(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 891436 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 891436

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/10
C12Q 1/68

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **29.07.1988**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **23.03.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **23.03.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **29.07.1988 PCT/US1988/002601**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

31.07.1987 US 080479

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **The Board of Trustees of the Leland,** Cal. 94035, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Burg, Lawrence James,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Pouletty, Philippe Jacques,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Boothroyd, John Charles,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Keijo Heinonen Oy, Fredrikinkatu 61 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Kohdepolynukletotidisekvenssien selektiivinen monistus
Selektivt flerfaldigande av targetpolynukleotidsekvenser

KOHDEPOLYNUKLEOTIDISEKVENSSIEN SELEKTIIVINEN MONISTUS

Keksinnön alue

Tämä keksintö koskee diagnostisia kokeita, joissa havaitaan tietyn geenin läsnäolo, joko geenin itsensä havaitsemiseksi tai geenin sisältävän organismin havaitsemiseksi, ja on erityisesti suunnattu menetelmiin, joissa havaittavana olevan geenin kopioiden lukumäärää nostetaan entsymaattisesti ennen havaintomenetelmää. Keksintö koskee edelleen mitä tahansa menetelmää, joka vaatii spesifisen polynukleotidisekvenssin monien kopioiden syntymisen.

Keksinnön tausta

On kehitetty joukko diagnostisia kokeita, jotka pohjautuvat tietyn DNA- tai RNA-sekvenssin läsnäolon havaitsemiseen osoituksena analyytin, esim. bakteerin, viruksen tai geneettisen vian läsnäolosta näytteessä. Joissakin tapauksissa diagnostista geeniä on läsnä riittävä määrä suoraan havaittavaksi, joko hybridisaatiolla, reaktiolla spesifisen vasta-aineen kanssa tai muulla menetelmällä. Jos kiinnostuksen kohteena olevaa geeniä on läsnä pieni määrä tai näytteessä mukana olevien samanlaisten sekvenssien aiheuttama tausta on riittävän korkea, on kohdegeenin luotettava ja herkkä havaitseminen vaikeaa. Epäselvä tulos ei ole tyydyttävä diagnostisessa kokeessa.

On kehitetty erilaisia menetelmiä tällaisten diagnostisten menetelmien herkkyyden ja spesifisyyden lisäämiseksi. Kohteen monistus soluviljelyllä, tehokas mutta aikaavievä menetelmä, on jo kauan ollut ainoa luotettava menetelmä. Muut menetelmät lisäävät havaintomenetelmän herkkyyttä käyttäen herkkiä näytteeseen liitettyjä ilmoittajaryhmiä, jotka yhdistyvät kohteen kanssa. Esimerkkejä herkistä ilmoittajaryhmistä olisivat radioaktiiviset ja fluoresoivat molekyylit. Entsyymit, kuten peroksidaasi tai emäksinen fosfataasi näytteeseen liittyneenä parantavat myös herkkyyttä katalyyttisen vaikutuksensa vuoksi, joka niillä on substraattikromoforeihin. Parempi herkkyys

voidaan saada myös monistamalla ilmoittajaryhmiä. Tällainen monistus on saatu aikaan avidiinibiotiinin vuorovaikutuksella, reaktiolla nukleiinihappojen kanssa, tai RNA-ilmoittajaryhmän suoralla entsymaattisella replikoinnilla. Tämä jälkimmäinen menetelmä tuottaa aina 1 000 000 RNA-kopiota noin 12 minuutissa. Toinen menetelmä monistaa kohdenukleiinihappo-sekvenssin ennemmin kuin havaintojärjestelmässä käytetyt ilmoittajaryhmät.

Eräs menetelmä kohdenukleiinihappojen monistamiseksi tunnetaan polymeraasin ketjureaktiona eli PCR-menetelmänä ja on kehitetty geneettisiin vikoihin syynä olevien geenien havaitsemiseksi. Tämä menetelmä käyttää spesifisiä oligonukleotidialukkeita toistuvissa kohde-DNA:n denaturointisykleissä, alukkeen pariuttamisessa ja pidentämisessä DNA-polymeraasilla. Yhdestä alukkeesta syntyneet pidentyneet tuotteet toimivat lisäkohdesekvensseinä muulle alukkeelle. Kohdesekvenssin monistumisastetta säädetään syklien lukumäärällä, jotka suoritetaan, ja se lasketaan teoreettisesti yksinkertaisesti kaavalla 2^n, jossa n on syklien lukumäärä. Jos keskimääräinen tehokkuus syklille on noin 65%-85%, tarvitaan 25 sykliä, jotta saadaan kohdesekvenssistä 0,3-4,8 miljoonaa kopiota.

Vaikka polymeraasin ketjureaktio on hyvin herkkä ja lupaava menetelmä, liittyy siihen joitakin rajoituksia ja haittoja luonnostaan. Esimerkiksi jokainen polymeraasin ketjureaktion sykli antaa parhaimmillaankin vain 2-kertaisen monistumisen, ja näin tarvitaan suuri syklien lukumäärä (20-30) riittävän monistumismäärän saavuttamiseksi. Lisäksi korkeassa lämpötilassa tapahtuva denaturoituminen, joka ilmenee jokaisessa PCR-syklissä, inaktivoi tyypillisesti käytetyn entsyymin ja näin täytyy lisätä toistuvasti kallista entsyymiä.

Sen mukaisesti menetelmä, joka nostaa geenin monistumisastetta (vaatien vähemmän entsyymiä ja harvempia syklejä) olisi erittäin edullinen kaikkiin diagnostisiin menetelmiin, joissa käytetään spesifisen kohdenukleotidisekvenssin havaitsemista ja mitä tahansa muuta menetelmää, joka tarvitsee suurempaa

lukumäärää spesifisesti monistettuja polynykleotideja (RNA tai DNA).

Asiaankuuluva kirjallisuus

PCR-menetelmää on kuvattu lukuisissa julkaisuissa, mukaanlukien Saiki et al., "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia", Science (1985) 230:1350-1354; Saiki et al., "Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes", Nature (1986) 324:163-166; ja Scharf et al., "Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences", Science (1986) 233:1076-1078. Katso myös eurooppalainen patenttijulkaisu nro 0 200 362 A2 (hakemusnro 86302298-4), julkaistu 10.12.1986, joka vaatii etuoikeutta kolmeen US-patenttihakemukseen: sarjanro 716 975, jätetty 28.3.1985; sarjanro 791 308, jätetty 10.10.1985 ja sarjanro 828 144, jätetty 7.2.1986.

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö tarjoaa käyttöön menetelmän monistaa nopeasti (entsymaattisen syklin avulla) kohdepolynukleotidisekvenssin kopioiden lukumäärää vaihtelemalla kahta menetelmää, jotka kopioivat kohdetemplaattia. Ensimmäisessä vaiheiden sarjassa syntyy välituotteena oleva kaksijuosteinen polynukleotidi, joka sisältää promoottorin kohdesekvenssin jälkeen. Kaksijuosteista välituotetta käytetään sitten toiseen menetelmään useiden RNA-kopioiden valmistamiseksi käyttäen RNA-polymeraasia, joka sitoutuu kaksijuosteisen välituotteen promoottorialueeseen. Kutakin RNA-kopiota voidaan sitten käyttää kohdesekvenssinä aloittamaan toinen monistumissykli valmistamalla toinen (tai myöhempi) kokoelma kaksijuosteisia promoottorin sisältäviä välituotteita käyttäen käänteiskopioijaentsyymiä. Keksinnön menetelmä tarjoaa siis käyttöön menetelmän, joka in vitro monistaa näytteessä olevien kohdepolynukleotidisekvenssien kopioiden lukumäärän paljon nopeammin kuin aikaisemmat

menetelmät. Tätä menetelmää käytetään spesifisessä toteutusmuodossa Toxoplasma gondiin diagnostiseen määrittämiseen.

Lyhyt kuvaus piirroksesta

Keksintö tulee paremmin ymmärretyksi, kun viitataan seuraavaan keksinnön yksityiskohtaiseen kuvaukseen yhdessä piirroksen kanssa, joka muodostaa osan selityksestä, jossa:

Kuvio on kaaviollinen esitys polynukleotideista, jotka ovat läsnä keksinnön menetelmän eri vaiheissa.

Spesifisten toteutusmuotojen kuvaus

Tämä keksintö tarjoaa käyttöön menetelmän monistaa kohdepolynukleotidisekvenssin kopioiden lukumäärää ja on sen vuoksi erityisen käyttökelpoinen diagnostisissa kokeissa, joilla on tarkoitus tunnistaa spesifisiä polynukleotidisekvenssejä, joita on näytteessä pieniä määriä. Se on myös käyttökelpoinen missä hyvänsä menetelmässä, joka hyötyy spesifisen sekvenssin polynukleotidien nopeasta syntymisestä.

Kohdepolynukleotidisekvenssi voi olla vain fraktio suuremmasta molekyylistä tai voi olla alunperin läsnä erillisenä molekyylinä, niin että spesifinen sekvenssi muodostaa koko nukleiinihapon. On tarpeetonta, että monistettava kohdesekvenssi olisi läsnä puhtaana. Se voi olla pienempi fraktio kompleksiseoksesta, kuten osa nukleiinihapposekvenssistä, joka johtuu tietystä mikro-organismista, joka organismi koostuu vain pienestä fraktiosta tiettyä analysoitavaa biologista näytettä.

Polynukleotideja sisältävä lähtöreaktioseos voi sisältää useamman kuin yhden kohdesekvenssin, jos halutaan. Siksi tämä menetelmä on käyttökelpoinen ei vain tuotettaessa suuria määriä yhtä spesifistä polynukleotidikohdesekvenssiä vaan myös monistettaessa samanaikaisesti useampaa kuin yhtä erilaista kohdesekvenssiä, joka on sijoittunut samaan tai eri

polynukleotidimolekyyliin. Jos läsnä on useampi kuin yksi kohdesekvenssi, tämän keksinnön ainoa vaadittava muunnos on antaa alukkeet (puhutaan jäljessä) kullekin halutulle kohdesekvenssille.

Mikä tahansa spesifinen polynukleotidikohdesekvenssi voidaan monistaa tällä menetelmällä. On vain tarpeen, että riittävä määrä nukleotideja kummassakin sekvenssin päässä tunnetaan riittävän yksityiskohtaisesti, niin että kaksi oligonukleotidialuketta voidaan valmistaa, kuten jäljessä on kuvattu. Mitä enemmän tiedetään sekvenssin molempien päiden emäksistä, sitä suurempi voi olla kohdesekvenssin alukkeiden spesifisyys ja sitä suurempi menetelmän tehokkuus. Tulee selviämään, että sana aluke tässä käytettynä voi viitata useampaan kuin yhteen alukkeeseen, erityisesti siinä tapauksessa, että ilmenee epäselvyyttä informaatiossa, joka koskee monistettavan kohteen päätesekvenssiä tai sekvenssejä. Esimerkiksi kun nukleiinihapposekvenssi on johdettu tunnetusta proteiinisekvenssistä, käytetään kuhunkin juosteeseen alukekokoelmaa, joka sisältää sekvenssit, jotka edustavat kaikkia mahdollisia kodonimuunnoksia perustuen geneettisen koodin degeneraatioasteeseen. Yksi aluke tästä kokoelmasta on homologinen kohdesekvenssin pään kanssa.

Menetelmä alkaa valmistamalla kaksijuosteinen polynukleotidivälituote, joka sisältää kohdesekvenssin ja sisältää lisäksi promoottorin, joka on sijoittuneena kohdesekvenssin yläpuolelle. Tämä kaksijuosteinen välituote valmistetaan vaihesarjalla käyttäen lyhyitä oligonukleotideja alukesekvensseinä ja pidentämällä alukkeet käyttäen pidempää polynukleotidijuostetta, johon aluke sitoutuu templaattina. Komplementaarinen kohdejuoste saadaan yksijuosteisena (jos se ei ole valmiiksi siinä muodossa) ja hybridisoidaan oligonukleotidisekvenssiksi, joka sisältää promoottorisekvenssin sitovan sekvenssin yläpuolella, joka on komplementaarinen komplementaarisen juosteen alueen kanssa kohdealueen 3'-päässä tai sen lähellä komplementaarisessa juosteessa. Sitoutumissekvenssi tässä alukkeessa on olennaisesti samanlainen kuin sekvenssi

kohdepolynukleotidimolekyylissä, joka löytyy kopioitavan spesifisen kohdesekvenssin 5'-kohdassa, tai kohdesekvenssin 5'-päässä. Tätä aluketta käytetään aloittamaan DNA-molekyylin synteesiä käyttäen DNA-polymeraasia (kuten käänteiskopioijaentsyymi), jolla on sama suunta kuin alkuperäisellä kohdejuosteella.

Toinen oligonukleotidi hybridisoidaan sitten tähän juuri syntetisoituun juosteeseen. Tämä toinen oligonukleotidialuke on komplementaarinen alueen kanssa, joka vastaa kohdemolekyylin 3'-päätä. Nukleotidien lukumäärä alukealueiden välissä on edullisesti alle 300, edullisemmin alle 200, mutta enemmän kuin 10, edullisemmin enemmän kuin 15. Kun toista aluketta pidennetään, muodostuu kopio kohdesekvenssistä ja ensimmäisestä alukkeesta. Saatava tuote sisältää sen vuoksi promoottorialueen 5' kohdesekvenssiin, joka on keksinnön menetelmän ensimmäisen osan tarkoitus.

Välituotepromoottorin sisältävää kaksijuosteista polynukleotidia käytetään sitten templaattina DNA:sta riippuvalle RNA-polymeraasille, joka pystyy sitoutumaan promoottorialueeseen, joka on luotu välituotteeseen. Polymeraasientsyymi kopioi kohdesekvenssin, jolloin syntyy useita RNA-kopioita kohdesekvenssistä promoottorin alapuolelle. Muodostuneiden kopioiden lukumäärä riippuu promoottorista, käytetystä RNA-polymeraasista ja reaktio-olosuhteista, mutta 10 kopiota muodostuu helposti ja 100 tai enemmän kopioita voidaan valmistaa valitsemalla voimakkaat promoottorit, aktiiviset RNA-polymeraasit ja sopivat reaktio-olosuhteet.

Kutakin RNA-kopiota voidaan käyttää templaattina spesifisen kohteen lisäkopioiden tuottamisessa. Reaktio toisen yllä käytetyn oligonukleotidin kanssa, alukkeen pidennys, jolloin saadaan komplementaarinen sekvenssi, reaktio ensimmäisen alukkeen kanssa ja saadun hybridin pidennys molempiin suuntiin (ensimmäisen alukkeen toimiessa alukkeena kohdekopion muodostumiselle ja komplementaarisen juosteen 3'-pään toimiessa alukkeena niin, että syntyy kopio promoottorialueesta)

tuottavat samanlaisen kaksijuosteisen promoottorin sisältävän välituotteen kuin edellä on kuvattu ja jota käytettiin templaattina valmistettaessa RNA-kopioita. Promoottorista riippuvaista RNA-polymeraasia käyttäviä RNA:ta tuottavia syklejä voidaan sitten toistaa. Jos vain 10 RNA-kopiota muodostuu sykliä kohti, kolme sykliä tuottaa tuhatkertaisen kasvun reaktiokasvualustassa läsnä olevien kohdesekvenssien lukumäärässä. Jos 100 kopiota RNA:ta syntyy templaattia kohti, miljoona kopiota kohdesekvenssistä muodostuu kolmessa syklissä.

Yllä kuvattu menetelmä edellyttää joko kaksijuosteisen, kohdejuosteen ja kohdejuosteelle komplementaarisen juosteen sisältävän polynukleotidikohteen läsnäoloa tai komplementaarisen kohdejuosteen läsnäoloa, jos alkuperäinen kohde on yksijuosteinen polynukleotidi, kuten RNA. Jos kohde on alunperin yksijuosteinen RNA tai DNA, komplementaarinen kohdejuoste voidaan valmistaa samanlaisella tavalla kuin edellä kuvattu käyttäen oligonukleotidialuketta. Esimerkiksi yllä kuvattu toinen oligonukleotidialuke on komplementaarinen alueen kanssa, joka vastaa kohdemolekyylin 3'-päätä. Tätä toista oligonukleotidialuketta, tai erilaista aluketta, joka on komplementaarinen kohdesekvenssin 3'-alueelle, voidaan käyttää valmistettaessa komplementaarista juostetta, jota käytetään menetelmän ensimmäisessä vaiheessa. Toinen variaatio on lähteä oligonukleotidialukkeesta, joka on komplementaarinen kohdejuosteelle (mieluummin kuin sen komplementaarijuosteelle). Promoottorisekvenssin sisältävä aluke hybridisoidaan sitten komplementaariseksi juosteeksi, joka lähtee ensimmäisestä alukkeesta.

Oligonukleotidialukkeet valikoidaan siten, että ne ovat "olennaisesti" komplementaarisia erilaisille juosteille kustakin monistettavasta spesifisestä sekvenssistä. Tämä tarkoittaa sitä, että alukkeiden täytyy olla riittävän komplementaarisia hybridisoituakseen niitä vastaavien juosteiden kanssa. Alukesekvenssin ei sen vuoksi tarvitse toistaa sen templaatin tarkkaa sekvenssiä, johon se sitoutuu. Ei-komplementaarinen nukleotidifragmentti voidaan esimerkiksi liittää

alukkeen 5'-päähän muistaen, että alukesekvenssi on komplementaarinen templaattijuosteelle. Tietenkin, kuten edellä on kuvattu, eräs tällainen ei-komplementaarinen nukleotidifragmentti on keksinnön vaatima promoottorisekvenssi. Kuitenkin silloinkin, kun promoottorisekvenssiä ei ole läsnä, voidaan liittää muita ei-komplementaarisia nukleotidifragmentteja. Esimerkiksi sekvenssi, jossa on restriktioendonukleaasin pilkkomiskohta, voidaan saada käyttöön mahdollistamaan monistettujen kohdesekvenssien valmistus plasmidiin insertoimista varten. Vaihtoehtoisesti voidaan ei-komplementaariset emäkset sirotella alukkeen sitojasekvenssiin, sillä edellytyksellä että alukesekvenssillä on riittävä komplementaarisuus monistettavan juosteen (tai sen komplementaarisäikeen) sekvenssille hybridisoitavaksi sen kanssa ja templaatin muodostamiseksi pidennetyn tuotteen synteesiin. Yksittäinen nukleotidi voidaan korvata kohtuullisen pituisessa (esim. noin 15 nukleotidia) alukkeessa tarkoituksena saada aikaan spesifinen endonukleaasin pilkkomiskohta.

Jos halutaan, voidaan promoottorisekvenssit sisällyttää molempiin alukkeisiin täydellisen syklin tuottamien kopioden lukumäärän edelleen lisäämiseksi.

Keksinnön menetelmän toiminta voidaan helposti nähdä viittaamalla kuvaan ja seuraavaan yksityiskohtaiseen kuvaukseen. Kuvassa ja seuraavassa selityksessä esitetyissä kaaviollisissa yksi- ja kaksijuosteisissa polynukleotideissa käytetään standardinimityksiä ja orientaatiota. Kaksijuosteisten polynukleotidien ylemmän juosteen vasen pää on 5'-pää saman juosteen oikean pään ollessa 3'-pää (osoitettu nuolimaisilla päillä). Koska komplementaarisilla juosteilla on vastakkaiset suunnat, pohjajuoste on esitetty 3'-pää vasemmalle osoittaen ja 5'-pää oikealle osoittaen. Sekaannuksen välttämiseksi pohjajuoste on esitetty tässä suunnassa silloinkin kun sitä ei esitetä osana kaksijuosteisesta polynukleotidista. Samaa sopimusta noudatetaan sekvensseillä, jotka on esitetty tekstissä (vaatimukset mukaanlukien), joissa eri sekvenssit on identifioitu kirjaimin ja numeroin. Menetelmän jokaisen vaiheen kaikkia

tuotteita ei ole esitetty; ainoastaan tälle keksinnölle olennaiset ovat mukana.

Kuvan ensimmäisellä rivillä voidaan nähdä kaksijuosteinen kohdepolynukleotidimolekyyli, joka sisältää joukon alueita, jotka on määritelty toiminnoilla, jotka suoritetaan tässä molekyylissä myöhemmissä vaiheissa. Kuten aikaisemmin mainittiin, kaksijuosteinen kohde valmistetaan ensimmäistä vaihetta varten, jos alkuperäinen kohde on yksijuosteinen RNA- (tai DNA-)molekyyli. Polynukleotidin 5'-päässä on X1:ksi identifioitu osa, joka ei kopioidu myöhemmissä tapahtumissa. Tätä seuraa osa sekvenssistä P1, joka käsittää osan myöhemmässä vaiheessa käytettävän alukkeen sekvenssistä. Sekvenssiä P1 seuraa kohdesekvenssi T, joka on kopioitava sekvenssi. Sekvenssi P2, joka sitoutuu erilaiseen alukkeeseen, on mukana T:n 3'-päässä. Lisänukleotideja voi olla läsnä P2:n jälkeen, mutta ne eivät kopioidu. Nämä nukleotidit on merkitty X2:lla kuvassa. Ei X1 eikä X2 vaadita tämän keksinnön toimintaan ja ne ovat siksi mukana valinnaisesti, ulottuen lukumäärällisesti nollasta moniin satoihin tai jopa tuhansiin nukleotideihin. Heittomerkki tai merkintä "prime" osoittaa vastakkaisessa juosteessa olevan komplementaarisen juosteen. Tämä kaksijuosteinen kohdemolekyyli denaturoidaan oligonukleotidialukkeen läsnäollessa ja sitten olosuhteet muutetaan oligonukleotidin ja kohteen pariuttamiseksi, kuten rivillä 2 on esitetty.

Kuvan rivi 2 esittää ensimmäisen oligonukleotidialukkeen, PR-P1, jolla on kompleksirakenne, mutta sisältää sekvenssin P1 3'-päässään, hybridisoituna denaturoidun kohdemolekyylin P1'-osaan. Tämän oligonukleotidialukkeen 5'-pää, PR, sisältää sekvenssin, joka voi kaksijuosteisessa muodossaan sisältää funktionaalisen promoottorin RNA-polymeraasille. Sekvenssi PR voi sisältää lisänukleotideja ilman että ne vaikuttaisivat haitallisesti keksintöön. PR-P1-aluke pidennetään sopivalla entsyymillä (joko DNA:sta riippuvalla DNA-polymeraasilla DNA-kohteelle tai RNA:sta riippuvalla DNA-polymeraasilla RNA- ja/tai DNA-kohteelle), jolloin saadaan juoste PR-P1-T-P2-X2, kuten kuvan rivillä 3 on esitetty. Promoottorialueen

yksijuosteinen luonne on esitetty kuvassa kosketuksen puuttumisella tässä alueessa olevan kahden juosteen välillä ja tekstissä seuraavalla tavalla:

```
PR \
    P1--T--P2--X2
X1'-P1'-T'-P2'-X2'.
```

Tämä (ja muut) keksinnön alukkeet ovat edullisesti suhteellisen lyhyitä, nimittäin 50 nukleotidia tai vähemmän, jotta hybridisaatio (pariuttaminen) ja syklit tapahtuvat nopeasti, erityisesti automaattisilla laitteilla.

Kuvan rivillä 3 esitetyn kaksijuosteisen polynukleotidin denaturoinnin jälkeen toinen aluke sekvenssistä P2' lisätään seokseen pariuttamisolosuhteissa, kuten rivillä 4 on esitetty. Sekvenssi P2' on ekvivalenttinen aikaisemmin identifioidun sekvenssin P2' kanssa ja on itsessään komplementaarinen PR-P1-T-P2-X2:n P2-segmentin kanssa.

Kuvan rivi 5 esittää tuotteen, joka saadaan pidentämällä alukesekvenssiä P2' esitetyssä templaatissa. Promoottorialue on nyt tässä vaiheessa kaksijuosteinen ja voidaan siksi käyttää sitomaan DNA:sta riippuvaan RNA-polymeraasiin. Tekstissä tämä kaksivaiheinen välituote on kirjoitettu:

```
PR--P1--T--P2--X2
PR'-P1'-T'-P2'    .
```

RNA-polymeraasilla tuotetut kopiot on esitetty kuvan rivillä 6. Kopiodut osat, kaikki promoottorialueen alapuolella, on merkitty $P1^R$-T^R-$P2^R$:ksi (yläviite R merkitsee RNA-kopiota). Tämä RNA-molekyyli voi olla sama tai hiukan pitempi tai lyhyempi kuin P1-T-P2, koska se tulee sisältämään koko sekvenssin PR-P1 RNA-polymeraasilla kopioidussa alkuperäisessä nukleotidissa tai sen jälkeen. Jos alkuperäinen kohdejuoste on yksijuosteinen DNA-kohde, $P1^R$-T^R-$P2^R$ on alkuperäisen DNA-kohteen RNA-ekvivalentti plus mikä tahansa osa promoottorin sisältävästä osasta PR kopioituna RNA-polymeraasilla tai miinus mitkä tahansa nukleotidit, jotka eivät kopioidu polymeraasilla.

Jos RNA-kopiot on tarkoitus kierrättää uudelleen lisämonistusta varten, vaiheet, jotka aikaisemmin esitettiin promoottorin sisältävän kaksijuosteisen DNA-välituotteen valmistukselle, toistetaan. Ei ole välttämätöntä käyttää samoja alukeosia P1 ja P2' tai samaa promoottoriosaa PR, vaikka PR-P1 ja P2' ovat jo saatavilla ja voidaan käyttää ilman muuntelua. Jos käytetään muita alukesekvenssejä, saadut kopiot ovat hiukan lyhyempiä tai pitempiä kuin ensimmäiset kopiot, muttä tämä ei vaikuta keksintöön haitallisesti, ellei ole jotain erityistä tarvetta säilyttää alkuperäistä P1-T-P2-sekvenssiä. Alkupariuttaminen P2'-alukkeella ja sitä seuraava alukkeen pidennys saavat aikaan kuvan rivillä 7 esitetyn tuotteen. Kaksijuosteisen välituotteen denaturointi ja pariuttaminen alukkeella PR-P1 antaa rivillä 8 esitetyn tuotteen. Tätä välituotetta voidaan pidentää molempiin suuntiin, koska P1-sekvenssi toimii alukkeena, joka käyttää komplementaarista juostetta templaattina ja komplementaarinen juoste toimii alukkeena, joka käyttää sekvenssiä PR templaattina.

Jos tässä vaiheessa käytetään samoja alukkeita kuin joita käytettiin rivien 1-5 esittämissä vaiheissa, on tuote samanlainen kuin rivillä 5 esitetty tuote, eroten vain yläjuosteen pituudessa. Tämä ei vaikuta mihinkään myöhempiin RNA-polymerointeihin niin kuin tapahtuu silloin, kun RNA-polymeraasi käyttää vain alempaa templaattijuostetta. Jos käytetään erilaisia alukesekvenssejä voi saatu templaattijuoste olla suurempi tai pienempi riippuen käytetyistä alukkeista. Sillä edellytyksellä, että ainakin yksi tässä vaiheessa käytetyistä alukkeista sisältää 5'-päässään sekvenssin, joka toimii promoottorina RNA-polymeraasille, saatu materiaali pystyy vielä monistumaan lisää. Sen mukaisesti kuvan rivillä 9 olevaa promoottorin sisältävää kaksijuosteista DNA-välituotetta voidaan käyttää DNA-riippuvan RNA-polymeraasin kanssa tuottamaan monia RNA-kopioita.

Kun aluksi käytetyt alukkeet hybridisoituvat tarkoittamattomien sekvenssien kanssa DNA-seoksessa, joka sisältää kohdemolekyylin, voidaan saavuttaa etua käyttämällä erilaisia

alukkeita sykliä toistettaessa. Jos esimerkiksi tietty kohdenukleotidi on tarkoitus havaita epäpuhtaassa analyytissä, joka sisältää monia polynukleotidisekvenssejä, kuten silloin, kun bakteerien tai parasiittien aiheuttamaa infektiota todetaan ihmisen neste- tai kudosnäytteestä, alukeoligonukleotidien hybridisaatio isäntä-DNA:lla voi johtaa monistumiseen ei-tarkoitetuissa isäntäsekvensseissä. Koska promoottorisekvenssi tulee olemaan läsnä monistuneessa taustamateriaalissa, voidaan havaita merkittävä nousu spesifisen taustasekvenssin määrässä yhdessä kohdesekvenssin kasvun kanssa. Tämän ongelman välttämiseksi voidaan käyttää erilaisia alukkeita ja/tai promoottoreita eri syklien aikana, jotta estetään taustan monistuminen. Toisessa syklissä voidaan esimerkiksi käyttää eri sitoutumisaluetta ($P1^x$ ja/tai $P2'^x$), joka osuu kohdesekvenssissä alkuperäisen alukkeen sitoutumisalueen lähelle tai peittää sen. Vaikka muiden taustapolynukleotidisekvenssien kanssa voi tapahtua sitoutumista, on epätodennäköistä, että sama taustamateriaali monistuisi. Peräkkäisissä vaiheissa käytettyjen alukkeiden voidaan kuvata olevan alukeyhdistelmä kiinni toisissaan, jos tätä keksinnön toteutusmuotoa seurataan, koska peräkkäiset alukeparit löytyisivät lähempänä toisiaan kohdemolekyylin komplementaarisissa juosteissa. Toiset (ja peräkkäiset) syklit voivat myös käyttää eri promoottorialuetta (esim. PR^x), joka sitoo eri RNA-polymeraasin. Liuokseen jäävän ensimmäisen RNA-polymeraasin hajoaminen ja sen jälkeen toisen polymeraasin liittäminen, joka sitoutuu PR^x:ään, moninkertaistaa kohdekopiot mutta ei taustakopioita, vaikka saattaakin syntyä lisäryhmä taustakopioita. Lisäksi aikaisemmista sykleistä peräisin olevat alukkeet, joita voi olla mukana ylimäärin, voidaan haluttaessa poistaa. Sopivat menetelmät alukkeiden poistamiseksi perustuvat niihin ominaisuuksiin, jotka erottavat ne kohteesta, kuten koko tai alukkeiden esiintyminen yksijuosteisena DNA:na, kun kohde on läsnä kaksijuosteisena DNA:na tai RNA:na. Esimerkiksi geelikromatografia poistaa pienet alukkeet suuremmista kohteista, kun taas spesifiset nukleaasit tai vasta-aineet poistavat alukkeet kaksijuosteisista kohteista.

Esimerkkinä joko toisissaan kiinni olevien alukkeiden ryhmästä tai erilaisista alukkeista, joilla on erilaiset promoottorit, oletetaan, että ensimmäisessä monistussyklissä haluttu kohdesekvenssi monistuu tekijällä 50. Samaan aikaan alukkeiden sitoutuminen taustasekvenssiin ilmenee siten, että taustasekvenssi monistuu myös tekijällä 50. Jos toisessa monistussyklissä käytetään toisissaan kiinni olevia alukkeita ja tapahtuu jälleen 50-kertainen monistuminen, kohdesekvenssi monistuu 2500:lla, koska (pahimmillaan) on kaksi taustasekvenssiä, joista kumpikin monistuu 50:llä. Kolmen toisissa kiinni olevien alukkeiden aiheuttaman syklin jälkeen monistumistekijä kohteelle tulee olemaan 125 000 käsittäen (pahimmillaan) kolme taustasekvenssiä, jotka monistuvat 50:llä.

Tämän keksinnön menetelmän yksittäiset vaiheet ovat kaikki tavanomaisia ja voidaan suorittaa käyttäen tunnettuja reagensseja ja menetelmiä. Ainoat erityisesti määritellyt reagenssit ovat alukkeet PR-P1 ja P2'. Nämä osat voidaan kuitenkin helposti saada, joko kokonaissynteesillä tai eristämällä halutut sekvenssit luonnollisista lähteistä. Kokonaissynteesi toteutetaan helpoimmin, jos sekvenssit P2 (ja sen mukaisesti sen komplementaarisekvenssi P2') ja P1 ovat tunnettuja kohdemolekyylissä. Promoottorisekvenssit sisältävien DNA-osien kokonaissynteesi toteutetaan helposti, koska promoottorisekvenssit itsessään on julkaistu. Jos kohdemolekyylin sekvenssi ei ole tunnettu, kohdemolekyyli voidaan segmentoida restriktioendonukleaaseilla tai muilla menetelmillä ja osilla, jotka on valittu keksinnössä käytettäviksi. RNA-polymeraasi ja siihen liittyvä promoottorisekvenssi voidaan valita lukuisista saatavilla olevista komponenttilähteistä. Esimerkiksi T7 RNA-polymeraasi T7-bakteriofaagista on saatavissa New England Biolabsilta. Muita RNA-polymeraaseja ovat SP6 bakteriofaagista SP6, saatavissa New England Biolabsilta, tai K-12 E.coli-kannasta K-12, joka on saatavissa Sigma Chemical Companyltä, St. Louis, Missouri. Vastaavat promoottorit voidaan eristää organismista, josta polymeraasi saadaan, tai syntetisoida kemiallisesti, jolloin promoottorisekvenssi on tunnettu.

Muita keksinnön menetelmässä käytettyjä biokemiallisia reagensseja on entsyymi, joka pystyy pidentämään alukesekvenssejä, jolloin muodostuu kaksisäikeisiä polynukleotideja. Tällaisia entsyymejä ovat käänteiskopioijaentsyymi ja muut DNA-polymeraasit. Erityisen edullisia entsyymejä ovat AMV-käänteiskopioijaentsyymi LifeScience Inc.:lta tai polymeraasi I (Klenowin fragmentti) Bethesda Research Laboratories, Pharmacia, U.S. Biochemicals or Biolabs.

Tämän keksinnön yksittäiset vaiheet ovat helposti sovellettavissa automaatioon. Reaktiot voidaan suorittaa erillisessä säiliössä lisäämällä peräkkäin reagensseja ja muuttamalla olosuhteita tarpeen vaatiessa. Denaturointiolosuhteet käsittävät yleensä kohotetut lämpötilat, erityisesti lämpötilat välillä 95°C-100°C. Pariuttaminen ja alukkeen pidennys tapahtuvat alhaisemmissa lämpötiloissa, tyypillisesti 35°C-50°C. Koska monet proteiinit denaturoidaan yhdessä polynukleotidien kanssa korkeammissa osoitetuissa lämpötiloissa, lisäproteiineja voidaan lisätä tarvittaessa. Muita mukana olevia reagensseja voivat olla puskurit pitämään reaktio sopivassa pH-arvossa ja ioniolosuhteissa, sekä mononukleotiditrifosfaatteja (mahdollisesti leimattuna tai muunnettuna antamaan havaittava signaali) käytettäväksi pidennysreaktioissa.

Jos käytetään korkeampia lämpötiloja denaturoimaan kaksijuosteisia polynukleotideja, ei tarvitse erottaa reagensseja tai liuoksia. Muut denaturointiolosuhteet, kuten liuottimien käyttö, ovat vähemmän toivottuja lisääntyneiden erotusvaiheiden vuoksi siirryttäessä pariuttamisesta denaturointiolosuhteisiin ja takaisin pariuttamisolosuhteisiin. Monet denaturointi-, pariuttamis- ja pidennysolosuhteet ovat kuitenkin tunnettuja ja niitä voidaan käyttää haluttaessa.

Kohdesekvenssin moninkertaisia kopioita voidaan käyttää monin tavoin. Esimerkiksi voidaan keksinnön menetelmää käyttää valmistettaessa moninkertaisia kopioita geenistä insertoitavaksi plasmidiin tai muuhun kohteeseen geenien

käsittelyprosessissa. Käytettäessä diagnostiseen kokeeseen kohdesekvenssille, havaitsemisvaihe (hybridisaatio koettimella, reagoiminen vasta-aineen tai spesifisen ligandin kanssa) voidaan suorittaa eristämättä monistunutta kohdetta reaktiokasvualustasta, jos koetin, vasta-aine tai ligandikohde on sekvenssissä T, s.o. ei käsitä osaa alukkeesta tai promoottorialueista. Koetinkohde alueiden P1 ja P2 sisällä voidaan valita, mutta kohdegeenikopioiden (P1-T-P2 tai $P1^R$-T^R-$P2^R$) erotus olisi suoritettava, jotta vältettäisiin alukemolekyylien sitoutuminen tai häiritseminen. Leimattuja ribositrifosfaatteja (esim. radioaktiivisia leimoja, biotiini- tai avidiinileimoja) voidaan myös käyttää vaiheissa, joissa tuotetaan RNA:ta. Lisäkäyttöjä tällä keksinnöllä saaduille polynukleotidituotteille olisivat mutageneesi, geeniteknologia ja kloonaus, geneettinen analyysi, terapia (sekä geeni- että kemoterapia), proteiinien tuotanto (sekä in vitro-translaatio että liittäminen soluun) ja mitkä tahansa muut menetelmät, jotka käyttävät hyväksi spesifisten polynukleotidisekvenssien moninkertaisia kopioita. Esimerkiksi RNA:n säätelymolekyylejä voidaan tuottaa suuria määriä.

Keksinnön nyt tultua yleisesti kuvatuksi tulee se paremmin ymmärretyksi viittaamalla seuraaviin yksityiskohtaisiin esimerkkeihin, jotka annetaan vain selvitystarkoituksessa, eikä niiden ole tarkoitettu rajoittavan keksintöä.

ESIMERKKI

Keksinnön menetelmiä arvioitiin käyttäen kloonattua Toxoplasma gondii-geeniä, spesifisesti geeniksi B1 identifioitua 35-kertaista toistuvaa antigeenigeeniä. Kyseinen geeni saatiin yhdistelmä-DNA-kirjastosta, joka sisälsi genomi-DNA:n T. gondii-lajista (kanta RH). Kirjasto konstruoitiin ilmentymisvektorissa lambda gt11 ja seulottiin immunisoidusta kanista saaduilla vastaseerumeilla. Näin identifioidut rekombinantit subkloonattiin ja edelleen karakterisoitiin. Näissä tutkimuksissa käytetyn kohdegeenin havaittiin olevan osa

2,2 kiloemäsparin (kb) yksiköstä, joka toistuu monta kertaa peräkkäin T. gondiin genomissa. Tämän geenin identifiointi ja restriktiokartta on julkaistu (Boothroyd et al., "Antigen and Tubulin Genes of Toxoplasma Gondii", Molecular Strategies of Parasitic Invasion, Ayabian et al., eds., UCLA Symposia Vol. 42, pp. 237-250, Alan Liss, New York, 1987). Yhden täydellisen toiston nukleotidisekvenssi on määritetty (mutta ei julkaistu). Tälle työlle relevantti osa sekvenssistä on esitetty alla. Käytetty numerointijärjestelmä lähteeEcoRI-kohdasta määritellen toiston genomissa. Sekvenssi on esitetty kaksijuosteisena molekyylinä ylemmän juosteen ollessa 5'-3'-suunnassa, vasemmalta oikealle. Oligonukleotidisegmentit on alleviivattu samansuuntaisissa juosteissa ja siten samassa sekvenssissä.

721
AAAAAATGTG GGAATGAAAG AGACGCTAAT GTGTTTGCAT AGGTTGCAGT CACTGACGAG
TTTTTTACAC CCTTACTTTC TCTGCGATTA CACAAACGTA TCCAACGTCA GTGACTGCTC

OLIGO #0 OLIGO #1

781
CTCCCCTCTG CTGGCGAAAA GTGAAATTCA TGAGTATCTG TGCAACTTTG GTGTATTCGC
GAGGGGAGAC GACCGCTTTT CACTTTAAGT ACTCATAGAC ACGTTGAAAC CACATAAGCG

OLIGO #2

841
AGATTGGTCG CCTGCAATCG ATAGTTGACC ACGAACGCTT TAAAGAACAG GAGAAGAAGA
TCTAACCAGC GGACGTTAGC TATCAACTGG TGCTTGCGAA ATTTCTTGTC CTCTTCTTCT

OLIGO #3

Koska geenimonistuksen lopullinen päämäärä oli menetelmän potentiaalinen käyttö diagnostisessa kokeessa, kohdegeeni tutkittiin, jotta nähtiin, täyttikö se diagnoosiin sopivalle kohdegeenille tarpeelliset, voimassa olevat kriteeriot. Näiden mukaan kohdegeenin tulee olla läsnä parasiitin enimmissä tai kaikissa kannoissa, se ei saa olla läsnä muiden infektoivien aineiden genomeissa (erityisesti sellaisissa, jotka saattaisivat häiritä diagnoosissa), ja ne eivät saa olla havaittavissa isännän genomissa. Esitutkimukset osoittavat, että geeni on läsnä kaikissa parasiitin tutkituissa kannoissa ja että muiden tutkittujen organismien kanssa ei ole ristireaktiivisuutta, ei myöskään humaani-isännän kanssa.

Joukosta alukkeita arvioitiin niiden käyttömahdollisuus keksinnön menetelmässä. Nämä alukkeet on identifioitu alleviivaamalla edellä esitetyissä sekvensseissä. Nämä alukkeet olivat pituudeltaan 20-40 nukleotidia (mukaanlukien mahdollinen promoottorisekvenssi) osoittaen homologiaa kohdesekvenssin kanssa pariuttamisen tehostamiseksi. Kunkin alukkeen 3'-päässä oli mukana guanosiinijäännös (G) tai sytosiinijäännös (C) varmistamassa tehokkaan emäspariutumisen, josta pidentyminen voi tapahtua. Alukkeet valikoitiin korkeintaan 150 emäsparin kanssa vastakkaisille juosteille komplementaaristen alukkeiden välillä, niin että pidentyminen olisi tehokas ja nopea. Alukkeet valikoitiin edelleen niin, että niiltä puuttui kyky muodostaa stabiileita emäsparirakenteita muiden alukkeiden kanssa tai yksittäisessä alukkeessa, mikä estäisi aluketta pariutumasta kohdesekvenssiin. Vaikka monistumisvaiheille tämä ei olekaan oleellista, valittiin alukkeet reunustamaan sopivia restriktiokohtia helpottamaan kloonausta ja koettimien konstruoimista "sisäisesti" monistettuun DNA:han (s.o. koetin, joka on spesifinen monistetulle tuotteelle, mutta joka ei hybridisoidu alukkeisiin). "Sisäisesti" monistettu DNA on ekvivalenttinen osan T kanssa yleisessä selitysosassa ja patenttivaatimuksissa.

Käytetyt reaktio-olosuhteet kaksijuosteisen fragmentin saamiseksi, joka sisältää T7 RNA-polymeraasin, olivat samanlaiset kuin aikaisemmin on kuvattu (Saiki et al., Nature (1986) 324:163-166). Reaktiokasvualusta sisälsi 100 µl:n tilavuudessa 10 mM Tris pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 1,5 mM dNTP, 1,5 µM oligonukleotidialukkeita, ja vaihtelevia määriä DNA:ta sisältävää kohdetta riippuen kokeesta (0,15 pg - 1,0 µg). Jokainen sykli käsitti denaturoinnin 90°C:ssa 2 min (paitsi ensimmäinen sykli, jolloin denaturoimista suoritettiin 10 min), nopean jäähdyttämisen kuivalla jäällä 5 sekunnin ajan, linkoamisen (kondensaation eliminoimiseksi putken yläosassa), alukkeiden pariuttamisen 35°C:ssa 2 min, kahden E. coli-polymeraasi I:n Klenowin fragmentin yksikön lisäämisen, ja pidennyksen 35°C:ssa 2 min.

Keksinnön menetelmää jatkettiin edelleen lisäämällä promoottori bakteriofaagin T7 RNA-polymeraasille yhden kohteen geenille spesifisen oligonukleotidin 5'-päässä (oligo #1 edellä esitettynä). T7-promoottorisekvenssi on TAATACGACTCACTATAGGG. Nämä 20 lisänukleotidia liitettiin alkuperäisestä vaiheesta saatuihin monistettuihin kaksijuosteisiin DNA-tuotteisiin, jolloin saatiin tuotteet, jotka ovat 20 emäsparia suurempia kuin jos olisi käytetty oligonukleotideja, joista tämä sekvenssi puuttui. Esimerkiksi oligoja #1 ja #2 käyttävä monistettu DNA on 117 emäsparia, 20 emäsparia suurempi kuin 97 emäsparin kohde, joka sisältää homologian oligonukleotideille (ja samoin oligoilla #1 ja #3 tuote oli 151 emäsparia = 131 emäsparia + 20 emäsparia).

Nämä lisätyt sekvenssit toimivat tehokkaana promoottorina T7 RNA-polymeraasille. T7-transkriptioreaktiot in vitro suoritettiin T7 RNA-polymeraasin toimittajan ohjeiden mukaan. DNA-templaatti otettiin suoraan ylläkuvatuista reaktioista (jotka liittyivät promoottorialueeseen) ilman lisäkäsittelyä. Autoradiogrammi in vitro-syntyneistä T7 RNA-transkripteistä vahvisti, että ne olivat 17 nukleotidia lyhyempiä kuin DNA-templaatti. Toisin sanoen 151 emäsparin kaksijuosteinen DNA-välituote antoi 134 nt:n RNA:n, 131 nt kohdesekvensseistä ja 3 nt (GGG) T7-promoottorisekvenssistä. Liittämällä [32P]-UTP RNA-transkriptiin, saatiin noin 3000-kertainen lisäys herkkyydessä havaita monistunut tuote verrattuna etidiumbromidivärjäykseen.

Keksinnön koe oli spesifisesti suunniteltu antamaan erittäin spesifisen aktiivisuuden omaava, matalasaantoinen RNA, eikä se sen vuoksi edusta T7-transkriptiolla saatujen kohdesekvenssien maksimaalista molaarista kasvua. Tiedetään kuitenkin, että suurisaantoisissa olosuhteissa T7 RNA-polymeraasi tuottaa 50-100 RNA-molekyyliä DNA-templaatin molekyyliä kohti (Davanloo et al., "Cloning and expression of the gene for the bacteriophage T7 RNA polymerase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81:2035-2039).

Menetelmä toteutettiin käyttäen useita syklejä kuvassa esitetystä ja edellä kuvatusta T7RT-monistuksesta. Tähän toteutustapaan viitataan yksinkertaisuuden vuoksi T7RT-menetelmänä. Tällä menetelmällä on useita etuja verrattuna tekniikan tason PCR-menetelmiin. Ensinnäkin, monistettava kohdesekvenssi voi olla joko RNA tai DNA, mikä on tärkeätä, jos valittu geeni ilmentyy voimakkaasti, koska AMV-käänteiskopioijaentsyymi voi käyttää templaattina joko RNA:ta tai yksijuosteista DNA:ta. Tämä on relevanttia myös sovellutuksille, joissa kohdesekvenssit ovat yksinomaan RNA:ta, kuten retrovirusten havaitseminen. Toiseksi, jokaisesta täydestä syklistä syntyvän monistumisen, mukaanluettuna molemmat sekvenssit, tulisi olla suurempi kuin PCR-menetelmällä saadun (aina 100 sykliä kohti T7RT:lle verrattuna korkeintaan 2:een sykliä kohti PCR-menetelmällä), jolloin tarvitaan pienempi määrä syklejä (3 sykliä 10^6-kertaiseen monistumiseen T7RT:lle siihen verrattuna, että PCR:llä tarvitaan ainakin 20-25), ja vastaavasti entsyymiä tarvitaan pienempi määrä. Kolmanneksi, suuria määriä RNA:ta voidaan tuottaa käytettäväksi missä tahansa prosessissa, jossa RNA on DNA:ta parempi, kuten translaatio proteiiniin, kemiallinen labiilisuus, jne.

T7RT-menetelmän alkututkimuksissa käytettiin samoja oligonukleotideja ja kohdesekvenssejä, joita on kuvattu edellisissä kappaleissa. Kuten kuvassa on osoitettu, käytetään kuhunkin sykliin peräkkäin kahta entsyymiä: AMV-käänteiskopioijaentsyymiä ja T7 RNA-polymeraasia. Toistuvat vaiheet, denaturointi, pariuttaminen ja pidennys saadaan aikaan muuttamalla näytteen lämpötilaa (90-100°C denaturointiin, 37-41°C pariuttamiseen) ja lisäämällä entsyymiä näytteeseen, joka sisältää monistettavaa nukleiinihappoa, lisäämällä riittävästi puskuria (entsyymin toimittajien osoittama määrä), NTP:tä ja dNTP:tä, molaarinen ylimäärä oligonukleotidialukkeita, ja RNaasin inhibiittoria.

Ensimmäisessä kokeessa käytettiin geenifragmenttia, joka oli alunperin syntetisoitu sisältämään promoottorisekvenssin (kuten edellä on kuvattu), osoittamaan T7RT-menetelmän

toteutettavuutta. Ensin substraatti-DNA transkriboitiin T7 DNA-polymeraasilla, jonka odotettiin antavan 134 nt:n RNA-tuotteen. Tämä aine muutettiin sitten takaisin kaksijuosteiseksi DNA:ksi, kuten on kuvattu, ja kuvassa esitetty käyttäen AMV-käänteiskopioijaentsyymiä radioleimatun dNPT:n läsnäollessa. Odotettu (ja saatu) pää-DNA-tuote oli myös 134 nt, sisältäen pienen määrän 151 nt:n materiaalia, geenifragmenttien jatkuvan syöttämisen vuoksi. Kontrollinäyte käsiteltiin samalla tavalla paitsi että T7-polymeraasi jätettiin huomiotta. Tämän käänteiskopioijaentsyymillä suoritetun vaiheen jälkeen suoritettiin kussakin näytteessä toinen sykli, jossa suoraan monistettiin AMV RT:llä. Tämä johti siihen, että saatiin olennaisia määriä 151 nt:n tuotetta 134 nt:n tuotteen synteesillä käyttäen alukkeena oligoa #1 (jossa on ylimääräiset 17 nukleotidia T7-promoottorista 5'-päässään). Koska 134 nt:n materiaalia saatiin noin 10 kertaa enemmän (yhden T7 RT-syklin jälkeen) kuin kontrolloidun reaktion 151 nt:n tuotetta, T7-monistus vastasi sitä, joka saatiin noin 4,5 syklillä PCR-menetelmää yksinään. Tämä monistuminen saavutettiin optimoimatta T7RT-menetelmää, niin että voidaan odottaa saatavan vielä suurempia parannuksia tehokkuudessa ja kustannuksissa verrattuna PCR-menetelmään.

Kaikki julkaisut ja patenttihakemukset, jotka tässä selityksessä on mainittu, osoittavat sen alan ammattimiesten taitavuutta, johon tämä keksintö kuuluu. Kaikki julkaisut ja patenttihakemukset on liitetty tähän viitteeksi samassa määrin kuin jos jokainen yksittäinen julkaisu tai patenttihakemus olisi spesifisesti ja yksittäisesti osoitettu liitetyn viitteeksi.

Keksinnön nyt tultua täysin kuvatuksi on alan ammattimiehelle ilmeistä, että siihen voidaan tehdä monia muutoksia ja muunnoksia poikkeamatta mukaan liitettyjen vaatimusten hengestä tai alueesta.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä kohdepolynukleotidisekvenssin kopioiden lukumäärän monistamiseksi reaktiokasvualustassa, joka menetelmä käsittää sen, että:

(1) peräkkäin hybridisoidaan yksijuosteinen kohdepolynukleotidimolekyyli alukesekvensseillä, jonka jälkeen pidennetään alukkeet ja denaturoidaan, jolloin ainakin yksi alukkeista sisältää promoottorisekvenssin, kaksijuosteisen DNA-välituotteen tuottamiseksi, jossa on promoottorisekvenssi kohdesekvenssin yläpuolella, ja (2) kasvatetaan moninkertaisia kohdesekvenssin RNA-kopioita välituotteesta käyttäen RNA-polymeraasia, joka pystyy sitomaan promoottorin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, joka edelleen käsittää sen, että (1) valmistetaan toinen kokoelma kaksijuosteisia DNA-välituotteita, joilla on promoottorisekvenssi kohdesekvenssin yläpuolella, RNA-kopioista hybridisoimalla RNA-kopiot alukesekvenssien kanssa, pidentämällä ja denaturoimalla, ja (2) kasvatetaan useita RNA-kopioita toisesta kaksijuosteisten DNA-välituotteiden kokoelmasta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa pidentäminen käsittää sen, että saatetaan reaktiokasvualusta kosketuksiin käänteiskopioijaentsyymin kanssa.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa menetelmä käsittää sen, että hybridisoidaan kaksijuosteisen kohdemolekyylin anti-sense-juoste ensimmäisen alukkeen kanssa, joka käsittää promoottorisekvenssin 5'-päässään, ja sitovan sekvenssin, joka on ekvivalenttinen kohdemolekyylin sense-juosteen 5' kanssa, pidennetään ensimmäinen komplementaarinen juoste ensimmäisestä alukkeesta käyttäen anti-sense-juostetta templaattina, denaturoidaan, jolloin saadaan ensimmäinen kokoelma yksijuosteisia polynukleotidivälituotteita, hybridisoidaan ensimmäinen kokoelma toisella alukkeella, joka

sitoo 3':n kohdesekvenssiin sense-juosteessa, pidennetään komplementaarista juostetta toisesta alukkeesta käyttäen ensimmäistä komplementaarista juostetta templaattina, jolloin saadaan kaksijuosteinen DNA-välituote, ja saattamalla reaktiokasvualusta kosketuksiin RNA-polymeraasin kanssa, joka pystyy sitomaan promoottorin.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, joka käsittää sen, että:

(1) hybridisoidaan yksijuosteinen polynukleotidimolekyyli, jonka sekvenssi on X1'-P1',T'-P2'-X2' ja joka on komplementaarinen kohdemolekyylille, jonka sekvenssi on X1-P1-T-P2-X2, ensimmäisen alukkeen kanssa, jonka sekvenssi on PR-P1, jolloin muodostuu

```
PR
   \
    P1
X1'-P1'-T'-P2'-X2';
```

(2) pidennetään komplementaarinen juoste, jolloin muodostuu

```
PR
    P1--T--P2--X2
X1'-P1'-T'-P2'-X2',
```

jonka jälkeen denaturoidaan yksijuosteisten polynukleotidien ensimmäisen kokoelman muodostamiseksi;

(3) hybridisoidaan ensimmäinen yksijuosteisten polynukleotidien kokoelma toisen alukkeen kanssa, jonka sekvenssi on P2', jolloin muodostuu

```
PR-P1-T-P2-X2
      P2'  ;
```

(4) pidennetään komplementaarinen juoste, jolloin muodostuu

```
PR--P1--T--P2--X2
PR'-P1'-T'-P2'   ;
```

ja

(5) kasvatetaan monia RNA-kopioita P1-T-P2:sta, joilla on

kaava $P1^R$-T^R-$P2^R$, käyttäen RNA-polymeraasia, joka pystyy sitomaan kaksijuosteiden promoottorialueen

PR

PR'

jossa T on kohdesekvenssi;

T' on T:n kanssa komplementaarinen sekvenssi;

PR-P1 on ensimmäinen oligonukleotidialuke, jossa PR käsittää promoottorisekvenssin ja P1 on ensimmäisen alukkeen sitova sekvenssi;

P1' on P1:n kanssa komplementaarinen sekvenssi;

PR' on PR:n kanssa komplementaarinen sekvenssi;

P2' on toinen oligonukleotidialuke;

P2 on sekvenssi P2':n kanssa komplementaarisessa kohdepolynukleotidissa;

X1 ja X2 ovat sekvenssejä kohdemolekyylin sekvenssin P1-T-P2 ulkopuolella ja voivat yksittäisesti olla läsnä tai poissa;

X1' on X1:n kanssa komplementaarinen sekvenssi;

X2' on X2:n kanssa komplementaarinen sekvenssi; ja

$P1^R$-T^R-$P2^R$ on RNA-molekyyli, jossa $P1^R$ on P1:n kanssa ekvivalenttinen sekvenssi, T^R on T:n kanssa ekvivalenttinen sekvenssi ja $P2^R$ on P2:n kanssa ekvivalenttinen sekvenssi.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, jossa menetelmä edelleen käsittää vaiheet:

(6) hybridisoidaan moninkertaiset kaavan $P1^R$-TR-$P2^R$ mukaiset RNA-kopiot toisen alukkeen kanssa, jolloin muodostuu

$$P1^R\text{-}T^R\text{-}P2^R$$
$$P2';$$

(7) pidennetään komplementaarinen juoste, jolloin muodostuu

$$P1^R\text{-}T^R\text{-}P2^R$$
$$P1'\text{-}T'\text{-}P2',$$

ja denaturoidaan sen jälkeen, jolloin saadaan kolmas kokoelma yksijuosteisia polynukleotideja;

(8) hybridisoidaan kolmas kokoelma yksijuosteisia polynukleotideja ensimmäisen alukkeen kanssa, jolloin muodostuu

$$PR \diagdown P1$$
$$P1'\text{-}T'\text{-}P2';$$

(9) pidennetään komplementaariset juosteet, jolloin muodostuu

$$PR\text{--}P1\text{--}T\text{--}P2$$
$$PR'\text{-}P1'\text{-}T'\text{-}P2'$$

(10) toistetaan vaihe (5); ja

(11) valinnaisesti toistetaan vaiheet (6)-(10); jolloin kussakin vaiheessa (6)-(10) kukin PR-P1 ja P2' oligonukleotidialuke edustaa vastaavaa aluketta edeltävästä vaihesyklistä tai aluketta, joka eroaa vastaavasta alukkeesta.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, jossa yksijuosteinen kohdepolynukleotidimolekyyli on RNA.

8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, jossa yksijuosteinen kohdepolynukleotidimolekyyli on DNA.

9. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, jossa pidentäminen käsittää pidennettävien sekvenssien saattamisen kosketuksiin käänteiskopioijaentsyymin kanssa.

10. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, jossa RNA-polymeraasi on T7 RNA-polymeraasi.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa alukkeet käsittävät sitojasekvenssit, joiden pituus on 10-30 nukleotidia.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa alukkeita erottaa vähemmän kuin 200 emäsparia.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa promoottorisekvenssi sijaitsee alukkeen 5'-päässä.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa yksijuosteinen kohdepolynukleotidi on DNA, pidennys suoritetaan käyttäen käänteiskopioijaentsyymiä, ja alukkeet ovat välituotteessa korkeintaan 150 emäsparin toisistaan erottamina.

15. Menetelmä kohdepolynukleotidisekvenssin toteamiseksi näytteessä, joka menetelmä käsittää:

monistetaan kohdesekvenssin kopioiden lukumäärä patenttivaatimuksen 1 mukaisesti; ja

todetaan monistettujen kopioiden läsnäolo.

PATENTKRAV

1. En metod för ökning av antalet målpolynukleotidsekvenskopior i ett reaktionsmedium varvid metoden innefattar:

(1) sekventiellt hybridisering av en enströngad målpolynukleotidmolekyl med primersekvenser varefter nämnda primersekvenser förlängs och denatureras varvid minst en av nämnda primers innehåller en promotersekvens för att producera en dubbelströngad DNA-mellanprodukt med en promotorsekvens ovanför målsekvensen och (2) odling av multipla RNA-kopior av nämnda målsekvens av nämnda mellanprodukt med hjälp av en RNA-polymeras som kan binda nämnda promoter.

2. En metod i enlighet med patentkrav 1 som dessutom innefattar 1) framställning av en andra uppsättning dubbelströngad DNA-mellanprodukt som innehåller en promotersekvens ovanför nämnda målsekvens av nämnda RNA-kopior genom hybridisering av nämnda RNA-kopior med primersekvenser genom förlängning och denaturering, och 2) odling av ett flertal RNA-kopior fran nämnda andra uppsättning dubbelströngade DNA-mellanprodukter.

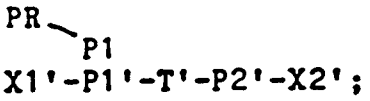
3. En metod i enlighet med patentkrav 1 i vilken förlängning innefattar att man bringar nämnda reaktionsmedium i kontakt med ett reverstranskriptasenzym.

4. En metod i enlighet med patentkrav 1 i vilken metoden innefattar hybridisering av anti-sense-strängen av en dubbelströngad malmolekyl med en första primer som innehåller en promotersekvens vid dess 5'-ända och en bindande sekvens som är ekvivalent med målmolekylens anti-sensesträng 5', förlängning av en första komplementärsträng från nämnda första primer med hjälp av nämnda anti-sense-sträng som templat, denaturerering varvid en första uppsättning enströngade polynukleotid-mellanprodukt, hybridisering av nämnda första uppsättning med en andra primer som binder 3' till nämnda målsekvens i nämnda sense-sträng, förlängning av

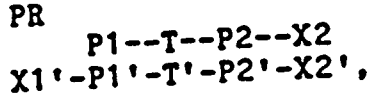
en komplementärsträng från nämnda andra primer med hjälp av nämnda första komplementärsträng som templat för att erhålla en dubbelsträngad DNA-mellanprodukt och genom att bringa nämnda reaktionsmedium i kontakt med RNA-polymeras som kan binda nämnda promotor.

5. En metod i enlighet med patentkrav 1 som innefattar:

(1) hybridisering av en ensträngad polynukleotidmolekyl vars sekvens är X1'-P1'-T'-P2'-X2'och som är komplementär i förhållande till målmolekylen vars sekvens är X1-P1-T-P2-X2 tillsammans med en första primer vars sekvens är PR-P1 varvid man erhåller:

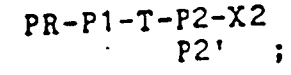


(2) förlänging av en komplementärsträng varvid man erhåller

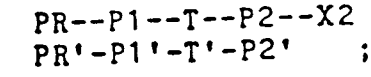


varefter man denaturerar för att erhålla en första uppsättning ensträngade polynukleotider;

(3) hybridisering av nämnda första nämnda uppsättning ensträngade polynukleotider med en andra primer vars sekvens är P2' varvid man erhåller



(4) förlängning av en komplementärsträng för att erhålla



och

(5) odling av ett flertal RNA-kopior av P1-T-P2 som innehar formeln $P1^R$-T^R-$P2^R$ med hjälp av en RNA-polymeras som kan binda en dubbelsträngad promoter-region

PR

PR';

i vilken T utgörs av en målsekvens;

T' utgörs av en sekvens som är komplementär till T;

PR-P1 utgörs av en första oligonukleotidprimer i vilken PR omfattar en promotersekvens och P1 utgörs av den bindande sekvensen av nämnda första primer;

P1' utgörs av en sekvens som är komplementär till P1;

PR' utgörs av en sekvens som är komplementär till PR;

P2' utgörs av en andra oligonukleotidprimer;

P2 utgörs av en sekvens i målpolynukleotiden som är komplementär till P2':

X1 och X2 utgörs av sekvenser utanför P1-T-P2 sekvensen av nämnda målmolekyl och kan individuellt vara närvarande eller frånvarande;

X1' utgörs av en sekvens komplementär till X1;

X2' utgörs av en sekvens komplementär till X2;och

$P1R$-T^R-$P2^R$ utgörs av en RNA-molekyl i vilken $P1^R$ utgörs av en sekvens ekvivalent med P1, T^R utgörs av en sekvens ekvivalent med T och $P2^R$ utgörs av en sekvens ekvivalent med P2.

6. En metod i enlighet med patentkrav 5 i vilken metoden

dessutom innefattar följande faser:

(6) hybridisering av nämnda multipla RNA-kopior enligt formeln $P1^R-T^R-P2^R$ med nämnda andra primer för att erhålla

$$P1^R-T^R-P2^R$$
$$P2';$$

(7) förlängning av en komplementärsträng för att erhålla

$$P1^R-T^R-P2^R$$
$$P1'-T'-P2',$$

varefter denaturering utförs för att erhålla en tredje uppsättning ensträngade polynukleotider;

(8) hybridisering av nämnda tredje uppsättning ensträngade polynukleotider med nämnda första primer för att erhålla

$$PR \diagdown P1$$
$$P1'-T'-P2';$$

(9) förlängning av komplementärsträngar föfr att erhålla

$$PR--P1--T--P2$$
$$PR'-P1'-T'-P2'$$

(10) upprepning av fas (5), och

(11) valbar upprepning av fas (6)-(10); varvid i varje fascykel (6)-(10) varje PR-P1 och P2' oligonukleotidprimer representerar motsvarande primer från en föregående fascykel eller en primer som skiljer sig från motsvarande primer.

7. En metod i enlighet med patentkrav 5 i vilken nämnda ensträngade polynukleotidmålmolekyl utgörs av RNA.

8. En metod i enlighet med patentkrav 5 i vilken nämnda ensträngade polynukleotidmålmolekyl utgörs av DNA.

9. En metod i enlighet med patentkrav 5 i vilken förlängningen innefattar att bringa de sekvenser som skall förlängas i kontakt med revers transkriptas.

10. En metod i enlighet med patentkrav 5 i vilken RNA-polymeraset utgörs av T7 RNA-polymeras.

11. En metod i enlighet med patentkrav 1 i vilken nämnda primers innefattar bindningssekvenser vars längd är 10-30 nukleotider.

12. En metod i enlighet med patentkrav 1 i vilken nämnda primers separeras av mindre än 200 baspar.

13. En metod i enlighet med patentkrav 1 i vilken promotersekvensen befinner sig i primerns 5'-ända.

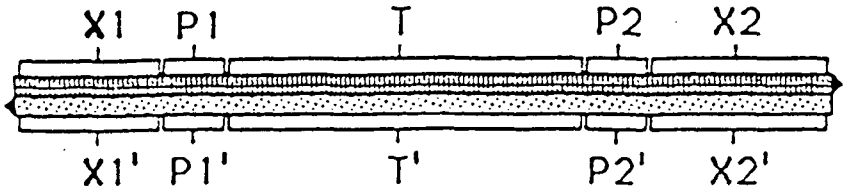
14. En metod i enlighet med patentkrav 1 i vilken en ensträngad målpolynukleotid utgörs av DNA, förlängningen utförs med hjälp av reverstranskriptas och nämnda primers är närvarande i nämnda mellanprodukt som separeras av högst 150 baspar.

15. En metod för att påvisa förekomsten av målpolynukleotidsekvenser i ett prov varvid metoden innefattar:

ökning av antalet kopior av nämnda målsekvenser enligt patentkrav 1; och

påvisande av de förökade kopiornas närvaro.

FIG. 1



Denaturointi ja pariuttaminen

T7-promoottori-sekvenssi

FIG. 2



DNA tai RNA

RT

FIG. 3



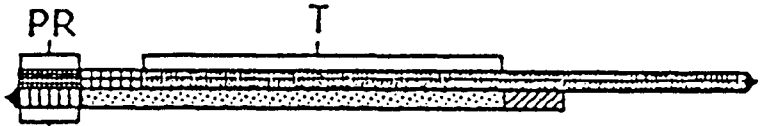
Denaturointi ja pariuttaminen

FIG. 4



RT

FIG. 5



T7

FIG. 6



RNA 10-100 kopiota per templaatti

Pariuttaminen ja RT

FIG. 7



T7

Denaturointi ja pariuttaminen

FIG. 8



RT

FIG. 9



PATENTTI-JA REKISTERIHALLITUS
PATENTTIOSASTO

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAK.NRO	LUOKKA	TUTKIJA	TUTKIMUSTUL. SAATU
89 436	C 22 B/10		

TUTKITUT LUOKAT	TUTKITUT MAAT FI SE NO DK CH DE WO EP GB US	TUTK. KESK. *)
Uutuustutkimusta ei ole sekty		

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
1)		
2)		
3)		
4)		
5)		
6)		
7)		
8)		
9)		

*) TUTKIMUS KESKEYTETTY ESTEEN LÖYTYMISEN TAKIA

KÄÄNNÄ!

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA, HAKUSANAT YM.)

HELSINKI 12.2.93

PÄIVÄYS

ALLEKIRJOITUS