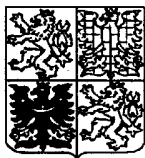


(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1996 - 2495

(22) Přihlášeno: 23.08.1996

(30) Právo přednosti:
25.08.1995 US 1995/002673

(40) Zveřejněno: 11.06.1997
(Věstník č. 6/1997)

(47) Uděleno: 16.10.2001

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 12.12.2001
(Věstník č. 12/2001)

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. 7:

C 12 N 9/99

C 12 Q 1/68

C 12 N 9/12

C 12 N 9/00

(73) Majitel patentu:

F. Hoffmann-La Roche AG, Basle, CH;

(72) Původce vynálezu:

Birch David Edward, Berkeley, CA, US;
Laird Walter Joseph, Pinole, CA, US;
Zoccoli Michael Anthony Drive, Moraga, CA, US;

(74) Zástupce:

Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha 1, 11000;

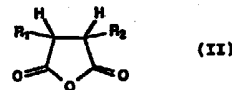
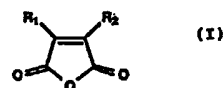
(54) Název vynálezu:

**Chemicky modifikovaný termostabilní enzym,
způsob jeho přípravy, způsob amplifikace cílové
nukleové kyseliny a amplifikační směs a kit pro
polymerázové řetězové reakce**

(57) Anotace:

Chemicky modifikovaný termostabilní enzym,
v nemodifikovaném stavu vykazující aktivitu DNA
polymerázy nebo aktivitu ligázy, který je reverzibilně
inaktivován reakcí směsi termostabilního enzymu
s modifikačním činidlem, přičemž tato reakce se provádí při
alkalickém pH a teplotě nižší než 25 °C, modifikačním
činidlem je anhydrid dikarboxylové kyseliny obecného vzorce
I, kde R₁ a R₂ jsou atomy vodíku nebo organické radikály,
které mohou být spojeny, nebo obecného vzorce II, kde R₁ a
R₂ jsou organické radikály, které jsou přednostně spojeny, a
atomy vodíku mají konfiguraci cis, a vede k úplné inaktivaci
enzymové aktivity; a způsob jeho přípravy. Způsob
amplifikace cílové nukleové kyseliny ve vzorku, který
zahrnuje stupně (a) kontaktování vzorku s amplifikační
reakční směsí obsahující primer komplementární k cílové
nukleové kyselině a výše uvedený chemicky modifikovaný
termostabilní enzym a (b) inkubaci výsledné směsi ze stupně
(a) při teplotě nad 50 °C po dobu dostačující k reaktivaci
chemicky modifikovaného termostabilního enzymu a
umožnění tvorby produktů prodlužování primerů.
Amplifikační směs pro polymerázové řetězové reakce
obsahující pár primerů a výše uvedený chemicky

modifikovaný termostabilní enzym. Kit pro polymerázové
řetězové reakce obsahující výše uvedený chemicky
modifikovaný termostabilní enzym.



Chemicky modifikovaný termostabilní enzym, způsob jeho přípravy, způsob amplifikace cílové nukleové kyseliny a amplifikační směs a kit pro polymerázové řetězové reakce

5 Oblast techniky

Vynález se týká chemicky modifikovaného termostabilního enzymu a způsobu jeho přípravy. Dále se týká způsobu amplifikace cílové nukleové kyseliny ve vzorku a amplifikační směsi a kitu pro polymerázové řetězové reakce.

10

Dosavadní stav techniky

15 Proces polymerázové řetězové reakce (PCR) pro amplifikaci sekvencí nukleové kyseliny je dobře znám v oboru a je popsán v US patentech č. 4 683 202, 4 683 195 a 4 965 188. Komerční prodejci jako je Perkin Elmer, Norwalk, CT, prodávají PCR činidla a publikují PCR protokoly.

20 V každém cyklu PCR amplifikace je dvojřetězcová cílová sekvence denaturována, ke každému řetězci denaturovaného cíle jsou tepelně hybridizovány primery a primery jsou prodlouženy působením DNA polymerázy. Specifičnost amplifikace závisí na specifitě primerové hybridizace. Primery jsou vybrány tak, aby byly komplementární k nebo v podstatě komplementární k sekvencím, vyskytujícím se na 3' konci každého řetězce cílové nukleokyselinové sekvence. Za zvýšených teplot používaných typicky v PCR hybridizují polymery pouze k zamýšlené cílové sekvenci. Avšak amplifikace reakčních směsí jsou typicky prováděny při teplotě místnosti, tedy 25 pod teplotou potřebnou k zajištění specifičnosti primerové hybridizace. Za takových méně přísných podmínek se primery mohou vázat nespecificky k jiné pouze parciálně komplementární nukleokyselinové sekvenci (nebo i k jiným primerům) a iniciovat syntézu nežádoucích prodloužených produktů, které mohou být amplifikovány spolu s cílovou sekvencí. Amplifikace nespecifických primerových prodloužených produktů může soutěžit s amplifikací požadovaných 30 cílových sekvencí a může významně snižovat účinnost amplifikace požadované sekvence. Problémy vyvolané nespecifickou amplifikací jsou dále diskutovány v Chou a spol., 1992, Nucleic Acids Research 29 (7):1717-1723.

35 Nespecifická amplifikace může být redukována redukcí tvorby prodloužených produktů z primerů navázaných k necílovým sekvencím před startem reakce. V jedné metodě označené jako „horký-start“ protokol (hot-start) se jedno nebo více podstatných činidel neuvádí do reakční směsi, dokud teplota není dostatečně vysoká pro poskytnutí nezbytné hybridizační specifity. Tímto způsobem nemůže reakční směs podporovat primerové prodloužení během doby, kdy reakční podmínky nezaručují specifickou primerovou hybridizaci.

40

Metody horkého startu mohou být prováděny ručně při otevření reakční zkumavky po počátečním vysokoteplotním inkubačním stupni a přidáním chybějících činidel. Nicméně jsou ruční metody s horkým startem pracovně náročné a zvyšují riziko kontaminace reakční směsi. Metody s horkým startem, které používají tepelně labilní materiál jako je vosk pro oddělení nebo zachycení reakčních složek jsou popsány v US patentu č. 5 411 876 a Chou a spol., 1992, supra. 45 V těchto metodách taví vysokoteplotní předreakční inkubace tepelně labilní materiál, čímž umožňuje, aby se činidla promísila.

50 Další metoda redukce tvorby prodloužených produktů z primerů navázaných k necílovým sekvencím před začátkem reakce zmírňuje inhibice DNA polymerázy za použití sloučeniny, která se nekovalentně váže k DNA polymeráze tepelně reverzibilním způsobem. US patent č. 5 338 671 popisuje použití protilátek specifických pro termostabilní DNA polymerázu pro inhibici DNA polymerázové aktivity. Protilátky musí být inkubovány s DNA polymerázou v pufru při teplotě místnosti pro sestavení reakční směsi za účelem umožnění tvorby komplexu 55 protilátka DNA polymeráza. Protilátková inhibice DNA polymerázové aktivity je inaktivována

vysokoteplotní předreakční inkubaci. Nevýhodou této metody je, že produkce protilátek specifických k DNA polymeráze je nákladná a časově náročná, zejména ve velkých množstvích. Navíc přidavek protilátek k reakční směsi může vyžadovat přepracování amplifikační reakce.

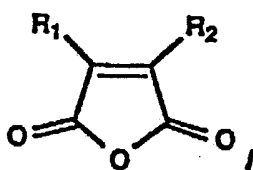
- 5 Tvorba prodloužených produktů může být také inhibována přidavkem sloučeniny, která se nekovalentně váže k primerům tepelně reverzibilním způsobem, čímž brání primerům před hybridizací k jakékoliv sekvenci, cílové nebo jiné. Například jednořetězcový vazebný protein přidaný k reakční směsi bude vázat primery a tím bránit primerové hybridizaci a inhibici primerového prodloužení. Zlepšení výtěžku PCR produktů za použití genového 32 proteinu jsou popsána Schwarzem a spol., 1990, *Nucleic Acids Research* 18(4):10.

- 15 Nespecifická amplifikace může být redukována degradací prodloužených produktů vytvořených z primerů navázaných k necílovým sekvencím před startem reakce, jako je použití metod popsanych v US patentu č. 5 418 149 a ve WO 92/01 814. Degradace nově syntetizovaných prodloužených produktů se dosáhne inkorporací dUTP a UNG do reakční směsi a inkubací reakční směsi při 45 až 60 °C pro provedení amplifikační reakce. Nevýhodou této metody je, že degradace prodlouženého produktu soutěží s tvorbou prodlouženého produktu a eliminace nespecifického primerového prodlouženého produktu je pravděpodobně méně úplná.

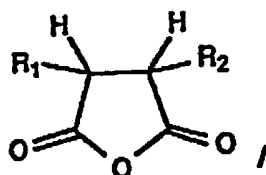
- 20 Běžné techniky molekulární biologie, proteinové chemie a nukleokyselinové chemie, které jsou známé odborníkům v oboru, jsou plně vysvětleny v literatuře. Viz např. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (Sambrook a spol., 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J.Gait, vyd., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames a S.T. Higgins vyd. 1984); *Chemical Reagents for Protein Modification* (CRC Press) a série *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.). Všechny patenty, patentové přihlášky a publikace zde uváděné, jak dříve tak dále, jsou zde zahrnuty jako odkaz.

30 Podstata vynálezu

- Předmětem vynálezu je chemicky modifikovaný termostabilní enzym, v nemodifikovaném stavu vykazující aktivitu DNA polymerázy nebo aktivitu ligázy, který je reverzibilně inaktivován reakcí směsi termostabilního enzymu s modifikačním činidlem, přičemž tato reakce se provádí při alkalickém pH a teplotě nižší než 25 °C, modifikačním činidlem je anhydrid dikarboxylové kyseliny obecného vzorce



- 40 kde R₁ a R₂ jsou atomy vodíku nebo organické radikály, které mohou být spojeny, nebo obecného vzorce



- 45 kde R₁ a R₂ jsou organické radikály, které jsou přednostně spojeny, a atomy vodíku mají konfiguraci cis, a vede k úplné inaktivaci enzymové aktivity.

Předmětem vynálezu je dále také způsob přípravy chemicky modifikovaného termostabilního enzymu, který v nemodifikovaném stavu vykazuje aktivitu DNA polymerázy nebo aktivitu ligázy, přičemž chemická modifikace má za následek reverzibilní inaktivaci aktivity enzymu, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje reakci směsi termostabilního enzymu s výše uvedeným modifikačním činidlem a za výše uvedených podmínek, přičemž uvedená reakce vede k úplné inaktivaci enzymové aktivity.

Dále je předmětem vynálezu také způsob amplifikace cílové nukleové kyseliny ve vzorku, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje stupně

(a) kontaktování vzorku s amplifikační reakční směsí obsahující primer komplementární k cílové nukleové kyselině a výše uvedený chemicky modifikovaný termostabilní enzym, a

(b) inkubaci výsledné směsi ze stupně (a) při teplotě nad 50 °C po dobu dostačující k reaktivaci chemicky modifikovaného termostabilního enzymu a umožnění tvorby produktů prodlužování primerů.

Předmětem vynálezu je také amplifikační směs pro polymerázové řetězové reakce, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje pár primerů a výše uvedený chemicky modifikovaný termostabilní enzym.

Konečně je předmětem vynálezu také kit pro provedení polymerázové řetězové reakce, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje výše uvedený chemicky modifikovaný termostabilní enzym.

Předložený vynález poskytuje způsoby a činidla pro amplifikaci nukleové kyseliny za použití amplifikační reakce na bázi primerů, jak jsou specifikovány v připojených nárocích. Tyto metody a činidla poskytují jednoduché a ekonomické řešení problému nespecifické amplifikace. Metody používají reverzibilně inaktivovaný tepelně stabilní enzym, který může být reaktivován inkubací v amplifikační reakční směsi při zvýšené teplotě. Nespecifická amplifikace je většinou redukována, protože reakční směs neposkytuje podporu primerového prodloužení, dokud teplota reakční směsi nebyla zvýšena na teplotu, která umožňuje primerovou hybridizační specifickou.

Jeden aspekt předloženého vynálezu se týká reverzibilně inaktivovaných tepelně stabilních enzymů, které jsou produkovány reakcí mezi termostabilním enzymem, který katalyzuje primerovou prodlužovací reakci a modifikačním činidlem. Reakce vede k významné, výhodně v podstatě kompletní redukci enzymové aktivity. Inkubace modifikovaného enzymu ve vodném pufru při alkalickém pH při teplotě, která je menší než asi 25 °C, nevede v podstatě ke zvýšení enzymové aktivity za méně než asi 20 minut. Inkubace modifikovaného enzymu ve vodném pufru, upraveném na pH 8 až 9 při 25 °C, při teplotě vyšší než asi 50 °C poskytne alespoň dvojnásobné

Přednostní činidla pro modifikaci enzymu zahrnují maleinanhydrid, substituované maleinanhydridy, jako citrakonahydrid, cis-akonitový anhydrid a 2,3-dimethylmaleinanhydrid; anhydrid kyseliny exo-cis-3,6-endoxo- Δ^4 -tetrahydroftalové; a 3,4,5,6-tetrahydroftalanhydrid. Zejména jsou preferovány anhydrid kyseliny citrakonové a anhydrid kyseliny cis-akonitové pro přípravu reverzibilně inaktivovaných DNA polymeráz pro použití v PCR amplifikacích.

Jiný aspekt předloženého vynálezu se týká metod pro provedení reakcí amplifikace nukleové kyseliny za použití reverzibilně inaktivovaného termostabilního enzymu podle předloženého vynálezu. Předložený vynález poskytuje metody amplifikace cílové nukleové kyseliny obsažené ve vzorku, zahrnující stupně:

(a) kontaktu vzorku s amplifikační reakční směsí, obsahující primer komplementární k cílové nukleové kyselině a modifikovaný termostabilní enzym, kde modifikovaný termostabilní enzym je produkován reakcí směsi termostabilního enzymu, který katalyzuje primerovou prodlužovací

reakci a modifikačního činidla, přičemž se reakce provádí v alkalickém pH při teplotě, která je menší než asi 25 °C, přičemž reakce vede k chemické modifikaci enzymu, která vede v podstatě k úplné inaktivaci enzymové aktivity a přičemž inkubace modifikovaného enzymu ve vodném pufru upraveném na pH 8 až 9 při 25 °C, při teplotě vyšší než asi 50 °C vede k alespoň

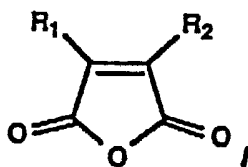
5 dvojnásobnému zvýšení enzymové aktivity během méně než 20 minut, a

(b) inkubace výsledné směsi ze stupně (a) při teplotě, která je větší než asi 50 °C po dobu dostačující k reaktivaci enzymu a vytvoření produktů primerového prodloužení.

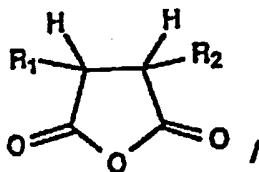
10 Preferovanou metodou podle vynálezu je metoda amplifikace cílové nukleové kyseliny obsažené ve vzorku, zahrnující:

(a) kontakt vzorku s amplifikační reakční směsí, obsahující primer komplementární k cílové nukleové kyselině a modifikovaný termostabilní enzym, kde modifikovaný termostabilní enzym

15 je produkován reakcí směsi termostabilního enzymu anhydridu dikarboxylové kyseliny obecného vzorce



20 kde R₁ a R₂ jsou vodík nebo organické radikály, které mohou být spojeny, nebo obecného vzorce



kde R₁ a R₂ jsou organické radikály, které mohou být spojeny a vodíky jsou cis, přičemž reakce

25 poskytuje v podstatě kompletní inaktivaci enzymové aktivity,

a

(b) inkubaci výsledné směsi ze stupně (a) při teplotě, která je větší než asi 50 °C po dobu

30 dostačující k reaktivaci enzymu a vytvoření produktů primerového prodloužení.

Preferovaná provedení metod používají reverzibilní modifikované enzymy modifikované použitím preferovaných modifikačních činidel. V některých provedeních vynálezu se inkubační stupeň, stupeň (b) provádí před startem amplifikační reakce. V jiných provedeních je inkubace,

35 která vede k reaktivaci enzymu, integrálním stupněm v amplifikačním procesu. Například denaturační stupeň prováděný v každém PCR cyklu může současně působit reaktivaci modifikované DNA polymerázy.

V preferovaném provedení vynálezu je amplifikační reakcí polymerázová řetězová reakce (PCR)

40 a používá se reverzibilně inaktivovaná termostabilní DNA polymeráza. Reakční směs se inkubuje před provedením amplifikační reakce při teplotě, která je vyšší než teplota teplotní hybridizace amplifikační reakce. DNA polymeráza je tak inaktivována dokud je teplota nad teplotou, která umožňuje specifitu amplifikační reakce, čímž snižuje nespecifickou amplifikaci.

45 Jiný aspekt vynálezu se týká amplifikačních reakčních směsí, které obsahují reverzibilně inaktivovaný termostabilní enzym podle předloženého vynálezu spolu s činidly pro provedení amplifi-

kační reakce. V preferovaném provedení obsahuje amplifikační reakční směs oligonukleotidové primery pro provedení PCR.

- 5 Další aspekt vynálezu se týká kitů, které obsahují reverzibilně inaktivovaný termostabilní enzym podle vynálezu a jedno nebo více amplifikačních činidel.

Popis obrázků na připojených výkresech

- 10 Obr. 1 představuje vzorce anhydridu kyseliny citrkonové, anhydridu kyseliny cis-akonitové a anhydridu kyseliny 2,3-dimethylmaleinové a reakci mezi anhydridem kyseliny citrkonové a lysinem.

- 15 Obr. 2 představuje výsledky amplifikací provedených za použití citrakonylatované Taq DNA polymerázy, jak je popsáno v příkladu 4.

Obr. 3 představuje výsledky amplifikací provedených za použití citrakonylatovaných DNA polymeráz, jak je popsáno v příkladu 6.

- 20 Obr. 4 představuje výsledky při měnící se době předinkubace v amplifikacích prováděných za použití citrakonylatovaných a cis-akonitylatovaných DNA polymeráz, jak jsou popsány v příkladu 9.

- 25 Obr. 5 představuje výsledky při měnících se počtech amplifikačních cyklů v amplifikacích prováděných za použití citrakonylatovaných a cis-akonitylatovaných DNA polymeráz, jak jsou popsány v příkladu 10.

Pro výklad vynálezu jsou dále definovány některé výrazy.

- 30 Výrazy „nukleová kyselina“ a „oligonukleotid“ označují primery, sondy a oligomerní fragmenty, které jsou detekovány a měly by to genericky být polydeoxyribonukleotidy (obsahující 2-deoxy-D-ribosu), polyribonukleotidy (obsahující D-ribosu) a mnoho jiných typů polynukleotidů, které jsou N-glykosidy purinové nebo pyrimidinové báze, nebo modifikované purinové nebo pyrimidinové báze. Není zde rozdíl v délce mezi výrazy „nukleová kyselina“ a „oligonukleotid“
35 a tyto výrazy budou používány zaměnitelně. Tyto výrazy se týkají pouze primární struktury molekuly. Tyto výrazy tak zahrnují dvoj- a jednořetězcové DNA jakož i dvoj- a jednořetězcové RNA. Oligonukleotidy mohou být připraveny jakoukoliv vhodnou metodou. Přehled metod syntézy je uveden v práci Goodchilda, 1990, Bioconjugate Chemistry 1(3): 165-187.

- 40 Výraz „hybridizace“ označuje tvorbu dvoušroubovicové struktury ze dvou jednořetězcových nukleových kyselin způsobenou párováním komplementárních bází. Hybridizace se může objevit mezi plně komplementárními nukleokyselinovými řetězci nebo mezi „v podstatě komplementárními“ nukleokyselinovými řetězci, které obsahují malé regiony chybného párování. Podmínky, za kterých budou hybridizovat pouze plně komplementární nukleokyselinové řetězce jsou označovány jako „přísné hybridizační podmínky“ nebo „sekvenčně-specifické hybridizační podmínky“.
45 Stabilní dvoušroubovice v podstatě komplementárních sekvencí mohou být dosaženy za méně přísných hybridizačních podmínek. Odborník v oboru technologie nukleových kyselin může stanovit stabilitu dvoušroubovice empiricky při zvážení mnoha proměnných, zahrnujících například délku a koncentraci bázových párů oligonukleotidů, iontovou sílu a výskyt chybného párování bází, podle návodů známých v oboru (viz např. Sambrook a spol., 1989, supra).
50

Obecně jsou přísné hybridizační podmínky zvoleny asi 5 °C pod bodem tepelného tání (thermal melting point - T_m) pro specifickou sekvenci při definované iontové síle a pH. T_m je teplota (při definované iontové síle a pH), při které 50 % párů bází je disociováno. Uvolnění přísnosti

hybridizačních podmínek umožní toleranci sekvenčního chybného párování; stupeň tolerovaného chybného párování může být kontrolován úpravou hybridizačních podmínek.

Výraz „primer“ se týká oligonukleotidu, jak přírodního tak syntetického, schopného působit jako počáteční bod DNA syntézy za podmínek, ve kterých je syntéza produktu primerového prodloužení komplementárního k řetězci nukleové kyseliny vyvolána, tj. za přítomnosti čtyř rozdílných nukleosidtrifosfátů a činidla pro polymerizaci (tj. DNA polymerázy nebo reverzní transkriptázy) ve vhodném pufru a při vhodné teplotě. Oligonukleotidové analogy, jako jsou „peptidové nukleové kyseliny“, mohou působit jako primery a jsou zahrnuty ve výrazu „primer“, jak je zde použit. Primer je výhodně jednořetězcový oligodeoxyribonukleotid. Vhodná délka primeru závisí na zamýšleném použití primeru, ale typicky je v rozmezí od 6 do 50 nukleotidů. Krátké primerové molekuly obecně vyžadují chladničkové teploty pro tvorbu dostatečně stabilních hybridních komplexů s templátem. Primer nemusí odrážet přesnou sekvenci templátu nukleové kyseliny, ale musí být dostatečně komplementární k hybridizaci s templátem.

Výraz „primerové prodloužení“ jak je zde použit, se týká jak syntézy DNA vzniklé z polymerizace jednotlivých nukleosidtrifosfátů za použití primeru jako počátečního bodu a k připojení dalších oligonukleotidů k primeru k prodloužení primeru. Jak je zde použit je výraz „primerové prodloužení“ zamýšlen jako zahrnující ligaci dvou oligonukleotidů za vzniku delšího produktu, který může sloužit jako cíl v budoucích amplifikačních cyklech. Jak je zde použit, je výraz „primer“ míněn jako zahrnující oligonukleotidy použité v ligaci zprostředkovaných amplifikačních procesech, které jsou prodlouženy ligací druhého oligonukleotidu, který hybridizuje v sousední poloze.

Primery mohou zahrnovat další rysy, které umožňují detekci nebo imobilizaci primeru, ale nemění základní vlastnost primeru, působení jako počáteční bod iniciace DNA syntézy. Například mohou primery obsahovat další nukleokyselinovou sekvenci na 5' konci, která nehybridizuje k cílové nukleové kyselině, ale která usnadňuje klonování amplifikovaného produktu. Region primeru, který je dostatečně komplementární k templátu k hybridizaci, je zde označován jako hybridizující region.

Výraz „cílový region“ a „cílová nukleová kyselina“ se týká regionu nebo subsekvence nukleové kyseliny, který je amplifikován. Místo primerové hybridizace se může označit jako cílový region pro primerovou hybridizaci.

Jak je zde použito, je oligonukleotidový primer „specifický“ pro cílovou sekvenci, je-li počet chybných párování přítomných mezi oligonukleotidem a cílovou sekvencí menší než počet chybných párování přítomných mezi oligonukleotidem a necílovými sekvencemi, které mohou být přítomny ve vzorku. Hybridizační podmínky mohou být zvoleny tak, že se za nich vytvářejí stabilní dvoušroubovice pouze není-li počet přítomných chybných párování větší než počet chybných párování přítomných mezi oligonukleotidem a cílovou sekvencí. Za takových podmínek může oligonukleotid tvořit stabilní dvoušroubovici pouze s cílovou sekvencí. Použití cílově specifických primerů za vhodných přísných amplifikačních podmínek umožňuje specifickou amplifikaci těch cílových sekvencí, které obsahují cílová vazebná místa. Použití sekvencně specifických amplifikačních podmínek umožňuje specifickou amplifikaci těch cílových sekvencí, které obsahují exaktně komplementární primerová vazebná místa.

Výraz „nespecifická amplifikace“ označuje amplifikaci nukleokyselinových sekvencí jiných než cílových sekvencí, které vznikají z hybridizace primerů k sekvencím jiným než je cílová sekvence a pak slouží jako substrát pro primerové prodloužení. Hybridizace primeru k necílové sekvenci je označena jako „nespecifická hybridizace“ a může se objevovat během nižší teploty, redukovaných přísných předreakčních podmínek.

Výraz „termostabilní enzym“ označuje enzym, který je relativně stabilní k teplu. Termostabilní enzymy mohou odolávat vyšší teplotní inkubaci použité pro odstranění modifikovaných skupin,

typicky větší než 50 °C, aniž by byly postiženy nevratnou ztrátou aktivity. Modifikované termostabilní enzymy použitelné v metodách podle předloženého vynálezu zahrnují termostabilní DNA polymerázy a termostabilní ligázy.

- 5 Výraz „termostabilní DNA polymeráza“ označuje enzym, který je relativně stabilní k teplu a katalyzuje polymerizaci nukleosidtrifosfátů za vzniku produktů primerového prodloužení, které jsou komplementární k jednomu z nukleokyselinových řetězců cílové sekvence. Enzym iniciuje syntézu na 3' konci primeru a postupuje ve směru k 5' konci templátu do ukončení syntézy. Čištěné termostabilní DNA polymerázy jsou popsány v US patentu č. 4 889 818; US patentu
10 č. 5 352 600, US patentu č. 5 079 352; WO 91/09 950; WO 92/03 556; WO 92/06 200; WO 92/06 202; US patentu č. 5 491 086, WO 92/09 689 a US patentu č. 5 210 036.

- Enzym „získaný“ z organismu zde označuje enzym, který je čištěn z organismu nebo rekombinantní verzi enzymu, který je čištěn z organismu a zahrnuje enzymy, ve kterých byly aminokyselinové sekvence modifikovány použitím technik molekulární biologie.
15

- Výraz „reverzibilně inaktivovaný“ jak je zde použit se týká enzymu, který byl inaktivován reakcí se sloučeninou, která vede ke kovalentní modifikaci (označované také jako chemická modifikace) enzymu, kde modifikující sloučenina je odstranitelná za vhodných podmínek. Reakce, která vede
20 k odstranění modifikující sloučeniny, nesmí být reverzní modifikační reakce. Pokud je to reakce, která vede k odstranění modifikující sloučeniny a obnovení funkce enzymu, je enzym považován za reverzně inaktivovaný.

- Výraz „reakční směs“ označuje roztok, obsahující činidla nezbytná k provedení dané reakce. „Amplifikační reakční směs“ označuje roztok, obsahující nezbytná činidla pro provedení
25 amplifikační reakce, typicky obsahující oligonukleotidové primery a DNA polymerázu nebo ligázu ve vhodném pufru. „PCR reakční směs“ typicky obsahuje oligonukleotidové primery, termostabilní DNA polymerázu, dNTP, a dvojvalný kovový kationt ve vhodném pufru. Reakční směs je označována jako kompletní, jestliže obsahuje všechna činidla nezbytná k provedení
30 reakce a nekompletní, jestliže obsahuje pouze část nezbytných činidel. Odborníkovi v oboru bude zřejmé, že reakční složky jsou rutinně uchovávány jako oddělené roztoky, obsahující každý část všech složek, z důvodů výhodnosti, skladovací stability a pro umožnění nezávislé úpravy koncentrací složek podle aplikace a dále, že se reakční složky spojí před reakcí pro vytvoření kompletní reakční směsi.

- 35 Metody podle předloženého vynálezu zahrnují provedení amplifikační reakce za použití reverzibilně inaktivovaného termostabilního enzymu, kde je aktivní enzym vyžadován pro primerové prodloužení. Před vysokoteplotní inkubací, která aktivuje enzym, amplifikační reakční směs nepodporuje primerové prodloužení a nevznikají žádné prodloužené produkty, nespecifické ani jiné. Po vysokoteplotní inkubaci, která reaktivuje enzym, se amplifikační reakce udržuje při
40 zvýšených teplotách, které zajišťují reakční specifičnost. Produkty primerového prodloužení jsou vytvářeny pouze za podmínek, které zajišťují amplifikační specifitu.

- V metodách podle předloženého vynálezu teplem inaktivovaný enzym, ve svém aktivním stavu,
45 katalyzuje reakci primerového prodloužení. Pro použití v typické amplifikační reakci, např. PCR, vykazuje reverzibilně inaktivovaný termostabilní enzym, ve svém aktivním stavu, DNA polymerázovou aktivitu. Pro použití v ligázou zprostředkovaných amplifikačních systémech vykazuje reverzibilně inaktivovaný termostabilní enzym ve svém aktivním stavu aktivitu DNA
50 ligázy.

- V ligázou zprostředkovaném amplifikačním systému se vytvoří „produkt prodloužení“ ligací prvního oligonukleotidu (zahrnut do výrazu „primer“) ke druhému oligonukleotidu, který hybridizuje přiléhající ke 3' konci prvního oligonukleotidu. Druhý oligonukleotid může hybridizovat bezprostředně přiléhající k primeru a v tomto případě je pouze vyžadována ligace, nebo může
55 hybridizovat jedna nebo více bází vzdálených od primeru a v tomto případě je vyžadována

polymerázová aktivita pro prodloužení primeru před ligací. V každém případě je zde spojení dvou oligonukleotidů, které hybridizují k přiléhajícím regionům cílové DNA označeno výrazem „primerové prodloužení“.

- 5 Reverzibilně inaktivované termostabilní enzymy podle vynálezu jsou produkovány reakcí mezi enzymem a modifikačním činidlem, která vede k reverzibilní chemické reakci enzymu, která vede k úplné ztrátě, nebo téměř úplné ztrátě enzymové aktivity. Modifikace zahrnuje kovalentní připojení modifikátorové skupiny k proteinu. Modifikátorová skupina se volí tak, že modifikace je reverzní při inkubaci při zvýšené teplotě v amplifikačním reakčním pufru. Vhodné enzymy a modifikátorové skupiny jsou popsány dále.

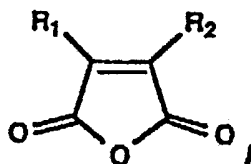
15 Reverzibilně inaktivované enzymy, které vykazují ve svém aktivním stavu DNA polymerázovou aktivitu, se připraví z termostabilních DNA polymeráz. Termostabilní DNA polymerázy použitelné v amplifikačních reakcích jsou dobře známé v oboru a mohou být získány z mnoha zdrojů jako jsou termofilní eubakterie nebo archaeobakterie ze druhů rodu *Thermus*, *Thermotoga*, *Thermococcus*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* a *Thermosipho*. Představiteli druhů, ze kterých byly získány termostabilní DNA polymerázy použitelné v PCR amplifikacích zahrnují *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Pyrodictium occultum*, *Pyrodictium abyssi* a *Thermosipho africanus*. Termostabilní DNA polymerázy jsou popsány v US patentu č. 4 889 818, US patentu č. 5 352 600, US patentu č. 5 079 352, WO 91/09 950, WO 92/03 556, WO 92/06 200, WO 92/06 202, US patentu č. 5 491 086, WO 92/09 689 a US patentu č. 5 210 036. Termostabilní DNA polymerázy jsou obchodně dostupné od Perkin Elmer, Norwalk, CT.

- 25 Reverzibilně inaktivované termostabilní enzymy vhodné pro použití v jiných amplifikačních postupech, jako jsou ligázou zprostředkované amplifikace, jsou připraveny z termostabilních enzymů popsáných v odkazech citovaných dále, které popisují různé amplifikační metody.

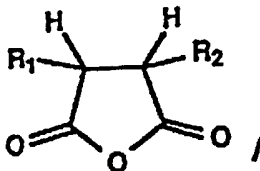
30 Metody podle předloženého vynálezu nejsou omezeny na použití enzymů uvedených jako příklady. Například jakákoliv termostabilní DNA polymeráza popsána v literatuře pro použití v amplifikačních reakcích může být modifikována, jak je zde popsáno, pro produkci reverzibilně inaktivovaného enzymu vhodného pro použití v předložených metodách. Obecně může být v předložené metodě použit jakýkoliv enzym, který katalyzuje primerové prodloužení nebo je vyžadován k tomu, aby došlo k primerovému prodloužení a je dostatečně termostabilní, aby odolal vysokoteplotní reaktivační inkubaci, aniž by byl nevratně inaktivován a může být modifikován, jak je zde popsáno pro produkci reverzibilně inaktivovaného enzymu. Odborník v oboru bude schopen optimalizovat modifikaci reakce a podmínky amplifikační reakce pro jakýkoliv daný enzym na bázi uvedených poznatků.

40 V preferovaných provedeních vynálezu se reverzibilní inaktivace termostabilního enzymu provádí reverzibilním blokováním lysinových zbytků chemickou modifikací ϵ -aminoskupiny lysinových zbytků. Modifikace lysinů v aktivním regionu proteinu vede k inaktivaci proteinu. Dále modifikace lysinů mimo aktivní region může přispívat k inaktivaci proteinu sterickou interakcí nebo konformačními změnami. V literatuře bylo popsáno množství sloučenin, které reagují s aminoskupinami reverzibilním způsobem. Například aminoskupiny byly reverzibilně modifikovány trifluoracetylací (viz Goldnerg a Anfinsen, 1962, *Biochemistry* 1:410), amidinací (viz Hunter a Ludwig, 1962, *J.Amer.Chem.Soc.* 84:3491), maleylací (viz Butler a spol., 1967, *Biochem.J.* 103:78), acetoacetylací (viz Marzotto a spol., 1967, *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 36:517 a Marzotto a spol., 1968, *Biochim.Biophys.Acta* 154:450), tetrafluorsukcinylnací (viz Braunitzer a spol., 1968, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 349:265) a citrakonylnací (viz Dixon a Perham, 1968, *Biochem.J.* 109:312-314; a Habbeeb a Atassi, 1970, *Biochemistry* 9 (25):4939-4944).

55 Preferovaná činidla pro chemickou modifikaci ϵ -aminoskupiny lysinových zbytků jsou anhydridy dikarboxylových kyselin obecného vzorce



kde R_1 a R_2 jsou vodík nebo organické radikály, které mohou být spojeny, nebo obecného vzorce



kde R_1 a R_2 jsou organické radikály, které mohou být spojeny a vodíky jsou cis. Organický radikál může být přímo připojen ke kruhu vazbou uhlík-uhlík nebo přes vazbu uhlík-heteroatom, jako je vazba uhlík-kyslík, uhlík-dusík nebo uhlík-síra. Organické radikály mohou být také vzájemně spojeny za vzniku kruhové struktury jako je například v 3,4,5,6-tetrahydroftalanhydridu.

Anhydridy dikarboxylových kyselin reagují s aminoskupinami proteinů za získání odpovídajících acylovaných produktů jak je ukázáno pro citrakonový anhydrid na obr. 1. Reverzibilita výše uvedených anhydridů dikarboxylových kyselin se předpokládá být zvýšená přítomností buď dvojné vazby cis-uhlík-uhlík nebo cis vodíky, která udržuje terminální karboxylovou skupinu acylovaného zbytku v prostorové orientaci vhodné pro interakci s amidovou skupinou a následnou deacylací. Viz Palacian a spol., 1990, Mol.Cell.Biochem. 97:101-111 pro popisy pravděpodobných mechanismů jak acylačních tak deacylačních reakcí. Jiné substituenty mohou podobně omezovat rotaci kolem vazby 2,3 acylové skupiny v acylovaném produktu a o takových sloučeninách se předpokládá, že budou působit v metodách podle předloženého vynálezu.

Preferovaná činidla zahrnují maleinanhydrid; substituované maleinanhydridy jako je citrakonový anhydrid, cis-akonitový anhydrid a 2,3-dimethylmaleinanhydrid; anhydrid kyseliny exo-cis-3,6-endoxo- Δ^4 -tetrahydroftalové; a 3,4,5,6-tetrahydroftalanhydrid. Činidla jsou obchodně dostupná od např. Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI), Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO) nebo Spectrum Chemical Mfg. Corp. (Gardena, CA). Modifikace termostabilních DNA polymerů použitím substituovaných maleinanhydridových činidel, citrakonanhidridu a cis-akonitového anhydridu jsou popsána v příkladech.

Relativní stability aminoskupin acylovaných za použití výše uvedených činidel se snižují v následujícím pořadí: maleinanhydrid; anhydrid kyseliny exo-cis-3,6-endoxo- Δ^4 -tetrahydroftalové; 3,4,5,6-tetrahydroftalanhydrid, cis-akonitový anhydrid a 2,3-dimethylmaleinanhydrid (viz Palacian a spol., supra). Optimální aktivační inkubační podmínky pro enzymy modifikované jednotlivým činidlem jsou stanoveny empiricky jak je popsáno v příkladech.

US patent č. 5 262 525 popisuje metody pro chemickou modifikaci proteinů, které používají sloučeniny, které jsou anhydridy dikarboxylových kyselin připravené Diels-Alderovou reakcí maleinanhydridu a dienu. Sloučeniny popsané v tomto patentu, které mají zde specifikovanou stabilitu mohou být vhodné v předloženém vynálezu.

Metody podle předloženého vynálezu nejsou omezeny na uváděné příklady modifikátorových sloučenin nebo modifikací proteinu chemickou modifikací lysinových zbytků. Jakákoliv ze sloučenin popsaných v literatuře, která reaguje s proteiny za vzniku reverzibilní ztráty veškeré nebo téměř veškeré enzymové aktivity, kde modifikace je reverzibilní při inkubaci při zvýšené

teplotě v amplifikačním reakčním pufru, je vhodná pro přípravu reverzibilně inaktivovaného enzymu. Jak se stávají dostupnými nové sloučeniny, které reverzibilně modifikují protein, budou tyto také vhodné pro použití v předloženém vynálezu. Sloučeniny pro přípravu modifikovaných termostabilních enzymů podle předloženého vynálezu zahrnují sloučeniny, které zabezpečují následující vlastnosti:

- (1) reakce s termostabilním enzymem, který katalyzuje primerové prodloužení vede k významné inaktivaci enzymu;
- (2) inkubace výsledného modifikovaného enzymu ve vodném pufru při pH kolem 8 až 9 při teplotě při nebo pod teplotou místnosti (25 °C) nevede k žádnému významnému zvýšení enzymové aktivity za méně než asi 20 minut; a
- (3) inkubace výsledného modifikovaného termostabilního enzymu v amplifikačním pufru, upraveném na pH asi 8 až 9 při teplotě místnosti, při zvýšené teplotě větší než asi 50 °C vede k alespoň dvojnásobnému zvýšení enzymové aktivity za méně než asi 20 minut.

Vhodnost určité modifikátorové sloučeniny může být empiricky rutinně stanovena podle zde uvedeného návodu. Experimentální postupy pro měření výše uvedených vlastností, stupeň zeslabení enzymové aktivity vzniklá z modifikace proteinu a stupeň obnovení enzymové aktivity po inkubaci při zvýšených teplotách, jsou popsány v příkladech.

Příprava reverzibilně inaktivovaných termostabilních enzymů

Chemická modifikace lysinových zbytků v proteinech je založena na schopnosti ϵ -aminoskupiny tohoto zbytku reagovat jako nukleofil. Neprotonovaná aminoskupina je reaktivní forma, která je výhodná při alkalickém pH. Modifikační reakce se provádí při pH 8,0 až 9,0 ve vodném pufru při teplotě při nebo teplotě pod teplotou místnosti (25 °C). Reakce je v podstatě kompletní po 12 až 24 hodinách inkubace. Vhodné reakční podmínky jsou v oboru známé a jsou popsány dále v příkladech.

Anhydridy dikarboxylových kyselin reagují snadněji s vodou za vzniku odpovídajících kyselin. Proto velká část činidla je hydrolyzována během modifikace proteinových aminoskupin. Rychlost hydrolyzy stoupá s pH. Zvýšení hydrolyzy, které se objevuje při pH větším než asi 9 může být výsledkem suboptimální acylace proteinu.

Obecně se v acylační reakci použije molární přebytek modifikátorového činidla vzhledem k proteinu. Optimální molární poměr modifikátorového činidla k enzymu závisí na použitém činidle a stanoví se empiricky. Například TaqDNA polymeráza je v podstatě kompletně inaktivována (< 5 % původní aktivity) reakcí se 20-násobkem nebo i vyšším molárním přebytkem anhydridu kyseliny citrkonové. Minimální molární poměr modifikátoru, který vede v podstatě ke kompletní inaktivaci enzymu může být stanoven provedením inaktivačních reakcí s postupnými ředěními modifikátorového činidla jak je popsáno v příkladech.

V metodách podle předloženého vynálezu není nezbytné, aby byl enzym plně inaktivován, pouze enzym musí být významně inaktivován. Enzym je významně inaktivován, jestliže aktivita enzymu po reakci s modifikátorem je menší než asi 50 % původní aktivity. Redukce v nespecifické amplifikaci může být dosažena za použití významně inaktivovaného enzymu. Molární poměr modifikátoru k enzymu v reakci může být empiricky zvolen tak, že povede buď k úplné inaktivaci nebo významné inaktivaci enzymu po provedení postupu. Vhodné molární poměry jsou poskytnuty v příkladech. Vhodné reakční podmínky pro inaktivaci enzymů, které nejsou uvedeny příklady, mohou být stanoveny rutinními pokusy podle návodů.

Důležitým aspektem tepelné inaktivovaných enzymů podle předloženého vynálezu je jejich skladovací stabilita. Obecně jsou zde popsány sloučeniny stabilní po prodloužená časová období,

což odstraňuje nutnost přípravy bezprostředně před použitím. Například citrakonylatovaná Taq DNA polymeráza byla zjištěna jako zůstávající neaktivovaná alespoň po čtyři týdny, je-li uchovávána při 25 °C. Doporučované podmínky skladování se mění v závislosti na použitém modifikátoru, ale obecně by měl být přípravek inaktivovaného enzymu uchováván při nebo pod 5 teplotou místnosti (25 °C), výhodně v chladničce. Zejména by měly být uchovávány nestabilnější modifikované enzymy, jako jsou ty, které byly modifikovány 2,3-dimethylmaleinanhydridem.

Způsoby podle předloženého vynálezu zahrnují reakci směsi, obsahující reverzibilně inaktivovaný termostabilní enzym a podrobení reakční směsi vysokoteplotní inkubaci před nebo jako 10 integrální část amplifikační reakce. Vysokoteplotní inkubace vede k deacylaci aminoskupin a obnovení enzymové aktivity.

Deacylace modifikovaných aminoskupin vzniká jak ze zvýšení teploty tak z průvodního snížení pH. Amplifikační reakce jsou typicky prováděny v Tris-HCl pufru upraveném na pH 8,0 až 9,0 15 při teplotě místnosti. Při teplotě místnosti upřednostňují alkalické podmínky reakčního pufru acylovanou formu aminoskupiny. Ačkoliv je pH reakčního pufru upraveno na pH 8,0 až 9,0 při teplotě místnosti, snižuje se pH Tris-HCl reakčního pufru se zvyšující se teplotou. pH reakčního pufru se snižuje při zvýšených teplotách, při kterých se provádí amplifikace a, zejména, při kterých se provádí aktivační inkubace. Snížení pH reakčního pufru napomáhá deacylaci amino- 20 skupin.

Změna v pH, ke které dochází za vysokoteplotních reakčních podmínek, závisí na použitém pufru. Teplotní závislost na pH pro různé pufrы používané v biologických reakcích je uvedena v práci Gooda a spol., 1966, Biochemistry 5 (2): 467-477. Pro Tris-pufrы změna pKa, tj. pH při 25 středu pufrovacího rozmezí, se týká teploty následovně: $\Delta pK_a/^\circ C = 0,031$. Například Tris-HCl 25 pufr sestavený při 25 °C prochází poklesem v pKa na 2,17, jestliže se zahřeje na 95 °C pro aktivační inkubaci.

Ačkoliv se amplifikační reakce typicky provádějí v Tris-HCl pufru, mohou být amplifikační 30 reakce provedeny v pufrech, které vykazují menší nebo větší změnu pH s teplotou. V závislosti na použitém pufru může být žádoucí více nebo méně stabilně modifikovaný enzym. Například použití modifikačního činidla, které vede k méně stabilně modifikovanému enzymu umožňuje obnovení dostatečné enzymové aktivity za menších změn pufrového pH. Empirické porovnání relativních stabilit enzymů modifikovaných různými činidly, jak jsou uvedena výše, naznačuje 35 výběr modifikovaného enzymu vhodného pro použití v konkrétních pufrech.

V metodách podle předloženého vynálezu je dosaženo aktivace modifikovaného enzymu inkubací provedenou při teplotě, která je rovna nebo je vyšší než teplota primerové hybridizace (teplotní hybridizace) použitá v amplifikační reakci pro zajištění amplifikační specifčnosti. Délka 40 inkubace vyžadovaná pro obnovení enzymové aktivity závisí na teplotě a pH reakční směsi a na stabilitě acylovaných aminoskupin enzymu, která závisí na modifikátorových činidlech použitých při přípravě modifikovaného enzymu. Je možno použít široké rozmezí inkubačních podmínek; optimální podmínky se stanoví empiricky pro každou reakci. Obecně se inkubace provádí v amplifikačním reakčním pufru při teplotě větší než asi 50 °C po dobu mezi asi 10 sekundami 45 a asi 20 minutami. Optimalizace inkubačních podmínek pro reaktivaci enzymů není uvedena v příkladech ani nejsou uvedeny příklady reakční směsi, ale je možno tyto stanovit rutinními pokusy podle zde uvedených návodů.

V preferovaném provedení se PCR amplifikace provádí za použití reverzně inaktivované 50 termostabilní DNA polymerázy. Teplota tepelné hybridizace použitá v PCR amplifikaci je typicky asi 55 až 75 °C a předreakční inkubace se provádí při teplotě rovné nebo vyšší než je teplota teplotní hybridizace, výhodně při teplotě vyšší než asi 90 °C. Amplifikační reakční směs se výhodně inkubuje při asi 90 až 100 °C po asi 12 minut pro reaktivaci DNA polymerázy před teplotní cyklizací. Vhodné předreakční inkubační podmínky pro typické PCR amplifikace jsou

popsány v příkladech spolu s vlivem měnících se předreakčních inkubačních podmínek na amplifikaci.

První stupeň v typické PCR amplifikaci zahrnuje tepelnou denaturaci dvouřetězcové cílové nukleové kyseliny. Přesné podmínky vyžadované pro denaturaci vzorku nukleové kyseliny závisí na délce a složení vzorku nukleové kyseliny. Typicky je inkubace při 90 až 100 °C po dobu asi 10 sekund až asi 4 minut účinná pro úplnou denaturaci vzorku nukleové kyseliny. Počáteční denaturační stupeň může sloužit jako předreakční inkubace k reaktivaci DNA polymerázy. Nicméně v závislosti na délce a teplotě počátečního denaturačního stupně a modifikátoru použitým pro inaktivaci DNA polymerázy, obnovení DNA polymerázové aktivity může být kompletní. Je-li požadováno maximální obnovení enzymové aktivity může být předreakční inkubace prodloužena nebo alternativně může být zvýšen počet amplifikačních cyklů.

V preferovaném provedení vynálezu jsou modifikovaný enzym a počáteční denaturační podmínky zvoleny tak, že pouze frakce obnovitelné enzymové aktivity je obnovena během počátečního inkubačního stupně. Následné cykly PCR, který každý zahrnuje vysokoteplotní denaturační stupeň, vedou k dalšímu obnovení enzymové aktivity. Aktivace enzymové aktivity je tak opožděna proti počátečnímu cyklování amplifikace. Toto „časové uvolňování“ DNA polymerázové aktivity bylo pozorováno k dalšímu snížení nespecifické amplifikace. Je známo, že přebytek DNA polymerázy se podílí na nespecifické amplifikaci. V předložených metodách je přítomné množství DNA polymerázové aktivity nízké během počátečních stupňů amplifikace, je-li počet cílových sekvencí nízký, což redukuje množství vytvořených nespecifických prodloužených produktů. Maximální DNA polymerázová aktivita je přítomna během posledních stupňů amplifikace, kdy je počet cílových sekvencí vysoký a kdy jsou možné vysoké amplifikační výtěžky. Je-li to nezbytné, může být počet amplifikačních cyklů zvýšen pro kompenzaci nižšího množství DNA polymerázové aktivity přítomné v počátečních cyklech. Vliv měnících se počtů amplifikačních cyklů na amplifikaci je uveden v příkladech.

Výhoda metod podle předloženého vynálezu je v tom, že metody nevyžadují žádnou manipulaci reakční směsi po počáteční přípravě reakční směsi. Metody jsou ideální pro použití v automatizovaných amplifikačních systémech a v in situ amplifikačních metodách, kde přídavek činidel po počátečním denaturačním stupni nebo použití voskových bariér je nevýhodné nebo nepraktické.

Metody podle předloženého vynálezu jsou zvláště vhodné pro redukci nespecifické amplifikace v PCR. Nicméně vynález není omezen na jakýkoliv určitý amplifikační systém. Reverzibilně inaktivované enzymy podle předloženého vynálezu mohou být použity v jakémkoliv amplifikačním systému na bázi primerů, který používá termostabilní enzymy a zmírňuje reakční teplotu pro dosažení amplifikační specifičnosti. Předložené metody mohou být aplikovány na izotermální amplifikační systémy, které používají termostabilní enzymy. Pouze přechodná inkubace při zvýšené teplotě je vyžadována pro obnovení enzymové aktivity. Poté, co se reakční směs podrobí vysokoteplotní inkubaci za účelem obnovení enzymové aktivity, provádí se reakce při vhodné reakční teplotě.

Jiné amplifikační metody navíc k PCR (US patenty č. 4 683 195; 4 683 202 a 4 965 188) zahrnují, ale nejsou tak omezeny, následující: Ligase Chain Reaction (LCR, Wu a Wallace, 1989, Genomics 4:560-569 a Barany, 1991, Proc. Natl.Acad.Sci. USA 88:189-193); Polymeráze Ligase Chain Reaction (Barany, 1991, PCR Methods and Applic. 1:5-16); Gap-LCR (PCT patentová publikace č. WO 90/01069); Repair Chain Reaction (evropská patentová přihláška č. 439182 A2), 3SR (Kwoh a spol. 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86:1173-1177; Guatelli a spol. 1990, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87: 1874-1878; PCT patentová publikace WO 92/08800) a NASBA (US patent č. 5 130 238). Tento vynález není omezen na jakýkoliv určitý amplifikační systém. Pokud jsou vyvíjeny jiné systémy, mohou tyto systémy být přínosem pro provedení tohoto vynálezu. Poslední přehled amplifikačních systémů byl publikován v práci Abramsona a Myerse, 1993, Current Opinion in Biotechnology 4:41-47.

Ukázky metod přípravy vhodných pro každou amplifikační reakci jsou popsány v oboru (viz například Sambrook a spol., supra a odkazy popisující amplifikační metody citované výše). Jednoduché a rychlé metody přípravy vzorků pro PCR amplifikace cílových sekvencí jsou popsány v Higuchi, 1989, v PCR Technology (Erich ed., Stockton Press, New York) a v PCR Protocols, kapitoly 18-20 (Innis a spol., vyd. Academic Press, 1990). Odborník v oboru bude schopen vybrat a empiricky optimalizovat vhodný protokol.

Metody pro detekci amplifikovaných produktů byly popsány v literatuře. Standardní metody zahrnují analýzu gelovou elektroforézou nebo hybridizací oligonukleotidovými sondami. Detekce hybridů vytvořených mezi sondami a amplifikovanými nukleovými kyselinami může být provedena mnoha formami, zahrnujícími „dot-blot“ esejový formát a reverzní dot-blot esejový formát. (viz Saiki a spol., 1986, Nature 324:163-166; Saiki a spol. 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86:6230; PCT patentová publikace č. WO 89/11 548; US patenty č. 5 008 182 a 5 176 775; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (vyd. Innis a spol., Academic Press, San Diego, CA): 337-347. Reverzní dot-blot metody využívající mikrojамkových destiček jsou popsány v související US Serial No. 141355 (odpovídá EP-A 420 260); US patent č. 5 232 829; Loeffelholz a spol., 1992, J.Clin.Microbiol. 30(11):2847-2851; Mulder a spol., 1994, J.Clin. Microbiol. 32(2):292-300; a Jackson a spol., 1991, AIDS 5:1463-1467.

Další vhodná esejová metoda, označovaná jako 5'-nukleázová esej, je popsána v US patentu č. 5210015 a práci Hollanda a spol., 1991, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88:7276-7280. V 5'-nukleázové esejí jsou značené sondy degradovány současně s primerovým prodloužením při 5' ke 3' exonukleázové aktivitě DNA polymerázy, např. Taq DNA polymerázy. Detekce produktu rozpadu sondy indikuje jak objevení se hybridizace mezi sondou a cílovou DNA, tak výskyt amplifikační reakce. US patent č. 5 491 063 (odpovídá EP-A 699 768) a EP-A 713 921) popisuje zlepšené metody pro detekci degradace sondy, která se vyskytuje současně s amplifikací.

Alternativní metoda pro detekci amplifikace nukleové kyseliny monitorováním zvýšení celkového množství dvoušroubovicové DNA v reakční směsi je popsána v práci, jejímž autorem je Higuchi a spol., 1992, Bio/Technology 10:413-417, Higuchi a spol., 1993, Bio/Technology 11:1026-1030 a evropské patentové přihlášce č. 487 218 a 512 334. Detekce dvoušroubovicové cílové DNA je založena na zvýšené fluorescenci, kterou ethidiumbromid (EtBr) a jiné DNA vazebné značky vykazují, jsou-li navázány na dvoušroubovicovou DNA. Zvýšení dvoušroubovicové DNA vzniklé ze syntézy cílových sekvencí vede k detekovatelnému zvýšení fluorescence. Problémem této metody je, že syntéza necílové sekvence, tj. nespecifická amplifikace, vede ke zvýšení fluorescence, které interferuje s měřením zvýšení fluorescence vzniklé ze syntézy cílových sekvencí. Metody podle předloženého vynálezu jsou proto zvláště vhodné, že snižují nespecifickou amplifikaci a tím minimalizují zvýšení fluorescence vzniklé z amplifikace necílových sekvencí.

Předložený vynález se také týká kitů, multikontejnerových jednotek, obsahujících vhodné složky pro uskutečnění předložené metody. Vhodný kit obsahuje reverzibilně inaktivovaný termostabilní enzym a jedno nebo více činidel pro provedení amplifikační reakce, jako jsou oligonukleotidové primery, substrátové nukleosidové trifosfáty, kofaktory a vhodný pufr.

Příklady předloženého vynálezu uvedené dále jsou poskytnuty pouze pro ilustrativní účely a neomezují rozsah vynálezu. Různá provedení vynálezu v rozsahu nároků, které následují za příklady, budou zřejmá odborníkům v oboru po studiu předcházejícího textu a následujících příkladů.

Příklady provedení vynálezu

5 Příklad 1

Esej polymerázové aktivity

10 Všechna měření DNA polymerázové aktivity popsaná v příkladech dále byla provedena za použití následující eseje DNA polymerázové aktivity. Tato esej je v podstatě popsána v práci Lawyera a spol., 1989, J.Biol.Chem. 264:6427-6437 a v AmpliTaq^R DNA polymeráze product insert (Perkin Elmer, Norwalk, CT), obě práce jsou zde uvedeny jako odkazy.

15 Jedna jednotka enzymové aktivity je definována jako množství, které inkorporuje 10 nmol dTNP do kyselinového nerozpustného materiálu za 30 minut v 10 min inkubaci při 74 °C. Pro labilitu modifikovaných enzymů byly aktivity měřeny při 50 °C a normalizovány na standardní Taq DNA polymerázový roztok, který byl také zkoušen při 74 °C. Reakce byly provedeny v 50 µl objemu, obsahujícím následující činidla:

20 25 mM TAPS (tris-hydroxymethyl)-methyl-amino-propansulfonová kyselina, sodná sůl), pH 9,3 (při teplotě místnosti);
 50 mM KCl;
 2 mM MgCl₂;
 1 mM β-merkapt ethanol;
 25 200 µM každého z dATP, dGTP a dTTP;
 100 µM [α-³²P] -dCTP (0,05-0,1 Ci/mmol);
 DNA aktivovaného lososího sperma.

30 Příklad 2

Tento příklad popisuje modifikaci Taq DNA polymerázy za použití anhydridu kyseliny citrkonové. Měření aktivity citrakonylatované Taq DNA polymerázy, která indikují molární poměr modifikátoru k enzymu v inaktivační reakci, vyžadovaný pro dosažení kompletní inakti-

35 vace DNA polymerázové aktivity, jsou popsána v příkladu 3 dále.

Taq DNA polymeráza (AmpliTa^R, Perkin Elmer, Norwalk CT) byla použita v počáteční koncentraci 1,3 mg/ml. V počátečním pokusu byla Taq DNA polymeráza nejprve dialyzována proti 1000-násobnému přebytku v objemu 0,1 boritanu sodného při pH 8,63. Tento stupeň byl

40 shledán jako nepodstatný a v dalších pokusech byla TaqDNA polymeráza použita v Tris pufru (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 65 mM KCl, pH 7,5) přímo bez dialýzy proti boritanu sodnému.

Anhydrid kyseliny citrkonové (11,06 M) je obchodně dostupný (Aldrich, Milwaukee, WI). Výchozí roztok anhydridu kyseliny citrkonové se vytvoří ředěním 11,06M anhydridu kyseliny citrkonové 100-násobně v DMA (N,N-dimethylformamid).

45

Pro jednu sadu reakcí bylo vytvořeno postupné ředění roztoku anhydridu kyseliny citrkonové opakovaným 2-násobným ředěním v DMF. Pro každý roztok v sérii byly přidány 4 µM zředěného roztoku anhydridu kyseliny citrkonové ke 400 µM TaqDNA polymerázového roztoku (s dialýzou s boritanem sodným), za vzniku roztoků, obsahujících molární poměry anhydridu kyseliny citrkonové k TaqDNA polymeráze přibližně 80/1, 40/1, 20/1 a 10/1. Roztoky byly inkubovány přes noc při 4 °C pro inaktivaci TaqDNA polymerázy. Enzym, který byl modifikován v reakci s N-molárním přebytkem modifikátoru je zde označován jako NX enzym. Výsledné

50

citrakonfylatované TaqDNA polymerázy jsou zde označovány jako 80X, 40X, 20X a 10X TaqDNA polymerázy.

- 5 Další modifikační reakce byly prováděny za použití 80, 160X a 240X molárních poměrů anhydridu kyseliny citrakové k TaqDNA polymeráze (bez dialýzy proti boritanu sodnému). 160X a 240X poměry byly vytvořeny vhodnou úpravou výchozího ředění 11,06M anhydridu kyseliny citrakové v DMF (N,N-dimethylformamid). Například pro konečný 160X poměr se 11,06M anhydrid kyseliny citrakové zředí 1/50 v DMF, a 4 µl výsledného výchozího roztoku anhydridu kyseliny citrakové se přidají ke 400 µl TaqDNA polymerázového roztoku. Výsledné
10 TaqDNA polymerázy jsou označovány zde jako 240X, 160X a 80X TaqDNA polymerázy.

Příklad 3

- 15 Inaktivace a tepelné obnovení DNA polymerázové aktivity za použití anhydridu kyseliny citrakové

- Tento příklad popisuje měření citrakonylatovaných TaqDNA polymeráz z příkladu 2 jak před, tak po reaktivaci citrakonylatované TaqDNA polymerázy tepelnou inkubací. Byl měřen vliv
20 pH na množství aktivity získané po tepelné reaktivaci citrakonylatovaných TaqDNA polymeráz.

- Vzorky citrakonylatovaných TaqDNA polymeráz byly zředěny 1/200 v pufru, obsahujícím 10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,5 % Tweenu 20, 0,5 % NP-40, 16 % glycerinu. pH pufru bylo 8,25 při teplotě místnosti. Zředěné vzorky citrakonylatované TaqDNA polymerázy
25 byly inkubovány při 90 °C po 20 minut nebo udržovány při teplotě místnosti jako kontrola. Po zpracování byly vzorky zředěny 1/5 v enzymovém ředicím pufru (25 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM β-merkaptioethanolu, 0,5 % TweenTM20, 0,5 % NP-40, 0,1 % želatiny) a aktivita byla sledována jak je popsáno v příkladu 1. DNA polymerázové aktivity po zpracování jsou uvedeny dále. Molární poměr se týká molárního poměru anhydridu kyseliny citrakové
30 k TaqDNA polymeráze za použití modifikační reakce. Každá z aktivit je průměrem ze dvou aktivit naměřených v duplikátu vzorků.

Aktivita (% kontroly)

molární poměr	nezahříváno	90 °C inkubace
kontrola	100	
80X	0	16
40X	0	28
20x	3,7	38
10X	38	63

- 35 Kompletní inaktivace TaqDNA polymerázy byla získána za použití více než 20-násobného molárního přebytku anhydridu kyseliny citrakové. Po inkubaci plně inaktivované TaqDNA polymerázy při 90 °C po 20 minut bylo obnoveno minimálně 16 % aktivity.

- 40 I když byla obnovena vyšší enzymová aktivita za použití 40X citrakonylatované TaqDNA polymerázy než za použití 80X citrakonylatované TaqDNA polymerázy, je mnohem praktičtější použít 80X (nebo vyšší) citrakonylatovanou TaqDNA polymerázu v komerčním kitu pro umožnění větších výrobních tolerancí.

- 45 Podobné pokusy byly provedeny za použití pufru upraveného na pH 7,75 při teplotě místnosti. Výsledky jsou uvedeny dále.

Aktivita (% kontroly)

molární poměr	nezahříváno	90 °C inkubace
kontrola	100	
80X	0	61
40X	0	67
20X	3,5	70
10X	35	77

- 5 Množství obnovené DNA polymerázové aktivity bylo větší při nižším pH.

Aktivity 80X a 160X TaqDNA polymerázy (bez dialýzy boritanem sodným) byly měřeny před a po reaktivaci tepelnou inkubací v podstatě jak popsáno výše. pH pufru použitého pro inkubaci bylo 8,0 při teplotě místnosti. Výsledky jsou uvedeny dále. Každá z aktivit je průměr ze dvou aktivit naměřených z duplikátních vzorků.

Aktivita (% kontroly)

molární poměr	nezahříváno	90 °C inkubace
kontrola	100	
160X	0	19
80X	0	29

- 15 Vliv pH na reaktivaci je možno zjistit ze srovnání aktivity obnovené za použití 80X TaqDNA polymeráz ze tří reaktivací při různém pH. Výše uvedené údaje naznačují, že se enzymová aktivita obnoví i při vysokém molárním přebytku modifikátoru použitého v modifikační reakci.

20 Příklad 4

PCR amplifikace za použití citrakonylatovaných TaqDNA polymerázy

- 25 Tento příklad popisuje použití citrakonylatované Taq termostabilní DNA polymerázy popsané v příkladu 2 v PCR amplifikaci.

PCR protokol

- 30 Amplifikace byly prováděny za použití 1/20, 1/40 a 1/80 ředění 240X modifikované TaqDNA polymerázy popsané v příkladu 2. Ředění byla prováděna v pufru složeném ze 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 (při teplotě místnosti), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), 1 mM DTT (dithiothreitol), 50 % glycerinu, 0,5 % Tweenu 20, 0,5 % Nonidetu P40 (AmpliTaQ R uchovávací pufr, Perkin Elmer, Norwalk, CT). Pro porovnání byly amplifikace také provedeny za použití 1/10, 1/20, 1/40 a 1/80 ředění nemodifikované TaqDNA polymerázy.

- 35 Klonovaná HTLV-I genomická sekvence byla amplifikována za použití primerů SK432 a SK111. Primerové sekvence jsou uvedeny v US patentu č. 5 418 149, zahrnutém zde jako odkaz. PCR byla provedena ve 100 µl reakčním objemu za následujících reakčních podmínek.

- 40 Reakční směs:
30 kopií HTLV-IDNA templátu;
10 mM Tris, pH 8,3;
50 mM KCl;

0,5 μ M každého primeru;
 200 μ M dATP, dCTP a dGTP;
 400 μ M dUTP;
 0,5 μ l roztoku citrakonylatované TaqDNA polymerázy;
 2,5 mM $MgCl_2$;
 1 ng hpDNA;
 1 jednotka UNG (Perkin Elmer, Norwalk, CT).

Profil tepelného cyklování:

10	Předreakční podmínky:	(90 °C za 10 minut)
	2 cykly	denaturace 98 °C 1 minuta
		teplotní hybridizace/prodloužení 60 °C 2 minuty
	38 cyklů	denaturace 94 °C 1 minuta
		teplotní hybridizace/prodloužení 60 °C 1 minuta
	konečná inkubace	60 °C 7 minut

Amplifikované produkty byly analyzovány pomocí elektroforézy na 4% agarosovém gelu za použití 1x TBE (0,089 M Tris, 0,089 M kyseliny borité, 0,0025 M dvojsodného EDTA) vyvíjecího pufru. Elektroforéza byla provedena při 100 voltech po přibližně 2 hodiny. Ethidium bromid (0,5 μ l/ml) byl přidán po elektroforéze pro vybarvení jakékoliv přítomné DNA. Gel byl odbarven v 1X TBE a pruhy DNA vybarvené ethidiumbromidem byly vizualizovány použitím UV ozařování.

Výsledky

Výsledky jsou uvedeny na obr. 2. Pruh, odpovídající amplifikované cílové sekvenci je označen. Pruhy, objevující se na gelu jiné než pruh, který odpovídá amplifikované cílové sekvenci odpovídají produktům vzniklým nespecifickou amplifikací necílových sekvencí. Vliv použití citrakonylatované TaqDNA polymerázy (značená Taq, HS) na amplifikaci je možno zjistit z porovnání tvaru pruhů a intenzity v každé z drah. Protože amplifikace nespecifických produktů soutěží s amplifikací cílové sekvence, zvýšení amplifikace cílové sekvence dále indikuje velikost redukce nespecifické amplifikace. Proto změna v relativním množství produktů v každé dráze lépe indikuje vliv předreakčních zpracování na nespecifickou amplifikaci.

Amplifikace za použití nemodifikované TaqDNA polymerázy vedou k převážně nespecifickým amplifikačním produktům. Použití citrakonylatované TaqDNA polymerázy vede k významnému zvýšení intenzity pruhu, odpovídajícího amplifikované cílové sekvenci a významnému snížení v intenzitě pruhů odpovídajících nespecifickým amplifikačním produktům. Údaje znamenají, že PCR amplifikace za použití reverzibilně inaktivované DNA polymerázy významně redukuje nespecifickou amplifikaci a významně zvyšuje množství požadované amplifikované cílové sekvence.

Příklad 5

Jiné citrakonylatované termostabilní DNA polymerázy

Tento příklad popisuje citrakonylaci několika jiných termostabilních DNA polymeráz navíc k TaqDNA polymeráze popsané výše. Byly modifikovány následující termostabilní DNA polymerázy:

1) termostabilní DNA polymeráza z *Thermus thermophilus* (rTth, Perkin Elmer, Norwalk, CT), jak je popsána ve WO 91/09 950, zahrnutém zde jako odkaz.

2) mutant termostabilní DNA polymerázy z *Thermatoga maritima* (UITmaTM, Perkin Elmer, Norwalk, CT), jak je popsána ve WO 92/03 556, zahrnutém zde jako odkaz.

- 5 3) mutantní forma termostabilní DNA polymerázy z *Thermus aquaticus*, který postrádá 3' k 5' exonukleázovou aktivitu, jak je popsána ve WO 92/06200, zahrnutém zde jako odkaz. Tento enzym je zde označován jako Taq CS nebo AmpliTaq^RCS.

10 Pro každou z výše uvedených tří DNA polymeráz byl připraven počáteční roztok o přibližné koncentraci 200 jednotek/μl. Pro srovnání 1,3 mg/ml TaqDNA polymerázy, jak je použita v předchozích příkladech, je přibližně ekvivalentní 260 jednotkám/μl. Každá z DNA polymeráz byla modifikována v podstatě jak je popsáno v příkladu 2 výše. Deset μl anhydridu kyseliny citrkonové bylo zředěno v 500 μl DMF. Potom bylo 10 μl zředěného anhydridu kyseliny citrkonové kombinováno s 1000 μl každého z enzymových roztoků. Výsledné roztoky byly inkubovány přes noc při 4 °C.

Příklad 6

- 20 PCR amplifikace za použití citrakonylatovaných DNA polymeráz

Tento příklad popisuje použití citrakonylatovaných termostabilních DNA polymeráz, popsaných v příkladech 2 a 5, v PCR amplifikacích.

- 25 PCR protokol

Amplifikace byly prováděny za použití ředění DNA polymeráz. Ředění byla prováděna v pufru složeném ze 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 (při teplotě místnosti), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), 1 mM DTT (dithiothreitol), 50 % glycerinu, 0,5 % Tweenu 20, 0,5 % Nonidetu P40 (AmpliTa^R uchovávací pufr, Perkin Elmer; Norwalk, CT).

35 HIV-1 genomická sekvence byla amplifikována za použití primerů SK145 a SK431 (Perkin Elmer, Norwalk, CT). Primery SK 145 a SK 431 jsou popsány v US patentu č. 5 481 149 a v následujících vědeckých publikacích: SK 145 je popsán v práci Kwoka a spol., 1990, *Nucleic Acids Res.* 18:999-1005; SK 431 je popsán v práci Jacksona a spol., 1991, *AIDS* 5:1463-1467. PCR byla provedena ve 100 μl reakčním objemu za následujících reakčních podmínek:

Reakční směs:

- 30 kopií HTLV-IDNA templátu;
40 10 mM Tris, pH 8,3;
50 mM KCl;
0,5 μM každého primeru;
200 μM dATP, dCTP a dGTP;
400 μM dUTP;
45 0,5 μl roztoku DNA polymerázového roztoku;
2,5 mM MgCl₂;
1 ng hpDNA;
1 jednotka UNG (Perkin Elmer, Norwalk, CT).

Profil tepelného cyklování:

Předreakční podmínky:	(95 °C za 12 minut)
38 cyklů denaturace	94 °C 1 minuta
teplotní hybridizace/prodloužení	60 °C 1 minutu
konečná inkubace	60 °C 7 minut

- 5 Předreakční stupeň slouží také jako počáteční denaturační stupeň. Počáteční denaturační stupeň se rutinně používá v typické amplifikační reakci pro zajištění kompletní denaturace dvoušroubovicového cíle. Každý cyklus PCR začíná denaturačním stupněm při 94 °C po 1 minutu. Potom bezprostředně následuje předreakční inkubace prováděná při 95 °C po 12 minut, reakční směs se inkubuje při 94 °C 1 minutu během denaturačního stupně prvního cyklu.

- 10 Amplifikované produkty byly analyzovány pomocí elektroforézy na agarosovém gelu (100 ml 3% NuSieve^R a 0,5% SeaChem^R) za použití 1x TBE (0,089 M Tris, 0,089 M kyseliny borité, 0,0025 M dvojsodného EDTA) vyvíjecího pufru. Elektroforéza byla provedena při 100 voltech po přibližně 2 hodiny. Ethidium bromid (0,5 µl/ml) byl přidán po elektroforéze pro vybarvení jakékoliv přítomné DNA. Gel byl odbarven v 1X TBE a pruhy DNA vybarvené ethidiumbromidem byly vizualizovány použitím UV ozařování.

Amplifikace za použití citrakonylatovaných DNA polymeráz

- 20 Ředění (1/10, 1/20, 1/40 a 1/80) citrakonylatovaných DNA polymeráz popsaná v příkladu 5 a 240X citrakonylatované TaqDNA polymerázy, popsané v příkladu 1, byla použita pro amplifikace HIV-1 nukleové kyseliny a amplifikované produkty byly analyzovány elektroforézou na agarosovém gelu. Pro srovnání byly amplifikace provedeny za použití ředění nemodifikované TaqDNA polymerázy.

- 25 Výsledky jsou uvedeny na obr. 3. Pruh, odpovídající amplifikované cílové sekvenci je označen. Pruhy, objevující se na gelu jiné než pruh, který odpovídá amplifikované cílové sekvenci, odpovídají produktům vzniklým nespecifickou amplifikací necílových sekvencí. Vliv použití citrakonylatované DNA polymerázy na amplifikaci je možno zjistit z porovnání tvaru pruhů a intenzity v každé z drah. Protože amplifikace nespecifických produktů soutěží s amplifikací cílové sekvence, zvýšení amplifikace cílové sekvence dále indikuje velikost redukce nespecifické amplifikace. Proto změna v relativním množství produktů v každé dráze nejlépe indikuje vliv předreakčních zpracování na nespecifickou amplifikaci.

- 35 Amplifikace za použití nemodifikované TaqDNA polymerázy vedou k převážně nespecifickým amplifikačním produktům. Použití citrakonylatované TaqDNA polymerázy vede k významnému zvýšení intenzity pruhu, odpovídajícího amplifikované cílové sekvenci u téměř 1/80 ředění a významnému snížení v intenzitě pruhů odpovídajících nespecifickým amplifikačním produktům. Údaje znamenají, že PCR amplifikace za použití reverzibilně inaktivované DNA polymerázy významně redukuje nespecifickou amplifikaci a významně zvyšuje množství požadované amplifikované cílové sekvence.

- 40 Použití citrakonylatovaných UITma, Taq CS a rTth DNA polymeráz také vede k větší produkci specifického amplifikačního produktu, než tomu je v amplifikacích za použití nemodifikované TaqDNA polymerázy, spolu se současnou redukcí množství nespecifického amplifikačního produktu. Výsledky demonstrují, že metody podle předloženého vynálezu jsou aplikovatelné na termostabilní DNA polymerázy obecně.

- 50 Je třeba uvést, že ačkoliv výsledky demonstrují funkčnost předloženého vynálezu, výsledky získané s citrakonylatovanými Taq, UITma, Taq CS a rTth DNA polymerázami nejsou přímo

srovnatelné, protože modifikační podmínky byly nesrovnatelně optimalizovány pro každou DNA polymerázu. Ačkoliv každý počáteční roztok DNA polymerázy obsahuje stejně jednotek/ml, molarita roztoku nebyla stanovena, a proto nebyl stanoven molární přebytek anhydridu kyseliny citrkonové v každé modifikační reakci. Odborník v oboru bude schopen zjistit empiricky optimální modifikační podmínky za použití zde popsaných protokolů.

Příklad 7

10 Cis-Akonitylovaná DNA polymeráza

Tento příklad popisuje použití modifikace TaqDNA polymerázy za použití anhydridu kyseliny cis-akonitové.

15 Byly provedeny modifikace za použití anhydridu kyseliny cis-akonitové, jak je popsáno v příkladu 2, s tím hlavním rozdílem, že anhydrid kyseliny cis-akonitové je dostupný jako prášek a ne jako kapalina. TaqDNA polymeráza (AmpliTaq^R, Perkin Elmer, Norwalk CT) v Tris pufru (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 68 mM HCl, pH 7,5) byl použit za výchozí koncentrace 1,3 mg/ml. Výchozí roztok anhydridu kyseliny cis-akonitové (Aldrich, Milwaukee, WI) byl
20 vytvořen rozpuštěním anhydridu kyseliny cis-akonitové v 1 ml 100% EtOH.

K roztoku 1000 µl TaqDNA polymerázy bylo přidáno buď 10 nebo 20 µl roztoku anhydridu kyseliny cis-akonitové a získány tak roztoky, obsahující molární poměry anhydridu kyseliny cis-akonitové k TaqDNA polymeráze přibližně 90/1 a 180/1. Roztoky byly inkubovány přes noc při
25 4 °C pro inaktivaci TaqDNA polymerázy.

Porovnání amplifikací za použití cis-akonitylatované TaqDNA polymerázy a amplifikací za použití citrakonylatované TaqDNA polymerázy jsou popsána dále.

30 Příklad 8

Inaktivace a tepelná obnova DNA polymerázové aktivity za použití anhydridu kyseliny cis-akonitové

35 Aktivity 90X a 180X cis-akonitylovaných TaqDNA polymeráz připravených v příkladu 7 byly měřeny před a po reaktivaci tepelnou inkubací v podstatě jak je popsáno v příkladu 3 výše. pH pufru během inkubací bylo 8,0. Výsledky jsou uvedeny dále. Každá z aktivit je průměr ze dvou aktivit naměřených v duplikátních vzorcích.

40 Aktivita (% kontroly)

molární poměr	nezahříváno	90 °C inkubace
kontrola	100	
180X	0	50
90X	3	118

45 Porovnání výsledků s výsledky z příkladu 3 znamená, že cis-akonitylace je snadněji reverzní než citrakonylace. Vyšší molární přebytek anhydridu kyseliny cis-akonitové je nezbytný ke kompletní inaktivaci DNA polymerázy a je obnovena větší aktivita po vysokotepelné inkubaci. Důvod pro naměření aktivity větší než 100 % po modifikaci 90-násobným molárním přebytkem anhydridu kyseliny cis-akonitové s následnou tepelnou reaktivací je neznámý, ale může být přičten nepřesnosti v aktivitní esaji nebo může odrážet aktuální modifikaci DNA polymerázy.

50

Příklad 9

Vliv předreakční inkubační doby

Tento příklad popisuje vliv předreakční inkubační doby na množství získaného produktu.

Amplifikace byly provedeny za použití citrakonylatovaných a cis-akonitylovaných TaqDNA polymeráz připravených jak popsáno výše. Pro každou sadu byly použity amplifikační podmínky, TaqDNA polymerázy modifikované použitím 80-násobného a 160-násobného molárního přebytku anhydridu kyseliny citrkonové a 90-násobného a 180-násobného molárního přebytku anhydridu kyseliny cis-akonitové. Amplifikace byly provedeny za použití HIV-1 modelového systému popsaného v příkladu 6 výše s tím rozdílem, že počáteční předreakční podmínky byly měněny. Pro každý enzymový přípravek byly prováděny amplifikace za použití předreakčních inkubací 12, 6, 3 a 0 minut.

Jak je uvedeno výše, slouží také předreakční inkubační stupeň jako počáteční denaturační stupeň. Každý cyklus PCR začíná denaturačním stupněm. Bezprostředně po počáteční předreakční inkubaci, provedené při 95 °C po 12, 6, 3 nebo 0 minut, se každá reakční směs inkubuje při 94 °C po 1 minutu během denaturačního stupně prvního cyklu. Tak, i když není použita žádná předreakční inkubace, je enzymová aktivita obnovena během denaturačního stupně počátečního cyklu.

Amplifikační produkty byly analyzovány elektroforézou na agarózovém gelu. Výsledky jsou uvedeny na obr. 4. Pruh, odpovídající amplifikované cílové sekvenci je označen. Pruhy, objevující se na gelu, jiné než pruh, který odpovídá amplifikované cílové sekvenci, odpovídají produktům generovaným nespecifickou amplifikací necílových sekvencí.

Výsledky ukazují, že použitím cis-akonitylovaných DNA polymeráz všechny předreakční inkubační doby vedou k silnému pruhu, odpovídajícímu amplifikovanému produktu. Amplifikace prováděné bez předreakční inkubace nevedou k takovému množství produktu jako amplifikace za použití prodloužených předreakčních inkubací.

Naopak výsledky ukazují, že při použití citrakonylatované DNA polymerázy předreakční inkubace alespoň 3 minuty byla vyžadována pro získání maximálního množství amplifikovaného produktu. Amplifikace prováděné bez předreakční inkubace vedly k významně menšímu množství amplifikovaného produktu. Výsledky indikují, že aktivita cis-akonitylovaných DNA polymeráz je obnovena mnohem rychleji než u citrakonylatovaných DNA polymeráz.

Příklad 10

Vliv počtu cyklů

Tento příklad popisuje vliv zvýšení počtu amplifikačních cyklů na kompenzování krátké předreakční inkubační doby.

Byly provedeny amplifikace za použití TaqDNA polymeráz modifikovaných použitím 80-násobného a 160-násobného molárního přebytku anhydridu kyseliny citrkonové a 90-násobného a 180-násobného molárního přebytku anhydridu kyseliny cis-akonitové. Amplifikace byly provedeny v podstatě jak je popsáno výše za použití HIV-1 modelového systému popsaného v příkladu 6 s tím rozdílem, že byly měněny počty počátečních předreakčních inkubací a cyklů. Pro každý enzymový přípravek byly provedeny amplifikace za použití následujících podmínek:

předreakční inkubace
12 minut, 80 °C

amplifikační cykly

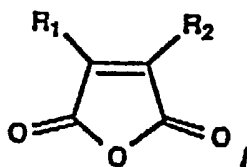
0	60
0	60
0	48
0	43
0	39

Amplifikační produkty byly analyzovány elektroforézou na agarózovém gelu. Výsledky jsou uvedeny na obr. 5. Výsledky ukazují, že zvýšení počtu amplifikačních cyklů může kompenzovat ztrátu účinnosti vzniklou z nekomplexní reaktivace DNA polymerázové aktivity, jestliže nebyla použita předreakční inkubace.

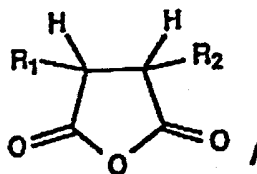
Pro každou DNA polymerázu vede zvýšení počtu amplifikačních cyklů ke zvýšení amplifikovaného produktu. Vliv byl nejmenší při použití cis akonitylatované TaqDNA polymerázy, jak je uvedeno na obr. 9 při potřebě malé, pokud vůbec nějaké, předreakční inkubace.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Chemicky modifikovaný termostabilní enzym, v nemodifikovaném stavu vykazující aktivitu DNA polymerázy nebo aktivitu ligázy, který je reverzibilně inaktivován reakcí směsi termostabilního enzymu s modifikačním činidlem, přičemž tato reakce se provádí při alkalickém pH a teplotě nižší než 25 °C, modifikačním činidlem je anhydrid dikarboxylové kyseliny obecného vzorce



kde R₁ a R₂ jsou atomy vodíku nebo organické radikály, které mohou být spojeny, nebo obecného vzorce



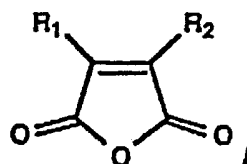
kde R₁ a R₂ jsou organické radikály, které jsou přednostně spojeny, a atomy vodíku mají konfiguraci cis,

a vede k úplné inaktivaci enzymové aktivity.

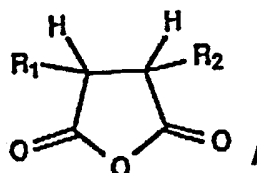
2. Chemicky modifikovaný termostabilní enzym podle nároku 1, vyznačující se tím, že inkubace chemicky modifikovaného termostabilního enzymu ve vodném pufru při alkalickém pH při teplotě, která je menší než 25 °C, nevede k významnému zvýšení enzymové aktivity za méně než 20 minut a že inkubace uvedeného chemicky modifikovaného enzymu ve

vodném pufru, upraveném na pH 8 až 9 při 25 °C, při teplotě vyšší než 50 °C poskytne alespoň dvojnásobné zvýšení enzymové aktivity za méně než 20 minut.

3. Chemicky modifikovaný termostabilní enzym podle nároku 1 nebo 2, kde reverzibilně inaktivovanou enzymovou aktivitou je aktivita termostabilní DNA polymerázy získané z druhů vybraných z *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus* a *Thermotoga maritima*.
4. Chemicky modifikovaný termostabilní enzym podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, který je produkován za použití modifikačního činidla vybraného ze skupiny, zahrnující maleinanhydrid, anhydrid kyseliny exo-cis-3,6-endoxo-delta⁴-tetrahydroftalové; anhydrid kyseliny citrakonové, 3,4,5,6-tetrahydroftalanhydrid, anhydrid kyseliny cis-akonitové a anhydrid kyseliny 2,3-dimethylmaleinové.
5. Chemicky modifikovaný termostabilní enzym podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, který je produkován reakcí při níž se modifikačního činidla použije ve více než 20-násobném přebytku vzhledem k uvedenému termostabilnímu enzymu.
6. Chemicky modifikovaný termostabilní enzym podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, který je produkován reakcí směsi termostabilního enzymu s modifikačním činidlem, kde termostabilním enzymem je termostabilní DNA polymeráza získaná z *Thermus aquaticus* a modifikačním činidlem je anhydrid kyseliny citrakonové.
7. Chemicky modifikovaný termostabilní enzym podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, který je produkován reakcí směsi termostabilního enzymu s modifikačním činidlem, kde termostabilním enzymem je termostabilní DNA polymeráza získaná z *Thermus thermophilus* a modifikačním činidlem je anhydrid kyseliny cis-akonitové.
8. Způsob přípravy chemicky modifikovaného termostabilního enzymu, který v nemodifikovaném stavu vykazuje aktivitu DNA polymerázy nebo aktivitu ligázy, přičemž chemická modifikace má za následek reverzibilní inaktivaci aktivity enzymu, vyznačující se tím, že zahrnuje reakci směsi termostabilního enzymu s modifikačním činidlem prováděnou při alkalickém pH a teplotě nižší než 25 °C, přičemž modifikačním činidlem je anhydrid dikarboxylové kyseliny obecného vzorce



kde R₁ a R₂ jsou atomy vodíku nebo organické radikály, které mohou být spojeny, nebo obecného vzorce



kde R₁ a R₂ jsou organické radikály, které jsou přednostně spojeny, a atomy vodíku jsou v konfiguraci cis,

přičemž uvedená reakce vede k úplné inaktivaci enzymové aktivity.

9. Chemicky modifikovaný termostabilní enzym připravený způsobem podle nároku 8.

10. Způsob amplifikace cílové nukleové kyseliny ve vzorku, **vyznačující se tím**, že zahrnuje stupně

5

(a) kontaktování vzorku s amplifikační reakční směsí obsahující primer komplementární k cílové nukleové kyselině a chemicky modifikovaný termostabilní enzym podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 a 9 a

10

(b) inkubaci výsledné směsi ze stupně (a) při teplotě nad 50 °C po dobu dostačující k reaktivaci chemicky modifikovaného termostabilního enzymu a umožnění tvorby produktů prodlužování primerů.

15

11. Amplifikační směs pro polymerázové řetězové reakce, **vyznačující se tím**, že obsahuje pár primerů a chemicky modifikovaný termostabilní enzym podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 a 9.

20

12. Kit pro provedení polymerázové řetězové reakce, **vyznačující se tím**, že obsahuje chemicky modifikovaný termostabilní enzym podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 a 9.

5 výkresů

Obr. 1

anhydrid kyseliny cis-akonitové

anhydrid kyseliny citrakonové

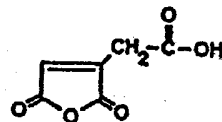
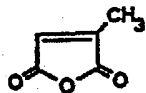
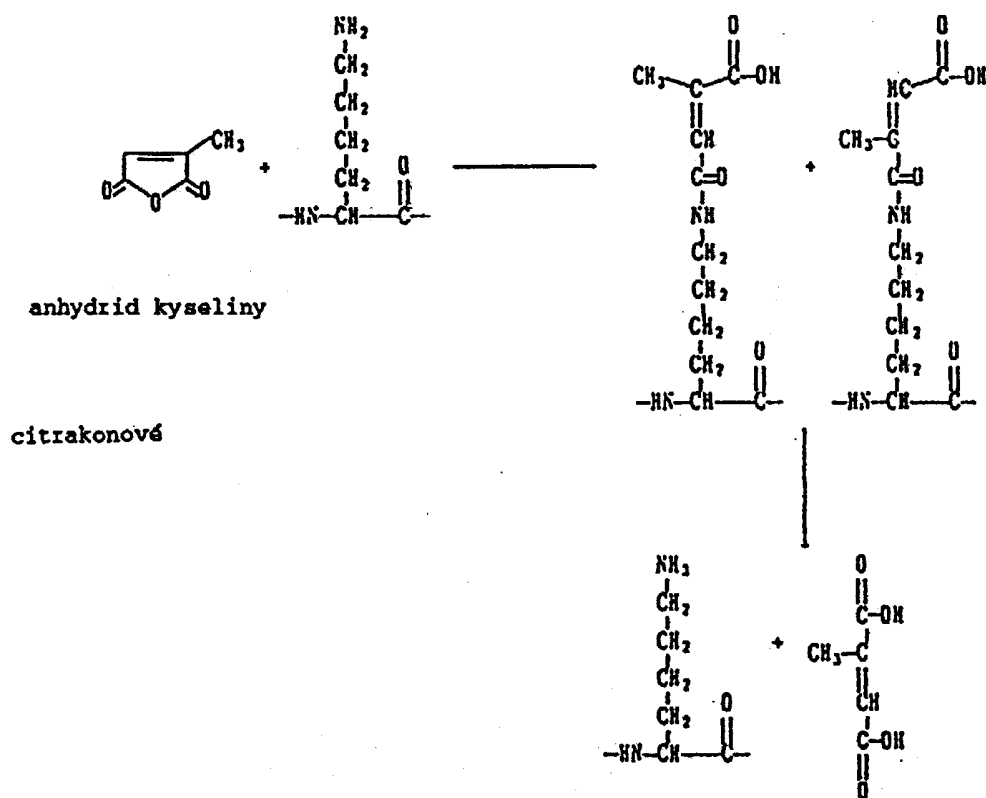


Schéma reverzibilní reakce anhydridu kyseliny citrakonové
a lysinovými zbytky

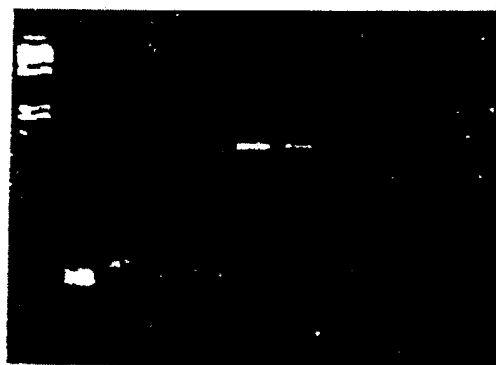


Obr. 2

HTLV amplifikace

primery: SK111/SK432,
templát: PMC E56, 30 kopií
standardy: ϕ X 174/Hae III

	Taq				Taq, HS		
stds	1/10	1/20	1/40	1/80	1/20	1/40	1/80



← c11

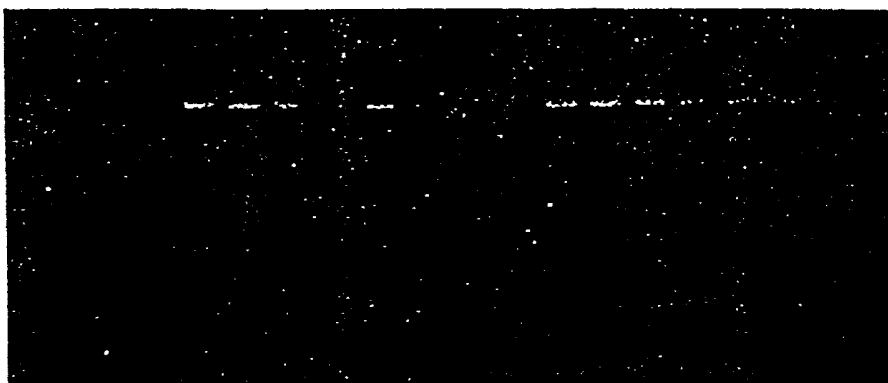
Obr. 3

HTLV amplifikace

primery: SK145/SK431

templát: 100 kopií

HSI (derivatizovaný)															
Taq				Taq				UITma				Taq,CS			
1/10	1/20	1/40	1/80	1/10	1/20	1/40	1/80	1/10	1/20	1/40	1/80	1/10	1/20	1/40	1/80



↑ cíl

Obr. 4

HIV amplifikace s AmpliTaq, HS

Primery" SK145/SK431

templát: 100 kopií

cis-akonitový				citrakonový											
90x				180x				80x				160x			
12	6	3	0	12	6	3	0	12	6	3	0	12	6	3	0



← cfl

12, 6, 3 nebo 0 minut předaktivace při 95 °C před 38 PCR
cykly

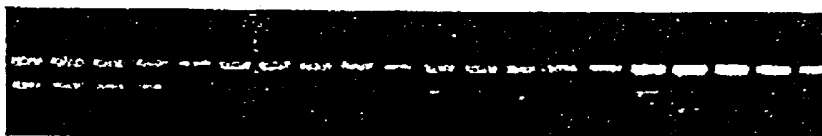
Obr. 5

HIV amplifikace s AmpliTaq, HS

Primery" SK145/SK431

templát: 100 kopií

cis	90x	cis	180x	cit	80x	cit	160x
<u>60</u>	60 48 43 39	<u>60</u>	60 48 43 39	<u>60</u>	60 48 43 39	<u>60</u>	60 48 43 39



60=60 cyklů po 12 min, 80 °C předinkubace
60=60 cyklů, žádná předinkubace
48=48 cyklů, žádná předinkubace
43=43 cyklů, žádná předinkubace
39=39 cyklů, žádná předinkubace

Konec dokumentu
