(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 25 240 T2** 2005.08.11

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 920 536 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 25 240.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/05677**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 911 955.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/042871**
(86) PCT-Anmeldetag: **24.03.1998**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **01.10.1998**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.06.1999**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **28.07.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.08.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12Q 1/68**

(30) Unionspriorität:
823111 **24.03.1997** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI

(73) Patentinhaber:
ROCHE Diagnostics Corp., Indianapolis, Ind., US

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(72) Erfinder:
LINDEMANN, W., Garrett, Benicia, US;
SCHUELER, Paula, Benicia, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR SUBTRAKTIVEN HYBRIDISIERUNG UND DIFFERENZIELLEN ANALYSE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die Erfindung liegt im Gebiet der genetischen Analyse. Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren zum Isolieren von Polynukleotiden, die Nukleinsäuresequenzen umfassen, die differenziell exprimiert, differenziell vorhanden oder differenziell in zwei oder mehr verschiedenen Zellen angeordnet sind, Zellpopulation oder Zelltypen, unter Verwendung von Techniken der subtraktiven Hybridisierung und selektiven Amplifikation.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Fähigkeit, Unterschiede zwischen zwei Populationen von Nukleinsäuresequenzen zu detektieren, ist für das Charakterisieren der molekularen Basis verschiedener pathologischer Zustände wichtig, beispielsweise Neoplasie, infektiöse und degenerative Erkrankungen, virale Infektionen und erbliche Prädispositionen gegenüber einer Krankheit. In wachsendem Umfang wird die Technik der subtraktiven Hybridisierung verwendet, um Polynukleotide zu identifizieren, die Sequenzen umfassen, die in einer ersten Population von Nukleinsäuresequenzen vorhanden sind, aber in einer zweiten Population fehlen, in einer anderen Konzentration vorliegen oder anders angeordnet sind.

[0003] Sargent und Dawid, Science 222: 135-139 (1983) verwendeten subtraktive Hybridisierung, um cDNAs zu isolieren, die mRNA-Moleküle repräsentieren, die bevorzugt im Gastrulastadium der Entwicklung des Froschembryos exprimiert werden. Gastrula-cDNA wurde mit RNA aus unbefruchteten Eiern hybridisiert und die cDNA, die nicht hybridisieren konnte, wurde kloniert. Diese klonierten Sequenzen repräsentierten mRNAs, die in der Froschgastrula differenziell exprimiert wurden. In ähnlicher Weise klonierten Hedrick et al., Nature (London) 308: 149-153 (1984) ein T-Zellrezeptormolekül durch Hybridisieren von cDNA aus antigenspezifischen T-Zellen mit RNA aus B-Zellen und Sammeln der nicht-hybridisierten cDNA. Trotz dieser frühen Erfolge wurde bald ersichtlich, dass dieses Verfahren in der Praxis auf die Detektion von differenziell exprimierter mRNA beschränkt ist, die 0,01% oder mehr der gesamten mRNA-Population repräsentieren. Weiterhin wird in Fällen, wo das Verfahren praktisch ist, die Selektion der differenziell exprimierten cDNA (als einzelsträngiges Material) durch Hydroxyapatitchromatographie erreicht, was aufwendig ist und zu Verlusten des wertvollen Materials führt. Schließlich stellt diese Technik keine Verfahren zum Detektieren von Unterschieden in der Genomorganisation, wie etwa Deletion, Genamplifikation oder Rearrangierung bereit.

[0004] Adaptionen der subtraktiven Hybridisierungstechniken sind entwickelt worden, welche die Identifikation und Isolation von Polynukleotiden gestatten, die Sequenzdifferenzen zwischen verschiedenen Genomen repräsentieren. Lamar und Palmer, Cell 37:171-177 (1984) verwendeten einen selektiven Klonierungsansatz, um Y-Chromosomen-spezifische Sequenzen in der Maus zu isolieren.

[0005] Hybridisierungen wurden unter Verwendung von Restriktionsenzym-verdauter männlicher DNA als Tracer und beschallter weiblicher DNA als Treiber durchgeführt. Von den nach dem Verschmelzen (Annealen) erhaltenen Duplexen enthalten nur solche, bei denen beide Stränge aus männlicher DNA abgeleitet sind, Sequenzen, die für das Y-Chromosom einmalig sind und eine Restriktionsenzymerkennungsstelle an jedem Ende besitzen. Solche Duplexe wurden vorzugsweise in einen Vektor geklont, der kompatible Restriktionsenzymerzeugte Enden enthielt.

[0006] Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4778-4782 (1985) und Nussbaum et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6521-6525 (1987) beschrieben die Isolation von Fragmenten, die Sequenzen enthielten, die aus dem menschlichen X-Chromosom durch Hybridisieren von Restriktionsenzym-verdauter DNA aus Zellen, die polysom für das X-Chromosom waren, deletiert waren, mit einem Überschuss an gescherter DNA aus Zellen, die ein oder mehrere X-Chromosomdeletionen beherbergten, unter Verwendung von Bedingungen, bei denen die Reassoziationsrate gesteigert war. Das selektive Klonieren unter Verwendung eines Vektors mit kompatiblen Restriktionsenzym-erzeugten Enden wurde für die Isolierung von Sequenzen verwendet, die in den X-Chromosomdeletionen fehlen.

[0007] Strauss und Ausubel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1889-1893 (1990) beschrieben eine Technik zum Isolieren eines Polynukleotids, das DNA umfasst, die in einer Hefedeletionsmutante fehlt. Bei diesem Verfahren wird es denaturierter Wildtyp-DNA gestattet, mit Biotin-markierter DNA aus der Deletionsmutante zu annealen und Biotin-enthaltende Duplexe (die Sequenzen enthalten, die der Mutante und dem Wildtyp gemein sind), werden aus der Lösung durch Binden an Avidin-beschichtete Perlen entfernt. Das Verfahren wird mehrfach wiederholt, unter Hinzufügen von frisch biotinylierter Wildtyp-DNA zur Mutanten-DNA, die am Ende jedes

Zyklus ungebunden zurückbleibt. Schließlich wird einzelsträngiges Material durch eine Polymerasekettenreaktion amplifiziert, um eine Sonde zu erzeugen, die an Sequenzen angereichert ist, die beider Deletionsmutante fehlen. Natürlich kann dieses Verfahren nur verwendet werden, um eine genomische Region zu isolieren, die durch eine Deletionsmutante definiert ist und seine Anwendbarkeit auf kompliziertere Genome als das der Hefe ist nicht überprüft worden. Eine ähnliche Vorgehensweise unter Verwendung einer Biotin-basierten Trennung zum Isolieren von differenziell exprimierten cDNAs wurde durch Lebeau et al., Nucleic Acids Research 19: 4778 (1991) beschrieben.

[0008] Wieland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2720-2724 (1990) beschrieben ein Verfahren zum Isolieren von Polynukleotiden, die Sequenzen umfassen, die in einer "Tester"-DNA-Population vorhanden sind, die in einer "Treiber"-Population fehlen. Bei diesem Verfahren wird die Tester-DNA mit Biotin markiert, und dann mehreren Hybridisierungsrunden mit Treiber-DNA im Überschuss unterworfen. Nach jeder Runde wird einzelsträngige DNA durch Hydroxyapatitchromatographie gesammelt. Nach der letzten Runde wird die kleine Menge nicht-hybridisierter biotinylierter DNA (die für die Testerpopulation einmalig ist) durch Avidinaffinitätschromatographie gereinigt, durch eine Polymerasekettenreaktion amplifiziert und kloniert, um eine Sonde für Sequenzen zu erzeugen, die in der Testerpopulation einmalig ist.

[0009] Kürzlich ist eine als repräsentationale Differenzanalyse (RDA) bekannte Technik entwickelt worden, welche die Isolierung von DNA-Fragmenten gestattet, die in einer Population von DNA-Sequenzen vorhanden sind, aber in einer anderen Population von DNA-Sequenzen fehlen. Lisitsyn et al., Science 259: 946-951 (1993); Lisitsyn et al., Meth. Enzymology 254: 291-304 (1995); US-Patent 5,436,142; US-Patent 5,501,964; Lisitsyn et al., Nature Genetics 6: 57-63 (1994). Dieses Verfahren gestattet es, nach Fragmenten zu suchen, die in einer "Tester"-Population von DNA-Sequenzen vorhanden sind, die nicht in einer verwandten "Treiber"-Population vorhanden sind. Solche einzigartigen Fragmente werden "Ziel"-Sequenzen genannt. Im ersten Schritt der RDA werden "Repräsentationen" beider Populationen erhalten. Diese Repräsentationen bestehen aus geringer komplexen Subsets der Originalsequenzpopulation. In der meist ausgeübten Ausführungsform der Technik wird eine Repräsentation erhalten, indem beide Populationen getrennt einem Verdau mit einer Restriktionsendonuklease unterworfen werden, ein erster Satz von Adaptern an den Enden der so erzeugten Fragmente anligiert wird und durch eine Polymerasenkettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern, die zum ersten Satz von Adaptern komplementär sind, unter Bedingungen amplifiziert werden, bei denen nur relativ kurze Fragmente (kleiner als 2 Kilobasenpaare) amplifiziert werden. Die ersten Adapter werden von den amplifizierten Fragmenten beider Populationen durch Restriktionsenzymverdau entfernt und ein zweiter Satz von Adaptern (mit einer anderen Sequenz als der erste Satz) wird durch Ligieren nur an den amplifizierten Fragmenten aus der Tester-DNA-Population angelagert.

[0010] Die Adapter-enthaltenden amplifizierten Fragmente aus der Testerpopulation werden dann mit einem Überschuss an amplifizierten Fragmenten aus der Treiberpopulation kombiniert (denen Adapter fehlen) und die Mischung wird unter denaturierenden und verschmelzenden Bedingungen inkubiert, worauf eine weitere Runde der PCR-Amplifikation unter Verwendung von Primern folgt, die zum zweiten Satz von Adaptern komplementär sind. Während des Verschmelzungsschrittes bilden sich mehrere Arten von Duplex. Weil die Treiberfragmente im Überschuss vorliegen, bildet der Hauptteil der Fragmente, welche sowohl den Tester- als auch den Treiberpopulationen gemeinsame Sequenzen enthalten, entweder Treiber-Treiber-Duplexe (die keine Adapter enthalten) oder Tester-Treiber-Duplexe (die einen einzelnen Adapter auf dem von dem Testerfragment stammenden Strang enthalten) bilden. Fragmente, welche Sequenzen enthalten, die für die Tester-Population einmalig sind, sind zum Selbstannealen in der Lage, um Duplexe zu erzeugen, die einen Adapter an jedem Ende besitzen. Folglich werden während des PCR-Schrittes nach dem Annealen Tester-Tester-Duplexe exponentiell amplifiziert werden. Andererseits werden Tester-Treiber-Duplexe, die nur einen einzelnen Adapter besitzen, in einer linearen Weise amplifiziert und werden damit nur einen kleinen Bruchteil der Population amplifizierter Sequenzen bilden. Treiber:Treiber-Duplexe, denen Adapter fehlen, werden überhaupt nicht amplifiziert. Die selektive Amplifikation von Fragmenten, die Zielsequenzen enthalten, wird somit mittels der Tatsache erreicht, dass vor dem Verschmelzen nur Fragmente aus der Tester-Population Adapter besitzen, die nur Tester-Tester-Duplexe mit dem Potential zur exponentiellen Amplifikation versehen.

[0011] Die Schritte des Entfernens der auf aus einem vorherigen Schritt erhaltenen angereicherten Zielfragmente vorhandenen Adapter, des Hinzufügens neuer Adapter, des Inkubierens unter denaturierenden und annealenden Bedingungen mit einem Überschuss an Fragmenten aus der Treiberpopulation und die Amplifikation durch PCR, werden wiederholt, bis ein gewünschter Grad an Anreicherung erzielt wird.

[0012] Eine Adaption der RDA, die cDNA-RDA genannt wird, ist kürzlich von Hubank & Schatz Nucleic Acids Research 22: 5640-5648 (1994) beschrieben worden, bei der zwei Populationen von cDNA auf die Anwesen-

heit eines cDNA-Fragments verglichen werden, das entweder eine mRNA repräsentiert, die für eine der beiden Populationen einzigartig ist oder eine mRNA, die in den zwei Populationen differenziell exprimiert wird. cDNA-RDA unterscheidet sich von dem Original-RDA-Protokoll in den folgenden Hinsichten. 1) Da die Komplexität der mRNA-Population einer typischen Säugerzelle nur 1 bis 2 % der Genomkomplexität ausmacht, wird die Erzeugung einer Repräsentation für die Praxis der cDNA-RDA nicht benötigt. Daher kann eine vollständige Analyse von Unterschieden in einem einzelnen Experiment erhalten werden. 2) Die Amplifikation von Fragmenten, von denen bereits bekannt ist, dass sie sich zwischen den zwei Populationen unterscheiden, können durch Hinzufügen solcher Fragmente zum Treiber minimiert werden. 3) Die Amplifikation von mRNAs repräsentierende Fragmenten, die bei verschiedenen Pegeln in den zwei Populationen vorhanden sind (eher als in einer Population abwesend), können durch Erschöpfen der Populationen von wenig häufigen Sequenzen (durch Hybridisieren mit niedrigem $C_o t$) vor der Amplifikation und Erniedrigen des Verhältnisses von Treiber zu Tester während der Hybridisierungen nach der Erzeugung des ersten Differenzproduktes erzielt werden. Dies wandelt effektiv eine hochregulierte Sequenz in eine einzigartige Sequenz um, für die Zwecke der Analyse. Eine Limitation der cDNA-RDA ist die Unfähigkeit, Differenzen aufgrund von Punktmutationen, kleinen Deletionen oder kleinen Insertionen zu erkennen, wenn sie nicht eine bestimmte Restriktionsenzym-Erkennungsstelle betreffen. cDNA-RDA ist verwendet worden, um Transkripte eines transfizierten Gens in kultivierten Zellen zu detektieren und um Gene repräsentierende cDNAs zu klonen, deren Transkription in Reaktion auf einen Umweltstimulus hochreguliert wird.

[0013] RDA und cDNA-RDA hängen von der selektiven Amplifikation zum Anreichern von Polynukleotiden ab, die Sequenzen enthalten, die für eine bestimmte Aminosäuresequenzpopulation einzigartig oder in ihr angereichert sind. Die selektive Amplifikation von einzigartigen Sequenzen wurde mit der selektiven Degradierung von in beiden Populationen gemeinsamen Sequenzen in der Technik der enzymatischen degradierenden Subtraktion kombiniert. Zeng et al., Nucleic Acids Research 22: 4381-4385 (1994); US-Patent 5,525,471. Bei dieser Prozedur werden die Enden der die Testerpopulation umfassenden amplifizierten DNA-Fragmente durch die enzymatische Addition von α-Phosphorthioat-modifizierten Nukleotiden blockiert. Die Hybridisierung von blockierten Testerfragmenten mit einem Überschuss an unblockierten Treiberfragmenten wird dann unter Bedingungen durchgeführt, welche die Verschmelzungsrate beschleunigen, was die Verwendung von relativ niedrigen Treiberkonzentrationen gestattet. Nach Hybridisierung zerstört die Behandlung mit Exonuklease III (einer Doppelstrang-spezifische Nuklease, die vom 3'-Ende angreift) und Exonuklease VII (einer Einzelstrang-spezifische Nuklease) Treiber-Treiber- und Tester-Treiber-Duplexe. Jedoch machen die Phosphorthioatblockierten Enden von Tester-Tester-Hybriden diese Duplexe gegenüber der kombinierten Nukleasebehandlung resistent. Tester-Tester-Duplexe, welche die Nukleasebehandlung überleben, durchlaufen eine zweite Subtraktionsrunde und werden dann durch eine Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Zusätzliche Subtraktions- und Amplifikationsrunden können bei Bedarf durchgeführt werden.

[0014] Da die Technik der RDA in den letzten Jahren öfter ausgeübt worden ist, sind mehrere Nachteile ersichtlich geworden. Ein Hauptproblem ergibt sich aus der Ineffizienz der multiplen Restriktionsverdaus und Ligationsreaktionen, die bei der Technik verwendet werden. Das Fehlen eines vollständigen Restriktionsverdaus führt zu einem unvollständigen Entfernen des ersten Adaptersatzes aus der Testerfragmentpopulation, was zu einer Unfähigkeit führt, den zweiten Satz von Adaptern anzulagern. In ähnlicher Weise würde ein ineffizienter Ligationsschritt zum unvollständigen Anlagern des zweiten Satzes von Adaptern führen, selbst an Stellen, von denen der erste Satz entfernt worden ist. Da die Amplifikationsprimer komplementär zum zweiten Satz von Adaptern sind, vermindert eine unvollständige Anlagerung der zweiten Adapter das Ausmaß der Amplifikation von Zielsequenzen, das erzielt werden kann. Zusätzlich führt die Notwendigkeit, Proben durch mehrere Schritte zu prozessieren und möglicherweise zwischen den Schritten Material aufzureinigen, zu Verlusten von bereits rarem experimentellem Material. Eine mögliche Folge ineffizienter Restriktionsverdauung und/oder Ligation ist die Erzeugung von Falsch-Positiven, wobei der Verlust einer bestimmten Treibersequenz durch das Versagen, amplifiziert zu werden, zu einer unrichtigen Identifikation seines Komplements im Tester als Zielsequenz führt.

[0015] Ein anderer Nachteil der RDA, wie sie üblicherweise ausgeführt wird, rührt von der Verwendung einer großen Zahl von Polymerasekettenreaktionszyklen während des Amplifikationsschritts her. Typischerweise werden 20 Zyklen der PCR verwendet, um die Repräsentation zu erzeugen, und 25 bis 30 Zyklen von PCR werden während jeder Hybridisierung/Amplifikationsrunde der RDA verwendet. Falls, wie üblich, drei Runden von Hybridisierung/Amplifikation durchgeführt werden, haben die Zielnukleinsäuren 95 bis 110 Amplifikationsrunden zu dem Zeitpunkt durchlaufen, zu dem sie isoliert werden. Zusätzliche Amplifikationsrunden werden üblicherweise verwendet, um das durch die RDA isolierte Differenzprodukt zu klonieren und zu sequenzieren. Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass bei hohen Zykluszahlen einer PCR-Amplifikation ein "Plateaueffekt" beobachtet wird. Innis und Gelfland in "PCR Protocols: A guide to methods and applications", Hrsg. Innis et al., Academic Press (1990), S. 3-12. Dieser Effekt ist durch ein Absinken in der exponentiellen Rate der Akkumu-

lierung von Amplifikationsprodukt charakterisiert, das während der späten Zyklen auftritt. Mögliche Ursachen des Plateaueffekts beinhalten 1) Erschöpfung an Substraten, 2) Verlust an Enzymaktivität, 3) Degradierung von Substraten, 4) Endproduktinhibierung, 5) Kompetition um die Reaktanten durch nicht-spezifische Produkte, 6) unvollständige Denaturierung des Produkts bei einer hohen Produktkonzentration und 7) Wiederannealen von Produkt bei hoher Produktkonzentration (was ein Primerannealen und/oder eine Extension blockieren kann).

[0016] Diese letzten zwei Merkmale der späteren Zyklen einer Polymerasekettenreaktion sind insbesondere für RDA und verwandte Techniken wichtig, weil sie, außer dass sie zu einer weniger als exponentiellen Amplifikation führen, auch in einem Schiefwerden der Repräsentation von Produkten in Reaktionen, wie etwa RDA, führen, bei denen mehrere Fragmente amplifiziert werden. Insbesondere haben Mathieu-Daude et al., Nucleic Acids Research 24: 2080-2086 (1996) gezeigt, dass in späteren Zyklen die Amplifikationsrate von häufigen Produkten rascher sinkt, als diejenige von weniger häufigen Produkten in derselben Reaktion. Dies liegt am bevorzugten Wiederannealen der häufigeren Produkte, was die Primerbindung und/oder Extension für diese häufigen Spezies verhindert. Dieses Phänomen ist konsistent mit der Tatsache, dass die Annealingrate proportional zu den Konzentrationen der reagierenden Stränge ist. Die Konsequenz dieses Effekts für die Praxis von cDNA-RDA ist, dass die Fähigkeit, mRNAs, die in verschiedenen Konzentrationen in zwei Populationen vorhanden sind, zu detektieren (im Gegensatz zu mRNAs, die für eine der Populationen einmalig sind) für mRNAs minimiert wird, deren cDNAs mit hohen Konzentrationen in der Ausgangspopulation vorhanden sind.

[0017] Eine weitere potentielle Quelle von Artefakten in der derzeitigen Prozedur für die RDA ist die Verwendung von zehn PCR-Zyklen unmittelbar nach dem ersten Hybridisierungsschritt. Erst nachdem diese zehn Amplifikationszyklen durchgeführt worden sind, wird das Material mit Nuklease behandelt, um unhybridisiertes Material abzubauen. Diese Abfolge von Ereignissen hat den möglicherweise unerwünschten Effekt, dass Tester:Tester-Duplexe (d.h. das gewünschte Produkt) zehn Denaturierungsschritte unterworfen werden, mit dem entsprechenden Risiko, dass einige dieser Duplexe darin versagen, sich umzuformen, beispielsweise aufgrund der Degradierung ihrer bildenden Stränge, während sie im denaturierten Zustand sind.

[0018] Schließlich kann die Anwesenheit von Treiber-DNA im Überschuss während der zehn PCR-Zyklen vor der Nukleasebehandlung zu einer verminderten Effizienz der Amplifikation von Tester:Tester-Hybriden führen, aufgrund des Potentials für die restlichen Treiber:Treiber- und Treiber:Tester-Duplexe, als eine Senke für Primer, Substrate, Gegenionen und Enzyme zu wirken.

[0019] In der Ausübung der vorliegenden Erfindung werden diese Nachteile durch Verfahren überwunden, die weniger PCR-Zyklen, einen Nukleaseverdau vor der Amplifikation und einen einzelnen Adapter, der zur Verwendung mit mehreren Primern ausgelegt ist, verwenden. Die Erfindung zeigt auch zusätzliche Vorteile, wie unten stehend dargestellt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0020] Die Erfindung stellt verbesserte Verfahren zur Identifikation und Isolierung von Polynukleotiden bereit, die Nukleinsäuresequenzen umfassen, die in einer ersten (Proben-)Zelle, Zelltyp oder Zellpopulation vorhanden sind, die nicht in einer oder mehreren (Kontroll-)Zelle(n), Zelltyp(en) oder Zellpopulation(en) vorhanden sind. Solche Polynukleotide werden als "einmalige Fragmente" oder "Differenzprodukte" unter Verwendung der Verfahren der Erfindung identifiziert. Einmalige Fragmente können als Ergebnis von Unterschieden im Sequenzinhalt erhalten werden, wie etwa Insertion oder Deletion oder durch Unterschiede in der Sequenzorganisation, wie etwa Inversion oder Translokation. Das Verfahren der Erfindung leidet nicht an den mit den vorherigen Verfahren der subtraktiven Hybridisierung assoziierten Probleme, wie etwa Verluste an Material, die mit den wiederholten Restriktionsverdau- und Ligationsschritten assoziiert sind, verschobene Repräsentationen, die sich aus übermäßigen Amplifikationszyklen ergeben, und Interferenz mit den Amplifikationsschritten durch große Mengen unerwünschter Kontrollsequenzen.

[0021] Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Gewinnen eines in einer Probenpopulation von Polynukleotiden vorkommenden einmaligen Fragments, das nicht in einer Kontrollpopulation von Polynukleotiden vorkommt, wobei das Verfahren umfasst:

a) Fragmentieren beider Populationen von Polynukleotiden durch dasselbe Verfahren, um Proben- und Kontrollfragmentpopulation zu erzeugen;

b) kovalentes Anlagern eines Oligonukleotids, welches verschränkte Primerbindungsstellen umfasst, an beide Fragmentpopulationen, wobei die Primerbindungsstellen eine äußerste Primerbindungsstelle, eine innerste Primerbindungsstelle und zumindest eine weitere interne Primerbindungsstelle dazwischen um-

fasst, um Oligonukleotid-markierte Proben und Kontrollfragmentpopulationen herzustellen;
c) Amplifizieren der Oligonukleotid-markierten Probenfragmentpopulation unter Verwendung eines nicht zielgerichteten Primers, der zur äußersten Primerbindungsstelle des Nucleotids komplementär ist, um eine amplifizierte Probenfragmentpopulation zu erzeugen;
d) Amplifizieren der Oligonukleotid-markierten Kontrollfragmentpopulation unter Verwendung eines zielgerichteten Primers, der zur innersten Primerbindungsstelle des Oligonukleotids komplementär ist, um eine amplifizierte Kontrollfragmentpopulation zu erzeugen;
e) Kombinieren der amplifizierten Probenfragmentpopulation mit einem Überschuss der amplifizierten Kontrollfragmentpopulation, Denaturieren und Inkubieren unter annealenden Bedingungen, um eine Annealing-Mischung bereitzustellen;
f) Unterwerfen der Annealing-Mischung unter Bedingungen, unter denen alle Fragmente degradiert werden, außer doppelsträngigen Fragmenten, die in jedem Strang einen zielgerichteten Primer enthalten; und
g) nachfolgendes Unterwerfen der Annealing-Mischung, die wie in Schritt f) behandelt wurde, einer Amplifikation, unter Verwendung von nichtzielgerichteten Primern, die zu einer der internen Primerbindungsstellen komplementär sind, um ein erstes Differenzprodukt zu erzeugen.

[0022] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren bereit, weiterhin umfassend das Wiederholen der Schritte (e) bis (g), wobei ein Differenzprodukt die amplifizierte Probenfragmentpopulation ersetzt und wobei die behandelte Annealing-Mischung einer Amplifikation unter Verwendung eines nicht zielgerichteten Primers unterworfen wird, der zu einer anderen Primerbindungsstelle komplementär ist als der im vorigen Schritt verwendeten, um zusätzliche Differenzprodukte bereitzustellen.

[0023] Die Erfindung stellt zusätzlich ein Verfahren zum Gewinnen eines in einer Probenpopulation von Polynukleotiden vorhandenen einmaligen Fragments bereit, das nicht in einer Kontrollpopulation von Polynukleotiden vorhanden ist, wobei das Verfahren umfasst:
a) Fragmentieren beider Populationen von Polynukleotiden durch dasselbe Verfahren, um Proben- und Kontrollfragmentpopulation zu erzeugen;
b) kovalentes Anlagern eines Oligonukleotids, welches verschränkte Primerbindungsstellen enthält oder kodiert, an beide Fragmentpopulationen, wobei die Primerbindungsstellen eine äußerste Primerbindungsstelle, eine innerste Primerbindungsstelle und zumindest eine weitere interne Primerbindungsstelle dazwischen umfasst, um Oligonukleotid-markierte Proben und Kontrollfragmentpopulationen herzustellen;
c) Amplifizieren der Oligonukleotid-markierten Probenfragmentpopulation unter Verwendung eines nicht zielgerichteten Primers, der zur äußersten Primerbindungsstelle des Nucleotids komplementär ist, um eine amplifizierte Probenfragmentpopulation zu erzeugen;
d) Amplifizieren der Oligonukleotid-markierten Kontrollfragmentpopulation unter Verwendung eines zielgerichteten Primers, der zur innersten Primerbindungsstelle des Oligonukleotids komplementär ist, um eine amplifizierte Kontrollfragmentpopulation zu erzeugen;
e) Kombinieren der amplifizierten Probenfragmentpopulation mit einem Überschuss der amplifizierten Kontrollfragmentpopulation, Denaturieren und Inkubieren unter annealenden Bedingungen, um eine Annealing-Mischung bereitzustellen;
f) Unterwerfen der Annealing-Mischung unter Bedingungen, unter denen alle Fragmente degradiert werden, außer doppelsträngigen Fragmenten, die in jedem Strang einen zielgerichteten Primer enthalten; und
g) nachfolgendes Unterwerfen der Annealing-Mischung, die wie in Schritt f) behandelt wurde, einer Amplifikation, unter Verwendung von nichtzielgerichteten Primern, die zu einer der internen Primerbindungsstellen komplementär sind, um ein erstes Differenzprodukt zu erzeugen.

[0024] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Gewinnen zusätzlicher Differenzprodukte durch Wiederholen der vorstehenden Serie von Schritten a) bis g) bereit, wobei das erste Differenzprodukt (oder ein nachfolgendes Differenzprodukt) die amplifizierte Probenfragmentpopulation ersetzt und wobei die behandelte Verschmelzungsmischung einer Amplifikation unterworfen wird, die einen nichtzielgerichteten Primer verwendet, der komplementär zu einer internen Primerbindungsstelle ist, die sich von der unterscheidet, die im vorstehenden Schritt verwendet wird, oder einen nicht-zielgerichteten Primer, der zur innersten Primerbindungsstelle komplementär ist, um zusätzliche Differenzprodukte bereitzustellen.

[0025] Die Erfindung stellt auch eine Ausführungsform der Erfindung zum Gewinnen zusätzlicher Differenzprodukte durch Wiederholen der vorstehenden Reihe von Schritten e) bereit, wobei das erste Differenzprodukt (oder ein nachfolgendes Differenzprodukt) die amplifizierte Probenfragmentpopulation ersetzt, und wobei die behandelte Verschmelzungsmischung einer Amplifikation unter Verwendung eines zu einer internen Primerbindungsstelle komplementären nicht-zielgerichteten Primers unterworfen wird, die sich von der im vorstehenden Schritt verwendeten unterscheidet, oder einen nicht-gerichteten Primer, der zur innersten Primerbindungs-

stelle komplementär ist.

[0026] Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden Verfahren zum Gewinnen einmaliger cDNA-Fragmente, die für Unterschiede in der mRNA-Population von zwei oder mehr verschiedenen Zellen, Zelltypen oder Zellpopulationen repräsentativ ist, bereitgestellt.

[0027] Bei einer anderen Ausführungsform werden Verfahren zum Gewinnen eines Differenzproduktes, das ein oder mehrere Nukleotidfragmente umfasst, die sich zwischen zwei Polynukleotidpopulationen unterscheiden, bereitgestellt.

[0028] Bei einer anderen Ausführungsform werden Verfahren zum Gewinnen von Fragmenten, welche Sequenzdifferenzen zwischen zwei Genomen repräsentieren, bereitgestellt.

[0029] Bei einer anderen Ausführungsform werden Verfahren zum Gewinnen von cDNAs, die RNA-Moleküle repräsentieren, die für eine bestimmte Polynukleotidpopulation einmalig sind, bereitgestellt.

[0030] Bei einer anderen Ausführungsform werden Verfahren zum Gewinnen von cDNAs, die RNA-Moleküle repräsentieren, die in einer bestimmten Polynukleotidpopulation präferentiell exprimiert werden, bereitgestellt.

[0031] Bei einer anderen Ausführungsform wird ein verbessertes Verfahren der repräsentationalen Differenzanalyse bereitgestellt, bei dem mehrere Schritte von Restriktionsverdau und Ligation vermieden werden.

[0032] Bei einer anderen Ausführungsform wird ein Verfahren zum Anpeilen einer Population von Polynukleotiden für selektiven Abbau bereitgestellt.

[0033] Bei einer anderen Ausführungsform wird ein Verfahren zum Erreichen einer selektiven Amplifikation einer Population von Polynukleotiden bereitgestellt.

[0034] Bei einer anderen Ausführungsform wird ein Oligonukleotid mit mehreren Primerbindungsstellen zur Verwendung im Verfahren der Erfindung und verwandten Verfahren bereitgestellt.

[0035] Bei einer anderen Ausführungsform wird ein Oligonukleotid mit mehreren Primerbindungsstellen mit erhöhten Verschmelzungstemperaturen vom 5'- bis zum 3'-Ende zur Verwendung im Verfahren der Erfindung und verwandten Verfahren bereitgestellt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0036] Fig. 1 zeigt ein Flussdiagramm für eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0037] Die vorliegende Erfindung stellt verbesserte Verfahren für eine subtraktive Hybridisierung bereit, um Polynukleotidfragmente zu identifizieren, die für eine bestimmte Probenpopulation von Polynukleotiden einmalig sind. Das Verfahren kann verwendet werden, um neben anderen Dingen Polynukleotidfragmente, wie etwa cDNAs zu isolieren, die für einen bestimmten pathologischen oder Entwicklungszustand charakteristisch sind. Das Verfahren ist schneller als existierende Verfahren, ergibt eine höhere Ausbeute des authentischen Produkts und erzeugt eine repräsentativere Sammlung von einmaligen Fragmenten als dies vormalige Verfahren tun.

[0038] Wenn nicht anders angezeigt, verwendet die Ausübung der vorliegenden Erfindung konventionelle Techniken der Molekularbiologie, Biochemie, Mikrobiologie, rekombinanten DNA, Nukleinsäurehybridisierung, Genetik, Immunologie, Embryologie und Onkologie, die alle zu den Kenntnissen auf dem Gebiet der Technik gehören. Solche Techniken sind vollständig in der Literatur erläutert. Siehe beispielsweise Maniatis, Fritsch, & Sambrook, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Habor Laboratory Press (1982); Sambrook, Fritsch & Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Glover, DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH, Bände I und II, IRL Press (1985), Band III, IRL Press (1987); Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING, John Wiley & Sons (1984); Rigby (Hrsg.), die Reihe GENETIC ENGINEERING (Academic Press); Setlow & Hollaender (Hrsg.), die Reihe GENETIC ENGINEERING: PRINCIPLES

AND METHODS, Plenum Press; die Reihe METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press); Silhavy, Berman & Enquiest, EXPERIMENTS WITH GENE FUSIONS, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1984); Gait (Hrsg.), OLIGONUCLEOTIDE SYNTESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1984, 1985); Eckstein (Hrsg.) OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1991); Hames & Higgins, NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION: A PRACTICAL APPROACH, IRLK Press (1985); Hames & Higgins, TRANSCRIPTION AND TRANSLATION: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1984); Freshney, ANIMAL CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1986); Mahy, VIROLOGY: A PRACTICALAPPROACH, IRL Press (1985); Woodward, IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES: A PRACTICAL APPROACH IRL Press (1985); Miller & Calos (Hrsg.), GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987); Erlich (Hrsg.) PCR TECHNOLOGY, Stockton Press (1989); Innis et al., PCR PROTOCOLS, Academic Press (1990).

[0039] In der Beschreibung der vorliegenden Erfindung wird die folgende Terminologie, wie unten definiert, verwendet.

[0040] Ein Polynukleotid ist ein Polymer aus Nukleotiden, und der Ausdruck soll kleinere Polynukleotide (Fragmente) umfassen, die durch Fragmentierung größerer Polynukleotide erzeugt werden. Die Ausdrücke Polynukleotid und Nukleinsäure beinhalten sowohl RNA als auch DNA, wie auch einzelsträngige und doppelsträngige Polynukleotide und Nukleinsäuren. Polynukleotide beinhalten auch modifizierte Polynukleotide und Nukleinsäuren, die solche Modifikationen der Base, des Zuckers oder der Phosphatgruppen enthalten, wie sie im Stand der Technik bekannt sind.

[0041] Eine Population von Polynukleotiden ist jegliche Sammlung von Polynukleotiden, die aus unterschiedlichen Nukleotidsequenzen besteht. Beispiele von Polynukleotidpopulationen beinhalten, sind jedoch nicht beschränkt auf, das Genom einer normalen Zelle, das Genom einer infizierten Zelle, das Genom einer neoplastischen Zelle, das Genom einer in einem pathologischen Zustand befindlichen Zelle, die DNA, die für eine bestimmte Zelle, eine multizelluläre Struktur, einen Organismus, einen Differenzierungszustand, einen pathologischen oder nicht-pathologischen Zustand charakteristisch ist, die Gesamt-RNA-Population einer Zelle, die polyadenylierte RNR-Population einer Zelle, oder eine für die mRNA-Population einer bestimmten Zelle, einer multizellulären Struktur, eines Organismus, eines Differenzierungszustands, eines pathologischen oder nicht-pathologischen Zustands präsentative cDNA-Population.

[0042] Unter Verwendung der Verfahren dieser Erfindung wird man eine Probenpopulation von Polynukleotiden nach Fragmenten durchsuchen, die ein oder mehrere Polynukleotidsequenzen umfassen, die in Bezug auf eine Kontrollpopulation von Polynukleotiden einmalig sind. Eine Probenpopulation wird beispielsweise aus einer bestimmten Zelle, einem Zelltyp, einer infizierten Zelle, einer pathologischen Zelle oder Zellen in einem bestimmten Entwicklungszustand oder Krankheitsfortschritt gewonnen werden und auf die Anwesenheit eines oder mehrer einmaliger Fragmente durch Vergleich mit einer Kontrollpopulation gemäß den Verfahren der Erfindung getestet werden. Beispielsweise würde, falls die Probenpopulation aus einer Virus-infizierten Zelle gewonnen wird, die Kontrollpopulation von einer uninfizierten Zelle derselben Art gewonnen werden. In gewissen Situationen, wie etwa der Identifikation einer Sequenz, die in einem bestimmten pathologischen Zustand deletiert ist, können normale (nicht-pathologische) Zellen als Probenpopulation verwendet werden.

[0043] Sequenzkomplexität oder Komplexität ist als die Länge einer nicht-wiederholten Nukleotidsequenz definiert, die in einer Population von Polynukleotiden vorhanden ist.

[0044] Ein Untersatz niedrigerer Komplexität einer Population von Polynukleotiden oder Fragmenten ist eine Sammlung, die einige, aber nicht alle Sequenzen oder Fragmente enthält, die in der ursprünglichen Population vorhanden sind.

[0045] Ein Fragment einer Nukleinsäure ist ein kleineres Stück der Nukleinsäure. Fragmentierung ist der Prozess, durch den Fragmente erhalten werden. Die Fragmentierung kann durch jegliches im Stand der Technik bekannte Verfahren erreicht werden, beispielsweise enzymatisch, chemisch, mechanisch, etc., soweit das Verfahren reproduzierbar denselben Satz von Fragmenten für eine gegebene Population von Polynukleotiden erzeugt. Ein übliches Verfahren der Fragmentierung einer Polynukleotidpopulation ist es, die Population der Wirkung einer Restriktionsendonuklease auszusetzen.

[0046] Eine Fragmentpopulation wird erhalten, wenn eine Nukleinsäure oder eine Population von Polynukleotiden einer Fragmentierung unterworfen wird.

[0047] Wie hierin verwendet, bezieht sich Markierung auf ein Verfahren, bei dem zusätzliche Sequenzen einem Polynukleotid oder Nukleinsäurefragment hinzugefügt werden. Eine markierte Population von Polynukleotidfragmenten kann beispielsweise durch das Anlagern von Oligonukleotidlinkern oder -adaptern an einer Population von Polynukleotidfragmenten erzeugt werden. Differenzielle Markierung bezieht sich auf eine Situation, in welcher die Anwesenheit von zusätzlichen Sequenzen offenbart wird, um zwei oder mehr Populationen von Polynukleotiden oder Polynukleotidfragmenten voneinander zu unterscheiden.

[0048] Denaturierung bezieht sich auf den Prozess, durch den eine doppelsträngige Nukleinsäure in ihre sie bildenden Einzelstränge umgewandelt wird. Die Denaturierung kann beispielsweise durch Verwendung von hoher Temperatur, niedriger Ionenstärke, saurem oder alkalischem pH und/oder gewissen organischen Lösungsmitteln erreicht werden. Annealen (Verschmelzen) (manchmal Hybridisierung genannt) bezieht sich auf den Prozess, durch den komplementäre einzelsträngige Nukleinsäuren eine Doppelstrangstruktur oder einen Duplex bilden, vermittelt durch Wasserstoffbindung zwischen komplementären Basen in den zwei Strängen.

[0049] Die Annealinqbedingungen sind solche Werte beispielsweise der Temperatur, der Ionenstärke, des pHs und des Lösungsmittels, die das Auftreten des Annealens gestatten. Viele verschiedene Kombinationen der oben erwähnten Variablen sind für das Annealing zielführend. Geeignete Bedingungen zum Annealen sind im Stand der Technik wohl bekannt und beinhalten allgemeinen eine Ionenstärke von 50 mM oder höher monovalenter und/oder divalenter Kationen bei neutralem oder fast neutralem pH.

[0050] Eine Annealingmischung ist eine Zusammensetzung, die einzelsträngige Nukleinsäure bei der geeigneten Temperatur, pH und Ionenstärke enthält, um zu gestatten, dass ein Annealen zwischen Molekülen, die Regionen komplementärer Sequenz teilen, stattfindet.

[0051] Ein Duplex bezieht sich auf ein doppelsträngiges Polynukleotid.

[0052] Amplifikation ist der Prozess, durch welchen zusätzliche Kopien einer Nukleinsäuresequenz oder Sammlung von Nukleinsäuresequenzen erzeugt werden. Amplifikation wird allgemein enzymatisch unter Verwendung eines DNA-Polymeraseenzyms erzielt. Derzeitige Techniken gestatten exponentielle Amplifikation jeglicher Sequenz, die von Bindungsstellen für ein Paar von Oligonukleotidprimern flankiert ist, durch die reiterative Anwendung von Denaturierung, Primerannealing und Polymeraseextensionsschritten, was allgemein als Polymerasekettenreaktion bekannt ist. US-Patent 4,683,202, Saiki et al., Science 239: 487-491 (1988), Innis et al., oben, Erlich, oben. Unter den am meisten ausgeübten Bedingungen der Polymerasekettenreaktion beträgt die Polymerisationsrate ungefähr 1.000 bis 2.000 Nukleotide pro Minute. Dementsprechend ist die maximale Länge an amplifizierbarer Sequenz durch die Reaktionsbedingungen beschränkt (beispielsweise die Dauer des Extensionsschrittes). Die Fähigkeit, das Ausmaß an Verlängerung in einer Polymerasekettenreaktion zu steuern, kann vorteilhaft verwendet werden, um Niederkomplexitäts-Untersätze von amplifizierten Fragmenten aus einer Anfangsfragmentsammlung hoher Komplexität zu erzeugen.

[0053] Degradierung (Abbau) bezieht sich auf die Depolymerisation eines Polynukleotids. Die Degradierung eines Polynukleotids wird allgemein durch Hydrolyse von Internukleotidphosphodiester-Bindungen auftreten, um kurze Oligonukleotide und/oder Mononukleotide freizusetzen. Degradierung kann entweder chemisch oder enzymatisch erzielt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung durchlaufen Fragmente einer Kontrollpopulation von Polynukleotidfragmenten vorzugsweise exonukleolytische Degradierung, weil sie im Vergleich zu einer Probenpopulation von Polynukleotidfragmenten differenziell markiert sind.

[0054] Ein Differenzprodukt ist ein als Ergebnis der Ausübung der vorliegenden Erfindung erhaltenes Polynukleotid. Es enthält einen oder mehrere Polynukleotide oder Polynukleotidfragmente, die in einer Probenpopulation von Polynukleotiden oder Polynukleotidfragmenten vorliegen, die nicht in einer Kontrollpopulation von Polynukleotiden oder Polynukleotidfragmenten vorliegen.

[0055] Ein einmaliges Fragment ist ein Fragment, das in der Probenpopulation von Polynukleotiden oder Polynukleotidfragmenten vorhanden ist, das nicht in einer Kontrollpopulation von Polynukleotiden oder Polynukleotidfragmenten vorhanden ist.

[0056] Ein Primer ist ein Oligonukleotid, das zum Basenpaaren mit einem Polynukleotid in der Lage ist und als eine Stelle dient, von der aus eine Polymerisation begonnen werden kann. Ein Primer mit Eigenschaften der Gestalt, dass sein Extensionsprodukt gegenüber einer Degradierung empfindlich ist, ist als ein zielgerichteter Primer bekannt; ein Primer mit Eigenschaften, so dass sein Extensionsprodukt gegenüber einer Degradierung gestützt ist, ist als ein nicht-zielgerichteter Primer bekannt. Allgemeiner gesagt, ist eine angepeilte Po-

pulation von Polynukleotiden eine solche, die vorzugsweise einer Degradierung mittels einer gewissen einmaligen Eigenschaft oder Zusammensetzung zugänglich ist, die nicht mit einer nicht-angepeilten Population von Polynukleotiden geteilt wird.

[0057] Eine Primerbindungsstelle bezieht sich auf eine Region eines Polynukleotids, wie etwa einen Adapter oder eine von einem Adapter kodierte Sequenz, die zur Basenpaarung mit einem Primer in der Lage ist oder die eine Sequenz kodiert, die zur Basenpaarung mit einem Primer in der Lage ist. Beispielsweise können die Adapter der vorliegenden Erfindung innerhalb ihrer Sequenz mehrere Primerbindungsstellen enthalten, oder diese kodieren. Im Falle mehrerer Primerbindungsstellen ist die äußerste Primerbindungsstelle die Primerbindungsstelle, die am nächsten am 3'-Ende des Nukleinsäurestrangs lokalisiert ist, in dem sie sitzt. Die innerste Primerbindungsstelle ist am weitesten vom 3'-Ende des Nukleinsäurestrangs entfernt lokalisiert, in dem sie sitzt. Eine oder mehrere interne Primerbindungsstelle(n) können zwischen der äußersten und der innersten Primerbindungsstelle vorhanden sein. Man sollte anmerken, dass, da die Polymerisation in einer 5'-nach-3'-Richtung fortschreitet und eine Primerbindungsstelle komplementär zum Primer ist, von dem aus die Polymerisation beginnt, eine äußerste Bindungsstelle eine Sequenz am nächsten am 5'-Ende des Produkts der Polymerisation kodiert im Vergleich zu internen oder innersten Primerbindungsstellen.

[0058] Ein Oligonukleotid ist eine kurze Nukleinsäure, allgemein DNA und allgemein einzelsträngig. Allgemein ist ein Oligonukleotid kürzer als 200 Nukleotide, insbesondere kürzer als 100 Nukleotide, ganz besonders 50 Nukleotide oder kürzer.

[0059] Eine Nuklease ist ein Enzym, das zum Abbauen von Nukleinsäure in der Lage ist. Eine Exonuklease degradiert von den Enden eines Nukleinsäuremoleküls. Eine 5'-spezifische Exonuklease beginnt ihre Degradierung am 5'-Ende eines Nukleinsäuremoleküls, und eine 3'-spezifische Exonuklease beginnt ihre Degradierung am 3'-Ende eines Nukleinsäuremoleküls. 5'-spezifische Exonukleasen können zusätzlich im Hinblick auf 5'-Phosphat- oder 5'-Hydroxyterminierte Enden spezifisch sein. In ähnlicher Weise können 3'-spezifische Exonukleasen für entweder 3'-Phosphat- oder 3'-Hydroxy-terminierte Enden spezifisch sein. Eine Endonuklease degradiert intern in einem Nukleinsäuremolekül. Eine Einzelstrang-spezifische Nuklease ist zum Abbauen einzelsträngiger Nukleinsäuren in der Lage, entweder exonukleolytisch oder endonukleolytisch, ist aber unfähig, eine doppelsträngige Nukleinsäure zu degradieren.

[0060] Genomische DNA ist DNA, die aus einer Zelle gewonnen wird, die das gesamte Genom oder einen Teil des Genoms dieser Zelle repräsentiert.

[0061] cDNA oder "komplementäre DNA" ist DNA, die aus dem Kopieren von RNA durch reverse Transkription gewonnen wird. Sie muss oft die Population von mRNA-Molekülen repräsentieren, die in einer bestimmten Zelle, einem Zelltyp, einem Entwicklungszustand oder einem pathologischen Zustand gefunden werden.

Verfahren der Erfindung

A. Ausgangsmaterial

[0062] Das Ausgangsmaterial für das Ausführen des Verfahrens der Erfindung sind zumindest zwei Populationen von Polynukleotiden. Eine Population von Polynukleotiden kann das Genom einer Zelle oder einer Gruppe von Zellen umfassen und kann beispielsweise durch im Stand der Technik bekannte Techniken gewonnen werden, wie etwa Aufbrechen von Zellen, optional gefolgt von der Isolierung der Kerne. Die Präparation von aufgebrochenen Zellen oder Kernen kann weiterhin den Wirkungen von proteolytischen Enzymen und Extraktion mit organischen Lösungsmitteln unterworfen werden und es können Nukleinsäuren durch jegliches der bekannten Verfahren, einschließlich Chromatographie und selektive Präzipitation, gereinigt werden.

[0063] Alternativ können Populationen von cDNA als Ausgangsmaterial für das Ausführen des Verfahrens der Erfindung verwendet werden. In diesem Fall wird RNA zuerst aus der Zelle, dem Zelltyp oder der Zellpopulation von Interesse gereinigt, wobei geeignete Vorkehrungen getroffen werden, wie im Stand der Technik bekannt, um die Degradierung der RNA zu minimieren. Polyadenylierte RNA, mRNA, zytoplasmatische RNA, Gesamtzell-RNA oder andere selektierte RNA-Populationen können verwendet werden. Die RNA wird in cDNA ("komplementäre DNA") mittels beispielsweise der sequentiellen Wirkungen eines reversen Transkriptaseenzyms, um einen ersten Strang zu erzeugen, und einer DNA-Polymerase, um den ersten Strang in ein Duplex umzuwandeln, durch im Stand der Technik bekannte Verfahren (siehe beispielsweise Maniatis et al., Sambrook et al., Ausubel et al., supra) konvertiert.

[0064] Andere Arten von Nukleinsäuren oder Polynukleotiden, wie im Stand der Technik erwogen, können ebenfalls als Ausgangsmaterial verwendet werden.

B. Fragmentierung und optionale Auswahl von niederkomplexen Untersätzen

[0065] Um den Prozess der Amplifikation zu erleichtern, werden Polynukleotidpopulationen einer Fragmentierung unterworfen. Die Fragmentierung kann durch den Verdau von Nukleinsäure beispielsweise mit einer Restriktionsendonuklease erzielt werden. Andere Verfahren der Fragmentierung können Verdau mit einer Einzelstrang-spezifischen Nuklease wie Mungbohnennuklease oder S1-Nuklease bei Temperaturen zwischen physiologischer Temperatur und der Schmelztemperatur des zu fragmentierenden Polynukleotids beinhalten. Unter bestimmten Bedingungen kann auch eine Fragmentierung durch mechanisches Scheren adäquat sein.

[0066] Für Polynukleotidpopulationen hoher Komplexität, beispielsweise das Genom einer menschlichen Zelle, können optional Verfahren zum Vermindern der Komplexität der besagten Polynukleotidpopulation angewendet werden. Beispielsweise kann die Fragmentierung eines Polynukleotids oder einer Population von Polynukleotiden unter Verwendung eines Verfahrens, das produzierbar denselben Satz von Fragmenten erzeugt, als ein erster Schritt im Erhalten eines niedriger-komplexen Untersatzes der Ausgangspopulation von Polynukleotiden verwendet werden. Nach der Fragmentierung wird die Auswahl eines Untersatzes der so erzeugten Fragmente einem einen Untersatz der ursprünglichen Population von Polynukleotiden bereitstellen, der eine niedrigere Komplexität als der des Ausgangsmaterials hat, falls das gewünscht ist. Die Selektion kann beispielsweise anhand der Größe erzielt werden. Die Größenselektion kann durch viele Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, erreicht werden, beispielsweise Gelelektrophorese oder Säulenchromatographie. Ein bevorzugtes Verfahren zum Erreichen einer Größenselektion ist es, eine Population von Polynukleotiden mit einem Restriktionsenzym zu verdauen. Falls die Polynukleotidpopulation aus genomischer DNA stammt, wird ein Restriktionsenzym mit einer Sechs-Nukleotiderkennungssequenz oft verwendet. Die Population von durch Restriktionsenzymverdau erzeugten Fragmenten wird dann einer Amplifikation unterworfen, beispielsweise durch PCR, unter Bedingungen, bei denen die Größe des Amplifikationsproduktes auf weniger als ungefähr 2 Kilobasen beschränkt ist; solche Bedingungen sind im Stand der Technik bekannt (Innis et al, oben). Da ein Teil der durch Verdau mit einem Restriktionsenzym mit einer sechs-Nukleotiderkennungssequenz erzeugten Fragmente größer als ungefähr 2 Kilobasen sein wird, werden diese nicht amplifiziert. Daher enthält die amplifizierte Population einen Untersatz der Ausgangsfragmentpopulation.

[0067] Die Auswahl kann durch andere im Stand der Technik bekannte Verfahren zusätzlich zur Größe erzielt werden. Beispielsweise sind die Schwimmdichte, die Sequenzzusammensetzung und die Affinität für einen bestimmten Liganden nicht-limitierende Beispiele für zusätzliche Selektionstechniken.

[0068] Gewisse Nukleinsäurepopulationen, wie solche, die durch die mRNA-Population einer Zelle repräsentiert sind, können von hinreichend niedriger Komplexität sein, so dass die Erzeugung eines Niederkomplexitäts-Untersatzes nicht notwendig ist. In diesem Fall wird der Verdau mit einem Restriktionsenzym mit einer Vier-Nukleotiderkennungssequenz das nachfolgende Anlagern von Adaptern erleichtern, um eine amplifizierte Fragmentpopulation zur Verwendung im Annealingschritt bereitzustellen und zur Amplifikation von praktisch allen Fragmenten zu führen (da die Mehrzahl von durch Spaltung mit einem Restriktionsenzym mit einer Vier-Nukleotiderkennungssequenz erzeugten Fragmente kürzer als 2 Kilobasen ist).

C. Adapteroligonukleotide

[0069] Die vorliegende Erfindung stellt neue Adapternukleotide bereit, deren Verwendung zu größerer Effizienz und höheren Ausbeuten eines authentischen Differenzprodukts führt, indem die Notwendigkeit für wiederholtes Ersetzen von Adaptern durch Restriktionsenzymverdau und Ligation ausgeschlossen wird. Diese neuen Adapteroligonukleotide enthalten oder kodieren Bindungsstellen für mehrere individuelle Primer, die zur Fragmentamplifikation verwendet werden können und falls gewünscht, um gewisse der sich ergebenden amplifizierten Fragmente für eine selektive Degradierung anzupeilen. Die neuen Oligonukleotide sind von hinreichender Länge, um mehrere Primerbindungsstellen zu enthalten, aber nicht so lang, dass sie mit der Spezifität der Hybridisierung interferieren (nämlich dadurch, dass sie Regionen von Selbst-Komplementarität enthalten). Die in einem Adapter enthaltenen oder von ihm codierten mehreren Primerbindungsstellen können einander überlappen, um verschränkte Primerbindungsstellen zu erzeugen, oder die Primerbindungsstellen können diskret vorliegen.

[0070] In einer bevorzugten Ausführungsform weist jede eine Primerbindungsstelle codierende Sequenz, fortschreitend vom 5'-Ende zum 3'-Ende des Adapters eine sukzessiv höhere Annealingtemperatur auf. Die Diffe-

renz der Annealingtemperatur zwischen benachbarten Stellen ist etwa 10°C, bevorzugtererweise 5°C und am bevorzugtesten 3°C. Folglich wird der Guanin- + Cytosingehalt und/oder die Länge jeder Primerbindungsstelle fortschreitend vom 5'- zum 3'-Ende des Adapters steigen. Somit werden allgemein die 5'-igsten oder äußersten Primerbindungsstellen kürzer sein, einen niedrigeren Guanin- + Cytosingehalt und eine niedrigere Annealingtemperatur aufweisen, während die 3'-igsten oder innersten Primerbindungsstellen länger sein werden, und einen höheren Guanin- + Cytosingehalt und eine höhere Annealingtemperatur aufweisen. Der Bereich der Annealingtemperaturen für die individuellen Primerbindungsstellen des Adapters sollte an seinem unteren Ende hinreichend hoch sein, um eine spezifische Hybridisierung zu gestatten und am oberen Ende nicht für die bei der Amplifikation verwendete DNA-Polymerase inhibitorisch sein. Dieser Bereich reicht von etwa 20°C bis 90°C, bevorzugtererweise von etwa 35°C bis etwa 85°C, noch bevorzugtererweise von etwa 45°C bis etwa 80°C und am bevorzugtesten von etwa 55°C bis etwa 75°C. Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Oligonukleotidadapter vier Primerbindungsstellen. Jedoch ist es klar, dass auch mehr oder weniger als vier Primerbindungsstellen von der Erfindung erfasst würden und dass es nicht notwendigerweise eine spezifische Beziehung zwischen den Annealingtemperaturen der Primerbindungsstellen geben muss.

[0071] Die Adapter werden an den Fragmenten durch Techniken angelagert, die im Stand der Technik bekannt sind. Adapter können chemisch oder enzymatisch über die Wirkung einer DNA- oder RNA-Ligase (siehe beispielsweise Maniatis et al., Sambrook et al., Ausubel et al., oben) angelagert werden. Bei einem bevorzugten Verfahren zum Anlagern von Adaptern wird eine Fragmentierung einer DNA-Population durch Behandlung mit einem Restriktionsenzym erzielt werden, das 5'-vorragende Enden zurücklässt. Ein kurzes Oligonukleotid, von dem ein Teil komplementär mit diesem 5'-Überhang ist und von dem ein Teil komplementär mit der Sequenz am 3'-Ende des Adapters ist, wird verwendet, um den Adapter zum Anlagern des 3'-Endes des Adapters am 5'-Ende des am Restriktionsenzym erzeugten Endes auszurichten. Nach Anlagern des Adapters wird das kurze Oligonukleotid durch Denaturierung entfernt und das Komplement des Adapters wird durch die Wirkung einer DNA-Polymerase unter Verwendung des 3'-Endes des Originalfragments als ein Primer synthetisiert.

[0072] Falls niederkomplexe Untersätze der Kontroll- und Probennukleotidpopulationen durch selektive Amplifikation von kleinen Fragmenten erzeugt werden sollen, werden vor diesem Schritt Adapter an den Mitgliedern der Population angelagert; es wird bevorzugt, dass die Probenfragmentpopulation unter Verwendung eines nicht-phosphorylierten Primers amplifiziert wird, der zur äußersten Primerbindungsstelle komplementär ist, während die Kontrollfragmentpopulation unter Verwendung eines phosphorylierten Primers amplifiziert wird, der komplementär zur innersten Primerbindungsstelle ist.

D. Erzeugung von differenziell-markierten Kontroll- und Probenfragmentpopulationen

[0073] Nach Anlagern von Adaptern werden die Kontroll- und Probenfragmentpopulationen getrennt einem Ausgangsamplifikationsschritt unterworfen, vorzugsweise durch eine Polymerasekettenreaktion. Die Erzeugung eines Komplements der Adaptersequenz, wie gerade beschrieben, kann vor der anfänglichen Amplifikation durch Durchführen einer anfänglichen Extension in Abwesenheit von Primern erreicht werden.

[0074] Durch den Prozess dieses anfänglichen Amplifikationsschritts werden die Amplifikationsprodukte der Proben- und Kontrollfragmentpopulationen differenziell markiert. Diese differenzielle Markierung zielt auf die amplifizierten Fragmente der Kontrollpopulationen für einen selektiven Abbau und stellt sicher, dass nicht angepeilte Duplexe (die während der nachfolgenden Annealingschritte auftreten), aus den amplifizierten Fragmenten der Probenpopulation gegenüber einem Abbau resistent sind. Die differenzielle Markierung wird durch Verwendung verschiedener Arten von Primern zur Amplifikation der Kontrollfragmentpopulation und der Probenfragmentpopulation verwendet, wie nunmehr beschrieben wird.

[0075] Primer, die zum Verschmelzen an den Primerbindungsstellen des Oligonukleotidadapters in der Lage sind, können an ihrem 5'-Ende entweder phosphoryliert oder nicht-phosphoryliert sein. Es gehört zum Stand der Technik, beide Arten von Primer durch automatische Synthese herzustellen (siehe z.B. Applied Biosystems Model 380D DNA Synthesizer Anwender-Anwenderhandbuch und die zugehörigen technischen Berichte, Gait, oben, und Eckstein, oben, deren Offenbarung hiermit als Referenz inkorporiert wird). Phosphorylierte Oligonukleotide werden in einem automatischen Instrument unter Verwendung eines phosphorylierten Monomers im abschließendem Kopplungszyklus synthetisiert. Ein solches phosphoryliertes Monomer zur Verwendung in der automatischen Synthese kann kommerziell beispielsweise von Clontech Laboratories, Palo Alto, CA oder Applied Biosystems, Foster City, CA oder Glen Research, Sterling, VA oder anderen kommerziellen Händlern bezogen werden. Alternativ kann ein phosphoryliertes Oligonukleotid durch automatische Synthese eines 5'-Hydroxylterminierten Oligonukleotids, gefolgt von enzymatischer Phosphorylierung unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt werden (z.B. Maniatis et al., Sambrook et al., Ausubel et

al., oben).

[0076] Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Primer bei der differenziellen Markierung der zwei Populationen von Polynukleotidfragmenten wie folgt verwendet. Bei der Anfangsamplifikation der Kontrollfragmentpopulation wird ein 5'-phosphorylierter Primer zur Amplifikation verwendet. Bei der Anfangsamplifikation der Probenpopulation wird ein 5'-nicht-phosphorylierter Primer zur Amplifikation verwendet. Die Anwesenheit einer 5'-Phosphatgruppe auf, die amplifizierte Kontrollfragmentpopulation umfassenden, Fragmenten macht diese Fragmente für die Wirkung von Nukleasen zugänglich, welche den exonukleolytische Abbau an 5'-Phosphat-Termini initiieren, wie etwa λ-Exonuklease. Im Gegensatz dazu, schützt der Mangel an einem 5'-Phosphat auf, die Probenfragmentpopulation umfassenden, Fragmenten diese Fragmente vor der Wirkung von 5'-phosphatspezifischen Nukleasen wie λ-Exonuklease. Ein Primer, dessen Extensionsprodukte einem Abbau zugänglich sind, ist als zielgerichteter Primer bekannt, und es wird gesagt, dass seine Extensionsprodukte angepeilt werden; während ein Primer, dessen Extensionsprodukte gegenüber einer Degradierung geschützt sind, als ein nicht-zielgerichteter Primer bekannt ist und gesagt wird, dass seine Extensionsprodukte nicht-angepeilt sind. Andere Arten von nicht-zielgerichteten Primern beinhalten solche, die eine oder mehrere α-Phosphorthioat- oder Methylphosphonat-Internukleotidbindungen nahe am 5'-Ende enthalten, oder Primer, deren 5'-Ende mit Amin- oder Thiolgruppen blockiert ist, die alle auch Extensionsprodukte ergaben, die gegenüber einem Abbau durch λ-Exonuklease resistent sind. Andere Arten von 5'-Endmodifikation [d.h. modifizierte Nukleinsäurestrukturen, wie etwa beispielsweise Bicyclo-DNA, Bolli et al. (1996), Nucleic Acids Res. 24: 4660-4667, und Peptidnukleinsäuren, Nielsen et al. (1991), Science 254: 1497-1500], welche ein Oligo- oder Polynukleotid gegenüber einer 5'-spezifischen Exonuklease resistent machen, werden im Rahmen der Erfindung ebenfallserwogen. Zusätzlich können andere Arten von Nuklease zum Abbau der angepeilten Nukleinsäurestränge verwendet werden. Beispielsweise ist T7 Gen-6-Exonuklease eine Doppelstrang-spezifische Exonuklease, die in einer 5'-nach-3'-Richtung hydrolysiert. Kerr und Sadowski (1989), J. Biol. Chem., 247: 311-318. Jedoch kann der Verdau durch T7 Gen-6-Exonuklease durch die Anwesenheit von vier oder mehr Phosphorthioatbindungen am 5'-Ende eines doppelsträngigen DNA-Moleküls blockiert werden. Nikiforov et al. (1994) PCR Meth. & App. 3: 285-291. Für die Inkorporation von Amino- oder Thio-modifizierten Nukleotiden während der automatischen Oligonukleotidsynthese nützliche Monomere und Reagenzien sind von verschiedenen kommerziellen Lieferanten, beispielsweise Clontech Laboratories, Palo Alto, CA oder Applied Biosystems, Foster City, CA oder Glen Research, Sterling, VA oder anderen Lieferanten erhältlich.

[0077] Für die Herstellung von nicht-angepeilten Amplifikationsprodukten wird die Amplifikation mit einem 5'-Hydroxy-terminierten Primer gestartet, der komplementär zu einer Primerbindungsstelle ist, die sich von derjenigen unterscheidet, die zur Amplifikation der angepeilten Fragmentpopulation verwendet wird. Allgemein wird die amplifizierte Kontrollfragmentpopulation angepeilt sein und die amplifizierte Probenfragmentpopulation wird nicht-angepeilt sein.

[0078] Ein anderes Verfahren zum Anpeilen des niederkomplexen Untersatzes einer Kontrollfragmentpopulation ist es, die Zellen, aus denen die Kontrollpopulation abgeleitet werden soll, unter Bedingungen zu züchten, bei denen Uracil anstelle von Thymin in die DNA eingebaut wird (oder die Anfangsamplifikation der Kontrollfragmentpopulation unter Verwendung, von Desoxyuridintriphosphat anstelle von Thymidintriphosphat durchzuführen). Dies würde die Uracil-substituierte DNA für eine abbauende Wirkung des Enzyms Uracil-DNA-Glycosylase zugänglich machen.

[0079] In der bevorzugtesten Ausführungsform des Anfangsamplifikationsschritts der Erfindung wird die Kontrollfragmentpopulation unter Verwendung eines phosphorylierten Primers amplifiziert, der eine Sequenz komplementär zur innersten Primerbindungsstelle des Adapters aufweist und wird die Probenfragmentpopulation unter Verwendung eines nicht-phosphorylierten Primers mit einer Sequenz amplifiziert, die komplementär zur äußersten Primerbindungsstelle des Adapters ist.

E. Annealing

[0080] Die differenziell markierten Kontroll- und Probenfragmentpopulationen, die durch die Anfangsamplifikationsreaktionen erzeugt wurden, werden miteinander kombiniert, Denaturierungsbedingungen unterworfen, und dann unter annealenden Bedingungen inkubiert, wobei die Fragmente von der Kontrollpopulation im Überschuss vorliegen. Dieser Überschuss (in Bezug auf Nukleotidmol) kann von 2:1 bis 100.000:1 reichen, abhängig von den Anforderungen des Experiments, und ist vorzugsweise 100:1. Der Überschuss von Kontroll- zu Probenfragmenten kann für die unterschiedlichen Hybridisierungs-/Amplifikationszyklen unterschiedlich sein.

[0081] Die Denaturierung fördernde Bedingungen, einschließlich hoher Temperatur und/oder niedriger Ionenstärke und/oder moderaten bis hohen Konzentrationen an organischem Lösungsmittel sind im Stand der Technik bekannt. In ähnlicher Weise sind Bedingungen, welche das Reannealen oder die Renaturierung fördern, wie hohe Ionenstärke und/oder niedrige Temperaturen, und die Variation dieser Bedingungen, um die Stringenz der Hybridisierung einzustellen, im Stand der Technik bekannt (z.B. Maniatis et al., Sambrook et al., Ausubel et al., oben). Die Annealingzeit kann abhängig von der Komplexität der Sequenzen in der Reaktion und im gewünschten Ausmaß an Renaturierung variiert werden und wird allgemein durch die Verwendung der Formel bestimmt:

$C_0t_{1/2} = 1/k,$

wobei C_0 sich auf die Anfangskonzentration von Einzelstrang-DNA bezieht, $t_{1/2}$ die Zeit ist, zu der die Hälfte der Ausgangs-Einzelstrang-DNA einen Duplex gebildet hat und k die Ratenkonstante der Reassoziierung ist, die von der Komplexität der DNA-Population abhängt. Annealing-Mischungen werden allgemein nahe dem neutralen pH gepuffert und können auch Chelatoren, wie etwa EDTA, enthalten. Siehe beispielsweise Sambrook et al., oben, Ausubel et al., oben und Hames & Higgins (1985), oben.

[0082] Die Ionenstärke der Annealing-Mischung wird traditioneller Weise unter Verwendung des Na^+-Kations eingestellt. Jedoch würde das Mg^{2+}-Kation aus vielen Gründen bevorzugt sein. Zunächst wird eine gegebene Konzentration an Mg^{2+} im Vergleich zu einer gleichen Konzentration eines monovalenten Kations, wie etwa Na^+ oder K^+ eine entsprechend höhere Ionenstärke bereitstellen. Zweitens ist die hohe Konzentration an Na^+, die in Annealingsreaktionen verwendet wird (typischerweise ungefähr 1 M) für die zur Amplifikation verwendeten DNA-Polymeraseenzyme inhibitorisch und ist zu hoch, um eine Dilution der Annealing-Mischung in die Amplifikationsreaktion unter Erhaltung vernünftiger Reaktionsvolumina zu gestatten, was eine Präzipitation oder Aufreinigung des annealten Produktes vor der Amplifikation erfordert. Bislang wurde die Verwendung von Mg^{2+} bei Annealingreaktionen durch die häufige Anwesenheit von Mg^{2+}-abhängigen Nukleasen ausgeschlossen, welche oft Präparationen von DNA und RNA kontaminierten. Bei der vorliegenden Erfindung sind zu amplifizierende Nukleinsäuren im allgemeinen einer hinreichenden Zahl von Aufreinigungsschritten (z.B. vor und nach Ligation von Adaptern) unterworfen worden, so dass eine Nukleasekontamination vernachlässigbar ist. Alternativ können Nukleinsäurepräparationen durch Chromatographie auf speziell ausgelegten Matrizen gereinigt werden, wie etwa Qiaex II (Qiagen) oder GeneClean (Bio 101), um Nuklease-freie Präparationen zu ergeben. Folglich erwägt die vorliegende Erfindung die Verwendung von Mg^{2+} in der Annealingreaktion bei einer Konzentration von 62,5 mM, was im Hinblick auf die Ionenstärke äquivalent zu 1 M NaCl ist. Wetmur und Sninsky in "PCR Strategies", Hrsg. Innis et al., Academic Press (1995), S. 69-83: Nachdem die Annealingreaktion abgeschlossen ist, kann die Reaktionsmischung einfach in die Komponenten für die Amplifikationsreaktion verdünnt werden, so dass die Mg^{2+}-Konzentration zwischen 1 und 5 mM ist, abhängig vom Mg^{2+}-Optimum der für die Amplifikation verwendeten DNA-Polymerase, das allgemein etwa 1,5 mM ist.

F. Nukleaseverdau

[0083] Nach Annealen wird die Annealing-Mischung so behandelt, dass die angepeilten Fragmente abgebaut werden und die nicht-angepeilten Fragmente sowohl gegenüber einem Abbau geschützt als auch bevorzugt amplifiziert werden. Die Bedeutungen der Begriffe "angepeilt" und "nicht-angepeilt" und die Verfahren, mit denen der selektive Abbau der angepeilten Fragmente und die selektive Amplifikation der nicht-angepeilten Fragmente erzielt wird, sind oben beschrieben worden.

[0084] Demgemäss folgen dem Annealingschritt ein oder mehrere Nukleaseverdauungsschritte, bei denen die angepeilten Polynukleotide einem Abbau zugänglich sind. Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthalten zielgerichtete Primer eine 5'-Phosphatgruppe, und sind nicht-zielgerichtete Primer an ihren 5'-Enden unphosphoryliert; und zum Verdau wird eine Kombination von Mungbohnennuklease und λ-Exonuklease verwendet. Diese Bedingungen führen zur Zerstörung von einzelsträngigem Material durch Mungbohnennuklease und der exonukleolytischen Degradierung (durch λ-Exonuklease) jeglichen Strangs, der mit einer 5'-Phosphatgruppe terminiert ist. Somit werden beide Stränge enthaltende Duplexe aus der Kontrollfragmentpopulation abgebaut. Einen 5'-phosphorylierten Strang (aus der Kontrollfragmentpopulation) und einen Strang, der am 5'-Ende nicht-phosphoryliert ist (aus der Probenfragmentpopulation) enthaltende Duplexe erfahren einen Abbau des 5'-phosphorylierten Strangs durch λ-Exonuklease, woraufhin der verbleibende Strang für die Mungbohnennukleasewirkung zugänglich wird. Aus zwei Strängen aus der amplifizierten Probenfragmentpopulation bestehende Duplexe enthalten zwei 5'-Hydroxylenden und sind daher vorzugsweise gegenüber einem Abbau resistent. Solche Duplexe sind auch vorzugsweise amplifizierbar, wie unten beschrieben wird. Verdaus mit diesen Enzymen können in jeglicher Reihenfolge fortschreiten; in einer bevorzugten Ausführungsform folgt einer an-

fänglichen Verdauung mit λ Exonuklease eine Behandlung mit Mungbohnennuklease. Enzyme oder chemische Behandlungen, welche dieselbe Spezifität wie Mungbohnennuklease und λ-Exonuklease aufweisen, werden von der vorliegenden Erfindung ebenfalls erwogen.

G. Amplifikation

[0085] Nach der Nukleasebehandlung werden die überlebenden unverdauten Polynukleotide unter Verwendung eines nichtzielgerichteten Primers komplementär zu einer der internen Bindungsstellen, vorzugsweise der ersten internen Primerbindungsstelle neben der äußersten Primerbindungsstelle, amplifiziert. Wie oben beschrieben, haben Duplexe, die Sequenzen enthalten, die für die Probenpopulation einmalig sind, die Nukleasedegradierung aufgrund ihrer nicht-phosphorylierten 5'-Enden überlebt. Sie stehen daher für die exponentielle Amplifikation zur Verfügung. Alle anderen Spezies an duplex- oder einzelsträngigen Polynukleotiden sind durch die vorangehende Nukleasebehandlung abgebaut worden. Folglich ist das Amplifikationsprodukt hoch angereichert an Fragmenten, welche für die Probenpopulation einmalig sind.

H. Wiederholung eines Zyklus, um weitere Differenzprodukte zu erhalten

[0086] Das aus dem vorstehenden Schritt enthaltene amplifizierte Material kann mit einem Überschuss (2-fach bis 100.000-fach, vorzugsweise 100-fach) von amplifizierten Fragmenten aus der Kontrollpopulation kombiniert werden und der Zyklus des Annealens, des Nukleaseverdaus und der Amplifikation kann wiederholt werden, bis ein oder mehrere gewünschte Differenzprodukte gewonnen werden. Bei jedem Zyklus wird ein anderer, nicht-zielgerichteter Primer für den Amplifikationsschritt verwendet. Bei einer bevorzugten Ausführungsform entspricht der Amplifikationsprimer in einem gegebenen Zyklus der nächsten Primerbindungsstelle, die innerhalb zu derjenigen liegt, die im vorhergehenden Zyklus verwendet wurde. Ein zur innersten Primerbindungsstelle komplementärer nicht-zielgerichteter Primer kann verwendet werden, falls notwendig.

[0087] Das Verhältnis von Kontroll- zu Probenfragmenten wird auf 100:1 gehalten. Wenn die Subtraktionsrunden fortschreiten, wachsen seltene Differenzprodukte in der amplifizierten Probenfragmentpopulation verhältnismäßig. Dieses Ansteigen wird es den seltenen Differenzprodukten gestatten, identische Paarungen während der Hybridisierung (einer kinetischen Reaktion zweiter Ordnung) schneller zu finden. Dies sollte die Anzahl von Runden an subtraktiver Hybridisierung, die benötigt wird, um die seltenen Boten zu finden, vermindern und kann in den späteren Runden gestatten, die lange Hybridisierungszeit (20 Stunden) auf nur 6 bis 8 Stunden zu verkürzen und/oder ein Vermindern in der Anzahl an Zyklen zu gestatten, die zum Amplifizieren der Differenzprodukte benötigt werden.

[0088] Um zu vermeiden, dass "bekannte" unerwünschte Sequenzen im Differenzprodukt erhalten werden, kann die amplifizierte Kontrollfragmentpopulation mit den "bekannten" Sequenzen ergänzt werden oder die amplifizierte Probenfragmentpopulation kann mit einer Depletionsbibliothek hybridisiert werden, welche unerwünschte "bekannte" Sequenzen enthält. Jedes dieser Verfahren arbeitet höchst effizient bei der Erzeugung der zweiten (oder nachfolgender) Differenzprodukte.

[0089] Die Anreicherung an seltenen Boten kann durch Verwendung einer erschöpften Kontrollfragmentpopulation bei der Erzeugung der zweiten (oder nachfolgender) Differenzprodukte verstärkt werden. Die erschöpfte Kontrollfragmentpopulation wird unter Verwendung der Kontrollfragmentpopulation in begrenzender Menge und ihr Abziehen mit einem Überschuss der Probenfragmentpopulation erzeugt werden. Erschöpfte Kontrollfragmentpopulationen sollten in den abschließenden Runden der subtraktiven Hybridisierung verwendet werden.

[0090] Die durch Ausübung der Erfindung erhaltenen Differenzprodukte können direkt als Sonden verwendet werden oder können zur Sequenzbestimmung kloniert und vermehrt werden, zur Verwendung als Sonden, etc.

BEISPIELE

[0091] In einem nicht-beschränkenden Beispiel der Ausübung der Erfindung wird das folgende Protokoll zur Differenzanalyse zwischen zwei cDNA-Populationen bereitgestellt. TE (oder 1 x TE) ist 10 mM Tris-Cl (pH 8,0 bei 20°C)/0,1 mM Ethylendiamintetraessigsäure. 3x EE-Puffer ist 30 mM EPPS (Sigma Chemical Co.), pH 8,0 (bei 20°C)/3 mM Ethylendiamintetraessigsäure.

[0092] Es wurden angeschrägte Gelbeladungsspitzen verwendet, um den Überstand von den Pellets zu entfernen, um einen Verlust an Pellets aufgrund von Spitzenversatz zu vermindern. Um die Ausbeute an Präzipi-

tationen zu steigern, werden Hi-Yield™-Röhrchen (Robbins Scientific Corporation, Sunnyvale, CA) verwendet. Dünnwandige PCR-Röhrchen (McroAmp™ Reaction tubes, Perkin Elmer, Norwalk, CT) werden für die Amplifikationsschritte verwendet.

[0093] Unterschiede bei den Zyklusbedingungen zwischen Thermo-Cyclern und Inkonsistenzen zwischen den Näpfen können durch Verwendung eines touchdown PCR-Programms für die Amplifikationsschritte vermieden werden. R.H. Don et al. (1991) "Touchdown" PCR, um Pseudoprimen während der Genamplifikation zu umgehen. Nucleic Acids Research 19:4008, dessen Offenbarung hierbei durch Bezugnahme inkorporiert wird.

A. Oligonukleotide

[0094] Die folgenden Oligonukleotide werden durch automatische chemische Synthese unter Verwendung eines Applied Biosystems 380D DNA-Synthesizers hergestellt:

AO: 45-mer Adapteroligonukleotid:

5'-CGATAGTCAC TCTACCACTC AGCCTACGCA CGAGACGATG TACTC-3'

SEQ ID NO:1

LA: 13-mer Linkeradapter:

5'-GATCGAGTAC ATC-3' **SEQ ID NO:2**

P1: 22-mer Oligonukleotidprimer (T_m = 58,4°C)

5'-CGATAGTCAC TCTACCACTC AG-3' **SEQ ID NO:3**

P2: 24-mer Oligonukleotidprimer (T_m = 61,9°C)

5'-TAGTCACTCT ACCACTCAGC CTAC-3' **SEQ ID NO:4**

P3: 24-mer Oligonukleotidprimer (T_m = 72,1°C)

5'-TACCACTCAG CCTACGCACG AGAC-3' **SEQ ID NO:5**

P4: 26-mer Oligonukleotidprimer (T_m) 74 = 74,9°C)

5'-CAGCCTACGC ACGAGACGAT GTACTC-3' **SEQ ID NO:6**

PP4: 26-mer 5'-Phosphatoligonukleotidprimer

5'-p-CAGCCTACGC ACGAGACGAT GTACTC-3' **SEQ ID NO:7**

B. Präparation von cDNA

[0095] PolyA$^+$ mRNA wird aus eukaryotischen Zellen oder Geweben isoliert, vorzugsweise unter Verwendung partieller Lyse, um zytoplasmatische mRNA zu erzeugen. Falls prokaryotische Zellen die Quelle der RNA sind, können Gesamt-RNA-Präparationen verwendet werden. Es wird darauf geachtet, große Volllängentranskripte (z.B. unter Verwendung steriler, Ribonuklease-freier Reagenzien und Pipettierer) zu erhalten und sicherzustellen, dass die Proben identisch behandelt worden sind und in einer ähnlichen Wachstumsstufe sind.

[0096] Doppelsträngige cDNA wird unter Verwendung eines Oligo-5'-T_{30}MN-3'-Primers (M = A, G oder C und N = A, G, C oder T) präpariert, wobei nach dem doppelsträngigen cDNA-Produktionsprotokoll vorgegangen wird, das dem Gibco BRL (Gaithersburg, MD) Superscript™ II RT-Enzym beiliegt.

[0097] Es werden Präparationen von cDNA sowohl von der Probe als auch von den Kontroll-RNA-Populationen unter identischen Bedingungen in getrennten Reaktionsgefäßen gemacht.

C. Restriktionsverdau von cDNA

[0098] Die folgenden Schritte werden identisch, aber in getrennten Reaktionsgefäßen für die Proben- und Kontroll-cDNA-Populationen durchgeführt. Zwei Mikrogramm cDNA werden mit DpnII (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) in 100 µl bei 37°C für 2 bis 4 Stunden unter Bedingungen verdaut, die vom Lieferanten empfohlen werden, unter Verwendung von sterilen Puffern und Pipettiervorrichtungen. Der Fortschritt des Verdaus kann durch Agarosegelelektrophorese eines Aliquots der Verdaureaktion überwacht werden. Bei Abschluss des Verdaus wird die Verdaumischung 2 x mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 1 x mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zur wässrigen Phase werden 2 µg Glycogenträger, 50 µl 10 M NH_9OAc und 650 µl 100%ige EtOH zugegeben. Die Mischung wird für 20 Minuten auf Eis gesetzt, woraufhin sie einer Zentrifugation bei 14.000 U/min für 14 Minuten bei 4°C unterworfen wird. Das Pellet wird mit 85 % EtOH gewaschen, dann getrocknet und in 20 µl TE wieder aufgenommen.

D. Ligation von Adaptern

[0099] Die folgenden Schritte werden identisch, aber in getrennten Reaktionsgefäßen für die Proben- und Kontroll-cDNA-Populationen durchgeführt. Die folgenden Komponenten (unter Verwendung steriler Puffer und von H_2O) werden kombiniert:
12 µl (ungefähr 1,2 µg) restriktionsverdaute cDNA (entweder Probenfragmentpopulation oder Kontrollfragmentpopulation)
7,5 µl entsalztes 45-mer Oligo AO (2 mg/ml) [SEQ ID NO:1]
4,3 µl entsalzter Linkeradapter 13-mer Oligo LA (1 mg/ml) [SEQ ID NO:2]
6 µl 10X Ligasepuffer (New England Biolabs, Inc., Berverly, MA) ,
27,2 µl H_2O

[0100] Um ein Annealen zu gestatten, werden die Mischungen in einen PTC 100™-Thermocycler (M J Research, Watertown, MA) mit einem "Hot Bonnet" bei 50°C für 1 min inkubiert, gefolgt von einem Abkühlen auf 10°C über den Verlauf von 1 Stunde. Zur Ligation werden 3 µl T4 DNA-Ligase (400 Einheiten/µl, New England Biolabs, Beverly, MA) hinzugegeben und die Inkubation wird bei 12 bis 16°C über Nacht fortgesetzt. Die Ligationsmischung wird durch Hinzufügen von 140 µl TE verdünnt.

E. Anfangsamplifikation

[0101] Die Anfangsamplifikationsreaktionen können verwendet werden, um niederkomplexe Untersätze der Proben- und/oder Kontrollfragmentpopulationen zu erzeugen. Dies kann durch Auswählen einer geeigneten Kombination von Restriktionsenzym für den Restriktionsverdau (Schritt C, oben) und Amplifikationsbedingungen erreicht werden, so dass die größeren Fragmente in der Population nicht amplifiziert werden. Alternativ kann die amplifizierte Population die Komplexität des Ausgangsmaterials behalten, wobei die Anfangsamplifikation einfach verwendet wird, um die Menge an für nachfolgende Schritte verfügbarem Material zu erhöhen. Die folgenden Bedingungen sind dafür ausgelegt, 0,5 bis 1 mg an amplifiziertem Material für jede Population, die amplifiziert wird, bereitzustellen.

1. Probenfragmentpopulation (nicht-zielgerichtet)

[0102] Es werden Reaktionen von 200 µl in 0,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen zusammengebracht und 20 bis 30 Reaktionen werden vorbereitet. Für die Probenfragmentpopulation enthält jede Reaktion die folgenden Komponenten, die in der gezeigten Reihenfolge zugegeben werden:
169, 2 µl steriles H_2O
20 µl 10X Vent® PCR-Puffer (New England Biolabs, Beverly, MA)
6,8 µl PCR-Nukleotidmix (10 mM von jeweils dATP, dCTP, dGTP, DTTP; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)
2 µl Primer P1 (1 mg/ml) [SEQ ID NO:3]
2 µl Adapter-ligierte Probenfragmentpopulation, verdünnt wie in D oben.

[0103] Die Reaktionen werden in einem PTC 100™ Thermocycler (M J Research, Watertown, MA) mit einem "Hot Bonnet" platziert und für 3 Minuten bei 72°C inkubiert (um die Linkeradapter 13-mers von Schritt D zu dissoziieren). 1 µl (5 Einheiten) Vent® DNA-Polymerase (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) wird zugegeben

und die Inkubation wird bei 72°C für 5 Minuten fortgesetzt. Dies füllt die zum 45-mer Adapteroligonukleotid komplementären Enden auf, das an die Fragmente in Stufe D anligiert wurde, wodurch ein Satz von Primerbindungsstellen erzeugt wird. Als Nächstes werden die Reaktionsmischungen 20 Zyklen von 1 Minute bei 95°C, 30 Sekunden bei 58,4°C und 3 Minuten bei 72°C unterworfen. Eine abschließende Extension von 10 Minuten bei 72°C wird durchgeführt, dann werden die Reaktionen auf 4°C gekühlt. Es ist wichtig, nicht die Zykluszahl über 20 hinaus zu steigern, da ein Beeinflussen hin zu kleineren Amplifikationsprodukten auftreten wird, was die nachfolgende Subtraktion beeinflusst. Falls mehr Produkt erforderlich ist, sollte die Anzahl der Reaktionen gesteigert werden.

[0104] Für die Reinigung des Amplifikationsproduktes werden vier Reaktionen pro 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen kombiniert. Jede Mischung wird 2 x mit 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 1 x mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Dann werden 75 µl 3 M NaOAc (pH 5,3) und 800 µl Isopropanol hinzugegeben und es wird gemischt, und die Röhrchen werden für 20 Minuten auf Eis gestellt. Die Röhrchen werden dann bei 14.000 U/min für 14 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wird mqit 85% EtOH gewaschen, getrocknet und bis zu einer Nukleinsäurekonzentration von 0,5 mg/ml wieder aufgenommen (ungefähr 100 bis 150 µl pro Vier-Reaktions-Röhrchen).

2. Kontrollfragmentpopulation (angepeilt)

[0105] Für die Kontrollfragmentpopulation werden Reaktionen von 200 µl in 0,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen angesetzt, und es werden 20 bis 30 Reaktionen vorbereitet. Jede Reaktion enthält die folgenden Komponenten, die in der gezeigten Reihenfolge zugefügt werden:
169,2 µl steriles H_2O 20 µl 10X Vent® PCR-Puffer (New England Biolabs, Beverly, MA)
6,8 µl PCR-Nukleotidmix (10 mM von jeweils dATP, dCTP, dGTP, DTTP; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)
2 µl Primer PP4 (1 mg/ml) [SEQ ID NO:7]
2 µl Adapter-ligierte Probenfragmentpopulation, verdünnt wie in D oben.

[0106] Die Reaktionen werden in einem PTC 100™ Thermocycler (M J Research, Watertown, MA) mit einem Hot Bonnet platziert und für 3 Minuten bei 80°C inkubiert (um die Linkeradapter 13-mers von Schritt D zu dissoziieren). 1 µl (5 Einheiten) Vent® DNA-Polymerase (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) wird zugegeben und die Inkubation wird bei 80°C für 5 Minuten fortgesetzt. Dies füllt die zum 45-mer Adapteroligonukleotid komplementären Enden auf, das an die Fragmente in Stufe D anligiert wurde, wodurch ein Satz von Primerbindungsstellen erzeugt wird. Als Nächstes werden die Reaktionsmischungen 20 Zyklen von 1 Minute bei 95°C und 3 Minuten bei 74,9°C unterworfen. Eine abschließende Extension von 10 Minuten bei 75°C wird durchgeführt, dann werden die Reaktionen auf 4°C gekühlt. Es ist wichtig, nicht die Zykluszahl über 20 hinaus zu steigern, da ein Beeinflussen hin zu kleineren Amplifikationsprodukten auftreten wird, was die nachfolgende Subtraktion beeinflusst. Falls mehr Produkt erforderlich ist, sollte die Anzahl von Reaktionen gesteigert werden.

[0107] Für die Reinigung des Amplifikationsproduktes werden vier Reaktionen pro 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen kombiniert. Jede Mischung wird 2 x mit 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 1 x mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Dann werden 75 µl 3 M NaOAc (pH 5,3) und 800 µl Isopropanol hinzugegeben und es wird gemischt, und die Röhrchen werden für 20 Minuten auf Eis gestellt. Die Röhrchen werden dann bei 14.000 U/min für 14 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wird mit 85% EtOH gewaschen, getrocknet und bis zu einer Nukleinsäurekonzentration von 0,5 mg/ml wieder aufgenommen (ungefähr 100 bis 150 µl pro Vier-Reaktions-Röhrchen).

F. Subtraktive Hybridisierung

[0108] Um eine Annealingmischung herzustellen, werden 80 µl der amplifizierten, Adapter-ligierten Kontrollfragmentpopulation aus Schritt E oben (40 µg) mit 40 µl einer 50-fachen Verdünnung der amplifizierten, Adapter-ligierten Probenfragmentpopulation aus Schritt E oben (0,4 µg) in einem 0,5 ml Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen gemischt. Die Mischung wird einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert. Die Nukleinsäuren werden durch Hinzufügen von 30 µl 10 M NHgOAc, 380 µl 100% EtOH und Inkubation bei –70°C für 10 Minuten präzipitiert. Die Mischung wird für 1 bis 2 Minuten auf 37°C erwärmt (um die Salzpräzipitation zu minimieren) und wird dann einer Zentrifugation bei 14.000 U/min für 14 Minuten bei 4°C unterworfen. Das Präzipitat wird 2 x mit 85 % EtOH gewaschen, jedes Mal mit kurzer Zentrifugation, und dann durch Vakuum 3 Minuten lang getrocknet.

[0109] Das Präzopitat wird gründlich in 4 µl 3X EE Puffer [30 mM EPPS (Sigma Chemical Co.), pH 8,0 (bei

20°C)/3 mM EDTA] durch Pipettieren für mindestens 2 Minuten resuspendiert, und dann für 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Der Inhalt wird durch Vortexen gemischt und die Flüssigkeit wird durch eine kurze Zentrifugation auf den Boden des Röhrchens gebracht, dann wird sie mit 35 µl, auf 37°C vorgewärmtem, Mineralöl überlagert.

[0110] Die Mischung wird dann bei 98°C für 5 Minuten in einem Thermocycler inkubiert, um die Nukleinsäuren zu denaturieren. Sie wird auf 67°C abgekühlt und es wird 1 µl 5 M NaCl (auf 67°C vorgewärmt) unmittelbar direkt in die subtraktive Hybridisierungsmischung zugegeben. Die Inkubation bei 67°C wird für 20 Stunden fortgesetzt.

G. Erzeugung von erstem Differenzprodukt (DP1)

1. Verdünnung der subtraktiven Hybridisierungsmischung

[0111] Die subtraktive Hybridisierungsmischung wird unter dem Mineralöl entnommen und schrittweise unter Verwendung von vorerwärmten Lösungen verdünnt, um eine durch Änderungen in der Temperatur induzierte, ungewollte Hybridisierung zu minimieren. Zuerst wird die subtraktive Hybridisierungsmischung aus Schritt F oben, die bei 67°C für 20 h inkubiert worden ist, zu 15 µl TE gegeben, das auf 67°C vorerwärmt worden ist. Während das Röhrchen im Thermocycler gehalten wird, wird die Mischung heftig pipettiert.

[0112] Zusätzliche 65 µl TE (auf 67°C vorgewärmt) werden zugegeben und die Mischung wird noch einmal heftig pipettiert. Schließlich werden 315 µl steriles H_2O (auf 67°C vorgewärmt) hinzugefügt und die Mischung wird gründlich gevortext. Der subtraktive Hybridisierungsmix ist nun bei 0,2X TE und für einen λ-Exonukleaseverdau oder einen Mungbohnennukleaseverdau fertig. Er kann auf Eis oder bei –70°C zur Langzeitlagerung gelagert werden.

2. Verdau mit λ-Exonuklease

[0113] Zu 200 µl der verdünnten subtraktiven Hybridisierungsmischung aus Schritt G.1 oben werden 30 µl 10 X λ-Exonuklease-Puffer (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 60 µl Wasser und 10 µl λ-Exonuklease (10 Einheiten/µl, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 37°C für 30 min inkubiert. Der Verdau wird durch Inkubation der Reaktionsmischung bei 75°C für 10 Minuten beendet, worauf ein Abkühlen auf Raumtemperatur über 5 Minuten erfolgt. Das Reaktionsröhrchen wird kurz zentrifugiert, um das Kondensat zu sammeln und es werden 100 µl Wasser hinzugefügt und gemischt. Die Reaktionsmischung wird 2 x mit einem gleichen Volumen von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, V/V/V) und 1 x mit einem gleichen Volumen von Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, V/V) extrahiert. Die wässrige Phase wird geteilt (200 µl in jedes der zwei 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen), und zu jedem Röhrchen werden 4 µg Glycogenträger, 0,1 ml 10 M Ammoniumacetat und 1,3 ml absoluten Ethanols gegeben. Nach Mischen und Inkubation auf Trockeneis für 20 Minuten wird die präzipitierte Nukleinsäure durch Zentrifugation bei 14.000 U/min für 14 min bei 4°C gesammelt. Die Präzipitate werden mit 85 % Ethanol gewaschen, für 3 Minuten vakuumgetrocknet und in 50 µl sterilem Wasser pro Präzipitat resuspendiert. Die resuspendierten Präzipitate werden in einem der zwei Röhrchen vereinigt, das andere wird 2 x mit 50 µl sterilem Wasser gewaschen und die Waschungen werden mit den resuspendierten Präzipitaten vereinigt.

[0114] Als eine Positivkontrolle für die Exonukleaseverdauungen kann ein Satz von kommerziell erhältlichen 5'-phosphorylierten Molekulargewichtsmarkern verwendet werden. Als eine Negativkontrolle können dieselben Marker dephosphoryliert werden (beispielsweise durch Behandlung bakterieller oder Kalbsdarm-alkalischer Phosphatasen). Das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Verdauungsprodukten können durch Southern Blot-Analysen detektiert werden.

3. Mungbohnennukleaseverdau

[0115] Zu 200 µl der λ-Exonukleaseverdauungsmischung aus Schritt G.2 oben werden die folgenden Komponenten zugegeben:
40 µl 10X Mungbohnennukleasepuffer (New Eng. Biolabs, Beverly, MA)
4 µl $ZnSO_4$
136 µl steriles H_2O
20 µl Mungbohnennuklase (10 Einheiten/µl, New Eng. Biolabs, Beverly, MA)

[0116] Die Verdaumischung wird bei 30°C für 35 Minuten inkubiert. Sie wird dann 2 x mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 1 x mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und in zwei 1,5 ml Mikrozentrifugenröhr-

chen aufgeteilt, die je 200 µl enthalten. Nach Zufügen von 4 µl Glycogenträger, 100 µl 10 M NH_4OAc und 1.300 µl 100% EtOH wird die Mischung für 20 Minuten auf Trockeneis gestellt. Nukleinsäuren werden durch Zentrifugation bei 14.000 U/min für 15 min bei 4°C gesammelt. Die Präzipitate werden mit 85% EtOH gewaschen, 3 Minuten lang vakuumgetrocknet und jedes wird in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert. Es können die Nukleinsäuren aus der Mungbohnennukleasereaktion unter Verwendung der Pharmacia Microspin™-Säule S-200 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) gereinigt werden, wobei nach dem von dem Hersteller bereitgestellten Protokoll vorgegangen wird. Die Säulenausflüsse werden kombiniert.

4. Amplifikation

[0117] 20 µl Mungbohnennuklase/λ-Exonuklease-verdautes Material aus Schritt G.3 wird auf Eis jedem von vier Röhrchen zugegeben, von denen jedes die folgenden Komponenten enthält, die auf Eis vorgemischt worden sind:
169,2 µl steriles H_2O
20 µl 10X Vent®-Puffer (New England Biolabs, Beverly, MA)
6,8 µl PCR-Nukleotidmix (10 mM von jeweils dATP, dCTP, dGTP, DTTP; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)
2 µl P2-Primer (1 mg/ml) [SEQ ID NO:4]

[0118] Die Mischungen werden in einem Thermocycler für 1 Minute bei 95°C inkubiert, dann auf 80°C abgekühlt, woraufhin 1 µl (5 Einheiten) Vent® (Exo)-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) zugefügt werden. Es werden dann 22 Amplifikationszyklen gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt: 1 Minute bei 95°C, 30 Sekunden bei 61,9°C und 3 Minuten bei 72°C. Eine abschließende Extension von 5 Minuten bei 72°C wird durchgeführt, und die Reaktionen werden auf 4°C abgekühlt.

[0119] Die vier Amplifikationsreaktionen werden dann in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen kombiniert, und 2 x mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 1 x mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die Nukleinsäuren werden durch Hinzufügen von 75 µl 3 M NaOAc (pH 5,3) und 800 µl Isopropanol präzipitiert, gefolgt von einer Inkubation auf Eis für 20 Minuten. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation bei 14.000 U/min für 14 Minuten bei 4°C gesammelt. Die Pellets werden mit 85 % EtOH gewaschen, für 3 Minuten vakuumgetrocknet und dann in 100 µl TE resuspendiert, um eine Nukleinsäurekonzentration von ungefähr 0,5 µg/µl zu erhalten. Dies ist das Differenzprodukt 1 (DP1).

H. Erzeugung des zweiten Differenzprodukts (DP2)

[0120] DP-1 wird auf 10 ng/µl mit TE verdünnt. Die Schritte der subtraktiven Hybridisierung (F), Verdünnung (G.1), Mungbohnennukleaseverdau (G.2), λ-Exonukleaseverdau (G.3) und Amplifikation (G.4) werden wiederholt, wobei den oben beschriebenen Prozeduren mit den folgenden Änderungen gefolgt wird. In Schritt F ersetzt DP-1 die amplifizierte Adapterligierte Probenfragmentpopulation; in Schritt G.4 ersetzt der P3-Primer [SEQ ID NO:5] den P2-Primer [SEQ ID NO:4] und das folgende Zyklusprogramm wird zum Amplifizieren unter Verwendung des P3-Primers verwendet: 1 Minute bei 95°C und 3 Minuten bei 72,1°C.

I. Erzeugung des dritten Differenzprodukts (DP3)

[0121] DP-2 wird mit TE auf 10 ng/µl verdünnt. Die Schritte der subtraktiven Hybridisierung (F), Verdünnung (G.1), Mungbohnennukleaseverdau (G.2), λ-Exonukleaseverdau (G.3) und Amplifikation (G.4) werden wiederholt, wobei den oben beschriebenen Prozeduren mit den folgenden Änderungen gefolgt wird. In Schritt F ersetzt DP-2 die amplifizierte Adapterligierte Probenfragmentpopulation; in Schritt G.4 ersetzt der P4-Primer [SEQ ID NO:6] den P2-Primer [SEQ ID NO:4] und das folgende Zyklusprogramm wird zum Amplifizieren unter Verwendung des P4-Primers verwendet: 1 Minute bei 95°C und 3 Minuten bei 74,9°C.

J. Analyse der Differenzprodukte

[0122] Falls erwünscht, kann jedes der Differenzprodukte durch Restriktionsverdau und Gelelektrophorese wie folgt analysiert werden. Die DNA-Konzentration des Differenzprodukts wird bestimmt (beispielsweise durch Ultraviolettabsorption), und die DNA wird gemäß dem folgenden Protokoll verdaut. Man kombiniere:
1,0 µl (500 ng) DNA (DP1, DP2 oder DP3)
1,0 µl 10 X Dpn II-Puffer (New England Biolabs, Beverly, MA)
0,5 µl Dpn II (50 E/µl, New England Biolabs, Beverly, MA)
7,5 µl steriles H_2O

[0123] Die Verdaumischung wird bei 37°C für 2 bis 4 Stunden inkubiert. Die Verdauprodukte (500 ng) werden zusammen mit 500 ng Aliquots von unverdautem Differenzprodukt; amplifizierter, Adapter-ligierter Kontrollfragmentpopulation; und amplifizierter, Adapter-ligierter Probenfragmentpopulation auf einem 2,0% Seakem® GTG® (FMC BioProducts, Rockland, ME) Agarose-Minigel, das in TAE-Puffer (40 mM Trisacetat/10 mM Ethylendiamintetraessigsäure, pH 8,3 bei 23°C) läuft, analysiert. Die Markerspuren beinhalten 1 µg jeweils der Marker IX und III (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

[0124] Die Amplifikationsprodukte sollten in der Größe von 200 bis 1300 Basenpaare reichen. Wenn die Anzahl an Runden subtraktiver Hybridisierung/selektiver Amplifikation ansteigt, sollte das Vorhandensein individueller diskreter Banden in der Intensität anwachsen. Falls die Banden verschmiert sind, sollte man mit verdünnten Probenfragmenten reamplifizieren oder die Anzahl von Amplifikationszyklen vermindern. Schließlich ist es immer vorteilhaft, PCR in einem Heißstart-Format zu verwenden.

[0125] Während die vorliegende Erfindung oben durch gewisse spezifische Beispiele und Ausführungsformen beschrieben worden ist, wird sie nur durch den Schutzumfang der anhängenden Ansprüche beschränkt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: LINDEMANN, GARRETT
SCHUELER, PAULA

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: VERFAHREN ZUR SUBTRAKTIVEN HYBRIDISIERUNG UND DIFFERENZANALYSE

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:
(A) NAME: MORRISON & FOERSTER
(B) STRASSE: 755 PAGE MILL ROAD
(C) STADT: PALO ALTO
(D) STAAT: CA
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 94304-1018

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Diskette
(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Ausgabe #1.0, Version #1.30

(v) DERZEITIGE ANMELDEDATEN:
(A) ANMELDENUMMER: US
(B) ANMELDETAG:
(C) KLASSIFIKATION:

(viii) ANWALT/VERTRETER-INFORMATION:
(A) NAME: Brennan, Sean M.
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 39.917
(C) REFERENZ/AKTENNUMMER: 33746-20001.00

(ix) KOMMUNIKATIONS-INFORMATION:
(A) TEL. (415) 813-5600
(B) FAX: (415) 494-0792
(C) TELEX: 706141

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 45 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1

CGATAGTCAC TCTACCACTC AGCCTACGCA CGAGACGATG TACTC 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 13 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2

GATCGAGTAC ATC 13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3

CGATAGTCAC TCTACCACTC AG 22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4

TAGTCACTCT ACCACTCAGC CTAC 24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5

TACCACTCAG CCTACGCACG AGAC 24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6

CAGCCTACGC ACGAGACGAT GTACTC 26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7

CAGCCTACGC ACGAGACGAT GTACTC 26

Patentansprüche

1. Verfahren zum Gewinnen eines in einer Probenpopulation von Polynukleotiden vorkommenden einmaligen Fragments, das nicht in einer Kontrollpopulation von Polynukleotiden vorkommt, wobei das Verfahren umfasst:
a) Fragmentieren beider Populationen von Polynukleotiden durch dasselbe Verfahren, um Proben- und Kontrollfragmentpopulation zu erzeugen;
b) kovalentes Anlagern eines Oligonukleotids, welches ineinander verschachtelte Primerbindungsstellen umfasst, an beide Fragmentpopulationen, wobei die Primerbindungsstellen eine äußerste Primerbindungsstelle, eine innerste Primerbindungsstelle und zumindest eine weitere interne Primerbindungsstelle dazwischen umfasst, um Oligonukleotid-markierte Proben und Kontrollfragmentpopulationen herzustellen;
c) Amplifizieren der Oligonukleotid-markierten Probenfragmentpopulation unter Verwendung eines nicht zielgerichteten Primers, der zur äußersten Primerbindungsstelle des Nucleotids komplementär ist, um eine amplifizierte Probenfragmentpopulation zu erzeugen;
d) Amplifizieren der Oligonukleotid-markierten Kontrollfragmentpopulation unter Verwendung eines zielgerichteten Primers, der zur innersten Primerbindungsstelle des Oligonukleotids komplementär ist, um eine amplifizierte Kontrollfragmentpopulation zu erzeugen;
e) Kombinieren der amplifizierten Probenfragmentpopulation mit einem Überschuss der amplifizierten Kontrollfragmentpopulation, Denaturieren und Inkubieren unter annealenden Bedingungen, um eine Annealing-Mischung bereitzustellen;
f) Unterwerfen der Annealing-Mischung unter Bedingungen, unter denen alle Fragmente degradiert werden, außer doppelsträngigen Fragmenten, die in jedem Strang einen zielgerichteten Primer enthalten; und
g) nachfolgendes Unterwerfen der Annealing-Mischung, die wie in Schritt f) behandelt wurde, einer Amplifikation, unter Verwendung von nichtzielgerichteten Primern, die zu einer der internen Primerbindungsstellen komplementär sind, um ein erstes Differenzprodukt zu erzeugen.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, weiterhin umfassend das Wiederholen der Schritte (e) bis (g), wobei ein Differenzprodukt die amplifizierte Probenfragmentpopulation ersetzt und wobei die behandelte Annealing-Mischung einer Amplifikation unter Verwendung eines nicht zielgerichteten Primers unterworfen wird, der zu einer anderen Primerbindungsstelle komplementär ist als der im vorigen Schritt verwendeten, um zusätzliche Differenzprodukte bereitzustellen.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei der zielgerichtete Primer eine 5'-Phosphatgruppe enthält und dem nicht-zielgerichteten Primer eine 5'-Phosphatgruppe fehlt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei Bedingungen, unter denen alle Fragmente degradieren, außer den doppelsträngigen Fragmenten, die einen nichtzielgerichteten Primer in jedem Strang enthalten, die Wirkungen einer Einzelstrang-spezifischen Nuklease und einer für 5'-Phosphat-terminierte Nukleinsäuren spezifischen Exonuklease umfassen.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die einzelstrangspezifische Nuklease Mungbohnen-Nuklease ist.

6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die für 5'-Phosphat-terminierten Nukleinsäuren spezifische Exonuklease λ-Exonuklease ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Primerbindungsstellen verschiedene Annealingtemperaturen aufweisen.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei die vom 5'-Ende zum 3'-Ende des Oligonukleotids fortschreitenden Primerbindungsstellen eine sukzessiv höhere Annealing-Temperatur aufweisen.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Oligonukleotid vier oder mehr Primerbindungsstellen enthält.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die kovalente Anlagerung durch die Wirkung einer DNA- oder RNA-Ligase vorgenommen wird.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Fragmentierung durch Behandlung mit einem Restriktionsenzym erreicht wird, welches ein 5'-vorragendes Ende zurücklässt.

12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Proben- und Kontrollpopulation von Nukleotiden cDNA umfassen.

13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Proben- und Kontrollpopulationen von Polynukleotiden genomische DNA umfassen.

14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, weiterhin umfassend Klonieren zumindest eines der Differenzprodukte.

15. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die beiden Populationen in Schritt (b) Sammlungen sind, die einige, aber nicht alle Fragment der Originalpopulationen enthalten.

16. Kit für die Isolierung eines oder mehrerer Polynukleotidfragmente, die in derselben Population von Polynukleotiden vorliegen und nicht in einer Kontrollpopulation von Polynukleotiden vorliegen, wobei das Kit umfasst:
a) ein verschiedene Primerbindungsstellen umfassendes Oligonukleotid;
b) Reagenzien, Enzyme, Puffer, Primer, die zum Annealen an den Primerbindungsstellen des Oligonukleotids in der Lage sind, und Nukleotide für eine Nukleinsäureamplifikation;
c) eine Einzelstrang-spezifische Nuklease;
d) eine Exonuklease, die für Nukleinsäuren mit 5'-Phosphat-terminierten Enden spezifisch ist;
e) Reagenzien, Salze und Puffer zum Durchführen einer Annealing-Reaktion;
f) Reagenzien und Enzyme zur DNA-Ligation; und
g) Reagenzien und Enzyme für die Synthese von cDNA.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1

Flussdiagramm zur verbesserten subtraktiven Hybridisierung und Differenzanalyse

