

(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: **C 12 Q 1/68 C 12 N 15/10 C 12 P 19/34**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1996 00133**

(22) Indleveringsdag: **1996-02-09**

(24) Løbedag: **1986-03-26**

(41) Alm. tilgængelig: **1996-02-09**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2004-07-19**

(30) Prioritet: **1985-03-28 US 716975 1985-10-25 US 791308**

(73) Patenthaver: **F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, CH-4002 Basel, Schweiz**

(72) Opfinder: **Kary Banks Mullis, 447 Beloit Avenue, Kensington, CA 94708, USA**

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

(54) Benævnelse: **Et første og andet oligonukleotid og anvendelse deraf til eksponentiel multiplicering ved polymerase-kædereaktion af en specifik nukleinsyresekvens indeholdt i en enkelt- eller dobbeltstrengt nukleinsyre eller i en blanding af sådanne nukleinsyrer**

(57) Sammendrag:

Der beskrives sæt af nukleinsyreprimerere, som kan medvirke til eksponentiel multiplikation af ønskede specifikke nukleinsyresekvenser. Disse sekvenser er enkeltstrengede eller dobbeltstrengede og indgår i nukleinsyrer eller blandinger af nukleinsyrer. De beskrevne primere afgrænser enderne af de nukleinsyresekvenser, som ønskes multipliceret, og er i alt væsentligt komplementære til disse sekvenser. Herved muliggøres det, at forlængelsesproduktet, som syntetiseres fra den ene primer i et sæt, kan tjene som template for syntese af forlængelsesprodukt ud fra sættets anden primer, når det adskilles fra sin komplementære nukleinsyresekvens. Der beskrives endvidere reagenssystemer, der indeholder primersættene samt et multiplikationsmiddel, og der beskrives endelig anvendelse af primersættene til multiplikation af nukleinsyresekvenser i forbindelse med kloning, detektion og kemisk syntese samt i forbindelse med indførelse af in vitro mutationer.

FIG.1

Dobbeltstrenget 94 bp lang sekvens

```

TTTGC  TTCTGACACA  ACTGTGTTCA  CTAGCAACCT  →
AAACG  AAGACTGTGT  TGACACAAGT  GATCGTTGGA

```

```

                NcoI      HinfI MstII
                V        V      V
CAAACAGACA  CCATGGTGCA  CCTGACTCCT  GAGGAGAAGT  →
GTTTGTCGT  GGTACCACGT  GGACTGAGGA  CTCCTCTTCA
                ↑
                Allel basepar
                DNA-polymorfi

```

```

CTGCCGTTAC  TGCCCTGTG
GACGGCAATG  ACGGGACAC

```

Den foreliggende opfindelse angår et første og et andet enkeltstrenget oligonukleotid, der tillader eksponentiel multiplikation af eksisterende nukleinsyresekvenser og vedhæftning af en promotorsekvens ved polymerase-kædereaktion. Opfindelsen angår nærmere bestemt oligonukleotider der er anvendelige i en fremgangsmåde til at frembringe en hvilken som helst bestemt nukleinsyresekvens ud fra en given sekvens af DNA eller RNA i mængder, som er store sammenlignet med den oprindeligt tilstedeværende mængde. DNA'et og RNA'et kan være enkeltstrenget eller dobbeltstrenget og kan være forholdsvis rene former eller en komponent af en blanding af nukleinsyrer. Oligonukleotiderne udnytter en gentagen reaktion for at udføre multiplikationen af den ønskede nukleinsyresekvens og vedhæftningen af en promotorsekvens.

Navnlig til diagnostiske anvendelser kan mål-nukleinsyresekvensen bare være en lille mængde af det DNA eller RNA, som er på tale, således at det kan være vanskeligt at påvise dets tilstedeværelse under anvendelse af ikke-isotopisk mærkede eller endemærkede oligonukleotidprober. Der udfoldes store anstrengelser for at forøge følsomheden hos probedetektionssystemerne, men der er udført liden forskning vedrørende multiplikation af målsekvensen, således at den er til stede i mængder, som er tilstrækkelig til let at blive påvist under anvendelse af nuværende tilgængelige metoder.

Der er blevet beskrevet adskillige metoder i litteraturen til syntese af nukleinsyrer de novo eller ud fra en eksisterende sekvens. Med disse metoder er man i stand til at frembringe store mængder af en given nukleinsyre med en fuldstændig specificeret sekvens.

En kendt metode til syntetisering af nukleinsyrer de novo involverer organisk syntese af en nukleinsyre ud fra nukleosidderivater. Denne syntese kan udføres i opløsning eller på et fast bæremateriale. En type organisk syntese er phosphotriestermetoden, som er blevet anvendt til at fremstille genfragmenter eller korte gener. I phosphotriestermetoden fremstilles oligonukleotider, som kan knyttes sammen til dannelsen af længere nukleinsyrer. For en beskrivelse af denne metode se Narang, S.A. et al., *Meth. Enzymol.*, 68, 90 (1979) og US patent nr. 4.356.270. I patentbeskrivelsen omtales syntesen og kloningen af somatostatingenet.

En anden type organisk syntese er phosphodiestermetoden, som er blevet anvendt til at fremstille et tRNA-gen. Se Brown, E. L. et al., *Meth. Enzymol.*, 68, 109 (1979) for en beskrivelse af denne metode. Som ved phosphotriestermetoden

involverer phosphodiestermetoden syntese af oligonukleotider, som derefter knyttes sammen til dannelse af den ønskede nukleinsyre.

- Skønt de ovenfor nævnte metoder til de novo syntese kan anvendes til at syntetisere lange
- 5 strenge af nukleinsyre, er de ikke særligt praktiske at anvende til syntese af store mængder af en nukleinsyre. Begge processer er arbejdskrævende og tidsrøvende, kræver dyrt udstyr og dyre reagenser og har en lav samlet effektivitet. Den lave samlede effektivitet kan skyldes ineffektiviteten i syntesen af oligonukleotiderne og sammenføjningsreaktionerne. Ved syntesen af en lang nukleinsyre eller endog ved syntesen af en stor
- 10 mængde af en kortere nukleinsyre vil det være nødvendigt at syntetisere mange oligonukleotider, og der er behov for mange sammenføjningsreaktioner. Følgelig ville disse metoder ikke være praktiske til syntetisering af store mængder af en hvilken som helst ønsket nukleinsyre.
- 15 Der findes også metoder til fremstilling af nukleinsyrer i store mængder ud fra små mængder af den oprindeligt eksisterende nukleinsyre. Disse metoder involverer kloningen af en nukleinsyre i et hensigtsmæssigt værtssystem, hvor den ønskede nukleinsyre indsættes i en egnet vektor, som anvendes til at transformere værten. Når værten dyrkes, replikeres vektoren, og dermed frembringes flere kopier af den ønskede nukleinsyre. For en
- 20 kort beskrivelse af subkloning af nukleinsyrefragmenter se Maniatis T. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, s. 390-401 (1982). Se også de metoder, der er beskrevet i beskrivelsen til US patenterne nr. 4.416.988 og nr. 4.403.036.
- 25 En tredje metode til syntetisering af nukleinsyrer, som er beskrevet i US patent nr. 4.293.652, er en hybrid af den ovenfor beskrevne organiske syntese og molekylær kloning. Ved denne fremgangsmåde fremstilles det hensigtsmæssige antal oligonukleotider til at udgøre den ønskede nukleinsyresekvens ved organisk syntese og indsættes sekventielt i en vektor, som multipliceres ved dyrkning forud for hver efterfølgende indføjeelse.
- 30 The Pharmacia Catalog "Molecular Biologicals" (1984) beskriver "Gene Cartridges", dvs. dobbeltstrengede restriktionsfragmenter, der indeholder en trp-promotor/operator. Dette dokument beskriver imidlertid ikke anvendelsen af disse fragmenter til multiplikation af en nukleinsyresekvens, og selv hvis fragmenterne blev anvendt til multiplikation, tillader
- 35 fragmenterne ikke vedhæftning af en promotorsekvens i den ene ende af den multiplicerede nukleinsyre.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse har nogen lighed med den molekylære kloningsmetode; den involverer imidlertid ikke opformering af nogen organisme og undgår derved de mulige risici, der er forbundet hermed, eller den ulempe, som dette giver. Ved den foreliggende opfindelse kræves ej heller syntese af nukleinsyre-

5 sekvenser, som ikke er beslægtede med den ønskede sekvens, og man undgår dermed med den foreliggende opfindelse behovet for en omfattende oprensning af produktet fra en kompliceret biologisk blanding.

Den foreliggende opfindelse angår et første og et andet enkeltstrenget oligonukleotid

10 (primer), der tillader eksponentiel multiplikation ved polymerase-kædereaktion af en eller flere specifikke nukleinsyresekvenser til stede i en nukleinsyre, eller i en blanding deraf, og vedhæftning af en promotorsekvens. Forlængelsesproduktet af én primer bliver, når den hybridiseres til den anden, en template for fremstillingen af den ønskede specifikke nukleinsyresekvens og vice versa, og fremgangsmåden gentages så ofte

15 som nødvendigt for at frembringe den ønskede mængde af sekvensen. Det forventes, at denne fremgangsmåde er mere effektiv end metoder, der er beskrevet ovenfor, til fremstilling af store mængder af nukleinsyre ud fra en mål-sekvens og til at frembringe en sådan nukleinsyre i en tidsperiode, der til sammenligning er kort. Den foreliggende fremgangsmåde er navnlig nyttig til multiplikation af sjældne

20 nukleinsyrer til stede i en blanding af nukleinsyrer til effektiv påvisning af sådanne former.

I Kleppe et al., J. Mol. Biol. 56: 341 (1971), beskrives en fremgangsmåde til syntetisering af DNA under anvendelse af primer-igangsættende, template-ledende repair replikation, og

25 det foreslås at replikationscykler kan gentages ved hver gang at tilføre en frisk dosis DNA-polymerase. Der er imidlertid ingen antydning af at primer-forlængelsesprodukter skal være komplette nok til at være i stand til at danne stabile primer-template-komplekser med henblik på at fungere som templates for primere i efterfølgende runder af primerforlængelse, og at eksponentiel in vitro-multiplikation kun er mulig

30 ved at danne sådanne komplekser, som fungerer som komplette templates i efterfølgende runder.

Nærmere bestemt tilvejebringer den foreliggende opfindelse et første og et andet enkeltstrenget oligonukleotid, der tillader eksponentiel multiplikation ved polymerase-

35 kædereaktion af en specifik nukleinsyresekvens indeholdt i en enkeltstrenget eller dobbeltstrenget nukleinsyre, eller i en blanding af sådanne nukleinsyrer, hvor:

- (a) det første enkeltstrengede oligonukleotid er i det væsentlige komplementært til den enkeltstrengede nukleinsyre eller til den ene streng i den dobbeltstrengede nukleinsyre;
- 5 (b) det andet enkeltstrengede oligonukleotid er i det væsentlige komplementært til et komplement af den enkeltstrengede nukleinsyre eller til den anden streng i den dobbeltstrengede nukleinsyre;
- (c) det ene af de enkeltstrengede oligonukleotider yderligere indeholder en sekvens, som er ikke-komplementær til nukleinsyren, hvilken sekvens er en promotorsekvens; og
- 10 (d) de dele af oligonukleotiderne, der er i det væsentlige komplementære, afgrænser enderne af den specifikke nukleinsyresekvens, der skal multipliceres.

Europæisk patent nr. 200 362 beskriver fremgangsmåder til påvisning og
15 kloning af multiplicerede nukleinsyresekvenser, hvor disse sekvenser er blevet multipliceret ved at anvende fremgangsmåden i den foreliggende ansøgning, og den foreliggende ansøgning er en afdelt ansøgning af europæisk ansøgning nr. 86 30 2299.2.

20 Oligonukleotiderne i den foreliggende opfindelse kan være nyttige til ikke bare at frembringe store mængder af en eksisterende nukleinsyre med fuldstændig specificeret sekvens, men også til fremstilling af nukleinsyresekvenser, som vides at eksistere, men som ikke er fuldstændig specificerede, og til efterfølgende transkription af den multiplicerede nukleinsyre skal en begyndelseskopi af
25 sekvensen, som skal multipliceres, være tilgængelig i hvert tilfælde, omend det ikke behøver at være et rent eller et særskilt molekyle.

Fig.1 viser en 94 basepar lang sekvens af human β -globin, som ønskes multipliceret. Den enkeltbasepar-ændring, som er forbundet med seglcelleanæmi, er
30 afbildet under 94-meren.

Fig. 2 viser et autoradiogram af polyacrylamidgelelektroforese, som viser multiplikation af 94-meren indeholdt i human vildtype-DNA og i et plasmid, der indeholder et 1,9 kb langt BamHI fragment af det normale β -globingen (betegnet
35 pBR328:HbA).

Fig. 3 viser et autoradiogram af polyacrylamidgelelektroforese demonstrerende multiplikation af en hvilken som helst af den specifikke 94-mere målsekvens til

stede i pBR328:HbA, et plasmid, indeholdende, et 1,9 kb langt BamHI-fragment af seglcelleallelet af β -globin (betegnet pBR328:HbS), pBR328:HbA, hvor den sekvens, der skal multipliceres, er spaltet med MstII, og pBR328:HbS, hvor den sekvens, som skal multipliceres, er blevet behandlet med, men ikke spaltet med

5 MstII.

Fig. 4 viser i detaljer trinnene og produkterne fra polymerasekædereaktionen til multiplikation af den ønskede 94-mer sekvens af human β -globin i 3 cyklusser under anvendelse af to oligonukleotidprimere.

10

Fig. 5 viser et autoradiogram af polyacrylamidgelelektroforese, som viser multiplikation efter 4 cyklusser af en 240-mer sekvens i pBR328:HbA, hvor delprøverne er fordøjet med NcoI (bane 3), MstII (bane 4) eller Hinfl (bane 5). Bane 1 er molekylvægtsstandard, og bane 2 indeholder det intakte 240 bp lange

15 produkt.

Fig. 6 viser sekvensen af det normale (β^A) β -globingen og seglcelle (β^S) β -globingen i området med DdeI og Hinfl restriktionssteder, hvor den enkelte understregning for β^A markerer positionen af DdeI-restriktionsstedet (CTGAG), og dobbeltunderstregningen for β^A og β^S markerer positionen for Hinfl-restriktionsstedet (GACTC).

20

Fig. 7 viser resultaterne af sekventiel fordøjelse af normal β -globin under anvendelse af en 40-mer probe og DdeI-restriktionsenzymet efterfulgt af Hinfl-restriktionsenzymet.

Fig. 8 viser resultaterne af sekventiel fordøjelse af seglcelle β -globin under anvendelse af den samme 40-mer probe som i fig. 7 og DdeI-restriktionsenzymet efterfulgt af Hinfl-restriktionsenzymet.

25

Fig. 9 viser et autoradiogram af polyacrylamidgelelektroforese, som viser anvendelsen af den samme 40-mer probe som i fig. 7 til specifik at karakterisere beta-globinallelerne til stede i prøver af hel, human DNA, som er blevet udsat for multiplikation ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

30

Fig. 10 viser et fotografi af en 6% NuSieve agarosegel visualiseret ved anvendelse af ethidiumbromid og UV-lys. Dette fotografi demonstrerer multiplikationen af et sub-fragment af et 110-bp langt multiplikationsprodukt, hvilket sub-fragment er et indre indskudt sæt i det 110-bp lange fragment.

35

Udtrykket "oligonukleotid" som anvendt her under reference til primere, prober, oligomerfragmenter, som skal påvises, oligomerkontroller og umærkede blokerende oligomerer, defineres som et molekyle, der omfatter 2 eller flere deoxyribonukleotider eller ribonukleotider, fortrinsvis flere end tre. Dets nøjagtige størrelse vil afhænge af

5 mange faktorer, som igen anghænger af den endelige funktion eller anvendelse af oligonukleotidet.

Som anvendt her refererer udtrykket "primer" til et oligonukleotid, hvad enten dette forekommer naturligt som i en oprenset restriktionsfordøjelse eller er produceret

10 syntetisk, som er i stand til at fungere som et initieringspunkt for syntese, når den anbringes under betingelser, hvorved syntesen af et primerforlængelsesprodukt, som er komplementært til en nukleinsyrestræng, induceres, dvs. i tilstedeværelse af nukleotider og et induceringsmiddel, såsom DNA-polymerase, og en egnet temperatur- og pH-værdi. Primeren er fortrinsvis enkeltstrengt for at opnå maximal effektivitet ved multiplikation,

15 men kan alternativt være dobbeltstrengt. Hvis primeren er dobbeltstrengt, skal den først behandles for at separere dets strenge forud for at den anvendes til at frembringe forlængelsesprodukter. Primeren er fortrinsvis et oligodeoxyribonukleotid. Primeren må være tilstrækkelig lang til at prime syntesen af forlængelsesprodukter i nærværelse af induceringsmidlet. De nøjagtige længder af primerne vil afhænge af mange faktorer,

20 inklusiv temperatur, primerkilde og anvendelse af metoden. Til f.eks. diagnostiske formål indeholder oligonukleotidprimeren afhængig af kompleksiteten af målsekvensen typisk 15-25 eller flere nukleotider, skønt den kan indeholde færre nukleotider. For de andre anvendelser er oligonukleotidprimeren typisk kortere, f.eks. 7-15 nukleotider. Sådanne korte primermolekyler kræver almindeligvis lavere temperaturer til at danne

25 tilstrækkeligt stabile hybridkomplekser med templat.

Her udvælges primerne til at være "i alt væsentligt" komplementære til de forskellige strenge af hver specifik sekvens, som skal multipliceres. Dette betyder, at primerne skal være tilstrækkeligt komplementære til at hybridisere med deres

30 respektive strenge. Primersekvensen behøver derfor ikke at afspejle den nøjagtige sekvens af templat.

En af primerne der anvendes til multiplikation indeholder yderligere en promotorsekvens, som er ikke-komplementær til den sekvens der ønskes

35 multipliceret. Ikke-komplementære baser eller længere sekvenser være fordelt i primeren, forudsat at primersekvensen har tilstrækkelig komplementaritet med sekvensen af den streng, der skal multipliceres, til at hybridisere hermed og

derved danne en template for syntese af forlængelsesproduktet af den anden primer.

Som anvendt her refererer udtrykkene "restriktionsendonukleaser" og
5 "restriktionsenzym" til bakterieenzym, som hver skærer dobbeltstrenget DNA ved eller nær en specifik nukleotidsekvens.

Som anvendt her refererer udtrykket "DNA-polymorfi" til den tilstand, i hvilken
10 to eller flere forskellige nukleotidsekvenser kan eksistere på et bestemt sted i DNA'et.

Udtrykket "restriktionsfragmentlængdepolymerase" ("RFLP") refererer til forskellene
hos individer i længderne af restriktionsfragmenter dannet ved fordøjelse med en
bestemt restriktionsendonuklease.

15 Anvendelsen af den foreliggende opfindelse involverer enkeltstrengede oligonukleotider, der er anvendelige i en fremgangsmåde til eksponentiel multiplikation ved polymerase-kædereaktion af enhver af én eller flere ønskede specifikke nukleinsyresekvenser, som er at finde i en nukleinsyre, og til vedhæftning af en
20 promotorsekvens. Eftersom store mængder af en specifik sekvens kan fremstilles ved den foreliggende fremgangsmåde, kan den foreliggende opfindelse anvendes til at forbedre effektiviteten af kloning af DNA eller mRNA og til multiplikation af en målsekvens for at lette påvisningen af denne. Den foreliggende opfindelse er også nyttig til opnåelse af store mængder af den ønskede sekvens ud fra en
25 blanding af nukleinsyrer fremkommende ved en ikke-perfekt kemisk syntese.

Generelt kan de enkeltstrengede oligonukleotider ifølge den foreliggende opfindelse anvendes i en fremgangsmåde, som involverer en kædereaktion til i eksponentielle
mængder i forhold til antallet af de involverede reaktionstrin at frembringe i det
30 mindste én specifik nukleinsyresekvens forudsat at (a) enderne af den krævede sekvens er kendte i tilstrækkelige detaljer til, at der kan syntetiseres oligonukleotider, som vil hybridisere hertil, (b) at en lille mængde af sekvensen er tilgængelige til at initiere kædereaktionen. Produktet fra kædereaktionen vil være en særskilt nukleinsyreduplex med termini svarende til enderne af de anvendte
35 specifikke primere.

Der kan anvendes en hvilken som helst kilde af nukleinsyre, i rensat eller ikke-
rensat form, som udgangsnukleinsyren eller -syrerne, forudsat at den indeholder

eller mistænkes for at indeholde den ønskede, specifikke nukleinsyresekvens. Der kan således ved fremgangsmåden f.eks. anvendes DNA eller RNA, inklusiv mRNA, hvilket DNA eller RNA kan være enkeltstrenget- eller dobbeltstrenget. Ydermere kan der anvendes en DNA-RNA-hybrid, som indeholder en streng af

5 hver. Der kan også anvendes en blanding af hvilke som helst af disse nukleinsyrer, eller der kan også anvendes nukleinsyrer frembragt ved en tidligere multiplikationsreaktion som her beskrevet under anvendelse af den samme eller forskellige primere. Den specifikke nukleinsyresekvens, som skal

10 multipliceres, kan være blot en fraktion af et større molekyle eller kan være til stede i begyndelsen som et særskilt molekyle, således at den specifikke sekvens udgør hele nukleinsyren. Det er ikke nødvendigt, at den sekvens, der skal

15 multipliceres, er til stede initielt i en ren form; den kan være en mindre fraktion af en kompleks blanding, såsom en del af β -globingenet indeholdt i hel, human DNA, eller en del af nukleinsyresekvensen hidrørende fra en bestemt mikroorganisme,

hvilken organisme måske blot udgør en meget lille fraktion af en bestemt biologisk prøve. Udgangsnukleinsyren kan også indeholde flere end den ønskede, specifikke nukleinsyresekvens, som kan være den samme eller forskellig. De

foreliggende oligonukleotider er derfor ikke blot nyttig til frembringelse til store mængder af en specifik nukleinsyresekvens, men også til samtidig multiplikation

20 af flere end én forskellig, specifik nukleinsyresekvens lokaliseret på den samme eller forskellige nukleinsyremolekyler.

Nukleinsyren eller -syrerne kan opnås fra enhver som helst kilde, f.eks. fra plasmider såsom pBR322, fra klonet DNA eller RNA, eller fra naturlig DNA eller RNA fra enhver

25 som helst kilde, inklusiv bakterier, gær, vira eller højere organismer, såsom planter eller dyr. DNA eller RNA kan ekstraheres fra blod, vævsmateriale, såsom chorion-villi, eller fra amniumceller ved en række metoder, såsom beskrevet af Maniatis et al., Molecular Cloning, (1980), 280-281.

30 Enhver specifik nukleinsyresekvens kan frembringes med oligonukleotiderne ifølge den foreliggende opfindelse. Det er kun nødvendigt, at et tilstrækkeligt antal baser ved begge ender af sekvensen er kendt i tilstrækkelige detaljer, således at der kan fremstilles to oligonukleotider, som vil hybridisere til forskellige strenge af den ønskede sekvens og ved relative positioner langs sekvensen, således at et forlængelsesprodukt

35 syntetiseret ud fra en primer, kan, når den er separeret fra dens template (komplement), tjene som en template for forlængelse af den anden primer til en nukleinsyre med en defineret længde. Jo større kendskabet til baserne i begge ender af sekvensen er, des større kan specificiteten for primerne for målnukleinsyresekvensen være, og des større er

- effektiviteten af fremgangsmåden. Det vil forstås, at ordet "primer", som anvendt her, kan referere til mere end en primer, navnlig i det tilfælde, hvor der er nogen flertydighed vedrørende informationen med hensyn til den terminale sekvens (de terminale sekvenser) af det fragment, som skal multipliceres. F.eks. i det tilfælde, hvor en nukleinsyre-
- 5 sekvens udledes fra proteinsekvensinformation, vil en samling af primere indeholdende sekvenser, som repræsenterer alle mulige codonvariationer baseret på degenereringen af den genetiske kode blive anvendt for hver streng. En primer fra denne samling vil være 100% homolog med enden af den ønskede sekvens, som skal multipliceres.
- 10 Oligonukleotidprimerne kan fremstilles under anvendelse af en hvilken som helst egnet metode, såsom f.eks. phosphotriestermetoden eller phosphodiestermetoden beskrevet ovenfor eller automatiserede udførelsesformer heraf. I én sådan automatiseret udførelsesform anvendes diethylphosphoramiditer som udgangsmaterialer og kan syntetiseres som beskrevet af Beaucage et al., Tetrahedron Letters (1981), 22: 1859-1862. En
- 15 fremgangsmåde til syntetisering af oligonukleotider på et modificeret, fast bæremateriale omtales i US patent nr. 4.458.066. Det er også muligt at anvende en primer, som er blevet isoleret fra en biologisk kilde (såsom en restriktions-endonukleasefordøjelse).
- 20 Den specifikke nukleinsyresekvens frembringes ved at anvende den nukleinsyre, som indeholder denne sekvens, som en template. Hvis nukleinsyren indeholder to strenge, er det nødvendigt at separere strengene af nukleinsyren, før den kan anvendes som template, enten i et separat trin eller samtidigt med syntesen af primerforlængelsesprodukterne. Denne strengeseperation kan opnås ved en
- 25 hvilken som helst egnet metode, inklusiv fysiske, kemiske eller enzymatiske metoder. En fysisk fremgangsmetode til separation af strengene af nukleinsyren involverer opvarmning af nukleinsyren, indtil den er fuldstændig (>99%) denatureret. Typisk varmedenaturering kan involvere temperaturer liggende fra ca. 80 til 105°C i tidsperioder på fra ca. 1 til 10 minutter. Strengeseperation kan også
- 30 induceres af et enzym fra den klasse af enzymer, der er kendt som helicaser, eller enzymet RecA, som har helicaseaktivitet, og som i tilstedeværelse af riboATP vides at denaturere DNA. De reaktionsbetingelser, som er egnede til separation af nukleinsyrestrengene med helicaser, er beskrevet af Kuhn Haffmann-Berling, CSH-Quantitative Biology, 43: 63 (1978) og metoder til anvendelse af RecA er opsummeret i
- 35 C. Radding, Ann. Rev. Genetics, 16: 405-37 (1982).

Hvis den oprindelige nukleinsyre, der indeholder den sekvens, der skal multipliceres, er enkeltstrenget, syntetiseres dens komplement ved at tilsætte en

eller flere oligonukleotidprimerne hertil. Hvis en hensigtsmæssig enkelt-primer tilsættes, syntetiseres et primerforlængelsesprodukt i nærværelse af primeren, en inducer eller katalysator for syntesen og de nedenfor beskrevne 4 nukleotider.

Produktet vil være delvis komplementært til den enkeltstrengede nukleinsyre og vil

- 5 hybridisere med nukleinsyrestrengen til dannelse af en duplex af ulige lange strenge, som derefter kan separeres i enkeltstrenge, som beskrevet ovenfor til frembringelse af to enkelte, separerede komplementære strenge. Alternativt kan to hensigtsmæssige primere tilsættes til den enkeltstrengede nukleinsyre, og reaktionen kan udføres.

10

Hvis den oprindelige nukleinsyre udgør den sekvens, der skal multipliceres, vil det primerforlængelsesprodukt (de primerforlængelsesprodukter), som produceres, være fuldstændig komplementære til strengene af den oprindelige nukleinsyre og vil hybridisere hermed til dannelse af en duplex af strenge med lige stor længde, som

- 15 kan adskilles til enkeltstrengede molekyler.

Når de komplementære strenge af nukleinsyren eller -syernerne er separeret - er strengene hvad enten nukleinsyren oprindelig var dobbeltstrengt eller enkeltstrengt - parate til at blive anvendt som en template for syntesen af yderligere nukleinsyrestrenge. Denne

- 20 syntese kan udføres under anvendelse af en hvilken som helst egnet metode. Generelt set foregår det i en puffret vandig opløsning, fortrinsvis ved et pH på 7-9, mest fortrinsvis ca. 8. Der tilsættes fortrinsvis et molært overskud (for klonet nukleinsyre sædvanligvis ca. 1000:1 primer: template, og for genomisk nukleinsyre sædvanligvis ca. 10^6 :1 primer: template) af de to oligonukleotidprimere til pufferen indeholdende de separerede
- 25 templatestrenge. Det skal imidlertid forstås, at mængden af komplementær streng måske ikke er kendt, hvis den foreliggende fremgangsmåde anvendes til diagnostiske formål, således at mængden af primer i forhold til mængden af komplementær streng ikke kan fastlægges med sikkerhed. Som en praktisk forholdsregel vil mængden af tilsat primer imidlertid almindeligvis være i molært overskud i forhold til mængden af komplementær
- 30 streng (template), når den sekvens, der skal multipliceres, er indeholdt i en blanding af komplicerede, langkædede nukleinsyrestrenge. Der foretrækkes et stort molært overskud for at forbedre effektiviteten af fremgangsmåden.

Deoxyribonukleosidtriphosfaterne dATP, dCTP, dGTP og TTP tilsættes også til

- 35 synteseblandingen i hensigtsmæssige mængder, og den fremkomne opløsning opvarmes til ca. 90-100°C i fra ca. 1 til 10 minutter, fortrinsvis fra 1 til 4 minutter. Efter denne opvarmningsperiode får opløsningen lov at afkøle til stuetemperatur, hvilket er at foretrække af hensyn til primerhybridisering. Til den afkølede blanding tilsættes et egnet

middel til induktion eller katalysering af primerforlængelsesreaktionen (her kaldet induceringsmiddel), og reaktionen får lov til at forløbe under betingelser, som er kendte inden for fagområdet. Denne syntesereaktion kan finde sted ved fra stuetemperatur op til en temperatur, over hvilken induceringsmidlet ikke længere fungerer effektivt. Hvis DNA-polymerasen således f.eks. anvendes som induceringsmiddel, vil temperaturen almindeligvis ikke være større end ca. 40°C. Det er mest hensigtsmæssigt at reaktionen finder sted ved stuetemperatur.

Induceringsmidlet kan være en hvilken som helst forbindelse eller et hvilket som helst system, som vil fungere til udførelse af syntesen af primerforlængelsesprodukter, inklusiv enzymer. Egnede enzymer til dette formål inkluderer f.eks. E.coli DNA-polymerase I, Klenow-fragment af E.coli DNA-polymerase I, T₄-DNA-polymerase eller andre tilgængelige DNA-polymeraser, revers transkriptase og andre enzymer, inklusiv varmestabile enzymer, som vil lette kombinationen af nukleotiderne på den rette måde til dannelse af de primerforlængelsesprodukter, som er komplementære til hver nukleinsyrestræng. Syntesen vil generelt blive initieret ved 3'-enden af hver primer og forløbe i 5'-retningen langs templatestrengen, indtil syntesen stopper, under frembringelse af molekyler med forskellige længder. Der kan imidlertid være induceringsmidler, som initierer syntese ved 5'-enden, og syntesen forløber i den anden retning under anvendelse af den samme proces som beskrevet ovenfor.

Den nyligt syntetiserede streng og dens komplementære nukleinsyrestræng danner et dobbeltstrengt molekyle, som anvendes i de efterfølgende trin i fremgangsmåden. I det næste trin separeres strengene fra det dobbeltstrengede molekyle under anvendelse af en hvilken som helst af de ovenfor beskrevne metoder til frembringelse af enkeltstrengede molekyler.

Ny nukleinsyre syntetiseres på de enkeltstrengede molekyler. Yderligere induceringsmiddel, nukleotider og primere kan om nødvendigt tilsættes for at processen fortsætter under de ovenfor beskrevne betingelser. Syntesen vil igen blive initieret ved en ende af oligonukleotidprimerne og vil forløbe langs de enkelte strenge af templaten til frembringelse af yderligere nukleinsyre. Efter dette trin vil halvdelen af forlængelsesproduktet bestå af den specifikke nukleinsyresekvens afgrænset af de to primere.

Trinnene med strengeseparation og forlængelsesproduktsyntese kan gentages så ofte, som der er behov herfor til frembringelse af den ønskede mængde af den specifikke nukleinsyresekvens. Som det vil blive beskevet i yderligere detaljer nedenfor, vil mængden af den specifikke nukleinsyresekvens, der produceres, akkumulere på eksponentiel måde.

- Når det ønskes at frembringe mere end én specifik nukleinsyresekvens ud fra den første nukleinsyre eller en blanding af nukleinsyrer, anvendes det hensigtsmæssige antal af forskellige oligonukleotidprimere. Hvis der f.eks. skal fremstilles to forskellige,
- 5 specifikke nukleinsyresekvenser, anvendes 4 primere. To af primerne er specifikke for en af de specifikke nukleinsyresekvenser og de to andre primere er specifikke for den anden specifikke nukleinsyresekvens. På denne måde kan hver af de to forskellige specifikke sekvenser fremstilles eksponentielt ved den foreliggende fremgangsmåde.
- 10 Oligonukleotiderne ifølge den foreliggende opfindelse kan anvendes i en eksponentiel multiplikationsfremgangsmåde, som udføres på en trinvis måde, hvor der efter hvert trin tilsættes nye reagenser, eller hvor alle reagenser samtidig tilsættes i begyndelsestrinnet eller delvis trinvis og delvis samtidig, hvor frisk reagens tilsættes efter et givet antal trin. Hvis man til strengeseparation anvender en
- 15 metode, såsom varme, som vil inaktivere det inducerende middel, hvilket er tilfældet med varmelabilt enzym, er det nødvendigt at supplere op med det inducerende middel efter hver strengeseparationstrin. Når der til strengeseparationstrinnet anvendes enzymatiske midler, kan den samtidige metode anvendes. I den samtidige procedure kan reaktionsblandingen ud over
- 20 nukleinsyrestrengen (-strengene) indeholde den ønskede sekvens, strengeseparationsenzymet (f.eks. helicase), en egnet energikilde for strengeseparationsenzymet såsom rATP, de 4 nukleotider, oligonukleotidprimerne i molært overskud og det inducerende middel, f.eks. Klenow-fragment fra E.coli DNA polymerase I. Hvis varme anvendes til denaturering i en samtidig proces, kan et varmestabilt
- 25 induceringsmiddel, såsom en termostabil polymerase, anvendes, hvilken polymerase vil fungere ved en hævet temperatur, fortrinsvis 65-90°C afhængig af induceringsmidlet, ved hvilken temperatur nukleinsyren vil bestå af enkelte og dobbelte strenge i ligevægt. Til mindre længder af nukleinsyre kan lavere temperaturer på ca. 50°C anvendes. Den øvre temperatur vil afhænge af den
- 30 temperatur, ved hvilken enzymet vil nedbrydes eller den temperatur, ved hvilket et utilstrækkeligt niveau af primerhybridisering vil finde sted. Et sådant varmestabilt enzym beskrives i f.eks. A.S. Kaledin et al., Biokhimiya, 45, 644-651 (1980). Hvert trin i processen vil ske sekventielt på trods af, at alle reagenserne er til stede i begyndelsen. Yderligere materiale kan tilsættes efter behov. Efter at
- 35 der er gået en passende tid til frembringelse af den ønskede mængde af den specifikke nukleinsyresekvens, kan reaktionen stoppes ved at inaktivere enzymerne på kendt måde eller separere komponenterne i reaktionen.

En fremgangsmåde, der anvender oligonukleotiderne ifølge den foreliggende opfindelse, kan udføres kontinuerligt. I en udførelsesform for en automatiseret fremgangsmåde kan reaktionen foregå i cykler gennem et denatureringsområde, et reagenstilsætningsområde og et reaktionsområde. I en anden udførelsesform kan
 5 det enzym, der anvendes til syntese af primerforlængelsesprodukterne, immobiliseres på en søjle.

De andre omsætningskomponenter kan ved hjælp af en pumpe cirkuleres kontinuerligt gennem søjlen og en opvarmningsspiral i serie, således at de producerede nukleinsyrer
 10 gentagne gange kan denatureres uden at inaktivere enzymet.

En fremgangsmåde, der anvender oligonukleotiderne ifølge den foreliggende opfindelse, vises i diagram nedenfor, hvor dobbeltstrenget DNA, som indeholder den ønskede sekvens [S] bestående af komplementære strenge [S^+] og [S^-], anvendes som
 15 nukleinsyren. Under den første og hver efterfølgende reaktionscyklus vil forlængelse af hver oligonukleotidprimer på den oprindelige template producere et nyt ssDNA-molekyleprodukt med ikke-defineret længde, som terminerer med kun en af primerne. Disse produkter, der herefter vil blive omtalt som "lange produkter", vil akkumulere på linær måde; dvs. at den mængde, der er til stede efter ethvert antal cyklusser, vil være
 20 proportional med antallet af cyklusser.

De således frembragte lange produkter vil fungere som templatere for den ene eller den anden af oligonukleotidprimerne under efterfølgende cyklusser og vil frembringe molekyler med den ønskede sekvens [S^+] eller [S^-]. Disse molekyler vil også fungere som templatere for den ene
 25 eller den anden oligonukleotidprimer under frembringelse af yderligere [S^+] og [S^-], og således kan en kædereaktion gennemføres, som vil resultere i akkumuleringen af [S] med en eksponentiel hastighed i forhold til antallet af cyklusser.

Andre biprodukter frembragt ved oligonukleotidhybridiseringer end de, der ønsket, er
 30 ikke selv-katalytiske (undtagen i sjældne tilfælde) og akkumulerer således med en linær hastighed.

Den specifikke sekvens, der skal multipliceres, [S], kan afbildes i diagram som følger:

35 [S^+] 5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCC 3'
 [S] 3' TTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'

De egnede oligonukleotidprimere ville være:

5' 3'
 AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzzzzzzzz....

nylig syntetiseret langt produkt 2

- 5 Hvis disse 4 strenge får lov at rehybridisere med primere 1 og 2 i den næste cyklus, vil induceringsmidlet katalysere følgende reaktioner:

Primer 2 5' AAAAAAAAAA -----> forlænges her

- 10 3'....zzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYGGGGGGGGGG 5'
 nyligt syntetiseret langt produkt 1

forlængelse <----- GGGGGGGGGG 5' primer 1

- 15 5'....AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCC...3'
 oprindelig templatestreng⁺

Primer 2 5' AAAAAAAAAA-----> forlænges

- 20 3'...zzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYGGGGGGGGGGzzzzzzzzzzzzzz.... 5'
 oprindelig templatestreng⁻

forlængelse her <----- GGGGGGGGGG 5' primer 1

- 25 5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzzzzzzzz....3'
 nyligt syntetiseret langt produkt 2

Hvis strengene af ovennævnte fire duplexer separeres, findes følgende strenge:

- 30 5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCC 3'
 nyligt syntetiseret [S⁺]

3'zzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYGGGGGGGGGG 5'
 første-cyklus-syntetiseret langt produkt 1

- 35 3'zzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYGGGGGGGGGG 5'
 nyligt syntetiseret langt produkt 1

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzzzzzzzzzz.... 3'

- 3'....zzzzzzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTTTTYYYYYYYYGGGGGGGGGzzzzzzzzzzzzzzzz.... 5'
oprindelig templatestreng

- 5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCCzzzzzzzzzzzzzzzz.... 3'
- første-cyklus-syntetiseret langt produkt 2

- 20 Trinnene i denne fremgangsmåde kan gentages uendeligt, idet de kun er begrænset af mængden af primere 1 og 2, induceringsmiddel og tilstedeværende nukleotider. Mængden af oprindelig nukleinsyre forbliver konstant i hele processen, fordi det ikke bliver replikeret. Mængden af lange produkter forøges lineær, fordi de kun produceres ud fra den oprindelige nukleinsyre. Mængden af specifik sekvens forøges eksponentielt.
- 25 Således vil den specifikke sekvens blive den dominerende form. Dette illustreres i den efterfølgende tabel, som angiver de relative mængder af de former, der teoretisk er til stede efter n cyklusser, under antagelse af 100% effektivitet i hver cyklus.:

Antal dobbeltstreng efter 0 til n cyklusser

	<u>Cyklus antal</u>	<u>Template</u>	<u>Lange produkter</u>	<u>Specifik sekvens [S]</u>
5	0	1	-	-
	1	1	1	0
	2	1	2	1
	3	1	3	4
	5	1	5	26
10	10	1	10	1013
	15	1	15	32.752
	20	1	20	1.048.555
	n	1	n	$(2^n - n - 1)$

- 15 Hvis der anvendes en enkeltstrengt nukleinsyre som template dannes der kun 1 langt produkt pr. cyklus.

- Oligonukleotiderne (primere) i den foreliggende opfindelse kan anvendes til at klonе en speciel nukleinsyresekvens til indsættelse i en egnet ekspressionsvektor. Vektoren kan derefter
 20 anvendes til at transformere en egnet værtsorganisme, således at den producerer genproduktet af sekvensen ved standardmetoder inden for rekombinant DNA teknologi.

- Ydermere kan oligonukleotiderne anvendes til in vitro mutagenisering.
 Oligodeoxyribonukleotidprimerne behøver ikke at være nøjagtig komplementære til den
 25 DNA-sekvens, som skal multipliceres. Det er kun nødvendigt, at den er i stand til at hybridisere til sekvensen på tilstrækkelig måde til at blive forlænget af polymeraseenzymet eller hvilket andet induceringsmiddel, der nu anvendes. Produktet fra en polymerasekædereaktion, hvor de primere, der anvendes, ikke er nøjagtig komplementære til den oprindelige template, vil indeholde sekvensen af
 30 primeren snarere end af templatēn, hvorved der indføres en in vitro mutation. I yderligere cyklusser vil denne mutation blive multipliceret med en uformindsket effektivitet, fordi der ikke kræves yderligere fejlparrede primerer. Den således frembragte mutant kan derefter indsættes i en egnet vektor ved hjælp af molekylærbiologiske standardmetoder og kan give mutantegenskaber på denne
 35 vektor, således som potentialet til frembringelse af et ændret protein.

Fremgangsmåden til fremstilling af en ændret DNA-sekvens, som ovenfor beskrevet, kan gentages på det ændrede DNA under anvendelse af forskellige primere, således

at der induceres yderligere sekvensændringer. På denne måde kan der gradvis frembringes en serie af muterede sekvenser, hvor hver tilføjelse i serierne kun vil adskille sig fra den sidste i mindre grad, men fra den oprindelige DNA-kildesekvens i stigende grad. På denne måde kan man i sidste ende foretage ændringer, som ikke var hensigtsmæssige i et enkelt trin, på grund af, at en meget alvorlig fejlparrende primer ikke kan fungere.

Ydermere kan en af oligonukleotiderne i den foreliggende opfindelse, som en del af dens sekvens indeholde en ikke-komplementær sekvens, forudsat at tilstrækkelige mængder af primeren indeholder en sekvens, som er komplementær til den streng, der skal multipliceres.

Efter at forlængelsesprimeren er tilsat foretages tilstrækkeligt mange cyklusser til at opnå den ønskede mængde af den nye template, som indeholder den ikke-komplementære nukleotidindføjelse. Dette tillader produktionen af store mængder af kombinerede fragmenter på forholdsvis kort tid (f.eks. 2 timer eller mindre) under anvendelse af en simpel teknik.

De heri beskrevne oligonukleotider kan også anvendes til at gøre det muligt at påvise og/eller karakterisere specifikke nukleinsyresekvenser forbundet med infektiøse sygdomme, genetiske sygdomme eller cellulære sygdomme, såsom cancer. Multiplikation er nyttig, når mængden af nukleinsyre, som er tilgængelig for analyse, er meget lille, såsom f.eks. ved prænatal diagnose af seglcelleanæmi under anvendelse af DNA opnået fra føtale celler. Multiplikation er navnlig nyttig, hvis en sådan analyse skal foretages på en lille prøve under anvendelse af ikke-radioaktive detekteringsmetoder, som kan være iboende ufølsomme, eller hvor radioaktive metoder anvendes, men hvor hurtig påvisning er ønskelig.

I relation til den foreliggende opfindelse kan genetiske sygdomme inkludere specifikke deletioner og/eller mutationer i det genomiske DNA fra en hvilken som helst organisme, såsom f.eks. en person, der lider af seglcelleanæmi, cystisk fibrose, α -thalassæmi, β -thalassæmi og lignende. Seglcelleanæmi kan let påvises ved hjælp af oligomerrestriktionsanalyse eller en RFLP-lignende analyse efterfulgt af multiplikation af den hensigtsmæssige DNA-sekvens ved hjælp af den foreliggende fremgangsmåde. α -Thalassæmi kan påvises ved fraværet af en sekvens, og β -thalassæmi kan påvises ved tilstedeværelsen af et polymorft restriktionssted tæt knyttet til en mutation, som fremkalder sygdommen.

Alle disse genetiske sygdomme kan påvises ved multiplikation af den hensigtsmæssige sekvens og analyse af den ved hjælp af Southern blot teknik uden brug af radioaktive prober. Ved en sådan fremgangsmåde multipliceres f.eks. en lille prøve af DNA fra f.eks. amnionvæske indeholdende et meget lavt niveau af den ønskede sekvens, skæres med et restriktionsenzym og analyseres ved hjælp af en Southern blotting teknik. Anvendelsen af ikke-radioaktive prober gøres lettere ved hjælp af det høje niveau af det multiplicerede signal.

I en anden udførelsesform kan en lille prøve af DNA multipliceres til et egnet niveau, og derefter kan der udføres en yderligere cyklus af forlængelsesreaktioner, hvor nukleotidderivater, som let kan påvises (såsom ^{32}P -mærket eller biotinmærket nukleosidtriphosphat) inkorporeres direkte i det endelige DNA-produkt, som kan analyseres ved restriktionsanalyse og elektroforetisk separation eller ved en hvilken som helst anden egnet metode. Et eksempel på denne teknik i et modelsystem vises på figur 5.

I en yderligere udførelsesform, vist i et modelsystem på figur 3, kan nukleinsyren udsættes for en bestemt restriktionsendonuklease for multipliceringen. Eftersom en sekvens, der er blevet skåret, ikke kan multipliceres, betyder tilstedeværelsen af et multipliceret fragment, på trods af forudgående restriktion af DNA-prøven, fravær af et genkendelsessted for endonukleasen i den multiplicerede sekvens. Tilstedeværelsen eller fraværet af en multipliceret sekvens kan påvises med en egnet metode.

En praktisk anvendelse af denne teknik kan illustreres ved dens anvendelse til at gøre det lettere at påvise seglcelleanæmi ved hjælp af oligomerrestriktionsteknik beskrevet herefter og af R.Saiki et al., *Bio/Technology* 3:1008-1012 (1985).

Seglcelleanæmi er en hæmoglobinsygdom, som skyldes et enkelt baseparskift i den 6. codon af β -globingenet. Figur 6 viser sekvenserne af normale β -globingener og seglcelle- β -globingener i området for deres polymorfi, hvor en enkelt understregning markerer lokaliseringen af et DdeI genkendelsessted, som kun er til stede i det normale gen, og hvor dobbeltunderstregningen markerer lokaliseringen af et HinfI-genkendelsessted, som ikke er polymorfisk og således er til stede i både det normale allel og seglcelleallelet. Figur 7 viser oligomerrestriktionsprocessen af normal β -globin DNA under anvendelse af en probe; der spænder over begge restriktionssteder, og mærket, hvor der er angivet en stjerne. DNA'et, der er multipliceret som tilvejebragt heri, denatureres og anneales til den mærkede probe. Enzymet DdeI spalter DNA'et ved det gendannede

- DdeI-genkendelsessted, og skaber en mærket octamer. Under de anvendte betingelser i prøven er octameren kort nok til at dissociere fra duplexen. En efterfølgende tilsætning af enzymet Hinfl har ingen virkning på den nu enkeltstrengede octamer. Figur 8 viser den samme proces anvendt overfor
- 5 seglcelleallelet af β -globin DNA. Enzymet DdeI kan ikke spalte den duplex, der er dannet af det multiplicerede DNA og den markede probe, på grund af en A-A baseparfejlparring. Enzymet Hinfl spalter imidlertid hybridene, og der produceres en mærket trimer. I praksis kan metoden diagnosticere DNA'et hos et individ som enten er homozygotisk for vildtypen, homozygotisk for seglcelletypen eller hetero-
- 10 zygotisk bærer af seglcelleanlægget, eftersom et specifikt signal er forbundet med tilstedeværelsen af begge alleler. Anvendelse af den ovenfor beskrevne metode til at multiplicere den relevante sekvens tillader hurtig analyse af et gen i enkelt kopi under anvendelse af en probe med blot et enkelt ^{32}P -mærkning.
- 15 Forskellige infektiøse sygdomme kan diagnosticeres ved at der i kliniske prøver findes specifikke DNA-sekvenser, som er karakteristiske for den sygdomsfremkaldende mikroorganisme. Disse inkluderer bakterier, såsom Salmonella, Chlamydia, Neisseria, vira, såsom hepatitisvira, og protozooparasitter, såsom Plasmodium, der forårsager malaria. I beskrivelsen til US patent nr. 4.358.535 udstedt til Falkow omtales
- 20 anvendelsen af specifikke DNA-hybridiseringsprober til diagnosticering af infektiøse sygdomme. Et iboende problem i Falkowproceduren er, at der kan være et forholdsvis lille antal pathogene organismer til stede i en klinisk prøve fra en inficeret patient, og DNA'et, der ekstraheres fra disse, kan udgøre blot en kun meget lille fraktion af det totale DNA i prøven. Specifik multiplicering af
- 25 mistænkte sekvenser forud for immobiliserings- og hybridiseringspåvisning af DNA-prøverne ville i høj grad forbedre disse procedurers følsomhed og specificitet.
- Rutinemæssige, kliniske anvendelser af DNA-prober til diagnosticering af infektiøse sygdomme ville blive betragteligt simplificeret, hvis der kunne anvendes ikke-
- 30 radioaktivt mærkede prober som beskrevet i EP 63.879 til Ward. I denne fremgangsmåde påvises biotinholdige DNA-prober ved hjælp af chromogene enzymer bundet til avidin eller biotinspecifikke antistoffer. Denne påvisningstype er bekvem, men forholdsvis ufølsom. Kombinationen af specifik DNA-multiplikation ved hjælp af den foreliggende fremgangsmåde og anvendelsen af stabilt mærkede
- 35 prober tilvejebringer den bekvemme og følsomme metode, som er påkrævet for at gøre Falkow- og Wardprocedurerne nyttige i et rutinemæssigt klinisk opsæt.

Oligonukleotiderne ifølge den foreliggende opfindelse kan også anvendes til at frembringe tilstrækkelige mængder af DNA fra et humant enkeltkopigen, således at påvisning med en simpel, ikke-specifik DNA-farve, såsom ethidiumbromid, kan anvendes til frembringelse af en direkte DNA-diagnose.

5

Ud over til påvisning af infektiøse sygdomme og patologiske abnormaliteter i organismernes genom kan oligonukleotiderne ifølge opfindelsen også anvendes til at påvise DNA-polymorfi, som måske ikke er forbundet med en patologisk tilstand.

- 10 De efterfølgende eksempler angives til illustration og har ikke til hensigt at begrænse opfindelsen på nogen måde. I disse eksempler er alle procenter angivet i vægtprocenter for faste stoffer og i volumenprocenter for væsker, og alle temperaturer er i grader Celcius med mindre andet angives.

15

Eksempel 1

En 25-basepar lang sekvens med nukletidsekvensen

- 20 5'CCTGGGCACCGTCACCCTGGATGCT 3'
 3'GGAGGGGTGGCAGTGGGACCTACGA 5'

- indeholdt i et 47 basepar langt FokI-restriktionsfragment af pBR322, som var opnået fra ATCC, blev fremstillet som følger. En FokI-fordøjelse af pBR322 indeholdende det 47 bp lange fragment blev fremstillet ved at fordøje pBR322 med FokI i overensstemmelse med de betingelser, der foreslås af leverandøren, New England Biolabs Inc. De anvendte primere var 5' d(CCTCGGCACCG) 3' og 5' d(AGC-ATCCAGGGTG) 3', og de blev fremstillet ved at anvende traditionelle metoder. Følgende bestanddele blev tilsat til 33 µl puffer, som var sammensat af 25 mM kaliumphosphat, 10 mM magnesiumchlorid og 100 mM natriumchlorid ved pH 7,5: 2433 pmol af hver af de ovenfor beskrevne primere, 2,4 pmol af det FokI-fordøjede pBR322, 12 nmol dATP, 22 nmol dCTP, 19 nmol dGTP og 10 nmol TTP.

- 35 Blandingen blev opvarmet til 85°C i 5 minutter og fik lov at afkøle til omgivelsestemperatur. Der blev tilsat 5 enheder Klenow fragment fra E.coli DNA polymerase I, og temperaturen blev holdt i 15 minutter. Efter denne tid blev blandingen igen opvarmet til 85°C i 5 minutter og fik lov til at afkøle. Der blev igen tilsat 5 enheder Klenow-fragment, og reaktionen fik lov at forløbe i 15

minutter. Trinnene med opvarmning, afkøling og syntese blev gentaget endnu 11 gange.

Efter den sidste gentagelse blev en 5 µl delprøve udtaget fra reaktions-
5 blandingen. Denne blev opvarmet til 85°C i 3 minutter og fik lov at afkøle til
omgivelsestemperatur. 12,5 pmol α-P³²-deoxycytidintriphosphat og 5 enheder
Klenow-fragment blev tilsat, og reaktionen fik lov at forløbe i 15 minutter. De
mærkede produkter blev undersøgt ved polyacrylamidgelelektroforese. Eokl-
fordøjelsen blev mærket på lignende måde og tjente som en kontrol og molekyl-
10 vægtmarkører. Det eneste stærkt mærkede bånd, der var synligt efter de 13 cyklusser,
var den tilsigtede 25-basepar lange sekvens.

Eksempel 2

15 Den ønskede sekvens, der skulle multipliceres, var en 94 basepar lang sekvens
indeholdt i det humane β-globingen og strækkende sig over MstII-stedet, der er
involveret i seglcelleanæmi. Sekvensen har den på figur 1 viste nukleotidsekvens.

20 I. Syntese af primere

Følgende to oligodeoxyribonukleotidprimere blev fremstillet ved den nedenfor
beskrevne metode:

25 5' CACAGGGCAGTAACG 3' Primer A

og

5' TTTGCTTCTGACACA 3' Primer B

Automatiseret synteseprocedure: Diethyl phosphoramiditer, der er syntetiseret
30 ifølge Beaucage og Caruthers (Tetrahedron Letters (1981) 22:1859-1862) blev
sekventielt kondenseret til et nukleosidderivatiseret glasbæremateriale med styret
porestørrelse under anvendelse af en Biosearch SAM-1. Proceduren inkluderede
detritylering med trichloreddikesyre i dichlormethan, kondensation under anven-
delse af benzotriazol som aktiverende protondonor og afdækning (eng: capping)
35 med eddikesyreanhydrid og dimethylaminopyridin i tetrahydrofuran og pyridin.
Cyklustid var ca. 30 minutter. Udbytte ved hvert trin var stort set kvantitativt
og blev bestemt ved opsamling og spektroskopisk undersøgelse af den
dimethoxytritylalkohol, der blev frigjort under detrityleringen.

Fjernelse af oligodeoxyribonukleotidbeskyttelse og oprensningsprocedure: Det faste bæremateriale blev fjernet fra søjlen og udsat for 1 ml koncentreret ammoniumhydroxid ved stuetemperatur i 4 timer i et lukket glas. Bærematerialet blev derefter
5 fjernet ved filtrering, og opløsningen, der indeholdt det delvis beskyttede oligodeoxynukleotid, blev opvarmet til 55°C i 5 timer. Ammoniak blev fjernet, og resten blev påsat en præparativ polyacrylamidgel. Der blev udført elektroforese ved 30 volt/cm i 90 minutter, hvorefter båndet, der indeholdt produktet, blev
10 identificeret ved UV-skygning af en fluorescensplade. Båndet blev udskåret og elueret med 1 ml destilleret vand natten over ved 4°C. Denne opløsning blev påsat en Altech RP18 søjle og elueret med en 7-13% gradient af acetonitril i 1% ammoniumacetatpuffer ved pH 6,0. Elueringen blev målt ved UV-absorption ved 260 nm, og den hensigtsmæssige fraktion blev opsamlet, kvantificeret ved UV-absorbans i et fastlagt volumen og inddampet til tørhed ved stuetemperatur i en
15 vakuumcentrifuge.

Karakterisering af oligodeoxyribonukleotider: Testprøver af de oprensede oligonukleotider blev ³²P-mærket med polynukleotidkinase og γ -³²P-ATP. De mærkede forbindelser blev undersøgt ved autoradiografi af 14-20% polyacrylamidgeler efter
20 elektroforese i 45 minutter ved 50 volt/cm. Denne procedure verificerede molekylvægten. Basesammensætningen blev bestemt ved fordøjelse af oligodeoxyribonukleotidet til nukleosider under anvendelse af gift-diesterase og bakteriel, alkalisk phosphatase og efterfølgende separation og kvantificering af de afledte nukleosider under anvendelse af en HPLC-søjle med omvendt fase og en mobil fase af
25 10% acetonitril, 1% ammoniumacetat.

II. DNA-kilde.

A. Ekstraktion af hel, human vildtype-DNA

30 Human, genomisk DNA, der er homozygotisk for normal β -globin, blev ekstraheret fra cellelinien Molt4 (opnået fra Human Genetic Mutant Cell Repository og identificeret som GM2219c) under anvendelse af teknikken beskrevet af Stetler et al., Proc.Natl.Acad.Sci. (1982), 79:5966-5970.

35 B. Konstruktion af klonede globingener

Et 1,9 kb langt BamHI-fragment af det normale P-globingen isoleredes fra cosmidet pFC11 og indsattes i BamHI-restriktionsstedet af pBR328 (Soberon et al., Gene (1980) 9:287-305). Dette fragment, som omfatter det område, som hybridiserer til den

syntetiske 40-mer probe, inkluderer den første og den anden exon, den første intron og de 5'-flankerende sekvenser af genet (Lawn et al., Cell (1978), 15:1157-1174). Denne klon betegnedes pBR328:HbA og blev deponeret under ATCC nr. 39.698 25.maj 1984.

5

Det tilsvarende 1,9 kb lange BamHI-fragment af seglcelleallelet af β -globin isoleredes fra cosmidet pFC12 og klonedes som ovenfor beskrevet. Denne klon blev betegnet pBR328:HbS og deponeredes under ATCC nr. 39.699 25. maj, 1984.

10

Hver rekombinantplasmid blev transformeret ind i og opformeret i E.coli MM294 (ATCC nr. 39.607).

C. Fordøjelse af klonede globingener med MstII

15 Ialt 100 μ g af hver af pBR328:HbA og pBR328:HbS blev individuelt fordøjet med 20 enheder MstII (New England Biolabs) i 16 timer ved 37°C i 200 μ l 150 mM NaCl, 12 mM Tris HCl (pH 7,5), 12 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT) og 100 μ g/ml bovinserumalbumin (BSA). Produkterne blev betegnet pBR328:HbA/MstII henholdsvis pBR328: HbS/MstII.

20

III. Polymerasekædereaktion

Til 100 μ l buffer bestående af 60 mM natriumacetat, 30 mM Trisacetat og 10 mM magnesiumacetat ved pH 8,0 tilsættes 2 μ l af en opløsning indeholdende 100 picomol
25 Primer A (med sekvensen d(CACAGGGCACTAACG)), 100 picomol af Primer B (med sekvensen d(TTGCTTCTGACACA)) og 1000 picomol af hver af dATP, dCTP, dGTP og TTP. Desuden tilsættes en af følgende ovenfor beskrevne DNA-kilder:

- 30 10 μ g hel, human, vildtype DNA (reaktion I)
0,1 picomol pBR328:HbA (reaktion II).
0,1 picomol pB R328: HbS (reaktion III).
0,1 picomol pBR328:HbA/MstII (reaktion IV).
0,1 picomol pBR328:HbS/MstII (reaktion V).
Intet mål-DNA (reaktion VI)

35

Hver af de fremkomne opløsninger blev opvarmet til 100°C i 4 minutter og fik lov at afkøle til stuetemperatur i 2 minutter, hvorefter 1 μ l indeholdende 4 enheder Klenow-fragment af E.coli DNA polymerase tilsættes. Hver reaktion fik lov at

forløbe i 10 minutter, hvorefter cyklussen med tilsætning af primere, nukleotider og DNA, opvarmning, afkøling, tilsætning af polymerase og omsætning blev gentaget 19 gange for reaktion I og 4 gange for reaktionerne II-VI.

- 5 4 mikroliter delprøver af reaktionerne I og II, der var fjernet før den første cyklus og efter den sidste cyklus af hver reaktion, blev påsat en 12% polyacrylamidgel 0,089 M i Tris-borat-buffer ved pH 8,3 og 2,5 mM i EDTA. Gelen blev elektroforesebehandlet ved 25 volt/cm i 4 timer, blev overført til en nylonmembran, der tjente som fast-fase-bæremateriale og probebehandlet med et
- 10 syntetisk 5'-³²P-mærket 40 bp langt fragment, der var fremstillet ved standardteknik, med sekvensen:

5'd(TCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAG)3'

- 15 i 30% formamid, 3 x SSPE, 5 x Denhardt's, 5% natriumdodecylsulfat ved pH 7,4. Figur 2 er et autoradiogram af den probebehandlede nylonmembran for reaktionerne I og II. Bane 1 er 0,1 picomol af en 58 bp lang syntetisk fragmentkontrol, hvor 1 streng er komplementær til den ovennævnte probe. Bane 2 er 4 µl reaktion I forud for den første multiplikationscyklus. Bane 3 er 4 µl reaktion I efter den 20.
- 20 multiplikationscyklus. Bane 4 er 4 µl reaktion II efter fem multiplikationscyklusser. Bane 5 er en molekylvægtstandard, der består af en FokI (New England Biolabs) fordøjelse af pBR322 (New England Biolabs) mærket med α-³²P-dNTP'er og polymerase. Bane 3 viser, at efter 20 cyklusser indeholdt reaktionsblanding I en stor mængde af den specifikke sekvens med den rigtige molekylvægt og ingen andre påviselige
- 25 produkter. Reaktionsblanding II indeholdt efter 5 cyklusser også dette produkt, såvel som udgangsnukleinsyren og andre produkter, som vist ved bane 4.

- Til 5,0 µl delprøve af reaktionerne II-VI tilsattes efter den 4. cyklus 5 pmol af hver af de ovenfor beskrevne primere. Opløsningerne blev opvarmet til 100°C i 4 minutter og fik
- 30 lov at ækvilibrere til stuetemperatur. Der tilsattes 3 pmol af hver af α-³²P-dATP, α-³²P-dCTP, α-³²P-dGTP, α-³²P-dTTP og 4 enheder Klenow-fragment. Reaktionen fik i et slutvolumen på 10 µl og ved de ovenfor angivne saltkoncentrationer lov at forløbe i 10 minutter. Polymeraseaktiviteten blev afsluttet ved opvarmning i 20 minutter ved 60° C. 4 µl delprøver af reaktionerne II-VI blev ladet på en 12% polyacrylamidgel 0,089 M i Tris-
- 35 borat-buffer ved pH 8,3 og 2,5 mM i EDTA. Gelen blev elektroforesebehandlet ved 25 volt/cm i 4 timer, hvorefter autoradiografi blev udført.

Figur 3 er et autoradiogram af elektroforesen. Bane 1 er en molekylvægtstandard, bane 2 er reaktion II, bane 3 er reaktion III, bane 4 er reaktion IV og bane 5 er reaktion V. En anden bane for reaktion VI som kontrol og uden tilsat DNA havde ingen markeringer i nogen af banerne. Det kan ses ud fra tegningen, at det 94 bp lange fragment, som var forudsagt ud fra mål-DNA, kun var til stede, hvor intakt β -globin-DNA-sekvenser var tilgængelige for multiplicering, dvs. pBR328:HbA (bane 2), pBR328:HbS (bane 3) og pBR328:HbS/MstII (bane 5). MstII-fordøjelse skærer pBR328:HbA i den 94-mere sekvens, og gør den derved ude af stand til at blive multipliceret, og det 94-mere bånd viser sig ikke i bane 4. I modsætning hertil udskæres den 94-mere sekvens i pBR328:HbS ikke, når plasmidet fordøjes med MstII, og er således tilgængelig for multiplikation som vist i bane 5.

Figur 4 viser kædereaktionen for 3 cyklusser ved multiplicering af den 94 bp lange sekvens. PC01 og PC02 er primere A og B. Tallene på højre side indikerer cyklusserne, hvorimod tallene på venstre side indikerer cyklustallene, i hvilke et specielt molekyle blev frembragt.

Eksempel 3

Dette eksempel viser multiplikationen af en 110 bp lang sekvens, der spænder over det allele MstII-genkendelsessted i det humane hæmoglobingen.

Ialt 1,0 mikrogram hel, human DNA, 100 picomol d(ACACAACTGTGTTCACTAGC) og 100 picomol d(CAACTTCATCCACGTTACC), hvor primerne var blevet fremstillet ved metoden ifølge eksempel 2, blev opløst i 100 μ l af en opløsning, som bestod af:

1,5 mM af hver af de fire deoxyribonukleosidtriphosfater
30 mM Trisacetatbuffer ved pH 7,9
60 mM natriumacetat
10 mM magnesiumacetat
0,25 mM dithiothreitol.

Opløsningen opvarmedes til 100°C i 1 minut og bragtes hurtigt til 25°C i 1 minut, hvorefter der tilsattes 2,5 enheder Klenow-fragment af DNA-polymerase. Polymerasereaktionen fik lov at forløbe i 2 minutter ved 25°C, hvorefter cyklussen med opvarmning, afkøling, tilsætning af Klenow-fragment og omsætning blev gentaget så ofte som ønsket.

Med en effektivitet på 70% ved hver cyklus resulterede 15 cyklusser i syntese af 1,4 femtomol af det ønskede 110 bp fragment af β -globingenet.

Eksempel 4

5

Dette eksempel viser multiplikationen af en 240 bp lang sekvens, der spænder over det allele MstII-genkendelsessted i det humane hæmoglobingen. Denne sekvens indeholder NcoI, HinfI og MstII restriktionsstederne.

- 10 Til 100 μ l af en blanding af 60 mM natriumacetat, 30 mM Tris-acetat og 10 mM magnesiumacetat ved pH 8,0 indeholdende 0,1 pmol pBR328:HbA tilsættes 2 μ l opløsning A, der indeholdt:

100 picomol d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) primer.

- 15 100 picomol d(TAACCTTGATACCAACCTGCCC) primer

1000 pmol af hver af dATP, dCTP, dGTP og TTP.

- De to primere blev fremstillet ved metoden beskrevet i eksempel 2. Opløsningen blev opvarmet til 100°C i 4 minutter og fik lov at afkøle i omgivelsesluft i 2 minutter, hvorefter der tilsættes 1 μ l indeholdende fire enheder Klenow fragment af E.coli DNA polymerase. Reaktionen fik lov at forløbe i 10 minutter, hvorefter cyklussen bestående af tilsætning af opløsning A, opvarmning, afkøling, tilsætning af polymerase og reaktion blev gentaget 3 gange. Til en delprøve på 5,0 μ l af reaktionerne tilsættes 5 picomol af hver af ovennævnte oligonukleotidprimere.
- 25 Opløsningen blev opvarmet til 100°C i 4 minutter og fik lov at indstille sig til omgivelsestemperatur, hvorefter 3 picomol af hver af de α -³²P-mærkede deoxyribonukleosidtriphosphater og 4 enheder Klenow-fragment tilsættes. Reaktionen fik i en slutvolumen på 10 μ l og ved de ovenfor givne saltkoncentrationer lov at forløbe i 10 minutter. Polymeraseaktiviteten blev afsluttet ved opvarmning i 20
- 30 minutter ved 60°C. 2 μ l delprøver blev fordøjet med NcoI, MstI eller HinfI og sat på en 12% polyacrylamidgel 0,089 M i Tris-borat-buffer ved pH 8,3 og 2,5 mM i EDTA. Gelen blev elektroforesebehandlet ved 25 volt/cm i 4 timer, og autoradiografi blev udført. Figur 5 viser autoradiogrammet af elektroforesen, hvor bane 1 er den molekylvægtstandard, bane 2 er uden fordøjelse med enzym (240
- 35 bp intakt), bane 3 er fordøjelse med NcoI (131 og 109 bp), bane 4 er fordøjelse med MstII (149 og 91 bp), og bane 5 er fordøjelse med HinfI (144 og 96 bp). Autoradiogrammet er i overensstemmelse med multiplikationen af den 240 bp lange sekvens.

Eksempel 5

Dette eksempel viser anvendelsen af fremgangsmåden beskrevet heri til påvisning af seglcelleanæmi ved sekventiel fordøjelse.

5

Syntese og phosphorylering af oligodeoxyribonukleotider

En mærket DNA-probe, RS06, med sekvensen

10 5'*CTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGG 3'

hvor * indicerer mærkningen, og en umærket, blokerende oligomer, RS10, med sekvensen:

15 3'GACAGAGGTCACCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCC 5'

som har 3 basepar fejlparrede med RS06, blev syntetiseret ifølge fremgangsmåderne, som angivet i eksempel 2(I). Proben RS06 blev mærket ved at kontakte 5 pmol heraf med 4 enheder T4 polynukleotidkinase (New England Biolabs) og 50 pmol γ -³²P-ATP (New England Nuclear, ca. 7200 Ci/mmol) i et 40 μ l reaktionsvolumen indeholdende 70 mM Tris-buffer (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 1,5 mM spermin og 2,5 mM dithiothreitol i 90 minutter ved 37°C. Det totale volumen blev derefter indstillet til 100 μ l med 25 mM EDTA og oprenset ifølge fremgangsmåden af Maniatis et al., Molecular Cloning (1982), 464-465 over en 1 ml Bio Gel P-4 spindialysesøjlefra BioRad ækvilibreret med Tris-EDTA (TE) puffer (10 mM Tris-puffer, 0,1 mM EDTA, pH 8,0). Den mærkede probe blev yderligere oprenset ved elektroforese på en 18% polyacrylamidgel (19:1 acrylamid:BIS, BioRad) i Tris-borsyre-EDTA (TBE) puffer (89 mM Tris, 89 mM borsyre, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) i 500 vhr. Efter lokalisering ved autoradiografi blev den del af gelen, der indeholdt den mærkede probe, udskåret, knust og elueret i 0,2 ml TE-puffer natten over ved 4°C. TCA-præcipitation af reaktionsproduktet indicerer, at den specifikke aktivitet var 4,9 Ci/mmol, og slutkoncentrationen var 20 pmol/ml.

Den umærkede RS10 blokerende oligomer blev anvendt ved en koncentration på 200 pmol/ml.

35

Isolering af human, genomisk DNA fra cellelinier

Genomisk DNA med høj molekylvægt blev isoleret fra lymfoidcellelinierne Molt4, SC-1 og GM2064 under anvendelse af i alt væsentligt den metode, der beskrives af
5 Stetler et al. i PNAS (1982) 79, 5966-5970 (for Molt4) og Maniatis et al. i Molecular Cloning (1982), 280-281.

Molt4 (Human Mutant Cell Repository, GM2219C) er en T-cellelinie, der er homozygot for normal β -globin, og SC-1, deponeret hos ATCC 19. marts 1985, er en
10 EBV-transformeret B-cellelinie, der er homozygot for seglcelleallelet. GM2064 (Human Mutant Cell Repository, GM2064) blev oprindeligt isoleret fra et individ, der er homozygot med arvelig persistens af føtalhæmoglobin (HPFH) og indeholder ingen beta- eller deltaglobinsekvenser. Alle cellelinier blev opretholdt i RPMI-1640 med 10% føtal kalveserum.

15

Isolering af human, genomisk DNA fra kliniske blodprøver

En klinisk blodprøve, betegnet CH12, fra en kendt seglcellebærer (AS) blev opnået fra Dr. Bertram Lubin fra Children's Hospital i Oakland, Californien.
20 Genomisk DNA blev fremstillet ud fra "buffy-coat"-fraktionen, som primært består af perifer blodlymfocytter, under anvendelse af en modifikation af den fremgangsmåde, der beskrives af Nunberg et al. i Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 5553-5556 (1978).

25 Cellerne blev resuspenderet i 5 ml Tris-EDTA-NaCl (TEN) puffer (10 mM Tris puffer pH 8, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl) og indstillet til 0,2 mg/ml proteinase K, 0,5% SDS, og inkuberet natten over ved 37°C. Natriumperchlorat blev derefter tilsat til 0,7 M, og lysatet blev forsigtigt rystet i 1-2 timer ved stuetemperatur. Lysatet blev ekstraheret med 30 ml phenol/chloraform (1:1), derefter med 30 ml chloraform
30 og efterfulgt af ethanol præcipitering af nukleinsyrerne. Pelleten blev resuspenderet i 2 ml TE-puffer, og RNase A blev tilsat til 0,005 mg/ml. Efter fordøjelse i 1 time ved 37°C blev DNA'et ekstraheret en gang med et lige volumen af phenol, phenol/chloraform og chloraform og blev ethanol præcipiteret. DNA'et blev resuspenderet i 0,5 ml TE-puffer, og koncentrationen blev bestemt ved absorbtion ved 260 nm.

35

Polymerasekædereaktion til selektiv multiplicering af β -globinsekvenser

To mikrogram genomisk DNA blev multipliceret i et initielt 100 µl reaktionsvolumen indeholdende 10 mM Tris-puffer (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 150 pmol Primer A med sekvensen d(CACAGGGCACTAACG) og 150 pmol af Primer B med sekvensen d(CTTTGCTTCTGACACA) og blev dækket med ca. 100 µl mineralolie for at for-

5 hindre fordampning.

Hver DNA-prøve undergik 15 multiplikationscyklusser, hvor en cyklus bestod af 3 trin:

- 10 1) denaturering i et varmebloksæt ved 95°C i 2 minutter,
- 2) umiddelbar overføring til et varmebloksæt ved 30°C i 2 minutter for at tillade primere og genomisk DNA at anneale,
- 3) tilsætning af 2 µl af en opløsning indeholdende 5 enheder Klenow-
- 15 fragment af *E.coli* DNA-polymerase I (New England Biolabs), 1 nmol af hver af dATP, dCTP, dGTP og TTP i en puffer, der er sammensat af 10 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ og 4 mM dithiothreitol. Denne forlængelsesreaktion fik lov at forløbe i 10 minutter ved 30°C.

Efter slutcyklussen blev reaktionen afsluttet ved opvarmning ved 95°C i 2

20 minutter. Mineralolien blev ekstraheret med 0,2 ml chloraform og bortkastet. Slutreaktionsvolumenet var 130 µl.

Hybridisering/fordøjelse af multipliceret, genomisk DNA med prober og Ddel/Hinfl

- 25 45 µl af det multiplicerede, genomiske DNA blev ethanol præcipiteret og resuspenderet i samme volumen TE-puffer. 10 µl (indeholdende den præ-
- 30 multiplicerede ækvivalent til 154 ng genomisk DNA) blev overført til et 1,5 ml Micrafuge-glas og 20 µl TE-puffer til et slutvolumen på 30 µl. Prøven blev dækket med mineralolie og denatureret ved 95°C i 10 minutter. 10 µl 0,6 M NaCl
- 35 indeholdende 0,02 pmol mærket R306-probe blev tilsat til glasset, der blev blandet let, og glasset blev straks overført til en 56°C varm varmeblok i 1 time. Der blev tilsat 4 µl umærket RS10-blokerende oligomer (0,8 pmol), og hybridiseringen fortsattes, i yderligere 10 minutter ved samme temperatur. Der tilsattes 5 µl 60 mM MgCl₂/0,1% BSA og 1 µl *Ddel* (10 enheder, New England Biolabs), og det reannealede DNA blev fordøjet i 30 minutter ved 56°C. Derefter tilsattes 1 µl *Hinfl* (10 enheder, New England Biolabs), og blandingen inkuberedes i yderligere 30 minutter. Reaktionen blev stoppet ved at tilsætte 4 µl 75 mM EDTA og 6 µl sporfarve til et slutvolumen på 61 µl.

Mineralolien blev ekstraheret med 0,2 ml chloroform og 18 µl af reaktions-
blandingen (45 ng genomisk DNA) blev sat på en 30% polyacrylamid-minigel
(19:1, Bio Rad) i et Hoeffer SE200 apparat. Gelen blev elektroforesebehandlet
5 ved ca. 300 volt i. 1 time, indtil bromphenolblå-farvefronten havde vandret 3,0 cm
fra påsætningsstedet. De øverste 1,5 cm af gelen fjernedes, og den resterende
gel blev eksponeret i 4 dage med en følsomhedsforstærkende skærm ved -70°C .

Diskussion af autoradiografi (fig.9)

10

Hver bane indeholder 45 ng multipliceret, genomisk DNA. Bane A indeholder
Molt4 DNA.; bane B, CH12; bane C, SC-1 og bane D, GM2064. Molt4
repræsenterer genotypen af et normalt individ med 2 kopier af β^A -genet pr. celle (AA),
CH12 er en klinisk prøve fra en seglcellebærer med et β^A - og et β^S -gen pr. celle (AS),
15 og SC1 repræsenterer genotypen for et seglcelleindivid med to kopier af β^S -genet
pr. celle (SS). GM2064, som ikke indeholder beta- eller deltaglobinsekvenser,
er til stede som en negativ kontrol.

20

Som det ses på autoradiogrammet er den DdeI-spaltede, β^A -specifikke octamer kun til
stede i de DNA'er, der indeholder β^A -genet (baner A og B) og den HinfI-spaltede, β^S -
specifikke trimer er kun til stede i de DNA'er, der indeholder β^S -genet (banerne B og
C). Tilstedeværelsen af både trimer og octamer (bane B) er diagnostisk for en
seglcellebærer og kan skelnes fra et normalt individ (bane A) med octameren
alene og fra et seglcelleplaget individ (bane C) med trimer alene.

25

Gentagelsen af det ovenfor beskrevne forsøg under anvendelse af ikke-multipliceret,
genomisk DNA viste til sammenligning, at multiplikationen forøgede
påvisningsfølsomheden mindst 1000 gange.

30

Eksempel 6

Dette eksempel illustrerer direkte påvisning af et fuldstændigt uoprenset,
enkeltgenkopi i hel, human DNA på geler uden behov for en mærket probe.

35

Under anvendelse af den i eksempel 3 beskrevne metode blev et 110 bp langt
fragment fra en sekvens i det første exonområde af betaglobingenet
multipliceret ud fra 10 mikrogram hel, human DNA efter 20 cyklusser: Dette 110

bp fragment, der var frembragt efter 20 cyklusser, kunne let ses på geler, der var farvet med ethidiumbromid.

Sekvensen multipliceredes ikke, når det først var skåret med restriktionsenzymet

- 5 DdeI, undtagen hvis sekvensen, som i betaglobin-S-alleles, ikke indeholdt restriktionsstedet som enzymet genkender.

Eksempel 7

- 10 A. Ialt 100 fmol pBR328, der indeholdt et 1,9 kb langt indsat stykke fra det humane beta-globin A allel, 50 nmol af hver af α - ^{32}P -dNTP ved 500 Ci/mol og 1 nmol af hver af primerne, der anvendtes i eksempel 3, blev opløst i en opløsning indeholdende 100 μl 30 mM Tris-acetat ved pH 7,9, 60 mM natriumacetat, 100 mM dithiothreitol og 10 mM magnesiumacetat. Opløsningen bragtes til 100°C i 2 minutter og afkøledes til 25°C i 1
- 15 minut. Ialt 1 μl indeholdende 4,5 enheder Klenow-fragment af E.coli- DNA polymerase I og 0,09 enheder uorganisk pyrophosphatase tilsattes for at forhindre den mulige ophobning af pyrophosphat i reaktionsblandingen, og reaktionen fik lov at forløbe i 2 minutter ved 25°C, hvorefter cyklussen med opvarmning, afkøling, enzymtilsætning og reaktion blev gentaget 9 gange. 10 μl delprøver udtoges og
- 20 tilsattes til 1 μl 600 mM EDTA efter hver syntesecyklus. Hver blev analyseret på en 14% polyacrylamidgel i 90 mM Tris-borat og 2,5 mM EDTA ved pH 8,3 og 24 volt/cm i 2,5 timer. Den færdige gel blev opblødet i 20 minutter i den samme puffer med tilsætning af 0,5 pg/ml ethidiumbromid, vasket med det oprindelige puffer og fotograferet i UV-lys under anvendelse af et rødt filter.

25

Det fremstillede 110bp lange fragment blev udsåret fra gelen under ultraviolet lys, og det inkorporerede ^{32}P målttes ved Cerenkovbestråling. Et forsøg på at indpasse resultaterne i ligningen med formen: $\text{pmol}/10 \mu\text{l} = 0,01 [(1+y)^N - yN - 1]$, hvor N angiver antallet af cyklusser og y er fraktionsudbyttet pr. cyklus, var optimal med $y = 0,619$. Dette

30 indicerer, at en signifikant multiplicering opnåedes.

- B. Det ovenfor angivne forsøg gentoges med undtagelse af, at 100 nmol af hver dNTP tilsattes til en 100 μl reaktion, ingen radioaktiv mærkning blev anvendt og delprøver blev ikke fjernet efter hver cyklus. Efter 10 cyklusser afsluttedes reaktionen ved
- 35 kogning i 2 minutter, og rehybridiseringen blev udført ved 57°C i 1 time. Sekvensen af det 110 bp lange produkt blev bekræftet ved at udsætte 8 μl delprøver for restriktionsanalyse ved tilsætning af 1 μl bovinserumalbumin (25 mg/ml) og 1 μl af det

passende restriktionsenzym (Hinfl, MnII, MstII, NcoI) og ved omsætning ved 37°C i 15 timer. PAGE blev udført som ovenfor beskrevet.

Eksempel 8

5

Dette eksempel illustrerer anvendelsen af forskellige primere til multiplicering af forskellige fragmenter af pBR328 og 322.

10 A. Det i eksempel 7A beskrevne forsøg blev gentaget med undtagelse af, at der anvendtes følgende primere: d(TTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC) og d(GCCTCACCACCAACTTCATCCACGTTCACC) til fremstilling af et 130 bp langt fragment af pBR328.

15 B. Det i eksempel 7A beskrevne forsøg blev gentaget med undtagelse af, at der anvendtes følgende primere: d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) og d(TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG) til fremstilling af et 262 bp langt fragment af pBR328. Omsætningstiden var 20 minutter pr. cyklus.

20 C. Det i eksempel 8B beskrevne forsøg blev gentaget med undtagelse af, at 100 fmol af en MstII-fordøjelse af pBR328 indeholdende en 1,9 kb lang indføjelser fra det humane beta-globin 5 allel blev anvendt som initial template. Dette plasmid blev spaltet flere gange med MstII, men ikke inden i sekvensen, der skulle multipliceres. Desuden var de anvendte primere følgende:

25 d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) og
d(TAACCTTGATACCAACCTGCCC)

til dannelse af et 240 bp langt fragment.

30 D. Det i eksempel 7B beskrevne forsøg blev gentaget med undtagelse af, at 100 fmol af en NruI-fordøjelse af pBR328 blev anvendt som template, 200 nmol af hver dNTP blev anvendt i 100 µl reaktion og primerne var:

35 d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) og
d(CTTCCCCATCGGTGATGTCG)

til dannelsen af et 500 bp langt fragment fra pBR328. Omsætningstider var 20 minutter pr. cyklus ved 37°C. Slut-rehybridisering var 15 timer ved 57°C. Elektroforese skete på en 4% agarosegel.

5 Eksempel 9

Dette eksempel illustrerer fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvorved der introduceres en in vitro mutation i det multiplicerende segment.

- 10 A. Ialt 100 fmol pBR322 lineariseret med NruI, 1 nmol af hver af primerne:

d(CGCATTAAAGCTTATCGATG) og
d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT)

- 15 udformet til frembringelse af et 75 bp langt fragment, 100 nmol af hver dNTP i 100 µl 40 mM Tris ved pH 8, 20 mM i MgCl₂, 5 mM i dithiothreitol og 5 mg/ml bovinserumalbumin blev kombineret. Blandingen blev bragt til 100°C i 1 minut, afkølet i 0,5 minutter i et vandbad ved 23°C, hvorefter der tilsattes 4,5 enheder Klenow-fragment og 0,09 enheder uorganisk pyrophosphatase og reaktionen fik lov at forløbe i 3 minutter. Cyklussen med
20 opvarmning, afkøling, tilsætning af enzymer og omsætning blev gentaget 9 gange. Den 10. omsætningscyklus blev stoppet ved nedfrysning og en 8 µl delprøve af reaktionsblandingen blev sat på en 4% agarosegel visualiseret med ethidiumbromid.

- 25 B. Det i eksempel 9A beskrevne forsøg blev gentaget med undtagelse af, at de anvendte oligonukleotidprimere var:

d(CGCATTAAAGCTTATCGATG) og
d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCACGAGGCCCT).

- 30 Disse primere er udformet til at producere et 101 bp langt fragment, hvoraf 26 nukleotider (i den primer, der er angivet som nummer to), ikke er til stede i pBR322. Disse nukleotider repræsenterer sekvensen i T7-promotoren, som blev tilføjet til den 75 bp lange sekvens fra pBR322 ved at anvende primeren med 20 komplementære baser og en 26 base lang 5'-forlængelse. Proceduren krævede mindre end 2 timer, og der frembragtes 2 picomol
35 relativt rent 101 bp lange fragment fra 100 fmol pBR322.

T7-promotoren kan anvendes til at initiere RNA-transkription. T7-polymerase kan tilsættes til det 101 bp lange fragment til frembringelse af enkeltstrenget RNA.

C. Det i eksempel 8D beskrevne forsøg blev gentaget med undtagelse af, at de anvendte oligonukleotidprimere var som følger:

5 d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) og
 d(CCAGCAAGACGTAGCCCAGC)

til frembringelse af et 1000 bp langt fragment fra pBR322.

10 D. Det i eksempel 9C beskrevne forsøg blev gentaget med undtagelse af, at de anvendte oligonukleotidprimere var som følger:

 d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) og
 d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCACGAGGCCCT)

15

for således at frembringe et 1026 bp langt fragment, hvoraf 26 nukleotider (i den primer, der er angivet som nummer to) ikke er til stede i pBR322 og repræsenterer den ovenfor beskrevne T7-promotor. Promotoren er blevet indføjet naboliggende til et 1000 bp langt fragment fra pBR322.

20

Resultaterne indikerer, at en primer, som ikke er en perfekt parring til templatesekvensen, men som ikke desto mindre er i stand til at hybridisere tilstrækkeligt til at blive enzymatisk forlænget, producerer et langt produkt, som snarere indeholder sekvensen af primeren end den tilsvarende sekvens af den oprindelige template. Det lange produkt tjener som template

25 for den anden primer til introducering af en in vitro mutation. Denne mutation multipliceres i yderligere cyklusser med en uformindsket effektivitet, fordi ingen yderligere fejlparrede priminger kræves. I dette tilfælde blev en primer, som bærer en ikke-komplementær forlængelse på dets 5'-ende anvendt til indføjelse af en ny sekvens i produktet, der er naboliggende til templatesekvensen, der kopieres.

30

E. Fordi reaktionen med polymerase udvikler pyrophosphat og er teoretisk reversibel (Kornberg, A., DNA Replication, W.H. Freeman, San Francisco, 1980) blev effekten af at tilsætte en uorganisk pyrophosphatase for at undgå potentiel pyrophosphorolyse af produktet undersøgt. Kvalitativ polyacrylamidgelelektroforeseundersøgelse af reaktioner
35 plus og minus pyrophosphatase viste en mindre, men signifikant forøgelse i produktets homogenitet som et resultat af at tilsætte dette enzym.

Eksempel 10

Dette eksempel illustrerer anvendelsen af indskudte sæt af primere for at nedsætte baggrunden i multiplikationen af enkeltkopigener.

- 5 Hel, human DNA, som er homozygotisk for vildtype β -globinallelet, blev udsat for 20 multiplikationscyklusser på følgende måde: Ialt 10 μ g DNA, 200 pmol af hver af primerne:

d(ACACAACCTGTGTTCACTAGC) og
d(CAACTTCATCCACGTTTACC)

10

og 100 nmol af hver dNTP i 100 μ l af 30 mM Tris-acetat pH 7,9, 60 mM natriumacetat, 10 mM dithiothreitol og 10 mM magnesiumacetat blev opvarmet til 100°C i 1 minut, afkølet til 25°C i 1 minut og behandlet med 2 enheder Klenow-fragment i 2 minutter. Cyklussen med opvarmning, afkøling og tilsætning af Klenow-fragment blev gentaget 19 gange. En delprøve

- 15 på 10 μ l blev fjernet fra reaktionsblandingen og udsat for yderligere 10 multiplikationscyklusser under anvendelse af hver af primerne:

d(CAGACACCATGGTGACCTGACTCCTG) og
d(CCCCACAGGGCAGTA ACGGCAGACTTCTCC),

20

som multiplicerer et 58 bp langt fragment indeholdt i det ovenfor fremstillede 100 bp lange fragment. Disse sidste 10 multiplikationscyklusser blev udført ved at fortynde 10 μ l delprøven i 90 μ l frisk Tris-acetatpuffer beskrevet ovenfor indeholdende 100 nmol af hver dNTP og 200 pmol af hver primer. Reaktionsbetingelserne var som ovenfor

- 25 anført. Efter 10 cyklusser blev en 10 μ l delprøve (svarende til 100 ng af det oprindelige DNA) påsat en 6% NuSieve (FMC Corp.) agarosegel og blev visualiseret under anvendelse af ethidiumbromid.

Figur 10 illustrerer denne gel belyst med UV-lys og fotograferet gennem et rødt filter,

- 30 hvilket er kendt inden for fagområdet. Bane 1 er molekylvægtsmærkører. Bane 2 er en delprøve af den ovenfor beskrevne reaktionsblanding. Bane 3 er en delprøve identisk med den ovenfor beskrevne med undtagelse af, at det oprindelige vildtype-DNA blev spaltet med DdeI forud for multiplikationen. Bane 4 er en delprøve af en reaktion identisk med den ovenfor beskrevne med undtagelse af, at human DNA, som er homozygot for
- 35 seglcellebetaglobinallelet blev behandlet med DdeI forud for multiplikation (seglcelleallelet indeholder ikke et DdeI-restriktionssted i det fragment, som multipliceres her). Bane 5 er en delprøve af en reaktion identisk med den ovenfor beskrevne med undtagelse af, at laksesperm-DNA blev anvendt i stedet for human DNA. Bane 6 er en delprøve af en reaktion identisk med den ovenfor beskrevne med undtagelse af, at delprøven blev behandlet med DdeI

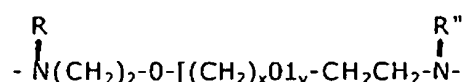
efter multiplikation (DdeI skulle omdanne det 58 bp lange vildtypeprodukt til 27 og 31 bp lange fragmenter). Bane 7 er en delprøve af materialet fra bane 4 behandlet med DdeI efter multiplikation (det 58 bp lange seglcelleprodukt indeholder intet DdeI-genkendelsessted).

- 5 Påvisning af et 58 bp langt fragment, som er repræsentativt for et enkeltkopigen fra 1 mikrogram human DNA under anvendelse af udelukkende ethidiumbromidfarvning af en agarosegel kræver en multiplikation på ca. 500.000 gange. Dette blev opnået ved at anvende de to indskudte sæt af oligonukleotidprimere, som er beskrevet her. Det første sæt multiplicerer det 110
10 bp lange fragment, og det i det indre indskudte sæt multiplicerer et subfragment af dette produkt op til et niveau, som er hensigtsmæssigt til påvisning, som vist på figur 10. Denne fremgangsmåde med at anvende primere, som multiplicerer en lille sekvens indeholdt i den sekvens, som er multipliceret i den tidligere multiplikationsproces, og som er indeholdt i forlængelsesprodukter af de andre
15 primere, gør det muligt at skelne mellem vildtypen og seglcelleallelet ved β -globinlocusset uden at ty til hverken radioisotopiske eller andre besværlige metoder, såsom beskrevet af Conner et al., PNAS (USA), 80:278 (1983) og Leary et al., PNAS (USA), 80:4045 (1983).

20 Eksempel 11

- Det forventes, at den foreliggende fremgangsmåde er nyttig til i en patient DNA-prøve at påvise en specifik sekvens associeret med en infektiøs sygdom, såsom f.eks. Chlamydia, under anvendelse af en biotinyleret hybridiseringsprobe, som
25 spænder over den ønskede, multiplicerede sekvens og under anvendelse af den i beskrivelsen til US patent nr. 4.358.535, se ovenfor, beskrevne fremgangsmåde. Den biotinylerede hybridiseringsprobe kan fremstilles ved interkellering og bestråling af et delvis dobbeltstrenget DNA med en 4'-methylensubstitueret 4,5'-8-trimethylpsoralen knyttet til biotin via en afstandsarm med formlen:

30



- hvor R betegner -H eller en -CHO-gruppe, R'' betegner -H, x er et tal på fra 1 til
35 4, og y er et tal på fra 2 til 4, som beskrevet i EP 156.287. Påvisning af biotinyllgrupper på proben kan opnås ved at anvende et streptavidin - sur fosfatase - kompleks, som kan opnås kommercielt fra Enzo Biochemical under anvendelse af de påvisningsmetoder, som foreslås af leverandøren i dennes brochure. Den hybridiserede prøve ses som en plet af udfældet farve på grund af bindingen på påvisningskomplekset

og den efterfølgende reaktion katalyseret af sur phosphatase, hvilket frembringer en udfældelig farve.

Cellelinien SC-1 (CTCC nr. 0082) blev deponeret 19. marts 1985 hos American Type
5 Culture Collection (ATCC) 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 USA med
ATCC deponeringsnummer CRL nr. 8756.

Opsummerende angår den foreliggende opfindelse oligonukleotider (primere) der
tillader eksponentiel multiplikation ved polymerase-kædereaktion af en eller flere
10 specifikke nukleinsyresekvenser og vedhæftning af en promotorsekvens, hvorved
primerforlængelsesprodukter frembringes, som efterfølgende kan fungere som
templater for yderligere primerforlængelsesreaktioner. Oligonukleotiderne er især
anvendelig til påvisning af nukleinsyresekvenser, som i begyndelsen kun er til stede i
meget små mængder.

PATENTKRAV

1. Et første og et andet enkeltstrengt oligonukleotid, der tillader eksponentiel
multiplikation ved polymerase-kædereaktion af en specifik nukleinsyresekvens indeholdt i
5 en enkeltstrengt eller dobbeltstrengt nukleinsyre, eller i en blanding af sådanne nuklein-
syrer,
k e n d e t e g n e t ved, at

- (a) det første enkeltstrengede oligonukleotid er i det væsentlige komplementært til
10 den enkeltstrengede nukleinsyre eller til den ene streng i den dobbeltstrengede
nukleinsyre;
- (b) det andet enkeltstrengede oligonukleotid er i det væsentlige komplementært til
et komplement af den enkeltstrengede nukleinsyre eller til den anden streng i
den dobbeltstrengede nukleinsyre;
- 15 (c) det ene af de enkeltstrengede oligonukleotider yderligere indeholder en
sekvens, som er ikke-komplementær til nukleinsyren, hvilken sekvens er en
promotorsekvens; og
- (d) de dele af oligonukleotiderne, der er i det væsentlige komplementære,
afgrænser enderne af den specifikke nukleinsyresekvens, der skal
20 multipliceres.

2. Oligonukleotider ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at promotoren er T7-promotoren.

25 3. Oligonukleotider ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at den specifikke nukleinsyresekvens er indeholdt i en større
sekvens.

4. Oligonukleotider ifølge et hvilket som helst af krav 1-3,
30 k e n d e t e g n e t ved, at nukleinsyren er DNA eller RNA, herunder mRNA, hvilket DNA
eller RNA er enkelt- eller dobbeltstrengt eller er en DNA-RNA-hybrid.

5. Oligonukleotider ifølge et hvilket som helst af krav 1-4,
k e n d e t e g n e t ved, at nukleinsyren er genomisk DNA.
35

6. Oligonukleotider ifølge et hvilket som helst af krav 1-5,
k e n d e t e g n e t ved, at de dele af oligonukleotiderne, der er i det væsentlige
komplementære, indeholder fra mindst ca. 7 til 25 nukleotider.

7. Anvendelse af oligonukleotiderne ifølge et hvilket som helst af krav 1-6 til eksponentiel multiplicering ved polymerase-kædereaktion af en specifik nukleinsyresekvens indeholdt i en enkelt- eller dobbeltstrengt nukleinsyre eller i en blanding af sådanne nukleinsyrer.
- 5 8. Anvendelse ifølge krav 7 til at muliggøre multiplikation, detektering og/eller karakterisering af specifikke nukleinsyresekvenser, der er associeret med infektiøse sygdomme, såsom de der forårsages af bakterier, vira og protozoparasitter; genetiske lidelser, såsom de der forårsages af specifikke deletioner og/eller mutationer i genomisk DNA; eller cellulære lidelser, såsom cancer.
- 10
9. Anvendelse ifølge krav 7 til at muliggøre RNA-transkription.

FIG.1

Dobbeltstrenget 94 bp lang sekvens

```
TTTGC  TTC TGACACA  ACTGTGTTCA  CTAGCAACCT  →
AAACG  AAGACTGTGT  TGACACAAGT  GATCGTTGGA

          NcoI      HinfI MstII
           V        V      V
CAAACAGACA  CCATGGTGCA  CCTGACTCCT  GAGGAGAAGT  →
GTTTGTCGT  GGTACCACGT  GGACTGAGGA  CTCCTCTTCA
                ↑
            Allel basepar
            DNA-polymorfi

CTGCCGTTAC  TGCCCTGTG
GACGGCAATG  ACGGGACAC
```

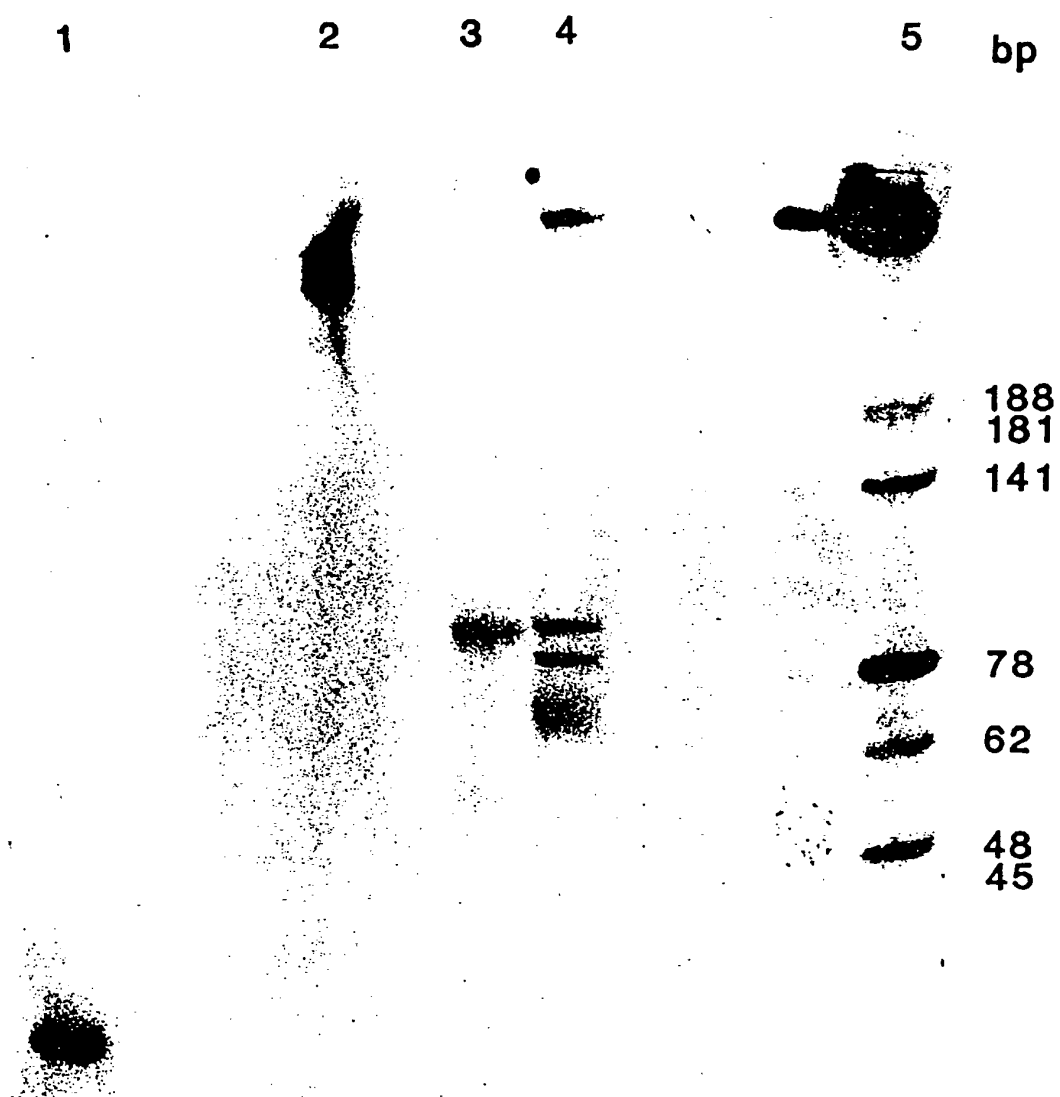


FIG.2

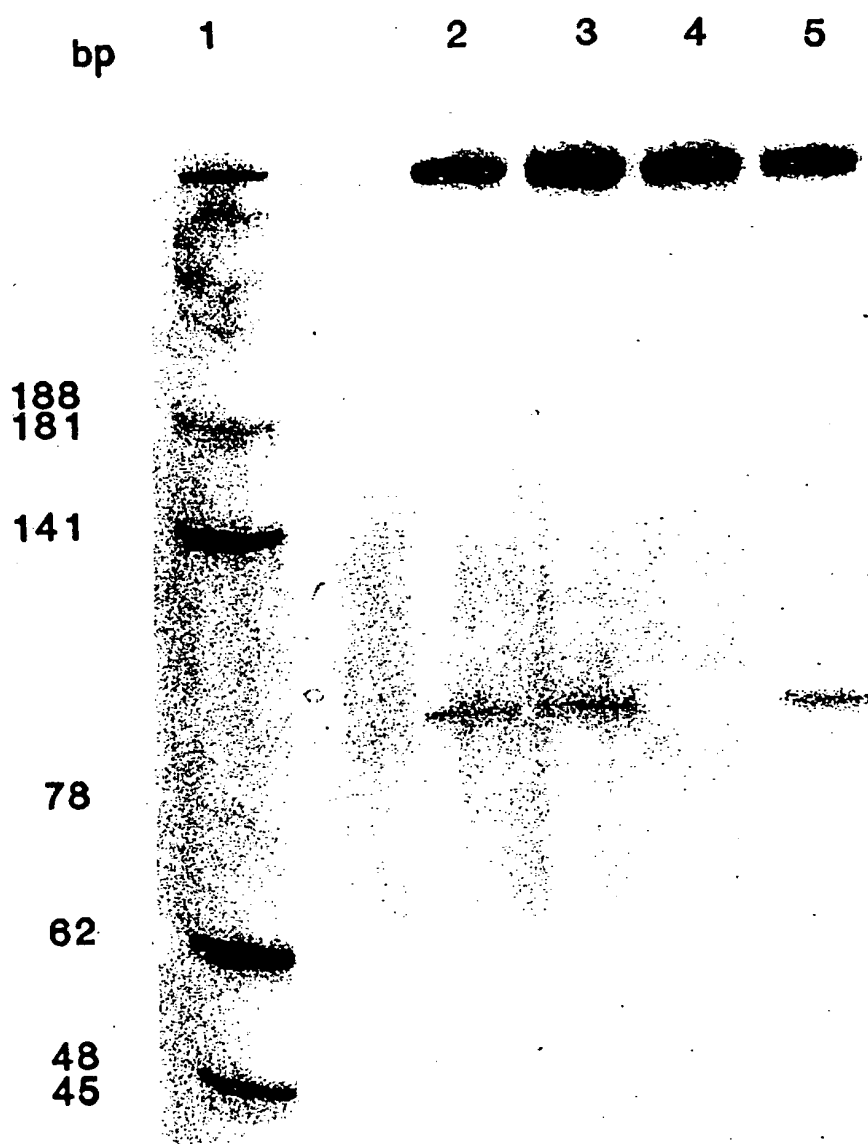


FIG.3

Human Betaglobin

[illegible]

CACAGGGCAGTAAAG PCOI

TTTCTTCTGACACA PC02

CYKLUSSE

denaturing, re-annealing

0 ... CCATCATTTT CTTACATTTT CTTCTGCAC AACCTGTTTC ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAGG TCTGCCCTTA CTGCCCTCTG GGGCAAGGTG AAGTTGTGTG...

forlænger ← CCAAT GACGGGACAC 5' PCR1

Polymerase, dNTP, er

```

0  .... CCATCIATTG CTTACATTG CTTCTGACAC AACTGTGTTC ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAAAG TGTGCCGTGTTA GTGCCCTGTG GGGCAAGGTG AAGTTGTGTG...
1  .... GGTACATATC GAATGTATAC GAAGACTGTG TTGACACAAg TGATCTGTGG TGAGACTGAGG ACTCTCTTTC AGAGGCAAT GACGGGACAC
1  .... TTTG CTTCTGACAC AACTGTGTTC ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAAAG TGTGCCGTGTTA GTGCCCTGTG GGGCAAGGTG AAGTTGTGTG...
0  .... GGTACATATC GAATGTATAC GAAGACTGTG TTGACACAAg TGATCTGTGG TGAGACTGAGG ACTCTCTTTC AGAGGCAAT GACGGGACAC CCCGTTCCAC TTCAACGACC...

```

denaturing, re-annealing

0 ... CCAICTA/TG CTTCGACAC AACCTGTTC ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGACGAGAG TCCTCCCTGTA CTCCCTGTG TGCCACAGCTG AAGTTGCTGCG..

||||| |||||||||

for_langer <---- GCAAT GACGGGACAC 3' PC01

1 ...GGTAGATAGC GAATCTAAAC GAAGACTGTG TTGACACAG TOATCTTGG TGGACTGAGG ACTCTCTCTC AGACGCCAAT GACCGGCAC

1
TTT CTTCTGACAC AACTGTGTTCT ACTAGCAACC ACCTGACTCT TTAGGAGAAO TCTGCGTTA CTGCGCTGTG GGGCAAGGTO AAGTTGTGTG...
!!!!!!
for longer (---- GCAAT GACGGGACAC 5' PCR)

0 ... GGTACATAAC GAATGTAAAC GAACACTGTG TTAGACACAAG TCACTCTTC TGGACTCAGC ACTCCTCTTC AGACGGCAAT GACGGCACAC CCGCTTCCAC TTCAACCCACC...

FIG.4-2 ! Polymerase, dNTP'er

0 CCATCTATTO CITAGATITG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TAAGAGAAAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTO GGGCAAGGTO AAGTTGCTG...
2 GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTO TTGACACAAG TAATCGTTG TGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC
2
1 GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTO TTGACACAAG TAATCGTTG TGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC
1
2
2
0 GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTO TTGACACAAG TAATCGTTG TGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC CCGTTCCAC TTCAACCCAC...
! denaturering, re-annealing
0 CCATCTATTO CITAGATITG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TAAGAGAAAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTO GGGCAAGGTO AAGTTGCTG...
5' PC02 TTG CTTCTGACAC A ----> forlanger
2 GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTO TTGACACAAG TAATCGTTG TGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC
2
2
1 GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTO TTGACACAAG TAATCGTTG TGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC
1
2
2
0 GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTO TTGACACAAG TAATCGTTG TGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC CCGTTCCAC TTCAACCCAC...
3

FIG.4-3 Polymerase, dNTP'er

0 ... CCACTAATG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG GGGCAAGGTG AAGTTGCTG...

3 ... GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTG TTGACACAA GATGCTTGG TGGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC

3 TTG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG

2 ... GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTG TTGACACAA GATGCTTGG TGGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC

2 TTG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG

3 AAAC GAAGACTGTG TTGACACAA GATGCTTGG TGGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC

3 TTG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG

1 ... GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTG TTGACACAA GATGCTTGG TGGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC

1 TTG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG

3 AAAC GAAGACTGTG TTGACACAA GATGCTTGG TGGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC

3 TTG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG

2 ... GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTG TTGACACAA GATGCTTGG TGGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC

2 TTG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG

3 AAAC GAAGACTGTG TTGACACAA GATGCTTGG TGGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC

3 TTG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG

0 ... GGTAGATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTG TTGACACAA GATGCTTGG TGGACTGAGG ACTGCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC

KOPIER AF DNA-SEKVENES EFTER N CYKLUSSE

N	0	1	5	10	15	20
template	1	1	1	1	1	1
langt produkt	0	1	5	10	15	20
kort produkt	0	0	26	1013	32.752	1.048.555
=2 (expN) - N-1						

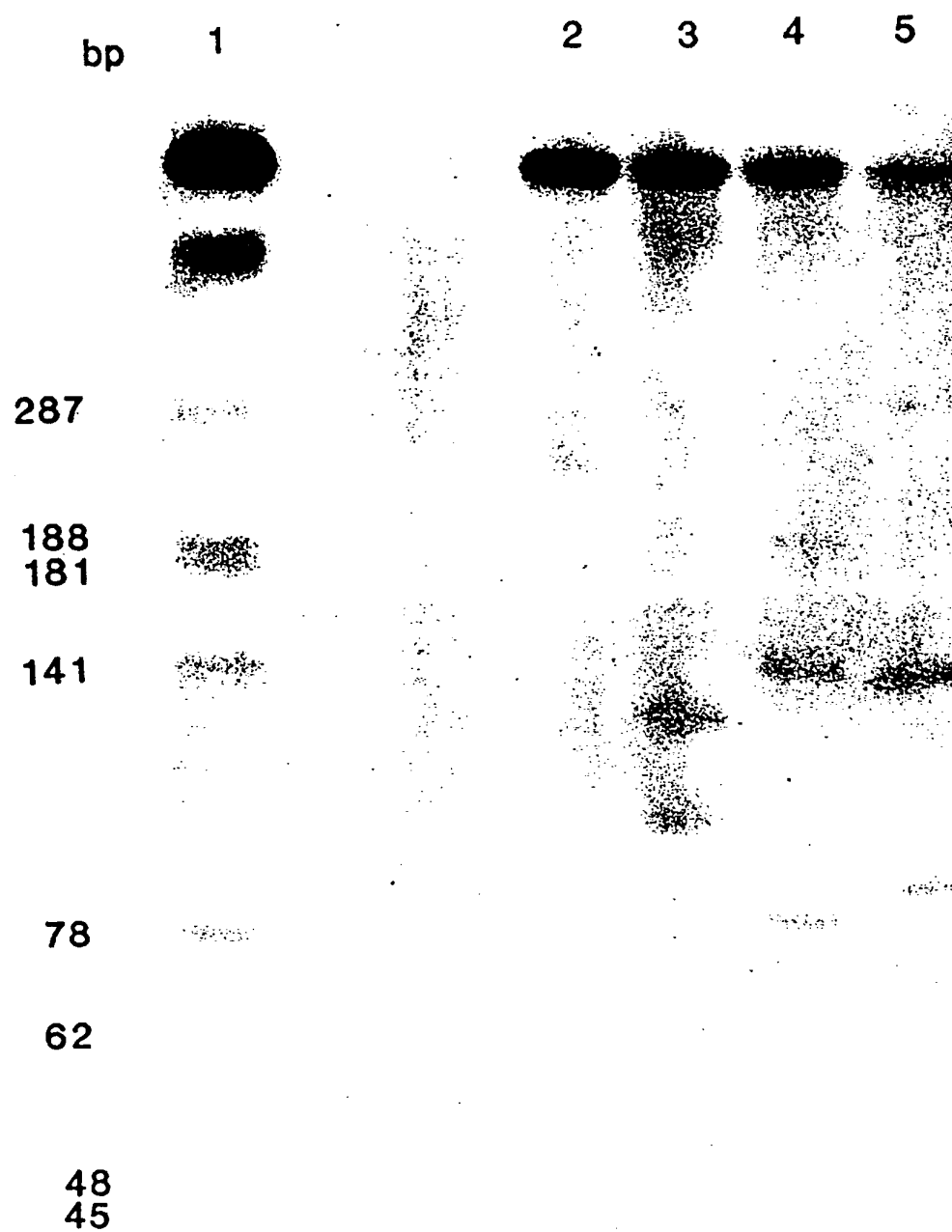


FIG.5

FIG.6

β^A =====

CA TGG TGCACCTGAC TCC TGAGGAGAAG TC TGCCG TTAC TGCCC TG TGGGGCAAGG TGAA

GTACCACG TGGAC TGAGGAC TCC TC TTCAGACGGCAA TGACGGGACACCCCG TTCCAC TT

 =====

β^S ===== *

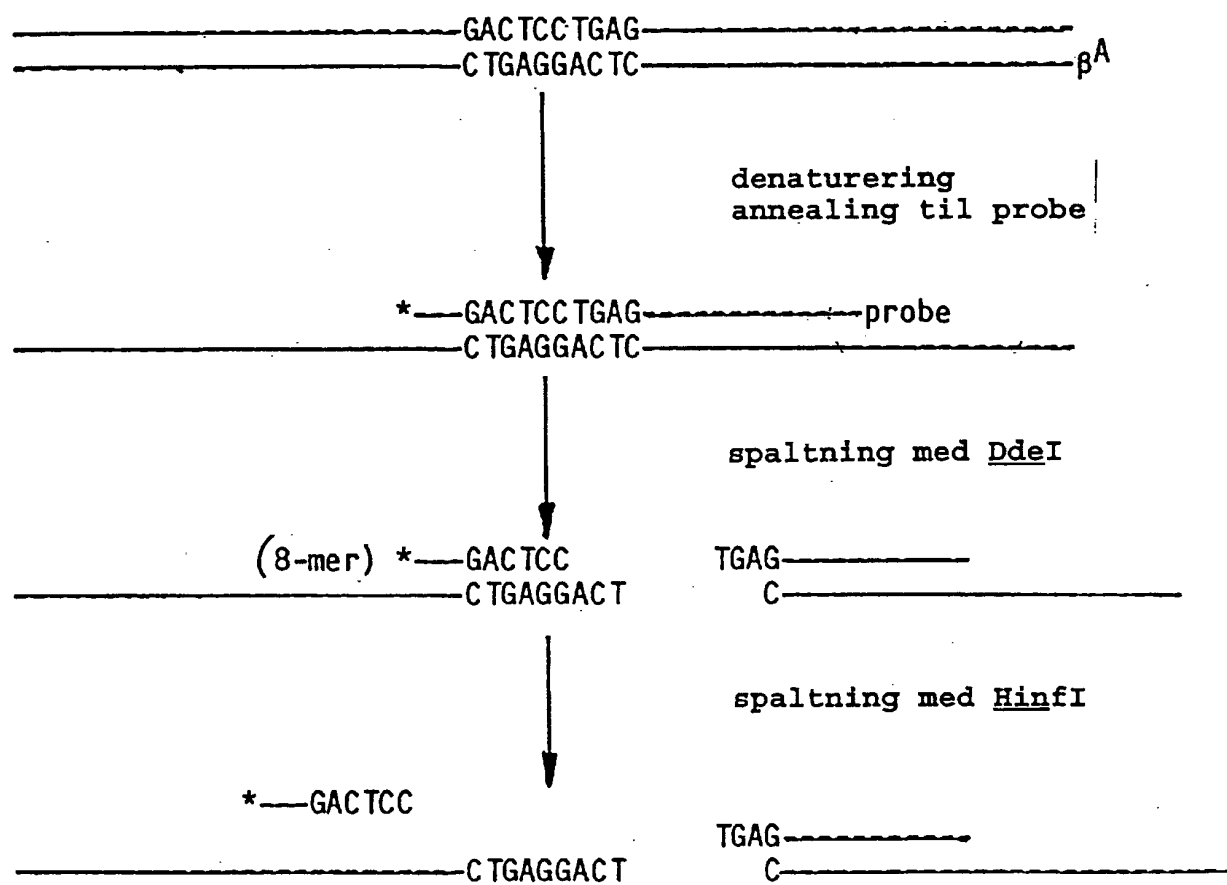
CA TGG TGCACCTGAC TCC TG TGGAGAAG TC TGCCG TTAC TGCCC TG TGGGGCAAGG TGAA

GTACCACG TGGAC TGAGGACACCTC TTCAGACGGCAA TGACGGGACACCCCG TTCCAC TT

 =====

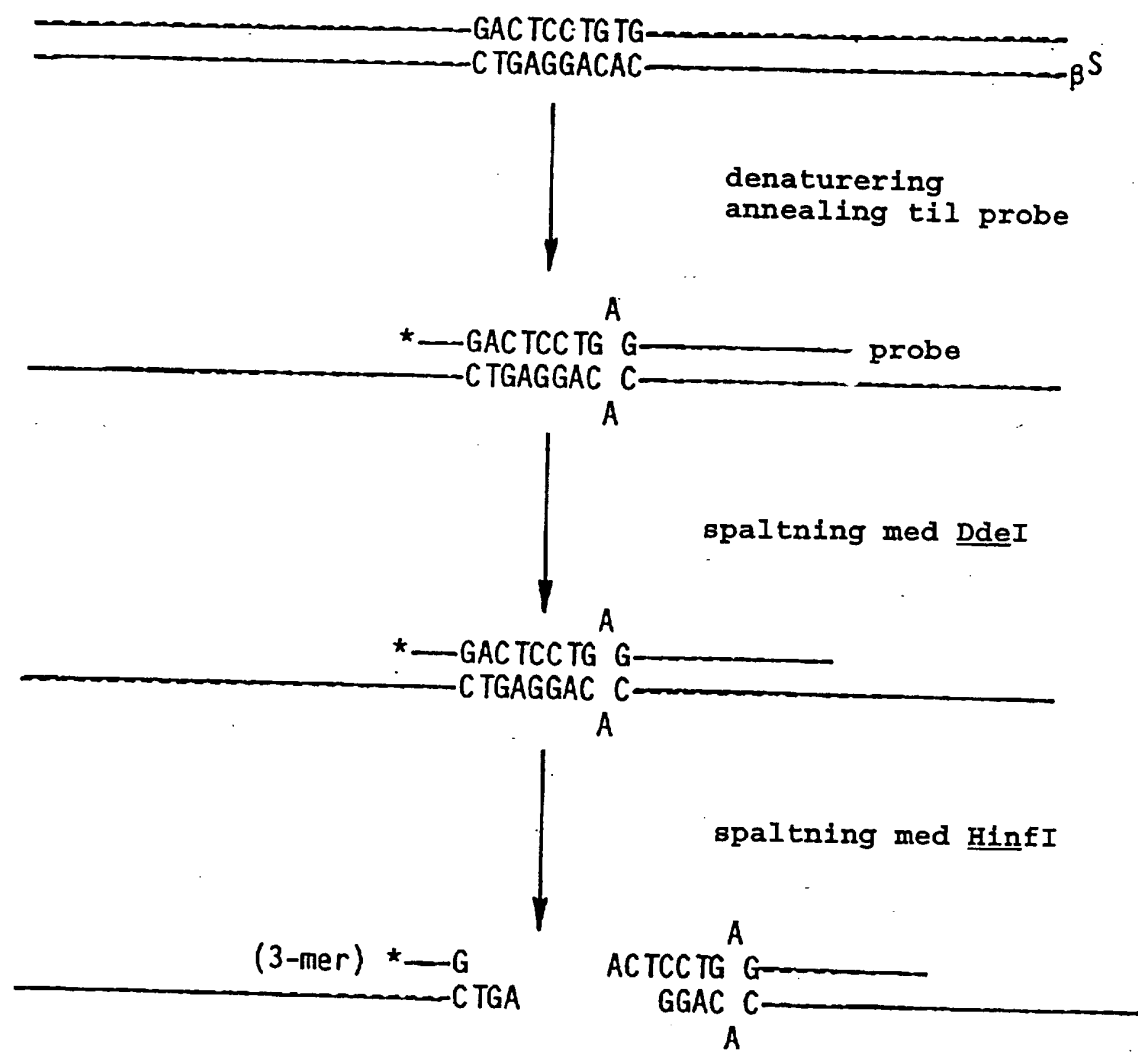
* Markerer mutationen (A til T) i seglcellegenet, hvilket bryder DdeI-stedet

FIG.7



* er mærkning

FIG.8



* er mærkning

FIG.9

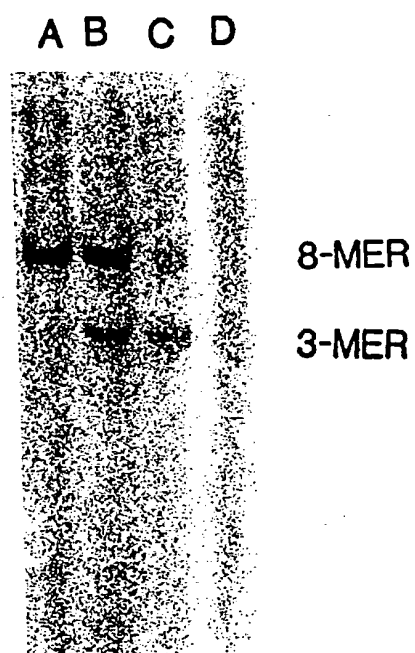


FIG. 10

