

DNA SONDY

SYNTÉZA NA MÍSTĚ, STISKEM JEDINÉHO TLAČÍTKA

Tento materiál poskytuje krátký úvod k sondám DNA, zejména pak k sondám TaqMan a FISH a jak zařízení pro syntézu DNA společnosti Kilobaser umožňuje jakékoli laboratoři vyrábět vlastní sondy, přičemž šetří provozní náklady a čas.

Autor: Alexander Murer CEO společnosti Kilobaser GmbH

01 ÚVOD

01.1 DNA sondy

DNA sondy jsou relativně krátké řetězce DNA (od 9 do 40 bází), které jsou modifikovány molekulami generujícími signál, jako jsou fluorescenční barviva nebo radioizotopy.

S celosvětovým objemem trhu přibližně 360 milionů EUR / 435 milionů USD (1) představují druhou největší skupinu mezi syntetizovanými oligonukleotidy vedle klasických DNA primerů. Tyto sondy DNA se vyrábějí plně chemicky, molekula po molekule, v zařízeních pro syntézu DNA („syntetizátory DNA“)

DNA sondy se používají k označení komplementárních řetězců DNA („cílová sekvence“) technikou označovanou jako hybridizace. Díky modifikaci například s fluorescenčními barvivy lze potom velmi specificky detekovat, a dokonce kvantifikovat komplementární hybridizované řetězce DNA. DNA sondy se používají ve výzkumu molekulární biologie a lékařské diagnostice, v metodách jako qPCR, Southern blot a Fluorescence-in-situ-hybridizace („FISH“).

Během pandemie COVID-19 způsobené patogenem SARS-CoV-2 dosáhly sondy DNA zvláštní důležitosti, protože byly použity pro vysoce citlivou detekci infikovaných osob pomocí testů qPCR (2).

01.2 Sondy FISH

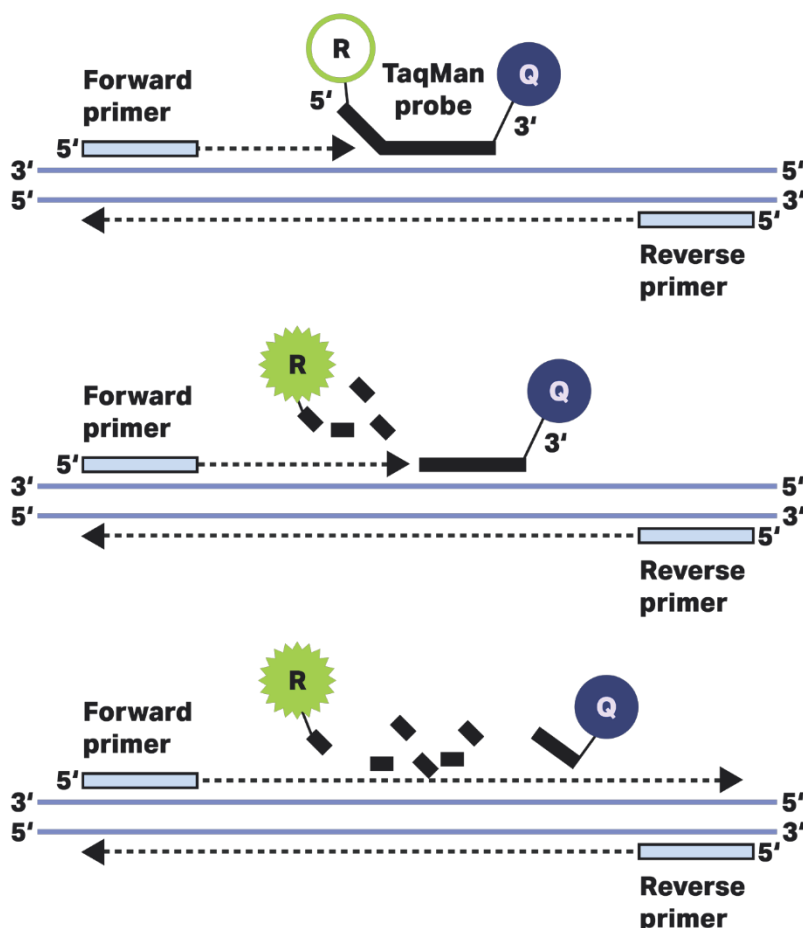
FISH je široce používanou technikou pro detekci a lokalizaci DNA nebo RNA v buňkách. Tato metoda tedy umožňuje analýzu jader jednotlivých buněk a metafázových chromozomů, stejně jako distribuce mRNA v celých embryích, řezech nebo tkáních. Detekce DNA a RNA je možná díky sekvenční specifitě sond FISH. Hybridizují s cílovou DNA nebo RNA a poté lze detekovat pomocí technik fluorescenční mikroskopie. Tyto sondy FISH se obvykle skládají z DNA oligonukleotidu modifikovaného fluoroforem např. 6-karboxyfluorescein (6-FAM) (3).

01.3

Sondy TaqMan & qPCR

Sondy TaqMan jsou další formou sond DNA s fluorescenčním barvivem na 5' konci, které nesou navíc druhou molekulu, která funguje jako „zhášec“ na 3' konci. Zhášec tak absorbuje emitované světlo z fluorescenčního barviva, dokud jsou obě molekuly spojeny vláknem DNA sondy v malé vzdálenosti od sebe. Pokud je tedy DNA sonda TaqMan neporušená, nelze ji detekovat pomocí fluorescence emitované

barvivem v qPCR cycleru. Sondy TaqMan jsou navrženy tak, aby hybridizovaly v oblasti DNA amplifikované specifickou sadou primerů. Vzhledem k tomu, že Taq polymeráza prodlužuje primer a syntetizuje výsledné vlákno, 5'-3' exonukleázová aktivita Taq polymerázy degraduje hybridizovanou sondu – a tím uvolní fluorescenční barvivo od zhášče, a to pak může po excitaci správnou vlnovou délkou emitovat světlo, jak je znázorněno na obrázku 1, které lze následně snadno detekovat a kvantifikovat. Tento systém se používá ke kvantifikaci specifické sekvence DNA, a tím zvyšuje specifitu metody qPCR (4).









Polymerization and Strand Displacement

Probe Cleavage (release of reporter dye)

Fluorescence occurs when reporter dye and quencher dye are no longer in close proximity

Completion of Polymerization

Obr 1: Princip qPCR s TaqMan sondou

| Fluorescenční barvivo | | Excitace | Emise | Doporučený zhášec | BHQ molekula Zhášecí rozsah |
|---|-----|----------|-------|-------------------|--|
|  | FAM | 495 | 520 | BHQ-1 |  BHQ-1 480-580 nm |
|  | TET | 521 | 536 | BHQ-1 | |
|  | VIC | 538 | 554 | | BHQ-2 559-670 nm |
|  | NED | 546 | 575 | | |
|  | ROX | 586 | 610 | BHQ-2 | |

Obr 1. Fluorofory s uvedenou hodnotou excitace a emise a odpovídající zhášec

02

DODÁVKY SOND

02.1

Cena

Výzkum dnes běžně využívá vlastní, navržené DNA sondy, což vede k vysokým provozním nákladům. Cena sondy s 6-FAM fluoroforem, BHQ-1 zhášecem, dlouhá pouhých 20 bází DNA obvykle začíná okolo 150 € / 180 \$ u všech známých velkých výrobců, jako jsou Eurofins, IDT DNA nebo Thermo Fisher. Přidání specifických modifikací a vyšší počet DNA bází může dále náklady významně zvýšit. Náklady jsou tak velmi vysoké, zejména ve srovnání s nízkými cenami nemodifikovaných DNA oligonukleotidů – takovéto řetězce DNA s 20 bázemi stojí jen asi 4 € / 4 \$.

02.2

Dodací lhůty

Úpravy zvyšují dodací lhůty DNA na několik dní. Obvykle jsou čekací doby na výrobu TaqMan sondy 4 až 8 pracovních dnů, přeprava pak může trvat 1–2 dny (USA, části EU) což může vést ke zpožděním, zejména u experimentů, které vyžadují více různých sond.

02.3

Závislost

Až na několik výjimek většina laboratoří na světě je závislá na společnostech vyrábějících sondy na zakázku. Vědci si běžně objednávají DNA primery i sondy DNA online

Konvenční syntetizátory DNA dostupné na trhu mohou jen těžko konkurovat společností syntetizujícím sondy na zakázku ve velkém, a to díky několika níže uvedeným faktorům:

- **Vysoké pořizovací náklady**
(od přibližně 35 000 EUR / 40 000 \$ za zařízení)
- **Rozsáhlá infrastruktura**
(ventilace, odsávání výfukových plynů)
- **Vysoké provozní náklady**
kvůli vysoké spotřebě drahých reagentů, zejména pro modifikovanou DNA
- **Složitě provozní požadavky**
speciálně vyškolený personál

Kvůli těmto faktorům jsou laboratoře, které jsou v současné době vybaveny vlastním syntetizátorem DNA, spíše výjimečným jevem.

02.2

Rizika spojená s duševním vlastnictvím

To málo syntetizátorů DNA rutině používaných koncovými zákazníky je většinou provozováno interními odděleními v korporacích. Jedním z

příkladů je skupina BASF, jejíž výzkumná oddělení nesmí objednávat DNA sekvence od externích společností pro zakázkovou syntézu, aby tak chránila cenné duševní vlastnictví. Riziko ztráty a kopírování dat potenciálně existuje jak během přenosu dat přes internet, tak i u dodavatele, a dokonce i v rámci přepravních služeb.

03

ALTERNATIVÍ ZDROJ DNA SOND: KILOBASER

03.1

Syntetická platforma u Kilobaseru

Syntetická platforma se skládá z přístroje pro syntézu - Kilobaser a dvou spotřebních doplňků – z kazety s chemií pro syntézu DNA a z fluidních čipů. Pro syntézu musí být do přístroje vložena jak kazeta s DNA chemií, která obsahuje všechna potřebná reakční činidla (zejména 4 základní stavební bloky pro adenin, guain, cytosin, thymin ve formě fosforamiditů) pro syntézu o celkové délce 200 bází. Přístroj

používá plynný argon k přenosu činidla potřebného pro každý krok syntézy z kazety do fluidního čipu.

Fluidní čip má dvě hlavní funkce: 1. Integrované miniaturní ventily řídí tok reagentů v průběhu jednotlivých syntetických kroků; 2. V komoře pro mikrosyntézu (klasicky označovaná jako „kolona“) probíhá syntéza DNA oligonukleotidů v solid-state fázi. K syntéze velikosti DNA oligo s 20 bázemi potřebuje Kilobaser méně než 1,5 hodiny a výtěžek se pohybuje kolem 300 pikomolů.

DNA sonda

| | |
|-------------------|--|
| Syntetický čas | 2,5 minuty na bázi + jednorázově 25 min konečné zpracování |
| Konečný výtěžek | 300 pikomolů (0,3 nanomol) |
| Relativní výtěžek | 99,5 % |
| Obsah v kazetě | 100 bází |

03.2

Uvedení produktu na trh

Od února 2021 začne společnost Kilobaser prodávat doplňkový produkt pro svůj syntetizátor DNA **Kilobaser**: kazetu s 6-FAM DNA a Quencher Fluidic Chips.

Tento spotřební materiál tak umožňuje v každé laboratoři vybavené naším přístrojem jednoduchou a efektivní možnost vyrábět vlastní DNA sondy, jako např. TaqMan a FISH.

V prvním kroku budou v nabídce reagenční kazety s označení 6-FAM a fluidní čipy s označení BHQ-1.

Kazety pro přípravu sond obsahují standardní reagenzie pro 100 bází DNA a 6-FAM, který je nakonec napojen na 3'-konec DNA. Čipy BHQ-1 obsahují syntetickou kolonu s již připojeným zhášedčem BHQ-1, který je navázán na 5 'konec DNA.

Spotřební materiál lze podle potřeby kombinovat, což umožňuje různé možnosti:

- Kazety 6-FAM a DNA Fluidic Chips lze použít k výrobě jedné nebo více sond DNA označených na 5 'konci fluorescenčním barvivem 6-FAM s celkem až 100 bázemi, také známé jako sondy FISH (fluorescence in situ hybridization).

- Pomocí fluidních čipů BHQ-1 a standardní kazety pro DNA sondy lze připravit více DNA primerů označených na 3 'konci BHQ-1 s celkem až 200 bázemi.

- Kombinací kazety sondy 6-FAM a fluidních čipů BHQ-1 pro syntézu lze vyrobit jednu nebo více sond TaqMan DNA s celkem až 100 bázemi, známými také jako sondy TaqMan.

03.3

Skladovatelnost

Kazeta 6-FAM: Životnost kazety 6-FAM po vložení do přístroje je omezená. Po první syntéze lze kazetu používat pro syntézu dalších 7 dní a poté ji musíte vyměnit.

Krátká životnost je důsledkem chemické nestability 6-FAM v roztoku. Neotevřené kazety mají trvanlivost nejméně jeden rok, protože 6-FAM je v nich skladován v lyofilizované podobě. Zásobníky reagenzií doporučujeme skladovat při 4 ° C.

Čip BHQ-1: Čipy mají trvanlivost nejméně jeden rok. Čip je možné použít pro syntézu oligonukleotidů pouze jednorázově neboť v průběhu procesu dojde ke kontaminaci pevné fáze v integrované kolonce.

Fluidní čipy by měly být skladovány ve tmě při pokojové teplotě a na suchém místě.

03.4

Kvalita a délka sekvence

Procentní výtěžek Kilobaseru na přidanou bázi DNA („Step-wise-yield“) je asi 99,5 % a dosahuje tak srovnatelných výsledků s velkými syntetickými systémy. Kvalita syntetizovaných sekvencí je plně srovnatelná s kvalitou komerčně dodávaných „standardních odsolených“ sond. Pro aplikace, kde jsou požadovány sondy v kvalitě „standardní odsolené“ sondy, lze použít přímo sondy syntetizované pomocí Kilobaseru.

Sondy bez dalšího čištění jsou bezprostředně po syntéze kontaminovány pouze minimálním

množstvím nenávaného fluoroforu. Pro techniku FISH to není relevantní, protože nenávané molekuly včetně volného fluoroforu jsou odstráney v promývacích krocích.

Sondy TaqMan lze obvykle objednat od výrobců primerů výhradně purifikované pomocí HPLC, protože vyšší hladiny navaované fluoroforu mohou v qPCR analýze vést k interferenci šumu pozadí, neboť tyto volné molekuly nejsou během analýzy zhášeny zhášečem navavaným na druhé straně sekvence.

Většina aplikací ve skutečnosti další přečištění nevyžaduje (5), protože mírný šum pozadí nenaruší analýzu a lze jej eliminovat pomocí softwaru qPCR. Přesto Kilobaser nabízí kolony pro manuální přečištění sond TaqMan.

Výtěžek syntézy DNA sondy s definovanou délkou může být zhruba vypočteno takto:

0,995 (% postupný výtěžek) jako základ s exponenciálním koeficientem rovným počtu bází = procento výtěžku produktu plné délky.

Pro sondu o délce 20 bází DNA platí rovnice:

$$0,995^{20} = 0,905 = 90,5 \%$$

50 bází DNA:

$$0,995^{50} = 0,778 = 77,8 \%$$

100 bází DNA:

$$0,995^{100} = 60,5 \%$$

Kilobaser doporučuje syntetizovat primery o maximální délce 60 DNA bází. I když pro většinu aplikací to není kritické, některé speciální aplikace mohou vyžadovat po syntéze purifikaci pomocí např. PAGE nebo HPLC tak, aby byly odstráney zkrácené řetězce.

04

DATA Z MĚŘENÍ A ANALÝZY

K prokázání funkčnosti byla sonda TaqMan syntetizovaná v systému Kilobaser použita pro analýzu pomocí technologie qPCR a výsledky byly porovnány se sondami renomovaného výrobce, firmy Eurofins Genomics. Proto byly použity dvě různě zpracované sondy TaqMan vyrobené systémem Kilobaser:

1. neošetřená sonda, která byla použita bezprostředně po syntéze bez následné purifikace

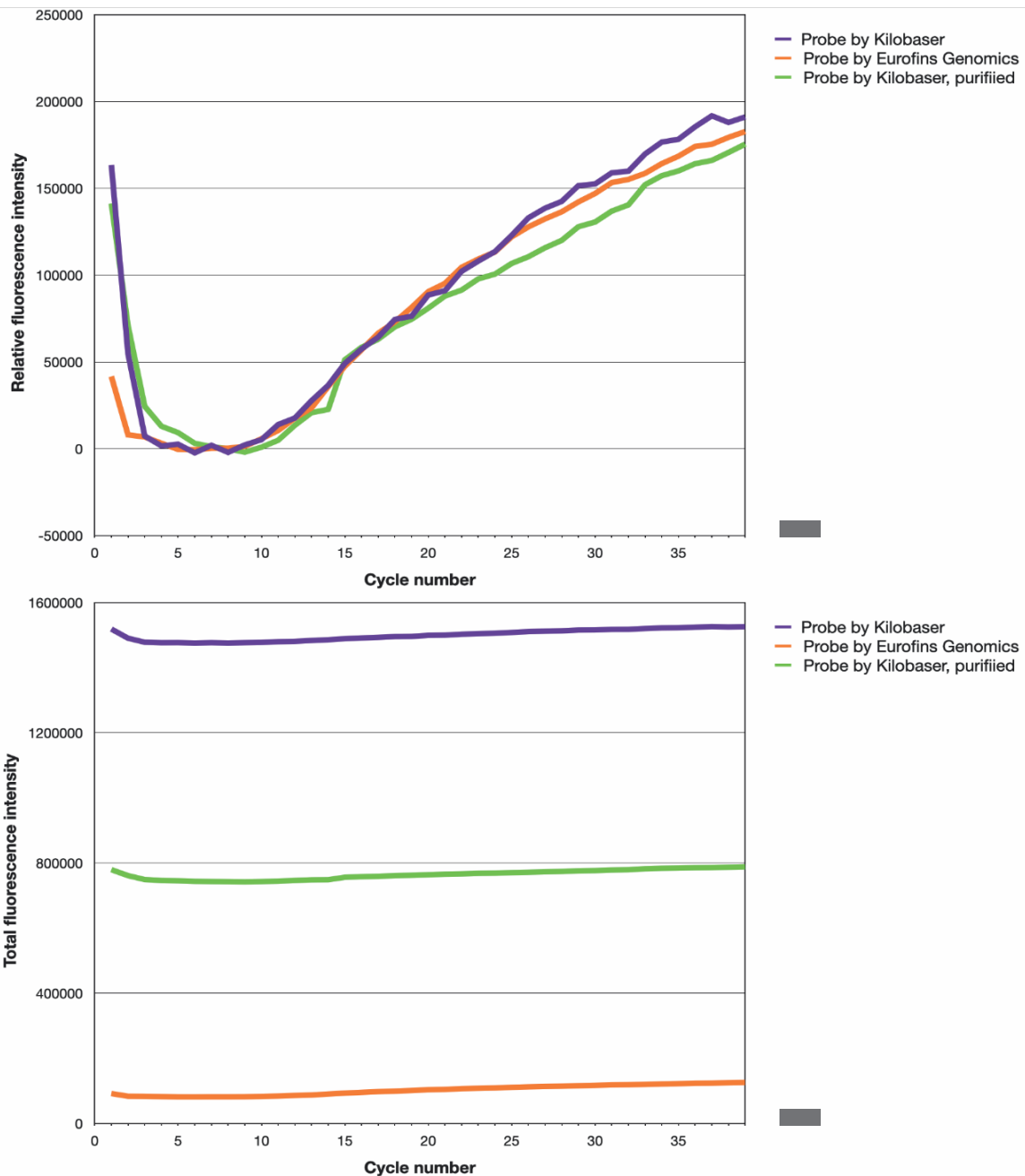
2. odsolená sonda, ze které byl před qPCR analýzou mimo jiné odstránen i navavaný FAM.

Na obrázku 3 jsou znázorněny reprezentativní amplifikační křivky qPCR s uvedenými sondami. Po odečtení signálu způsobeného šumem na pozadí od detekovaného fluorescenčního signálu, jak je vidět na obrázku 3a, je jasně viditelná specifická amplifikace cílové DNA,

kteřá je zcela srovnatelná v případě všech tří použitých sond.

Tento výsledek ukazuje, že sondy připravené pomocí systému Kilobaser mohou i bez následného přečištění fungovat dostatečně citlivě pro detekci cílových sekvencí DNA. Efekt přečištění lze pozorovat na obrázku 3b, na

kteřém je zobrazen původní nekorigovaný fluorescenční signál. Rozdíl v celkovém signálu je významný v důsledku nenávaného, a tedy nezhasnutého FAM, který způsobuje šum signálu na pozadí v případě nepurifikované sondy, testované bezprostředně po syntéze. Jednoduché odsolení těchto sond však signál pozadí významně snížilo.



Obrázek 3: Amplifikace signálu qPCR měřená pomocí různých sond vynesena pomocí (a) relativního fluorescenčního signálu po odečtu signálu pozadí a (b) celkového fluorescenčního signálu vs. počet cyklů.

05.1 Shrnutí

V současné době je zakázková syntéza DNA primárně zajišťována externě, protože konvenční zařízení pro syntézu DNA jsou nákladná a časově náročná.

S nízkými pořizovacími náklady, jednoduchou infrastrukturou, maximální uživatelskou

přívětivostí umožňuje Kilobaser inovativní přístup k syntéze DNA, kdy umožňuje každé laboratoři rychle a za nízké náklady vyrábět rozmanité DNA sondy.

První aplikace sond Kilobaser prokázala, že dosahují stejně dobrých výsledků jako komerčně dodávané sondy i bez purifikace, protože kontaminanty odstraněné pomocí HPLC neovlivňují standardní qPCR.

05.2 Výhled do budoucna

V současné době pro platformu Kilobaser je ve vývoji několik dalších aplikací, včetně:

- Čipy BHQ-2
- Kazety s dalšími fluorofory
- Kazety pro syntézu aptamerů
- Syntéza RNA
- Paralelní čipy pro simultánní syntézu

(1) MarketsAndMarkets - *Oligonucleotide Synthesis Market - Forcecasts to 2021*

(2) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html> (02.02.2021)

(3) J.M. Levisky, R.H. Singer: *Fluorescence in situ hybridization: past, present and future; Journal of Cell Science* 116: 2833-2838; (2003) doi: 10.1242/jcs.00633

(4) P.M. Holland et. al.: *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase; PNAS* 88:7276-7280 (1991) doi: 10.1073/pnas.88.16.7276

(5) A.T. Yeung et. al.: *Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance in real-time PCR; BioTechniques* 36:266-275 (2004) doi: 10.2144/04362RR01