



(12) PATENTANSØGNING

Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl.⁷: C 12 Q 1/68
 (21) Patentansøgning nr: PA 2004 01109
 (22) Indleveringsdag: 2004-07-15
 (24) Løbedag: 1986-03-26
 (41) Alm. tilgængelig: 2004-07-15
 (30) Prioritet: 1985-03-28 US 716,975 1985-10-25 US 791,308 1986-02-07 US 828,144

(71) Ansøger: F. HOFFMAN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, Schweiz

(72) Opfinder: Stephen Joel Scharf, 2028½ Fransisco Street, Berkeley, CA 94709, USA
 Glenn Thoman Horn, 3 Admiral Drive F370, Emeryville, CA 94608, USA
 Henry Anthony Ehrlich, 3936 Rhoda Avenue, Oakland, CA 94602, USA
 Randall Keichi Saiki, 320-39th Street, Richmond, CA 94805, USA
 Norman Arnheim, 22322 De Kalb, Woodland Hills, CA 91364, USA
 Kary Banks Mullis, 447 Beloit Avenue, Kensington, CA 94708, USA

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S, Sundkrogsgade 9, 2100 København Ø, Danmark

(54) Benævnelse: Kit til multiplicering og påvisning af nukleinsyresekvenser

(57) Sammendrag:

EkspONENTIelt multiplicerings- og påvisningskit til multiplicering og påvisning af en specifik template-nukleinsyresekvens eller specifikke template-nukleinsyresekvenser, der er indeholdt i en enkelt- eller dobbeltstrenget nukleinsyre eller i en blanding af sådanne nukleinsyrer i en prøve, hvilket kit i samlet form omfatter:

(a) i det mindste en første og en anden oligonukleotidprimer, der er indbyrdes forskellige, hvori

(aa) den ene af primerne er i det væsentlige komplementær til den enkeltstrengete nukleinsyre eller til en streng i den dobbeltstrengete nukleinsyre,

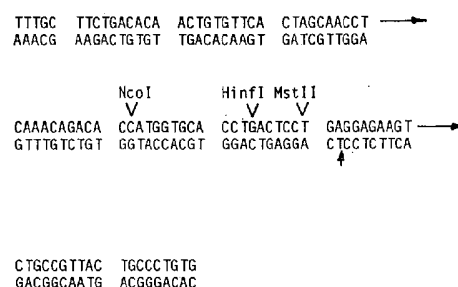
(ab) den anden af primerne er i det væsentlige komplementær til et komplement af den enkeltstrengete nukleinsyre eller til den anden streng i den dobbeltstrengete nukleinsyre, og hvori

(ac) primerne afgrænser enderne af den specifikke nukleinsyresekvens, der skal multipliceres og detekteres;

(b) et polymeriseringsmiddel; og

(c) midler til detektering af den multiplicerede specifikke nukleinsyresekvens, samt et kit til anvendelse deri.

FIG.1

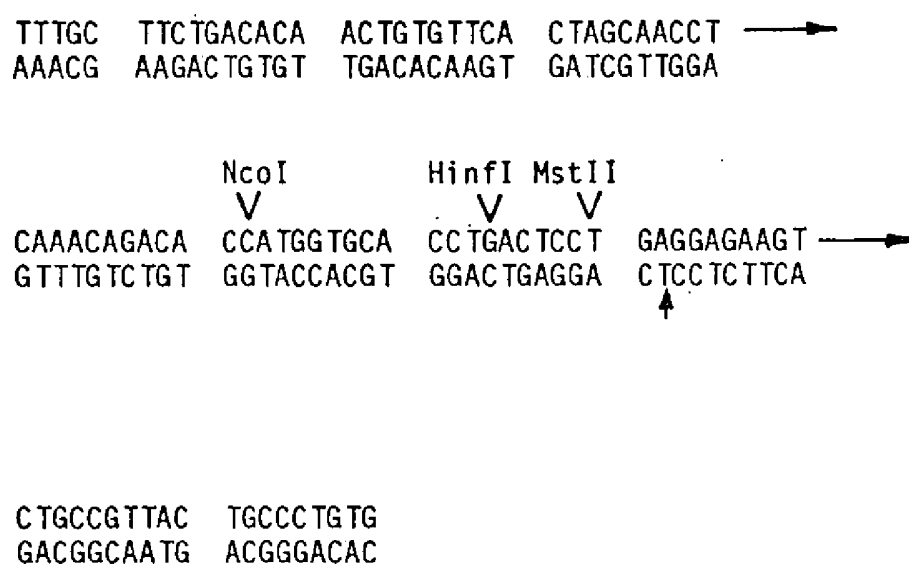


PATENTKRAV

1. Eksponentielt multiplicerings- og påvisningskit til multiplicering og påvisning af en specifik template-nukleinsyresekvens eller specifikke template-nukleinsyresekvenser,
5 der er indeholdt i en enkelt- eller dobbeltstrengt nukleinsyre eller i en blanding af sådanne nukleinsyrer i en prøve, hvilket kit i samlet form omfatter:
 - (a) i det mindste en første og en anden oligonukleotidprimer, der er indbyrdes forskellige, hvori
 - 10 (aa) den ene af primerne er i det væsentlige komplementær til den enkeltstrengede nukleinsyre eller til en streng i den dobbeltstrengede nukleinsyre,
 - (ab) den anden af primerne er i det væsentlige komplementær til et komplement af den enkeltstrengede nukleinsyre eller til den anden streng i den dobbeltstrengede nukleinsyre, og hvori
 - 15 (ac) primerne afgrænser enderne af den specifikke nukleinsyresekvens, der skal multipliceres og detekteres;
 - (b) et polymeriseringsmiddel; og
 - (c) midler til detektering af den multiplicerede specifikke nukleinsyresekvens.
- 20 2. Kit ifølge krav 1, hvori den specifikke template-nukleinsyresekvens er indeholdt i en større sekvens.
3. Kit ifølge krav 1 eller 2, hvori nukleinsyren er DNA eller RNA, herunder mRNA, hvilket DNA eller RNA kan være enkelt- eller dobbeltstrengt eller er en DNA-RNA-
25 hybrid.
4. Kit ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 3, hvori nukleinsyren er genomisk DNA.
- 30 5. Kit ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 4, hvori primerne indeholder ca. 15 til 25 nukleotider.
6. Kit ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 5, hvori mindst den ene af primerne har en nukleotidsekvens bundet til sin 5'-ende, hvilken sekvens er ikke-kom-
35 plementær til nukleinsyren.
7. Kit ifølge krav 6, hvori nukleotidsekvensen, der er bundet til 5'-enden af primeren, er en promotorsekvens.
- 40 8. Kit ifølge krav 7, hvori promotoren er T7-promotoren.

9. Kit ifølge et hvilket som helst af kravene 1-5, hvori der spredt i det mindste i den ene af primerne er anbragt baser eller en nukleotidsekvens, hvilke baser eller hvilken nukleotidsekvens er ikke-komplementære til den specifikke nukleinsyresekvens, der skal multipliceres og detekteres.
- 5
10. Kit ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 5, hvori den ene primer indeholder et restriktionssted.
11. Kit ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 10, hvori polymeriseringsmidlet er et
- 10 enzym valgt blandt *E. coli* polymerase I, Klenow-fragmentet fra *E. coli* polymerase I, T4-DNA-polymerase, andre DNA-polymeraser, revers transkriptase og varmestabile enzymer.
12. Kit ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 11, hvori midlet til detektering af
- 15 den multiplicerede specifikke template-nukleinsyresekvens eller de multiplicerede specifikke template-nukleinsyresekvenser omfatter en mærket oligonukleotidprobe.
13. Anvendelse af et kit ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 12 til multiplikation, detektering og/eller karakterisering af en specifik template-nukleinsyresekvens eller
- 20 specifikke template-nukleinsyresekvenser indeholdt i en enkelt- eller dobbeltstrenget nukleinsyre eller i en blanding af sådanne nukleinsyrer.
14. Anvendelse ifølge krav 13, hvori den specifikke template-nukleinsyresekvens eller de specifikke template-nukleinsyresekvenser er associeret med infektiøse sygdomme
- 25 såsom dem, der er forårsaget af bakterier, vira og protozoparasitter, genetiske lidelser såsom dem, der er forårsaget af specifikke deletioner og/eller mutationer i genomisk DNA, eller cellulære lidelser såsom cancer.

FIG.1



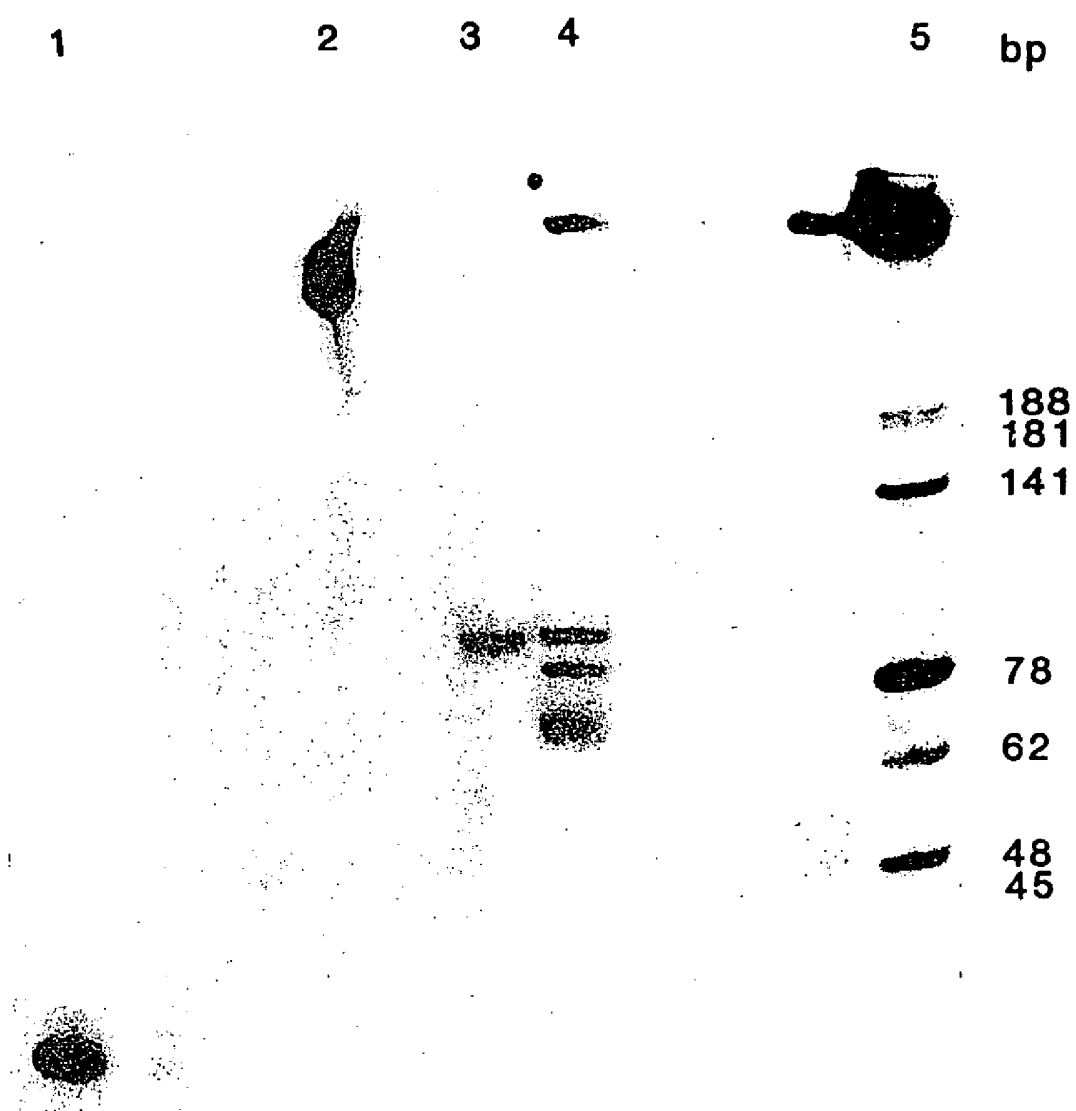


FIG.2

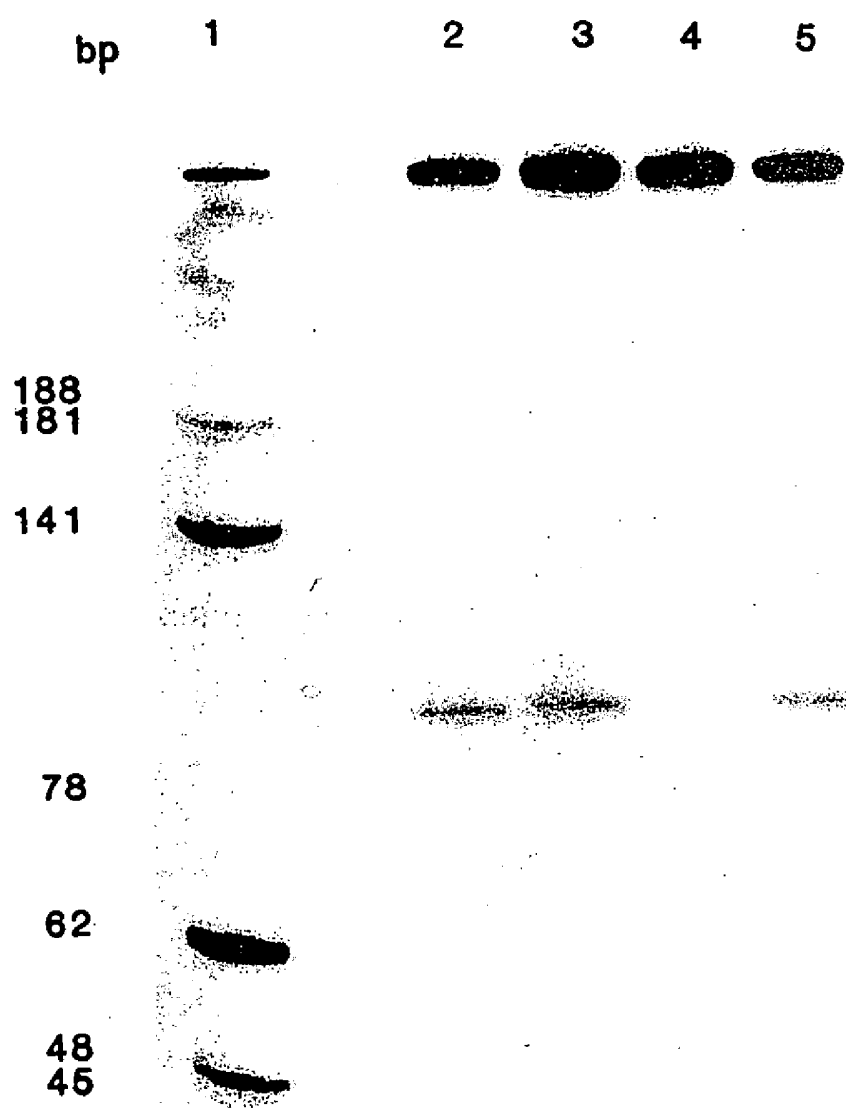


FIG.3

FIG.4-2

dNTPs

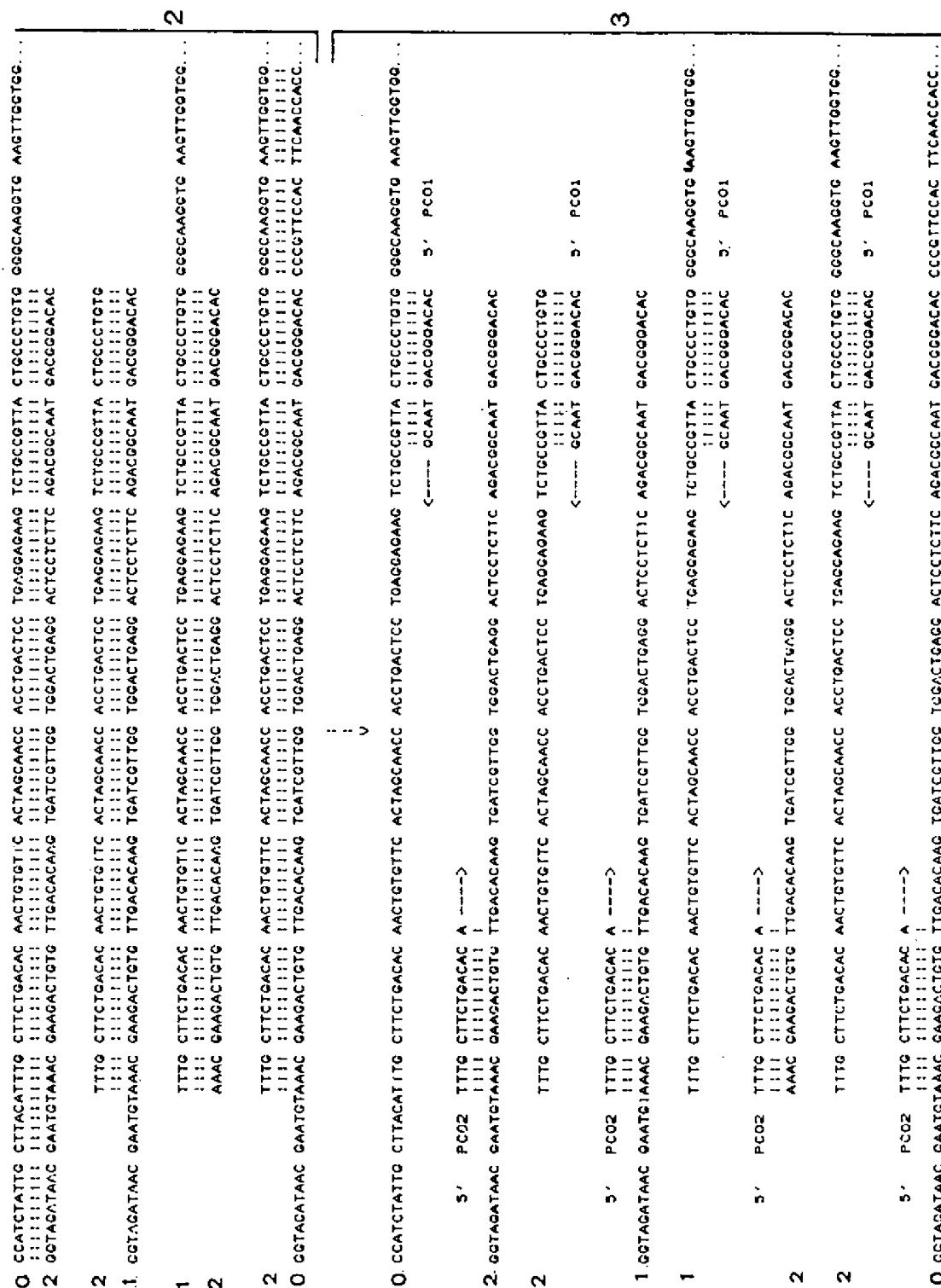


FIG.4-3

dNTPs

0	CCAICATATG	CTTCTGACAC	AACTGTGTTT	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCCGTTA	CTGCCCTGTG	GGGCAAGGTG	AACTTGGTGG...
3	GGTAGATAAC	GAATGTATAAC	CAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCCTCTTC	AGACGGCAAT	GACGGGACAC	
3		TTTG	CTTCTGACAC	AACTGTGTTT	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCCGTTA	CTGCCCTGTG	
2	GGTAGATAAC	GAATGTATAAC	CAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCCTCTTC	AGACGGCAAT	GACGGGACAC	
2		TTTG	CTTCTGACAC	AACTGTGTTT	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCCGTTA	CTGCCCTGTG	
3		AAAC	CAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCCTCTTC	AGACGGCAAT	GACGGGACAC	
3		TTTG	CTTCTGACAC	AACTGTGTTT	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCCGTTA	CTGCCCTGTG	
1	GGTAGATAAC	GAATGTATAAC	CAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCCTCTTC	AGACGGCAAT	GACGGGACAC	
1		TTTG	CTTCTGACAC	AACTGTGTTT	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCCGTTA	CTGCCCTGTG	
3		AAAC	CAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCCTCTTC	AGACGGCAAT	GACGGGACAC	
3		TTTG	CTTCTGACAC	AACTGTGTTT	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCCGTTA	CTGCCCTGTG	
2		AAAC	CAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCCTCTTC	AGACGGCAAT	GACGGGACAC	
2		TTTG	CTTCTGACAC	AACTGTGTTT	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCCGTTA	CTGCCCTGTG	
3		AAAC	CAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCCTCTTC	AGACGGCAAT	GACGGGACAC	
3		TTTG	CTTCTGACAC	AACTGTGTTT	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCCGTTA	CTGCCCTGTG	
0	GGTAGATAAC	GAATGTATAAC	CAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCCTCTTC	AGACGGCAAT	GACGGGACAC	CCCGTTCCAC TTCAACCCAC...

N	0	1	5	10	15	20
	1	1	1	1	1	1
	0	1	5	10	15	20
	0	0	26	1013	32.732	1,048.535

=2(e²PN)-N-1

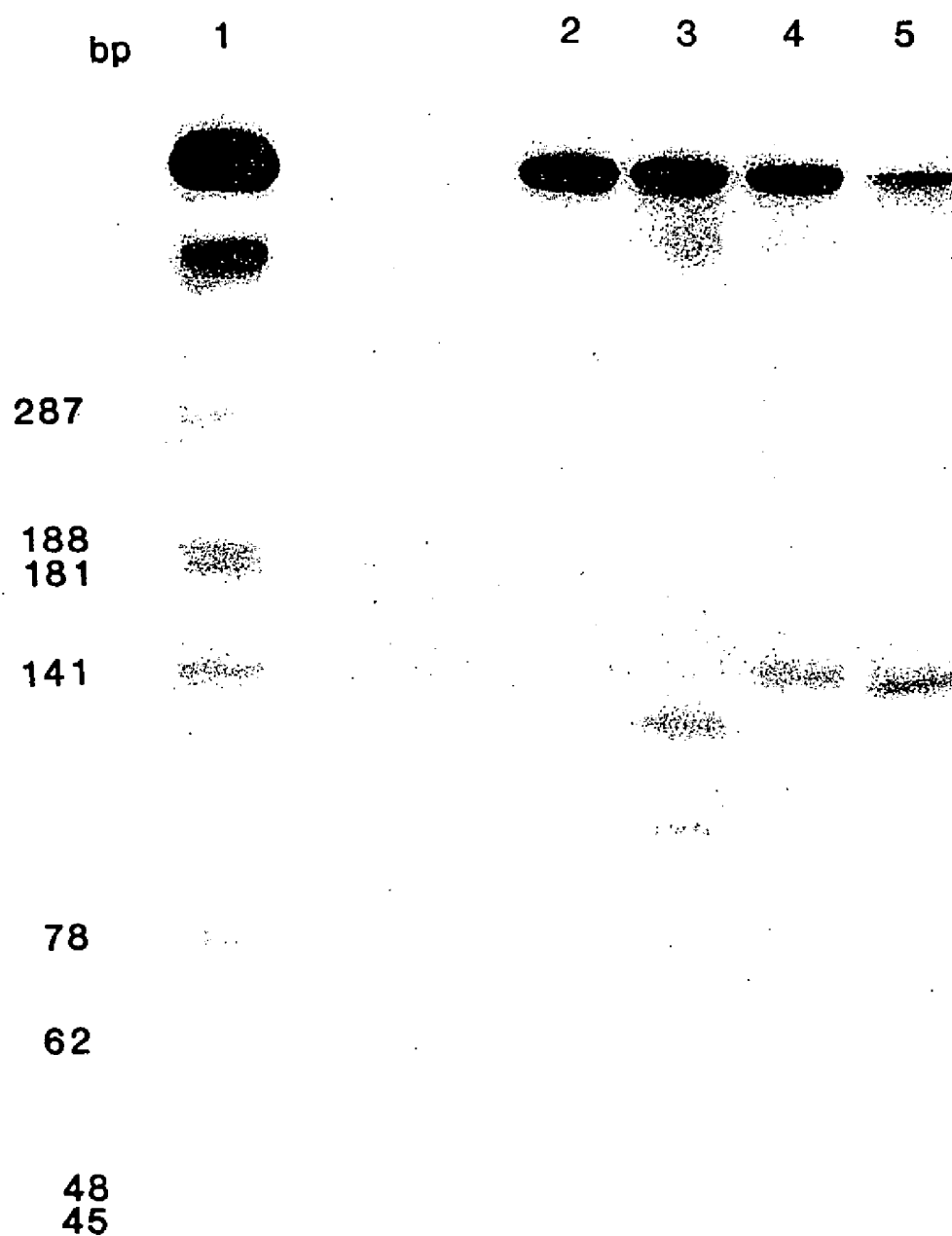


FIG.5

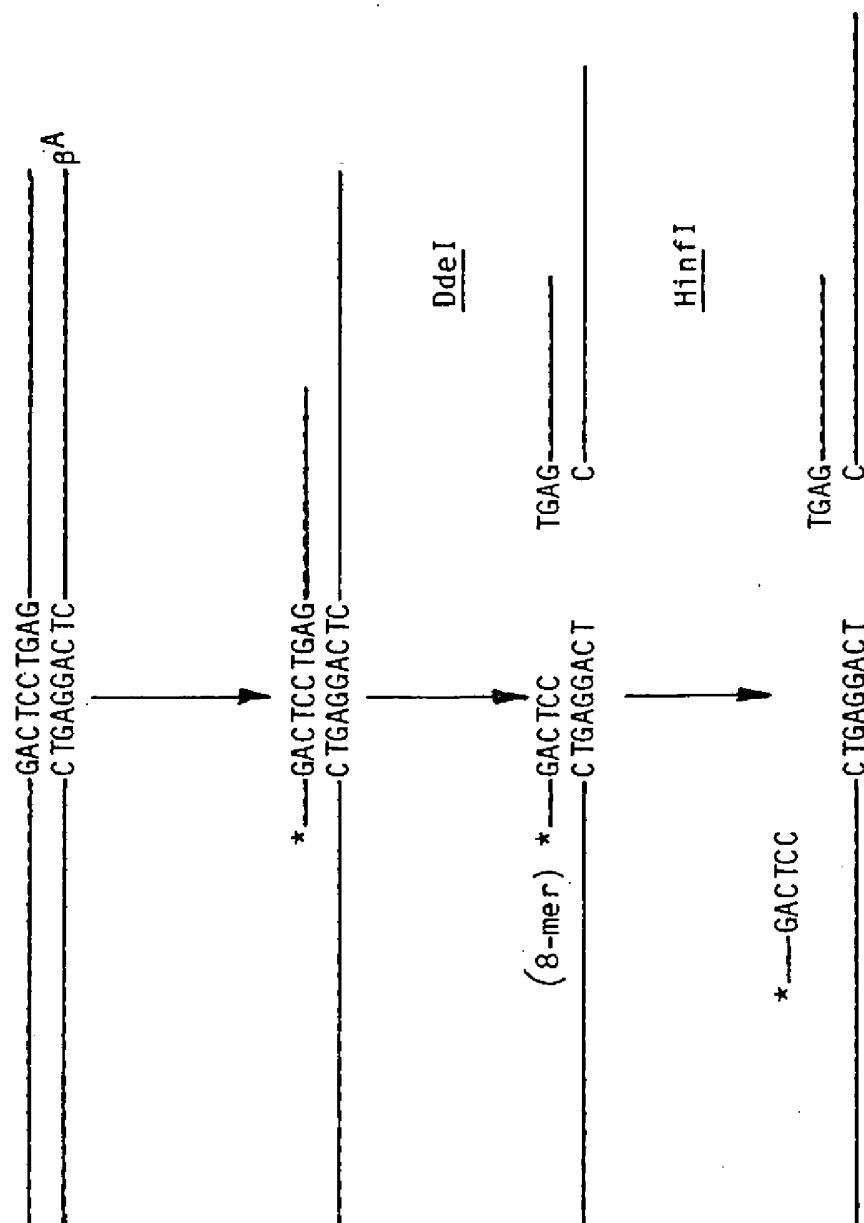


FIG.7

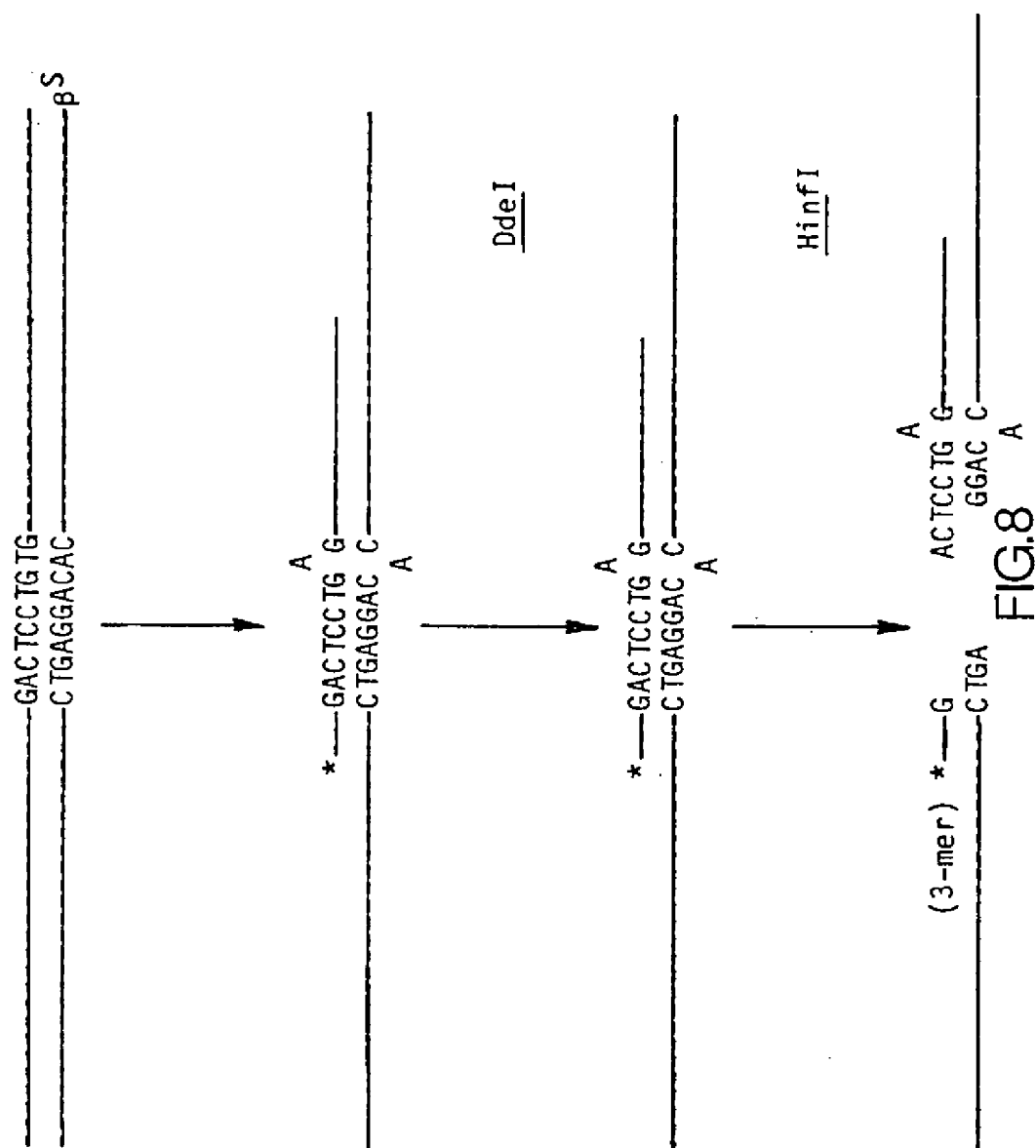


FIG.9

A B C D

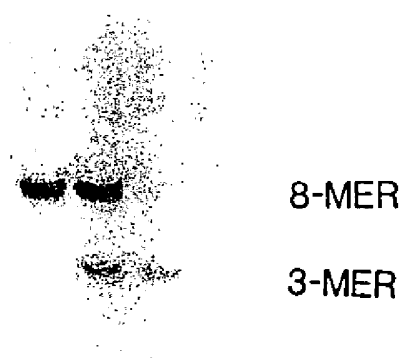


FIG. 10

