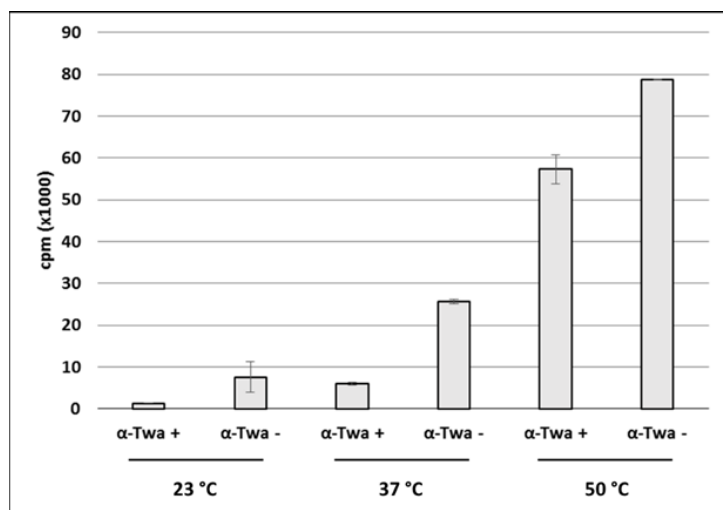


Teplotně citlivý DNA aptamer blokuje enzymatickou aktivitu Twa DNA polymerázy

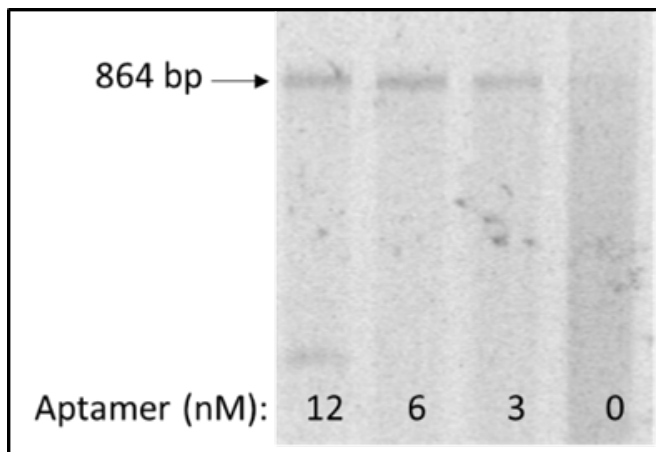
Polymerázová řetězová reakce (PCR) je základní metodou v řadě odvětví molekulární genetiky a diagnostiky, stejně jako důležitý nástroj pro klonování genů a jejich analýzu. Taq DNA polymeráza izolovaná z *Thermus aquaticus* je nejčastěji používaným enzymem pro diagnostiku založenou na PCR. Tento enzym však nemá „proofreading“ aktivitu, a není tedy vhodný pro klonování genů a amplifikace dlouhých DNA fragmentů. K řešení tohoto problému jsme nedávno izolovali z *Thermococcus waiotapuensis* teplotně rezistentní enzym, Twa DNA polymerázu, která má „proofreading“ aktivitu, závislou na 3'-5' exonukleázové aktivitě, a je schopna amplifikovat delší fragmenty DNA než Taq DNA polymeráza. Ačkoliv teplotně rezistentní DNA polymerázy mají maximální enzymatickou aktivitu při teplotě kolem 70°C, snížená enzymatická aktivita je pozorována i při pokojové teplotě. Za laboratorní teploty mohou oligonukleotidové primery nasedat na templátovou DNA nespecificky, a tím může docházet k tvorbě nežádoucích nespecifických DNA amplikonů generovaných během PCR. Pro eliminaci tvorby nespecifických DNA fragmentů byla navržena tzv. „hot-start“ PCR, ve které je enzymatická aktivita DNA polymeráz při teplotě nižší než 50°C blokována chemickou modifikací nebo pomocí protilátek, jež jsou specifické pro aktivní místo enzymu. Při vyšší teplotě, která je dosažena v prvním denaturačním kroku PCR (obvykle při 94°C), dochází k eliminaci inhibičního efektu inhibitorů. Tyto strategie „hot-start“ PCR mají určitou nevýhodu spočívající v tom, že snižují aktivitu enzymu, anebo jsou ireverzibilní. Alternativní metodou pro „hot-start“ PCR je použití DNA aptamerů, které, podobně jako protilátky, se vážou na enzym a inhibují jeho aktivitu při nízké teplotě. Na rozdíl od protilátek a chemických modifikací je inhibice enzymatické aktivity DNA aptamery reverzibilní a obvykle bez vlivu na enzymatickou aktivitu polymeráz. Doposud nebyl k dispozici DNA aptamer, který by blokoval enzymatickou aktivitu Twa DNA polymerázy.

V tomto projektu jsme využili modifikovanou metodu SELEX (z angl. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) a našli sekvence DNA aptameru, který je schopen inhibovat enzymatickou aktivitu Twa DNA polymerázy při teplotě nižší než 50°C (Obr. 1).



Obr. 1. Inhibiční efekt anti-Twa DNA aptameru na enzymatickou aktivitu Twa DNA polymerázy při různých teplotách. Enzymatická aktivita Twa DNA polymerázy byla určena v testu, ve kterém je měřena inkorporace ³²P-ATP do lososí genomové DNA v přítomnosti 0,2 mM dNTP a 0,05 U Twa DNA polymerázy v pufru pro Twa DNA polymerázu. Inkorporovaná radioaktivita byla měřena po 30 min inkubaci za různých teplot a v přítomnosti (α-Twa +) nebo nepřítomnosti (α-Twa -) anti-Twa DNA aptameru.

Další studia ukázala, že pokud byla PCR reakční směs obsahující primery, templát a Twa polymerázu inkubována 30 min před PCR při teplotě 23°C, anti-Twa DNA aptamer v koncentraci 3-12 nM zabránil tvorbě nespecifických DNA amplikonů (Obr. 2).



Obr. 2. Vliv různých koncentrací anti-Twa DNA aptameru na PCR s Twa DNA polymerázou. Fragment myší genomové DNA (864 bp) byl amplifikován v PCR pomocí Twa DNA polymerázy bez nebo s různými koncentracemi anti-Twa DNA aptameru. Pro PCR reakční směs (0,2 mM dNTP, 1 U Twa DNA polymerázy, 0,5 μ M předního a zadního primeru v pufru pro Twa DNA polymerázu) byla připravena a inkubována 30 min při 23°C před přenosem do T100 termálního cykleru (BioRad). Cyklovací podmínky byly následující: počáteční denaturace při 94°C 1 min následovaná 40 cykly denaturace při 95 °C po 15 s, nasedání primerů při 55 °C po 15 s a elongace při 72°C po 45 s. PCR amplikony byly frakcionovány elektroforézou v 1% agarózovém gelu a barveny ethidium bromidem. V PCR směsi doplněné anti-Twa DNA aptamery v koncentraci 3 - 12 nM byly produkovány především specifické DNA amplikony (864 bp; pozice vyznačena šipkou). V nepřítomnosti aptameru byla zvýšena amplifikace nespecifických amplikonů.

Závěr: Výsledky ukazují, že anti-Twa DNA aptamer inhibuje Twa DNA polymerázu a je využitelný pro hot-start PCR s Twa DNA polymerázou.

V případě zájmu o další informace k výsledkům tohoto projektu nebo o zakoupení neexkluzivní licence na přípravu anti-Twa inhibičního aptameru se obraťte na **Centrum pro transfer technologií**, ÚMG AV ČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, Tel. 420-241 063 227 nebo 420-602 892 876, e-mail: ctt@img.cas.cz