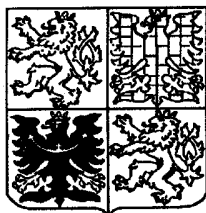


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 669-94

(13) A3

5(51)

C 12 Q 1/68

(22) 24.09.92

(32) 24.09.91

(31) 91/91402542

(33) EP

(40) 15.12.94

(71) Keygene N.V., Wageningen, NL;

(72) Zabeau Marc, Gent, BE;
Vos Pieter, HZ Renkum, NL;

(54) **Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů**

(57) Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů spočívá v tom, že se: a) výchozí DNA rozštěpí uvedenou specificky restrikční endonukleázou nebo endonukleázami za vzniku řady restrikčních fragmentů, b) restrikční fragmenty, získané z výchozí DNA se naváží na alespoň jeden synthenický oligonukleotid s dvojitým řetězcem (označovaný jako adaptor) s jedním koncem, kompatibilním pro vazbu na jeden nebo oba konce restrikčních fragmentů za vzniku prodloužených restrikčních fragmentů výchozí DNA, c) prodloužené restrikční fragmenty se za hybridizačních podmínek uvedou styku s alespoň jedním oligonukleotidovým primerem, d) uvedené primery zahrnující se stejnou sekvencí nukleotidů jako terminální části řetězce na koncích prodloužených restrikčních fragmentů včetně nukleotidů, účastnících se tvorby místa působení stanovené specifické restrikční endonukleázy a včetně alespoň části nukleotidů v navázaném adaptoru, přičemž alespoň jeden z uvedených primerů obsahuje na svém 3-konci zvolený řetězec s obsahem určeného počtu (jeden nebo několik) nukleotidů, uložených bezprostředně za posledním nukleotidem, účastnícím se tvorby místa pro specifickou restrikční endonukleázu. e) prodloužené restrikční fragmenty hybridizované na uvedené primery se amplifikují pomocí PVR nebo podobné techniky v přítomnosti požadovaných nukleotidů a DNA-polymerázy nebo se uskuteční elongace hybridizovaných primerů podél prodloužených restrikčních fragmentů výchozí DNA s nř uvedených primerů z počátku hybridizovány v celé své délce a f) amplifikované nebo elongované fragmenty DNA, získané ve stupni e) se identifikují nebo izolují.

Selektivní amplifikace restričních fragmentů



1. Oblast techniky

5 Vynález se týká selektivní amplifikace restričních fragmentů, aplikací mapování DNA a použití značení DNA v řadě různých aplikací včetně křížení rostlin a živočichů, identifikace kultivarů, v diagnostickém lékařství, při diagnose různých chorob u
10 rostlin i u živočichů, při identifikaci geneticky podmíněných chorob u člověka, při analýze příbuzenských vztahů, v kriminalistice a při určování typů mikroorganismů.

Specificky se vynález týká způsobů pro mapování DNA a pro detekci specifického značení DNA v genomech od
15 mikroorganismů až k vyšším rostlinám, živočichům a člověku. Vynález se rovněž týká syntetických molekul DNA a produktů na jejich bazi pro použití v různých oborech.

2. Dosavadní stav techniky

20

2.1. Mapování DNA

Mapování nebo typování DNA, stejně jako další metody pro mapování genů, identifikaci a analýzu DNA se týkají charakterizace podobnosti nebo odlišnosti genetického základu nebo genomu
25 jednotlivce, variety nebo rasy nebo čeledi. 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
30 enzymy, které rozpoznávají krátké řetězce nukleotidů, obvykle 4 až 8 bazí. 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 délky na porézních matricích nebo gelech, čímž dochází ke vzniku typických pásů, které jsou podkladem pro mapování DNA v genetickém základu organismu.

2.2. Polymorfismus DNA

V případě mapování velmi blízké příbuzných čeledí, odrůd nebo ras mohou být získané mapy DNA totožné nebo velmi podobné. V případě, že jsou pozorovány rozdíly u jinak identických map DNA, hovoří se o polymorfii DNA. Jde o nové fragmenty DNA, které se v mapě objevují. DNA je pak v této poloze polymorfni a nový fragment DNA je možno využít k označení DNA. Polymorfie DNA, prokázaná v mapách DNA, získaných pomocí štěpení restričními enzymy může být způsobena kteroukoliv z následujících změn v řetězci DNA: mutace, které odstraní místo působení restriční endonukleázy, mutace, jejichž důsledkem je vznik nových míst působení těchto enzymů, uložení nových bazí, vypuštění některých bazí nebo inverse mezi dvěma místy působení restričních enzymů.

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

2.3. Technika mapování DNA

V případě téměř všech živých organismů s výjimkou virů vzniká při štěpení veškeré DNA genomu působením restričních

endonukleáz tak velké množství pásů, že není možné vyšetřit obsah všech těchto pásů. Z tohoto důvodu jsou všechny metody pro mapování DNA založeny na principu, při jehož provádění se visualizuje jen malá frakce fragmentů DNA, takže vzniká jednoduchá sestava pásů, která tvoří mapu 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 zajistí se jejich vazba na membránu, načež se membrána hybridizuje se specifickým fragmentem DNA, "sondou". Fragment DNA vytvoří molekuly DNA s dvojitým řetězcem s fragmentem (nebo fragmenty) na membráně s obsahem komplementárních nukleotidových řetězců. V případě, že je sonda opatřena označením, které je možno učinit viditelným, je možno visualizovat 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, specificky polymorfismus délky restričních fragmentů. Rozdíly v délce restričních fragmentů odpovídají různým alelovým formám genetického místa, které jsou rozpoznávány sondou. Přestože je Southernova metoda mapování 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 vyšetření jednotlivých míst nebo malého množství míst v jedné reakci.

2.4. Řetězová reakce s použitím polymerázy (PCR)

5 Technika PCR 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, stálé při vyšší teplotě.
Oligonukleotidy jsou zkonstruovány tak, že se mohou vázat na
10 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, takže DNA mezi primery je
zdvojená. V průběhu každého cyklu syntézy DNA tak dochází ke
15 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".

20 Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří nový způsob amplifikace
restrikčních fragmentů, které byly získány po rozštěpení DNA určitého
organismu pomocí alespoň jednoho restrikčního enzymu, při použití
25 PCR. Při této nové aplikaci metody PCR nejsou použité nukleotidy
namířeny proti známému řetězci DNA, avšak jsou zkonstruovány tak,
že rozpoznávají zakončení restrikčního fragmentu. K tomuto účelu je
zapotřebí modifikovat tato zakončení restrikčních fragmentů
navázáním oligonukleotidových vazných řetězců (spojovníků,
30 adaptorů). Důvodem pro toto opatření je skutečnost, že konce
restrikčních 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 je založen na použití nové aplikace PCR-reakce pro amplifikaci jednoho nebo většího počtu restričních fragmentů, získaných z komplexní směsi fragmentů DNA, získaných rozštěpením molekul DNA genomu působením restričních endonukleáz. Jednou ze zvláštních výhod vynálezu je umožnění amplifikace restričních fragmentů DNA v situacích, v nichž řetězec nukleotidů na 5'-zakončení a 3'-zakončení není stanoven. V takových případech není možno definovat obvyklé řetězce specifických primerů, hybridizující na každý ze řetězců restričního fragmentu, který má být amplifikován a není tedy také možno použít žádnou ze známých amplifikačních metod.

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

1) Metody pro typování DNA genomů tak, že se náhodně vybere podskupina jednoho nebo většího počtu restričních 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 typování DNA, identifikace mikroorganismů, identifikace odrůd, analýza plemen a vyšetřování DNA, označené zjistitelným značením a vázané na genetické prvky.

2) Metody pro identifikace jednoho nebo většího počtu předem vybraných fragmentů DNA, které mohou být polymorfni, při použití PCR-amplifikace. Vynález rovněž zahrnuje specifické syntetické oligonukleotidy pro použití při 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.

4. Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je obecně graficky znázorněn způsob PCR-amplifikace prodloužených restričních fragmentů, získaných štěpením DNA genomu působením restričních endonukleáz.

Na obr. 2 je znázorněn způsob vazby adaptorů na odlišná zakončení restričních fragmentů: posunutá zakončení a vyplněná zakončení.

Na obr. 3 je znázorněna PCR-amplifikace prodloužených restričních fragmentů. Oblasti, označené orámováním, jsou adaptory, které jsou na restriční fragmenty navázány, a primery, které jsou použity při provádění PCR-amplifikace. Šipky označují směr syntézy DNA.

Na obr. 4 je graficky znázorněno provádění PCR-amplifikace na prodloužených restričních fragmentech.

Na obr. 5 je obecně znázorněna konstrukce selektivních primerů, které je možno použít při uskutečnění PCR-amplifikace prodloužených restričních fragmentů. šipkami jsou označeny obrácené opakující se řetězce na koncích restričních fragmentů. Selektivita primerů je ilustrována na dvou příkladech, v jednom z nich dochází k přesnému souladu a ve druhém z nich k úplnému nesouhlasu mezi selektivním řetězcem bazí a DNA, která je matricí pro restriční fragment.

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.

Na obr. 7 je znázorněn průběh selektivní PCR-amplifikace, prováděné na prodloužených restričních fragmentech.

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

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

15 Na obr. 10 jsou znázorněny typy variací nukleotidových řetězců, které je možno prokázat při způsobu identifikace polymorfismu délky amplifikovaných fragmentů.

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

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

30

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

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

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

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

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

20 Na obr. 18 je znázorněna část 4,5% denaturačního polyakrylamidového gelu a typovanou DNA, odebranou různými jednotlivcům 4 druhů domácích zvířat: užita byla kuřata, vepř, kráva a kůň, postup byl uskutečněn při použití SRFA a kombinace restrikčních enzymů SseI/MseI.

25

30

5. Podrobný popis vynálezu

5.1. Definice

5 V průběhu popisu přihlášky a následujících příkladů je užitá celá řada pojmů. Aby bylo možno zajistit jasné a trvalé porozumění popisné části i patentových nároků včetně rozsahu vynálezu, bude dále osvětlena řada pojmů:

10 - Restrikční endonukleáza nebo restrikční enzym je enzym, který rozpoznává specifický řetězec bází (cílové místo) v molekule DNA s dvojitým řetězcem, při použití tohoto enzymu dojde ke štěpení obou řetězců molekuly DNA v každém z těchto míst.

15 - 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 elektroforézy na gelu.

20

25 - Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP): DNA genomu dvou blízké příbuzných organismů, bude vykazovat určité rozdíly mezi složením jednotlivých nukleotidových řetězců na řadě míst. V případě, že se tyto rozdíly vyskytnou v místě, které je cílovým místem pro určitou restrikční endonukleázu, nebude se řetězec štěpit v tomto modifikovaném místě. Stejným způsobem ovšem může dojít také k takové modifikaci řetězce, při níž vznikne nové cílové místo, které neexistuje u jiných organismů, a v tomto místě pak dojde ke štěpení řetězce DNA příslušným enzymem. může rovněž dojít k tomu,

30 že přídatné nukleotidy, nebo také nukleotidy, u některého organismu chybějící budou modifikovat vzdálenost mezi cílovými 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 obou uvedených organismů tímž restrikčním enzymem.

5
10
15
- Elektroforéza na gelu: Aby bylo možno prokázat přítomnost restrikčních fragmentů je zapotřebí použít analytické metody pro frakcionaci molekul DNA s dvojitým řetězcem na základě rozměrů těchto fragmentů. Nejběžněji 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.

20
25
- Synthetické oligonukleotidy: Molekuly DNA s jednoduchým řetězcem, obsahující s výhodou 10 až 50 bazí a syntetizovatelné chemickou cestou se označují jako synthetické oligonukleotidy. Obecně jsou tyto synthetické 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 synthetického oligonukleotidu tedy bude užíván pro ty molekuly DNA, které mají pouze jednoduchý řetězec. Pojem smíšených oligonukleotidů bude dále užíván pro skupiny příbuzných oligonukleotidů, které mají analogické řetězce s výjimkou určitých míst.

30
- Vazba: enzymatická reakce, katalyzovaná enzymem ligázou, při níž jsou dvě molekuly DNA s dvojitým řetězcem spolu kovalentně spojeny se označuje jako vazba. Obecně jsou spolu oba řetězce DNA kovalentně spojeny, je však také možné zabránit vazbě jednoho ze dvou řetězců chemickou nebo enzymatickou modifikací

jednoho z obou zakončení. V tomto případě dojde ke kovalentní vazbě pouze na jednom z obou řetězců DNA.

5 - Adaptory: krátké molekuly DNA s dvojitým řetězcem, s omezeným počtem párů bazí, například 10 až 30 párů bazí, 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.

10

15 -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 párů bazí a dále se užívá DNA-polymerázy, odolné proti působení tepla. Řetězová 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 vytvářet struktury s dvojitým řetězcem s molekulami substrátové DNA, které mají komplementární nukleotidové řetězce. 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.

20

25

30

- 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.

5

- Primery: Obvykle se termín primer užívá pro řetězec DNA, od jehož 3'-zkončení začíná syntéza 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 textu označovány molekuly syntetických oligonukleotidů, které se užívají při PCR-reakci k zahájení reakce.

10

15

- Southernova hybridizace: Účelem Southernovy hybridizace, která se často označuje také jako Southern blot je fyzikální přenos DNA, frakcionované na agarozovém gelu na 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.

20

25

- Hybridizace nukleových kyselin: Hybridizace nukleových kyselin se užívá k detekci příbuzných řetězců DNA hybridizací DNA s jednoduchým řetězcem na nosiči, například na nylonové membráně nebo na nitrocelulóзовém filtračním papíru. Molekuly nukleových kyselin, které mají komplementární řetězce bazí 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.

30

- 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.

10 5.2. Popis výhodných provedení

Vynález se specificky týká způsobu a prostředků pro aplikaci PCR-reakce pro detekci polymorfismu restrikčních fragmentů (RFP) včetně polymorfismu v jejich délce. Vynález poskytuje metodu pro detekci RFP, syntetické oligonukleotidy pro použití při provádění způsobu podle vynálezu, balíčky s obsahem prostředků k detekci RFP a umožňuje aplikaci způsobu podle vynálezu 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, odrůdy nebo jednotlivce.

Obecný postup podle vynálezu pro produkci a pro identifikaci restrikčních fragmentů zahrnuje použití restrikční endonukleázy, vazbu 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 cílových místech za vzniku restrikčních fragmentů.

5 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 naváží syntetické oligonukleotidy (adaporty), takže každý restrikční fragment je opatřen dvěma prodlouženími, která slouží jako podklad pro zakotvení primerů, 10 užitých při PCR-amplifikaci.

Po působení restrikčních enzymů vznikají buď rovná zakončení, v nichž vytvářejí terminální nukleotidy obou řetězců pár bází, nebo nepravidelně prodloužená zakončení, v nichž jeden ze 15 dvou řetězců je na krátkou vzdálenost prodloužen (obr. 2). V případě restrikčních fragmentů se zarovnanými konci se užívají adaporty s jedním zarovnaným koncem. V případě nepravidelně zakončených restrikčních fragmentů se užívají adaporty s prodlouženým jedním řetězcem, komplementárním k prodlouženému řetězci restrikčního fragmentu. Užívají se tedy pro každý typ 20 restrikčního fragmentu specifické adaporty, které se liší pouze na jednom ze zakončení tak, aby adaptor mohl být navázán na restrikční fragment. V typických případech jsou použité adaporty tvořeny dvěma syntetickými oligonukleotidy, které jsou částečně 25 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 dochází k vazbě adaptorů na směs restrikčních fragmentů. V případě, že se užije velkého molárního přebytku adaptoru ve srovnání s množstvím restrikčních fragmentů, je možno 30 zajistit, že všechny restrikční fragmenty budou opatřeny adaporty na obou svých koncích. Restrikční fragmenty, připravené tímto způsobem se označují jako prodloužené restrikční fragmenty a postup, jímž se tyto fragmenty získávají, bude dále označován jako prodlužování restrikčních fragmentů.

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

Obecně je možno uvést, že materiál, získaný rozštěpením DNA genomu, zvláště DNA genomu živočicha, rostliny nebo člověka

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

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

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

Prodloužené restrikční fragmenty mají následující obecnou strukturu: jde o variabilní řetězec DNA (odpovídající restrikčnímu fragmentu před jeho prodloužením), který je na obou svých stranách opatřen obráceným řetězcem DNA (konstantní řetězec). Obrácený řetězec DNA (konstantní řetězec) DNA je složen z části 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 vytvořil páry bazí 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 bazí.

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 řetězců vybraných bazí tak, aby bylo možno použít několika odlišných primerů. V takovém případě mohou primery mít tentýž stálý řetězec a variabilní řetězce mohou být vytvořeny vybranými bazemi, které jsou u takto vytvořených primerů od sebe navzájem odlišné.

Je to právě adice těchto variabilních (zvolených) řetězců na 3'-zakončení primerů, která řídí předběžnou selekci prodloužených restrikčních fragmentů, které budou amplifikovány v následujícím PCR-stupni: v případě, že se PCR-reakce uskuteční za příslušných

podmínek, zahájí primery syntézu DNA pouze na těch restričních fragmentech, v nichž může variabilní řetězec DNA přesně vytvořit páry bazí s řetězcem matrice prodlouženého restričního fragmentu, jak je znázorněno na obr. 5.

5

Selekce je určena 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 baze", aby bylo zřejmé, že selekce těchto bazí činí primer selektivním. Je zřejmé, že prodloužený restriční fragment bude amplifikován pouze v tom případě, že selektivní baze 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.

10

15

Je možné předem stanovit stupeň selektivity, jehož je možno dosáhnout při použití variabilních řetězců s různým počtem selektivních bazí, při použití obecného vzorce 4^n , v němž n znamená počet selektivních bazí: při použití jedné selektivní baze dojde k amplifikaci jednoho ze 16 prodloužených fragmentů, při použití dvou selektivních bazí jednoho z 256 prodloužených fragmentů, při použití tří selektivních bazí jednoho ze 4 096 fragmentů, při použití 4 selektivních bazí jednoho ze 65 536 fragmentů atd. Jedno z výhodných provedení vynálezu tudíž umožňuje selektivně amplifikovat náhodnou podskupinu prodloužených restričních fragmentů z jakéhokoliv rozštěpeného vzorku DNA genomu bez ohledu na počet fragmentů, který vznikne působením restričního enzymu.

20

25

30

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 vzorcem 4^n , 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 bazí 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 bazí. 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 prodlouží vhodnou radioaktivně značenou látkou nebo fluorescenčním chromoforem tak, aby byla možná identifikace reakčního produktu po frakcionaci na základě velikosti molekul. ve výhodném provedení vynálezu jsou PCR-produkty frakcionovány elektroforézou na gelu při použití standardních gelových matricí jako jsou agarosa, polyakrylamidový gel nebo směs agarozy a polyakrylamidu. PCR-produkty, získané způsobem podle vynálezu budou dále označovány jako amplifikované restrikční fragmenty (ARF).

Prostředky a metody podle vynálezu je možno použít k produkci skupin ARF z jakéhokoliv složitého genomu po jeho rozštěpení restrikčními enzymy. Vynález umožňuje uvést do souladu počet získaných restrikčních fragmentů s frakcionačním gelovým

systemem, 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 systemem 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 bazí 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 frakcionací 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 představují dobře reprodukovatelné typování pro DNA genomu. Takovéto typování může mít různé použití, například v případě typování pro kriminalistické účely, pro diagnostickou identifikaci organismů a také pro identifikaci druhů, ras, odrůd 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, z něž 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) cílovým řetězcem pro restriční endonukleázu a

b) nukleotidovým řetězcem, přilehlým k cílovému místu a nacházejícím se v selektivním primeru.

5 V příbuzných organismech, čeledích, odrůdách, rasách nebo u příbuzných jedinců jsou, uvedené řetězce a jejich relativní vzdálenosti konzervovány v menší nebo větší míře. To znamená, že uvedené typování představuje bazi 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 typování genomů je vysoká rozlišovací schopnost, již je tímto postupem možno dosáhnout: je totiž možno současně srovnávat několik desítek nebo i stovek ARF.

15 Další zvláštní možností aplikace je sériové vyšetření nebo identifikace polymorfismu restrikčních fragmentů (RFP). Změny v nukleotidovém složení DNA genomu často vedou k polymorfismu restrikčních fragmentů: navíc zařazené nebo vypuštěné části pak ovlivní velikost restrikčních fragmentů, které je obsahují, jak je zřejmé z obr. 8, změny v nukleotidech pak mohou mít za následek zrušení cílového místa pro působení restrikční endonukleázy nebo vznik nového cílového 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, jde o techniku, která se často označuje jako detekce polymorfismu délky restrikčních fragmentů, RFLP. Tato metoda zahrnuje extensivní sériové vyšetření náhodně klonovaných fragmentů DNA při provádění Southern blot, tak aby bylo možno prokázat asociaci RFLP v různých genomech. V souladu s prováděním způsobu podle vynálezu je možno RFP identifikovat přímým srovnáním ARF, získaných z různých genomů. V principu je způsob podle vynálezu v případě 25 detekce RFP citlivější vzhledem k tomu, že nedochází pouze k detekci rozdílů mezi cílovými místy pro restrikční endonukleázu, nýbrž také k detekci rozdílů v přilehlých nukleotidových řetězcích, obsažených v selektivních PCR-primerech. V důsledku toho 30

představuje způsob podle vynálezu v současné době nejvýhodnější postup pro detekci RFLP.

5 RFLP je nyní možno využít pro různé aplikace včetně
typování 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
10 vlastnostmi a je možno jej využít ke sledování přítomnosti nebo
nepřítomnosti specifických genetických vlastností.

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

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

30 Ve druhém výhodném provedení zahrnuje vynález použití
způsobu podle vynálezu pro identifikaci jednoho nebo většího počtu
specifických restričních fragmentů. Určitý specifický restriční
fragment je možno amplifikovat z komplexní směsi prodloužených
restričních fragmentů tak, že se nejprve stanoví nukleotidový

řetězec prvních 8 až 12 bazí na každém konci restrikčního fragmentu. Na základě tohoto řetězce je pak možno konstruovat dva primery vždy s obsahem 5 až 10 nukleotidů, s řetězcem, komplementárním k řetězci v bezprostřední blízkosti místa působení restrikčního enzymu v komplementárním řetězci restrikčního fragmentu. Při použití skupin takových primerů je po PCR-amplifikaci možno získat jediný amplifikovaný fragment. Restrikčním fragmentem, použitým při tomto postupu může být buď klonovaný restrikční fragment nebo amplifikovaný restrikční fragment. Vzhledem k tomu, že celou řadu restrikčních fragmentů není možno příliš účinně amplifikovat, spočívá výhodný postup podle vynálezu pro identifikaci polymorfní značící DNA 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 restrikční 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 cílovému místu působení restrikční endonukleázy. Jakmile jsou tyto nukleotidové řetězce známy, je možno zkonstruovat specifické primery pro restrikční fragmenty, které budou amplifikovat pouze jediný restrikční fragment z rozštěpené DNA genomu. V tomto specifickém provedení vynálezu je možno použít pro detekci specifického restrikčního fragmentu dvou od sebe odlišných selektivních primerů. V každém ze dvou selektivních primerů se pak selektivní baze volí tak, že jsou komplementární vzhledem k řetězci nukleotidů, který je bezprostředně vázán na cílové místo pro restrikční endonukleázu, jak je znázorněno na obr. 8. Počet selektivních bazí pro každý primer závisí na komplexnosti směsi fragmentů po působení restrikčních 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 užijí 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 konstruuji tak, že jejich produkty mohou rozlišovat mezi normálními 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, je možné sledovat současně různá onemocnění, tento postup se často označuje jako PCR multiplex. Tento postup však trpí omezením, které spočívá v tom, že je možno 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 hořčnatých 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 zjištěitelné 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.

Způsob 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 značící DNA, k jejíž 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 bazí synthetického oligonukleotidu, jehož je zapotřebí k dosažení požadované specifičnosti 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. Způsob podle vynálezu proto představuje dosud nejuvhodnější postup pro PCR multiplex.

Vnález tedy poskytuje obecný postup pro izolaci značící DNA z jakéhokoliv genomu a pro použití této značící DNA ve všech myslitelných aplikacích typování DNA.

Vynález bude dále osvětlen následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení jeho rozsahu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů DNA z rajčete při použití PstI

A) Izolace a modifikace DNA

Celková DNA z rajčete (*Lycopersicon esculentum* c.v. Moneymarker) byla izolována z mladých listů způsobem podle publikace Brnatzski a Tanksley, 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 restrikční fragmenty byly navázány adaptory PstI s dvojitým

řetězcem (ds) dále popsaným způsobem. Tyto adaptory měly následující strukturu:

5- CTCGTAGACTGCGTACATGCA - 3

5 3- CATCTGACGCATGT - 5

3'-TGCA-přečnivající 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 adaptor a 2) vazba a restrikční 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:

25 2 mikrogramy DNA z rajčete
 0,2 mikrogramu adaptoru
 20 jednotek PstI
 1 jednotka T4 DNA-ligázy
 10 mM trisHAc o pH 7,5, 10 mM MgAc, 50 mM KAc,
 2 mM dithiothreitolu, 0,5 mM ATP

30 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 NH_4Ac do konečné koncentrace 2,5 M Pak se přidá ještě 100 mikrolitrů ethanolu s teplotou $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 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 $4\text{ }^\circ\text{C}$. 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 $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Selektivní srážení, tak jak bylo popsáno, účinně odstraní nenavázané adaptory z reakční směsi, současně však dochází také ke ztrátě malých fragmentů DNA (200 párů bazí 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 MgCl_2 , 50 mM KCl
- H_2O 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 $94\text{ }^\circ\text{C}$, 1 minuta při $60\text{ }^\circ\text{C}$, pak vzestup teploty od 60 do $72\text{ }^\circ\text{C}$ rychlostí $1\text{ }^\circ\text{C}$ za 5 sekund a 2,5 minuty při $72\text{ }^\circ\text{C}$. 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.

5 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:

1. 5-CTCGTAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGACTGCGTACA-3
2. 5-GACTGCGTACAtgcagA-3
3. 5-GACTGCGTACA tgcagAC-3
- 15 4. 5-GACTGCGTACAtgcagACC-3

Primer 1 je částí horního řetězce adaptoru, použitého pro modifikaci DNA a měl by tedy amplifikovat všechny PstI-fragmenty. Primer 2 obsahuje část řetězce adaptoru, rozpoznávací místo působení enzymu PstI (řetězec, psaný malými písmeny) a jeden selektivní nukleotid (velká písmena) a měl by teoreticky amplifikovat 20 přibližně 1/16 všech PstI-fragmentů. Primery 3 a 4 jsou podobné primeru 2, avšak obsahují 2 a 3 selektivní nukleotidy a je tedy možno očekávat, že budou amplifikovat přibližně 1/256 a 1/4096 PstI-fragmentů. Část reakční směsi byla analyzována na 25 agarozovém gelu, výsledek je znázorněn na obr. 11. Dráhy 1 a 6 na tomto obrázku obsahují značící DNA, jejíž velikost je uvedena vlevo. Dráhy 2, 3, 4 a 5 obsahují produkty PCR, získané při použití primerů 1, 2, 3 a 4. Výsledky prokazují, že pouze v případě primeru, obsahujícího 3 selektivní nukleotidy je počet amplifikovaných 30 fragmentů takový, aby bylo možno získat zřetelné pásy. V případě ostatních tří primerů byly získány pásy, které nebylo možno na agarozovém gelu rozdělit, protože vzniklo příliš mnoho produktů PCR-reakce. Mezi těmito produkty vždy převažují některé fragmenty

a je možno je pozorovat jako nátěr v pozadí, na němž se jeví další PCR-produkty. Je pravděpodobné, že se tyto produkty vyskytují ve větším počtu kopií v genomu rajčete nebo dochází k jejich účinnější amplifikaci než v případě dalších produktů. Je nutno uvést, že
5 vzhledem k celkovému počtu fragmentů po štěpení enzymem PstI v DNA genomu rajčete, 20 000 až 100 000 bylo od začátku předpokládáno, že bude zapotřebí použít primery, obsahující 3 selektivní nukleotidy k získání zřetelně odlišitelných pásů na agarozovém gelu.

10 D) Analýza amplifikovaných fragmentů pomocí Southern blot

Amplifikované fragmenty byly zkoumány metodou Southern blot, aby bylo možno ověřit, zda tyto fragmenty odpovídají restriční fragmentům s odpovídajícími rozměry. K tomuto účelu byly čtyři
15 fragmenty, získané při použití primeru 4, vyříznuty z agarozového gelu. Ze získaných řezů byla čištěna DNA absorpcí na skleněné kuličky (Gene Clean, Bio 101) a část čištěné DNA byla znovu amplifikována, čímž byl získán přibližně 1 mikrogram každého ze čtyř fragmentů DNA. Produkty reamplifikační reakce pak byly analyzovány
20 elektroforézou na 1,0% preparativním agarozovém gelu a požadované fragmenty DNA byly čištěny. 200 ng každého z fragmentů bylo označeno při použití (alfa-³²P)dATP při použití balíčku pro značení podle návodu výrobce (Boehringer Mannheim). Veškerá DNA rajčete byla rozštěpena PstI materiál byl podroben
25 elektroforéze na 1,0% agarozovém gelu. Byly použity čtyři zřetelně od sebe oddělené dráhy, na každou z nich byly nanесeny přibližně 3 mikrogramy DNA po rozštěpení. Pak byl proveden blot agarozového gelu při použití hybridizační membrány Genscreen * podle návodu výrobce (New England Nuclear). Po uskutečnění blotu byl gel
30 rozdělen na čtyři podíly, z nichž každý obsahoval jednu dráhu, získanou z DNA rajčete, rozštěpené působením enzymu PstI. Každý z uvedených čtyř podílů byl hybridizován na jednu ze čtyř DNA-sond způsobem podle publikace Klein-Lankhorst a další, Theor. Appl. Genet. 81, 661-667. Hybridizovaný materiál byl podroben

autoradiografii po dobu 40 hodin při použití filmů Kodak XAR5. Získané výsledky prokazují, že všechny fragmenty DNA genomu byly rozpoznávány uvedenými čtyřmi sondami DNA a měly stejnou délku jako tyto sondy. To znamená, že amplifikované fragmenty, užitě jako sondy, pocházely z fragmentů, prokázaných na blotech.

E) Selektivní amplifikace jediného restričního fragmentu

Pro 3 náhodně zvolené PstI-fragmenty DNA rajčete byly zkonstruovány tři skupiny primerů, šlo o fragmenty, u 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

15

Řetězec 1

5-ctgcagCAGTACCAGC-----CCGGCACCTGctgcag-3

5-TGCGTAACATtgcagCAGTA-3 3-TGGACgacgtACATGCGT-5

primer 1.1

primer 1.2

20

Skupina primerů 2

Řetězec 2:

5-ctgcagCCGAATCTCT-----AGTGAGTTAGctgcag-3

5-TGCGTACAtgcagCCGAA-3 3-CAATCgacgtACATGCGT-5

primer 2.1

primer 2.2

25

Skupina primerů 3

Řetězec 3:

5-ctgcagAATACCAAGA-----GCAAGCACAGctgcag-3

5-TGCGTACAtgcagTTATG-3 3-GTGTCgacgtACATGCGT-5

30

primer 3.1

primer 3.2

DNA rajčete byla rozštěpena enzymem PstI a na zakončení restričních 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 molekul této značící DNA (v kilobazích, kb) je uvedena na obou stranách gelu. Ve drahách 3, 6 a 9 je znázorněna DNA plasmidu s každým ze tří fragmentů po 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 fg odpovídající DNA plasmidu a 1 ng celkové DNA genomu. Ve drahách 7 a 8 je znázorněna amplifikace při použití skupiny primerů 2, DNA plasmidu 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.

20

F) Identifikace polymorfismu DNA s použitím SRFA

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 polymorfismus 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

30

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.

DNA byla izolována ze dvou linií rajčat (linie 83M-71392, *Mi*-sensitivní a linie 83M-71398, *Mi*-odolná, obě byly získány od De Riter Seeds, Bleiswijk, Nizozemí), tyto linie byly rozštěpeny působením restričního 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 Protean 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 kilobazích 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 polymorfismus cílových míst pro působení restričních 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 polymorfní 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 difuse ve 200 mikrolitrech 100 mM tris.HCl o pH 8,0, 10 mM EDTA. 2 mikrolitry materiálu byly použity pro reamplifikaci 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 plasmidového vektoru pUC18 (Yanisch-Perron a další, Gene 33, 103-119 po rozštěpení enzymem SmaI. 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).

Byly syntetizovány dvě skupiny primerů s obsahem šesti selektivních nukleotidů na bazi 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 polymorfismus, jaký byl původně prokázán u primerů s obsahem tří selektivních nukleotidů, které byly užity k průkazu tohoto polymorfismu.

Příklad 2

Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů DNA rajčete při použití dvou restrikčních enzymů

V příkladu 1 byl osvětlen princip selektivní amplifikace restrikčních fragmentů (SRDA) při použití DNA rajčete a restrikčního

enzymu PstI V tomto příkladu bude popsána amplifikace typu SRDA při použití dvou restrikčních enzymů, PstI a MseI.

5

Izolace a modifikace DNA

10

Veškerá DNA rajčete byla izolována z mladých lístků způsobem, který byl popsán v příkladu 1. Dva páry tak zvaných isogenických 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 isogenických linií jsou geneticky velmi podobné, avšak liší se od sebe přítomností řetězce pro odolnost proti

15

patogenní houbě *Verticillium albo-atrum*. Prvním stupněm při modifikaci vzorků DNA bylo štěpení těchto vzorků při použití dvou restrikčních 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), pufr obsahoval následující složky: 10 mM Tris.HAc, 10 mM MgAc, 50 mM KAc a 5 mM DTT, pH 7,5.

20

Štěpení DNA restrikčními enzymy PstI a MseI

25

Štěpení DNA bylo prováděno při použití následujících materiálů:

2,5 mikrogramů DNA

12,5 jednotek PstI (Pharmacia, 10 jednotek/mikrolitr)

30

12,5 jednotek MseI (N.E.Biolabs, 4 jednotky/mikrolitr)

5,0 mikrolitru 10 x RL-pufr

H₂O do 50 mikrolitrů

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

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.

5

Příprava adaptorů

Adaptor MseI má následující řetězec:

5-GACGATGAGTCCTGAG-3

10

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 se 7 mikrogramy, 1430 pmoly 14-meru 5-TACTCAGGACTCAT-3 v celkovém objemu 28,6 mikrolitrů vody.

15

Adaptor PstI má následující řetězec:

5-bio-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3

3-CATCTGACGCATGT-5

20

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

25

Vazba molekuly adaptoru

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

30

1 mikrolitr PstI bio-adaptoru (= 5 pmol)

1 mikrolitr MseI adaptoru (= 50 pmol)

1,2 mikrolitru 10 mM ATP

1 mikrolitr 10 x RL-pufu

1 jednotka T4 DNA-ligázy (Pharmacia, 5 jednotek/mikrolitr)
H₂O do 10 mikrolitrů

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

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

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.

Biotinylované fragmenty se v tomto stupni oddělí od nebiotinylovaných fragmentů (fragmenty Msel-Msel) vazbou na paramagnetické streptavidinové kuličky (Dyna). 10 mikrolitrů kuliček se 1x promyje 100 mikrolitry STEX (100 mM NaCl, 10 mM tris.HCl, 1 mM 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, přidrží v blízkosti magnetu. Tak nemohou kuličky být odpipetovány při přenášení supernatantu do jiné zkumavky. Kuličky se 1x promyjí a

5 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.

10 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-MseI

15 Matricová DNA, připravená svrchu uvedeným způsobem by měla obsahovat všechny fragmenty PstI-MseI z uvedených linií rajčat a mimoto ještě malé množství fragmentů PstI-PstI, prostých vnitřních fragmentů MseI. V tomto pokusu byl větší počet těchto fragmentů PstI-MseI 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
20 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 pásů v jedné dráze, což je přibližně 10x tolik jako v případě agarozových gelů z příkladu 1. Fragmenty byly
25 vizualizovány označením jednoho z PCR-primerů na 5'-zakončení pomocí (³²P)ATP a polynukleotidkinázy.

Značení PCR-primeru

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

3,0 mikrolitrů 18-meru (z roztoku 50 ng/mikrolitr = 150 ng) 5,0 mikrolitrů ³²P-ATP (z roztoku 10 mikroCi/mikrolitr = 50 mikroCi) 3,0 mikrolitrů 250 mM tris.HCl, 100 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

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)

0,6 mikrolitrů PstI-primeru (30 ng)
 2,0 mikrolitru 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
 5 mikrolitr)
 13,0 mikrolitru vody

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:

15 1 cyklus: denaturace: 30 s při 94 °C
 vazba: 30 s při 65 °C
 prodloužení: 30 s při 72 °C
 11 cyklů: denaturace: 30 s při 94 °C
 vazba: teplota se snižuje o 0,7 °C v každém cyklu
 20 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.
 prodloužení: 60 sekund při 72 °C
 25 23 cyklů: denaturace: 30 s při 94 °C
 vazba: 30 s při 56 °C
 prodloužení 60 s při 72 °C

Analyza amplifikovaných fragmentů na gelu

30

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, 7,5 M močoviny, 50 mM tris, 50 mM kyseliny borité, 1 mM EDTA, pH 8,3. 100 ml roztoku gelu bylo smíšeno s 500 mikrolitry 10% persíranu amonného a 100 mikrolitry TEMED těsně před 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 smíšena se stejným objemem 20 mikrolitrů 98% formamidu s 10 mM EDTA, 0,01 % bromfenolové modři a 0,01 xylenkyanolu. Výsledné směsi byly zahřáty na 3 minuty na 95°C a pak rychle zchlazeny na ledu. 2 mikrolitry každého ze vzorků byly nanесeny 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.

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 Msel-primerem-1 a PstI-primerem-3, dráhy 13 až 16 obsahují tyto DNA amplifikované Msel-primerem-1 a PstI-primerem-4, dráhy 17 až 20 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, určující velikost molekuly, avšak vizualizované fragmenty DNA odpovídají ± 200 nukleotidům na spodní straně obrázku a ± 500 nukleotidům na jeho horní straně.

Příklad 3Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů DNA různých čeledí Lactuca působením dvou restrikčních enzymů

5

V příkladu 2 je uveden princip 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 týchž restrikčních enzymů, PstI a MseI.

10

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:

15

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

20

25

30

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.

5 Amplifikace PstI-MseI-fragmentů

10 DNA, připravené svrchu uvedeným způsobem byly užity jako matrice pro reakce SRFA. Byly užity kombinace dvou primerů, přičemž byl použit jeden MseI-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:

15 MseI-primer: 5-GATGAGTCCTGAGTAAaca-3
PstI-primer-1: 5-GACTGCGTACATGCAGaa-3
PstI-primer-2: 5-GACTGCGTACATGCAGca-3

20 Amplifikace fragmentů PstI-MseI při použití svrchu 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. Ve 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 25 1 až 10, amplifikované primerem MseI v kombinaci s PstI-primerem-2. Označení velikosti molekul nukleotidů (na výkrese není viditelné) je uvedeno na pravé straně gelu. Rozdíly v jednotlivých pásech odrážejí rozdíly v příbuznosti zkoumaných rostlin.

30

Příklad 4

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

5

V příkladech 2 a 3 je uveden princip selektivní amplifikace restričních fragmentů SRFA při použití dvou restričních 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 restričních enzymů.

10

Izolace a modifikace DNA

15

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 restričních 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:

20

25

30

Restrikce 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:

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

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

10 AseI-adaptor: 5-bio-CTCGTAGACTGCGTACC-3
3 -CTGACGCATGGAT-5

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

15 Amplifikace restrikčních fragmentů

Amplifikace restrikčních fragmentů byla uskutečněna způsobem, popsaným v příkladu 2. 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
- 25 3. 5-TGAGTCCTGACCGAcaa-3
4. 5-TGAGTCCTGACCGAcac-3

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 EcoRI a AseI 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.

5

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

10

AseI-primery: 1. 5-GACTGCGTACCTAATAac-3
 2. 5-GACTGCGTACCTAATAag-3
 3. 5-GACTGCGTACCTAATacc-3
 4. 5-GACTGCGTACCTAATgaa-3

15

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

20

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

25

30

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, popsáným 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 páсů 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.

Příklad 5

Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů bakteriální DNA

V příkladech 2, 3 a 4 byl vysvětlen princip selektivní amplifikace restrikčních fragmentů SRFA při použití dvou restrikčních enzymů u rajčete, salátu (*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 kmény byly zvoleny k průkazu použitelnosti postupu u bakterií.

Izolace a modifikace DNA

Všechny vzorky DNA byly připraveny z kmenů *Xanthomonas campestris*, izolovaných z různých zdrojů, převážně z infikovaných rostlin. Tyto kmény byly označeny čísly 1 až 26 tak, jak jsou dále uvedeny, a je možno je získat z Laboratory 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
5	6.	campestris	campestris	568
	7.	campestris	alfalfae	497
	8.	campestris	coracanae	686
	9.	campestris	citri	8655
	10.	campestris	citri	9658
10	11.	campestris	citri	9181
	12.	campestris	citri	8657
	13.	campestris	citri	8654
	14.	campestris	citri	8650
15	15.	campestris	citri	682
	16.	campestris	citri	681
	17.	campestris	citri	9325
	18.	campestris	citri	9321
	19.	campestris	citri	9176
20	20.	campestris	citri	9671
	21.	campestris	citri	9665
	22.	campestris	citri	9182
	23.	campestris	citri	568
	24.	campestris	citri	9167
25	25.	campestris	citri	9175
	26.	campestris	citri	9160

30 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:

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

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

Amplifikace restrikčních fragmentů

10 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 Apal-primer 5-GACTGCGTACAGGCCc-3 s jedním selektivním nukleotidem, rovněž označeným malým písmenem. Apal-primer byl označen na 15 5'-zakočení pro detekci amplifikovaných fragmentů způsobem, popsaným v příkladu 2.

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

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

30

Příklad 6Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů DNA různých živočichů při použití dvou restrikčních enzymů

5

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 Sse8387I a Msel.

10

Izolace a modifikace DNA

15

DNA byla izolovaná 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) byly rozštěpeny restrikčními enzymy Sse8387I a Msel. Fragmenty DNA byly navázány na adaptory způsobem podle příkladu 2. Vzhledem k tomu, že při použití restrikčních enzymů Sse8387I a PstI vznikají kompatibilní 3'-prodloužená zakončení, bylo možno použít PstI-adaptor i Msel-adaptor, popsané v příkladu 2.

20

Amplifikace restrikčních fragmentů

25

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

30

Msel-primer:

5-GATGAGTCCTGAGTAAac-3

Sse8387I-primer-1:

5-GACTGCGTACATGCAGGaa-3 Sse8387I-primer-2:
5-GACTGCGTACATGCAGGag-3

5 Amplifikace fragmentů Sse8387I-Msel při použití párů
primerů, tak jak byly svrchu popsány byla prováděna způsobem podle
příkladu 2. Reakční produkty byly 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
10 DNA 1 až 15 po amplifikaci při použití Msel-primeru, párovaného s
Sse8387I-primerem-1, ve drahách 16 až 30 je uvedeno obdobné
typování při použití primeru Msel v kombinaci s
Sse8387I-primerem-2. Rozdíly mezi jednotlivými jedinci určitého
živočišného druhu odrážejí heterogenitu živočišné populace. Celkové
15 typování je charakteristické pro určitý živočišný druh.

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

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

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

c) vzájemně se naváží restrikční fragmenty, získané z
výchozí DNA na svých 5'- a 3'- zakončeních a 3'- a 5'-adaptory za
vzniku restrikčních fragmentů výchozí DNA s prodlouženými

zakončeními, přičemž tyto fragmenty obsahují na svém 5'- a 3'- zakončení prodlužující řetězce, jejichž nukleotidovými řetězci jsou řetězce 3'- a 5'- adaptorů včetně nukleotidů ze specifického restrikčního místa,

5

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 restrikčních fragmentů oligonukleotidovými segmenty za vzniku restrikčních fragmentů, prodloužených na obou koncích uvedeným konstantním řetězcem,

10

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

15

f) primery zahrnují řetězce, odpovídající týmž nukleotidovým řetězcům, jaké obsahují 5'- a 3'-zakončení prodloužených nebo popřípadě elongovaných restrikčních 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 restrikční endonukleázy v řetězci matrice,

20

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

25

30

h) identifikují nebo izolují výsledné restrikční fragmenty.

Ve specifickém provedení tohoto postupu odpovídá terminální nukleotid alespoň jednoho 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, účastníci se tvorby místa působení specifické endonukleázy ve směru své vlastní elongace v rozsahu odpovídajících restričních fragmentů
10 v průběhu amplifikačního stupně.

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
15 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.

20 Svrchu popsáný postup je vhodný pro použití k identifikaci polymorfismu 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 těmž účelům je možno využít i oligonukleotidy podle vynálezu.
25 Postupuje se tak, že se zkoumaná DNA podrobí 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
30 polymorfismu podle rozdílů, pozorovaných mezi velikostmi restričních fragmentů, které byly získány z různých DNA.

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 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.

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

i) nukleotidový řetězec (konstantní řetězec) alespoň 10 bazí, avšak ne více než 30 bazí, 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

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

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

- specifickou restriční endonukleázu,

- 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 řetězce 5'- a 3'- adaptorů, komplementární k řetězcům, použitým 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 výchozí DNA,

15

20

- 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.

25

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.

30

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,

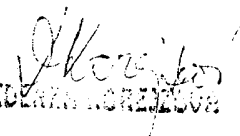
vznikající v tomto vazném řetězci rozštěpením každou z uvedených specifických endonukleáz.

5

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

10

Zastupuje :

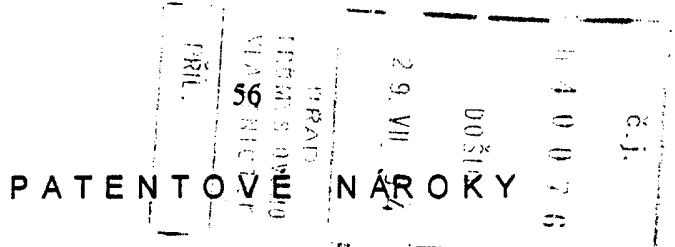

Dr. JUDr. J. KOCOUŘEK

15

20

25

30



1. Způsob řízené amplifikace alespoň části výchozí DNA, obsahující větší počet restrikčních míst pro alespoň jednu stanovenou specifickou restrikční endonukleázu, přičemž alespoň část řetězce nukleové kyseliny je neznámá, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se

5

a) výchozí DNA rozštěpí uvedenou specifickou restrikční endonukleázou nebo endonukleázami za vzniku odpovídající řady restrikčních fragmentů,

10

b) restrikční fragmenty, získané z výchozí DNA se naváží na alespoň jeden synthetický oligonukleotid s dvojitým řetězcem (označovaný jako adaptor) s jedním koncem, kompatibilním pro vazbu na jeden nebo oba konce restrikčních fragmentů za vzniku prodloužených restrikčních fragmentů výchozí DNA,

15

c) prodloužené restrikční fragmenty se za hybridizačních podmínek uvedou do styku s alespoň jedním oligonukleotidovým primerem,

20

d) uvedené primery zahrnují řetězce se stenou sekvencí nukleotidů jako terminální části řetězce na koncích prodloužených restrikčních fragmentů včetně nukleotidů, účastnících se tvorby místa působení stanovené specifické restrikční endonukleázy a včetně alespoň části nukleotidů v navázaném adaptoru, přičemž alespoň jeden z uvedených primerů obsahuje na svém 3'-konci zvolený řetězec s obsahem určeného počtu (jeden nebo několik) nukleotidů, uložených bezprostředně za posledním nukleotidem, účastnícím se tvorby místa pro specifickou restrikční endonukleázu,

25

e) prodloužené restrikční fragmenty hybridizované na uvedené primery se amplifikují pomocí PCR nebo podobné techniky v přítomnosti požadovaných nukleotidů a DNA-polymerázy nebo se uskuteční elongace hybridizovaných primerů podél prodloužených restrikčních fragmentů výchozí DNA s níž uvedené primery z počátku hybridizovaly v celé své délce a

30

f) amplifikované nebo elongované fragmenty DNA, získané ve stupni e) se identifikují nebo izolují.

2. Oligonukleotid, obsahující na jedné straně sekvenci 10 až 20 nukleotidů, odpovídajících opakujícímu se řetězci, existujícímu ve výchozí DNA nebo uloženému do výchozí DNA, získatelnou ve stupni a) a b) nároku 1 a na druhé straně na svém 3'-konci zvolený počet
5 přídavných nukleotidů (jeden nebo několik), nevyskytující se v opakovaném řetězci.

3. Použití způsobu podle nároku 1 nebo oligonukleotidu podle nároku 2 jako selektivního primeru pro elongaci nebo amplifikaci
10 výchozí DNA.

4. Použití způsobu podle nároku 1 nebo oligonukleotidu podle nároku 2 pro identifikaci polymorfismu DNA, pocházející z téhož druhu, například DNA genomu mikroorganismu, rostliny nebo
15 živočicha včetně člověka nebo fragmentu této DNA, a to mezi sebou nebo ve srovnání s určeným standardem DNA, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se studovaná DNA zpracovává způsobem podle nároku 1 nebo se uvede do styku s oligonukleotidem podle nároku 2 za
20 podmínek, při nichž může dojít k amplifikaci nebo elongaci a srovnávají se restriční mapy, získané z každé DNA a popřípadě ze standardní DNA a popřípadě se lokalizuje polymorfismus DNA na základě rozdílů mezi prodlouženými restričními fragmenty různých DNA.

25

30

5. Sestava pro fragmentaci určené DNA při použití jedné nebo většího počtu specifických restričních endonukleáz na fragmenty a analýzu těchto fragmentů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje

- specifickou restriční endonukleázu nebo endonukleázy,

5 - alespoň jeden syntetický oligonukleotid s dvojitým řetězcem (uváděný jako adaptor) s jedním koncem, kompatibilním pro vazbu na jeden nebo oba konce restričního fragmentu za vzniku prodloužených restričních fragmentů výchozí DNA,

10 - oligonukleotid podle nároku 2, obsahující na jedné straně sekvenci 10 až 20 nukleotidů, přičemž uvedené primery zahrnují řetězce se

stejnou sekvencí nukleotidů jako terminální části řetězců na koncích prodloužených restričních fragmentů včetně nukleotidů, účastnících se tvorby míst pro určenou specifickou restriční endonukleázu a alespoň část nukleotidů, přítomných v navázaných adaptorech,

15 alespoň jeden z uvedených primerů má na svém 3'-konci vybraný řetězec nukleotidů s určeným počtem (jeden nebo několik) nukleotidů, uložených bezprostředně za posledním nukleotidem, tvořícím místo působení specifické endonukleázy, na svém 3'-zakončení, zvolený počet přídatných nukleotidů (jeden nebo
20 několik).

6. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené 3'- a 5'- adaptory a popřípadě konstantní řetězce mají délku v rozmezí 10 až 30 nukleotidů, například 12 až 20 nukleotidů.

25

7. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že výchozí DNA, která má být fragmentována je DNA genomu z lidského nebo živočišného biologického vzorku, zejména ze tkáně nebo z krve, nebo z části rostliny, zejména z rostlinné tkáně nebo z mikroorganismu.

30

8. Použití způsobu podle nároku 4, popřípadě v kombinaci se způsobem podle nároku 6 nebo 7 pro identifikaci polymorfismu DNA, spojeného s geneticky podmíněným onemocněním u člověka, polymorfismu DNA, spojeného se stanovenými vlastnostmi u živočichů nebo s agronomickými vlastnostmi u rostlin a pro identifikaci značení, vyvinutého na bázi tohoto polymorfismu DNA.

9. Diagnostická sestava podle nároku 5 pro genetickou analýzu, například pro kriminalistické účely u lidí.

10. Sestava podle nároku 5 pro detekci dědičnosti určených vlastností u živočichů nebo agronomických vlastností u rostlin.

11. Použití způsobu podle nároku 1 nebo oligonukleotidu podle nároku 2 pro detekci podobnosti mezi varietami rostlin a živočichů, mezi jejich čeleděmi, kultivary, mezi mikroorganismy nebo pro vyhodnocení genetické vzdálenosti a pro charakterizaci variet, čeledí, kultivarů rostlin nebo živočichů a mikroorganismů.

20

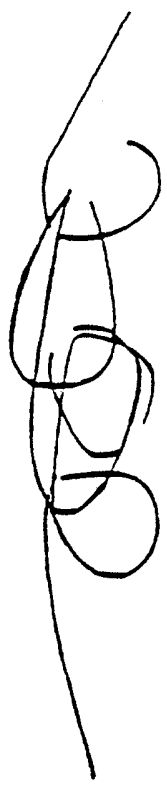
Zastupuje :

25

J. Konjden
Dr. BOJENKA KONJDENOVÁ

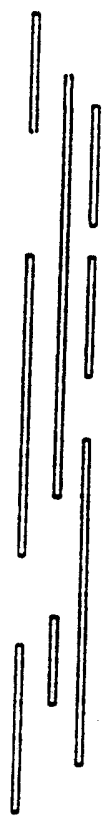
30

Prodlužování restrikčních fragmentů genomu

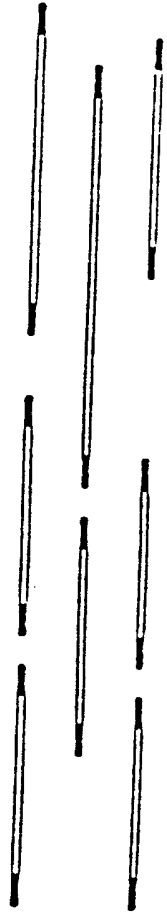


DNA genomu

štěpení
restrikčním enzymem



vazba
adaptoru



OBR. 1

INRA
INSTITUT
GENETIKY
PRAHA

76 III 62

0010

841154

8.2

Handwritten signature
Křížová

Vazba adaptoru

zarovnané konce

posunutý konec

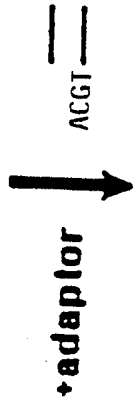
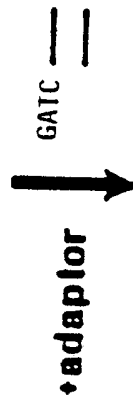
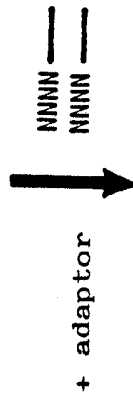
5'-prodloužení

3'-prodloužení

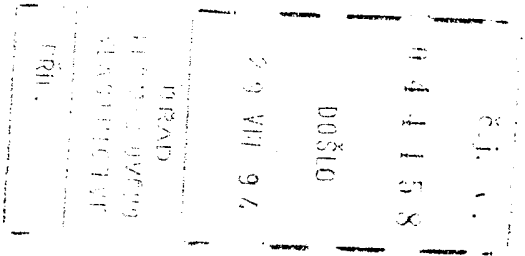
ex. PvuII

ex. Bgl II

ex. Pst I



OBR. 2



Handwritten signature

PCR-amplifikace prodloužených restričních fragmentů

adaptor restriční fragment **adaptor**
NNNNNNNNNNNNNGATC _____ GATCNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNCTAG _____ CTAGNNNNNNNNNNNNNNNN



primer
NNNNNNNNNNNNNGATC _____
NNNNNNNNNNNNNCTAG _____ CTAGNNNNNNNNNNNNNNNN

NNNNNNNNNNNNNGATC _____ GATCNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNCTAG _____ CTAGNNNNNNNNNNNNNNNN



NNNNNNNNNNNNNGATC _____ GATCNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNCTAG _____ CTAGNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNGATC _____ GATCNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNCTAG _____ CTAGNNNNNNNNNNNNNNNN

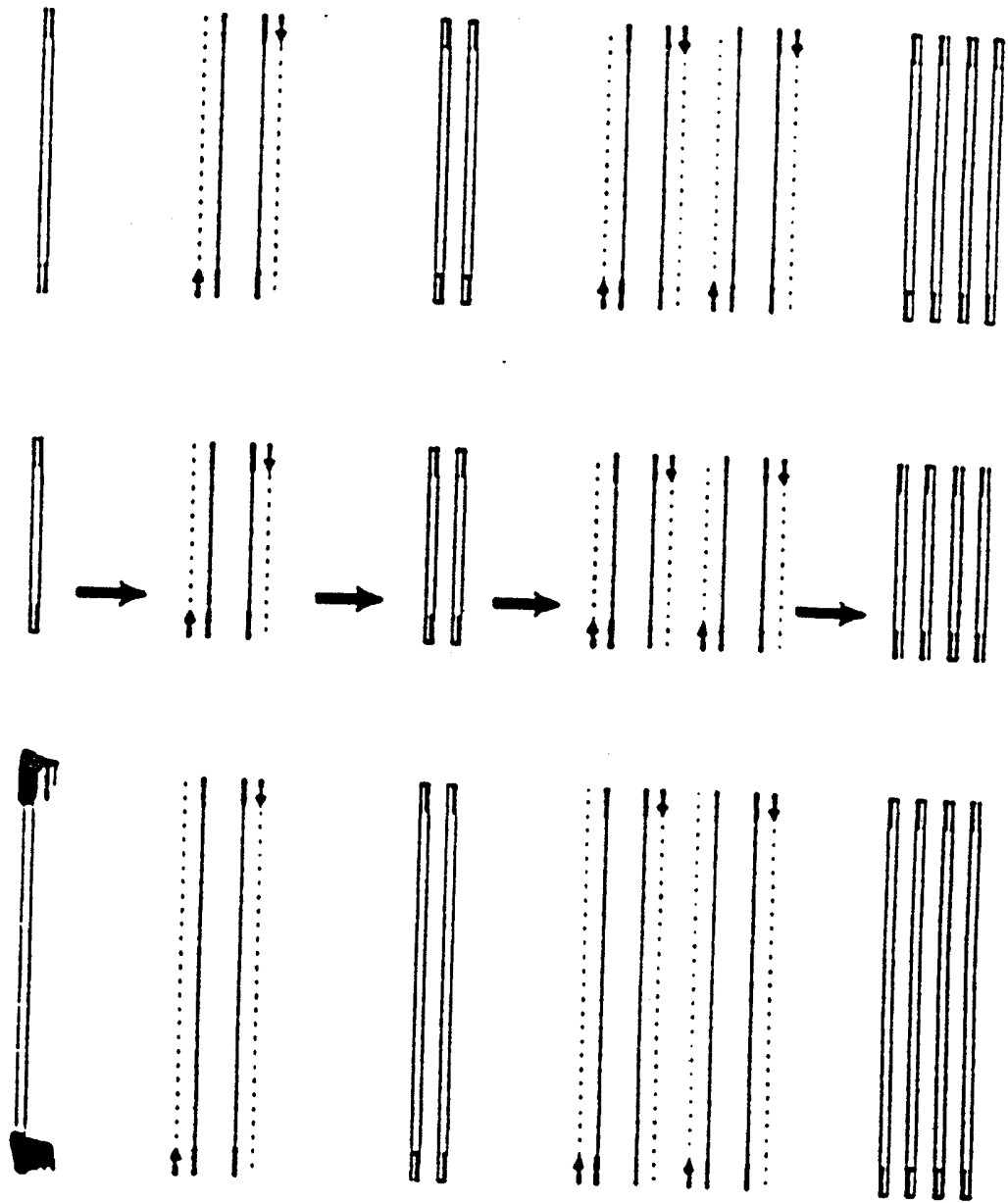


OBR. 3

041158
29 VII 97
DOŠLO
VRAID
LABORATOR
Příl.

Křižík

Vícenásobná amplifikace restrikčních fragmentů

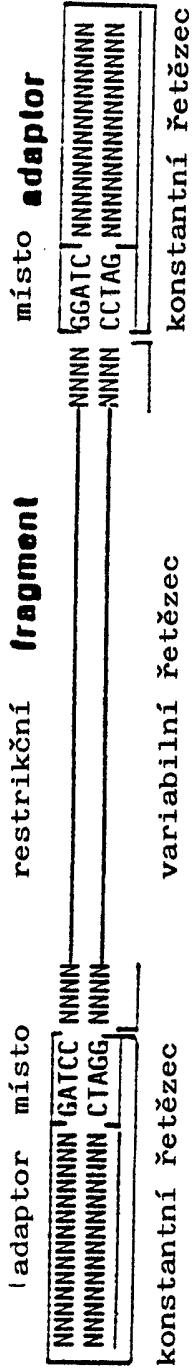


OBR. 4

1811
DOŠLO
29 VII 92
PRAHA
KATEDRA
BIOLOGIE
JANÁČKOVY
1811

Škorpisová

Selektivní PCR-primery



selektivní primery:

konstantní řetězec selektivní baze
 NNNNNNNNNNNNGATCC XYZ...

selekce matrice:

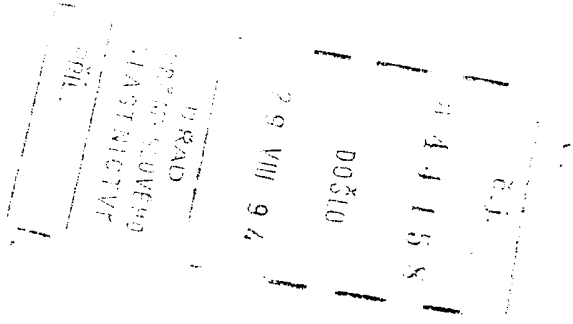
správná matrice

NNNNNNNNNNNNNGATCC GAG
 NNNNNNNNNNNNNCTAGG CTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

chybná matrice .

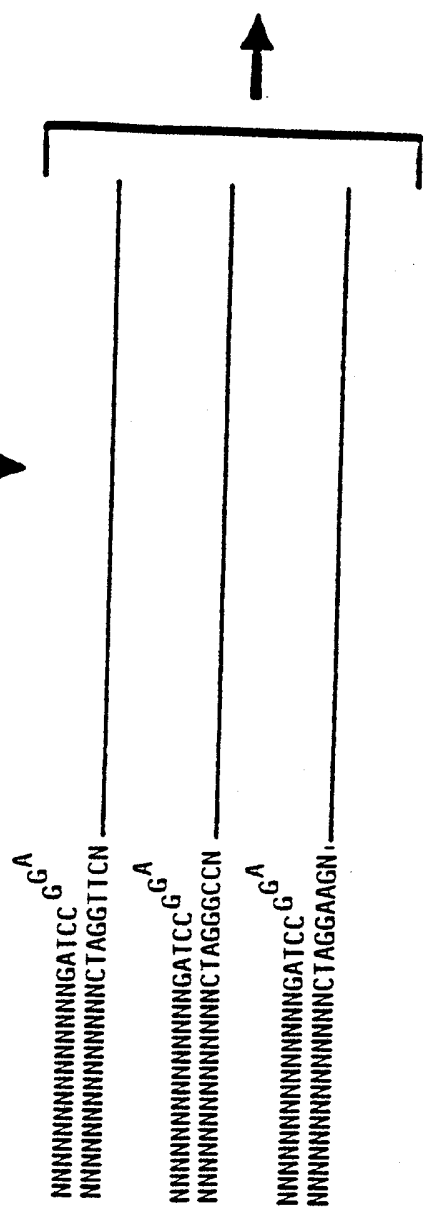
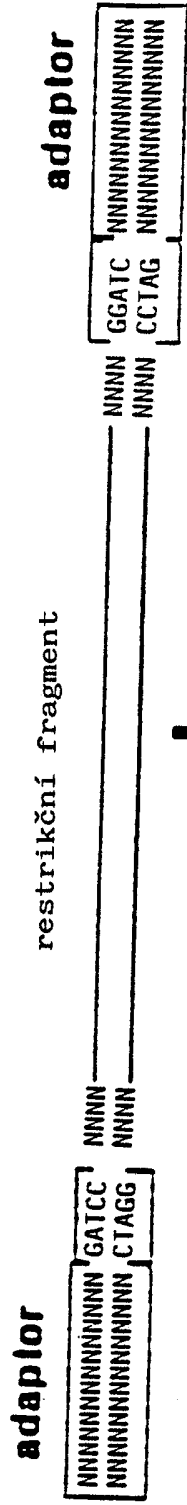
G
A

NNNNNNNNNNNNNGATCC G
 NNNNNNNNNNNNNCTAGG AAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 OBR. 5

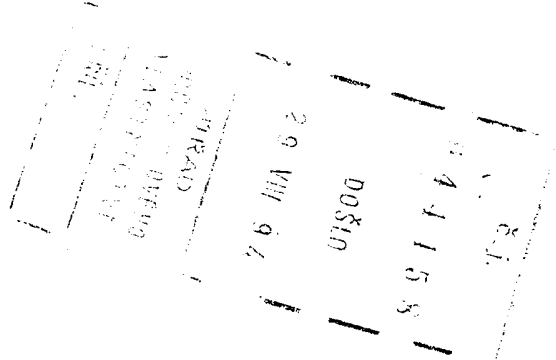


Handwritten signature

NNNNNNNNNNNGATC Selektivní PCR-amplifikace restrikčních fragmentů

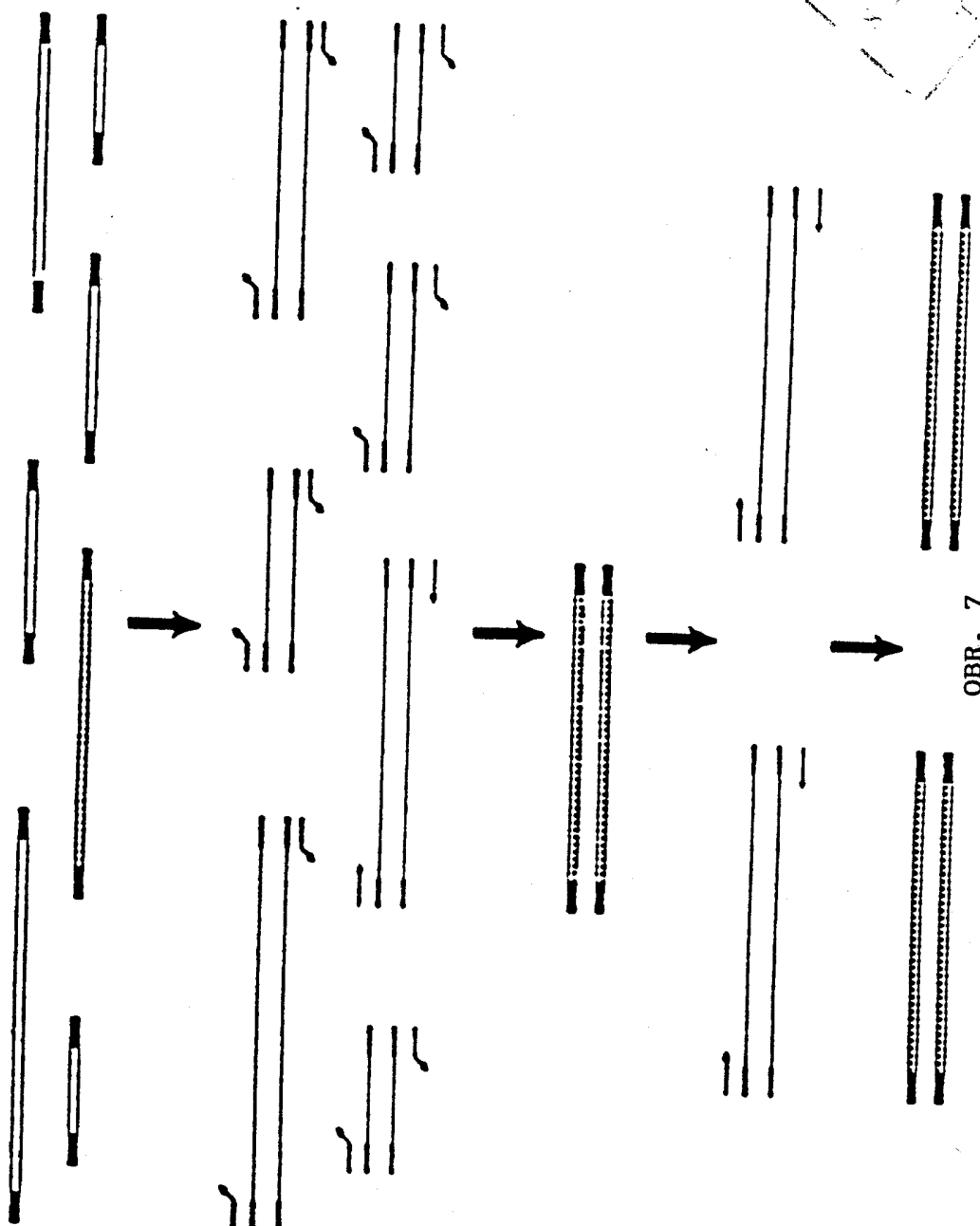


OBR. 6



Horizone

Selektivní amplifikace restrikčních fragmentů

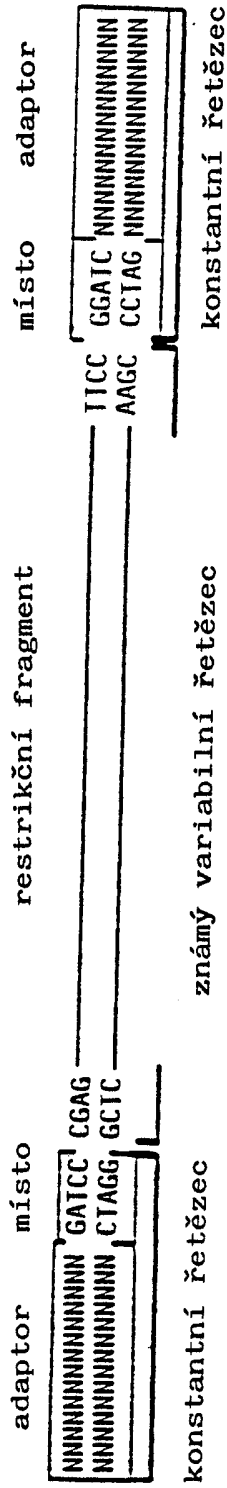


OBR. 7

188
MADONIA
CIVIL
29 VII 94
00310
15115
12

Skoupena

Selektivní PCR-primery, specifické pro fragmenty



selektivní primer 1

konstantní řetězec

selektivní báze

selektivní báze

konstantní řetězec

selektivní primer 2

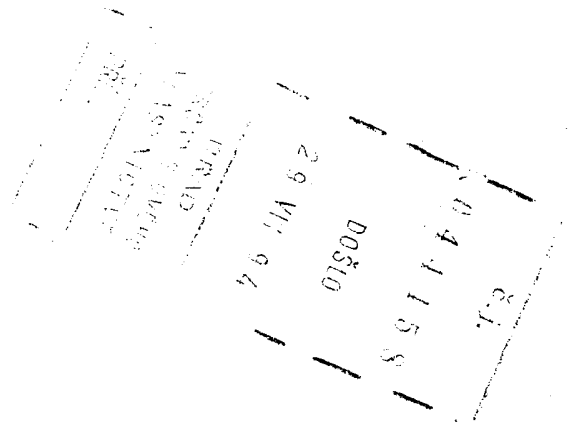


selekce matrice

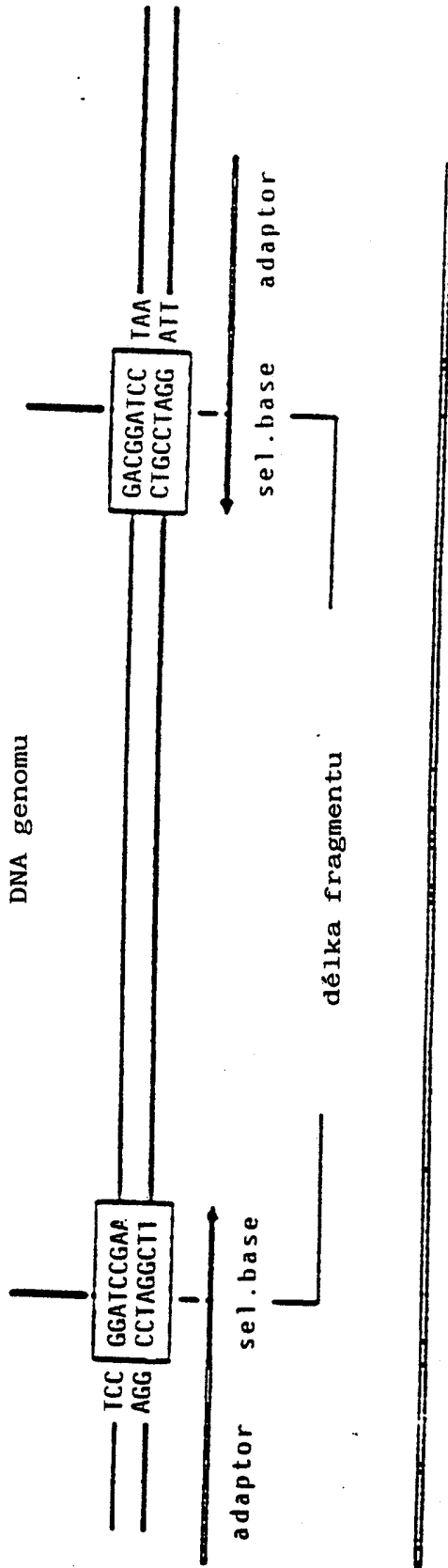
NNNNNNNNNNNNNGATCC CGAG _____
 NNNNNNNNNNNNNCTAGG GCTC _____

_____ TTGC GGATC NNNNNNNNNNNNNN
 _____ AAGC CCTAG NNNNNNNNNNNNNN

Škorpilová



Princip ARF



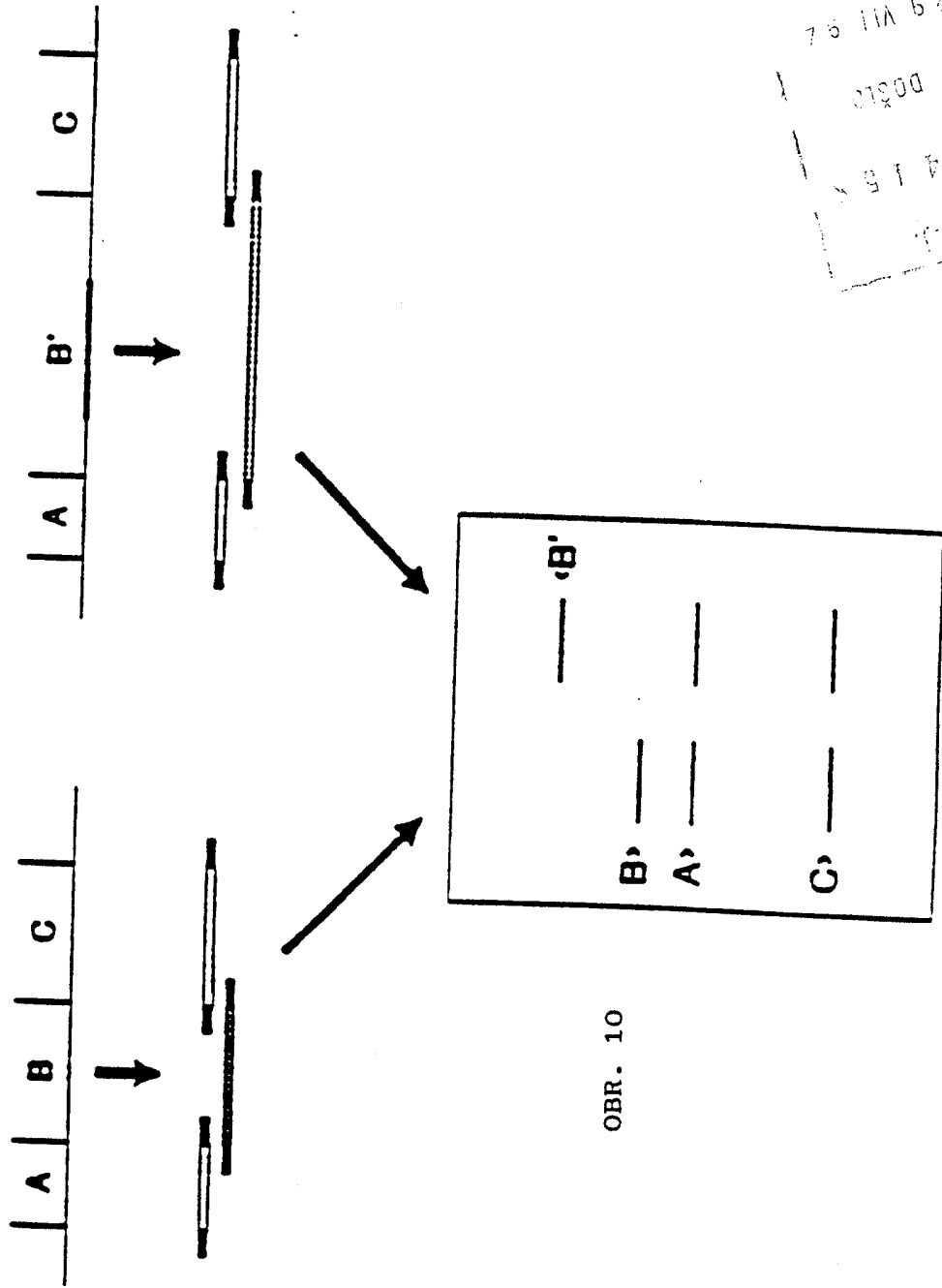
amplifikovaný restriční fragment

OBR. 9

76 14 52
07000
S I F P II
12

Handwritten signature

Polymorfismus délky amplifikovaného fragmentu

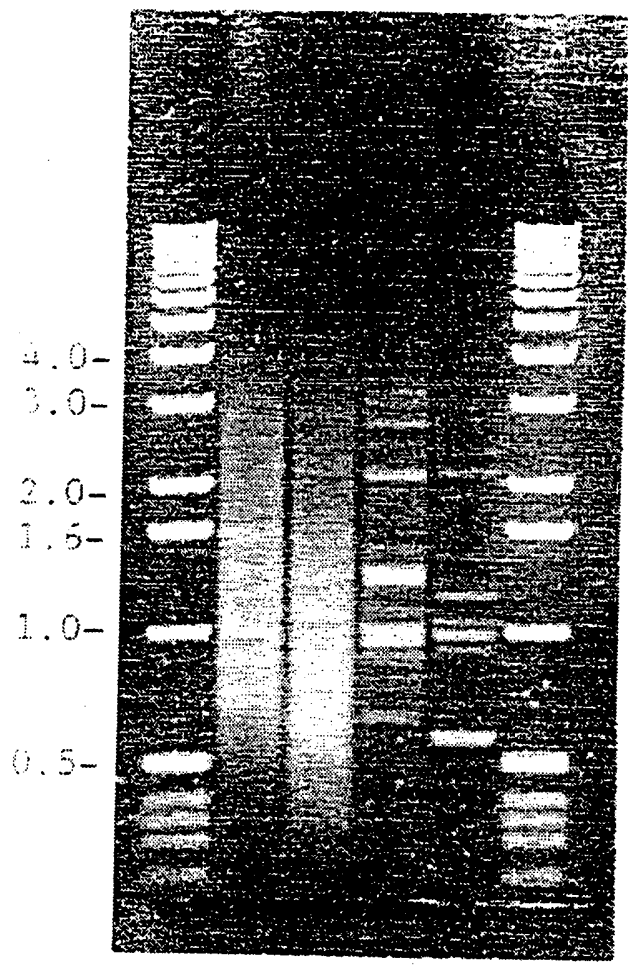


OBR. 10

URAD
PRONASAVNO
VLASTNOSTI
29. VII. 97
00310
04415
8.1

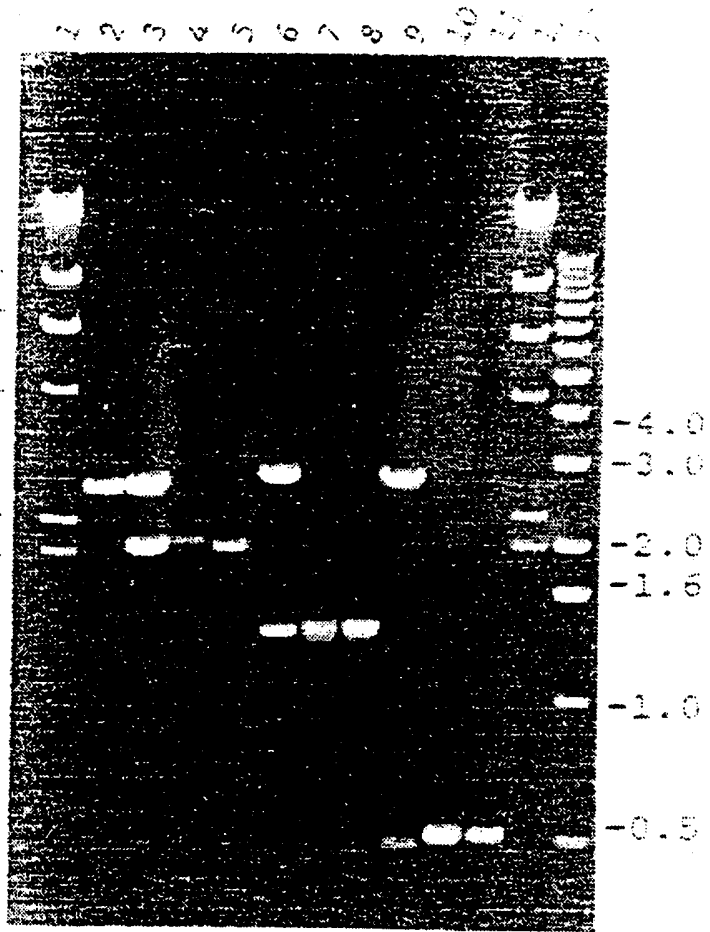
Handwritten signature

PRIN.
WASHINGTON
UNIVERSITY
GRAD
ENGINEERING
29. VII. 97
BOSS
04418
R.J.



OBR. 11

Handwritten signature



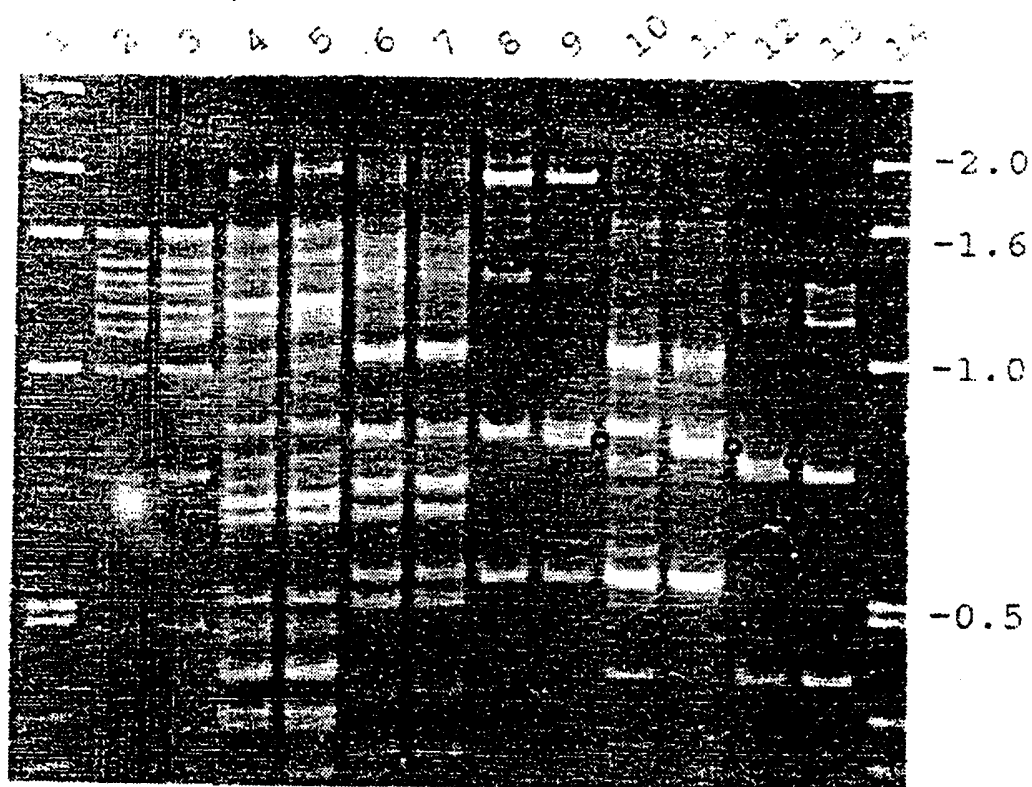
FRIL

29 VI 97
 07500
 044158
 112

OBR. 12

Majid

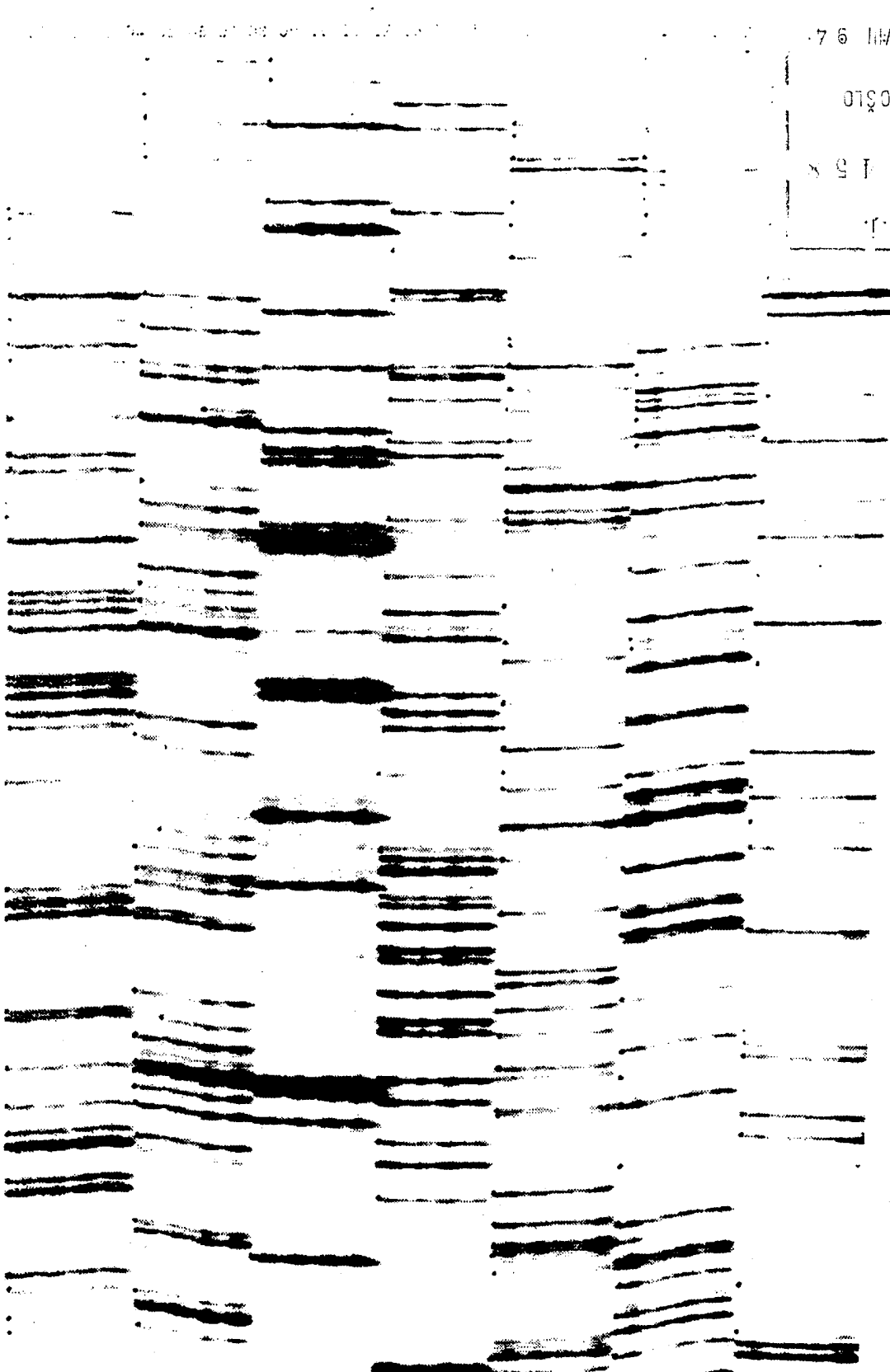
044158
 00510
 29 VII 94
 BRAD
 FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION
 FBI



OBR. 13

Handwritten signature

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



PRIL
VLAŠTICIA
FRONTOVENE
URAD
29. VII. 97
DOŠLO
044158
r.j.

Handwritten signature

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

01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



PRIL
VĚSTNÍK
PRŮMYŠLOVÉHO
ÚŘADU
29. VIII. 94
DOŠLO
044158
R.J.

052-

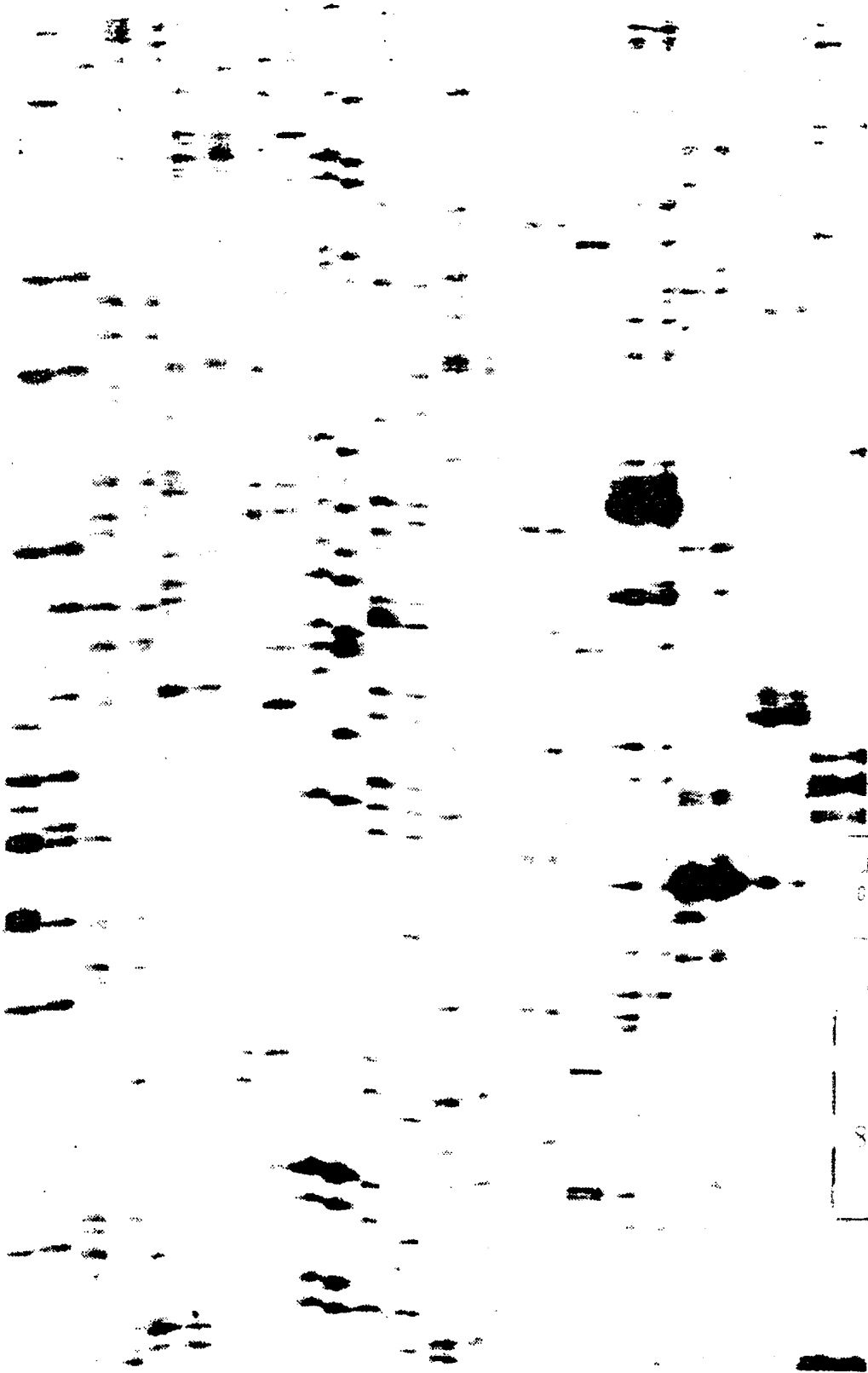
002-

-150

Handwritten signature

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

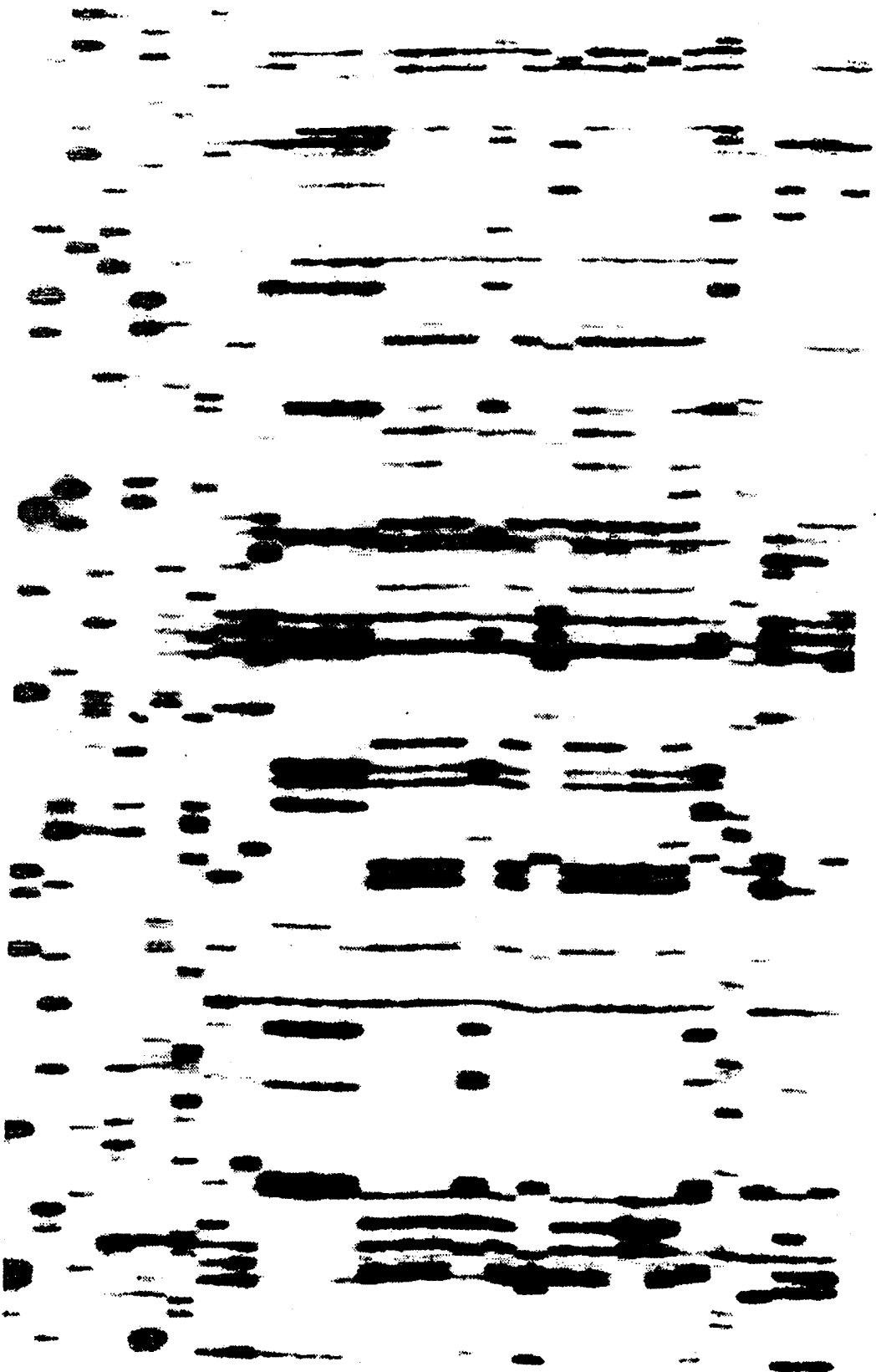


PRIL
VLASTNICTVI
PRONYSLOVENS
URAD
29. VII 97
00510
044158
291-

Handwritten signature

SRFA bakteriální DNA při použití ApaI a TaqI jako
restrikčních enzymů

01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

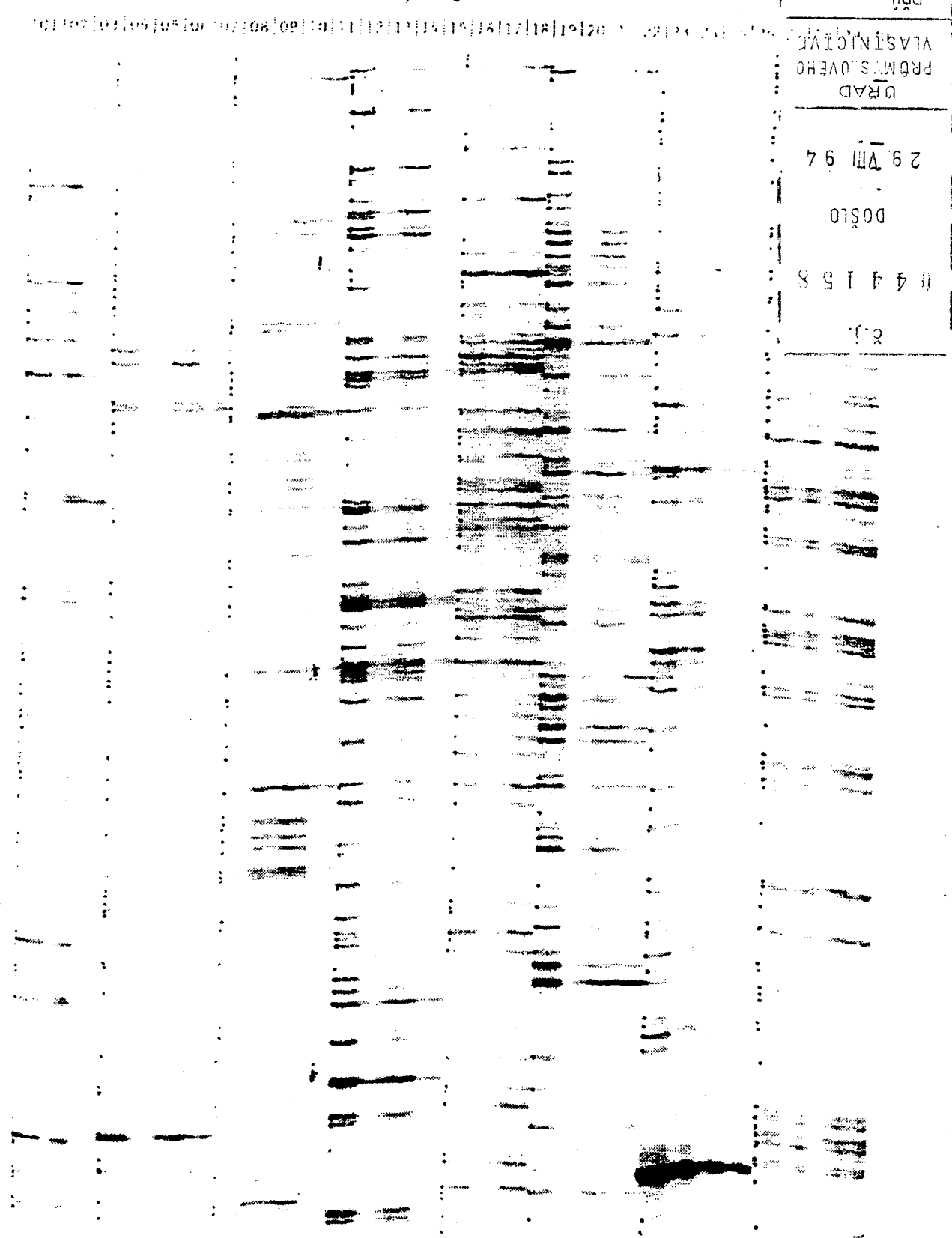


PRIL
002-
KASNICHTV
FRÖMYSLOVHO
URAD
29. VII 94
DOŠLO
044158
R.J.

051-

Handwritten signature

SRFA DNA živočichů při použití SSE83971 a MseI jako
restrikčních enzymů



PRIL.
VLASINICIJ
PRŮMYSLOVÉHO
ÚRAD
29. VIII 97
DOŠLO
044158
R.J.

J. Krýžan