(12) **PATENT**

(19) NO (11) **317111** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] C 12 Q 1/68 , G 0 1N 33/50

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19944655	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	1993.06.07 PCT/EP93/01435
(22)	Inng.dag	1994.12.02	(85)	Videreføringsdag	1994.12.02
(24)	Løpedag	1993.06.07	(30)	Prioritet	1992.06.05, GB, 9211979
(41)	Alm.tilgj	1995.02.03			
(45)	Meddelt:	2004.08.16			

(71) Søker Peter Eigil Nielsen, Hjortevænget 509, DK-2980 Kokkedal, DK
Michael Egholm, 1231 Lexington Ridge Drive, Lexington, MA 02173, US
Rolf Henrik Berg, Langelandsvej 20 B, 3. tv., DK-2000 Frederiksberg, DK
PNA Diagnostics A/S , Rønnegade 2, DK-2100 København Ø, DK
Ole Buchardt

(72) Oppfinner Peter Eigil Nielsen, Hjortevænget 509, DK-2980 Kokkedal, DK
Christopher John Stanley, 17A Millington Road, CB9HW Cambridge, GB
Michael Egholm, 1231 Lexington Ridge Drive, Lexington, MA 02173, US
Rolf Henrik Berg, Langelandsvej 20 B, 3. tv., DK-2000 Frederiksberg, DK
Ole Buchardt, DK

(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS , Postboks 7085 Majorstua, 0306 Oslo, NO

(54) Benevnelse **Anvendelse av nukleinsyreanaloger for inhibering av nukleinsyreamplifikasjon.**

(56) Anførte publikasjoner
WO 9112342, WO 9207957
P.E. Nielsen et al, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science, 1991, Vol. 254, s. 1497-1500
M Egholm et al, "Peptide nucleic acid (PNA), oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone", Journal of American Chemical Society, Vol. 114, s. 1895-1895-1897

(57) Sammendrag

Nukleinsyreanaloger av typen beskrevet i PCT/EP92/01220 (PNA) Som hybridiserer sterkt til nukleinsyrer, anvendes for å inhibere en nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre slik som PCR. Falske positiver i etterfølgende PCR-analyser forhindres ved å hybridisere en PNA til PCR-amplifikasjonsprodukter. Analyser som er i stand til å skjelne mellom enkeltbaseparmutanter, konstrueres ved anvendelse av en PNA-hybridisering til én av de to allele former for selektivt å inhibere en PCR-amplifikasjon av denne form. Asymmetriske PCR amplifikasjoner utføres ved å innlede en PCR symmetrisk ved anvendelse av like mengder forover- og reversprimere, og inaktivere én primer når amplifikasjonen er etablert ved å hybridisere en PNA til denne.

Foreliggende oppfinnelse angår fremgangsmåte for inhibering av en nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre, i hvilken prosedyre hver tråd av en dobbelttrådet målnukleinsyre har et område anvendt som et templat for én eller flere primere som er utvidet eller forbundet under dannelse av et andre templat komplementært med dette templat, fremgangsmåte for å forhindre at et nukleinsyreamplifikasjonsprodukt tjener som et templat i en etterfølgende amplifikasjonsprosedyre, fremgangsmåte for utførelse av en asymmetrisk nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre hvori hver tråd av en dobbelttrådet målnukleinsyre har et område anvendt som et templat for en primer som utvides for å danne et andre templat komplementært med dette templat, sett for anvendelse ved utførelse av en nukleinsyreamplifikasjons-reaksjon samt reagens for anvendelse til å inhibere en nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre.

Nukleinsyreamplifikasjonsteknikker anvendes nå i bredt omfang. Disse inkluderer "PCR"(polymerasekjedereaksjons)prosedyrer beskrevet i EP-A-0200362 og EP-A-0201184 som er teknikken som anvendes i bredest omfang, men også "LCR" (ligasekjedereaksjon) beskrevet i EP-A-0320308 og den såkalte "NASBA"- eller "3SR"-teknikk som er beskrevet i "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", vol. 87, s. 1874-1878, mars 1990 og "Nature", vol. 350, nr. 6313, s. 91-92, 7. mars 1991.

Et hovedproblem ved anvendelse av disse prosedyrer i diagnostikken er dannelse av falske, positive prøver ved overføring av amplifiserte nukleinsyresekvenser fra tidligere reaksjoner. Fordi disse prosedyrer er i stand til å gi et positivt resultat dersom selv et enkelt molekyl inneholdende målsekvensen er til stede, er det selvsagt meget lett at slike falske, positive prøver forekommer. I dag er det nødvendig at reaksjonsproduktet fra slike prosedyrer opparbeides før det kan bestemmes hvorvidt amplifikasjonsprosedyren er vellykket eller mislykket. Dette innbefatter kontakt mellom reaksjonsproduktet og flere deler av laboratorieutstyr, slik som pipetter, så vel som personell, hvilket kan føre til at spor av amplifikasjonsproduktet blir tilgjengelig for å kontaminere fremtidige forsøk.

Et stort arbeid pågår for tiden for å utvikle såkalte "indre" prosedyrer hvori amplifikasjonsreaksjonens vellykkethet kan kontrolleres uten noen behandling av amplifikasjonsproduktet og i en uåpnet reaksjonsbeholder.

Nye former for nukleinsyreanaloger er beskrevet i PCT/EP92/01220 inngitt 22. mai 1992, hvilke selektivt binder konvensjonelle nukleinsyrer med komplementære sekvenser under dannelse av hybrider som er mer stabile overfor dehybridisering ved oppvarming enn lignende hybrider mellom konvensjonelle nukleinsyrer. Ved foreliggende oppfinnelse er det nå funnet at det er mulig å utnytte denne høyere hybridstabilitet for selektivt å blokkere nukleinsyreamplifikasjonsprosedyrer. Denne teknikk kan anvendes for å forhindre falske, positive prøver i slike amplifikasjonsprosedyrer. Den kan også utnyttes som en vesentlig del av bestemte diagnostiske/analytiske fremgangsmåter.

I et første aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for inhibering av en nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre, i hvilken prosedyre hver tråd av en dobbelttrådet målnukleinsyre har et område anvendt som et templat for én eller flere primere som er utvidet eller forbundet under dannelse av et andre templat komplementært med dette templat, kjennetegnet ved at det tilveiebringes en nukleinsyreanalog som er tilstrekkelig komplementær med en sekvens av et slikt templat eller en slik primer til å hybridisere med denne, og hvor nukleinsyreanalogen hybridiserer tilstrekkelig sterkt til det respektive templat eller primer for å blokkere primertemplathybridisering eller blokkere primerutvidelse eller primerbinding under prosedyrebetingelsene. Dette aspekt av foreliggende oppfinnelse inkluderer således en fremgangsmåte for inhibering av en nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre i hvilken prosedyre hver tråd av en dobbelttrådet målnukleinsyre har et område anvendt som et templat for én eller flere primere som er utvidet eller bundet under dannelse av et andre templat som er komplementært med dette templat, hvori det tilveiebringes en nukleinsyreanalog som er tilstrekkelig komplementær med en sekvens av templatet eller primeren for å hybridisere med denne, og hvori nuklein-

syreanalogen hybridiseres tilstrekkelig sterkt med det respektive templat eller primer for å blokkere primer-templat-hybridisering eller å blokkere primerutvidelse eller primerbinding under prosedyrebetingelsene.

Fortrinnsvis er prosedyren en PCR- eller LCR- eller en 3SR-prosedyre. "Forankrede" og "inverterte" PCR-prosedyrer er inkludert.

Den "dobbelttrådede målnukleinsyre" som i hver tråd inneholder et område som virker som et templat, er ikke nødvendigvis et startmateriale, eller det behøver nødvendigvis heller ikke være det direkte mål for ønsket amplifikasjon i prosedyren.

I PCR vil "den dobbelttrådede målnukleinsyre" vanligvis være inkorporert i startmaterialet, og generelt vil det være amplifikasjonen av minst én tråd derav som er ønsket. En PCR-reaksjon kan imidlertid startes med kun én DNA-tråd, idet den komplementære tråd produseres i den første syklus for primerutvidelse. I senere sykluser vil den "dobbelttrådede målnukleinsyre" hovedsakelig være sammensatt av produkter fra tidligere sykluser.

I LCR vil likeledes den "dobbelttrådede målnukleinsyre" vanligvis først inkorporeres i startmaterialet, og i senere sykluser vil den hovedsakelig være amplifikasjonsproduktet.

Det er ikke nødvendigvis tilfelle at primere hybridiseres til hver tråd i den samme del av amplifikasjonssyklusen, eller kun etter at den dobbelttrådede målnukleinsyre er dannet. I 3SR-teknikken hybridiseres således en RNA-utgangstråd til en første primer som ved hjelp av reverstranskriptase utvides som en komplementær DNA-tråd under dannelse av den refererte "dobbelttrådede målnukleinsyre". Etter destruksjon av den hybridiserte RNA-tråd ved hjelp av RNase H hybridiseres en andre primer til DNA-tråden og utvides ved hjelp av reverstranskriptase under dannelse av et dobbelttrådet DNA-molekyl. Ved hjelp av dette trinn er således begge tråder tilstedeværende i DNA/RNA, i sin tid hybridisert til en primer som deretter er blitt utvidet.

Den første primer er konstruert slik at DNA/DNA-prod-

uktet inkluderer en promoter for en RNA-polymerase, slik som T7-RNA-polymerase, som anvender DNA/DNA-produktet som et templat og produserer multiple RNA-kopier som tilsvarer RNA-startmaterialet, som i sin tur blir startmaterialer som den første primer og den reverse transkriptase kan virke på.

Denne amplifikasjonsprosedyre kan utføres i fravær av nukleinsyreanalogen for å bygge opp et ønsket nivå av amplifikasjonsprodukt, og nukleinsyreanalogen kan deretter tilsettes.

Fortrinnsvis hybridiseres nukleinsyreanalogen til amplifikasjonsproduktet. Dette vil stanse amplifikasjonen og kan etterlate produktene i form av stabile nukleinsyre-nukleinsyreanaloghybrider som ikke er i stand til å virke som templater dersom de kontaminerer en etterfølgende reaksjon. "Åpne" heller enn "indre" prosedyrer gjøres derved sikre mot overføring av kontaminering.

Alternativt eller i tillegg kan apparatur som skal anvendes i en amplifikasjonsprosedyre av denne type, behandles med en oppløsning inneholdende nukleinsyreanalogen for å hybridisere analogen til ethvert amplifikasjonsprodukt som kan være til stede som en kontaminering, og apparaturen kan deretter vaskes og anvendes i amplifikasjonsprosedyren, idet amplifikasjon i denne prosedyre av ethvert amplifikasjonsprodukt opprinnelig tilstedeværende som en kontaminering i apparaturen, forhindres ved denne hybridisering til denne analog.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer således en fremgangsmåte for å forhindre at et nukleinsyreamplifikasjonsprodukt tjener som et templat i en etterfølgende amplifikasjonsprosedyre, kjennetegnet ved at en nukleinsyre-analog hybridiseres til nukleinsyreamplifikasjonsproduktet under dannelse av en hybrid som er stabil under betingelsene for den etterfølgende amplifikasjonsprosedyre.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer også en fremgangsmåte for å forhindre at ethvert nukleinsyreamplifikasjonsprodukt som kan være til stede i et miljø, tjener som et kontaminerende templat i en etterfølgende amplifikasjonprosedyre for nukleinsyren, hvilken fremgangsmåte omfatter behandling av miljøet med en nukleinsyreanalog som med amplifikasjonsproduktet danner en hybrid som er stabil under betingel-

sene for den etterfølgende amplifikasjonsprosedyre.

I praksis kan alt eller noe utstyr som skal anvendes i prosedyren, vaskes med en oppløsning inneholdende nukleinsyreanalogen, f.eks. i en hybridiseringsbuffer, slik at det dannes en stabil hybrid mellom analogen og enhver tilstedeværende nukleinsyre som inneholder målsekvensen for amplifikasjonen. Den dannede hybrid med nukleinsyreanalogen er tilstrekkelig stabil til å motstå betingelsene for den etterfølgende amplifikasjonsprosedyre, og den kontaminerende målsekvens forhindres derved fra å delta i en slik prosedyre og produsere et falskt, positivt materiale.

Nukleinsyreanalogen for anvendelse i dette og andre aspekter av foreliggende oppfinnelse inneholder fortrinnsvis fra 5 til 20 nukleobasebindende ligander, f.eks. fra 10 til 15 ligander.

Det kan tilveiebringes en nukleinsyreanalog som er skreddersydd til å stanse amplifikasjon av en spesifikk nukleinsyresekvens, eller det kan tilveiebringes et reagens inneholdende en blanding av nukleinsyreanalogsekvenser som vil stanse et antall forskjellige amplifikasjoner. Fortrinnsvis inneholder et reagens for dette sistnevnte formål et stort antall eller mange forskjellige sekvenser. Satt på spissen, kan det syntetiseres nukleinsyreanaloger ved anvendelse av en blanding av monomere syntoner (inkludert ligander som er komplementære med hver av de fire DNA-baser) i hvert trinn slik at det konstrueres molekyler som hvert inneholder en vilkårlig sekvens av ligander. En tilstrekkelig mengde av et slikt reagens bør, for å være i stand til å inhibere enhver amplifikasjonsprosedyre, inneholde et tilstrekkelig antall molekyler som er komplementære med hvert amplifikasjonsprodukt.

Generelt vil det være foretrukket at hvert molekyl av nukleinsyreanalog i et slikt reagens er minst en 10-mer, mer foretrukket minst en 12-mer, f.eks. en 15- til 20-mer.

Den selektive blokkering av amplifikasjonsprosedyrer kan bringes til å virke mer aktivt som en del av en diagnostisk prosess.

Ved anvendelse av dagens metoder, slik som PCR, for å amplifisere en sekvens i den hensikt å bestemme hvorvidt en

spesiell sekvens er til stede, slik som en enkelt baseendring fra en alternativ sekvens (f.eks. en enkelt basemutasjon fra den "normale" sekvens i et gen), er prosedyrene for påvisning av sekvensen i amplifikasjonsproduktet omstendelige. Prosedyrene inkluderer sekvensering av hele produktet for å bekrefte tilstedeværelsen av den endrede base. De inkluderer også påvirkning av et endret mønster av fordøyelsesprodukter produsert ved hjelp av ett eller flere restriksjonsenzymer, dersom endringen eller endringene i gensekvensen påvirker et restriksjonssete. De inkluderer også at det til produktet hybridiseres en merket nukleinsyreprobe for den muterte sekvens under betingelser som er tilstrekkelig stringente til å differensiere mellom de mulige sekvenser.

Ved å utforme en nukleinsyreanalog som kun er i stand til å danne en stabil hybrid med PCR-målsekvensen dersom mutasjonen er til stede, og ved å tilføre analogen til prøvenukleinsyren under hybridiserende betingelser, kan PCR-reaksjonen inhiberes selektivt slik at det ikke finner sted noen eksponentiell amplifikasjon av den mutasjonsholdige sekvens. Dette prinsipp kan også utvides til andre amplifikasjonsmetoder.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer således en fremgangsmåte for påvisning av tilstedeværelse eller fravær av en nukleinsyre-målsekvens omfattende utførelse av en amplifikasjonsprosedyre hvori hver tråd av en dobbelttrådet nukleinsyre med et område anvendt som et templat som inkluderer den del av nukleinsyren hvori den eventuelt tilstedeværende målsekvens er lokalisert, amplifiseres ved hybridisering av én eller flere primere til templatet og utvidelse eller binding av primerne under dannelse av et andre templat som er komplementært med dette templat hvori det tilveiebringes en nukleinsyreanalog som er komplementær med målsekvensen og som hybridiserer med templatet tilstrekkelig sterkt til å blokkere amplifikasjonsprosedyren når målsekvensen er til stede, men ellers ikke.

Dersom nukleinsyreanalogen er til stede gjennom hele amplifikasjonsreaksjonen, vil amplifikasjon av den andre tråd i målsekvensen heller være lineær enn eksponentiell, slik at det ikke produseres noen signifikante mengder av amplifikasjonsprodukt.

Tilstedeværelsen av målsekvensen kan derfor utledes fra svikten i amplifikasjonsreaksjonen som kan være PCR eller LCR eller 3SR, til å produsere en signifikant produktmengde. Produktet fra reaksjonen kan for eksempel elueres gjennom en gel, og den manglende evne til å produsere et bånd vil indikere tilstedeværelse av sekvensen.

Det vil være ønskelig å inkludere en intern kontroll som en gardering mot at reaksjonen har sviktet av noen annen årsak. Som en kontroll inkluderes således fortrinnsvis et andre nukleinsyresubstrat som er i stand til amplifikasjon ved hjelp av denne amplifikasjonsprosedyre ved anvendelse av de samme primere, hvilket gir amplifikasjon som produserer et produkt forskjellig fra produktet fra amplifikasjon av målsekvensen.

Prosedyren kan utføres på denne måte for å påvise tilstedeværelse av en spesiell base med en spesifikk lokalisering, f.eks. for å vise tilstedeværelse av en spesifikk enkeltbasemutasjon. En serie av slike analyser kan utføres samtidig eller sekvensielt for å identifisere hvilke av en rekke av mulige mutasjoner som er til stede innen et genområde, ved i hver analyse å anvende en nukleinsyreanalog skreddersydd for en slik mutasjon.

I tilfellet med en mutasjon fra en mer vanlig sekvens, kan mutasjonen eller den "normale" sekvens betraktes som "nukleinsyre-målsekvensen". Dersom nukleinsyreanalogen således er komplementær til den muterte sekvens, vil uteblivelse av amplifikasjonen vise tilstedeværelse av mutasjonen. Alternativt kan det anvendes en nukleinsyreanalog som er komplementær til den "normale" sekvens, hvorved uteblivelse av amplifikasjonen vil vise tilstedeværelse av den "normale" sekvens, og vellykket amplifikasjon vil vise tilstedeværelse av en uspesifisert mutasjon, dvs. fravær av den "normale" sekvens.

Selv om det er funnet at nukleinsyreanaloger, slik som PNA, kan blokkere en PCR-amplifikasjonsreaksjon, enten PNA er rettet mot hybridisering til et PCR-primerbindingssete eller til en nukleotidsekvens i templatet som deretter fjernes fra primerbindingssetet, er det ikke tilfelle at valget av PNA/DNA-hybridiseringssetet er uvesentlig. Det nødvendige

affinitetsnivå mellom PNA- og DNA-templatet for å stoppe PCR-reaksjonen er generelt noe mindre når PNA hybridiserer til primerbindingssetet eller nær opptil det. Affiniteten kan tilpasses nøyaktig ved passende valg av PNA-sekvenslengde, idet det tas i betraktning den spesielle basesekvens som er involvert, idet homopyridinområder bindes sterkest.

Det er således mulig å velge betingelser slik at to PCR-reaksjoner kan utføres samtidig på et enkelt templat, idet én reaksjon anvendes som en kontroll og er upåvirkelig overfor tilstedeværelsen av et egnet PNA som vil inhibere det andre. Dersom det således anvendes en enkelt "forlengs" primer i kombinasjon med to forskjellige "baklengs" primere, hvor én primer produserer et lengre og den andre et kortere amplifikasjonsprodukt, kan PNA ledes til bindingssetet for det kortere primerprodukt, eller nær opptil dette, og forhindre dets respektive PCR-reaksjon uten samtidig å inhibere det lengre PCR-reaksjonsprodukt dersom affiniteten av PNA velges med skjønnsomhet. Dersom PNA-hybridiseringssetet inneholder en mutasjon av et enkelt basepar som ønskes påvist, kan forholdene arrangeres slik at, dersom mutasjonen er til stede, PNA bindes og kun ett PCR-produkt produseres, mens dersom mutasjonen er fraværende, vil PNA ikke binde DNA sterkt nok til å inhibere det kortere PCR-produkt, og både det lengre og det kortere produkt produseres. Det ineffektivt blokkerte, lengre PCR-produkt virker således som en intern kontroll som verifiserer anvendelse av passende betingelser i analysen for tilstedeværelse eller fravær av mutasjonen.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer en fremgangsmåte hvori tilstedeværelse eller fravær av hver av en rekke sekvenser innen nukleinsyre-målsekvensen påvises i rekkefølge ved å utføre en serie av PCR-amplifikasjonsprosedyrer ved anvendelse av den samme primer eller primere og tilveiebringelse av en respektiv nukleinsyreanalog i hver prosedyre som er komplementær med en tilsvarende analog i rekken av sekvenser og hybridisere med denne for å blokkere amplifikasjonsprosedyren når den tilsvarende sekvens er til stede, men ikke ellers.

Er det således gitt en målsekvens som inneholder et par PCR-primerbindingsseter i avstand fra hverandre, ett sete

på hver tråd, kan det bestemmes hvorvidt det på én tråd foreligger en spesifikk sekvens mellom setene, ved å tilveiebringe en nukleinsyreanalog som er i stand til å binde seg til den spesifikke sekvens under dannelse av en hybrid som er stabil under PCR-betingelsene og som således vil blokkere den eksponentielle amplifikasjon. Dette prinsipp kan anvendes for å bestemme hvilke av et antall mulige sekvenser som er sekvensielt til stede innen et nukleinsyreområde i et gen, eller i et større område som et genaggregat. I *E. coli* er f.eks. opptil 30 gener aggregert i et kort, genetisk område som bestemmer antibiotisk resistens. En bestemmelse av hvilke antibiotiske resistensgener som er til stede i en spesiell organisme, vil vanligvis innbefatte utvikling av PCR-primere for hvert gen av interesse.

Ved anvendelse av nukleinsyreanaloger for selektiv PCR-blokkering kan de tilstedeværende gener bestemmes ved anvendelse av et enkelt primerpar som flankerer hele området. Det fremstilles nukleinsyreanaloger med en spesifikk sekvens som er komplementær med hver tråd med hensyn til hver gensekvens som skal identifiseres, og PCR-reaksjonen forsøkes i rekkefølge med hver tilstedeværende nukleinsyreanalog. Når det i nukleinsyren er til stede en sekvens som den testede analog hybridiserer til, blokkeres PCR-reaksjonen. Ved anvendelse av konvensjonell PCR ville det være nødvendig med et primerpar som er spesifikt for hver sekvens som skal undersøkes. Hvert primerpar ville fordre at betingelsene ved amplifikasjonen måtte optimaliseres ved å variere et antall parametere. Fordi nukleinsyreanaloger av typen beskrevet i den ovennevnte PCT-søknad lett kan syntetiseres med ønsket sekvens, kan problemene med å erholde et stort antall forskjellige PCR-primere og utvikle amplifikasjonsprosedyrer egnede for hver primerparkombinasjon, overvinnes.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer en fremgangsmåte for inhibering av den polymerasemedierte utvidelse av en primer hybridisert til et nukleinsyretemplat, omfattende at det under hybridiseringsbetingelser tilveiebringes en nukleinsyreanalog som danner en stabil hybrid med primeren eller templatet, ved primersetet eller nedstrøms fra primersetet.

Når produktet fra en amplifikasjonsprosedyre skal sekvenseres eller påvises og identifiseres ved undersøkelse med et merket oligonukleotid, må produktet vanligvis erholdes i en enkelttrådet form. Den komplementære tråd vil vanligvis være til stede i like store mengder, og trådene vil ha en tendens til å rekombineres. Det er derfor ønsket å utføre PCR-reaksjonene på en slik måte at det hovedsakelig produseres én av de to produkttråder (asymmetrisk PCR). For tiden gjøres det forsøk på dette ved å anvende mer av den ene primer enn den andre. Ideelt foregår eksponentiell produksjon av ønsket sekvens inntil én primer er oppbrukt og dette deretter fører til lineær amplifikasjon. På grunn av at de ulike primerkonsentrasjoner påvirker de tidlige trinn av reaksjonen, er det ofte et problem at PCR-prosessen ikke starter på riktig måte.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer derfor en fremgangsmåte for utførelse av en asymmetrisk nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre hvori hver tråd av en dobbelttrådet målnukleinsyre har et område anvendt som et templat for en primer som utvides for å danne et andre templat komplementært med dette templat, kjennetegnet ved at det etter et antall amplifikasjonssykluser tilsettes en nukleinsyreanalog som hybridiserer tilstrekkelig sterkt til en av primerne til å inhibere hybridiseringen av primeren til dens mål under reaksjonsbetingelsene, etterfulgt av at prosedyren deretter fortsettes gjennom et antall ytterligere sykluser.

Fortrinnsvis er amplifikasjonsprosedyren PCR.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer utførelse av en asymmetrisk amplifikasjon på denne måte, etterfulgt av påvisning eller sekvensering av produktet fra amplifikasjonen.

PNA-konsentrasjonen under den forsøkte PCR- eller en annen amplifikasjonsreaksjon er fortrinnsvis større enn 0,5 µM, fortrinnsvis større enn 2,0 µM, og helst større enn 3 µM, f.eks. 3 til 15 µM.

Den anvendte nukleinsyreanalog i alle de ovennevnte prosedyrer er fortrinnsvis en peptid-nukleinsyre (PNA) omfattende et polyamidskjelett inneholdende en rekke ligander i spredt avstand langs polyamidskjelettet, hvor hver av ligandene uavhengig av hverandre er naturlig forekommende nukleo-

baser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser eller nukleobasebindende grupper, hver av ligandene er bundet direkte eller indirekte til et nitrogenatom i polyamidskjelettet, og nitrogenatomene som binder liganden, er hovedsakelig atskilt fra hverandre i polyamidskjelettet med fra 4 til 8 mellomliggende atomer. Den kan imidlertid generelt være enhver nukleinsyreanalog som er i stand til å hybridisere til en nukleinsyre med komplementær sekvens under dannelse av en hybrid som er mer stabil overfor varmedenaturering enn en hybrid mellom det konvensjonelle deoksyribonukleotid tilsvarende analogen og nukleinsyren. Fortrinnsvis er den en nukleinsyreanalog som er i stand til å hybridisere til en dobbelttrådet nukleinsyre hvori én tråd har en sekvens komplementær med analogen slik at den andre tråd fjernes fra denne ene tråd.

De nitrogenbærende atomer i skjelettet av de ovenfor definerte peptidnukleinsyrer (PNA) er fortrinnsvis atskilt fra hverandre med fem atomer. I nukleinsyreanaloger med formel I (nedenfor) er dette funnet å tilveiebringe den sterkeste affinitet overfor DNA. I noen tilfeller kan det imidlertid være ønskelig å redusere bindingsstyrken mellom PNA og DNA ved å anbringe én eller flere av ligandene i en ikke optimal avstand fra hverandre, f.eks. ved en avstand på flere enn 5 atomer, f.eks. opptil 14 atomer eller flere.

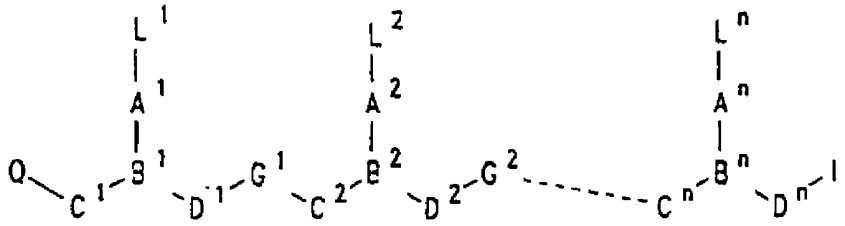
Fortrinnsvis vil ikke mer enn 25% av avstandene mellom ligandene være 6 atomer eller flere. Mer foretrukket vil ikke mer enn 10 til 15% av avstanden mellom ligandene være 6 atomer eller flere. Aza-nitrogenatomene som bærer ligandene (direkte eller via linkergrupper), er ikke selv medregnet i avstandene referert til ovenfor.

En alternativ eller ytterligere metode for å redusere styrken av DNA-binding er å utelate visse av ligandene ved å anbringe i deres sted et atom eller en gruppe som bidrar lite eller ingenting til bindingen av DNA, f.eks. hydrogen. Fortrinnsvis vil ikke mer enn 25% av ligandposisjonene være opptatt av ikke-bindende atomer eller grupper, f.eks. ikke mer enn 10 til 15%.

Representative ligander inkluderer enten de fire viktigste, naturlig forekommende DNA-baser (dvs. tymin, cytosin,

adenin eller guanin) eller andre naturlig forekommende nukleobaser (f.eks. inosin, uracil, 5-metylcytosin eller tiouracil) eller kunstig fremstilte baser (f.eks. bromuracil, azaadeniner eller azaguaniner, etc.) bundet til et peptidskjelett via en egnet linker.

I foretrukne utførelsesformer har nukleinsyreanalogene anvendt ved foreliggende oppfinnelse, den generelle formel (I):



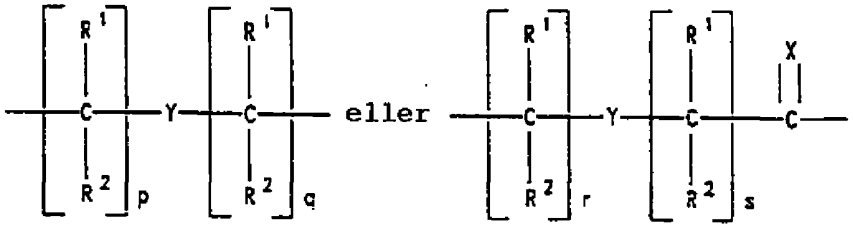
(I)

hvori:

n er minst 2,

hver av L^1-L^n er uavhengig av hverandre utvalgt fra hydrogen, hydroksy, (C_1-C_4)alkanoyl, naturlig forekommende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser, aromatiske grupper, DNA-innføyelser, nukleobasebindende grupper og rapportørligander, minst én av L^1-L^n er en naturlig forekommende nukleobase, en ikke-naturlig forekommende nukleobase, en DNA-innføyelse eller en nukleobasebindende gruppe;

hver av A^1-A^n er en enkeltbinding, en metylengruppe eller en gruppe med formel (IIa) eller (IIb):



(IIa) (IIb)

hvori:

X er O, S, Se, NR^3, CH_2 eller $C(CH_3)_2$;

Y er en enkeltbinding, O, S eller NR^4;

hver av p og q er et helt tall fra 1 til 5, summen av p+g er ikke større enn 10;

hver av r og s er null eller et helt tall fra 1 til 5, summen r+s er ikke større enn 10;

hver R^1 og R^2 er uavhengig av hverandre utvalgt fra hydrogen, (C_1-C_4)alkyl som kan være hydroksy- eller alkoksy- eller alkyltiosubstituert hydroksy, alkoksy, alkyltio, amino og halogen; og

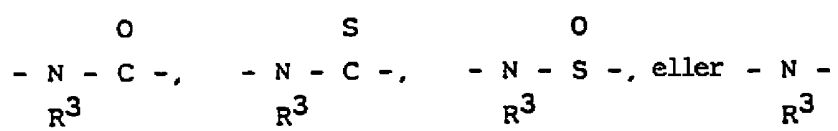
hver av R^3 og R^4 er uavhengig av hverandre utvalgt fra hydrogen, (C_1-C_4)alkyl, hydroksy-, alkoksy- eller alkyltio-substituert (C_1-C_4)alkyl, hydroksy, alkoksy, alkyltio og amino;

hver av B^1-B^n er N eller R^3N^+, hvor R^3 er som definert ovenfor;

hver av C^1-C^n er CR^6R^7, CHR^6CHR^7 eller $CR^6R^7CH_2$, hvor R^6 er hydrogen og R^7 er utvalgt fra sidekjedene i naturlig forekommende alfa-aminosyrer, eller R^6 og R^7 er uavhengig av hverandre utvalgt fra hydrogen, (C_2-C_6)alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, hydroksy, (C_1-C_6)alkoksy, (C_1-C_6)alkyltio, NR^3R^4 og SR^5, hvor R^3 og R^4 er som definert ovenfor, og R^5 er hydrogen, (C_1-C_6)alkyl, hydroksy-, alkoksy- eller alkyltiosubstituert (C_1-C_6)alkyl, eller R^6 og R^7 fullfører sammen et alisyklisk eller heterosyklisk system;

hver av D^1-C^n er CR^6R^7, $CH_2CR^6R^7$ eller CHR^6CHR^7, hvor R^6 og R^7 er som definert ovenfor;

hver av G^1-G^{n-1} er



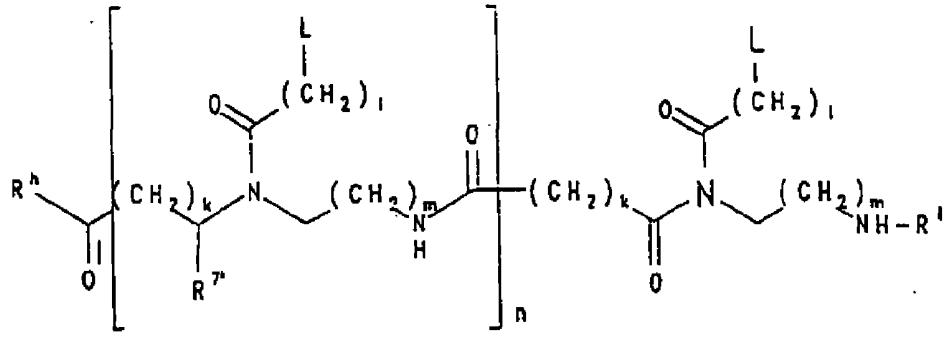
i enhver orientering, hvor R^3 er definert som ovenfor;

Q er $-CO_2H$, $-CONR'R"$, $-SO_3H$ eller $-SO_2NR'R"$ eller et aktivert derivat av $-CO_2H$ eller $-SO_3H$; og

I er $-NHR'''R''''$ eller $-NR'''C(O)R''''$ hvor R', R", R''' og R'''' uavhengig av hverandre er utvalgt fra hydrogen, alkyl, aminbeskyttende grupper, rapportørligander, innføyel-

sesgrupper, chelatdannende midler, peptider, proteiner, karbohydrater, lipider, steroider, oligonukleotider og løselige og uløselige polymerer. Alternativt kan C og D være $CHR^6(CH_2)_sCHR^7$, hvor S kan være fra 0 til 2.

Foretrukne peptidnukleinsyrer har generell formel (III):



(III)

hvori:

hver L er uavhengig av hverandre utvalgt fra hydrogen, fenyl, heterosykliske grupper, f.eks. med 1, 2 eller 3 ringer, naturlig forekommende nukleobaser og ikke-naturlig forekommende nukleobaser;

hver $R^{7'}$ er uavhengig av hverandre utvalgt fra hydrogen og sidekjedene i naturlig forekommende alfa-aminosyrer;

n er et helt tall fra 1 til 60;

hver av k, l og m er uavhengig av hverandre null eller et helt tall fra 1 til 5; fortrinnsvis er summen av k og m 1 eller 2, helst 1;

R^h er OH, NH_2 eller -NHLysNH$_2$; og

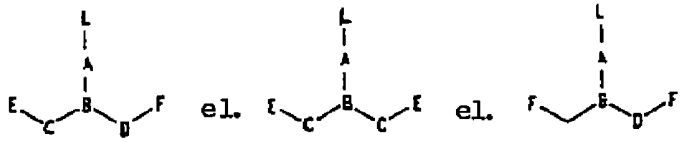
R^i er H eller $COCH_3$.

Spesielt foretrukne er forbindelser med formel (III) hvori hver L uavhengig av hverandre er utvalgt fra nukleobasene tymin (T), adenin (A), cytosin (C), guanin (G) og uracil (U), spesielt tymin, og n er et helt tall fra 1 til 30, spesielt fra 4 til 20.

Peptidnukleinsyrene ifølge foreliggende oppfinnelse kan syntetiseres ved tilpasning av standard peptidsyntese-prosedyrer, enten i oppløsning eller på en fast fase. De an-

vendte syntoner kan være spesielt utformede, monomere aminosyrer eller deres aktiverte derivater beskyttet ved hjelp av standard beskyttelsesgrupper. Oligonukleotidanalogene kan også syntetiseres ved anvendelse av de tilsvarende disyrer og diaminer.

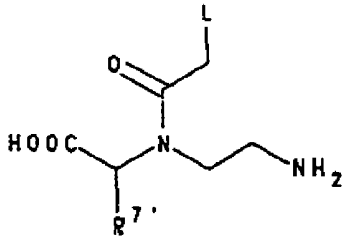
De monomere syntoner anvendt for å fremstille forbindelser for anvendelse ved foreliggende oppfinnelse, kan således utvelges fra aminosyrer, disyrer og diaminer med de generelle formler:



(IV) (V) (VI)

hvori L, A, B, C og D er som definert ovenfor, med unntak av at enhver aminogruppe deri kan beskyttes med aminbeskyttelsesgrupper; E er COOH, CSOH, SOOH, SO_2OH eller et aktivert derivat derav; og F er NHR^3 eller $NPgR^3$, hvor R^3 er som definert ovenfor og Pg er en aminbeskyttelsesgruppe.

Foretrukne, monomere syntoner er aminosyrer med formel (VII):



(VII)

eller aminbeskyttede og/eller syreterminalaktiverte derivater

derav, hvori L er utvalgt fra hydrogen, fenyl, heterosykliske grupper, naturlig forekommende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser og beskyttede derivater derav; og $R^{7'}$ er uavhengig utvalgt fra hydrogen og sidekjedene i naturlig forekommende alfa-aminosyrer. Spesielt foretrukne er slike syntoner med formel (4) hvori $R^{7'}$ er hydrogen og L er utvalgt fra nukleobasene tymin (T), adenin (A), cytosin (C), guanin (G) og uracil (U) og beskyttede derivater derav.

Fremstillingen av slike PNA er beskrevet i detalj i PCT-patentsøknad nr. PCT/EP92/01220 referert til ovenfor.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer et sett for anvendelse ved utførelse av en nukleinsyreamplifikasjonsreaksjon, kjennetegnet ved at det omfatter et stort antall primere for amplifikasjonen og minst én nukleinsyreanalog som har en sekvens komplementær med en sekvens i én av primerne eller med en nukleinsyre-målsekvens som skal amplifiseres ved anvendelse av primerne i amplifikasjonsreaksjonen.

Et slikt sett kan videre omfatte en polymerase eller ligase for anvendelse i amplifikasjonsreaksjonen for å produsere utvidelse eller ligering av primerne, f.eks. en DNA-polymerase som Taq-polymerase.

For anvendelse i en "3SR"-type prosedyre kan settene videre inkludere enhver eller flere av en reverstranskriptase, en RNA-polymerase og en nuklease, slik som RNase H.

Vanligvis kan slike sett ytterligere inkludere nukleotider, (noen eller alle av dTTP, dCTP, dATP og dGTP), hvor ett eller flere av disse kan være merket på enhver kjent eller egnet måte, f.eks. radiomerket. Reagenser for påvisning av slike merker kan være inkludert. Sett kan videre inkludere én eller flere buffere, salter, stabiliseringsmidler og nukleinsyregjenkjennelsesmidler. Disse kan være reagenser som gjenkjenner spesifikke sekvenser eller reagenser som gjenkjenner nukleinsyrer på en spesifikk, ikke-sekvensiell måte, hvor eksempler på de førstnevnte er oligonukleotider eller nukleinsyreanaloger av PNA-typen som eventuelt bærer påviselige merker, og eksempler på de sistnevnte er antistoffer mot nukleinsyrer.

Egnede merker for anvendelse ved foreliggende oppfinnelse inkluderer radioisotopmerker, enzymmerker, biotin, spinnmerker, fluoroforer, kjemiluminescensmerker, antigenmerker og antistoffmerker.

Z kan videre inkludere reagenser for utførelse av et positivt kontrolleksperiment inkludert et templat for amplifikasjon ved anvendelse av primerne for å produsere et amplifikasjonsprodukt som er forskjellig fra produktet fra nukleinsyreamplifikasjonsreaksjonen.

Et sett kan videre inkludere reagenser for anvendelse ved sekvensering av et nukleinsyreamplifikasjonsprodukt, f.eks. polymerase som Taq-polymerase og ett eller flere dideoksynukleotider.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også reagens for anvendelse til å inhibere en nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre, kjennetegnet ved at det omfatter en blanding av nukleinsyreanaloger som hver har evnen til å hybridisere tilstrekkelig sterkt til en eventuelt tilstedeværende, tilsvarende nukleinsyre med komplementær sekvens, under hybridiserende betingelser for å forhindre at nukleinsyren virker som en primer eller et templat i en amplifikasjonsprosedyre.

I de etterfølgende eksempler har alle PNA et skjelett avledet fra monomere syntoner med formel VII, og i hvert tilfelle er hver L én eller flere av de naturlig forekommende nukleobaser representert på vanlig måte med A, C, G eller T. Den anvendte nomenklatur følger nomenklaturen anvendt i PCT nr. PCT/EP92/01220 referert til ovenfor.

Foreliggende oppfinnelse vil bli ytterligere illustrert ved hjelp av de etterfølgende, spesifikke eksempler med referanse til de medfølgende figurer hvori:

figur 1 er et røntgenfotografi av en gel som viser inhibering av polymeraseformidlet utvidelse av en primer ved hjelp av PNA;

figur 2 er en etidiumbromidgel som viser selektiv blokkering av PCR-reaksjoner ved hjelp av PNA som skjelner mellom sekvenser som avviker fra hverandre med et enkelt basepar;

figur 3 er en etidiumbromidgel som viser et ytter-

ligere eksempel på PNA-dirigert inhibering av PCR;

figur 4 er en etidiumbromidgel som viser inhibering av PCR ved hjelp av PNA rettet mot seter på PCR-templatet som overlapper med, eller er atskilt i varierende omfang fra, primermålsetet; og

figur 5 er en etidiumbromidgel som viser fullstendig inhibering av en PCR-reaksjon ved hjelp av PNA komplementær med en primer; og

figur 6 er en etidiumbromidgel som viser resultatet fra eksempel 6 som en ytterligere illustrasjon på PCR-inhibering for å identifisere en enkelt baseendring.

Eksempel 1

Stans av primerutvidelse ved hjelp av PNA

0,5 µg av et plasmid (Bluescript, Stratagene, Inc.) inneholdende en innføyd sekvens av 10 tyminrester (pT10KS) spaltet med restriksjonsendonukleasen *Pvu*II og 0,1 µg "revers-primer" (5'-AAC AGC TAT GAC CAT G) til hvilke det ble tilsatt 1 µl 10 x konsentrert buffer (for *E. coli* Klenow-DNA-polymerase: 100 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 1 mM ditiotreitol (DTT), pH 7,5; for Taq-DNA-polymerase: 100 mM Tris-HCl, 15 mM $MgCl_2$, 500 mM NaCl, 1 mg/ml gelatin, pH 8,3), 6 µl H_2O og 100 ng A_{10}-PNA komplementær med T_{10}-innføyelsen i plasmidet, ble inkubert i 10 minutter ved 90°C, 60 minutter ved 37°C og deretter avkjølt til 20°C. Det ble deretter tilsatt 1 µl 10 mM DTT, 1 µl 10 µM oppløsning av dCTP, dGTP, dTTP, 1 µCi α^{32}P-dATP og 1 U av den egnede DNA-polymerase. Etter 5 minutter ved 20°C ble det tilsatt 2 µl av en 1 mM oppløsning av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og inkubasjonen ble fortsatt i 15 minutter ved 37°C for *E. coli*-DNA-polymerase, eller 60°C for Taq-polymerase. DNA ble deretter utfelt ved tilsetning av 50 µl etanol, 2% (vekt/volum) kaliumacetat og analysert ved elektroforese i 8% (vekt/volum) akrylamid/7 M urea-sekvenseringsgel etterfulgt av røntgenfotografering. Resultatet er vist i figur 1 hvor feltene representerer følgende:

Felt 1: *E. coli*-DNA-polymerase-Klenow-fragment, intet PNA.

Felt 2: som felt 1, men i nærvær av PNA.

Felt 3: Taq-polymerase, intet PNA.

Felt 4: Taq-polymerase i nærvær av PNA.

Felt 5:kontroll med plasmid spaltet med *Bam*HI.

Det fremgår fra diagrammet at A_{10}-PNA bør hybridisere til én tråd av templat-DNA ved *Bam*HI-setet. Dersom A_{10}-PNA således blokkerer polymeraseutvidelse av primeren, burde det dannes produkter som beveger seg på gelen sammen med *Bam*HI-spaltningsproduktene observert i felt 5. Dersom polymeraseutvidelse ikke er kontrollert av PNA, burde lengre utvidelsesprodukter erholdes. Det fremgår at i hvert PNA-holdig felt (2 og 4) dannes det forventede bånd i *Bam*HI-posisjonen. I fravær av PNA observeres et lengre produkt som hovedsakelig er totalt fraværende i PNA/Taq-feltet (felt 4), hvilket viser fullstendig blokkering av Taq med PNA.

Eksempel 2

Påvisning av enkeltbasemutasjon ved hjelp av PNA-dirigert inhibering av PCR-DNA-amplifikasjon

Plasmidet pT10KS ble konstruert ved kloning av de komplementære oligonukleotider 5'-GATCCT_{10}G og 5'-GATCCA_{10}G i respektive tråder ved *Bam*HI-setet i Bluescripten KS+plasmid (Stratagene). Plasmidet pT9CKS ble konstruert ved kloning av de komplementære oligonukleotider i 5'-TCGACT_5CT_4G og 5'-TCGACA_4GA_5G i *Sal*I-setet i pUC19.

En polymerasekjedereaksjon (PCR) ble utført med innhold av 25 ng plasmid 1, 25 ng plasmid 2 DNA, 1,25 mM dATP, 1,25 mM dCTP, 1,25 mM dGTP, 1,25 mM dTTP, 0,2 µg primer 1, 0,2 µg primer 2 og 2,5 µg PNA i 50 µl buffer (10 mM Tris-HCl, 3,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1 mg/ml gelatin, pH 8,3). Prøven ble oppvarmet til 94°C i 5 minutter og avkjølt til 65°C ved hvilket stadium 1 U Taq-DNA-polymerase (Boehringer Mannheim) ble tilsatt. Det ble deretter utført ytterligere 30 temperatursykluser (94°C (2 min.), 40°C (3 min.) og 65°C (2 min.)).

Det resulterende DNA ble analysert ved elektroforese i 6% (vekt/volum) polyakrylamidgeler eluert i TBE-buffer (90 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,3), og DNA ble visualisert ved farging med etidiumbromid.

Eksperimentet ble utført som beskrevet i eksempel 1

ved anvendelse av "M13-primer" som primer 1 og "revers-primer" som primer 2. De resulterende geler er vist i figur 2. De følgende plasmider og PNA ble anvendt:

Felt 1: pT9CKS (pBluescriptKS+ hvori dA_5GA_4/dT_4CT_5-PNA-mål ble klonet i *Sal*I-setet) og pT10KS (pBluescriptKS+ hvori et dA_{10}/dT_{10}PNA-mål ble klonet i *Bam*HI-setet), intet PNA.

Felt 2: som felt 1, men med PNA H-$T_5CT_4LysNH_2$.

Felt 3: som felt 1, men med PNA H-$T_{10}LysNH_2$.

Felt 4: pT10KS og pT9CKS med PNA H-T_5CT_4-$LysNH_2$.

Felt 5: pT10KS og pT9CKS med PNA H-$T_{10}LysNH_2$.

I felt 1 kan to PCR-produkter tydelig observeres, ett fra hvert plasmid. Amplifikasjon av pT10Ks gir et 118 bp fragment, og amplifikasjon av pT9CKS gir et 221 bp fragment.

Plasmid pT9CKS inneholder en målsekvens for PNA-$T_5CT_4LysNH_2$. I felt 2 kan intet bånd for dette plasmid observeres, hvilket viser inhibering av PCR med PNA.

Eksempel 3

Ytterligere demonstrasjon av PNA-dirigert inhibering av PCR

PNA-T_{10}-$LysNH_2$ ble syntetisert som i Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P.E. og Berg, R.H. (1992), J. Amer. Chem. Soc. *114*, 1895-1897; og Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P.E. og Berg, R.H. (1992), J. Amer. Chem. Soc. *114*, 9677-9678. Plasmidene pT10KS og pT9CKS var som beskrevet i eksempel 2. Kontrollplasmidet pCKS ble konstruert ved kloning av et 99 bp PCR-fragment (uten noen målseter for noen av PNSa anvendt i dette eksempel) i *Sma*I-setet i Bluescript KS+plasmid. Ved anvendelse av standardteknikker ble plasmider isolert fra utvalgte kloner av rekombinant *E. coli* JM103, renset ved oppdrift-tetthetssentrifugering i CsCl-gradienter og sekvensert ved dideoksymetoden.

De følgende oligonukleotidprimere ble anvendt i PCR-reaksjonene: revers-primer (5'-CACACAGGAAACAGCTATGAC) og "forover"- primer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT). PCR-amplifikasjoner ble utført i et volum på 50 µl inneholdende 1 ng av hvert plasmid, 0,2 µM av hver primer, 200 µM dNTP, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 (ved 25°C), 10 mM KCl og 3 mM $MgCl_2$.

PCR-reaksjonsblandingene ble belagt med 2 dråper paraffinolje og inkubert ved 90°C i 2 minutter før amplifikasjonsprosessen ble startet ved tilsetning av 3 U av stoffelpolymerasen (Perkin Elmer Cetus). En LEP-amplifikasjonmaskin (IgG Biotech) ble anvendt i alle eksperimenter, og PCR-syklusprofiler var 96°C, 2 min. - 55°C, 3 min. - 35°C, 1 min. - 65°C, 2 min. - 35 sykluser.

For å sikre at dannelsen av PNA/DNA-kompleksene kom forut for PCR-primerbinding og utvidelse, ble den vanlige 3-trinns PCR-syklus utvidet med et særskilt PNA-annealeringstrinn ved en temperatur godt over T_m for PCR-primerne.

Figur 3 viser den eksperimentelle oppstilling og resultatet av PCR-inhibering i nærvær av PNA T_{10}-$LysNH_2$. De to plasmidtemplater beskrevet ovenfor, ble anvendt, nemlig pT10-KS-plasmidet som dirigerer amplifikasjonen av et 246 bp fragment inneholdende et A_{10}-målsete, og kontrollplasmidet, pCKS, som dirigerer amplifikasjonen av et 329 bp ikke-målfragment. Når PNA T_{10}-$LysNH_2$ er fraværende (felt 2), dirigerer pT10KS-plasmidet syntesen av det forventede 246 bp PCR-fragment. I nærvær av 3,2 µM PNA T_{10}-$LysNH_2$ blir det imidlertid ikke produsert noe produkt (felt 3 til 5). Fraværet av produkt skyldes ikke en ikke-spesifikk, inhibitorisk virkning av PNA T_{10}-$LysNH_2$ på PCR-reaksjonen, fordi PNA T_{10}-$LysNH_2$ ikke vil inhibere amplifikasjonen av det forventede 329 bp fragment fra pCKS-kontrollplasmidet (felt 1). Det fremgår således at PNA T_{10}-$LysNH_2$ kan forhindre amplifikasjonen av dets beslektede mål-DNA på en sekvensspesifikk måte.

Eksempel 4

Påvisning av at den relative posisjon av PNA- og PCR-primer-målsetene kan endres uten å påvirke inhibering

Dette eksempel viser de oppnådde virkninger når PNA-målsetet er (1) lokalisert midt i PCR-området, er (2) lokalisert i umiddelbar nærhet til et PCR-primersete eller (3) overlapper ett av PCR-primersetene. Det er fundamentale forskjeller mellom den underliggende mekanisme for inhibering i disse tre tilfeller. Når PNA-målsetet er lokalisert i en avstand fra PCR-primersetene, forventes inhibering å foregå ved å forhindre gjennomlesning av polymerasen. Omvendt forventes

inhibering å foregå ved primerutelukkelse når PNA- og PCR-primermålsetene overlapper. Når PNA-målet er lokalisert nær PCR-primersetet, er det endelig sannsynlig at inhibering enten foregår ved å forhindre polymerasens tilgang til PCR-primeren og/eller ved å forhindre initiering av primerforlengelse. I alle tre tilfeller kan effektiv inhibering oppnås med PNA T_{10}-$LysNH_2$ som vist i figur 4. I dette eksempel forsøkes PCR ved anvendelse av, i de respektive forsøk, tre forskjellige forover-primere, referert til som "forover-primer", "SK-primer" og "A10-primer". Disse er forover-primer (5'-GTAAAACGACGGCCA-GT), T10-primer (5'-CATCCTTTTTTTTTG) og SK-primer (5'-TCTAGAACTAGTGGATC). I plasmid pT10KS anvendt i dette eksempel (se eksempel 2 for detaljer), er 3'-enden av forover-primer-målsetet lokalisert 101 bp nedstrøms for A10-målet, 3'-enden av SK-primeren er lokalisert umiddelbart nedstrøms for A10-målet, og A10-primeren omspenner A10-målsetet inkludert 5 og 1 bp på henholdsvis 5'- og 3'-siden. Felt 1-2: viser amplifikasjon av pT10KS-plasmidet med revers- og forover-primere i fravær (1) eller nærvær (2) av 3,2 µM PNA-T_{10}-$LysNH_2$. Felt 3 og 4: viser amplifikasjon av pT10KS med revers- og SK-primere i fravær (3) eller nærvær (4) av 3,2 µM PNA-T_{10}-$LysNH_2$. Felt 7 og 8: viser amplifikasjon av pT10KS-plasmidet med revers- og T10-primere i fravær (7) eller nærvær (8) av 3,2 µM PNA-T_{10}-$LysNH_2$. PCR-syklusbetingelser var 96°C, 2 min. - 55°C, 3 min. - 35°C, 1 min. - 65°C, 2 min. - 35 sykluser. PNA-$T_{10}LysNH_2$ vil forhindre dannelse av et PCR-produkt fra templater med vidt atskilte PNA- og PCR-primermålseter (felt 2), nærliggende PNA- og PCR-primermålseter (felt 4) og overlappende PNA- og PCR-primermålseter (felt 8).

Eksempel 5

En PCR-reaksjon ble utført generelt som beskrevet i eksempel 2, i fravær og nærvær av en PNA komplementær til én primer.

Resultatene er vist i figur 5. I felt 1 observeres det forventede PCR-produkt. I felt 2 er PCR-reaksjonen vist å være fullstendig inhibert.

Eksemplet ble utført ved anvendelse av "M13-primer"

som primer 1 og GATCC $T_{10}G$ som primer 2. Målplasmidet var pT10KS. De anvendte temperaturer i den andre fase av hver av de 30 sykluser var 35°C i stedet for 40°C.

Eksempel 6

PCR-inhibering med PNA med blandede sekvenser

De anvendte PNA i de foregående eksempler inneholdt kun pyrimidinrester og er vist å danne tripletter med deres målsekvenser. For å vise den allmenne gyldighet av prinsippet ble det således utført en serie eksperimenter med PNA med blandede sekvenser som danner standard Watson-Crick-duplekser med deres mål-DNA. Figur 6 viser den eksperimentelle oppstilling og resultatet av enkeltbasemutasjonsanalyse med to blandet sekvens-PNA som avviker fra hverandre med et enkelt nukleotid (PNA-A: H-TTCCGGTTGCC-NH_2 og PNA-B: Gly-TTCCGGCTGCC-NH_2). Det anvendes to templater ("A" og "B") inneholdende den tilsvarende punktmutasjon. Tre oligonukleotidprimere er involvert i dette eksperiment. Et forover- og revers-oligopar som produserer et 750 bp PCR-fragment og en degenerert primer rettet mot området inneholdende punktmutasjonen. Sammen med forover-primeren dirigerer den degenererte primer amplifikasjon av et 150 bp fragment ved anvendelse av enten A- eller B-allelen som templat. PNA er rettet mot området inneholdende punktmutasjonen, og "clamping" forventes således å virke ved primereksklusjon.

I dette eksempel inneholder hver PCR-reaksjonsblanding (50 µl) 200 µM dNTP, 10 mM Tris-HCl, pH 9,9 (20°C), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01% gelatin, 0,1% "Triton X-100", 1 U supermerket enzym (Stratagene), 1 ng allelspesifikt plasmid, 10 pmol degenerert primer rettet mot området inneholdende mutasjon, 10 pmol forover-primer, 10 pmol revers-primer og PNA som angitt. I figuren er feltene som følger: - Felt 1: A-allel uten PNA. Felt 2: A-allel og 10 µM PNA-A. Felt 3: A-allel og 10 µM PNA-B. Felt 4: B-allel uten PNA. Felt 5: B-allel og 10 µM PNA-A. Felt 6: B-allel og 10 µM PNA-B. PCR-betingelser var 96°C, 1 min. - 60°C, 2 min. - 40°C, 30 sek. - 60°C, 2 min. - 30 sykluser.

Når A-allelen anvendes som templat, produseres både

det 750 bp (intern PCR-kontroll) og det 150 bp fragment (diagnostisk for allelen) i fravær av PNA-A (felt 1). Når imidlertid reaksjonsblandingen inneholder PNA-A, produseres kun det 750 bp PCR-kontrollfragment (felt 2). I motsetning til dette produseres både 750 bp og 150 bp PCR-fragmentene i nærvær av PNA-B (felt 3). Endring av templatet til B-allelen reverserer resultatene. Nærvær av PNA-B vil således inhibere produksjonen av 150 bp-fragmentet (felt 6), mens nærvær av PNA-A ikke vil inhibere en slik produksjon (felt 5). Det konkluderes således med at begge de blandet sekvens-PNA (A og B) er i stand til å inhibere sine beslektede PCR-produkter med punktmutasjonsnøyaktighet.

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for inhibering av en nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre, i hvilken prosedyre hver tråd av en dobbelttrådet målnukleinsyre har et område anvendt som et templat for én eller flere primere som er utvidet eller forbundet under dannelse av et andre templat komplementært med dette templat,
karakterisert ved at det tilveiebringes en nukleinsyreanalog som er tilstrekkelig komplementær med en sekvens av et slikt templat eller en slik primer til å hybridisere med denne, og hvor nukleinsyreanalogen hybridiserer tilstrekkelig sterkt til det respektive templat eller primer for å blokkere primertemplathybridisering eller blokkere primerutvidelse eller primerbinding under prosedyrebetingelsene.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at amplifikasjonsprosedyren er en PCR- eller LCR-prosedyre.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2,
karakterisert ved at amplifikasjonsprosedyren utføres i fravær av nukleinsyreanalogen for å oppbygge et ønsket nivå av amplifikasjonsprodukt, etterfulgt av at nukleinsyreanalogen deretter tilsettes.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at nukleinsyreanalogen hybridiserer til amplifikasjonsproduktet.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at apparaturen som skal anvendes i en amplifikasjonsprosedyre av denne type, behandles med en oppløsning inneholdende nukleinsyreanalogen for å hybridisere analogen til ethvert amplifikasjonsprodukt som kan være til stede som en forurensning, og hvor apparaturen deretter vaskes og anvendes i en slik amplifikasjonsprosedyre, idet amplifikasjonen i prosedyren av ethvert amplifikasjonsprodukt som innledningsvis er til stede som en forurensning i apparaturen, forhindres av hybridiseringen til analogen.

6. Fremgangsmåte for å forhindre at et nukleinsyreamplifikasjonsprodukt tjener som et templat i en etterfølgende amplifikasjonsprosedyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at en nukleinsyreanalog hybridiseres til nukleinsyreamplifikasjonsproduktet under dannelse av en hybrid som er stabil under betingelsene for den etterfølgende amplifikasjonsprosedyre.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 6, for å forhindre at ethvert nukleinsyreamplifikasjonsprodukt som kan være til stede i et miljø, tjener som et forurensende templat i en etterfølgende amplifikasjonsprosedyre for nukleinsyren, k a r a k t e r i s e r t v e d at miljøet behandles med en nukleinsyreanalog som danner en hybrid med amplifikasjonsproduktet som er stabil under betingelsene for den etterfølgende amplifikasjonsprosedyre.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, for påvisning av nærvær eller fravær av en nukleinsyre-målsekvens, k a r a k t e r i s e r t v e d at det utføres en amplifikasjonsprosedyre hvori hver tråd av en dobbelttrådet nukleinsyre med et område anvendt som et templat, inkludert den del

av nukleinsyren hvor den eventuelle målsekvens er lokalisert, amplifiseres ved hybridisering av én eller flere primere til templatet og utvidelse eller binding av primerne under dannelse av et andre templat komplementært med templatet, hvori det tilveiebringes en nukleinsyreanalog som er komplementær med målsekvensen og som hybridiserer med et slikt templat tilstrekkelig sterkt til å blokkere amplifikasjonsprosedyren når målsekvensen er til stede, men ikke ellers.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nærvær eller fravær av hver av et stort antall sekvenser mellom et par primerbindingsseter innen en nukleinsyre-målsekvens påvises i rekkefølge ved å utføre en serie PCR-amplifikasjonsprosedyrer ved anvendelse av de samme primere og tilveiebringelse av en respektiv nukleinsyreanalog i hver prosedyre som er komplementær med en respektiv nukleinsyreanalog i det store antall sekvenser, for å hybridisere med denne og blokkere amplifikasjonsprosedyren når den respektive sekvens er til stede, men ikke ellers.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 8 eller 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som en kontroll inkluderes et andre nukleinsyresubstrat som er i stand til amplifikasjon ved hjelp av amplifikasjonsprosedyren ved anvendelse av de samme primere, ved hvilken amplifikasjon det dannes et produkt forskjellig fra produktet av amplifikasjon av målsekvensen.

11. Fremgangsmåte for utførelse av en asymmetrisk nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre hvori hver tråd av en dobbelttrådet målnukleinsyre har et område anvendt som et templat for en primer som utvides for å danne et andre templat komplementært med dette templat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det etter et antall amplifikasjonssykluser tilsettes en nukleinsyreanalog som hybridiserer tilstrekkelig sterkt til en av primerne til å inhibere hybridiseringen av primeren til dens mål under reaksjonsbetingelsene, etterfulgt av at prosedyren deretter fort-

settes gjennom et antall ytterligere sykluser.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 1, for inhibering av den polymeraseformidlede utvidelse av en primer hybridisert til et nukleinsyretemplat,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det under hybridiseringsbetingelser tilveiebringes en nukleinsyreanalog som danner en stabil hybrid med primeren eller templatet på primersetet eller nedstrøms fra primersetet.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 1, for inhibering av en PCR-reaksjon,
k a r a k t e r i s e r t v e d at en nukleinsyreanalog, utformet til kun å være i stand til å danne en stabil hybrid med en PCR-målsekvens dersom mutasjon er til stede, tilføres en prøvenukleinsyre under hybridiserende betingelser.

14. Sett for anvendelse ved utførelse av en nukleinsyre-amplifikasjonsreaksjon,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et stort antall primere for amplifikasjonen og minst én nukleinsyre-analog som har en sekvens komplementær med en sekvens i én av primerne eller med en nukleinsyre-målsekvens som skal amplifiseres ved anvendelse av primerne i amplifikasjonsreaksjonen.

15. Sett ifølge krav 14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere omfatter en polymerase eller ligase for anvendelse i amplifikasjonsreaksjonen for å produsere utvidelse eller ligering av primerne.

16. Sett ifølge krav 14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere inkluderer én eller flere av en reverstranskriptase, en RNA-polymerase og en nuklease.

17. Sett ifølge ethvert av kravene 14 til 16,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere inklu-

derer nukleotider.

18. Sett ifølge krav 17,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det inkluderer merkede nukleotider.

19. Sett ifølge ethvert av kravene 14 til 18,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere inkluderer én eller flere buffere, salter, stabiliseringsmidler og nukleinsyrepåvisningsmidler.

20. Sett ifølge ethvert av kravene 14 til 19,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere inkluderer reagenser for utførelse av et positivt kontrolleksperiment inkludert et templat for amplifikasjon ved anvendelse av primerne for å produsere et amplifikasjonsprodukt forskjellig fra produktet fra nukleinsyreamplifikasjonsreaksjonen.

21. Sett ifølge ethvert av kravene 14 til 20,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere inkluderer nukleinsyresekvenseringsreagenser.

22. Reagens for anvendelse til å inhibere en nukleinsyreamplifikasjonsprosedyre,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en blanding av nukleinsyreanaloger som hver har evnen til å hybridisere tilstrekkelig sterkt til en eventuelt tilstedeværende, tilsvarende nukleinsyre med komplementær sekvens, under hybridiserende betingelser for å forhindre at nukleinsyren virker som en primer eller et templat i en amplifikasjonsprosedyre.

23. Reagens ifølge krav 22,
k a r a k t e r i s e r t v e d at blandingen inneholder nukleinsyreanalogmolekyler med et stort antall forskjellige sekvenser.

24. Reagens ifølge krav 23,
k a r a k t e r i s e r t v e d at sekvensene er vilkårlige.

FIG. 1

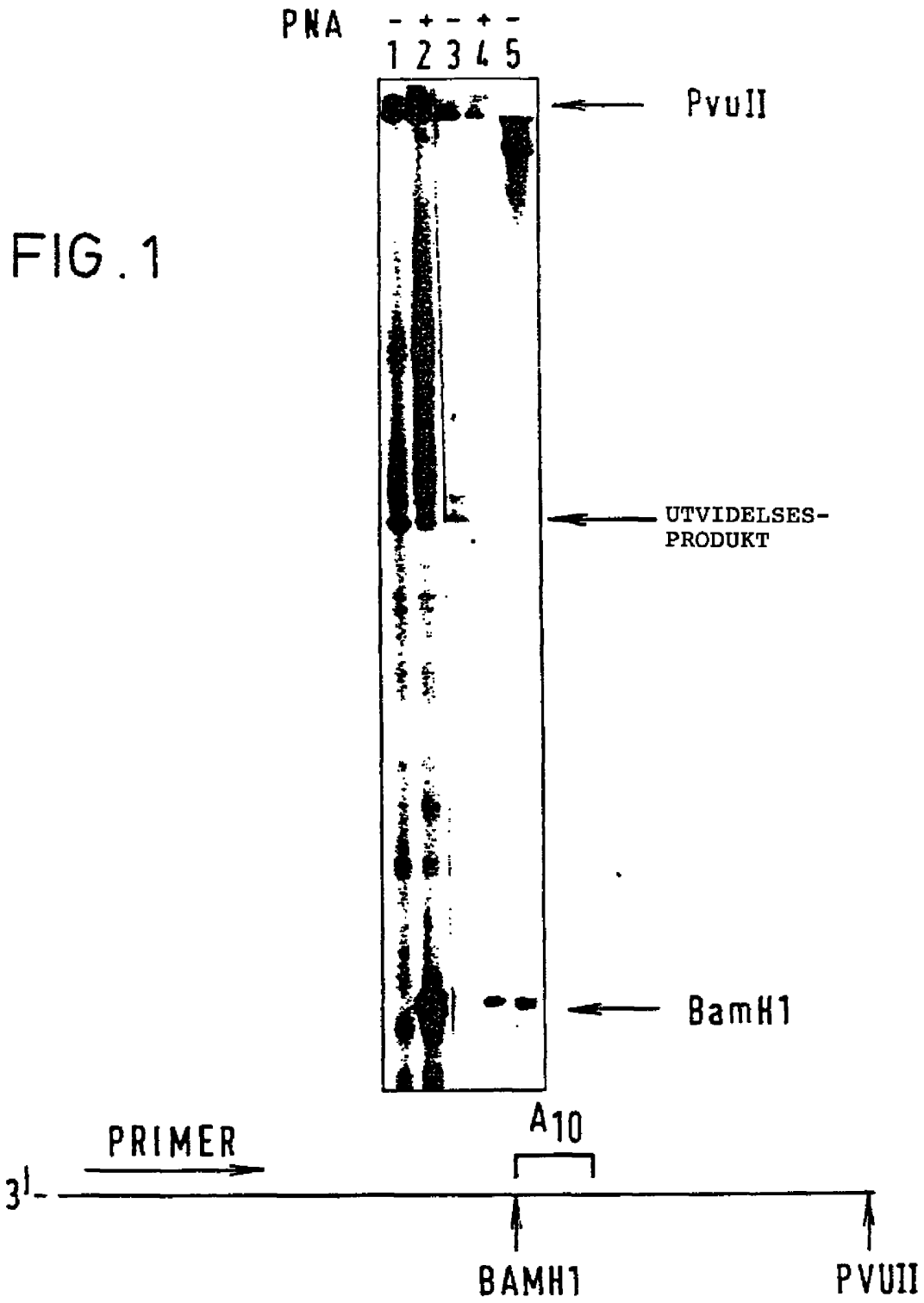

PNA
- + - + -
1 2 3 4 5
PvuII
UTVIDELSES-
PRODUKT
BamH1
PRIMER
A10
3'
BAMH1
PVUII

FIG. 2

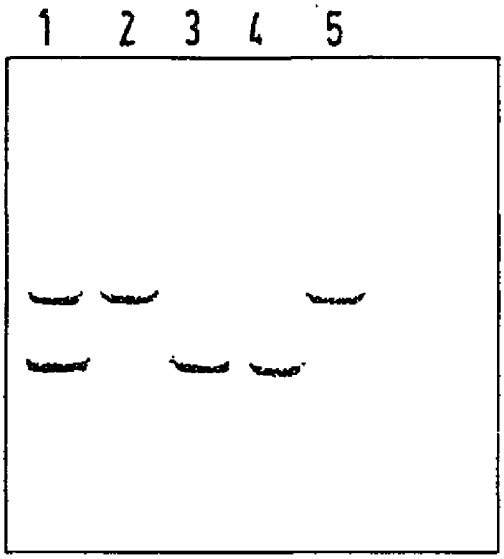


FIG. 3

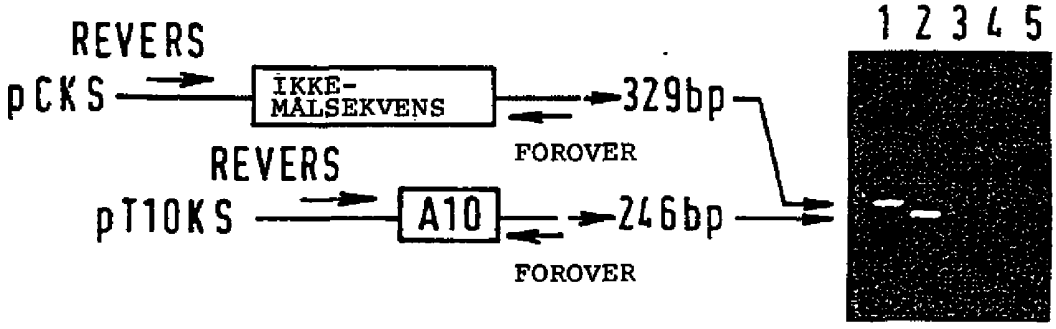


FIG. 5

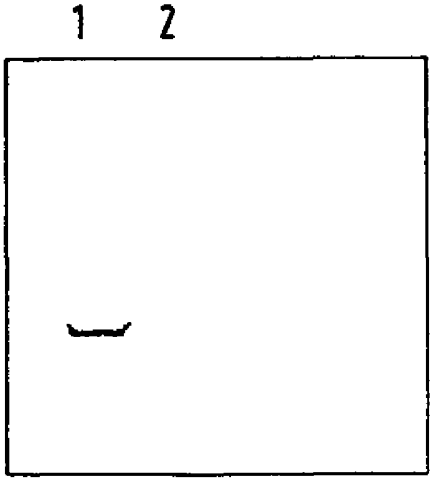


FIG. 4

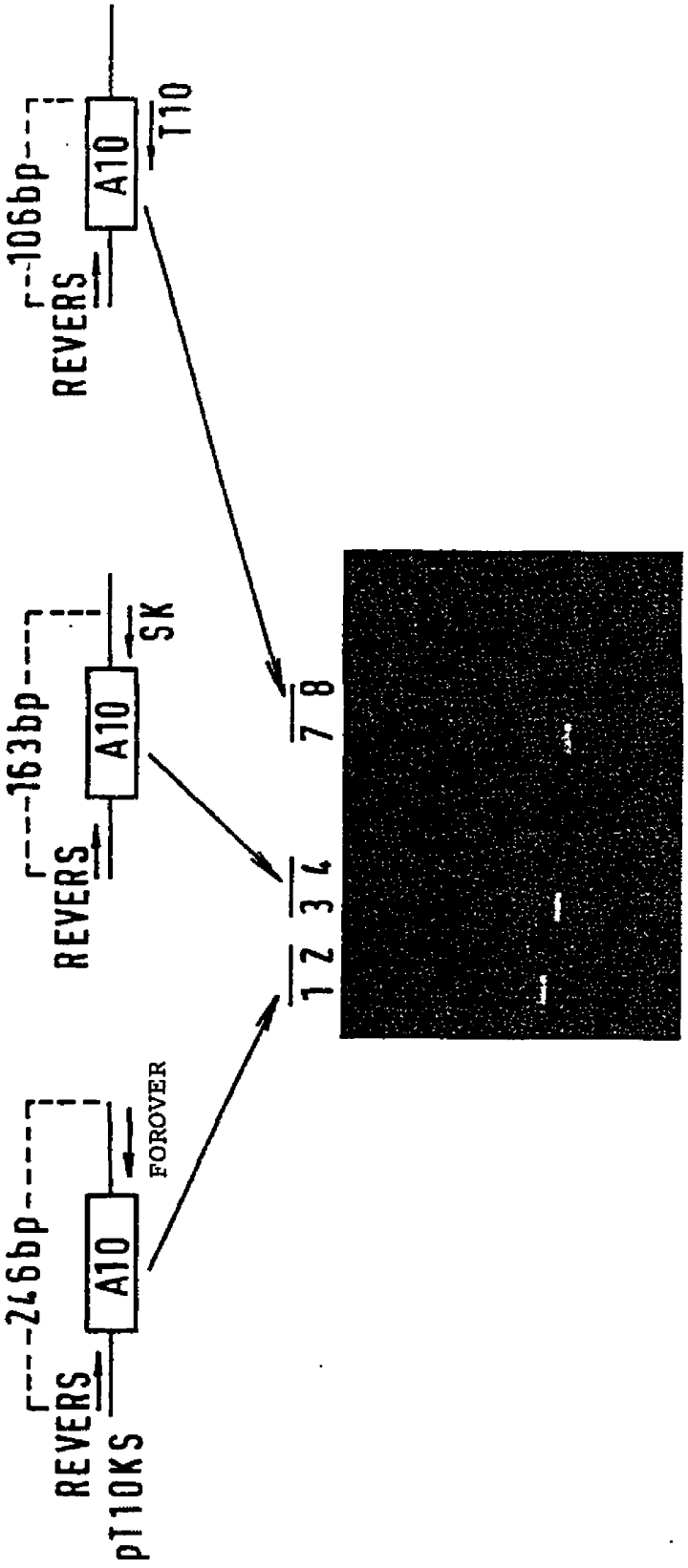
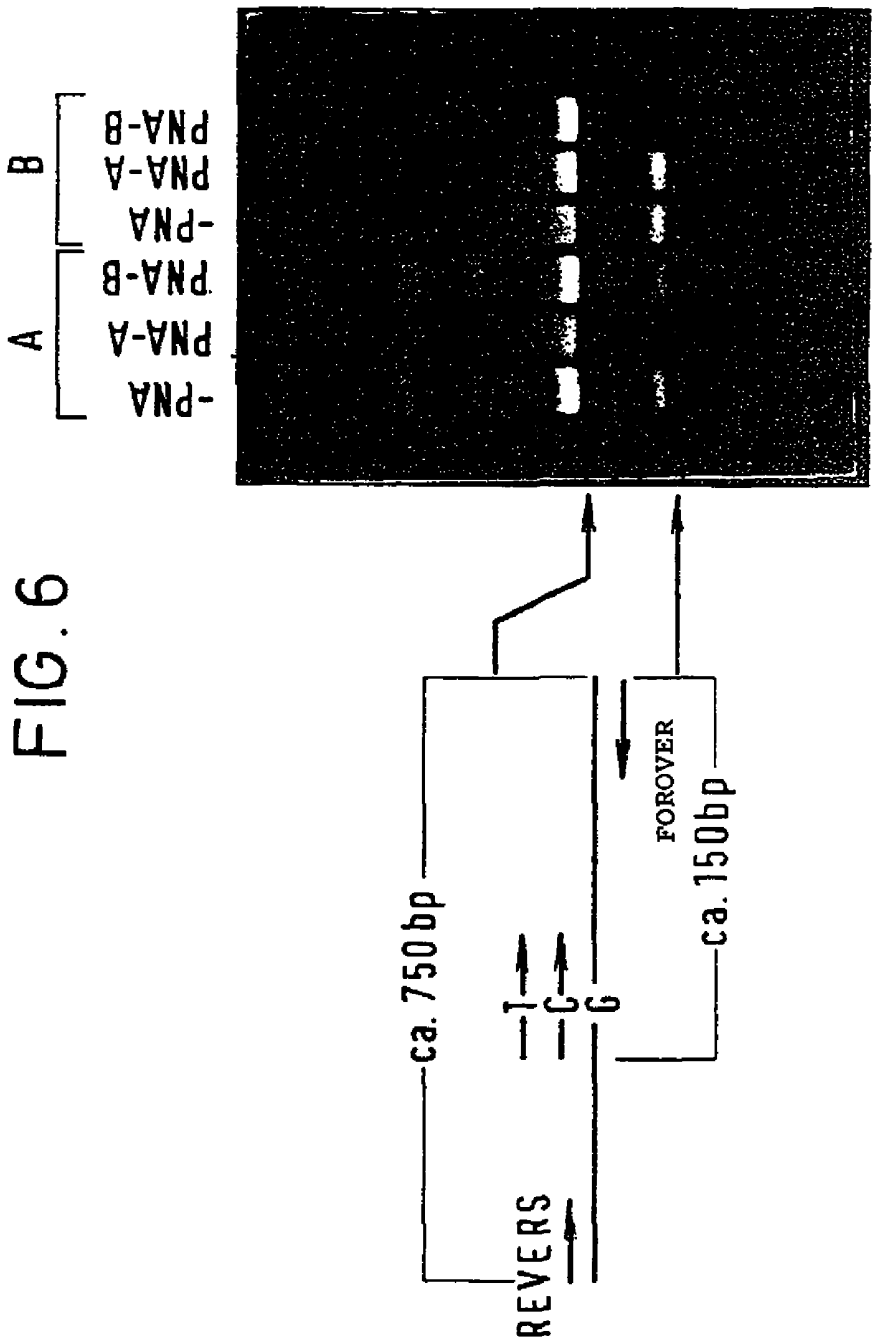

106bp
REVERS
A10
T10
163bp
REVERS
A10
SK
246bp
REVERS
A10
FOROVER
pT10KS
1 2 3 4
7 8

FIG. 6


B
A
-PNA
PNA-A
PNA-B
-PNA
PNA-A
PNA-B
ca. 750 bp
ca. 150 bp
FOROVER
REVERS
T
C
G