr pro elektroforézu byl užit tris pufr s kyselinou boritou a EDTA, obsahující 100 mM tris, 100 mM kyseliny borité a 2 mM EDTA, pH 8,3. Reakční směs byla smísena se stejným objemem 20 mikrolitrů 98% formamidu s 10 mM EDTA, 0,01 % bromfenolové modři 45 a 0,01 xyleneyanolu. Výsledné směsi byly zahřáty na 3 minuty na 95 °C a pak rychle zchlazeny na ledu. 2 mikrolitry každého ze vzorků byly nanášeny na gel a postup byl pak prováděn při napětí 110 W k zajištění stálého vývoje tepla v průběhu elektroforézy. Za těchto podmínek odpovídala síla elektrického pole v gelu hodnotám 40 až 50 voltů/cm.

50

Výsledky reakcí SRFA jsou znázorněny na obr. 14. Dráhy jsou označeny 1 až 28 a obsahují vždy čtyři linie rajčat s jednou ze sedmi kombinací primerů. Pořadí linií rajčat na gelu je následující.

1. GCR26, 2. GCR151, 3. Gem^R, 4. Gem^S, Dráhy 1 až 4 obsahují tyto DNA amplifikované Msel–primerem–1 a PstI–primerem–1, dráhy 5 až 8 obsahují tyto DNA, amplifikované Msel–primerem–1 a PstI–primerem–2, dráhy 9 až 12 obsahují tyto DNA, amplifikované

55

Msel-primer-1 a PstI-primerem-3, dráhy 13 až 16 obsahují tyto DNA amplifikované Msel-primerem-1 a PstI-primerem-5, dráhy 21 až 24 obsahují tyto DNA amplifikované Msel-primerem-1 a PstI-primerem-6 a dráhy 25 až 28 obsahují tyto DNA amplifikované Msel-primerem-1 a PstI-primerem-7. Gel neobsahuje žádné označení, určují velikosti molekuly, avšak vizualizované fragmenty DNA odpovídají ± 200 nukleotidům na spodní straně obrázku a ± 500 nukleotidům na jeho horní straně.

Příklad 3

10

Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů DNA různých čeledí

V příkladu 2 je uveden principi selektivní amplifikace restrikčních fragmentů SRFA při použití dvou restrikčních enzymů s použitím DNA rajčete. V tomto příkladu bude prokázáno, že obdobné výsledky je možno získat při použití DNA různých čeledí Lactuca při použití těchto restrikčních enzymů, PstI a Msel.

15

Izolace a modifikace DNA

DNA se izoluje způsobem, popsaným v příkladu 1 při použití mladých listů různých čeledí Lactuca. Jak bude ještě dále uvedeno, tyto rostliny zahrnují běžný salát *L. sativa* a několik jednotlivců ze dvou divokých čeledí Lactuca, *L. saligna* a *L. virosa*. Rostliny byly pro účely pokusů označeny následujícími jmény:

25

1. *L. saligna*, č. 21, rostlina 1
2. *L. saligna*, č. 21, rostlina 2
3. *L. saligna*, č. 22, rostlina 1
4. *L. saligna*, č. 22, rostlina 2
5. *L. virosa*, č. 01, rostlina 1
6. *L. virosa*, č. 01, rostlina 2
7. *L. virosa*, č. 02
8. *L. virosa*, č. 03, rostlina 1
9. *L. virosa*, č. 03, rostlina 2
10. *L. sativa*, běžný křehký salát

30

35

Analyzovaný genetický materiál tedy představoval 6 odlišných typů rostlin včetně dvou odlišných jednotlivců ze čtyř těchto typů.

Modifikace DNA těchto rostlin Lactuca k vytvoření matric pro SRFA byly prováděny stejným způsobem, jaký byl popsán svrchu v Příkladu 2.

40

Amplifikace PstI-Msel-fragmentů

DNA, připravené svrchu uvedeným způsobem byly užity jako matrice pro reakce SRFA. Byly užity kombinace dvou primerů, přičemž byl použit jeden Msel-primer a dva od sebe odlišné PstI-primery. Tyto primery (selektivní nukleotidy v nich jsou označeny malými písmeny) je možno charakterizovat jejich dále uvedenými řetězci:

45

Msel-primer:	5-GATGAGTCCTGAGTAAaca-3
PstI-primer-1:	5-GACTGCGTACATGCAGaa-3
PstI-primer-2:	5-GACTGCGTACATGCAGca-3

Amplifikace fragmentů PstI–MseI při použití svrhu popsaných primerů byla prováděna přesně způsobem podle příkladu 2 a vytvořené fragmenty byly vizualizovány na denaturačním polyakrylamidovém gelu způsobem podle příkladu 2. Získané pásy jsou znázorněny na obr. 15. Na drahách 1 až 10 jsou znázorněny vzorky DNA 1 až 10, amplifikované primerem MseI v kombinaci s PstI–primerem–1, ve drahách 11 až 20 jsou znázorněny vzorky DNA 1 až 10, amplifikované primerem MseI v kombinaci s PstI–primerem–2. Označení velikosti molekul nukleotidů (na výkrese není viditelné) je uvedeno v pravé straně gelu. Rozdíly v jednotlivých pásech odrážejí rozdíly v příbuznosti zkoumaných rostlin.

10

Příklad 4

Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů v inbredních liniích kukuřice při použití různých kombinací restrikčních enzymů

15

V příkladech 2 a 3 je uveden princip selektivní amplifikace restrikčních fragmentů SRFA při použití dvou restrikčních enzymů při použití DNA z rajčete a ze salátu (*Lactuca species*). V tomto příkladu bude prokázáno, že podobných výsledků je možno dosáhnout také při použití linií kukuřice (*Zea mais*). Mimoto bude prokázáno, že k typování DNA u těchto linií kukuřice je možno využít různých kombinací restrikčních enzymů.

20

Izolace a modifikace DNA

Byly užity dvě inbrední linie kukuřice, které byly označeny 1 a 2. Zdroj těchto linií je irelevantní vzhledem k tomu, že podle získaných zkušeností je možno z jakékoliv zvolené linie získat s použitím SRFA dobré typování DNA. DNA ze zkoumaných linií byla získána z mladých listů, z nichž byla izolována způsobem podle publikace Saghai–Mahoof a další 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 8014–8018. Pro přípravu matricové DNA byly užity následující kombinace restrikčních enzymů (EK): PstI/TaqI, EcoRI/TaqI, AseI/TaqI a Sse8387–I/TaqI. Všechny enzymy byly získány od Pharmacia s výjimkou enzymu AseI, který byl získán od New England Biolabs a enzymu Sse8387–I, který byl získán od Amersham. Matricové DNA byly připraveny v podstatě podle příkladů 2 a 3' s následujícími výjimkami.

30

Restrikční DNA byla uskutečněna tak, že nejprve byla DNA inkubována s enzymem TaqI jednu hodinu při teplotě 65 °C a pak byla inkubována s druhým enzymem, PstI, AseI, EcoRI nebo Sse8387–I další hodinu při teplotě 37 °C. Vazba adaptorů byla prováděna stejně jako v příkladu 2 při použití následujících adaptorů:

35

TaqI-adaptor: 5-GACGATGAGTCCTGAC-3
3 - TACTCAGGACTGGC-5

PstI a Sse8387-I-adaptor:
5-bio-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3
3 - CATCTGACGCATGT - 5

Asel-adaptor: 5-bio-CTCGTAGACTGCGTACC-3
3 -CTGACGCATGGAT-5

EcoRI-adaptor: 5-bio-CTCGTAGACTGCGTACC-3
3-CTGACGCATGGTTAA-5

Amplifikace restrikčních fragmentů

- Amplifikace restrikčních fragmentů byla uskutečněna způsobem, popsaným v příkladu 2.
5 Primery, zvolené pro označení amplifikačních produktů byly následující TaqI-primery s třemi selektivními nukleotidy (tyto nukleotidy jsou opět označeny malými písmeny):

TaqI-primery (5'-značené):

1. 5-TGAGTCCTGACCGAacc-3
2. 5-TGAGTCCTGACCGAaca-3
3. 5-TGAGTCCTGACCGAcaa-3
4. 5-TGAGTCCTGACCGAcac-3

- 10 Uvedené čtyři primery byly použity pro detekci amplifikačních produktů, získaných při použití všech čtyř kombinací enzymů. Pro každou kombinaci enzymů byly užity 4 primery pro jiný enzym za vzniku celkem 16 kombinací pro každý z enzymů. Uvedené primery budou dále znázorněny svými řetězci (selektivní nukleotidy jsou označeny malými písmeny). Pro primery
15 EcoRI a Asel byly vybrány primery se třemi selektivními nukleotidy, pro PstI primery se dvěma selektivními nukleotidy a pro enzym Sse byly zvoleny primery, obsahující jeden selektivní nukleotid. Pro enzymy, které štěpí DNA genomu kukuřice na malém počtu míst byly zvoleny primery, obsahující prodloužení s menším počtem selektivních nukleotidů.

- EcoRI-primery: 1. 5-CTGCGTTACCAATTCcaa-3
 2. 5-CTGCGTTACCAATTCaca-3
 3. 5-CTGCGTTACCAATTCaac-3
 4. 5-CTGCGTTACCAATTCcag-3

- Asel-primery: 1. 5-GACTGCGTACCTAATaac-3
 2. 5-GACTGCGTACCTAATaag-3
 3. 5-GACTGCGTACCTAATacc-3
 4. 5-GACTGCGTACCTAATgaa-3

- PstI-primery: 1. 5-GACTGCGTACATGCAGac-3
 2. 5-GACTGCGTACATGCAGaa-3
 3. 5-GACTGCGTACATGCAGca-3
 4. 5-GACTGCGTACATGCAGcc-3

- Sse8387-I-primery: 1. 5-GACTGCGTACATGCAGGa-3
 2. 5-GACTGCGTACATGCAGGg-3
 3. 5-GACTGCGTACATGCAGGc-3
 4. 5-GACTGCGTACATGCAGGt-3

Bylo provedeno celkem 128 PCR-reakcí (2 DNA x 4 kombinace enzymů x 16 kombinací primerů) způsobem, uvedeným v příkladu 2. Reakční produkty těchto PCR byly analyzovány na 3 gelech (s obsahem 48 drah/gel) způsobem, popsaným v příkladu 2. Všechny kombinace primerů poskytovaly mapy DNA v rozsahu 50 až 100 páسů v jedné dráze, s výjimkou kombinace SseI/TaqI, kde bylo získáno pouze 10 až 15 páسů v jedné dráze. Příklad jednoho z gelů je znázorněn na obr. 16. Je znázorněna část gelu s analýzou mapy, získané při použití kombinace enzymů PstI/TaqI a EcoRI/TaqI. V drahách 1 až 8 jsou znázorněny mapy dvou vzorků DNA kukuřice, získaných pomocí SRFA a TaqI-primeru-3 a PstI-primerů-1, -2, -3 a -4, v drahách 9 až 16 jsou znázorněny mapy DNA ze dvou vzorků kukuřice, získaných pomocí SRFA při použití TaqI-primeru-4 a PstI-primerů-1, -2, -3 a -4, v dráze 17 je uvedena lambda-DNA po rozštěpení enzymem PstI pro označení, velikost některých fragmentů řetězce nukleotidů je uvedena vpravo a ve drahách 18 až 25 jsou znázorněny mapy pro DNA ze dvou vzorků DNA kukuřice, získaných pomocí SRFA při použití TaqI-primeru-1 a EcoRI-primerů-1, -2, -3 a -4.

15

Příklad 5

Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů bakteriální DNA

20

V příkladech 2, 3 a 4 byl vysvětlen princip selektivní amplifikace restrikčních fragmentů SRFA při použití dvou restrikčních enzymů u rajčete, salátů (*Lactuca species*) a u kukuřice. V tomto příkladu bude prokázáno, že uvedený postup je možno použít také k charakterizaci bakteriální

DNA. Velký počet kmenů *Xanthomonas campestris* byl získán z Laboratory of Microbiology, Ghent, Belgie a uvedené kmeny byly zvoleny k průkazu použitelnosti postupu u bakterií.

Izolace a modifikace DNA

5

Všechny vzorky DNA byly připraveny z kmenů *Xanthomonas campestris*, izolovaných z různých zdrojů, převážně z infikovaných rostlin. Tyto kmeny byly označeny čísly 1 až 26 tak, jak jsou dále uvedeny, a je možno je získat z Laboratoire of Microbiology, Ghent, Belgie.

DNA	podčeleď	pathovar	izolát
1.	albilineans		494
2.	fragariae		708
3.	oryzae	oryzae	5047
4.	oryzae	populi	5743
5.	maltophilia		958
6.	campestris	campestris	568
7.	campestris	alfalfae	497
8.	campestris	coracanae	686
9.	campestris	citri	8655
10.	campestris	citri	9658
11.	campestris	citri	9181
12.	campestris	citri	8657
13.	campestris	citri	8654
14.	campestris	citri	8650
15.	campestris	citri	682
16.	campestris	citri	681
17.	campestris	citri	9325
18.	campestris	citri	9321
19.	campestris	citri	9176
20.	campestris	citri	9671
21.	campestris	citri	9665
22.	campestris	citri	9182
23.	campestris	citri	568
24.	campestris	citri	9167
25.	campestris	citri	9175
26.	campestris	citri	9160

10

DNA těchto bakteriálních kmenů byla izolována způsobem, popsaným v publikaci Marmur, J. Mol. Biol. 3, str. 208 až 218. Vzorky DNA byly rozštěpeny restričními enzymy v podstatě způsobem podle příkladu 4 s tím rozdílem, že jako restriční enzymy byly použity enzymy TaqI a ApaI. Vazba adaptorů byla uskutečněna způsobem podle příkladu 4 při použití následujících řetězců adaptorů:

15

TaqI- adaptor: 5-GACGATGAGTCCTGAC-3
3 - TACTCAGGACTGGC-5

ApaI- adaptor: 5-bio-TCGTAGACTGCGTACAGGCC-3
3- CATCTGACGCATGT-5

Amplifikace restrikčních fragmentů

Amplifikace restrikčních fragmentů byla uskutečněna způsobem, popsaným v příkladu 2. Primery, které byly zvoleny pro SRFA byly TaqI-primer 5-CGATGAGTCCTGACCGAg-3 s jedním selektivním nukleotidem, označeným malým písmenem a ApaI-primer 5-GACTGCGTACAGGCCGg-3 s jedním selektivním nukleotidem, rovněž označeným malým písmenem. ApaI-primer byl označen na 5'-zакončení pro detekci amplifikovaných fragmentů způsobem, popsaným v příkladu 2.

Každá ze 26 DNA byla amplifikována při použití svrchu popsané sestavy primerů. Podmínky amplifikace byly stejné jako v příkladu 2 s tím rozdílem, že poslední 9 cyklů PCR bylo vynecháno vzhledem k menší složitosti DNA ve srovnání s rostlinnou DNA z příkladů 2, 3 a 4.

Typování DNA, kterého bylo dosaženo při použití bakteriální DNA podle toho příkladu je znázorněno na obr. 17. Dráhy 1 až 26 představují bakteriální DNA 1 až 26. Velikost DNA, použité pro označení (na gelu není viditelný) je v počtech nukleotidů uvedena na pravé straně gelu. Tato čísla jasně prokazují že příbuznost bakteriálních kmenů se odráží na podobnosti získaných pásů.

20

Příklad 6

Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů DNA různých živočichů při použití dvou restrikčních enzymů

25

V předchozích příkladech byla popsána selektivní amplifikace restrikčních fragmentů SRFA pro DNA z různých rostlinných zdrojů. Nyní bude osvětlena účinnost způsobu při použití náhodně odebraných vzorků DNA z různých domácích zvířat. Byly použity: Gallus domesticus (kuře), SUSSCROFA DOMESTICA i. (vepř), bos taurus (kráva), Equus caballus (kůň). Použitými restrikčními enzymy byly Sse83871 a MseI.

30

Izolace a modifikace DNA

DNA byla izolována ze vzorků krve způsobem podle publikace Maniatis a další, 1982. Vzorky DNA 1 až 3 (kuře), 4 až 7 (vepř), 8 až 11 (kráva) a 12 až 15 (kůň) byla rozštěpeny restrikčními enzymy Sse83871 a MseI. Fragmenty DNA byly navázány na adaptory způsobem podle příkladu 2. Vzhledem k tomu, že při použití restrikčních enzymů Sse83871 a PstI vznikají kompatibilní 3'-prodloužená zakončení, bylo možno použít PstI-adaptor i MseI-adaptor, popsané v příkladu 2.

40 Amplifikace restrikčních fragmentů

Matricová DNA, popsaná svrchu a připravená způsobem podle příkladu 2 byla použita jako matrice při uskutečnění reakcí SRFA. Použité kombinace primerů byly tvořeny jedním MseI-primerem a odlišnými SseI-primery

MseI-primer:

5-GATGAGTCCTGAGTAAtac-3

Sse83871-primer-1:

45

5-GACTGCGTACATGCAGGaa-3

Sse83871-primer-2:

5-GACTGCGTACATGCAGGag-3

Amplifikace fragmentů Sse83871–MseI při použití párů primerů, tak jak byly svrchu popsány byla prováděna způsobem podle příkladu 2. Reakční produkty byl podrobeny elektroforéze na denaturačním polyakrylamidovém gelu, rovněž popsaném v příkladu 2. Autoradiografický záznam, znázorňující typování uvedených vzorků je uveden na obr. 18. Ve drahách 1 až 15 je uvedeno typování pro DNA 1 až 15 po amplifikaci při použití MseI–primeru, párovaného s Sse83871–primerem–I, ve drahách 16 až 30 je uvedeno obdobné typování při použití primeru MseI v kombinaci s Sse87871–primerem–2. Rozdíly mezi jednotlivými jedinci určitého živočišného druhu odrážejí heterogenitu živočišné populace. Celkové typování je charakteristické pro určitý živočišný druh.

10

Ve zvláštním provedení tvoří podstatu vynálezu způsob řízené amplifikace alespoň části výchozí DNA, která obsahuje větší počet restričních míst pro určité specifické restriční endonukleázy, přičemž alespoň část řetězce nukleových kyselin je neznámá, postup spočívá v tom, že se

15

a) výchozí DNA rozštěpí specifickou restriční endonukleázou za vzniku odpovídajícího počtu restričních fragmentů, opatřených zakončeními 5' a 3',

20

b) pokud 5'– a 3'– adaptory již nebyly k dispozici v oddělených formách, rozštěpí se toutéž specifickou restriční endonukleázou také určený oligonukleotidový vazný řetězec s dvojitým řetězcem, obsahující v nukleotidovém řetězci jediné místo působení pro použitou restriční endonukleázu za rozštěpení na 5'– a 3'–adaptor,

25

c) vzájemně se naváží restriční fragmenty, získané z výchozí DNA na svých 5'– a 3'– zakončeních a 3'– a 5'– adaptory za vzniku restričních fragmentů výchozí DNA s prodlouženými zakončeními, přičemž tyto fragmenty obsahují na svém 5'– a 3'– zakončení prodloužující řetězce, jejichž nukleotidovými řetězci jsou řetězce 3'– a 5'– adaptorů včetně nukleotidů ze specifického restričního místa,

30

d) pokud neběží o vhodné matrice pro primery, prodlouží se uvedené 5'– a 3'– adaptory před svrchu uvedenou vazbou přidáním oligonukleotidových segmentů se stanoveným stálým řetězcem na odpovídající 5'– a 3'–zakončení, přičemž se v případě potřeby z téhož důvodu prodlouží odpovídající konce prodloužených restričních fragmentů oligonukleotidovými segmenty za vzniku restričních fragmentů, prodloužených na obou koncích uvedených konstantním řetězcem,

35

e) prodloužené, popřípadě elongované restriční fragmenty se za hybridizačních podmínek uvedou do reakce s dvěma oligonukleotidovými primery,

40

f) primery zahrnují řetězce, odpovídající týmž nukleotidovým řetězcům, které obsahují 5'– a 3'–zakončení prodloužených nebo popřípadě elongovaných restričních fragmentů, které jsou komplementární k řetězcům, které mají funkci matricových řetězců pro uvedené primery, přičemž primery selektivně obsahují nukleotidy, komplementární k nukleotidům, účastnícím se tvorby místa působení specifické restriční endonukleázy v řetězci matrice,

45

g) elongované restriční fragmenty, hybridizované uvedenými primery se amplifikují PCR nebo podobnými postupy v přítomnosti požadovaných nukleotidů a polymerázy za další elongace hybridizovaných primerů podél restričních fragmentů výchozí DNA, s níž primery na počátku hybridizovaly po celé své délce, načež se

50

h) identifikují nebo izolují výsledné restriční fragmenty.

Ve specifickém provedení tohoto postupu odpovídá terminální nukleotid alespoň z uvedených primerů ve směru elongace poslednímu nukleotidu místa působení restriční endonukleázy,

postup zahrnuje identifikaci a izolaci restričních fragmentů výchozí DNA, které byly amplifikovány.

5 V dalším specifickém provedení tohoto postupu zahrnuje alespoň jeden z uvedených primerů řetězec určitého počtu nukleotidů (jeden nebo několik nukleotidů), který zasahuje za poslední nukleotid, účastní se tvorby místa působení specifické endonukleázy ve směru své vlastní elongace v rozsahu odpovídajících restričních fragmentů v průběhu amplifikačního stupně.

10 Ve specifickém provedení uvedeného postupu obsahuje vazný řetězec s dvojitým řetězcem nukleotidů několik míst působení specifických restričních endonukleáz, které se navzájem od sebe liší, postup spočívá v opakování stupňů svrchu uvedeného postupu při použití téže výchozí DNA, avšak při použití jiné restriční endonukleázy a při použití primerů, jejichž nukleotidový řetězec je definován stejným způsobem jako svrchu, avšak je specifický pro tuto odlišnou použitou restriční endonukleázu.

15 Svrchu popsaný postup je vhodný pro použití k identifikaci polymorfizmu určitých DNA, pocházejících z téhož živočišného druhu například může jít o DNA genomu mikroorganismu, rostliny nebo živočicha včetně lidí nebo může také jít o fragmenty této DNA. K těmto účelům je možno využít i oligonukleotidy podle vynálezu. Postupuje se tak, že se zkoumaná DNA podrobí 20 způsobu podle vynálezu nebo se uvede do styku s oligonukleotidem podle vynálezu za podmínek, při nichž může docházet k amplifikaci nebo k elongační reakci, mapy získaných restričních míst se srovnávají po každou jednotlivou DNA a popřípadě se lokalizuje místo, v němž dochází k polymorfizmu podle rozdílů, pozorovaných mezi velikostí restričních fragmentů, které byly získány z různých DNA.

25 Vynález se rovněž týká fragmentované DNA, jejíž různé fragmenty obsahují řetězce, které všechny odpovídají počátečním štěpným produktům nefragmentované výchozí DNA, z níž byly získány působením též specifické endonukleázy, přičemž všechny fragmenty byly prodlouženy na svých 5'- a 3'- zakončeních při použití příslušných 3'- a 5'- adaptorů, odpovídajících 30 rozštěpené části téhož výchozího vazného řetězce DNA, který na začátku obsahoval jediné místo působení uvedené specifické endonukleázy, popřípadě prodloužené předem určenými stálými řetězci. Fragmentovaná DNA může mít formu skupiny putujících pásů na vhodném nosiči, například gelu, v němž byly fragmenty na začátku uvedeny do pohybu působením elektrického pole.

35 Fragmentovaná DNA může také obsahovat koncové části včetně nukleotidů, charakterizovaných následujícím složením, počínaje od 5'- zakončení:

40 i) nukleotidový řetězec (konstantní řetězec) alespoň 10 bází, avšak ne více než 30 bází, komplementární k určenému řetězci DNA, který je užit jako adaptor, okamžitě následovaný:

ii) nukleotidovým řetězcem, komplementárním k místu působení specifické restriční endonukleázy, použité ve stupni a), přičemž řetězec tohoto místa ani jeho část nejsou obsaženy v řetězci ii), okamžitě následovaný

45 iii) nukleotidovým řetězcem s obsahem alespoň jednoho nukleotidu, avšak méně než 10 nukleotidů, s délkou například 1 až 5 nukleotidů.

50 Vynález se rovněž týká sestavy pro fragmentaci DNA při použití alespoň jedné restriční endonukleázy s následnou analýzou získaných fragmentů, sestava obsahuje:

- specifickou restriční endonukleázou,
- oligonukleotidový vazný řetězec s dvojitým řetězcem DNA, který sám o sobě obsahuje ve svém nukleotidovém řetězci jediné místo působení uvedené specifické restriční endonukleázy

pro rozštěpení na odpovídající 5'- a 3'- adaptory, přičemž uvedený vazný řetězec s obsahem DNA s dvojitým řetězcem má dostatečnou velikost pro vznik 5'- a 3'- části, které mohou sloužit jako matrice pro PCR-primery v této sestavě,

- 5 - PCR primery, obsahující tytéž sekvence jako řetězec 5'- a 3'- adaptorů, komplementární k řetězcům, použitých jako matrice pro uvedené primery, přičemž primery dále obsahují nukleotidy, komplementární k nukleotidům, které se účastní tvorby místa působení určené specifické restriční endonukleázy v řetězci matrice,
- 10 - popřípadě oligonukleotidové segmenty stanovených (stálých) řetězců pro tvorbu míst s dostatečnou délkou pro hybridizaci s uvedenými primery pro elongaci 5'- zakončení 5'- adaptorů nebo 3'- zakončení 3'- adaptorů nebo obou zakončení před rozštěpením vazného řetězce působením specifické restriční endonukleázy za vzniku 5'- a 3'- adaptorů nebo pro elongaci prodloužených fragmentů, získaných po vazbě 5'- a 3'- adaptorů na konce fragmentů
- 15 výchozí DNA,
- popřípadě fragmentovanou DNA, odpovídající určené DNA, jejíž fragmentace je sledována, přičemž fragmenty uvedeného standardu DNA byly získány rozštěpením této DNA při použití uvedené specifické restriční endonukleázy.

20 Ve zvláštním provedení této sestavy mají oligonukleotidové segmenty pro elongaci 5'- a 3'- adaptoru nebo pro 5'- a 3'- zakončení prodloužených fragmentů DNA identické řetězce.

25 V dalším specifickém provedení obsahuje vazný řetězec sestavy několik míst působení specifické endonukleázy, od sebe navzájem odlišných a sestava dále obsahuje primery, odpovídající 3'- a 5'- adaptorům, vytvořeným rozštěpením vazného řetězce uvedenými specifickými endonukleázami, přičemž primery odpovídají typu, který je uveden v nároku 8, pokud jde o 3'- a 5'- adaptory, vznikající v tomto vazném řetězci rozštěpením každou z uvedených specifických endonukleáz.

30 V dalším zvláštním provedení může sestava obsahovat fragmentované standardy DNA, odpovídající specifickým restričním endonukleázám přičemž určitý standard odpovídá vždy určité specifické restriční endonukleáze.

35

PATENTOVÉ NÁROKY

40

1. Způsob amplifikace přinejmenším jednoho restričního fragmentu z výchozí DNA, **v y z n a ě u j í c í s e t í m , ž e**

45 (a) výchozí DNA se štěpí přinejmenším jednou restriční endonukleázou a získají se restriční fragmenty,

 (b) získané restriční fragmenty se ligují s alespoň jedním syntetickým dvouřetězcovým oligonukleotidovým adaptorem, jehož jeden konec je kompatibilní pro ligaci s jedním nebo oběma konci restričních fragmentů, čímž se připraví označené restriční fragmenty,

50

 (c) získané označené restriční fragmenty se za hybridizačních podmínek přivedou do kontaktu s alespoň jedním oligonukleotidovým primerem, přičemž tento primer nebo primery obsahují nukleotidovou sekvenci párující s částí rozpoznávací sekvence restriční endonukleázy přítomné v označeném restričním fragmentu a také párující s částí adaptorové sekvence, přičemž alespoň

jeden z uvedených primerů obsahuje na svém 3'-konci zvolenou sekvenci obsahující přinejmenším jeden nukleotid umístěný bezprostředně vedle nukleotidů účastnících se vytvoření dané rozpoznávací sekvence,

- 5 (d) označené restriční fragmenty hybridizované na uvedený primer nebo primery se amplifikují v přítomnosti požadovaných nukleotidů a DNA polymerázy nebo se provede elongace těchto hybridizovaných primerů podél označených restričních fragmentů, a
- 10 (e) amplifikované nebo elongované DNA fragmenty získané ve stupni (d) se identifikují nebo izolují.

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že primer nebo primery obsahují sekvence, které mají stejnou nukleotidovou sekvenci jako terminální části řetězců na koncích uvedených označených restričních fragmentů, včetně nukleotidů účastnících se tvorby rozpoznávací sekvence pro uvedenou restriční endonukleázu a včetně přinejmenším části nukleotidů přítomných v ligovaných adaptorech, přičemž přinejmenším jeden z uvedených primerů má na svém 3'-konci zvolenou sekvenci obsahující přinejmenším jeden nukleotid umístěný bezprostředně vedle nukleotidů účastnících se vytvoření rozpoznávací sekvence pro uvedenou restriční endonukleázu.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že primer nebo primery mají sekvence přesně párující s konstantní DNA sekvencí, tvořenou částí rozpoznávací sekvence restriční endonukleázy a sekvencí adaptoru.

25 4. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že přinejmenším jeden primer obsahuje zvolenou sekvenci 1 až 10 nukleotidů.

5. Způsob podle některého z nároků 1 až 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že primery obsahují 10 až 50 nukleotidů a rozpoznávací sekvence restriční endonukleázy obsahuje 4 až 8 nukleotidů.

30 6. Způsob podle některého z nároků 1 až 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že nukleotidová sekvence primerů párující s adaptorem obsahuje 10 až 30 nukleotidů.

7. Způsob podle některého z nároků 1 až 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že adaptory jsou konstruovány takovým způsobem, že odpovídající rozpoznávací sekvence endonukleázy není při hybridizaci adaptoru na označené restriční fragmenty rekonstruována, přičemž primer nebo primery představují oligonukleotidy obsahující konstantní sekvenci přesně párující s alespoň jedním koncem sekvence alespoň jednoho označeného restričního fragmentu ve směsi, přičemž tato konstantní sekvence obsahuje nukleotidy párující s částí cílové sekvence dané restriční endonukleázy a přinejmenším jeden z uvedených primerů obsahuje na svém 3'-konci nukleotidové sekvence účastnící se tvorby rozpoznávací sekvence 1 až 10 dalších zvolených nukleotidů.

8. Způsob podle některého z nároků 1 až 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že sekvence nukleových kyselin ve výchozí DNA je alespoň zčásti neznámá.

9. Způsob podle některého z nároků 1 až 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se použijí nejméně dvě od sebe odlišné restriční endonukleázy.

50 10. Způsob podle některého z nároků 1 až 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že všechny primery obsahují stejnou konstantní nukleotidovou sekvenci.

11. Způsob podle některého z nároků 1 až 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se použije směs různých primerů.

55

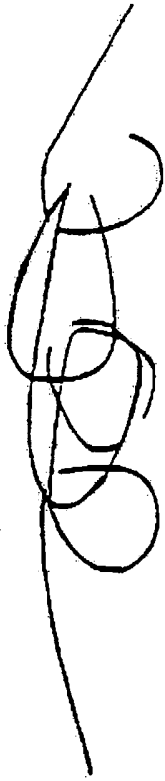
12. Způsob podle některého z nároků 1 až 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že přinejmenším jeden primer obsahuje na svém 3'-konci 1, 2 nebo 3 zvolené nukleotidy.
13. Způsob podle některého z nároků 1 až 11, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že ve stupni (a) se 5 použijí dvě odlišné restriční endonukleázy, přičemž přinejmenším jeden dvouřetězcový syntetický oligonukleotid použitý jako adaptor pro jednu z endonukleáz je biotinylován.
14. Způsob podle některého z nároků 1 až 13, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že alespoň jeden 10 primer je značený.
15. Způsob podle některého z nároků 1 až 14, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že počet selektivních nukleotidů se volí k omezení počtu amplifikovaných restričních fragmentů na 5 až 200.
16. Způsob přípravy sestavy amplifikovaných restričních fragmentů, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se 15
- (a) amplifikuje podskupina restričních fragmentů ze směsi restričních fragmentů, získaných z výchozí DNA při použití způsobu podle některého z nároků 1 až 15,
- 20 (b) amplifikované prodloužené restriční fragmenty se od sebe oddělí,
- (c) amplifikované restriční fragmenty se identifikují.
17. Způsob podle některého z nároků 1 až 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako výchozí 25 DNA k amplifikaci použije DNA genomu z lidského nebo živočišného vzorku, zvláště z tkáně nebo z krevního vzorku.
18. Způsob podle některého z nároků 1 až 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se k amplifikaci 30 použije DNA genomu rostliny nebo rostlinné tkáně.
19. Způsob podle některého z nároků 1 až 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako výchozí DNA k amplifikaci použije DNA mikroorganismu.
20. Způsob podle některého z nároků 1 až 16, pro identifikaci polymorfizmu mezi různými 35 výchozími DNA pocházejícími ze stejné skupiny živých organismů, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se identifikují rozdíly mezi amplifikovanými restričními fragmenty různých výchozích DNA.
21. Způsob podle některého z nároků 1 až 15, pro identifikaci polymorfizmu DNA genomu 40 mikroorganismu, rostliny nebo živočicha, včetně člověka, nebo fragmentů DNA, vzájemně nebo ve vztahu k odpovídající předem stanovené standardní DNA.
22. Způsob podle některého z nároků 1 až 15, pro identifikaci polymorfizmu DNA souvisejícího 45 s geneticky podmíněnými vlastnostmi u člověka, nebo geneticky podmíněnými vlastnostmi u živočichů nebo pro identifikaci geneticky podmíněných vlastností u rostlin a pro identifikaci značení DNA na bázi tohoto polymorfizmu DNA.
23. Způsob podle některého z nároků 1 až 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se srovnávají 50 alespoň dva nebo více amplifikovaných nebo elongovaných fragmentů DNA, identifikované nebo regenerované ve stupni (e) uvedeného způsobu pro detekci podobnosti mezi rostlinnými nebo živočišnými varietami, druhy, kultivary, mikroorganismy, nebo pro hodnocení genetické odlišnosti a charakteristik uvedených rostlinných nebo živočišných variet, druhů, kultivarů, mikroorganismů.

24. Způsob podle některého z nároků 1 až 15, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se amplifikované nebo elongované fragmenty DNA produkované ve stupni (e) identifikují nebo izolují ve formě DNA otisků.
- 5 25. Způsob podle nároku 23 pro identifikaci DNA markerů vázaných s genetickým znakem, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje identifikaci polymorfizmu mezi výchozími DNA ze stejných živočišných druhů s odlišnými genetickými znaky a uvedení tohoto polymorfizmu do korelace s fenotypem uvedeného genetického znaku.
- 10 26. Způsob podle některého z nároků 1 až 15, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále zahrnuje stupně:
- (f) izoluje se alespoň jeden identifikovaný nebo regenerovaný DNA fragment ve stupni (e),
- 15 (g) stanoví se nukleotidová sekvence prvních 8 až 10 nukleotidových zbytků vnitřně přiléhajících na rozpoznávací sekvenci restriční endonukleázy na obou koncích uvedených DNA fragmentů,
- (h) zkonstruují se oligonukleotidové primery s nukleotidovou sekvencí podle primerů ze stupně
- 20 (c) z nároku 1, přičemž zvolená sekvence nukleotidů obsahuje 5 až 10 nukleotidových zbytků odpovídajících prvním 8 až 12 nukleotidovým zbytkům vnitřně přiléhajícím k restričním místům na obou koncích DNA fragmentu.

25

18 výkresů

Prodlužování restrikčních fragmentů genomu



DNA genomu

štěpení
restrikčním enzymem



vazba
adaptoru



OBR. 1

Vazba adaptoru

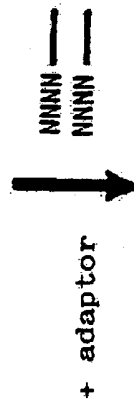
zarovnané konce

posunutý konec

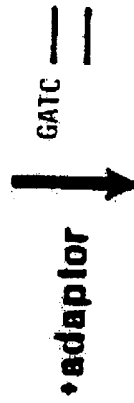
3'-prodloužení

5'-prodloužení

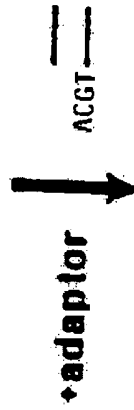
ex. PvuII



ex. Bgl II

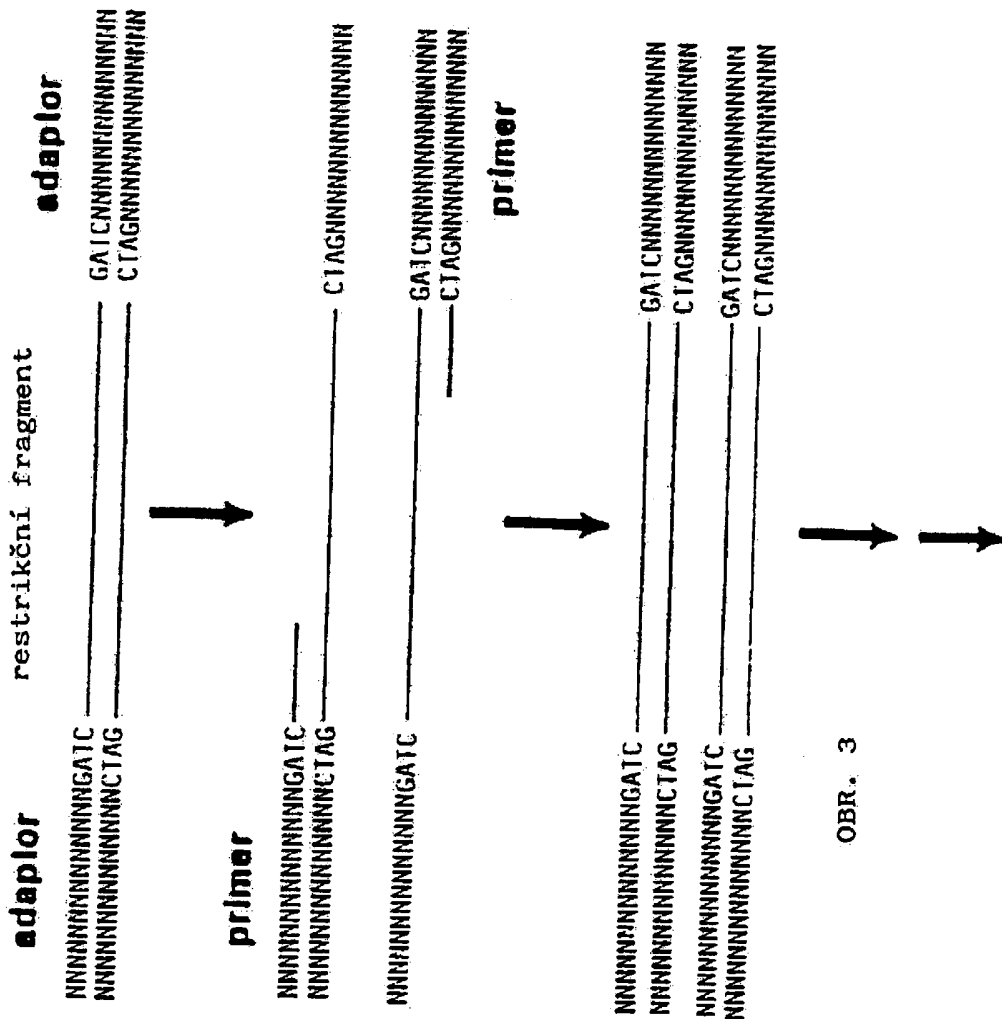


ex. Pst I



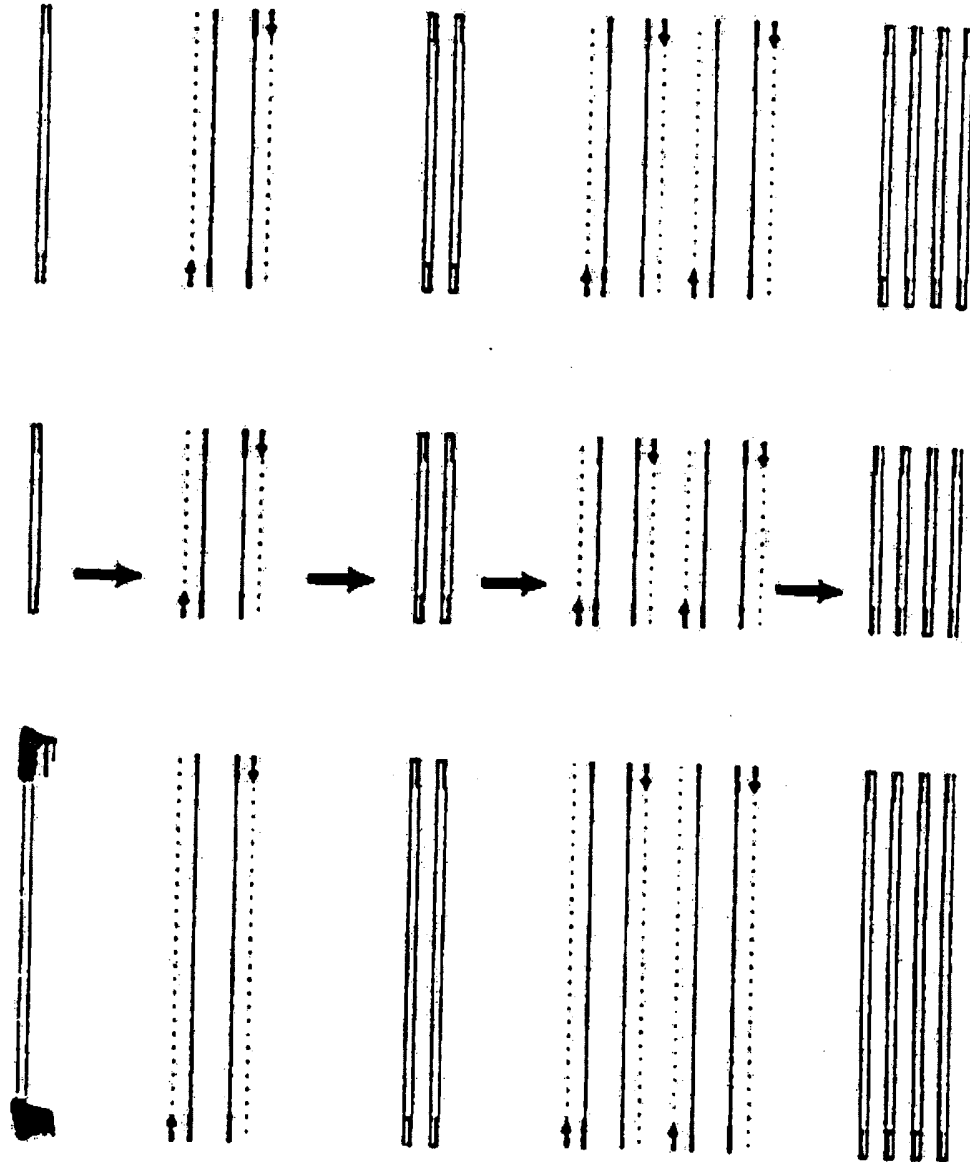
OBR. 2

PCR-amplifikace prodloužených restrikčních fragmentů



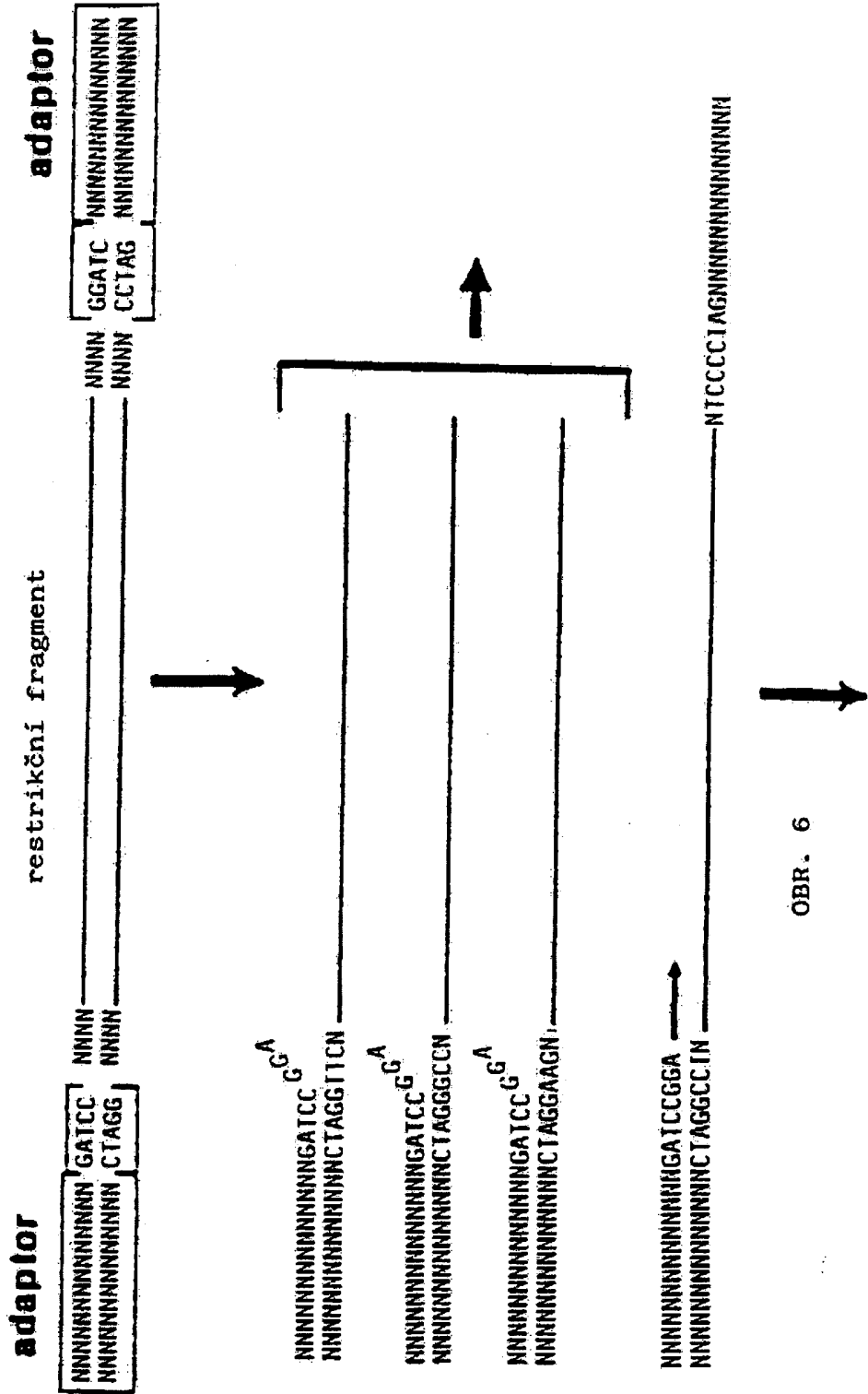
OBR. 3

Vícenásobná amplifikace restričních fragmentů



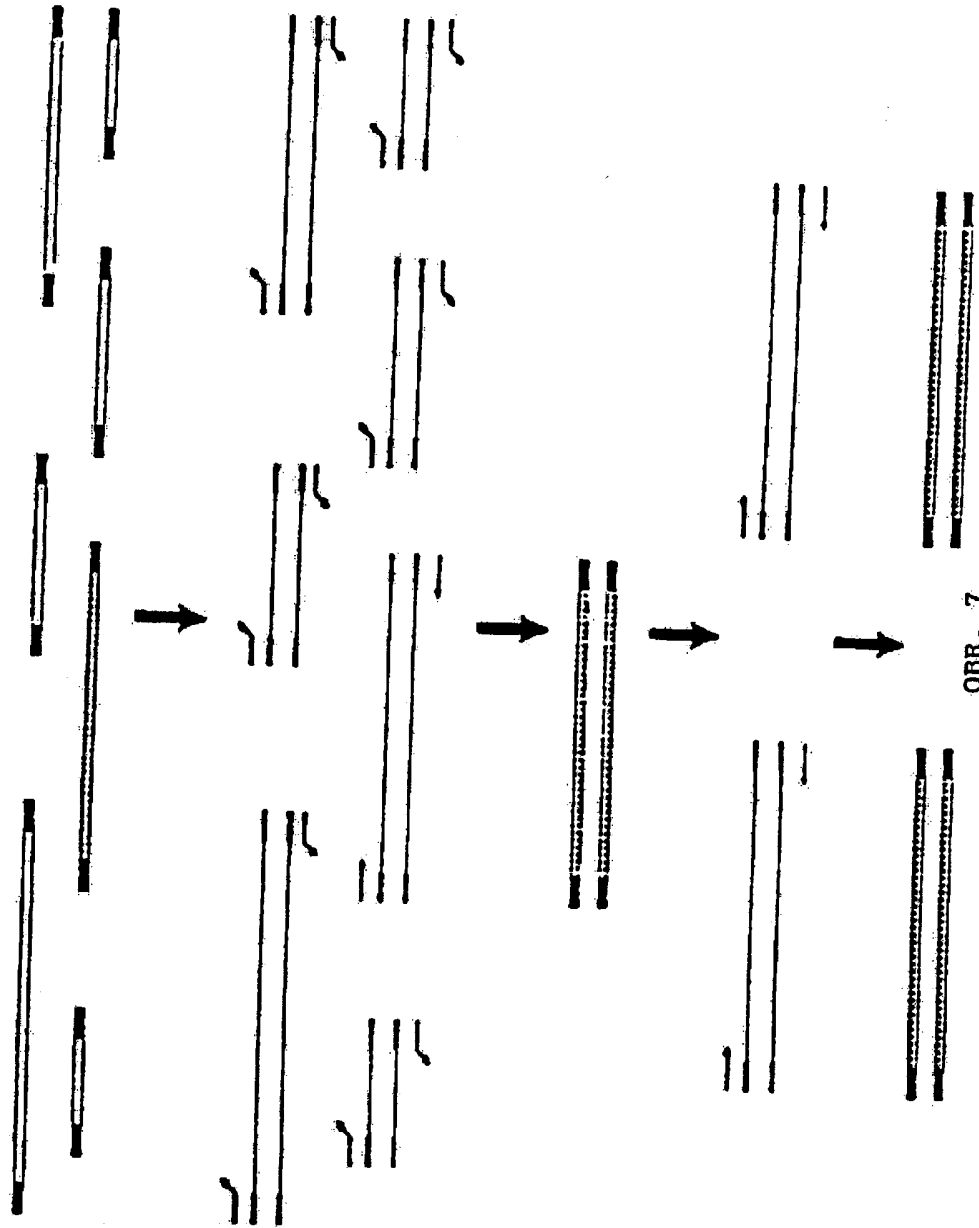
OBR. 4

NNNNNNNNNNNGATC Selektivní PCR-amplifikace restrikčních fragmentů

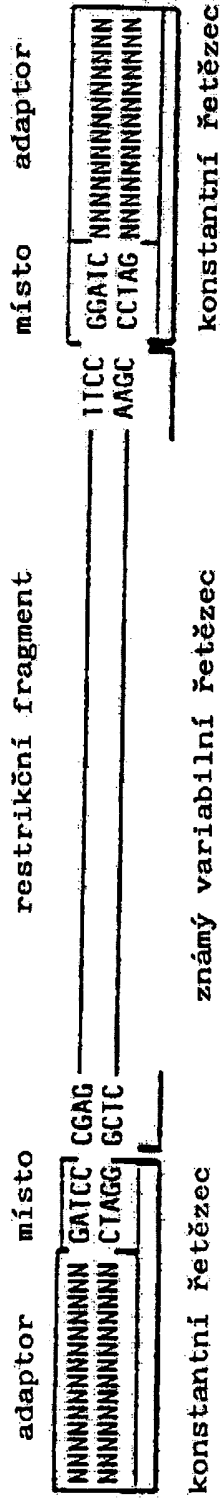


OBR. 6

Selektivní amplifikace restričních fragmentů



Selektivní PCR-primery, specifické pro fragmenty



selektivní primer 1

selektivní primer 2

konstantní řetězec selektivní base selektivní base konstantní řetězec



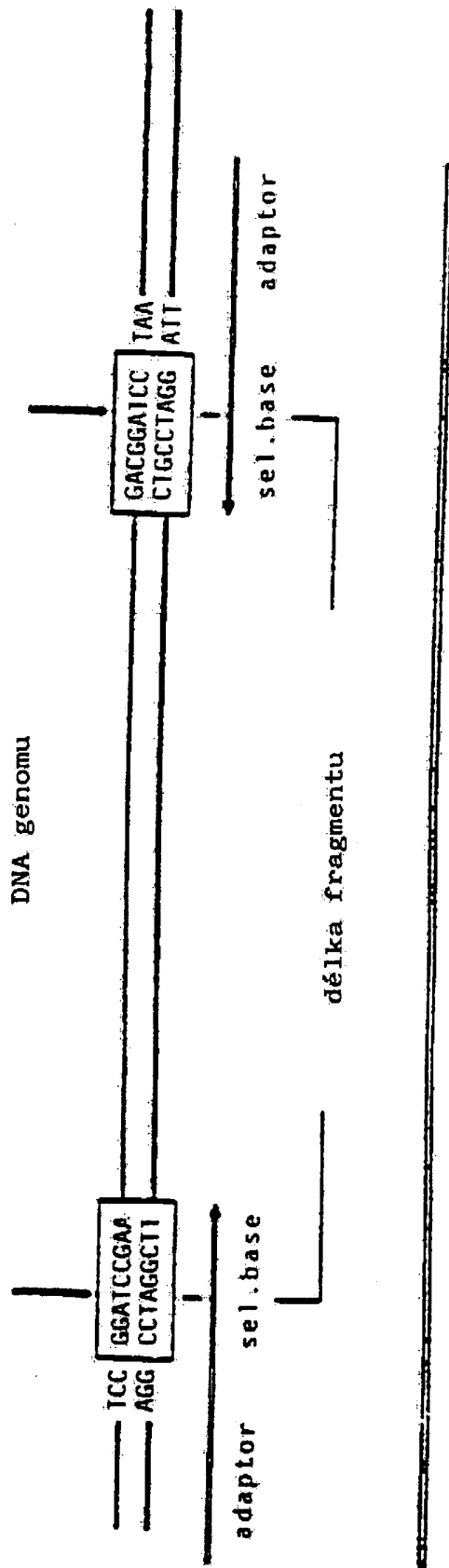
selekce matrice

NNNNNNNNNNNNNGATCC CGAG _____
 NNNNNNNNNNNNCTAGG GCTC _____

_____ TTGC GGATC
 NNNNNNNNNNNN
 _____ AAGC CCTAGN
 NNNNNNNNNNNN

OBR. 8

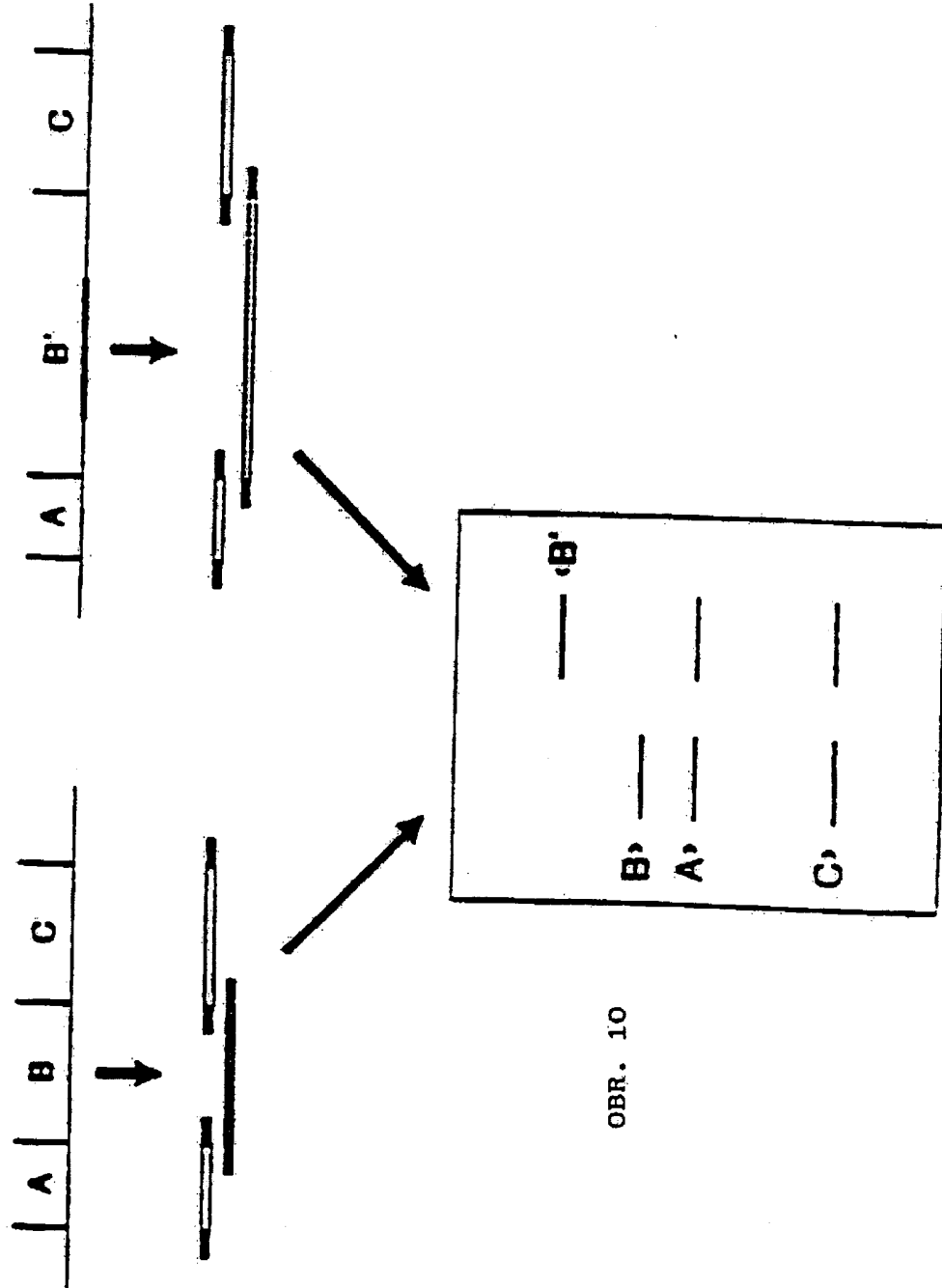
Princip ARF



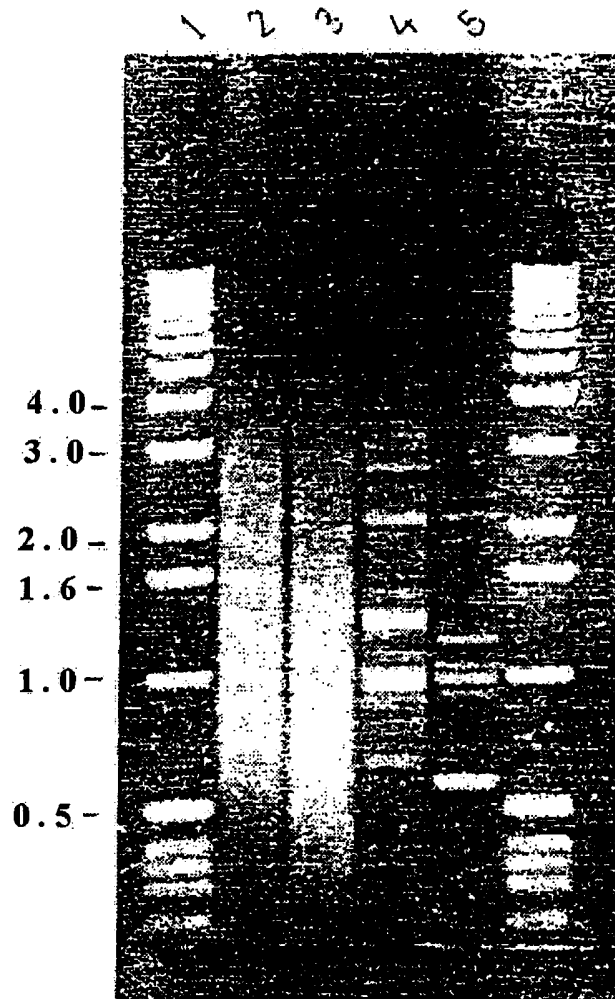
amplifikovaný restriční fragment

OBR. 9

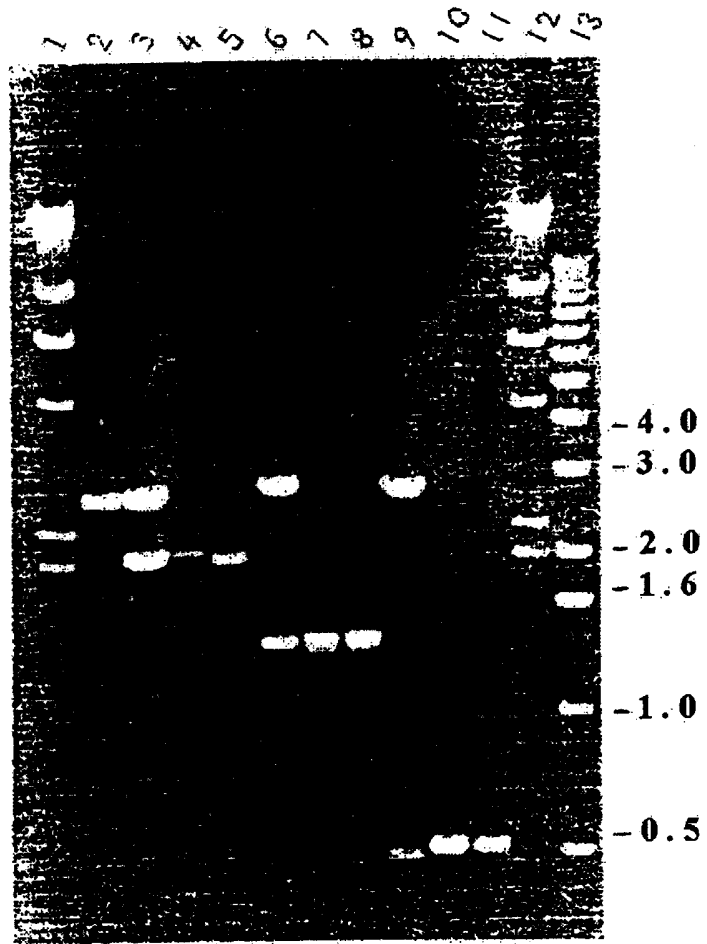
Polymorfismus délky amplifikovaného fragmentu



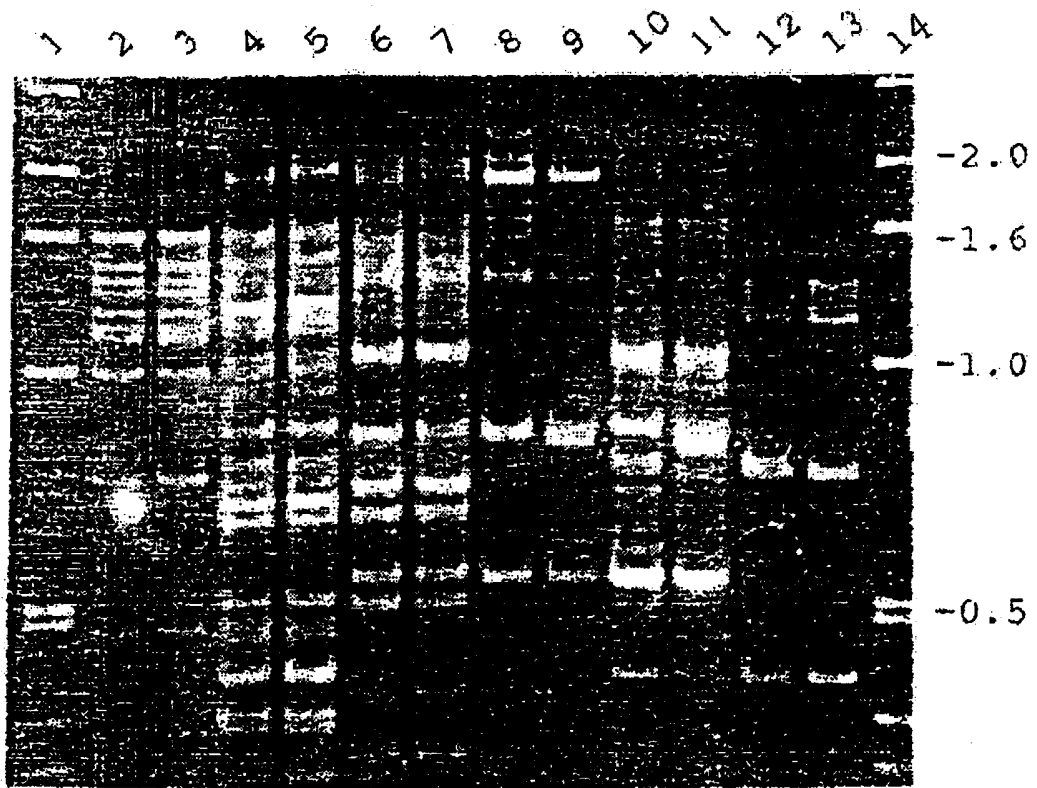
OBR. 10



OBR. 11



OBR. 12



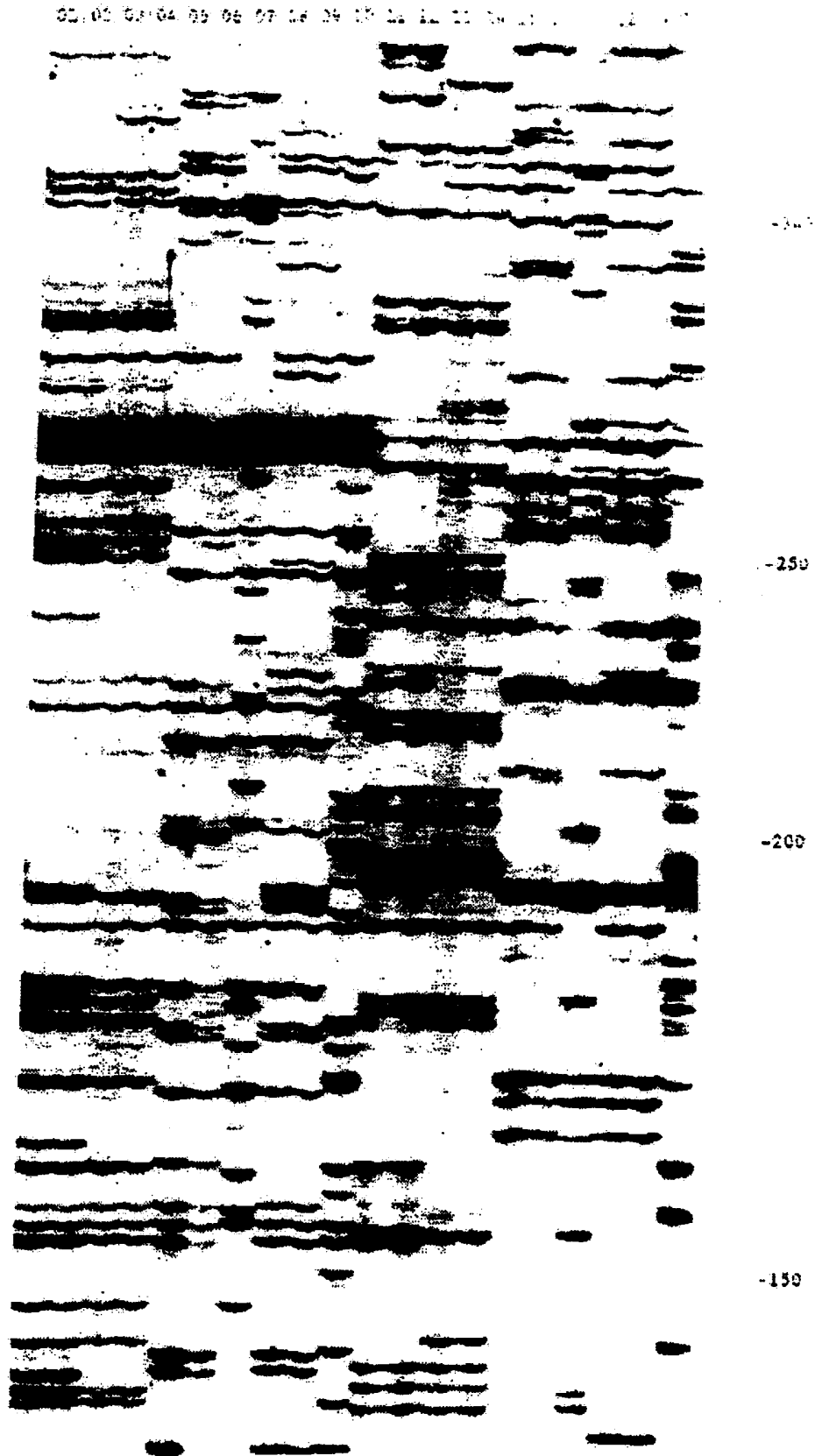
OBR. 13

**SRFA čtyř linií rajčat při použití PstI a MseI jako
rastrikčních enzymů**

[The main body of the document is almost entirely obscured by heavy black redaction marks, appearing as numerous horizontal and vertical bars of varying thicknesses across the page.]

OBR: 14

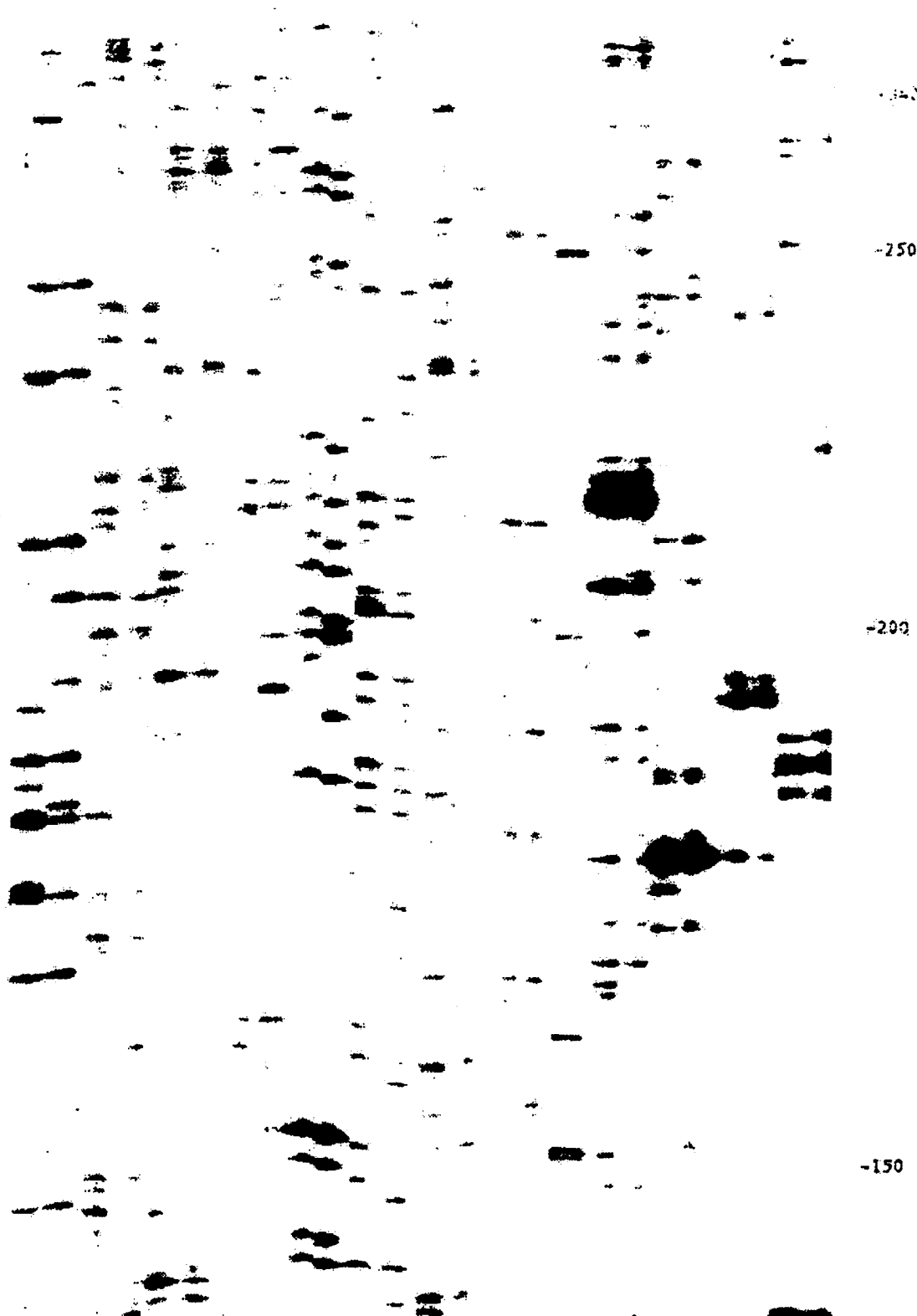
SRFA vzorků DNA z *Lactuca* při použití PstI a MseI jako
restrikčních enzymů



OBR. 15

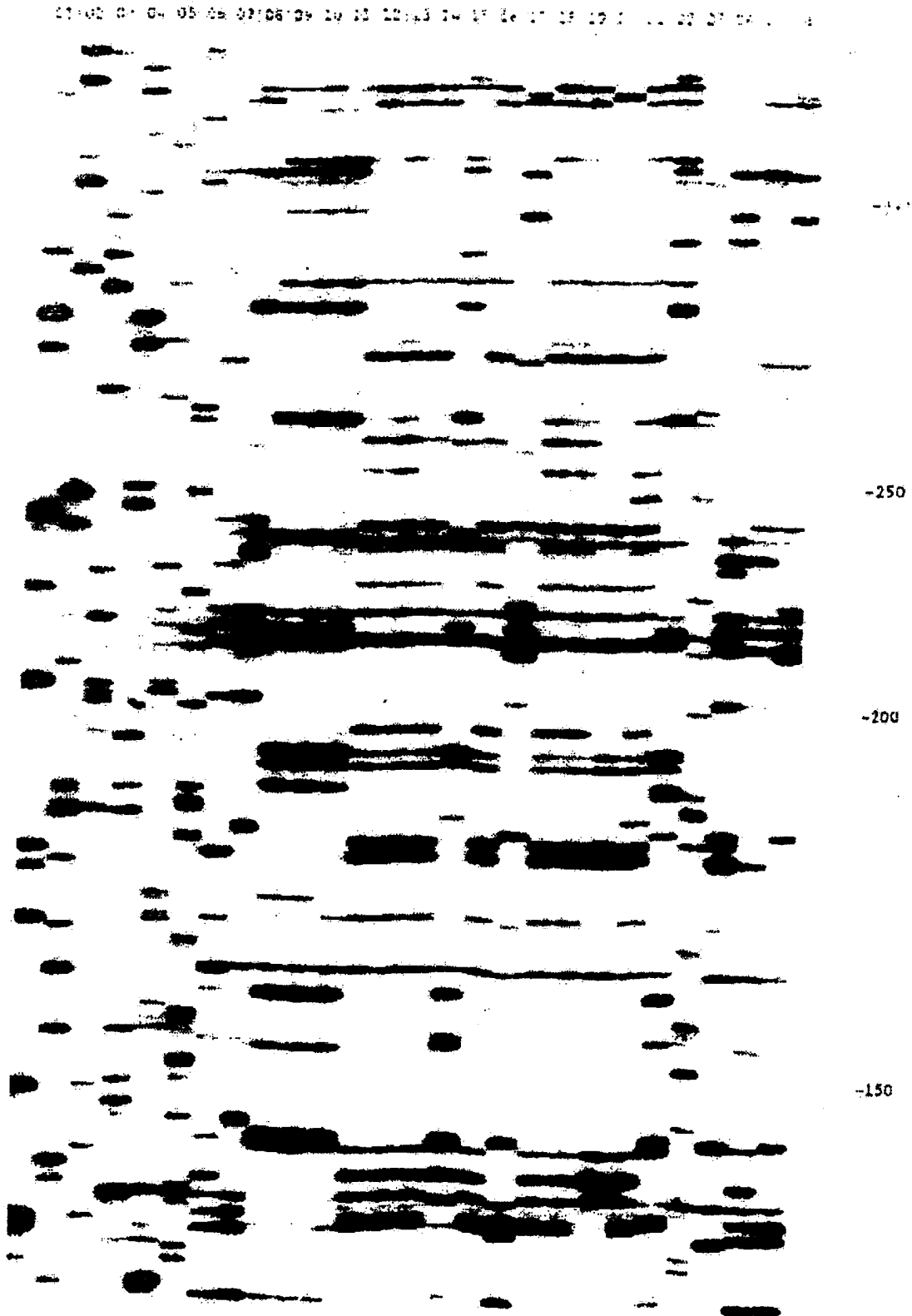
SRFA DNA z kukuřice při použití PstI a TaqI nebo
EcoRI a TaqI

01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100



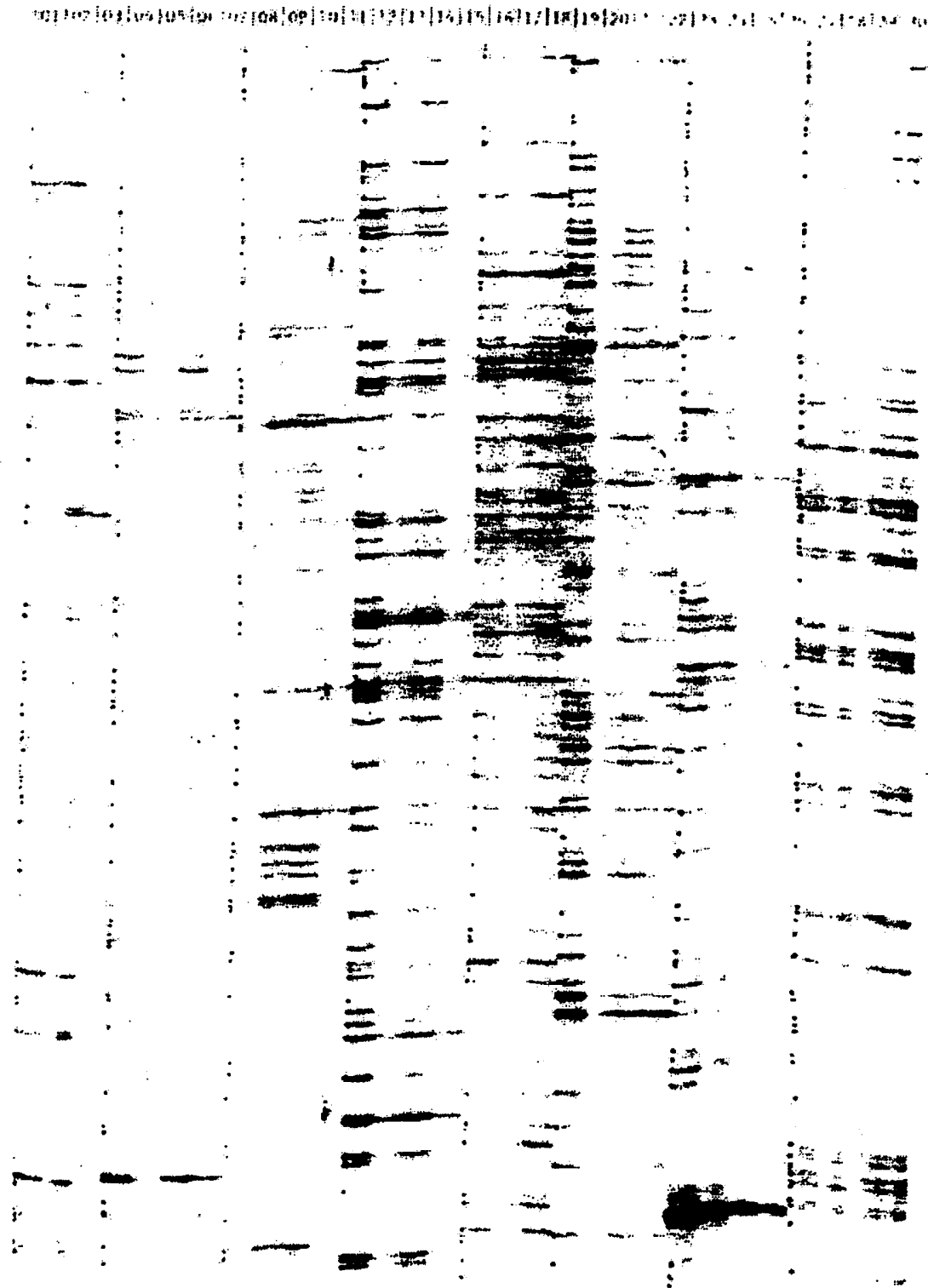
OBR. 16

SRFA bakteriální DNA při použití ApaI a TaqI jako
restrikčních enzymů



OBR. 17

SRFA DNA živočichů při použití SSE83971 a MseI jako
restrikčních enzymů



OBR. 18

Konec dokumentu