PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:
282 786

(19)
ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2951-94**
(22) Přihlášeno: **07. 06. 93**
(30) Právo přednosti:
05. 06. 92 GB 92/9211979
(40) Zveřejněno: **13. 09. 95**
(Věstník č. 9/95)
(47) Uděleno: **22. 08. 97**
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **15. 10. 97**
(Věstník č. 10/97)
(86) PCT číslo: **PCT/EP93/01435**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 93/25706**

(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.[6]:
C 12 Q 1/68
C 07 H 21/00

(73) Majitel patentu:
Buchardt Dorte, Vaerlose, DK;
Egholm Michael, Lexington, MA, US;
Nielsen Peter Eigil, Kokkedal, DK;
Berg Rolf Henrik, Fredericksberg, DK;
PNA Diagnostics A/S, Kodaň, DK;

(72) Původce vynálezu:
Buchardt Ole, Vaerlose, DK;
Egholm Michael, Lexington, MA, US;
Nielsen Peter Eigil, Kokkedal, DK;
Berg Rolf Henrik, Fredericksberg, DK;
Stanley Christopher John, Huntingdon, GB;

(74) Zástupce:
Čermák Karel JUDr., Národní 32, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:
Způsob inhibice amplifikace nukleové kyseliny a souprava pro amplifikaci nukleové kyseliny

(57) Anotace:
Způsob inhibice amplifikace nukleové kyseliny, při níž každý řetězec dvouřetězcové cílové nukleové kyseliny obsahuje oblast používanou jako templát pro jeden nebo více primerů, které se prodlužují nebo spojují za vzniku druhého templátu, který je k tomuto templátu komplementární, při němž se do reakční směsi pro amplifikaci zprostředkovanou polymerasou nebo ligasou přidá analog nukleové kyseliny, který je do té míry komplementární k sekvenci tohoto templátu nebo tohoto primeru, že se s tímto templátem nebo primerem hybridizuje, přičemž hybridizace analogu nukleové kyseliny k příslušnému templátu nebo primeru je dostatečně silná, že zabrání hybridizaci primeru s templátem nebo prodloužení primeru nebo připojení primeru za podmínek amplifikace. Souprava pro amplifikaci nukleové kyseliny, která zahrnuje několik primerů, z nichž každý je komplementární k nukleové kyselině, která má být amplifikována, a je schopen prodloužení nebo připojení za použití této nukleové kyseliny jako templátu a alespoň jeden analog nukleové kyseliny, který obsahuje sekvenci, jež je komplementární k sekvenci jednoho z těchto primerů nebo k nukleové kyselině, která nemá být amplifikována.

CZ 282 786 B6

Způsob inhibice amplifikace nukleové kyseliny a souprava pro amplifikaci nukleové kyseliny

Oblast techniky

Vynález se obecně týká způsobu inhibice amplifikace nukleové kyseliny a soupravy pro amplifikaci nukleové kyseliny. Konkrétněji se vynález týká použití analogů nukleové kyseliny při inhibici amplifikace nukleové kyseliny a dále též diagnostických/analytických technik, které jsou založeny na tomto principu.

Dosavadní stav techniky

Ve WO 91/12342 je popsán způsob umožňující vypustit jednu složku reakce PCR z reakční směsi a spustit amplifikaci pozdějším přídavkem této složky. Touto složkou je v podstatě hořečnatá sůl.

Ve WO 92/07957 je popsán způsob amplifikace nukleové kyseliny, při němž reakční směs obsahuje dimethylsulfoxid nebo glycerol, za účelem zvýšení množství produkované nukleové kyseliny získané při amplifikaci.

V publikaci Science, sv. 254, str. 1497 až 1500 je popsáno sekvenčně selektivní rozpoznávání DNA vytěsňováním jednoho řetězce dvouřetězcové nukleové kyseliny analogem nukleové kyseliny, který je substituován thyminem.

V Journal of the American Chemical Society, sv. 114, str. 1895 až 1897 jsou popsány oligonukleotidové analogy označované názvem peptidové nukleové kyseliny, které tvoří hybridy s komplementární DNA.

Ve WO 92/20702 jsou rovněž popisovány peptidové nukleové kyseliny, jakožto oligonukleotidové analogy, které vykazují velmi vysokou afinitu k nukleovým kyselinám.

Technik, které jsou založeny na amplifikaci nukleové kyseliny se v současné době v širokém rozsahu používá. Tyto techniky zahrnují postupy "PCR" (řetězová reakce vyvolaná polymerasou či polymerační reakce), které jsou popsány v EP-A-0200362 a EP-A-0201184. Techniky PCR se používá v největším měřítku, ale používá se i technik "LCR" (řetězová reakce vyvolaná ligasou). Posledně uvedené techniky jsou popsány v EP-A-0320308. Dále se též používá tzv. techniky "NASBA" nebo "3SR", která je popsána v Proc. Natl. Acad. Sci. USA, sv. 87, str. 1874 až 1878 (březen 1990) a v Nature, sv. 350, č. 6 313, str. 91 až 92 (7. března 1991).

Hlavním problémem při používání těchto postupů v diagnostice je vznik falešných pozitivních výsledků, k němuž dochází přenášením amplifikovaných sekvencí nukleové kyseliny z předchozích reakcí. Jelikož při těchto postupech mohou vzniknout pozitivní výsledky i v tom případě, že je přítomna pouze jediná molekula obsahující cílovou sekvenci, mohou se takové falešné pozitivní výsledky vyskytovat velmi snadno. V současné době je nutné zpracovávat reakční produkt z takových postupů před tím, než lze zjistit, zda amplifikační postup proběhl úspěšně nebo ne. Přitom se reakční produkt dostává do styku s několika kusy laboratorního zařízení, jako jsou pipety, a také s obsluhou, což může vést k tomu, že produkt amplifikace se dostane jako nečistota do následných pokusů.

V současné době se velká snaha zaměřuje na vývoj tzv. "uzavřených" postupů, při nichž je možno sledovat úspěšnost amplifikační reakce, aniž by bylo nutno jakkoliv manipulovat s produktem amplifikace a otvírat reakční nádobu.

Nové formy analogů nukleové kyseliny jsou popsány v přihlášce PCT/EP92/01220, podané 22. května 1992. Tyto formy selektivně vážou nukleové kyseliny s komplementární sekvencí za vzniku hybridů, které jsou stálejší proti dehybridizaci teplem, než podobné hybridy mezi konvenčními nukleovými kyselinami. Nyní se v souvislosti s vynálezem zjistilo, že této vyšší stability hybridu je možno využít k selektivnímu blokování postupů amplifikace nukleové kyseliny. Této techniky je možno použít k tomu, aby se zabránilo vzniku falešných pozitivních výsledků při takových amplifikačních postupech. Také je možno jí využít jako podstatné části určitých diagnostických/analytických postupů.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob inhibice amplifikace nukleové kyseliny, při níž každý řetězec dvouřetězcové cílové nukleové kyseliny obsahuje oblast používanou jako templát pro jeden nebo více primerů, které se prodlužují nebo spojují za vzniku druhého templátu, který je k tomuto templátu komplementární, jehož podstata spočívá v tom, že se do reakční směsi pro amplifikaci zprostředkovanou polymerasou nebo ligasou přidá analog nukleové kyseliny, který je do té míry komplementární k sekvenci tohoto templátu nebo tohoto primeru, že se s tímto templátem nebo primerem hybridizuje, přičemž hybridizace analogu nukleové kyseliny k příslušnému templátu nebo primeru je dostatečně silná, že zabrání hybridizaci primeru s templátem nebo prodloužení primeru nebo připojení primeru za podmínek amplifikace.

Tento aspekt vynálezu zahrnuje tedy způsob inhibice amplifikace nukleové kyseliny, při níž každý řetězec dvouřetězcové cílové nukleové kyseliny obsahuje oblast používanou jako templát pro jeden nebo více primerů, které se prodlužují nebo spojují za vzniku druhého templátu, který je k tomuto templátu komplementární, jehož podstata spočívá v tom, že amplifikace se provádí za přítomnosti analogu nukleové kyseliny, který je do té míry komplementární k sekvenci tohoto templátu nebo tohoto primeru, že se s tímto templátem nebo primerem hybridizuje, přičemž hybridizace analogu nukleové kyseliny k příslušnému templátu nebo primeru je dostatečně silná, že zabrání hybridizaci primeru s templátem nebo prodloužení primeru nebo připojení primeru za podmínek amplifikace.

Dále je předmětem vynálezu také souprava pro amplifikaci nukleové kyseliny, jejíž podstata spočívá v tom, že zahrnuje několik primerů, z nichž každý je komplementární k nukleové kyselině, která má být amplifikována, a je schopen prodloužení nebo připojení za použití této nukleové kyseliny jako templátu a alespoň jeden analog nukleové kyseliny, který obsahuje sekvenci, jež je komplementární k sekvenci jednoho z těchto primerů nebo k nukleové kyselině, která nemá být amplifikována.

Pod pojmem "amplifikace" se rozumí postup PCR, LCR nebo 3SR. Postup PCR přitom zahrnuje i zakotvené ("anchored") a obrácené ("inverted") postupy.

Dvouřetězcová cílová nukleová kyselina, která v každém řetězci obsahuje oblast působící jako templát, nemusí být nutně výchozí látkou, ani nemusí být nutně přímým cílem požadované amplifikace při tomto postupu.

Při PCR je dvouřetězcová cílová nukleová kyselina obvykle součástí výchozí látky a obvykle je žádoucí amplifikace alespoň jednoho jejího řetězce. PCR reakci je však možno zahájit jen s jedním řetězcem DNA, přičemž komplementární řetězec se vyrobí v prvním cyklu prodlužování primeru. V dalších cyklech se dvouřetězcová cílová nukleová kyselina bude skládat převážně z produktů z přechozích cyklů.

Podobně při LCR je dvouřetězcová cílová nukleová kyselina obvykle součástí výchozí látky a v pozdějších cyklech tvoří převážně produkt amplifikace.

Není nutno, aby se primery hybridizovaly ke každému řetězci ve stejné části amplifikačního cyklu, tak je tomu teprve po vytvoření dvouřetězcové cílové nukleové kyseliny. Při technice 3SR se tedy řetězec výchozí RNA hybridizuje k prvnímu primeru, který se prodlouží jako komplementární řetězec DNA působením reverzní transkriptasy za vzniku dvouřetězcové cílové nukleové kyseliny. Po destrukci hybridizovaného řetězce RNA působením RNasy H se k tomuto řetězci DNA hybridizuje druhý primer a prodlouží se reverzní transkriptasou za vzniku dvouřetězcové molekuly DNA. Do tohoto stadia se tedy ve své době oba řetězce přítomné v DNA/RNA hybridizují k primeru, který je potom prodloužen.

První primer je zkonstruován tak, že produkt DNA/DNA zahrnuje promotor pro RNA polymerasu, jako T7 RNA polymerasu, která za použití produktu DNA/DNA, jako templátu, vyrobí několik kopií RNA odpovídajících výchozí RNA, z nichž každá se postupně stane výchozí látkou pro první primer a reverzní transkriptasu na něj působící.

Tento amplifikační postup se může provádět za nepřítomnosti výše uvedeného analogu nukleové kyseliny, aby se vytvořila požadovaná hladina amplifikačního produktu a analog nukleové kyseliny se může přidat teprve poté.

Analog nukleové kyseliny se přednostně hybridizuje k produktu amplifikace. Tím ukončí amplifikaci a ponechá produkty ve formě stabilních hybridů nukleová kyselina - analog nukleové kyseliny, které nejsou schopny působit jako templáty, když kontaminují následující reakci. Tím se stanou "otevřené" postupy (na rozdíl od "uzavřených" postupů) bezpečnými proti přenosu kontaminace.

Alternativně nebo přídavně je možno postupovat tak, že se zařízení používané pro amplifikační postup výše uvedeného typu ošetří roztokem obsahujícím takový analog nukleové kyseliny, aby došlo k hybridizaci tohoto analogu s jakýmkoliv amplifikačním produktem, který může být přítomen jako nečistota, potom se toto zařízení promyje a použije se ho při amplifikaci, přičemž hybridizací k tomuto analogu se zabrání, aby při amplifikačním postupu došlo k amplifikaci jakéhokoliv amplifikačního produktu, který je zpočátku v tomto zařízení přítomný jako nečistota.

Předmětem vynálezu je tedy také způsob zabránění produktu amplifikace nukleové kyseliny, aby sloužil jako templát při následném amplifikačním postupu, jehož podstata spočívá v tom, že se k tomuto produktu amplifikace nukleové kyseliny hybridizuje analog nukleové kyseliny, který s ním vytvoří hybrid stálý za podmínek následné amplifikace.

Dále je předmětem vynálezu také způsob zabránění jakémukoliv produktu amplifikace nukleové kyseliny, který může být přítomen v prostředí, aby sloužil jako kontaminační templát při následném postupu amplifikace nukleové kyseliny, jehož podstata spočívá v tom, že se prostředí ošetří analogem nukleové kyseliny, který s tímto produktem amplifikace vytvoří hybrid stálý za podmínek následné amplifikace.

V praxi se může postupovat tak, že se celé zařízení nebo jeho část používaná při amplifikačním postupu omyje roztokem obsahujícím analog nukleové kyseliny, například hybridizačním pufru, aby se vytvořil stabilní hybrid mezi tímto analogem a jakoukoliv přítomnou nukleovou kyselinou, která obsahuje cílovou sekvenci pro amplifikaci. Hybrid vytvořený s analogem nukleové kyseliny je dostatečně stálý, aby vydržel podmínky následného amplifikačního postupu, a tím se kontaminační cílové sekvenci zabrání zúčastnit se amplifikačního postupu a způsobit tak vznik falešného pozitivního výsledku.

Analog nukleové kyseliny pro použití při tomto a jiných aspektech vynálezu přednostně obsahuje 5 až 20, například 10 až 15, ligandů vázajících nukleové báze.

Může se připravit analog nukleové kyseliny, který je vytvořen "na míru" pro zastavení amplifikace specifické sekvence nukleové kyseliny, nebo se může připravit reakční činidlo obsahující směs sekvencí analogických nukleovým kyselinám, přičemž v tomto druhém případě dojde k zastavení řady různých amplifikací. Reakční činidlo pro tento druhý případ přednostně obsahuje větší počet sekvencí. V extrémním případě je možno syntetizovat analogy nukleové kyseliny za použití směsi monomerních synthonů (zahrnující ligandy, které jsou komplementární ke každé ze čtyř bází DNA) v každém stupni, za účelem konstrukce molekul, z nichž každá obsahuje statistickou sekvenci ligandů. Dostatečné množství takového reakčního činidla by mělo obsahovat dostatečný počet molekul komplementárních k jakémukoliv amplifikačnímu produktu, takže dojde k inhibici jakékoliv amplifikace.

Každá molekula analogu nukleové kyseliny takového reakčního činidla bude obvykle přednostně alespoň 10–merem, s výhodou alespoň 12–merem, například 15– až 20–merem.

Selektivní inhibice amplifikačních postupů může být aktivněji uvedena do provozu jako součást diagnostického postupu.

Pokud se v současné době používá takových metod, jako je PCR, pro amplifikaci sekvence, za účelem zjištění, zda je přítomna určitá konkrétní sekvence, například sekvence, která se od alternativní sekvence liší výměnou jedné báze (například v případě mutace jedné báze v "normální" sekvenci genu), je detekce takové sekvence v amplifikačním produktu velmi pracná. Tato detekce zahrnuje sekvenování celého produktu za účelem prověření přítomnosti změněné báze a také detekci pozměněného složení štěpných produktů vytvořených jedním nebo více restrikčními enzymy, v případě, že změna nebo změny v sekvenci genu ovlivnily restrikční místa. Dále tato detekce zahrnuje také hybridizaci značené próby nukleové kyseliny pro mutovanou sekvenci k tomuto produktu za podmínek, které jsou dostatečně stringentní, aby došlo k diferenciaci mezi možnými sekvencemi.

Když se zkonstruuje analog nukleové kyseliny, který je schopen vytvořit stabilní hybrid s cílovou sekvencí PCR pouze v tom případě, že je přítomna mutace, a tento analog se přidá ke vzorku nukleové kyseliny za hybridizačních podmínek, může se selektivně inhibovat PCR reakce, aby nedošlo k exponenciální amplifikaci sekvence obsahující mutaci. Tento princip je možno rozšířit také na jiné amplifikační metody.

Předmětem vynálezu je tedy dále také způsob detekce přítomnosti nebo nepřítomnosti cílové sekvence nukleové kyseliny, při němž se každý řetězec dvouřetězcové nukleové kyseliny obsahující oblast používanou jako templát, včetně té části nukleové kyseliny, ve které je popřípadě přítomna cílová sekvence, amplifikuje hybridizací jednoho nebo více primerů k templátu a prodloužením nebo vazbou těchto primerů za vzniku druhého templátu, který je komplementární k tomuto templátu, jehož podstata spočívá v tom, že se amplifikace provádí za přítomnosti analogu nukleové kyseliny, který je komplementární k cílové sekvenci a hybridizuje se s tímto templátem dostatečně silně, takže dojde k inhibici amplifikace, jen v tom případě, že je cílová sekvence přítomna.

Pokud je analog nukleové kyseliny přítomen v průběhu amplifikační reakce, bude amplifikace druhého řetězce cílové sekvence lineární, a nikoliv exponenciální, takže nevznikne podstatné množství amplifikačního produktu.

Přítomnost cílové sekvence je tedy možno dedukovat z toho, že amplifikační reakce, kterou může být PCR, LCR nebo 3SR, neprobíhá v takovém rozsahu, že by to mělo za následek vznik

podstatné koncentrace produktu. Reakční produkt je například možno zkoušet na gelu a okolnost, že nevznikne pás, bude ukazovat na přítomnost cílové sekvence.

V takovém případě je vhodné zahrnout do systému vnitřní kontrolní prvek, který by vyloučil, že k reakci nedošlo z nějakého jiného důvodu. Jako tento kontrolní prvek může sloužit přednostně druhý substrát nukleové kyseliny, který je schopen amplifikace tímto amplifikačním postupem za použití stejných primerů a jehož amplifikací vzniká produkt, který se liší od produktu amplifikace cílové sekvence.

Tímto způsobem lze postup provádět za účelem detekce přítomnosti určité báze na určitém místě, například za účelem demonstrace přítomnosti mutace jediné specifické báze. Může se provést řada takových analýz paralelně nebo za sebou pro identifikaci, která z řady možných mutací (pokud k nějaké mutaci došlo) je přítomna v oblasti genu tak, že se při každé analýze použije analogu nukleové kyseliny, který je vytvořen "na míru" pro určitou specifickou mutaci.

V případě mutace obecnější sekvence, může být mutace "normální" sekvence považována za cílovou sekvenci nukleové kyseliny. Je-li tedy analog nukleové kyseliny komplementární k mutované sekvenci, ukazuje nepřítomnost amplifikace, že je mutace přítomna. Alternativně se může použít analogu nukleové kyseliny, který je komplementární k "normální" sekvenci, a v tomto případě ukazuje nepřítomnost amplifikace, že je přítomna "normální" sekvence. Když naopak dojde k úspěšné amplifikaci, ukazuje to, že je přítomna nespecifická mutace, tedy že "normální" sekvence není přítomna.

Přestože bylo zjištěno, že analogy nukleové kyseliny, jako jsou PNA, mohou inhibovat amplifikační PCR reakci, ať již je PNA orientována na hybridizaci s vazebným místem PCR primeru, nebo s nukleotidovou sekvencí v templátu, která se v podstatě z vazebného místa primeru odstraní, neznamená to, že volba DNA/PNA hybridizačního místa není důležitá. Obvykle platí, že úroveň afinity mezi PNA a DNA templátem, které je zapotřebí pro zastavení reakce PCR, je poněkud nižší, když se PNA hybridizuje k vazebnému místu primeru nebo blízko tohoto místa. Tuto afinitu je možno jemně naladit vhodnou volbou délky sekvence PNA, při níž se bere v úvahu konkrétně přítomná sekvence bází. Homopyrimidinové oblasti vážou nejsilněji.

Je tedy možné volit podmínky tak, že dvě reakce PCR je možno provádět na jednom templátu současně, přičemž jedné z nich, která není rušena přítomností vhodné PNA inhibující druhou, se používá jako kontrolní. Když se tedy použije jednoho forwardového primeru v kombinaci se dvěma odlišnými reverzními primery, z nichž jeden vytváří delší, a druhý kratší amplifikační produkt, může se PNA orientovat k vazebnému místu primeru produkujícího kratší produkt, nebo do blízkosti tohoto místa. Při uvážlivé volbě afinity PNA se tak může zabránit PCR reakci kratšího produktu, aniž by se současně inhibovala PCR reakce delšího produktu. Pokud hybridizační místo PNA obsahuje mutaci v jednom bázovém páru, která má být detegována, je možno uspořádat věci tak, že když je mutace přítomna, dojde k vazbě PNA a vznikne pouze jeden PCR produkt, zatímco není-li mutace přítomna, neváže PNA dostatečně silné DNA, aby to inhibovalo PCR reakci kratšího produktu a vznikne jak delší, tak kratší produkt. Neúčinně inhibovaná PCR reakce delšího produktu tak působí jako vnitřní kontrolní mechanismus ověřující použití vhodných podmínek při zkoušce na přítomnost nebo nepřítomnost mutace.

Předmětem vynálezu je také způsob, kterým se postupně zjišťuje přítomnost nebo nepřítomnost každé z několika sekvencí v cílové sekvenci nukleové kyseliny, jehož podstata spočívá v tom, že se provede série PCR amplifikačních postupů za použití stejného primeru nebo primerů, přičemž každý z těchto postupů se provádí za přítomnosti příslušného analogu nukleové kyseliny, který je komplemenární k příslušné jedné z několika sekvencí, přičemž mezi analogem nukleové kyseliny a příslušnou sekvencí dojde k hybridizaci a amplifikační postup je tedy inhibován pouze v případě, že je příslušná sekvence přítomna.

Je-li tedy dána cílová sekvence obsahující dvojici ve vzájemném odstupu uspořádaných vazebných míst PCR primeru, jednu v každém řetězci, může se zjistit, zda se mezi těmito místy vyskytuje v jednom řetězci určitá konkrétní sekvence tak, že se k systému přidá analog nukleové kyseliny, který je schopen vazby k této konkrétní sekvenci za vzniku hybridu, který je stálý za podmínek PCR a inhibuje exponenciální amplifikaci. Tohoto principu je možno účelně použít pro zjištění, které z několika možných sekvencí jsou za sebou přítomny v oblasti nukleové kyseliny v rámci genu nebo v rámci větší oblasti, jako shluku genů. Tak například v Escherichia coli je až 30 genů soustředěno v krátké genetické oblasti určující rezistenci vůči antibiotikům. Pro stanovení, které z možných genů způsobujících rezistenci vůči konkrétním antibiotikům jsou přítomny v určitém organismu, by bylo za normálních okolností nutno vyvinout PCR primery pro každý hledaný gen.

Za použití analogů nukleové kyseliny pro selektivní inhibici PCR je možno určit přítomné geny pomocí jediné dvojice primerů, které lemují celou oblast. Pro každou genovou sekvenci, která má být indentifikována, se zkonstruují sekvenčně specifické analogy nukleové kyseliny komplementární k oběma řetězcům, a učiní se pokus o PCR reakci, postupně za přítomnosti každého z analogů nukleové kyseliny. Pokud je v nukleové kyselině přítomna sekvence, s níž se zkoušený analog hybridizuje, je PCR reakce inhibována. Pokud by se mělo použít konvenční PCR reakce, bylo by nutno mít k dispozici dvojici primerů specifických pro každou zkoumanou sekvenci. Pro každou dvojici primerů by bylo nutno optimalizovat podmínky amplifikace variacemi řady parametrů. Vzhledem k tomu, že analogy nukleové kyseliny takového typu, jaký je popsán ve výše citované přihlášce PCT, se snadno syntetizují s požadovanými sekvencemi, je možno se vyhnout obtížím vyplývajícím z nutnosti připravovat velký počet různých PCR primerů a vyvíjet amplifikační postupy, které by byly vhodné pro každou kombinaci dvojice primerů.

Předmětem vynálezu je dále způsob inhibice polymerasou zprostředkovaného prodlužování primeru hybridizovaného k templátu nukleové kyseliny, jehož podstata spočívá v tom, že se k systému přidá za hybridizačních podmínek analog nukleové kyseliny, který vytváří stabilní hybrid s primerem nebo s templátem v místě primeru nebo za místem primeru.

Pokud se má produkt amplifikačního postupu sekvenovat nebo detegovat a identifikovat pomocí próby se značeným oligonukleotidem, bude obvykle nutno ho získat v jednořetězcové formě. Komplementární řetězec bude obvykle přítomen ve stejném množství a řetězce budou mít tendenci k rekombinaci. Je proto žádoucí provádět PCR reakce takovým způsobem, aby převážně vznikal jeden z řetězců produktu (asymetrická PCR). V současné době se tohoto cíle dosahuje tak, že se používá jednoho primeru ve větším množství než druhého. Za ideálních podmínek dochází k exponenciální produkci požadované sekvence tak dlouho, dokud se jeden primer nevyčerpá a potom probíhá lineární amplifikace. Vzhledem k nestejným koncentracím primeru, které ovlivňují počáteční stadia reakce, vzniká často problém v tom, že postup PCR není řádně zahájen.

Proto je předmětem vynálezu dále také způsob provádění asymetrického postupu amplifikace nukleové kyseliny, při němž každý řetězec dvouřetězcové cílové nukleové kyseliny obsahuje oblast používanou jako templát pro primer, který se prodlužuje za vzniku druhého templátu komplementárního k tomuto templátu, jehož podstata spočívá v tom, že se po několika cyklech amplifikace do systému přidá analog nukleové kyseliny, který se hybridizuje k jednomu z primerů dostatečně silně, aby inhiboval hybridizaci tohoto primeru k jeho cíli za podmínek reakce a dále se provede několik dalších cyklů tohoto postupu.

Přednostním amplifikačním postupem je PCR.

Vynález zahrnuje provádění asymetrické amplifikace výše popsaným způsobem a následnou detekci nebo sekvenování produktu této amplifikace.

Koncentrace PNA v průběhu zkoušené PCR nebo jiné amplifikační reakce je přednostně vyšší než 0,5 μM, s výhodou vyšší než 2,0 μmM, ještě výhodněji vyšší než 3 μM a leží například v rozmezí od 3 do 15 μM koncentrace.

Analogem nukleové kyseliny, kterého se používá při všech výše uvedených aspektech vynálezu, je přednostně peptidová nukleová kyselina (PNA), která se skládá z polyamidového hlavního řetězce nesoucího několik ligandů na místech lokalizovaných ve vzájemném odstupu podél tohoto hlavního řetězce, přičemž těmito ligandy jsou vždy nezávisle v přírodě se vyskytující nukleobáze, nukleobáze, které se v přírodě nevyskytují nebo skupiny vázající nukleobáze, každý takový ligand je vázán přímo nebo nepřímo k dusíkovému atomu hlavního řetězce a atomy dusíku nesoucí tyto ligandy jsou od sebe v hlavním řetězci z hlavní části odděleny 4 až 8 intervenujícími atomy. Obecně se však může jednat o jakýkoliv analog nukleové kyseliny, který je schopen se hybridizovat k nukleové kyselině s komplementární sekvencí za vzniku hybridu, který je stálejší vůči denaturaci teplem, než hybrid mezi konvenčním deoxyribonukleotidem odpovídajícím tomuto analogu a touto nukleovou kyselinou. Přednostně se jedná o analog nukleové kyseliny, který je schopen se hybridizovat k dvouřetězcové nukleové kyselině, v níž má jeden řetězec komplementární sekvenci vůči tomuto analogu, aby tak došlo k vytěsnění druhého řetězce.

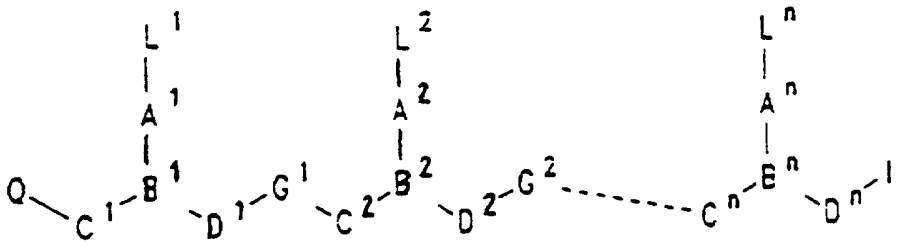
Nosičové dusíkové atomy v hlavním řetězci peptidové nukleové kyseliny definované výše (PNA) jsou od sebe přednostně odděleny 5 atomy. Zjistilo se, že u analogů nukleové kyseliny obecného vzorce I (uvedeného dále) se v takovém případě dosahuje nejsilnější afinity k DNA. V některých případech však může být žádoucí snížit pevnost vazby mezi PNA a DNA tím, že odstup u jednoho nebo více ligandů je méně než optimální. Toho se dosahuje například tím, že odstup zahrnuje více než 5, například až 14 nebo více atomů.

V přednostním provedení není meziligandový odstup z více než 25 % větší než 6 atomů nebo více. V ještě výhodnějším provedení není meziligandový odstup větší než 6 atomů nebo více z více než 10 % až 15 %. Aza-dusíkové atomy nesoucí liqandy (přímo nebo prostřednictvím spojovníků) se samy nepočítají do výše uvedeného odstupu.

Alternativní nebo přídavná metoda snižování pevnosti DNA vazby spočívá ve vynechání některých ligandů, přičemž na jejich místo se vloží skupiny, které přispívají jen málo nebo vůbec nepřispívají k vazbě DNA, jako je například vodík. V přednostním provedení není více než 25 %, například ne více než 10 až 15 %, poloh ligandů obsazeno nevazebnými skupinami.

Reprezentativní ligandy zahrnují buď 4 hlavní přírodní báze DNA (tj. thymin, cytosin, adenin nebo guanin), nebo jiné přírodní nukleobáze (například inosin, uracil, 5–methylcytosin nebo thiouracil) nebo umělé báze (například bromulacin, azaadeniny nebo azaguaniny atd.), které jsou připojeny k hlavnímu řetězci peptidu prostřednictvím vhodného spojovníku.

V přednostním provedení mají analogy nukleové kyseliny používané podle vynálezu strukturu odpovídající obecnému vzorci I

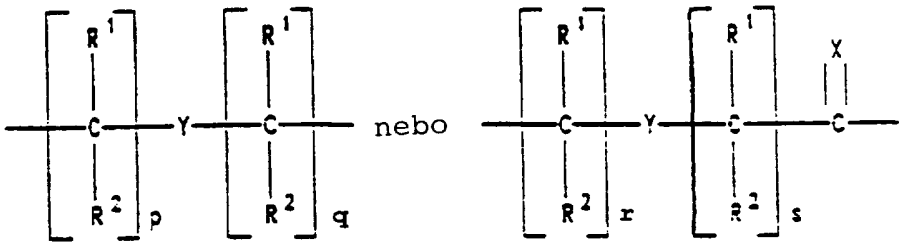


(I)

kde n představuje číslo s hodnotou alespoň 2;

každý ze symbolů L^1 až L^n nezávisle představuje skupinu zvolenou ze souboru zahrnujícího vodík, hydroxyskupinu, alkanoylskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, nukleobáze vyskytující se v přírodě, nukleobáze, které se v přírodě nevyskytují, aromatické zbytky, interkalátory DNA, vazebné skupiny pro nukleobáze a reporterové ligandy, přičemž alespoň jeden ze symbolů L^1 až L^n představuje nukleobázi vyskytující se v přírodě, nukleobázi, která se v přírodě nevyskytuje, interkalátor DNA nebo vazebnou skupinu pro nukleobázi;

každý ze symbolů A^1 až A^n představuje jednoduchou vazbu, methylenovou skupinu nebo skupinu obecného vzorce IIa nebo IIb



(IIa) (IIb)

kde

X představuje atom kyslíku, síry nebo selenu nebo skupinu vzorce NR^3, CH_2 nebo $C(CH_3)_2$;

Y představuje jednoduchou vazbu, atom kyslíku nebo atom síry nebo skupinu vzorce NR^4;

p a q představuje vždy celé číslo s hodnotou od 1 do 5, přičemž součet p + q nemá hodnotu vyšší než 10;

r a s představuje vždy číslo 0 nebo celé číslo s hodnotou od 1 do 5, přičemž součet r + s nemá hodnotu vyšší než 10;

R^1 a R^2 nezávisle představuje vždy atom vodíku, alkylskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, která je popřípadě substituována hydroxyskupinou, alkoxyskupinou nebo alkylthioskupinou, hydroxyskupinu, alkoxyskupinu, alkylthioskupinu, aminoskupinu nebo halogen;

R^3 a R^4 nezávisle představuje vždy atom vodíku, alkylskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, alkylskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, která je substituována hydroxyskupinou, alkoxyskupinou nebo alkylthioskupinou, hydroxyskupinu, alkoxyskupinu, alkylthioskupinu nebo aminoskupinu;

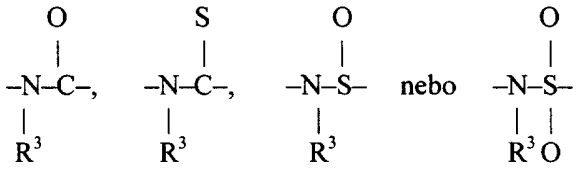
každý ze symbolů B^1 až B^n představuje atom dusíku nebo skupinu vzorce R^3N^+, kde R^3 má výše uvedený význam;

každý ze symbolů C^1 až C^n představuje skupinu vzorce CR^6R^7, CHR^6R^7 nebo $CR^6R^7CH_2$, kde R^6 znamená atom vodíku a R^7 představuje skupinu zvolenou ze souboru zahrnujícího postranní řetězce α-aminokyselin vyskytujících se v přírodě nebo každý ze symbolů R^6 a R^7 nezávisle představuje skupinu zvolenou ze souboru zahrnujícího atom vodíku, alkylskupinu se 2 až 6 atomy uhlíku, arylskupinu, aralkylskupinu, heteroarylskupinu, hydroxyskupinu, alkoxyskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, alkylthioskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, skupinu obecného vzorce NR^3R^4 nebo SR^5, kde R^3 a R^4 mají výše uvedený význam a R^5 představuje atom vodíku, alkylskupinu

s 1 až 6 atomy uhlíku nebo alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, která je substituována hydroxyskupinou, alkoxyskupinou nebo alkylthioskupinou nebo R^6 a R^7 dohromady doplňují alicyklický nebo heterocyklický systém;

každý ze symbolů D^1 až D^n představuje skupinu obecného vzorce CR^6R^7, $CH_2CR^6R^7$ nebo CHR^6CHR^7, kde R^6 a R^7 mají výše uvedený význam;

každý ze symbolů G^1 až G^{n-1} představuje skupinu obecného vzorce



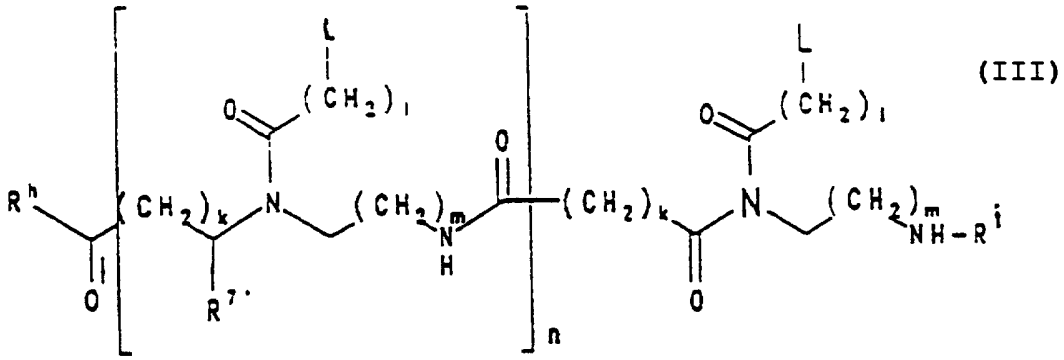
v libovolné orientaci, kde R^3 má výše uvedený význam;

Q představuje skupinu vzorce $-CO_2H$, $-CONR'R''$, $-SO_3H$ nebo $-SO_2NR'R''$ nebo aktivovaný derivát skupiny vzorce $-CO_2H$ nebo $-SO_3H$;

I představuje skupinu obecného vzorce $-NHR'''R''''$ nebo $-NR'''C(O)R''''$, kde R', R'', R''' a R'''' nezávisle představuje vždy skupinu zvolenou ze souboru zahrnujícího atom vodíku, alkylskupiny, chránicí skupiny aminoskupiny, reporterové ligandy, interkalátory, chelátory, peptidy, proteiny, uhlohydráty, lipidy, steroidy, oligonukleotidy a rozpustné a nerozpustné polymery.

C a D může alternativně představovat skupinu obecného vzorce $CHR^6(CH_2)_SCHR^7$, kde S znamená číslo s hodnotou od 0 do l.

Přednostní peptidové nukleové kyseliny mají strukturu odpovídající obecnému vzorci III



(III)

L nezávisle představuje vždy skupinu zvolenou ze souboru zahrnujícího atom vodíku, fenylskupinu, heterocyklické skupiny, které například obsahují 1, 2 nebo 3 kruhy, nukleobáze vyskytující se v přírodě a nukleobáze, které se v přírodě nevyskytují;

$R^{7'}$ nezávisle představuje vždy skupinu zvolenou ze souboru zahrnujícího atom vodíku a postranní řetězce v přírodě se vyskytujících α-aminokyselin;

n představuje celé číslo s hodnotou od 1 do 60;

k, l a m nezávisle představuje vždy číslo 0 nebo číslo s hodnotou od 1 do 5, přičemž součet k + m má přednostně hodnotu 1 nebo 2 a nejvýhodněji hodnotu 1;

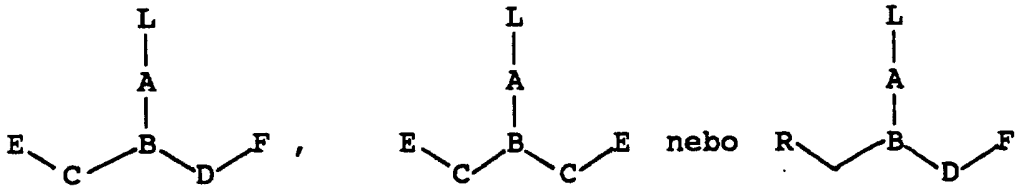
R^h představuje hydroxyskupinu, aminoskupinu nebo skupinu vzorce -NHLysNH$_2$; a

R^i představuje atom vodíku nebo skupinu vzorce $COCH_3$.

Obzvláštní přednost se dává sloučeninám obecného vzorce III, kde L nezávisle představuje vždy skupinu zvolenou ze souboru zahrnujícího nukleobáze thymin (T), adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a uracil (U), zejména thymin a n znamená celé číslo s hodnotou od 1 do 30, s výhodou od 4 do 20.

Peptidové nukleové kyseliny podle vynálezu je možno syntetizovat vhodně adaptovanými standardními postupy pro syntézu peptidů, prováděnými v roztoku nebo v tuhé fázi. Jako synthonů se může používat speciálně zkonstruovaných monomerních aminokyselin nebo jejich aktivovaných derivátů, které jsou chráněny standardními chránicími skupinami. Analogy oligonukleotidů je také možno syntetizovat za použití odpovídajících dvojsytných kyselin a diaminů.

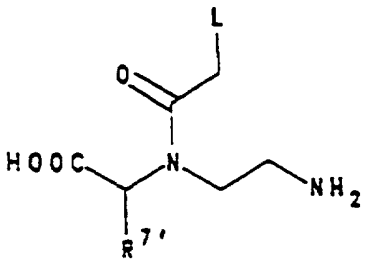
Monomerní synthony používané pro výrobu sloučenin vhodných pro tento vynález je tedy možno volit ze souboru zahrnujícího aminokyseliny, dvojsytné kyseliny a diaminy obecného vzorce IV, V nebo VI



(IV) (V) (VI)

kde L, A, B, C a D mají výše uvedený význam, pouze s tím rozdílem, že každá aminoskupina v nich obsažená je popřípadě chráněna chránicí skupinou aminoskupiny; E představuje skupinu vzorce COOH, CSOH, SOOH, SO_2OH nebo aktivovaný derivát takové skupiny; a F představuje skupinu obecného vzorce NHR^3 nebo $NPgR^3$, kde R^3 má výše uvedený význam a Pg představuje chránicí skupinu aminoskupiny.

Přednostními monomerními synthony jsou aminokyseliny obecného vzorce VII



(VII)

nebo jejich deriváty s chráněnou aminoskupinou a/nebo aktivovanou terminální karboxyskupinou, kde L představuje skupinu zvolenou ze souboru zahrnujícího atom vodíku, fenylskupinu, heterocyklické skupiny, nukleobáze vyskytující se v přírodě, nukleobáze, které se v přírodě nevyskytují a jejich chráněné deriváty; a $R^{7'}$ představuje nezávisle vždy skupinu zvolenou ze souboru zahrnujícího atom vodíku a postranní řetězce v přírodě se vyskytujících α-aminokyselin. Obzvláštní přednost se dává synthonům obecného vzorce (4), kde $R^{7'}$, představuje atom vodíku a L nezávisle představuje vždy skupinu zvolenou ze souboru

zahrnujícího nukleobáze thymin (T), adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a uracil (U) a jejich chráněné deriváty.

Výroba takových peptidových nukleových kyselin (PNA) je podrobně popsána ve výše citované patentové přihlášce PCT/EP92/01220.

Předmětem vynálezu je také souprava pro použití k provádění amplifikační reakce nukleové kyseliny, jejíž podstata spočívá v tom, že zahrnuje několik primerů pro tuto amplifikaci a alespoň jeden analog nukleové kyseliny, který obsahuje sekvenci, jež je komplementární k sekvenci obsažené v jednom z primerů nebo k cílové sekvenci nukleové kyseliny, která má být za použití primerů při amplifikační reakci amplifikována.

Tato souprava může dále obsahovat polymerasu nebo ligasu pro použití při amplifikační reakci, při níž dochází k prodloužení nebo ligaci primerů. Tak například může souprava obsahovat DNA polymerasu, jako Taq polymerasu.

Pokud se má soupravy používat při postupu typu "3SR", může dále obsahovat alespoň jeden enzym ze souboru zahrnujícího reverzní transkriptasu, RNA polymerasu a nukleasu, jako RNasu H.

Obvykle budou takové soupravy obsahovat dále též nukleotidy (alespoň některý nebo všechny ze souboru zahrnujícího dTTP, dCTP, dATP a dGTP), z nichž alespoň jeden může být značen jakýmkoliv známým nebo vhodným způsobem, například radiokativním značením. V soupravě mohou být také obsažena reakční činidla pro detekci značených látek. Dále mohou soupravy obsahovat také jeden nebo více pufrů, solí, stabilizačních činidel a činidel pro rozpoznávání nukleových kyselin. Může se jednat o činidla rozeznávající specifické sekvence nebo činidla rozpoznávající nukleové kyseliny sekvenčně nespecifickým způsobem. Jako příklad činidel z první z výše uvedených skupin je možno uvést oligonukleotidy nebo analogy nukleové kyseliny typu PNA, popřípadě nesoucí detegovatelné značky. Jako příklad činidel z druhé skupiny je možno uvést protilátky vůči nukleovým kyselinám.

Jako vhodné značení pro použití v souvislosti s vynálezem je možno uvést značení radioizotopy, značení enzymy, značení biotinem, spinové značení, značení fluorofory, značení chemiluminiscenčními látkami, značení antigeny a značení protilátkami.

Soupravy mohou dále obsahovat reakční činidla pro provedení pozitivního kontrolního experimentu. Tato činidla zahrnují templát pro amplifikaci za použití připojených primerů, při jehož amplifikaci vzniká odlišný produkt od produktu amplifikace nukleové kyseliny.

Souprava může dále obsahovat též reakční činidla pro sekvenování amplifikačního produktu nukleové kyseliny, například polymerasu, jako Taq polymerasu a jeden nebo více dideoxynukleotidů.

V následujících příkladech mají všechny peptidové nukleové kyseliny (PNA) hlavní řetězec odvozený od monomerního synthonu obecného vzorce VII, přičemž v každém případě každý ze symbolů L představuje jednu z v přírodě se vyskytujících nukleobází, které jsou obvyklým způsobem označeny symboly A, C, G nebo T. Použitá nomenklatura je shodná s nomenklaturou podle výše citované přihlášky PCT/EP92/01220. Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech konkrétního provedení, ve kterých se používá odkazů na připojené výkresy.

Přehled obr. na výkresech

Na obr. 1 je znázorněna autoradiografie gelu ukazující inhibici polymerasou zprostředkovaného prodloužení primeru působením PNA.

Na obr. 2 je znázorněn ethidiumbromidový gel ukazující selektivní inhibici PCR reakcí působením různých PNA, diskriminujících mezi sekvencemi, které se liší o jeden pár bází.

Na obr. 3 je znázorněn ethidiumbromidový gel ukazující další příklad inhibice PCR působením PNA.

Na obr. 4 je znázorněn ethidiumbromidový gel ukazující inhibici PCR působením PNA zaměřenou na místa PCR templátu, která se překrývají s cílovým místem primeru nebo která jsou od sebe v různé míře oddělena.

Na obr. 5 je znázorněn ethidiumbromidový gel ukazující úplnou inhibici PCR reakce působením PNA, která je komplementární k jednomu primeru.

Na obr. 6 je znázorněn ethidiumbromidový gel ukazující výsledek z příkladu 6, který dále ilustruje inhibici PCR zaměřenou na identifikaci změny jedné báze.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Inhibice prodloužení primeru působením PNA

0,5 μg plasmidu (Bluescript, Strategene Inc.) obsahujícího vloženou sekvenci 10 thyminových zbytků (pTlOKS) rozštěpeného restrikční endonukleasou PvuII a 0,1 μg reverzního primeru (5'–AAC AGC TAT GAC CAT G), k němuž byl přidán 1 μl 10 x koncentrovaného pufru (pro E. coli Klenow DNA polymerasu: 100 mM Tris-HCl, 100 mM chlorid hořečnatý, 50 mM chlorid sodný, 1 mM dithiothreitol (DTT), pH 7,5; pro Taq DNA polymerasu: 100 mM Tris-HCl, 15 mM chlorid hořečnatý, 500 mM chlorid sodný, 1 mg/ml želatiny, pH 8,3), 6 μl vody a 100 ng A_{10} PNA komplementární k T_{10} insertu v plasmidu se inkubuje 10 minut při 90 °C, 60 minut při 30 °C a potom se ochladí na 20 °C. Potom se přidá 1 μl 10 mM DTT, 1 μl 10 μM dCTP, dGTP, dTTP a 1 μCi α^{32} P-dATP a 1U vhodné DNA polymerasy. Po 5 minutách při 20 °C se přidají 2 μl 1 mM roztoku dATP, dCTP, dGTP a dTTP a v inkubaci se pokračuje 15 minut při 37 °C v případě E. coli DNA polymerasy nebo při 60 °C v případě Taq polymerasy. Potom se DNA vysráží přídavkem 50 μl ethanolu a roztoku octanu draselného o koncentraci 20 g/litr a analyzuje se elektroforézou na sekvenačním akrylamidovém gelu (koncentrace akrylamidu 80 g/litr) s močovinou (koncentrace močoviny 7M), načež následuje autoradiografie. Výsledky jsou znázorněny na obr. 1, na němž jednotlivé dráhy mají následující význam:

Dráha 1: E. coli DNA polymerasa Klenow Fragment, bez PNA
Dráha 2: jako dráha l, ale za přítomnosti PNA
Dráha 3: Taq polymerasa, bez PNA
Dráha 4: Taq polymerasa za přítomnosti PNA
Dráha 5: kontrolní, plasmid štěpen BamHI.

Z tohoto diagramu je zřejmé, že A_{10}PNA by se měla hybridizovat k jednomu řetězci templátové DNA v sousedství místa BamHI. Jestliže tedy A_{10}PNA bude inhibovat prodlužování primeru působením polymerasy, měly by vzniknout produkty, které by se měly pohybovat na gelu se štěpnými produkty BamHI znázorněnými v dráze 5. Pokud nebude prodlužování polymerasou působením PNA ovlivněno, měly by se získat delší prodloužené produkty. Je zřejmé, že v každé dráze obsahující PNA (2 a 4) vzniká očekávaný pás v poloze BamHI. Za nepřítomnosti PNA je pozorován delší produkt, který je v podstatě zcela nepřítomen v dráze PNA/Taq (dráha 4), což ukazuje, že Taq byla PNA zcela inhibována.

Příklad 2

Detekce mutace jediné báze směrovanou inhibicí PCR amplifikace DNA působením PNA

Plasmid pTlOKS se zkonstruuje klonováním komplementárních oligonukleotidů 5'-GATCCT_{10}G a 5'-GATCCA_{10}G do příslušných řetězců v místě BamHI Bluescript KS+plasmidu (Stratagene). Zkonstruuje se plasmid pT9CKS klonováním komplementárních oligonukleotidů 5'-TCGACT_5CT_4G a 5'-TCGACA_4GA_5G do místa Sal I plasmidu pUC19.

Provede se řetězová reakce působením polymerasy (PCR) za použití 25 ng plasmidu 1, 25 ng DNA z plasmidu 2, 1,25 mM dATP, 1,25 mM dCTP, 1,25 mM dGTP, 1,25 mM dTTP, 0,2 μg primeru 1, 0,2 μg primeru 2 a 2,5 μg PNA v 50 μl pufru (10 mM Tris-HCl, 3,5 mM chlorid hořečnatý, 50 mM chlorid draselný, 0,1 mg/ml želatiny, pH 8,3). Vzorek se 5 minut zahřívá na 94 °C a potom se ochladí na 65 °C, načež se k němu přidá 1U Taq DNA polymerasy (Boehringer Mannheim). Potom se provede 30 teplotních cyklů [94 °C (2 minuty), 40 °C (3 minuty) a 65 °C (2 minuty)].

Výsledná DNA se analýzuje elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (koncentrace polyakrylamidu 60 g/litr) v pufru TBE (90 mM Tris-borát, 1 mM EDTA, pH 8,3) a DNA se vizualizuje obarvením ethydiumbromidem.

Experiment se provádí způsobem popsaným v příkladu 1 za použití primeru M13, jako prvního primeru (primer 1) a reverzního primeru, jako druhého primeru (primer 2). Výsledný gel je znázorněn na obr. 2. Bylo použito následujících plasmidů a PNA.

Dráha 1: pT9CKS (pBluescriptKS+, do jehož místa SalI byl klonován dA_5GA_4/dT_4CT_5 PNA cíl) a pT10KS (pBluescriptKS+, do jehož místa BamHI byl klonován dA_{10}/dT_{10} PNA cíl), bez PNA.
Dráha 2: jako dráha 1, ale s PNA H-T_5CT_4LysNH$_2$
Dráha 3: jako dráha 1, ale s PNA H-T_{10}LysNH$_2$
Dráha 4: pT10KS a pT9CKS s PNA H-T_5CT_4LysNH$_2$
Dráha 5: pT10KS a pT9CKS s PNA H-T_{10}LysNH$_2$

V dráze 1 jsou jasně zřetelné 2 produkty PCR, po jednom z každého plasmidu. Amplifikaci pT10KS se získá 118 bp fragment a amplifikací pT9CKS se získá 221 pb fragment.

Plasmid pT9CKS obsahuje cílovou sekvenci pro PNA H-T_5CT_4LysNH$_2$. V dráze 2 není vidět pás odpovídající tomuto plasmidu, což ukazuje že PCR byla působením PNA inhibována.

Příklad 3

Další ukázka směrované inhibice PCR působením PNA

Způsobem uvedeným v Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E. a Berg, R. H. (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114, 1895 až 1897 a Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E. a Berg, R. H. (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114, 9577 až 9678 se syntetizuje PNA T_{10}ysNH$_2$. Plasmidy pT10KS a pT9CKS jsou stejné jako v příkladu 2. Klonováním 99bp PCR fragmentu (bez cílových míst jakékoliv PNA použité v tomto příkladu) do SmaI místa Bluescript KS+plasmidu se zkonstruuje kontrolní plasmid pCKS. Za použití standardních technik se plasmidy izolují ze selektovaných klonů rekombinantní E. coli JM103, purifikují hustotní centrifugací ve vznosu za použití gradientů chloridu cesného, načež se sekvenují dideoxymetodou.

Pro PCR reakce se použije následujících oligonukleotidových primerů: reverzního primeru (5'-CACACAGGAAACAGCTATGAC) a forwardového primeru (5'-GTAAAACGACGGCCAGT). PCR amplifikace se provádějí v 50 µl objemu obsahujícím 1 ng každého plasmidu, 0,2 µM každého z primerů, 200 µM dNTP, 10 mM v Tris-HCl, pH 8,3 (při 25 °C), 10 mM chloridu draselného a 3 mM chloridu hořečnatého.

PCR reakční směsi se převrství 2 kapkami parafinového oleje a inkubují 2 minuty při 90 °C před tím než se proces amplifikace zahájí přídavkem 3U stoffel polymerasy (Perkin Elmer Cetus). Při všech pokusech se používá amplifikačního zařízení LEP Amplifier (IgG Biotech) za použití následujících teplotních profilů pro PCR: 96 °C - 2 minuty, 55 °C - 3 minuty, 35 °C - 1 minuta, 65 °C - 2 minuty, celkem 35 cyklů.

Aby se zajistilo, že komplexy PNA/DNA vzniknou před vazbou PCR primeru a jeho prodlužováním, normální třístupňový PCR cyklus se rozšíří o separátní stupeň zahřívání PNA na teplotu, která je dostatečně vyšší než je hodnota T_m PCR primerů.

Na obr. 3 je znázorněno experimentální uspořádání a výsledky inhibice PCR za přítomnosti PNA T^{10}-LysNH$_2$. Použije se dvou plasmidových templátů popsaných výše, totiž plasmidu pT10KS, který řídí amplifikaci 246bp fragmentu obsahujícího cílové místo A_{10} a kontrolního plasmidu pCKS, který řídí amplifikaci 329bp necílového fragmentu. Pokud není přítomna PNA T_{10}-LysNH$_2$ (dráha 2), plasmid p10KS řídí syntézu očekávaného 246bp PCR fragmentu. Za přítomnosti 3,2 µM PNA T^{10}-LysNH$_2$ však nevzniká žádný produkt (dráhy 3 až 5). Nepřítomnost produktu není důsledkem nespecifického inhibičního účinku PNA T_{10}-LysNH$_2$ na PCR reakci, poněvadž PNA T_{10}-LysNH$_2$ neinhibuje amplifikaci očekávaného 329bp fragmentu z kontrolního plasmidu pCKS (dráha 1). Je tedy zřejmé, že PNA T_{10}-LysNH$_2$ je schopna zabránit amplifikaci stejné cílové DNA sekvenčně specifickým způsobem.

Příklad 4

Demonstrace, že relativní polohu cílových míst PNA a PCR primeru je možno měnit, aniž by to ovlivnilo inhibici

Tento příklad ukazuje účinky, kterých se dosáhne, když je cílové místo PNA umístěno 1) uprostřed PCR oblasti, 2) bezprostředně vedle místa PCR primeru nebo když se 3) překrývá s jedním z míst PCR primeru. Mezi mechanismy, na nichž je založena inhibice v těchto tří případech, existují zásadní rozdíly. Když je cílové místo PNA umístěno daleko od míst PCR primeru, očekává se, že bude inhibice probíhat tak, že se polymerasou zabrání transkripci bez zastávky. Naopak se očekává, že inhibice bude probíhat exklusí primeru, když se budou cílová místa PNA a PCR primeru překrývat. Konečně, když je cílové místo PNA umístěno v sousedství místa PCR primeru, bude pravděpodobně inhibice probíhat buď tak, že se zabrání přístupu polymerasy k PCR primeru a/nebo že se zabrání iniciaci prodlužování primeru. Jak je zřejmé z obr. 4, ve všech těchto třech případech se pomocí PNA T_{10}-LysNH$_2$ dosáhne účinné inhibice.

V tomto příkladu se pokus o PCR provádí při jednotlivých pokusech za použití tří různých forwardových primerů, které jsou označeny názvy "forward primer", "SK primer" a "A10 primer". Primery mají následující složení: forward primer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT), T10 primer (5'-CATCCTTTTTTTTTTG) a SK primer (5'-TCTAGAACTAGTGGATC). V plasmidu pT10KS, kterého se používá v tomto příkladu (podrobnosti jsou uvedeny v příkladu 2), je 3'-konec cílového místa forwardového primeru umístěn 101bp za cílem A10, 3'-konec SK primeru je umístěn ihned za cílem A10 a primer A10 se rozkládá v cílovém místě A10, včetně 5bp na straně 5' a 1bp na straně 3'. Dráhy 1 a 2 ukazují amplifikaci plasmidu pT10KS s reverzním a forwardovým primem za nepřítomnosti (1) nebo za přítomnosti 3,2 μM (2) PNA - T_{10}-LysNH_2. Dráhy 3 a 4 ukazují amplifikaci pT10KS s reverzním primerem a SK primerem za nepřítomnosti (3) nebo za přítomnosti (4) 3,2 μM PNA T_{10}-LysNH_2. Dráhy 7 a 8 ukazují amplifikaci plasmidu p10KS s reverzním primerem a primerem T10 za nepřítomnosti (7) nebo za přítomnosti (8) 3,2 μM PNA T_{10}-LysNH_2. Podmínky použité v cyklech PCR jsou 96 °C - 2 minuty, 55 °C - 3 minuty, 35 °C - 1 minuta, 65 °C - 2 minuty, celkem 35 cyklů. PNA T_{10}-LysNH_2 zabrání tvorbě produktu PCR z templátů s cílovými místy PNA a PCR primeru ve značném odstupu (dráha 2), se sousedními cílovými místy PNA a PCR primeru (dráha 4) a s překrývajícími se cílovými místy PNA a PCR primeru (dráha 8).

PCR reakce se obecně provádí způsobem popsaným v příkladu 2 za nepřítomnosti nebo přítomnosti PNA, která je komplementární k jednomu primeru.

Výsledky jsou uvedeny na obr. 5. V dráze 1 je vidět očekávaný PCR produkt. Dále je též vidět, že v dráze 2 byla PCR reakce úplné inhibována.

Postup podle tohoto příkladu se provede za použití "M13 primeru", jakožto primeru 1 a GATCC T_{10}G, jakožto primeru 2. Cílovým plasmidem je pT10KS. Teplota použitá ve druhé fáze každého z 30 cyklů je 35 °C místo 40 °C.

Příklad 6

Inhibice PCR působením PNA se smíšenou sekvencí

PNA, kterých bylo použito v předchozích příkladech obsahovaly pouze pyridiminové zbytky a bylo ukázáno, že vytvářejí s cílovými sekvencemi triplexy. Aby bylo možno ukázat univerzalitu tohoto principu, provede se série experimentů s různými PNA se smíšenou sekvencí, které vytvářejí standardní Watson-Crickovy duplexy s odpovídajícími cílovými DNA. Na obr. 6 je znázorněno experimentální uspořádání a výsledek analýzy na jedinou mutaci báze za použití dvou PNA se smíšenou sekvencí lišící se v jednom nukleotidu (PNA-A: H-TTCCGGTTGCC-NH_2 a PNA-B: Gly-TTCCGGCTGCC-NH_2). Použije se dvou templátů ("A" a "B") obsahujících odpovídající bodové mutace. Při tomto experimentu se používá tří oligonukleotidových primerů, forwardového a reverzního oligo-páru produkujícího 750bp PCR fragment a degenerovaného primeru namířešeného proti oblasti obsahující bodovou mutaci. Spolu s forwardovým primerem řídí degenerovaný primer amplifikaci 150bp framentu za použití buď A, nebo B allely, jako templátu. PNA jsou namířeny proti oblasti obsahující bodovou mutaci a očekává se, že inhibice (clamping) bude probíhat mechanismem exkluse primeru.

V tomto příkladu každá PCR reakční směs (50 μl) obsahuje 200 μM dNTP, 10 mM Tris-HCl o pH 9,9 (20 °C), 50 mM chlorid draselný, 1,5 mM chlorid hořečnatý, 0,01% želatinu, 0,1% Triton X-100, 1U enzym supertaq (Stratagene), 1 ng allela-specifického plasmidu, 10 pmol degenerovaného primeru namířeného proti oblasti obsahující mutaci, 10 pmol forwardového primeru, 10 pmol reverzního primeru a PNA, jak je to uvedeno. Na obr. jsou dráhy obsazeny takto:

Dráha 1: allela A, bez PNA
Dráha 2: allela A a 10 μM PNA-A,
Dráha 3: allela A a 10 μM PNA-B,
Dráha 4: allela B, bez PNA,
Dráha 5: allela B a 10 μM PNA-A,
Dráha 6: allela B a 10 μM PNA-B.

Podmínky PCR jsou: 96 °C - 1 minuta, 60 °C - 2 minuty, 40 °C - 30 sekund, 60 °C - 2 minuty, celkem 30 cyklů.

Když se jako templátu použije allely A, je za nepřítomnosti PNA-A (dráha 1) produkován jak 750bp fragment (interní PCR kontrola), tak 150bp fragment (diganostika allely). Když reakční směs obsahuje PNA-A produkuje se však pouze 750bp PCR kontrolní fragment (dráha 2). Naproti tomu, za přítomnosti PNA-B (dráha 3) se produkuje jak 750bp, tak 150 bp PCR fragment. Když se jako templátu použije allely B, výsledky jsou obrácené. Přítomnosti PNA-B tedy inhibuje produkci 150bp fragmentu (dráha 6), zatímco přítomnosti PNA-A tento účinek nemá (dráha 5). Z toho lze učinit závěr, že obě PNA se smíšenou sekvencí (A a B) jsou schopny inhibovat stejný PCR produkt s přesnostní bodové mutace.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob inhibice amplifikace nukleové kyseliny, při níž každý řetězec dvouřetězcové cílové nukleové kyseliny obsahuje oblast používanou jako templát pro jeden nebo více primerů, které se prodlužují nebo spojují za vzniku druhého templátu, který je k tomuto templátu komplementární, **vyznačující se tím,** že se do reakční směsi pro amplifikaci zprostředkovanou polymerasou nebo ligasou přidá analog nukleové kyseliny, který je do té míry komplementární k sekvenci tohoto templátu nebo tohoto primeru, že se s tímto templátem nebo primerem hybridizuje, přičemž hybridizace analogu nukleové kyseliny k příslušnému templátu nebo primeru je dostatečně silná, že zabrání hybridizaci primeru s templátem nebo prodloužení primeru nebo připojení primeru za podmínek amplifikace.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím,** že se amplifikace provádí za nepřítomnosti analogu nukleové kyseliny až do nashromáždění požadované koncentrace amplifikačního produktu a teprve potom se přidá analog nukleové kyseliny.

3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím,** že cílovou nukleovou kyselinou je kontaminující templát.

4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím,** že amplifikace je součástí způsobu detekce analytové nukleové kyseliny.

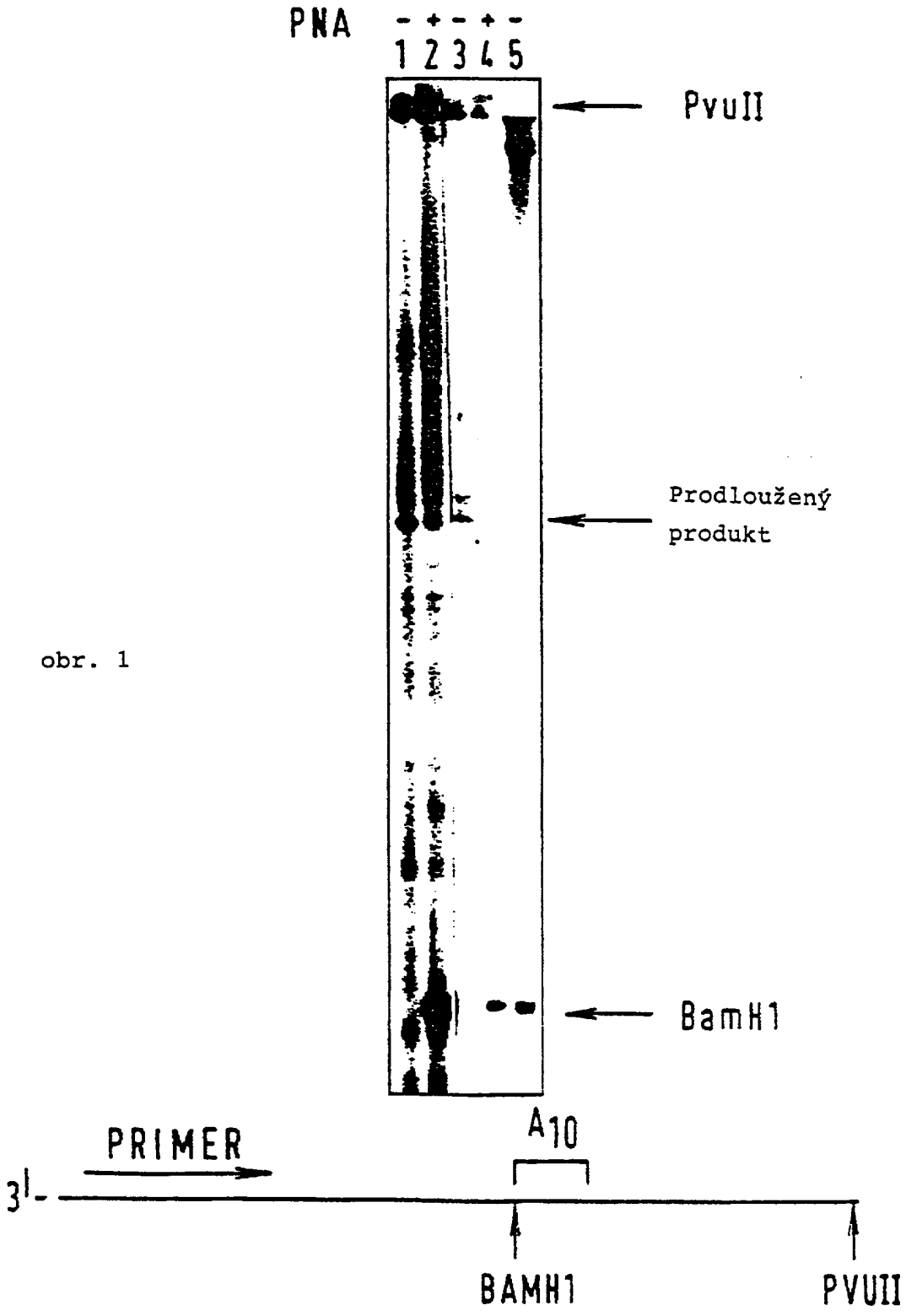
5. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím,** že analog nukleové kyseliny hybridizuje k jednomu primeru, který je komplementární k jednomu řetězci dvouřetězcové nukleové kyseliny, dostatečně silně, že je inhibována hybridizace tohoto primeru k tomuto řetězci.

6. Souprava pro amplifikaci nukleové kyseliny, **vyznačující se tím,** že zahrnuje několik primerů, z nichž každý je komplementární k nukleové kyselině, která má být

amplifikována, a je schopen prodloužení nebo připojení za použití této nukleové kyseliny jako templátu a alespoň jeden analog nukleové kyseliny, který obsahuje sekvenci, jež je komplementární k sekvenci jednoho z těchto primerů nebo k nukleové kyselině, která nemá být amplifikována.

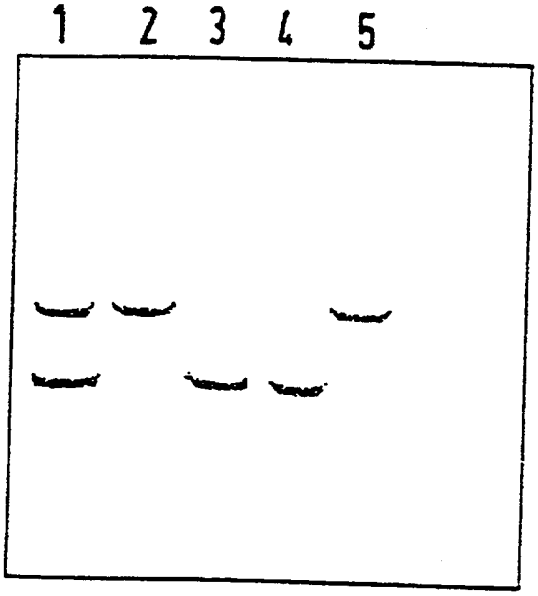
7. Souprava podle nároku 6, **vyznačující se tím,** že dále obsahuje polymerasu nebo ligasu.

4 výkresy

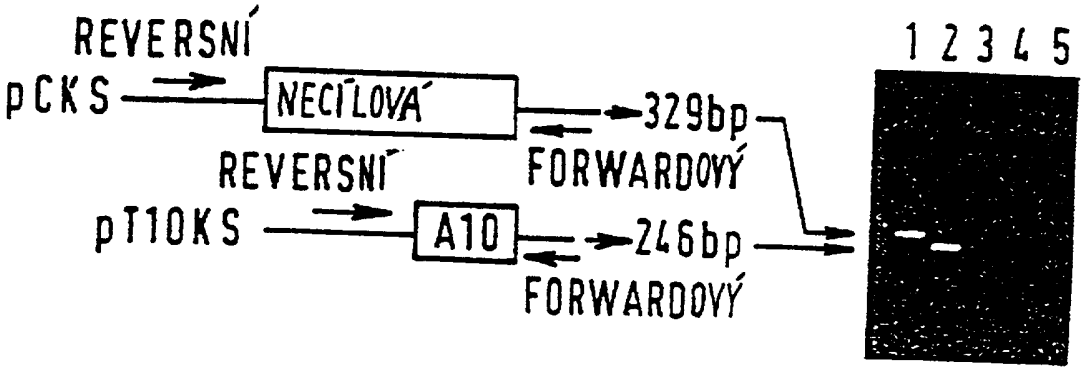

PNA
- + - + -
1 2 3 4 5
PvuII
Prodloužený
produkt
BamH1
PRIMER
A10
3'
BAMH1
PVUII

obr. 1

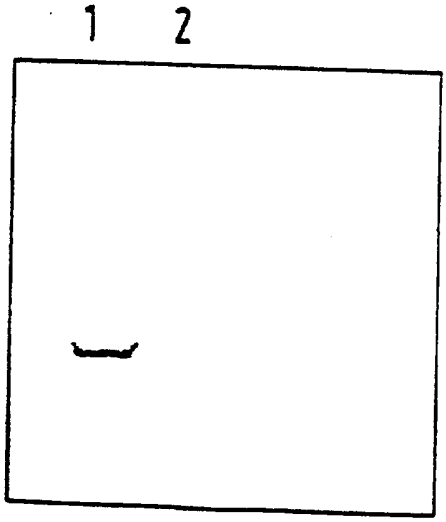
obr. 2

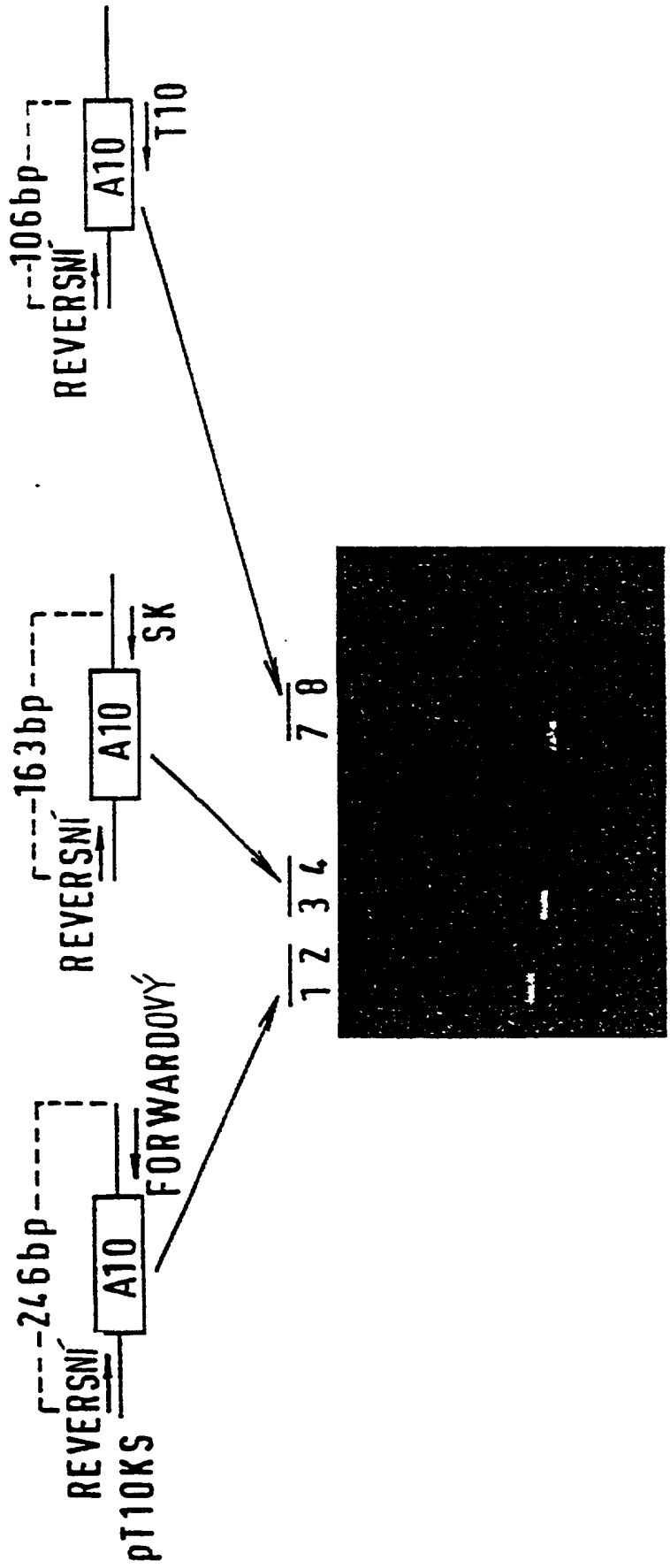


obr. 3

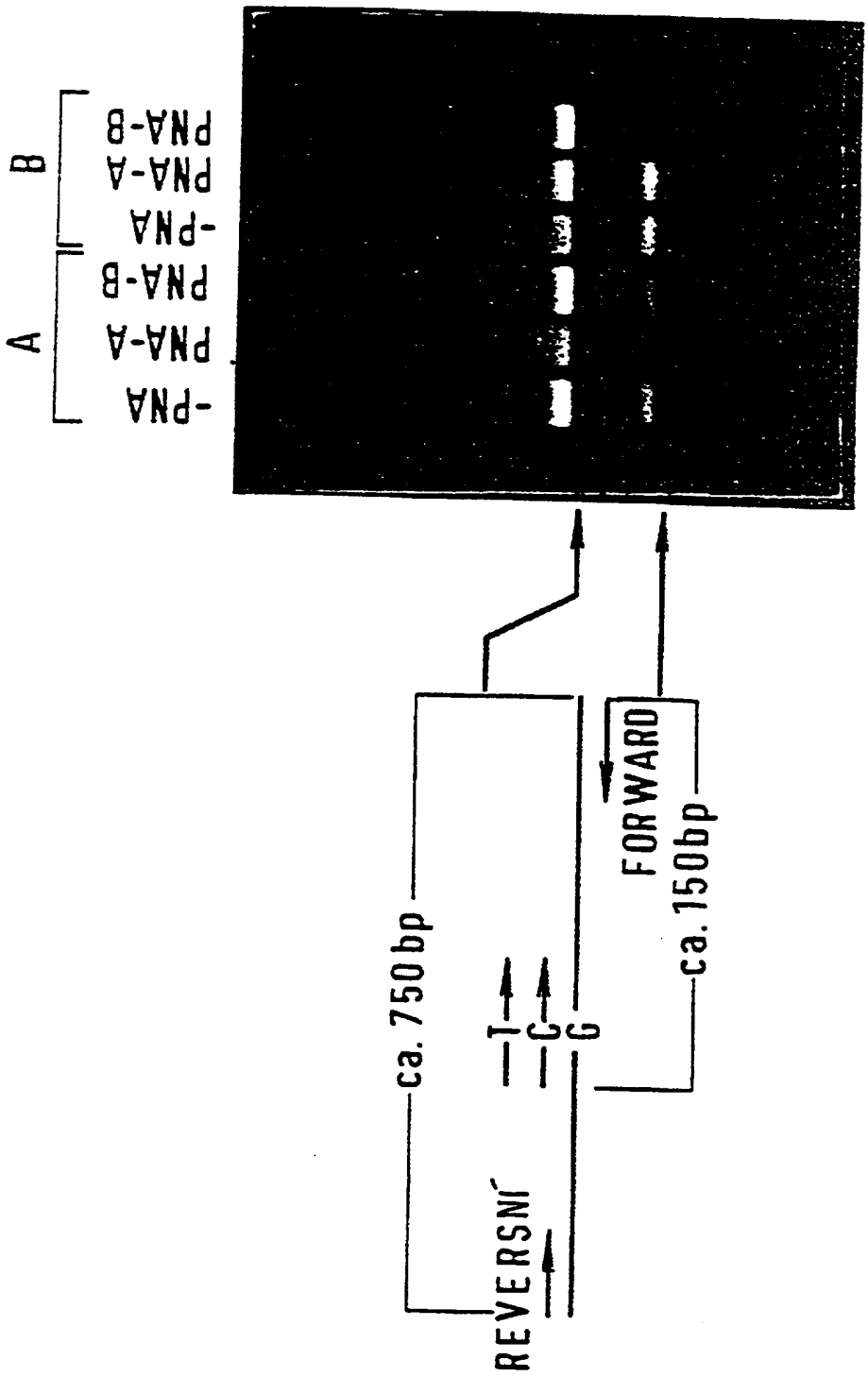


obr. 5




pT10KS
REVERSNÍ
246bp
A10
FORWARDOVÝ
REVERSNÍ
163bp
A10
SK
REVERSNÍ
106bp
A10
T10
1 2 3 4
7 8

obr. 4



obr. 6

Konec dokumentu