

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2016-248

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.04.2016**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **20.12.2017**
(Věstník č. 51/2017)

- (71) Přihlašovatel:
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha 4,
CZ
Top-Bio, s.r.o., Praha 4, CZ
- (72) Původce:
Ing. Magda Tůmová, Ph.D., Praha 4, CZ
RNDr. Petr Dráber, DrSc., Jesenice - Horní Jirčany,
CZ
Marek Dráber, MBA, Praha 4, CZ
- (74) Zástupce:
Hák Janeček & Švestka, Patentová a známková
kancelář, RNDr. Roman Hák, patentový zástupce,
U Průhonu 5, 170 00 Praha 7

- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob detekce specifických mikroRNA
pomocí templátové DNA a molekula
templátové DNA pro použití při tomto
způsobu**

- (57) Anotace:
Řešení se týká nové metody pro stanovení množství
mikroRNA (miRNA) v daném vzorku pomocí
templátové DNA a působení exonukleázy I
s následnou detekcí, případně kvantifikací DNA
templátu pomocí kvantitativní PCR.

CZ 2016 - 248 A3

20.04.16

PV 2016-248

PV 248 - 2016

P-0125-CZA

Způsob detekce specifických mikroRNA pomocí templátové DNA a molekula templátové DNA pro použití při tomto způsobu

Oblast techniky

Vynález se týká nové metody pro detekci a stanovení množství mikroRNA v daném vzorku pomocí templátové DNA a působení exonukleázy I s následnou kvantifikací DNA templátu.

Dosavadní stav techniky

MikroRNA jsou krátké nekódující RNA molekuly, které mají důležitou úlohu v regulaci exprese genů. První z těchto molekul byla objevena roku 1993 při studiu hlístice *C. elegans* (Lee and Ambros, 2001). Victor Ambros se svými kolegy zjistil, že gen *lin-4* řídící larvální vývoj této hlístice nekóduje bílkoviny, ale dvě malé molekuly RNA (Ambros, 2001). A právě tyto RNA jsou jedny z prvních členů dnes již velmi početné rodiny malých regulačních RNA označovaných mikroRNA nebo zkráceně miRNA. Do roku 2001 bylo publikováno přes 100 dalších genů pro tyto miRNA, a to i v jiných organismech (Bartel, 2004). Podle miRBase databáze bylo v současné době již identifikováno jen v lidském genomu přes 2500 miRNA (www.mirbase.org). Předpokládá se, že více než třetina celého lidského genomu je ovlivňována právě miRNA (Lewis et al., 2005). Ačkoliv objeveny relativně nedávno, miRNA se tak stávají jednou z nejpočetnějších skupin molekul regulujících genovou expresi.

MiRNA jsou molekuly RNA o délce 21 až 25 nukleotidů, které se účastní posttranskripční regulace exprese genů. Při jejich tvorbě nejprve vzniká primární transkript, který je ještě v jádře štěpen na kratší zhruba 70-ti nukleotidové pre-miRNA pomocí RNázy zvané Drosha. Pre-miRNA jsou exportovány do cytoplasmy, kde dochází k dalšímu opracování enzymem RNázou III zvaným Dicer a vzniká 21 až 25 nukleotidů dlouhá miRNA. Vlákno miRNA, které je komplementární k mRNA, se pak v komplexu zvaném RISC (RNA-induced silencing complex) váže na cílovou mRNA molekulu a dojde k represí translace či degradaci dané mRNA (He and Hannon, 2004). Později bylo také ukázáno, že miRNA mohou ovlivňovat expresi genů nejen negativně, ale i pozitivně (Vasudevan et al., 2007).

MiRNA regulují mnoho vývojových a fyziologických procesů. Deregulace konkrétních miRNA je asociována s různými patologickými procesy. Studia profilu miRNA u zdravých a nemocných jedinců dokládají, že různé miRNA jsou užitečné biomarkery různých onemocnění. V literatuře se uvádí, že miRNA je deregulována u různých typů a stadií nádorových chorob, virových infekcí, onemocnění nervového systému, kardiovaskulárních chorob, diabetu a dalších (Wang et al., 2016). Při studii velkého množství nádorových vzorků bylo zjištěno, že exprese miRNA v nádorech je obecně nižší a expresní profil miRNA v rakovinných tkáních je specifický podle vývojového původu tkáně (Lu et al., 2005). Dalším nálezem dokládajícím význam miRNA biomarkerů pro diagnostické účely bylo zjištění, že miRNA kolují v krvi a tělních tekutinách ve stabilní formě a mohou tak být neinvazivními markery (Mitchell et al., 2008). O miRNA se uvažuje nejen jako vhodných markerech diagnózy, ale také prognózy a odpovědi na léčbu (Takamizawa et al., 2004; Schetter et al., 2008).

Problémem s využitím miRNA pro diagnostické účely však zůstává metoda detekce a kvantifikace miRNA. Doposud bylo vyvinuto několik metod, které však jsou značně časově náročné a komplikované a z tohoto důvodu jsou výsledky jednotlivých studií nekonzistentní. Nejstarší metodou je tzv. Northern blot, jejímž principem je elektroforetické rozdělení molekul RNA podle velikosti, přenos na membránu a následná hybridizace s detekční sondou, která je komplementární ke stanovované sekvenci. Tato metoda je značně zdlouhavá a pracná a proto není vhodná pro experimenty většího rozsahu. Metoda byla modifikována pro miRNA inkorporací „locked nucleic acids“ (LNA) do sekvence DNA sondy, čímž došlo ke zvýšení specifity a sensitivity detekce miRNA (Valoczi et al., 2004), ale pracnost metody nebyla ovlivněna. Další metodou je *in situ* hybridizace, při které není nutné sledované molekuly izolovat a přenášet na membránu, ale hybridizace se sondou proběhne přímo v buňkách na fixovaném histologickém řezu. Pro krátké molekuly miRNA byla tato metoda upravena tak, že po hybridizaci s delší sondou je řetězec miRNA dosyntetizován polymerázou a zároveň je inkorporován digoxigenin, který je detekován značenou protilátkou (Nuovo et al., 2009). Nízká citlivost detekce *in situ* hybridizací a značná pracnost však dělá tuto metodu nevhodnou pro rutinní kvantifikaci miRNA.

Speciální skupinu tvoří metody využívající miRNA mikročipy, které umožňují simultánní stanovení velkého množství různých miRNA. V tomto případě jsou sondy (nejčastěji DNA)

s komplementární sekvencí k různým miRNA imobilizovány na pevném nosiči. Principem metody je opět hybridizace cílové molekuly s její sondou. Během několika dnů je možné získat touto metodou celou řadu dat, což je jeden z důvodů, proč je tato metoda hojně využívána. Nevýhodou je však vyšší požadavek na vstupní množství RNA vzorku a příprava specifického souboru požadovaných sond a výroba mikročipu před samotným experimentem (Meyer et al., 2010). Jedna z modifikací pro stanovení miRNA je využití LNA v sekvenci sond. LNA je syntetický analog RNA molekuly vykazující zvýšenou termostabilitu duplexů nukleových kyselin. Každý takový LNA monomer v sekvenci sondy zvyšuje teplotu tání (T_m) a tím umožňuje vyrobit čip s řadou sond o srovnatelné T_m . Tímto přístupem je možno zajistit vhodné hybridizační podmínky (Castoldi et al., 2008). Komerčně je dostupných několik variant těchto čipů. Díky omezené specifičtější této metody, je však nutné prvotní nález ověřovat ještě druhou metodou, obvykle kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR).

V současné době nejpoužívanější metody pro stanovení miRNA jsou založené na qRT-PCR. Výhodami těchto metod je, že výsledky mohou být získány během jediného dne, stanovení většího množství vzorků najednou a velká citlivost metod (Meyer et al., 2010). Tyto metody spočívají v izolaci RNA, přepsání RNA do cDNA (v procesu reverzní transkripce s reverzní transkriptázou) a následné qRT-PCR. Protože miRNA obsahují jen malý počet nukleotidů, musí před samotnou reverzní transkripcí miRNA dojít k prodloužení těchto molekul a to např. polyadenylací. Po polyadenylaci se využije oligo-dT sekvence jako primer pro reverzní transkripci a PCR pak probíhá s jedním univerzálním primerem a jedním specifickým pro danou miRNA (Fu et al., 2006; Balcells et al., 2011). Prodloužení miRNA molekul lze také docílit využitím tzv. „stem loop“ primerů. Tyto primery jsou nejprve hybridizovány s miRNA a pak teprve dochází k reverzní transkripci a následné detekci cDNA za použití běžné Taq Man qRT-PCR (Chen et al., 2005). K prodloužení miRNA molekuly může také dojít při reverzní transkripci za pomoci primeru s krátkou komplementární sekvencí k miRNA a dlouhým nespecifickým úsekem na jeho 5' konci. cDNA je následně kvantifikována SYBR Green qRT-PCR s LNA obsahujícím specifickým primerem a druhým univerzálním primerem (Raymond et al., 2005).

Pro stanovení miRNA se nově také používá vysokokapacitní sekvenování (tzv. „next generation sequencing“). Tato metoda je však spíše vhodná pro identifikaci nových miRNA než pro běžné rutinní testování. Existuje ještě několik dalších metod pro stanovení miRNA.

Tyto metody však nejsou určeny pro rutinní stanovení miRNA v běžné laboratoři a vyžadují specializované vybavení.

Všechny výše uvedené metody, kromě hybridizace *in situ*, vychází z izolované RNA nebo miRNA. Samotná izolace RNA bývá však zdoluhavý a náročný proces, během něhož může dojít k degradaci RNA všudypřítomnými RNázami a k ovlivnění výsledků stanovení exprese miRNA. Druhým krokem bývá polyadenylace poly(A) polymerázou následovaná reverzní transkripcí, kdy dochází k přepisu RNA na cDNA a teprve ta bývá kvantifikována pomocí qRT-PCR. Citlivá metoda, která by umožnila stanovit miRNA bez nutnosti její izolace, polyadenylace a přepisu do cDNA by byla velice potřebná, neboť by velmi zjednodušila a zlevnila celý proces.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je nová metoda detekce miRNA. Termínem detekce se rozumí jak pouhé zjištění přítomnosti či nepřítomnosti miRNA ve vzorku, tak i kvantitativní stanovení, jako je např. stanovení počtu molekul miRNA přítomných ve vzorku. Principem metody je kontakt miRNA ze zkoumaného vzorku se syntetickou jedno-vláknovou templátovou DNA, která je navržena tak, aby se její část komplementárně vážala na studovanou miRNA. Je-li miRNA přítomna, dojde k její hybridizaci s templátovou DNA (volné v roztoku nebo imobilizované na povrch, magnetické partikule nebo jiný substrát), čímž vznikne hybridní dvouvláknová sekvence DNA-RNA, která je rezistentní k působení exonukleázy I. Exonukleáza I degraduje pouze jedno-vláknové DNA tím, že ve směru od 3' konce k 5' konci odštěpuje jednotlivé nukleotidy. Pokud však miRNA ve vzorku není (nebo není schopna se komplementárně vázat na templátovou DNA), nevznikne dvouvláknová struktura, templátová DNA je v přítomnosti exonukleázy I degradována a nemůže sloužit jako templát pro následnou qRT-PCR s přidanými oligonukleotidovými primery. Způsob podle předloženého vynálezu může být použit jak pro detekci (průkaz přítomnosti miRNA), tak i pro kvantifikaci, relativní (vzájemné porovnání množství miRNA v různých vzorcích) i absolutní (zjištění absolutního množství miRNA v původním vzorku).

Pro každou konkrétní miRNA je navržena specifická templátová DNA. Jedná se o synteticky připravený oligonukleotid o délce 50 až 150 nukleotidů, obvykle o délce 70 až 100

nukleotidů, který je vhodný pro amplifikaci v qRT-PCR a má dvě části: variabilní úsek, který je specifický pro danou miRNA, a konstantní úsek, který je konstantní pro stanovení různých miRNA.

V jednom provedení je templátovou DNA oligonukleotid s konstantním úsekem začínajícím na 5' konci templátové DNA, kde je umístěna vazebná sekvence pro zakotvení templátové DNA. Pro toto zakotvení se obvykle využívá poly-A sekvence, o délce 15 až 40 nukleotidů, častěji 20 až 25 nukleotidů. Tato sekvence je důležitá pro zakotvení templátové DNA pomocí hybridizace s biotinylovanou poly-T sekvencí a následnou vazbou biotinu na streptavidin, který může být navázán na jakémkoliv povrchu, výhodně např. v jamkách PCR destičky, zkumavkách či magnetických partikulích. Nejvýhodnější je použití magnetických partikulí, kdy se přibližuje hybridizace optimálním podmínkám hybridizace v roztoku. Toto uchycení templátové DNA před hybridizací, případně s navázanou miRNA po hybridizaci, umožňuje odmyt možné inhibitory exonukleázy ze vzorku. Po vazebné sekvenci (výhodně poly-A sekvenci) následuje sekvence 15 až 30 nukleotidů, výhodně 18 až 26 nukleotidů, pro nasednutí forward primeru, následovaná úsekem extenze (prodlužujícím úsekem), jehož funkce spočívá pouze ve vhodném prodloužení velikosti PCR produktu (amplikonu). Sekvence prodlužujícího úseku by měla být navržena s ohledem na ostatní úseky templátové DNA, a to tak, aby nedocházelo ke vzniku sekundárních struktur v rámci celé molekuly DNA. Její délka je závislá na délce ostatních úseků a je volena tak, aby při qRT-PCR vznikal vhodně dlouhý amplikon. Tím končí sekvence konstantního úseku a pokračuje variabilní úsek templátové DNA, který je komplementární sekvencí k stanovované miRNA a zároveň místem, kde při detekci pomocí qRT-PCR nasedá tzv. reverzní primer. Sekvence reverzního primeru je komplementární sekvencí alespoň k části variabilního úseku templátové DNA o délce 15 až 30 nukleotidů, výhodně v rozsahu 18 až 26 nukleotidů.

V jiném provedení je templátovou DNA oligonukleotid, ve kterém je variabilní úsek navržen stejně jako v předchozím případě, ale v konstantním úseku molekuly chybí sekvence pro zakotvení, tj. sekvence pro hybridizaci na zakotvovací oligonukleotid. Na 5' konci templátové DNA je umístěn biotin, a je tedy možné ji přímo zakotvit na povrchu potažených streptavidinem, bez nutnosti hybridizace se zakotvenou poly-T sekvencí. Zbylé úseky molekuly jsou navrženy stejně jako v případě první templátové DNA (viz. výše).

Průkaz známé sekvence templátové DNA a její kvantifikace pomocí qRT-PCR je běžným laboratorním postupem známým odborníkům v oblasti průkazu specifických úseků DNA.

Výhodou metody podle předloženého vynálezu je, že není nutné miRNA předem ze vzorku izolovat, což celý proces velmi zjednodušuje, zkracuje, snižuje ztráty molekul miRNA, snižuje variabilitu, chybovost a redukuje finanční náročnost.

U většiny doposud používaných postupů pro kvantifikaci miRNA, následují po izolaci miRNA enzymatické reakce, které miRNA prodlužují (polyadenylace) a převádějí na cDNA (reverzní transkripce), aby ji bylo možné detekovat pomocí qRT-PCR. Nová metoda tyto enzymatické kroky nevyžaduje, a tím dochází k dalšímu zjednodušení a zlevnění metody. Využitím qRT-PCR jako detekční metody dochází ke zvýšení citlivosti této metody ve srovnání s metodami, které využívají mikročipy.

Předmětem vynálezu je v jednom provedení způsob detekce miRNA ve vzorku, ^{přičemž tento} ~~kteřýžto~~ způsob obsahuje kroky, kdy a) ke vzorku se přidá jednovláknová templátová DNA, která na svém 3' konci obsahuje variabilní úsek a na svém 5' konci obsahuje konstantní úsek, kde variabilní úsek obsahuje sekvenci komplementární k sekvenci miRNA, která má být detekována, konstantní úsek obsahuje úsek pro nasednutí forward primeru, a úsek extenze ležící mezi variabilním úsekem a úsekem pro nasednutí forward primeru; b) detekovaná miRNA se ponechá hybridizovat s templátovou DNA za vzniku hybridní molekuly; c) na templátovou DNA se po hybridizaci působí exonukleázou I, čímž se degraduje nehybridizovaná jednovláknová DNA, přičemž hybridizovaná templátová DNA je k působení exonukleázy I rezistentní; d) užitím qRT-PCR s forward a reverzním primerem, přičemž forward primer má sekvenci shodnou s alespoň částí úseku templátové DNA pro nasednutí forward primeru a reverzní primer má sekvenci komplementární k alespoň části variabilního úseku templátové DNA, se detekuje, případně kvantifikuje templátová DNA rezistentní k působení exonukleázy I, přičemž množství templátové DNA odpovídá množství miRNA přítomné v původním vzorku.

V jiném provedení způsob podle vynálezu dále obsahuje krok, kdy se templátové molekuly imobilizují na povrch, kde povrch je uzpůsoben pro navázání templátové DNA.

Při způsobu podle vynálezu templátová DNA dále obsahuje na svém 5' konci značku, výhodně biotin.

Ve výhodném provedení způsobu se užije templátová DNA, která obsahuje na svém 5' konci značící úsek, výhodně poly-A úsek.

V jiném výhodném provedení způsobu se v kroku a) dále přidá značící molekula DNA, která je komplementární ke značícímu úseku a obsahuje navázanou značku, výhodně se přidá molekula poly-T s navázaným biotinem.

V ještě jiném výhodném provedení se v kroku a) dále přidá chaotropní činidlo, výhodně GuSCN, ve výsledné koncentraci 0,5 až 8 mol/l, výhodně 1,5 až 4 mol/l, nejvýhodněji 2 mol/l.

Při jednom provedení způsobu podle vynálezu je výhodně imobilizační povrch potažen molekulami pro navázání značky templátové DNA, výhodně molekulami streptavidinu.

Imobilizační povrch je výhodně vnitřní povrch jamky titrační/PCR destičky nebo povrch magnetické částice.

Dalším předmětem vynálezu je molekula jednovláknové templátové DNA pro použití při detekci miRNA způsobem výše popsáným, ^{přičemž tato} ~~kte~~ molekula obsahuje na svém 3' konci variabilní úsek specifický pro detekovanou miRNA, který obsahuje sekvenci komplementární k sekvenci miRNA, která má být detekována, a na svém 5' konci obsahuje konstantní úsek, který obsahuje úsek pro nasednutí forward primeru a úsek extenze ležící mezi variabilním miRNA-specifickým úsekem a úsekem pro nasednutí forward primeru.

Molekula podle vynálezu výhodně dále obsahuje na svém 5' konci značku, výhodně molekulu pro zakotvení na pevném podkladu, výhodně biotin.

V jiném provedení molekula obsahuje na svém 5' konci značící úsek, výhodně poly-A úsek.

Výhodná molekula podle vynálezu je molekula, kde úsek pro nasednutí forward primeru je dlouhý 15 až 30 nukleotidů, výhodně 18 až 26 nukleotidů.

Výhodná je molekula podle vynálezu, kde úsek extenze je dlouhý 10 až 35, výhodně 18 až 26 nukleotidů.

V jednom výhodném provedení molekula podle vynálezu obsahuje sekvenci id. č. 1: 5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA ACG ATC ATC AGG AGA CAC T-3'.

V jiném výhodném provedení molekula podle vynálezu obsahuje sekvenci id. č. 2: 5'-Btn-AA AAA CCT TAC CAA TTT GAC CCG TCT GCG -3'.

Podrobnější objasnění a výhody předloženého vynálezu budou odborníkovi zřejmé z následujících příkladů a obrázku.

Objasnění výkresů

Popis obrázku

Obr.1. Schéma navržené metody detekce, případně kvantifikace miRNA. (1) Detekce/kvantifikace miRNA vyžaduje templátovou DNA unikátního složení, která je tvořena konstantním a variabilním úsekem. Konstantní úsek je tvořen úsekem pro nasednutí forward primeru, úsekem extenze a popřípadě ještě kotvicím úsekem (např. poly-A) pro zakotvení na pevný nosič (např. Btn-poly-T). Variabilní úsek představuje oblast unikátní sekvence, která je komplementární pro miRNA a na kterou se následně váže reverzní primer v průběhu qRT-PCR. (2) Vazba DNA templátu na streptavidin, který může být vázán kovalentně nebo nekovalentně na různé substráty. (3) Efekt exonukleázy I v přítomnosti (A) nebo nepřítomnosti (B) analyzované miRNA. (4) Detekce templátové DNA rezistentní k působení exonukleázy I (v důsledku vazby s miRNA) pomocí qRT-PCR s využitím dvojice oligonukleotidových primerů (forward a reverzní primer). Specifický amplikon se tvoří pouze v případě vazby miRNA na templátovou DNA.

uskutečnění

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Princip způsobu kvantifikace miRNA podle předloženého vynálezu je osvětlen na výhodném provedení, které je schematicky znázorněno na obrázku 1. V následujícím experimentu je způsob ověřen stanovením miRNA-238 pomocí templátové DNA 440/238 a magnetických mikročástic potažených streptavidinem.

Stručný přehled hlavních kroků způsobu:

- 1) hybridizace templátové DNA, obsahující poly-A sekvenci v konstantním úseku a ve variabilním úseku sekvenci pro stanovení miRNA-238, syntetické miRNA-238 a biotinylovaného poly-T oligonukleotidu v hybridizačním roztoku, čímž vznikne biotinylovaná hybridní molekula;
- 2) příprava magnetických částic potažených streptavidinem;
- 3) navázání biotinylované hybridní molekuly na magnetické částice potažené streptavidinem;
- 4) promytí částic s navázanou hybridní molekulou;
- 5) degradace jednořetězcové DNA exonukleázou I;
- 6) separace hybridních molekul od magnetických částic;
- 7) qRT-PCR detekce templátové DNA užitím forward primeru a reverzního primeru

Detailní protokol

Použitý materiál a vybavení:

Syntetické oligonukleotidy:

miRNA-238: 5'-UUU GUA CUC CGA UGC CAU UCA GA-3'

Poly-T-biotin: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'-biotin

Templátová DNA 440/238:

5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA ACG ATC ATC AGG AGA CAC TCA AAC TTC
TCT AAC TTT CTG AAT GGC ATC GGA GTA CAA A-3'

Primery: Forward 440: 5'-CGA TCA TCA GGA GAC ACT-3'

Reverzní 238: 5'-GTA CTC CGA TGC CAT TCA G-3'

Roztoky a enzymy:

20 x SSC: 3M NaCl, 300 mM citrát sodný, pH 7,0

Hybridizační roztok: 5 x SSC, 0,1% N-lauryl sarkosin, 0,02% SDS

Promývací roztok: 5 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA, 1M NaCl

tRNA: vodný roztok 2 mg/ml (Sigma, kat. č. R8759), skladován při -20°C

TP SYBR 2x Master Mix (Top-Bio, kat. č. T605)

10x konc. PCR Blue Buffer (Top-Bio, kat. č. T058)

T04P2: 2x koncentrovaný vodný roztok obsahující 0,4 M L-trehalozu, 2 M 1,2-propandiol, 2x koncentrovaný Blue buffer, aditiva a stabilizátory Top-Bio provenience.

Exonukléáza I (Thermo Scientific, Kat. č. EN0581)

Další materiály:

PCR destičky: BioRad plate 96-well s bílými jamkami (HSR 9905)

Magnetické partikule se streptavidinem (Dynabeads MyOne Streptavidin C1, Invitrogen)

PCR cykler: RealPlex EP Mastercycler (Eppendorf)

1) V jamce 96-jamkové polypropylenové destičky pro PCR byl v hybridizačním roztoku smíchán poly-T-biotin (200 fmol) s templátovou DNA 440/238 (100 fmol) a do některých vzorků byla přidána syntetická miRNA-238 (200 fmol). Vzorky DNA a RNA byly ředěny ze zásobních roztoků za přítomnosti nosičové tRNA 100 µg/ml. Finální objem každého vzorku byl 10 µl. Vzorky byly inkubovány 1 h při pokojové teplotě. Vzorky bez přidání syntetické miRNA-238 sloužily jako pozitivní a negativní kontroly (DNA, DNA+Exo I – viz tabulka 1).

2) Během inkubace byly připraveny magnetické partikule s kovalentně navázaným streptavidinem. Potřebné množství (1 µl suspenze/vzorek) bylo odebráno, 4x promyto promývacím roztokem, naředěno a nanášeno do jamek PCR destičky.

3) Do jamek s magnetickými partikulami byl přidán celý objem hybridizovaného vzorku (10 µl) a destička byla inkubována 30 min při pokojové teplotě.

4) Magnetické partikule byly promyty 2x hybridizačním pufrem a 2x promývacím pufrem. Po přidání promývacího roztoku byl vzorek vždy ponechán 2 až 3 min na magnetickém stojánku před odebráním supernatantu.

5) K promytým partikulím byl přidán roztok exonukleázy I v 1x T04P2 pufru (10 U/vzorek, finální objem 20 μ l). Vzorky byly inkubovány 60 min při 37⁰C.

6) Inaktivace exonukleázy I a separace vzorků od magnetických partikulí byla provedena zahřátím vzorků na 85⁰C po dobu 20 min. Po krátkém stočení, byly vzorky umístěny na magnetickou podložku a 15 μ l z každého vzorku bylo přeneseno do nové PCR destičky.

7) Detekce nedegradované DNA qRT-PCR: K 15 μ l vzorku bylo přidáno 15 μ l Master Mixu obsahujícího T04P2 pufr, primery (výsledná koncentrace 150 nM), dNTPs (výsledná koncentrace 200 μ M), Taq DNA polymerázu (1,5 U, výsledná koncentrace 0,05 U/ μ l) a SYBR Green I. Pro qPCR amplifikaci byl použit následný program: 3 min 95⁰C, 40x (95⁰C 10 s, 59,5⁰C 15 s, 72⁰C 10 s).

Metoda qRT-PCR umožňuje kvantifikovat nárůst amplifikovaného fragmentu DNA v reálném čase měřením jeho fluorescence. Výsledky qRT-PCR jsou udávány jako počet cyklů (C_T), které proběhnou, než fluorescence daného vzorku překročí určitou hranici (threshold), která je pro všechny vzorky v daném měření stejná. Čím více DNA ve vzorku je, tím dříve překročí danou hranici a tím nižší hodnotu C_T dosáhne. V tabulce 1 jsou shrnuty výsledky experimentu. Přítomnost miRNA v původním vzorku byla jednoznačně prokázána detekcí templátové DNA. Je zřejmé, že miRNA se vážala na templátovou DNA a ochránila ji tak před degradací exonukleázou I.

Tabulka 1. Výsledky stanovení miRNA-238 udávané jako C_T hodnota vzorků: samotné templátové DNA (DNA), samotné templátové DNA po ošetření exonukleázou I (DNA + ExoI), templátové DNA s navázanou miRNA po ošetření exonukleázou I (DNA + RNA + ExoI).

DNA 440/238				
Vzorky:	C_T		Průměr	St. odchylka
DNA	4,04	4,10	4,07	0,04
DNA + ExoI	13,16	13,08	13,12	0,06
DNA + miRNA + ExoI	5,08	4,96	5,02	0,08

Příklad 2

Stanovení miRNA-238 pomocí templátové DNA 440/238 v absenci a přítomnosti 2M guanidinu thiokyanátu (GuSCN).

Tento výhodný postup využívá poznatku, že RNA hybridizuje s templátovou DNA za přítomnosti chaotropních činidel (např. GuSCN), které jsou inhibitory RNáz. Tento postup je možné použít pro kvantifikaci miRNA v buňkách (Kaabache et al., 1995).

Postup kvantifikace miRNA je shodný s postupem v předchozím příkladu s výjimkou kroků 1 a 4. V kroku 1 probíhá hybridizace v hybridizačním roztoku anebo v T04P2 pufru s nebo bez přídavku GuSCN. V kroku 4 byly partikule promyty 3x TE pufrem.

Byly použity stejné oligonukleotidy, enzymy, zařízení a roztoky jako v příkladu 1, navíc byl užit TE pufr:

1x TE pufr: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1mM EDTA

Detailní protokol (pouze kroky odlišné od příkladu 1):

1) V jamce PCR destičky byl v hybridizačním roztoku nebo v T04P2 pufru s nebo bez GuSCN (výsledná konc. 2M) smíchán poly-T-biotin (200 fmol) s templátovou DNA 440/238 (100 fmol) a do některých vzorků byla přidána syntetická miRNA-238 (200 fmol). Finální objem byl 10 μ l. Vzorky byly inkubovány 1,5 h při pokojové teplotě. Vzorky DNA a RNA byly ředěny ze zásobních roztoků za přítomnosti nosičové tRNA 100 μ g/ml.

4) Magnetické partikule byly promyty od nenavázaného materiálu 3x TE puforem; každé promytí spočívalo v přidání promývacího roztoku a inkubaci vzorku 2 až 3 min na magnetickém stojánku před odebráním supernatantu.

V tabulce 2 jsou shrnuty výsledky experimentu. Přítomnost miRNA v původním vzorku (T04P2 pufru nebo hybridizačním roztoku) byla jednoznačně prokázána detekcí templátové DNA. Je zřejmé, že miRNA se vážala na templátovou DNA a ochránila ji tak před degradací exonukleázou I i za přítomnosti 2M GuSCN.

Tabulka 2. Výsledky stanovení miRNA-238 udávané jako C_T hodnota vzorků: samotné templátové DNA (DNA), samotné templátové DNA po ošetření exonukleázou I (DNA + ExoI), templátové DNA s navázanou miRNA po ošetření exonukleázou I (DNA + RNA + ExoI).

DNA 440/238								
	Hybridizační roztok				T04P2 pufr			
GuSCN	-		2M GuSCN		-		2M GuSCN	
Vzorky	C_T průměr	Stand. odchylka	C_T průměr	Stand. odchylka	C_T průměr	Stand. odchylka	C_T průměr	Stand. odchylka
DNA	4,74	1,00	4,26	0,38	3,75	0,28	3,91	0,23
DNA/ExoI	14,41	0,68	11,24	0,49	10,13	0,65	11,97	0,62
DNA/RNA/ExoI	3,74	0,45	3,59	0,16	3,39	0,36	4,32	0,83

Příklad 3

Stanovení miRNA-122 v T04P2 pufru nebo v séru pomocí templátové DNA BtnAnchor. Vzorky byly analyzovány v přítomnosti nebo nepřítomnosti 2M guanidinu thiokyanátu (GuSCN). Tento výhodný postup využívá poznatku, že RNA hybridizuje s templátovou DNA za přítomnosti chaotropních činidel (např. GuSCN), které jsou inhibitory RNáz a je možno je použít pro solubilizaci buněk (Kaabache et al., 1995). GuSCN přispívá také k rozrušení komplexů nukleových kyselin a proteinů. V tomto stanovení jsme využili templátovou DNA, na které je přímo konjugovaná biotinová značka, a není tedy nutné přidávat biotinylovaný poly-T oligonukleotid.

Postup byl shodný s postupem v příkladu 2 s výjimkou kroků 1 a posledního kroku týkajícího se qPCR detekce. V kroku 1 probíhala hybridizace v T04P2 pufru (prostředí ve kterém již byla provedena úspěšná hybridizace) nebo ve vzorku séra s nebo bez přídavku GuSCN (finální koncentrace 2M). Jako vzorek séra bylo použito FBS (GE Healthcare). Byly použity stejné enzymy, zařízení a roztoky jako v příkladu 2.

Syntetické oligonukleotidy:

miRNA-122: 5'-UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3'

Templátová DNA BtnAnchor:

5'-Btn-AA AAA CCT TAC CAA TTT GAC CCG TCT GCG ACTG ACTG ACTG ACTG
ACTG ACTG ACTG CG AGC AAA CAC CAT TGT CAC ACT CCA-3'

Primery: Forward TPL2: 5'-CCT TAC CAA TTT GAC CCG TCT GCG- 3'

Reverzní TPL2: 5'-TGG AGT GTG ACA ATG GTG TTT GCT CG- 3'

Detailní protokol (kroky odlišné od příkladu 2):

1) Do jamek PCR destičky byla do T04P2 pufru nebo do séra +/- GuSCN (výsledná konc. 2M) přidáno definované množství templátové DNA BtnAnchor (100 fmol). Do vybraných vzorků byla přidána syntetická miRNA-122 (200 fmol). Finální objem byl 10 µl. Vzorky byly inkubovány 1 h při pokojové teplotě. Vzorky DNA a RNA byly ředěny ze zásobních roztoků

za přítomnosti nosičové tRNA 100 µg/ml. Při qPCR detekci byl použit následující program: 3 min 95 °C 40x (95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 8 s) a specifické primery (viz. výše). Složení reakční směsi bylo stejné jako v předchozích příkladech.

V tabulce 3 jsou shrnuty výsledky experimentu. Přítomnost miRNA v původním vzorku byla jednoznačně prokázána detekcí templátové DNA. Je zřejmé, že miRNA se vážala na biotinylovanou templátovou DNA a ochránila ji tak před degradací exonukleázou I jak v přítomnosti T04P2 pufru, tak i ve vzorku séra za přítomnosti 2M GuSCN. Naopak ve vzorku séra bez GuSCN templátová DNA zřejmě nehybridizovala s miRNA a následně došlo k její degradaci exonukleázou I.

Tabulka 3. Výsledky stanovení miRNA-122 udávané jako C_T hodnota vzorků: samotné templátové DNA (DNA), samotné templátové DNA po ošetření exonukleázou I (DNA + ExoI), templátové DNA s navázanou miRNA po ošetření exonukleázou I (DNA + RNA + ExoI).

BtnAnchor						
	T04P2 pufr		FBS		FBS/2M GuSCN	
Vzorky	C_T průměr	Stand. odchylka	C_T průměr	Stand. odchylka	C_T průměr	Stand. odchylka
DNA	3,09	0,05	4,78	0,38	3,45	0,06
DNA/ExoI	8,91	0,06	11,00	0,37	10,02	0,37
DNA/RNA/ExoI	3,90	0,58	10,59	0,54	4,17	0,49

Výzkum, který byl podkladem pro vytvoření vynálezu, byl částečně podpořen dotací Technologické agentury České republiky na řešení projektu č. TH01010244 s názvem MikroRNA biomarkery – nové metody kvantifikace.

Seznam sekvencí

SEQUENCE LISTING

<110> Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha, CZ
Top-Bio, s.r.o., Praha, CZ

<120> Způsob detekce specifických mikroRNA pomocí templátové DNA a molekula
templátové DNA pro použití při tomto způsobu

<130> P-0125-CZ

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> syntetická molekula

<400> 1

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aacgatcatc aggagacact

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> syntetická molekula

<223> molekula biotinylovaná (Btn) na 5'konci

<400> 2

Btn-aaaaacctta ccaatttgac ccgtctgcg

Seznam citované literatury

1. Ambros, V., 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107, 823-826.
2. Balcells, I., Cirera, S., Busk, P.K., 2011. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol.* 11, 70.
3. Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
4. Castoldi, M., Schmidt, S., Benes, V., Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., 2008. miChip: an array-based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes. *Nat. Protoc.* 3, 321-329.
5. Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., Lao, K.Q., Livak, K.J., Guegler, K.J., 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33, e179.
6. Fu, H.J., Zhu, J., Yang, M., Zhang, Z.Y., Tie, Y., Jiang, H., Sun, Z.X., Zheng, X.F., 2006. A novel method to monitor the expression of microRNAs. *Mol. Biotechnol.* 32, 197-204.
7. He, L., Hannon, G.J., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522-531.
8. Kaabache, T., Barraud, B., Feldmann, G., Bernuau, D., Lardeux, B., 1995. Direct solution hybridization of guanidine thiocyanate-solubilized cells for quantitation of mRNAs in hepatocytes. *Anal. Biochem.* 232, 225-230.
9. Lee, R.C., Ambros, V., 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294, 862-864.
10. Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
11. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., Golub, T.R., 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 435, 834-838.
12. Meyer, S.U., Pfaffl, M.W., Ulbrich, S.E., 2010. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity? *Biotechnol. Lett.* 32, 1777-1788.
13. Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella,

- R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 10513-10518.
14. Nuovo, G., Lee, E.J., Lawler, S., Godlewski, J., Schmittgen, T., 2009. In situ detection of mature microRNAs by labeled extension on ultramer templates. *BioTechniques* 46, 115-126.
 15. Raymond, C.K., Roberts, B.S., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., Johnson, J.M., 2005. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA*. 11, 1737-1744.
 16. Schetter, A.J., Leung, S.Y., Sohn, J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N., Yuen, S.T., Chan, T.L., Kwong, D.L., Au, G.K., Liu, C.G., Calin, G.A., Croce, C.M., Harris, C.C., 2008. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*. 299, 425-436.
 17. Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T., 2004. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 64, 3753-3756.
 18. Valoczi, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyan, J., Kauppinen, S., Havelda, Z., 2004. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*. 32, e175.
 19. Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 318, 1931-1934.
 20. Wang, J., Chen, J., Sen, S., 2016. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J. Cell Physiol*. 231, 25-30.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob detekce miRNA, **vyznačující se tím**, že obsahuje kroky, kdy
 - a) ke vzorku se přidá jednovláknová templátová DNA, která na svém 3' konci obsahuje variabilní úsek a na svém 5' konci obsahuje konstantní úsek, kde variabilní úsek obsahuje sekvenci komplementární k sekvenci miRNA, která má být detekována, a konstantní úsek obsahuje úsek pro nasednutí forward primeru a úsek extenze ležící mezi variabilním úsekem a úsekem pro nasednutí forward primeru;
 - b) detekovaná miRNA se ponechá hybridizovat s templátovou DNA za vzniku hybridní molekuly;
 - c) na templátovou DNA se po hybridizaci působí exonukleázou I, čímž se degraduje nehybridizovaná jednovláknová DNA, přičemž hybridizovaná templátová DNA je k působení exonukleázy I rezistentní;
 - d) užitím qRT-PCR s forward a reverzním primerem, přičemž forward primer má sekvenci shodnou s alespoň částí úseku templátové DNA pro nasednutí forward primeru a reverzní primer má sekvenci komplementární k alespoň části variabilního úseku templátové DNA, se detekuje, případně kvantifikuje templátová DNA rezistentní k působení exonukleázy I, přičemž množství templátové DNA odpovídá množství miRNA přítomné v původním vzorku.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že způsob dále obsahuje krok, kdy se templátové molekuly imobilizují na povrch, kde povrch je uzpůsoben pro navázání templátové DNA.
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že templátová DNA dále obsahuje na svém 5' konci značku, výhodně biotin.
4. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že templátová DNA obsahuje na svém 5' konci značící úsek, výhodně poly-A úsek.

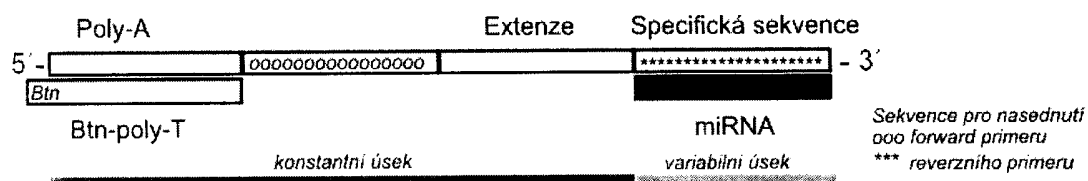
5. Způsob podle kteréhokoliv nároku 1 až 4, **vyznačující se tím**, že v kroku a) se dále přidá značící molekula DNA, která je komplementární ke značicímu úseku a obsahuje navázanou značku, výhodně se přidá molekula poly-T s navázaným biotinem.
6. Způsob podle kteréhokoliv nároku 1 až 5, **vyznačující se tím**, že v kroku a) se dále přidá chaotropní činidlo, výhodně GuSCN, ve výsledné koncentraci 0,5 až 8 mol/l, výhodně 1,5 až 4 mol/l, nejvýhodněji 2 mol/l.
7. Způsob podle kteréhokoliv nároku 2 až 6, **vyznačující se tím**, že imobilizační povrch je potažen molekulami pro navázání značky templátové DNA, výhodně molekulami streptavidinu.
8. Způsob podle kteréhokoliv nároku 2 až 7, **vyznačující se tím**, že imobilizační povrch je vnitřní povrch jamky titrační/PCR destičky nebo povrch magnetické částice.
9. Molekula jednovláknové templátové DNA pro použití při způsobu detekce miRNA podle nároku 1, ^{příčímž tato} ~~kterážto~~ molekula obsahuje na svém 3' konci variabilní úsek specifický pro detekovanou miRNA, který obsahuje sekvenci komplementární k sekvenci miRNA, která má být detekována, a na svém 5' konci obsahuje konstantní úsek, který obsahuje úsek pro nasednutí forward primeru a úsek extenze ležící mezi variabilním miRNA-specifickým úsekem a úsekem pro nasednutí forward primeru.
10. Molekula jednovláknové templátové DNA podle nároku 9, která dále obsahuje na svém 5' konci značku, výhodně molekulu pro zakotvení na pevném podkladu, výhodně biotin.
11. Molekula jednovláknové templátové DNA podle nároku 9, která dále obsahuje na svém 5' konci značící úsek, výhodně poly-A úsek.
12. Molekula jednovláknové templátové DNA podle kteréhokoliv nároku 9 až 11, kde úsek pro nasednutí forward primeru je dlouhý 15 až 30 nukleotidů, výhodně 18 až 26 nukleotidů.

13. Molekula jednovláknové templátové DNA podle kteréhokoliv nároku 9 až 11, kde úsek extenze je dlouhý 10 až 35, výhodně 18 až 26 nukleotidů.
14. Molekula jednovláknové templátové DNA podle kteréhokoliv nároku 9 až 13, která obsahuje sekvenci id. č. 1: 5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA ACG ATC ATC AGG AGA CAC T-3'.
15. Molekula jednovláknové templátové DNA podle kteréhokoliv nároku 9 až 13, která obsahuje sekvenci id. č. 2: 5'-Btn-AA AAA CCT TAC CAA TTT GAC CCG TCT GCG-3'.

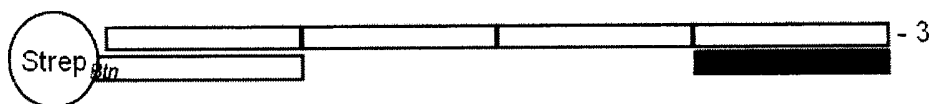
1/1

Obr. 1

1. Hybridizace templátové DNA s poly-T-biotin a miRNA ze vzorku

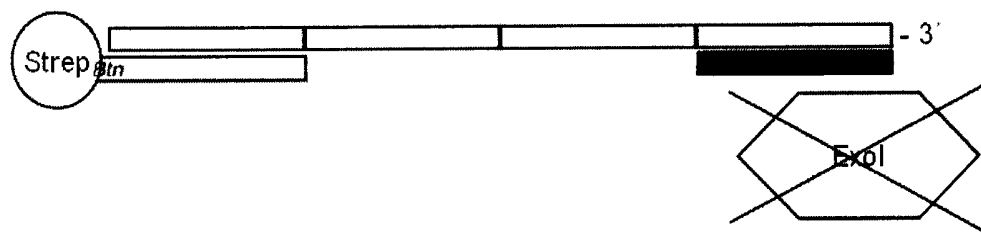


2. Vazba na streptavidin

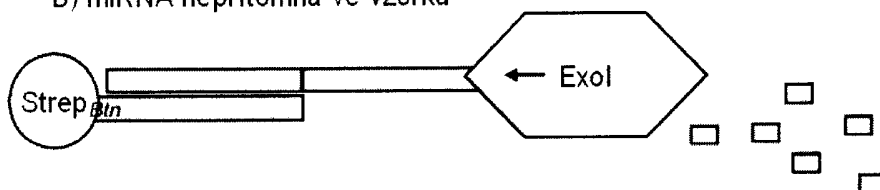


3. Působení exonukleázy I

A) miRNA přítomna ve vzorku



B) miRNA nepřítomna ve vzorku



4. Detekce nedegradované templátové DNA pomocí qRT-PCR

