



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900514080
Data Deposito	24/04/1996
Data Pubblicazione	24/10/1997

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	Q		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

METODO PER LA RIVELAZIONE DI ACIDI NUCLEICI AMPLIFICATI E KIT PER IL SUO USO.

DESCRIZIONE

RM 96 A 000277

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione dal titolo:

"Metodo per la rivelazione di acidi nucleici amplificati e kit per il suo uso".

a nome: CLONIT S.p.A.

inventori: Maurizio Gramegna e Giuseppe Colucci

La presente invenzione concerne un metodo per la rivelazione di acidi nucleici amplificati e un kit per il suo uso. Più in particolare il metodo concerne un sistema di rivelazione di DNA amplificato che utilizza il medesimo ligando preincorporato in entrambi gli inneschi per l'amplificazione, sia per la reazione di cattura, che per quella di rivelazione. Il metodo può essere applicato a qualsiasi DNA, genomico, virale, batterico, ecc., amplificato con qualsiasi tecnica nota agli esperti del settore, come per esempio la reazione a catena della polimerasi (PCR), a condizione che tali tecniche necessitino di oligonucleotidi inneschi. Il metodo è vantaggiosamente utilizzato anche per DNA amplificato, ottenuto da retrotrascrizione di mRNA bersaglio o, per esempio, di un RNA genomico virale.

La PCR (Hoffman La Roche), ha avuto negli ultimi anni un grande sviluppo, sia nella diagnostica medica, che nella ricerca di base ed applicata. La reazione si basa sull'impiego di oligonucleotidi-innesco specifici, per la reazione di una polimerasi termostabile quali, per esempio, la Taq polimerasi (*Thermus aquaticus*), o la Tth polimerasi (*Thermus thermophilus*), su uno stampo di DNA. Si ottiene un buon arricchimento del DNA bersaglio di partenza, mediante la ripetizione di cicli comprendenti

Ing. Barzanò & Ranardo
Roma S.p.A.

una fase di denaturazione, in cui vengono separate le due eliche del DNA, una fase di "annealing", in cui gli inneschi ibridizzano in maniera specifica a sequenze complementari sul DNA bersaglio, e una fase di elongazione, in cui la polimerasi termostabile polimerizza una catena di nucleotidi sullo stampo del DNA bersaglio. La PCR "nested" è utilizzata in tutti quei casi in cui non si può ottenere una quantità sufficiente di DNA amplificato, e comprende una prima amplificazione con una prima coppia di inneschi, ed una seconda amplificazione con una seconda coppia di inneschi, differenti dalla prima coppia, di sequenza interna a quella del frammento prodotto dalla prima amplificazione.

La domanda di brevetto WO90/06374 a nome Amrad Co. concerne un metodo per catturare un DNA bersaglio amplificato su un substrato solido che comprende le fasi di incorporare un primo ligando nel DNA a mezzo di reazione PCR che utilizzi un set di inneschi in cui uno di essi porta il ligando, e di mettere a contatto il DNA così trattato con un substrato solido che ha un reagente di legame immobilizzato su esso per detto ligando. La rivelazione del DNA così catturato viene effettuata a mezzo di legame di un secondo ligando, differente da quello utilizzato per la cattura, con un reagente in grado di produrre una reazione evidenziabile. Gli inneschi non elongati agiscono da competitori del DNA amplificato per il legame con il reagente adeso sul substrato solido, rendendo la reazione poco sensibile.

La presente invenzione supera gli svantaggi della tecnica nota e permette di rivelare in maniera semplice e sensibile il DNA amplificato, che ha incorporato una molecola di ligando su ciascuno dei due filamenti del

Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

DNA, a seguito di cattura su un substrato solido su cui è adesa una molecola in grado di reagire in maniera specifica con il ligando. Tale risultato si ottiene impiegando inneschi per l'amplificazione comprendenti un ligando, per esempio una molecola di biotina, al terminale 5'. La cattura avviene mediante la reazione di una molecola specifica per tale ligando, già immobilizzata sul substrato solido. Nel caso che il ligando sia la biotina, la molecola specifica è vantaggiosamente rappresentata da streptavidina, che ha 4 siti di legame per la biotina. La rivelazione avviene tramite il legame del ligando con una molecola al quale è coniugato un enzima in grado di catalizzare una reazione di rivelazione (ad esempio perossidasi, fosfatasi alcalina).

I vantaggi del metodo della presente invenzione sono costituiti dall'uso del medesimo ligando come sistema di legame alla fase solida e come sistema rivelatore; e dall'introduzione di una fase di denaturazione-rinaturazione che rende anche le molecole in fase solida saturate con gli inneschi non elongati in grado di catturare e rivelare i prodotti di amplificazione.

La presente invenzione verrà ora descritta, a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, e con riferimento alle figure allegate, in cui:

la figura 1 rappresenta uno schema del complesso ottenuto secondo l'invenzione;

la figura 2 rappresenta uno schema dei complessi ottenuti a seguito della fase di denaturazione e legame alla fase solida della miscela di amplificazione;

Ing. Bassano & Zanardo
Roma s.p.a.

la figura 3a rappresenta uno schema di un primo complesso ottenuto a seguito della fase di rinaturazione e legame alla molecola di rivelazione;
la figura 3b rappresenta uno schema di un secondo complesso ottenuto a seguito della fase di rinaturazione e legame alla molecola di rivelazione;
la figura 3c rappresenta uno schema di un terzo complesso ottenuto a seguito della fase di rinaturazione e legame alla molecola di rivelazione.

In una delle applicazioni della presente invenzione, un RNA bersaglio virale, per esempio quello del virus dell'epatite C (HCV), è retrotrascritto mediante l'impiego di un innesco antisenso specifico per la regione 5'UTR del genoma virale, e mediante l'uso dell'enzima trascrittasi inversa del virus della mieloblastosi aviaria AMV-RT.

Si procede ad una prima amplificazione con un innesco senso della stessa sequenza 5'UTR, sullo stampo del cDNA ottenuto dopo retrotrascrizione. Successivamente viene effettuata un'amplificazione "nested" utilizzando una coppia di inneschi interna al frammento già amplificato nella prima reazione PCR. La coppia di inneschi per l'amplificazione "nested" è marcata in 5' con biotina. Il prodotto di amplificazione così ottenuto è un frammento di DNA a doppia elica con, all'estremità 5' di ognuno dei filamenti, una molecola di biotina disponibile per successivi legami.

Il prodotto di amplificazione "nested" viene quindi messo a contatto con il substrato solido su cui precedentemente è stato immobilizzato un reagente di legame (per esempio streptavidina) e, quindi, catturato.

Viene poi introdotto nel sistema un secondo reagente di legame (per esempio streptavidina coniugata con perossidasi, SA-HRP) che si

Ing. Barzani G. Riccardo
Rome 21/01/01

lega alla molecola di biotina esposta, rimanendo disponibile per la reazione con un cromogeno per lo sviluppo di una reazione colorimetrica evidenziabile.

La streptavidina ha 4 siti di legame per la biotina e può legare un numero notevole di biomolecole, quali antigeni, anticorpi, carboidrati, cellule, DNA, enzimi, apteni, lectine, peptidi, proteine, recettori, che fungono da ponte per la rivelazione colorimetrica.

La biotina è in grado di legarsi, con legame avidinico, a tutti i siti disponibili e accessibili della streptavidina che si trova adesa ai pozzetti del substrato solido. Pertanto ciascuna molecola di streptavidina è in grado di legare fino a 4 molecole di biotina.

Introducendo un passaggio di denaturazione dopo l'amplificazione "nested", quindi prima di mettere a contatto l'amplificato con il substrato solido, si riesce ad incrementare ulteriormente la sensibilità del sistema. La denaturazione può essere effettuata con una miscela denaturante come descritto, oppure semplicemente con una bollitura di 10 minuti dell'amplificato.

Il passaggio di denaturazione permette di ottenere molecole di DNA amplificato a singola elica unitamente agli inneschi che non sono stati utilizzati dalla reazione.

Tutte le molecole presenti nella miscela denaturata recano pertanto in 5' una molecola biotina, siano gli inneschi oppure frammenti amplificati, che potrà legarsi ai siti disponibili della streptavidina. In questo modo sul substrato solido andranno a formarsi delle strutture costituite in

Ing. Barsano & Ranando
Roma s.p.a.

parte dal legame con gli inneschi non incorporati nella reazione, in parte con i frammenti amplificati.

Aggiungendo la soluzione di ibridazione si riporta la miscela in condizioni non denaturanti, con il risultato che le molecole torneranno a legarsi con i propri omologhi. In questo modo sul substrato solido andranno a costituirsi delle strutture formate in parte da un innesco legato alla streptavidina che ha reagito con un frammento di amplificazione ad esso complementare, in parte da un frammento di amplificazione legato alla streptavidina, che ha reagito con un frammento di amplificazione complementare, in parte da un frammento di amplificazione che ha reagito con un innesco complementare.

Si prospettano possibilità di sfruttamento dell'invenzione con altre molecole di legame, quali fosfatasi alcalina, peptidi, lectine, carboidrati, DNA, proteine di legame, ecc.

Il sistema può essere utilizzato anche con PCR "multiplex" utilizzando inneschi marcati in 5' con fluoresceine differenti, e rivelato su piastra, o con sistemi automatici ("gene scanner" e sequenziatori).

L'invenzione prevede anche la possibilità di utilizzo diretto per la quantizzazione del prodotto di amplificazione. Tale quantizzazione può essere realizzata con diluizioni scalari dell'acido nucleico bersaglio di partenza oppure con diluizioni scalari in miscela di amplificazione dopo la reazione di amplificazione.

Amplificazione con inneschi biotinilati e rivelazione su micropiastra -Kit

Ing. Barzano S. Romano
Roma s.p.a.

Miscela di retrotrascrizione: 50 mM Tris-HCl pH 8.2, 70 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 4mM DTT, 20 U RNAsin, 0.4% NP-40, 100 µM dNTPs, 25 pmoli di innesco antisenso (volume finale di reazione: 25µl).

Miscela di prima amplificazione: 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 200 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, 25 pmoli di innesco senso (volume finale di reazione: 75 µl).

Miscela di amplificazione "nested": 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 200 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, 25 pmoli di inneschi "nested" biotinilati (volume finale di reazione: 97 µl).

Soluzione denaturante: 80 mM EDTA, 0.4 N NaCl.

Soluzione di ibridazione: 80 mM sodio fosfato (dibasico), 10 mM sodio fosfato (monobasico), 2.5 M sodio tiocianato, 0.125% Tween-20, pH 5.

Soluzione di lavaggio: 7mM sodio fosfato (monobasico), 3 mM sodio fosfato (dibasico), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.125% Tween-20, pH 7.

Soluzione coniugante: 10 mM Tris-HCl pH 7.6, streptavidina coniugata con perossidasi.

Reagente colorimetrico: 1 g/l 3,3'-5,5'-tetra-metilbenzidina (BM Blue POD Substrate) (Boehringer Mannheim GmbH).

Soluzione di termine della reazione: acido solforico 5%.

Preparazione del substrato solido: si utilizzano micropiastre tipo "Elisa" (maxi Sorp, Pierce), dispensando in ogni pozzetto 200 µl di streptavidina 2 µg/ml ed incubando per la notte a 4°C. (Le micropiastre sono disponibili anche già preparate, Pierce).

L'estrazione dell'RNA può essere effettuata mediante la metodica classica di estrazione con fenolo-cloroformio (Sambrook, Fritsch, Maniatis,

*Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.*

Molecular Cloning A Laboratory Manual, CSH) o con uno dei kit commerciali attualmente disponibili sul mercato.

Si aggiungono 3 µl di siero oppure di RNA estratto a 22 µl di miscela di retrotrascrizione preparata come descritto, per un volume finale di 25 µl, e si denatura per 3 secondi a 92°C. Si aggiungono 8 U di AMV-RT e si incuba per 60 minuti a 42°C.

Terminata la retrotrascrizione, si aggiungono nella stessa provetta di reazione 75 µl di miscela di prima amplificazione preparata come descritto, con 2 U di Taq polimerasi (Hoffman La Roche) e si avvia l'amplificazione impostando i seguenti cicli:

<u>cicli</u>	<u>denaturazione</u>	<u>annealing</u>	<u>elongazione</u>
1	94°C 3 min	45°C 1 min	72°C 2 min
33	94°C 1 min	45°C 1 min	72°C 2 min

Dopo la prima amplificazione si dispensa in una nuova provetta di reazione 97 µl di miscela di amplificazione "nested" e si aggiungono 3 µl del primo amplificato, con 2 U di Taq polimerasi; si avvia nuovamente il programma precedente, ma con un numero totale di 24 cicli, invece dei 34 precedenti.

Al termine dell'amplificazione:

- si prelevano 20 µl dell'amplificato e si denatura chimicamente con uguale volume (20 µl) della soluzione denaturante lasciando a temperatura ambiente per 10 minuti;
- si aggiunge la miscela di amplificato denaturato preparato in precedenza;

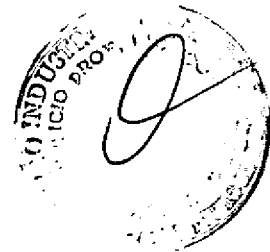
Ing. Barzani & Zanardo
Roma s.p.a.

- si aggiungono alla micropiastra 100 µl di soluzione di ibridazione e si incuba a 37°C per 30 minuti;
- si lavano i pozzetti con la soluzione di lavaggio ripetendo l'operazione 6 volte (lasciare 30 secondi la soluzione ad ogni passaggio);
- si aggiunge la streptavidina coniugata a perossidasi dopo averla diluita 1:5000 in 10 mM Tris-HCl pH 7.6, come consigliato dalla casa produttrice, e si incuba nuovamente a 37°C per 30 minuti;
- si ripete l'operazione di lavaggio come in precedenza;
- si aggiungono 100 µl di POD (substrato colorimetrico) e si lascia sviluppare il colore per 10-20 minuti a temperatura ambiente;
- si ferma la reazione colorimetrica con 100 µl di soluzione di termine della reazione;
- si legge la micropiastra al luminometro a 450 nm avendo come riferimento una lunghezza d'onda di 492 nm.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliercio
(N° d'iscr. 171)

Taliercio

Ing. Barrano & Barardo
Roma s.p.a.



RIVENDICAZIONI

RM96 A000277

1. Metodo per la rivelazione di un acido nucleico amplificato in un campione comprendente le fasi di:

i) incorporare un ligando in ciascuna elica dell'acido nucleico a mezzo di reazione di amplificazione che utilizzi come inneschi per la polimerizzazione due inneschi, in cui ciascuno di essi porta detto ligando, per ottenere un complesso acido nucleico-ligando;

ii) mettere detto complesso acido nucleico-ligando in condizioni che ne favoriscono la denaturazione in singole eliche;

iii) mettere a contatto, in condizioni rinaturanti, detto complesso acido nucleico-ligando denaturato con un reagente di legame per detto ligando, in cui detto reagente è adeso su un substrato solido, per ottenere un complesso acido nucleico-ligando-reagente di legame;

iv) rivelare detto complesso acido nucleico-ligando-reagente di legame.

2. Metodo per la rivelazione di un acido nucleico amplificato in un campione secondo la rivendicazione 1 in cui detto acido nucleico è DNA.

3. Metodo per la rivelazione di un acido nucleico amplificato in un campione secondo la rivendicazione 2 in cui detto DNA amplificato è ottenuto per retrotrascrizione di un RNA in cDNA e amplificazione di detto cDNA.

4. Metodo per la rivelazione di un acido nucleico amplificato in un campione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui detto ligando è la biotina e detto reagente di legame è la streptavidina.

Ing. Barzani G. Romano
Roma s.p.a.

5. Metodo per la rivelazione di un acido nucleico amplificato in un campione secondo la rivendicazione 4 in cui detta biotina è legata a ciascun terminale 5' di detti due inneschi.

6. Corredo diagnostico (kit) per la rivelazione di acido nucleico amplificato in accordo con il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti comprendente contenitori separati contenenti:

- una o più miscele di amplificazione;
- una soluzione denaturante;
- una soluzione di ibridazione;
- una soluzione coniugante;

e inoltre comprendente:

- un substrato solido a cui è adeso un reagente di legame.

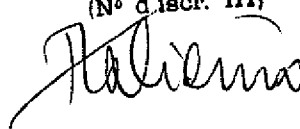
Roma, 24 APR. 1996

p.p. Clonit S.p.A.

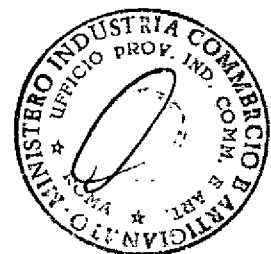
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

OC

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N° d'iscr. 171)



Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.



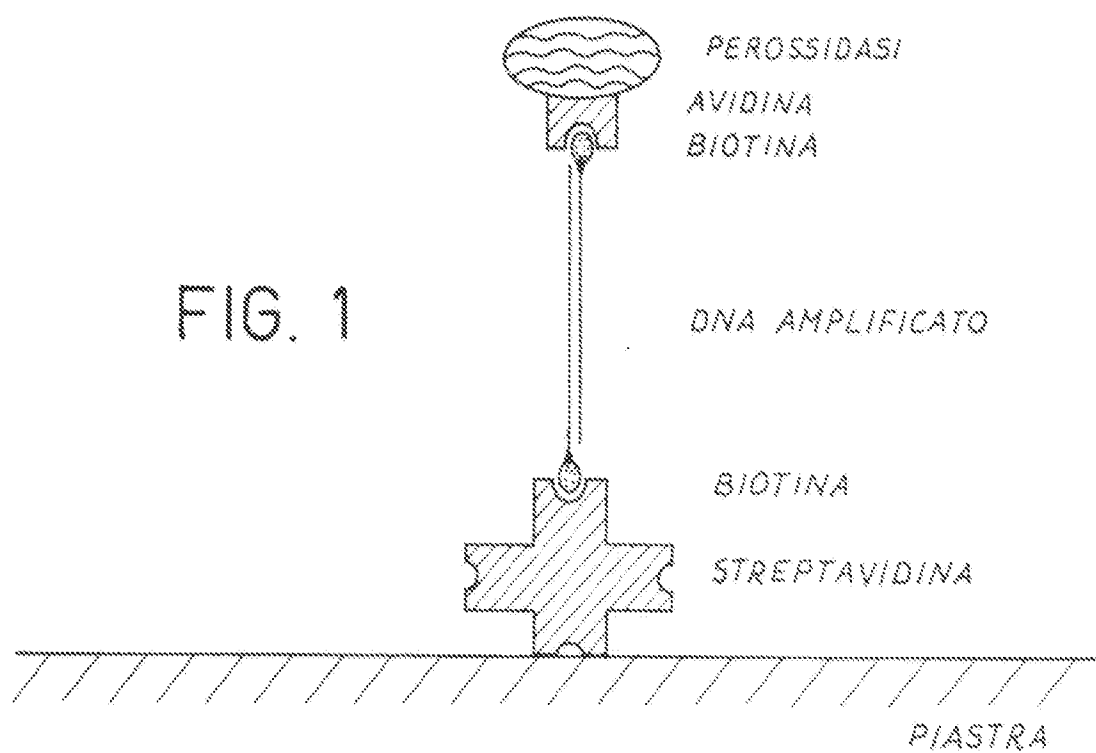
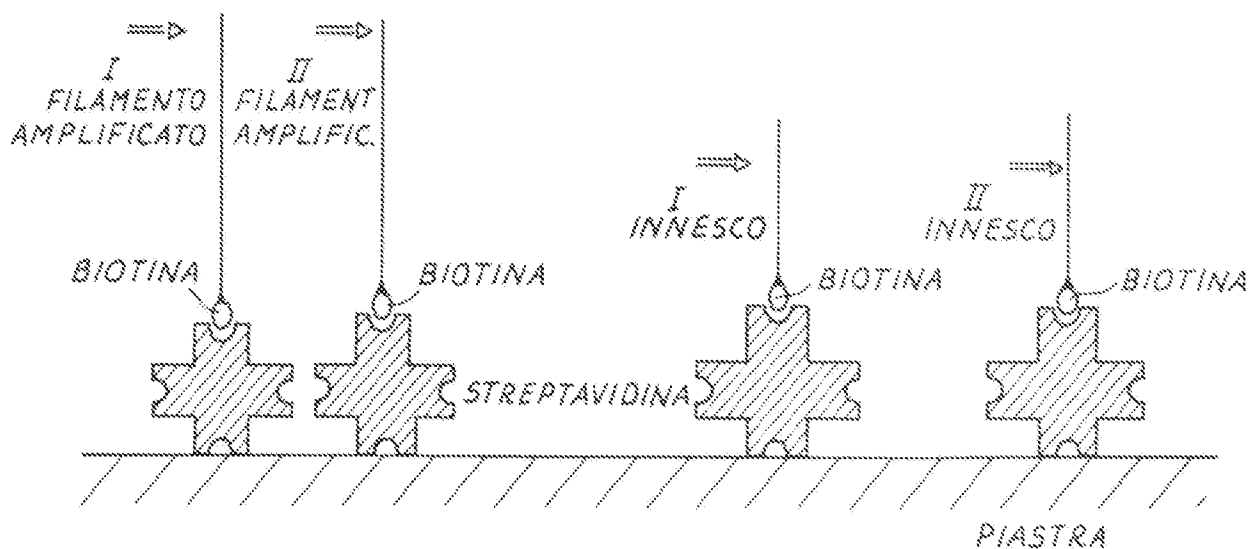


FIG. 1

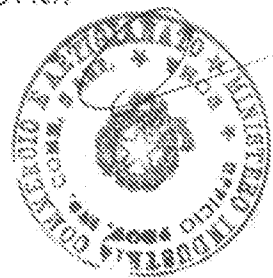
FIG. 2



p.p.: CLONIT S.p.A.
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliercio
(N° d'iscr. 1731)

Taliercio



2/2

FIG. 3a

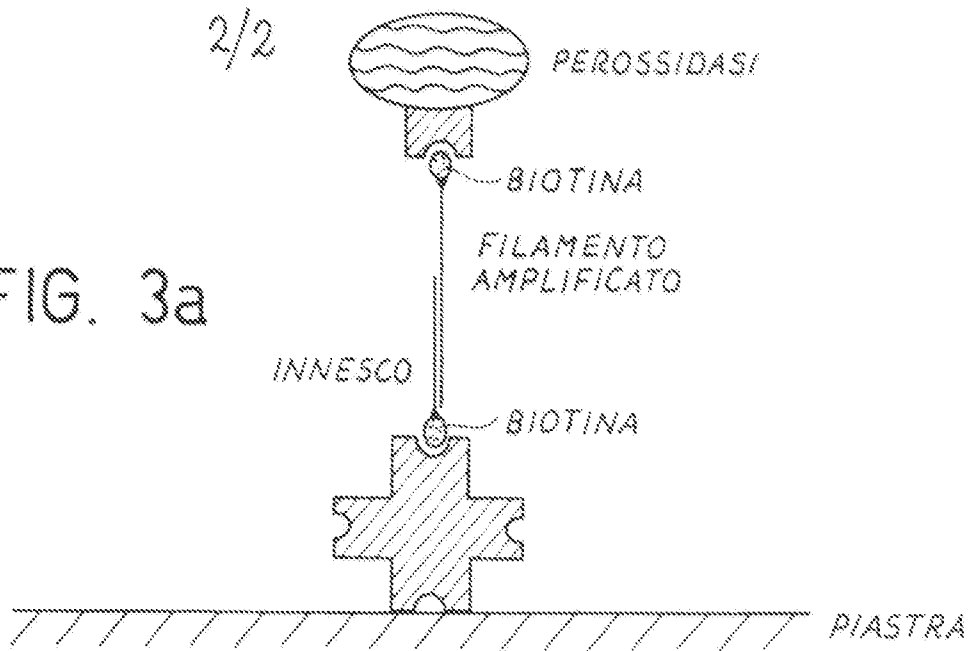


FIG. 3b

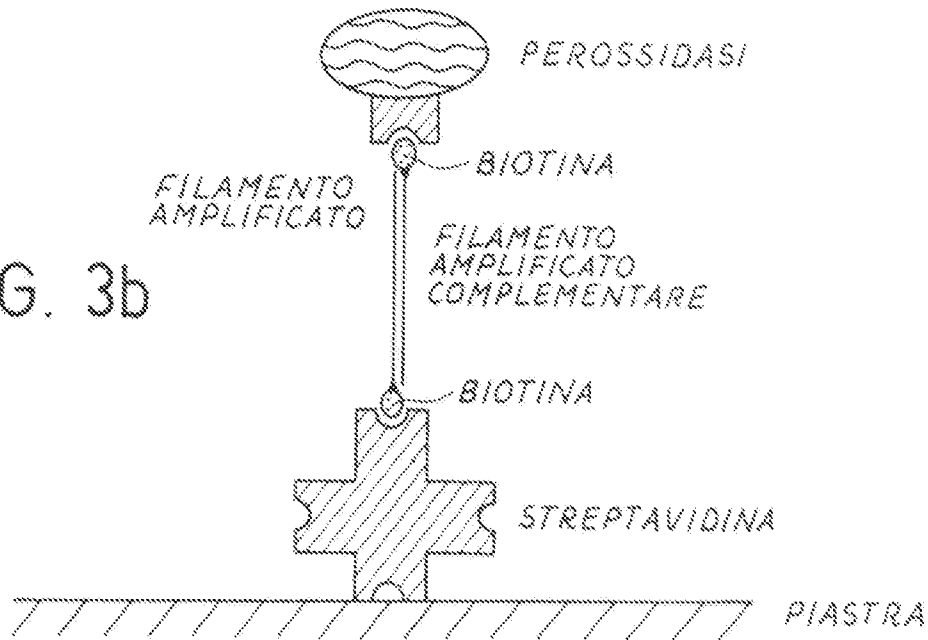
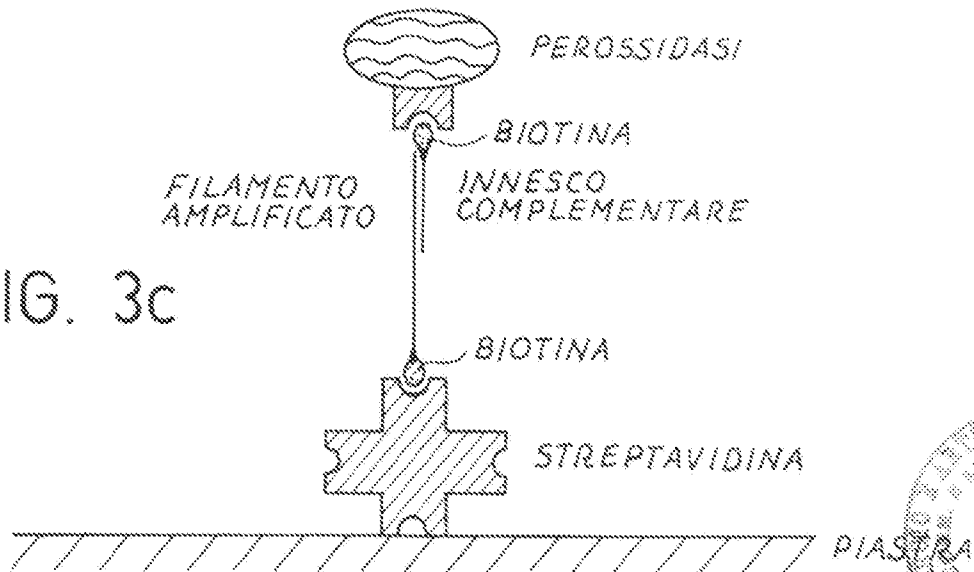


FIG. 3c



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talliercio
(N. d'iscr. 171)

Talliercio

d.p.: CLONIT S.p.A.
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

