



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **329977**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C40B 30/04 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 37/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20003115	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.12.21 PCT/US1998/27191
(22)	Inng.dag	2000.06.16	(85)	Videreføringsdag	2000.06.16
(24)	Løpedag	1998.12.21	(30)	Prioritet	1997.12.19, US, 68291 1998.07.02, US, 109076
(41)	Alm.tilgj	2000.08.21			
(45)	Meddelt	2011.01.31			
(73)	Innehaver	Stephen Felder, 7064 North Cathedral Rock Place, Tucson, AZ 85718, USA			
		Richard M Kris, 2602 East Avenida de Posada, Tucson, AZ 85718, USA			
(72)	Oppfinner	Stephen Felder, 7064 North Cathedral Rock Place, Tucson, AZ 85718, USA			
		Richard M Kris, 2602 East Avenida de Posada, Tucson, AZ 85718, USA			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for påvisning av minst ett nukleinsyremål og sett for påvisning av minst ett nukleinsyremål i en prøve			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 95/35505 A1, WO 97/10365 A1, US 4751177 A, US 4868105 A, WO 97/47640 A1, US 6228580 B1, NIEMEYER, C. M., Oligonukleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and construction of supramolecular bioconjugates, Nucleic Acids Research, 1994, Vol.22, Nr.25, sidene 5530-5539.			
(57)	Sammendrag				

Sammensetninger, apparatur og fremgangsmåter anvendelige for samtidig utførelse av et stort antall høyeffektive, biologiske eller kjemiske analyser ved anvendelse av gjentatte rekker av prober. En kombinasjon omfatter en overflate som omfatter mange testområder, der minst to av disse, og i en foretrukket utførelsesform minst 20 av disse, er vesentlig identiske, hvori hvert av testområdene omfatter en rekke av generiske ankermolekyler. Ankrene er forbundet med bifunksjonelle linkermolekyler som hvert inneholder en del som er spesifikk for minst ett av ankrene, og en del som er en probe som er spesifikk for et mål av interesse. Den resulterende rekke prober anvendes for å analysere tilstedeværelse av eller teste aktiviteten av ett eller flere målmolekyler som reagerer spesifikt med probene. I en utførelsesform er testområdene (som kan være brønner) ytterligere delt i mindre underområder (perforeringer eller fordypninger). I en utførelsesform blir EST kartlagt. I en annen utførelsesform blir tilstedeværelse av en målnukleinsyre påvist ved beskyttelse av målet mot nukleasespaltning med et polynukleotidfragment, og det beskyttede polynukleotid analyseres ved massespektrometri.

Oppfinnelsens bakgrunn

Fremgangsmåte for påvisning av minst ett nukleinsyremål og sett for påvisning av minst ett nukleinsyremål i en
5 prøve.

Det beskrives heri f.eks. preparater, apparatur og metoder anvendelige for samtidig utførelse av mange biologiske eller kjemiske analyser ved anvendelse av gjentatte rekker av prober. Mange forskjellige områder inneholder en rekke
10 generiske ankermolekyler. Ankerene er forbundet med bifunksjonelle linkermolekyler som hvert inneholder en del som er spesifikk for minst ett av ankerene og en del som er en probe som er spesifikk for et mål av interesse. Den resulterende rekke prober anvendes for å analysere tilstedeværelse av ett
15 eller flere målmolekyler som reagerer spesifikt med probene. Oppfinnelsen angår forskjellige områder som skiller seg fra hverandre ved beskaffenheten av den molekylære interaksjon, inkludert, men ikke begrenset til, oppdagelse av farmasøytiske legemidler, molekylær biologi, biokjemi, farmakologi og
20 medisinsk diagnostisk teknologi.

Store antall molekylære prober arrangert på overflater eller "chips" er blitt anvendt i mange forskjellige biologiske og kjemiske analyser. Analyser utføres for å bestemme hvorvidt målmolekyler av interesse reagerer med noen av
25 probene. Etter eksponering av probene for målmolekyler under utvalgte testbetingelser bestemmer testanordninger hvorvidt et målmolekyl har reagert med en gitt probe.

Disse systemer er anvendelige ved mange forskjellige screeningsprosedyrer for å oppnå informasjon om enten probene
30 eller målmolekylene. De har f.eks. vært anvendt for å screene for peptider eller potensielle legemidler som bindes til en reseptor av interesse, blant annet; for å screene prøver for tilstedeværelse av f.eks. genetiske mutasjoner, allele varianter i en populasjon eller et spesielt patogen eller en
35 patogenstamme, blant mange andre; for å undersøke genekspressjon, f.eks. identifisere mRNA hvis ekspresjon er korrelert med en spesiell fysiologisk tilstand, et utviklingsstadium eller en sykdomstilstand etc.

WO A1 95/35505 beskriver et array-in-array-system med

fysisk blokkering mellom arrayene slik at flere prøver kan analyseres samtidig og hvor hvert av sub-arrayene er identiske og består av flere ulike ankermolekyler som kan binde ett eller flere molekyler.

5 US 4751177 viser at et bifunksjonelt linkermolekyl/-mediatormolekyl vil forbedre hybridiseringsegenskapene og øke sensitiviteten til assayet.

WO A1 97/47640 beskriver nukleasebeskyttelses-analyser.

10 Det er kjent fra Niemeyer, C. M., "Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: Semisynthetic DNA-streptavidine hybride molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and construction of supra-molecular bioconjugates", Nucleic Acids Research, 1994, Vol.
15 22, No. 25, side 5530-5539, og koble bifunksjonelle linkere til ankermolekyler på et array før tilsetning av en prøve.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse omfatter fremgangsmåte for
20 påvisning av minst ett nukleinsyremål, kjennetegnet ved at den omfatter

a) å bringe en prøve som kan omfatte målet (målene), i kontakt med et nukleasebeskyttelsesfragment (-fragmenter) som er spesifikt for, og som binder til, målet (målene) for derved å
25 danne et nukleasebeskyttelsesfragment-/målnukleinsyredupleks,

b) å eksponere prøven for en nuklease som er effektiv til å kløyve den resterende enkelttrådede nukleinsyre, og deretter

c) å bringe den resulterende prøven i kontakt med en kombinasjon som omfatter, før tilsetning av prøven,

30 i) en overflate som omfatter et stort antall romlig atskilte områder, minst to av disse er i det vesentlige identiske og hvert område omfatter

ii) minst to forskjellige oligonukleotidankere som hvert er i forbindelse med

35 iii) en bifunksjonell linker som inneholder en første del som er spesifikk for ankeret, og en andre del som omfatter en probe som er spesifikk for delen (delene) i duplekse,

d) under betingelser som er effektive for hybridisering og

- d) under betingelser som er effektive for hybridisering og
- e) for påvisning av enhver bundet beskyttet del (deler).

Også omfattet av beskrivelsen er sett som er
anvendbart for påvisning av minst ett nukleinsyremål i en
5 prøve, kjennetegnet ved at det omfatter

- a) minst ett nukleasebeskyttelsesfragment som er
spesifikt for nukleinsyren (-syrene), men ikke for noen av
oligonukleotidankerene i settet,

- b) en overflate som omfatter flere romlig atskilte
10 områder der minst to er i det vesentlige
identiske, hver region omfatter minst to
forskjellige oligonukleotidankere, og

- c) en beholder som inneholder minst ett bifunk-
sjonelt linkermolekyl som har en første del som er spesifikk
15 for minst ett av oligonukleotidankerene og en andre del som
omfatter en probe som er spesifikk for, og i påvisningen
binder til, minst ett av nukleasebeskyttelsesfragmentene.

Det beskrives således preparater, apparatur og
metoder for samtidig utførelse av et stort antall biologiske
20 eller kjemiske analyser, og tillater høyeffektiv analyse av
mange prøver, f.eks. mange pasientprøver som skal screenes i
en diagnostisk analyse, eller mange potensielle legemidler
eller terapeutiske midler som skal testes i en metode for opp-
dagelse av legemidler. En kombinasjon tilveiebringes som er
25 anvendelig for påvisning av ett eller flere mål i en prøve.
Denne kombinasjonen omfatter en overflate som omfatter et
stort antall romlig atskilte områder som kan betegnes som
testområder, og som kan være brønner der i det minste to av
disse er hovedsakelig identiske. Hver overflate omfatter minst
30 to, fortrinnsvis minst 20 eller flere, f.eks. minst ca. 25,
50, 96, 864 eller 1536 etc., av slike hovedsakelig identiske
områder. Hvert testområde definerer et rom for innføring av en
prøve som inneholder (eller potensielt inneholder) ett eller
flere mål og inneholder en biologisk eller kjemisk rekke.
35 (Uttrykk som "prøve inneholdende et mål" eller "påvisning av
et mål i en prøve" er ikke ment å ekskludere prøver eller
bestemmelser (deteksjonsforsøk) der ingen mål er inneholdt
eller påvist. Generelt involverer foreliggende oppfinnelse
rekker for å bestemme hvorvidt et mål er inneholdt i en prøve,

uansett hvorvidt den blir påvist eller ikke.) Denne rekken omfatter generiske "ankere" som hvert står i forbindelse med et bifunksjonelt linkermolekyl som inneholder en første del som er spesifikk for ankeret, og en andre del som omfatter en
5 probe som er spesifikk for minst ett av målene. Kombinasjonen ifølge foreliggende oppfinnelse blir plassert i kontakt med en prøve som inneholder ett eller flere mål som eventuelt reagerer med et detektormolekyl(er), og som deretter undersøkes ved hjelp av en deteksjonsanordning som påviser
10 reaksjoner mellom målmolekyler og prober i testområdene, og dermed gir resultater av analysen.

Det beskrives således fremgangsmåter og preparater som er spesielt anvendelige for høyeffektive biologiske analyser. I spesielt foretrukne utførelsesformer kan opp-
15 finnelsen anvendes for høyeffektiv screening for legemiddeloppdagelse. En høyeffektiv analyse kan f.eks. utføres i mange (f.eks. 100) 96-brønners mikroplater samtidig. I hver brønn på en plate kan det f.eks. utføres 36 forskjellige tester ved anvendelse av en rekke på ca. 36 anker- og linkerpar. Det vil
20 si at 100 plater, med 96 brønner pr. plate, og hver med 36 tester pr. brønn, kan tillate totalt 345 000 tester; f.eks. kan 9600 forskjellige legemiddelkandidater testes samtidig for 36 forskjellige parametere eller analyser. Høyeffektive analyser gir mye mer informasjon for hver legemiddelkandidat
25 enn analyser som kun tester én parameter om gangen. Det er f.eks. mulig i en enkelt innledende høyeffektiv screeningsanalyse å bestemme hvorvidt en legemiddelkandidat er selektiv, spesifikk og/eller ikke-toksisk. Ikke-høyeffektive metoder nødvendigvis gjør omfattende oppfølgingsanalyser for å teste slike
30 parametere for hver legemiddelkandidat av interesse. Forskjellige typer av høyeffektive screeningsanalyser er beskrevet, f.eks. i eksempler 15-17. Evnen til å utføre samtidig mange forskjellige biologiske analyser, og å gjøre veldig mange analyser samtidig (det vil si med meget høy effektivitet), er
35 to viktige fordeler ved foreliggende oppfinnelse.

I én utførelsesform, f.eks. ved anvendelse av 96-brønners DNA-bindingsplater (Corning Costar) laget av polystyren med en derivatisert overflate for binding av primære aminer, slik som aminosyrer eller modifiserte oligonukleo-

tider, kan en kolleksjon av 36 forskjellige oligonukleotider plasseres på overflaten av hver brønn på hver plate for å tjene som ankere. Ankerene kan være kovalent bundet til det derivatisert polystyren, og de samme 36 ankere kan anvendes
5 for alle screeningsanalyser. For enhver spesiell analyse kan et gitt sett av linkere anvendes for å programmere overflaten av hver brønn til å være spesifikk for så mange som 36 forskjellige mål eller analysetyper av interesse, og forskjellige testprøver kan appliseres i hver av de 96 brønnene på hver
10 plate. Det samme sett av ankere kan anvendes mange ganger for å reprogrammere overflaten av brønnene for andre mål og analyser av interesse, eller det kan anvendes på nytt mange ganger med det samme sett av linkere. Denne fleksibilitet og gjenbruksevne representerer ytterligere fordeler ved
15 foreliggende oppfinnelse.

En utførelsesform er en kombinasjon anvendelig for påvisning av ett eller flere mål i en prøve, som omfatter, før tilsetning av prøven,

a) en overflate som omfatter mange, romlig atskilte
20 områder, der minst to av disse er vesentlig identiske, og hvert område omfatter:

b) minst åtte forskjellige oligonukleotidankere som alle står i forbindelse med

c) en bifunksjonell linker som inneholder en første
25 del som er spesifikk for oligonukleotidankeret, og en andre del som omfatter en probe som er spesifikk for målet (målene).

En annen utførelsesform av oppfinnelsen er en kombinasjon som er anvendelig for påvisning av ett eller flere mål i en prøve, som omfatter, før tilsetning av prøven,

30 a) en overflate som omfatter mange, romlig atskilte områder, der minst to av disse er vesentlig identiske, og hvert område omfatter:

b) minst åtte forskjellige ankere som alle står i forbindelse med

35 c) en bifunksjonell linker som har en første del som er spesifikk for ankeret, og en andre del som omfatter en probe som er spesifikk for målet (målene).

En annen utførelsesform av oppfinnelsen er en fremgangsmåte for påvisning av minst ett mål, som omfatter at en

prøve som kan omfatte målet (målene) bringes i kontakt med en kombinasjon som beskrevet ovenfor under betingelser som er effektive for at målet (målene) skal bindes til kombinasjonen. En annen utførelsesform er en fremgangsmåte for bestemmelse av et RNA-ekspresjonsmønster som omfatter inkubasjon av en prøve som omfatter som mål minst to RNA-molekyler med en kombinasjon som beskrevet ovenfor, hvori minst én probe av kombinasjonen er en nukleinsyre (f.eks. oligonukleotid) som er spesifikk (det vil si selektiv) for minst ett av RNA-målene, under betingelser som er effektive for spesifikk hybridisering av RNA-målet (-målene) til proben(e). En annen utførelsesform er en fremgangsmåte for identifisering av et middel (eller tilstand(er)) som modulerer et RNA-ekspresjonsmønster, som er metoden beskrevet ovenfor for bestemmelse av et RNA-ekspresjonsmønster, og som videre omfatter sammenligning av RNA-ekspresjonsmønsteret produsert i nærvær av midlet (eller tilstanden) med RNA-ekspresjonsmønsteret produsert under et forskjellig sett av betingelser.

Som eksempel illustrerer figurene 1 og 2 en kombinasjon og en fremgangsmåte for anvendelse av denne for å påvise et mRNA-mål. Overflaten, vist i figur 2, inneholder 15 identiske testområder; i en spesielt foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er hvert av disse testområder en brønn i en mikrotiterplate. Hvert av testområdene inneholder seks forskjellige ankere, her angitt som 1-6. Figur 1 illustrerer skjematisk ett av disse ankere, anker 1, som i en mest foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er et oligonukleotid. Til anker 1 er det festet et linkermolekyl, linker 1, som omfatter to deler. Den første delen, som er spesifikk for ankeret, er på denne figuren et oligonukleotid som kan hybridisere spesifikt til ankeret. Den andre delen, som er en probe som er spesifikk for målet av interesse - her mål-mRNA 1 - er på denne figuren et oligonukleotid som kan hybridisere til dette målet. Selv om det ikke er illustrert på figuren, kan hvert av de resterende fire ankere hybridisere til sin egen linker via den ankerspesifikke del; hver linker kan inneholde en probedel som er spesifikk for f.eks. et mRNA som er forskjellig fra (eller det samme som) mRNA 1. Denne illustrerte kombinasjon kan anvendes for å analysere så mange

som 15 forskjellige prøver samtidig for tilstedeværelse av mRNA 1 (eller samtidig for mRNA-mål som er spesifisert (programmert) ved hjelp av de andre fem prober i rekken). For å utføre analysen blir hver prøve, som i dette eksemplet kan

5 være en RNA-ekstrakt fra f.eks. én av 15 uavhengige cellelinjer, tilsatt i et lite volum til et av områdene, eller brønnene, og inkubert under betingelser som er effektive for hybridisering av proben og målet. For å bestemme hvorvidt mRNA 1 er til stede i en prøve anvendes en deteksjonsanordning som

10 kan gjenkjenne mønsteret og/eller kan undersøke spesifikke beliggenheter innen hvert område for tilstedeværelse av et signal. Hvis cellelinjene inkuberes under betingelser hvori deres mRNA er merket *in vivo* med en markør, og hvis mRNA 1 er til stede i en prøve, vil detektoren påvise et signal som

15 utgår fra det merkede mRNA på beliggenheten definert av anker-/probekompleks 1. Alternativt kan mRNA merkes direkte *in vitro*, før eller etter at det tilsettes til områdene (brønnene). Alternativt, som illustrert i figur 1, kan mRNA merkes indirekte, før eller etter at det har hybridisert til

20 proben, f.eks. ved inkubasjon av RNA med et merket "detektor"-oligonukleotid (målspesifikt rapportør-oligonukleotid) som er komplementært med en sekvens som er forskjellig fra sekvensen gjenkjent av proben. I det illustrerte eksempel kan 15 prøver analyseres samtidig. Fordi minst 20 eller flere, f.eks. så

25 mange som 1536 eller flere, prøver kan analyseres samtidig ifølge foreliggende oppfinnelse, er dette et svært høyeffektivt analysesystem.

Som anvendt heri, refererer "mål" til et stoff hvis tilstedeværelse, aktivitet og/eller mengde ønskes bestemt, og

30 som har en affinitet for en gitt probe. Mål kan være kunstig fremstilte eller naturlig forekommende stoffer. De kan også anvendes i uendret tilstand eller som aggregater med andre stoffer. Mål kan være bundet, kovalent eller ikke-kovalent, til et bindingsmedlem, enten direkte eller via et spesifikt

35 bindingsstoff. Eksempler på mål som kan anvendes ved foreliggende oppfinnelse inkluderer, men er ikke begrenset til, reseptorer (på vesikler, lipider, cellemembraner eller forskjellige andre reseptorer); ligander, agonister eller antagonist

nister som bindes til spesifikke reseptorer; polyklonale anti-

stoffer, monoklonale antistoffer og antiserer som er reaktive med spesifikke antigene determinanter (slik som på virus, celler eller andre materialer); legemidler; nukleinsyrer eller polynukleotider (inkludert mRNA, tRNA, rRNA, oligonukleotider, DNA, virus-RNA eller -DNA, EST, cDNA, PCR-amplifiserte produkter avledet fra RNA eller DNA, og mutasjoner, varianter eller modifikasjoner derav); proteiner (inkludert enzymer, slik som de som er ansvarlige for spaltning av neurotransmittere, proteaser, kinaser og lignende); substrater for enzymer; peptider; kofaktorer; lektiner; sukkerer; polysakkarider; celler; cellemembraner; organeller etc., så vel som andre slike molekyler eller andre stoffer som kan eksistere i kompleks, kovalent bundet, kryssbundet form etc. Som anvendt heri, er betegnelsene nukleinsyre, polynukleotid, polynukleinsyre og oligonukleotid ensbetydende. Mål kan også refereres til som antiprober.

Som anvendt heri, er en "probe" et stoff, f.eks. et molekyl, som kan gjenkjennes spesifikt av et spesielt mål. Typene av potensielle probe-/mål- eller mål-/probebindingspartnere inkluderer reseptor/ligand, ligand/antiligand; nukleinsyre(polynukleotid)interaksjoner, inkludert DNA/DNA, DNA/RNA, PNA(peptidnukleinsyre)/nukleinsyre; enzymer, andre katalysatorer eller andre stoffer med substrater, små molekyler eller effektormolekyler etc. Eksempler på prober som er omfattet av foreliggende oppfinnelse, inkluderer, men er ikke begrenset til, organiske og uorganiske materialer eller polymerer, inkludert metaller, chelatdannende midler eller andre forbindelser som reagerer spesifikt med metaller, plast, agonister og antagonist for cellemembranreseptorer, toksiner og venomer, virusepitoper, hormoner (f.eks. opioidpeptider, steroider etc.), hormonreseptorer, lipider (inkludert fosfolipider), peptider, enzymer (slik som proteaser eller kinaser), enzymsubstrater, kofaktorer, legemidler, lektiner, sukkerer, nukleinsyrer (inkludert oligonukleotider, DNA, RNA, PNA eller modifiserte eller substituerte nukleinsyrer), oligosakkarider, proteiner, enzymer, polyklonale og monoklonale antistoffer, enkeltkjedede antistoffer eller fragmenter derav. Probepolymerer kan være lineære eller sykliske. Prober kan skjelne mellom fosforylerte og ikke- fosforylerte proteiner,

enten i kraft av forskjellig aktivitet eller forskjellig binding. Prober som lektiner kan skjelne mellom glykosylerte proteiner. Som anvendt heri, er betegnelsene nukleinsyre, polynukleotid, polynukleinsyre og oligonukleotid ensbetydende.

5 Ethvert av stoffene beskrevet ovenfor som "prober" kan også tjene som "mål" og vice versa.

Enhver kompatibel overflate kan anvendes i forbindelse med foreliggende oppfinnelse. Overflaten (vanligvis et fast stoff) kan være ethvert av forskjellige organiske eller
10 uorganiske materialer eller kombinasjoner av disse, inkludert, kun som eksempel, plast som polypropylen eller polystyren; keramiske materialer; silisiummaterialer; (smeltet) silisium-
oksid, kvarts eller glass, som kan ha samme tykkelse som f.eks. et mikroskopglass eller et dekkglass; papir som filter-
15 papir; diazotisert cellulose; nitrocellulosefiltre; nylon-
membran; eller polyakrylamidgelpute. Substrater som er gjennomskinnelige for lys, er anvendelige når fremgangsmåten for utførelse av en analyse involverer optisk deteksjon. I en foretrukket utførelsesform er overflaten plastoverflaten på en
20 flerbrønns f.eks. vevskulturskål, f.eks. en 24-, 96-, 256-, 384-, 864- eller 1536-brønners plate (f.eks. en modifisert plate, slik som en Corning Costar DNA-bindingsplate). Ankere kan være assosiert, f.eks. bundet, direkte til en overflate eller kan være assosiert med én type overflate, f.eks. glass,
25 som i sin tur er plassert i kontakt med en andre overflate, f.eks. i en plast-"brønn" på en mikrotiterskål. Formen på overflaten er ikke kritisk. Den kan f.eks. være en flat overflate, slik som et kvadrat, rektangel eller en sirkel; en krummet overflate; eller en tredimensjonal overflate, slik som
30 en perle, partikkel, tråd, bunnfall, rør, kule etc.

Overflaten omfatter områder som er romlig atskilte og adresserbare eller identifiserbare. Hvert område omfatter et sett av ankere. Hvordan områdene er separert, deres fysiske karakteristika og deres relative orientering i forhold til
35 hverandre er ikke kritisk. I én utførelsesform kan områdene være separert fra hverandre med en fysisk barriere som er resistent mot passering av væske. I en foretrukket utførelsesform kan områdene f.eks. være brønner på en flerbrønns(f.eks. vevskultur)skål, f.eks. en 24-, 96-, 256-, 384-, 864- eller

1536-brønners plate. Alternativt kan en overflate, slik som en glassoverflate, være etset for å inneholde f.eks. 864 eller 1536 atskilte, grunne brønner. Alternativt kan en overflate omfatte områder uten noen atskillelser eller brønner, f.eks.

5 en flat overflate, f.eks. en plastbit, glass eller papir, og individuelle områder kan videre være definert ved å legge over en struktur (f.eks. en bit av plast eller glass) som avtegner de separate områder. Eventuelt kan en overflate allerede omfatte én eller flere rekker av ankere, eller ankere forbundet

10 med linkere, før de individuelle områder avtegnes. I en annen utførelsesform kan rekker av ankere innen hvert område være separert fra hverandre ved tomme områder på overflaten, hvor det ikke finnes noen ankere, eller ved kjemiske grenser, slik som voks eller silikoner, for å forhindre spredning av dråper.

15 I en annen utførelsesform kan områdene være definert som rør eller fluidkontrollkanaler, f.eks. utformet for gjennomstrømningsanalyser som f.eks. beskrevet av Beattie et al. (1995), Clin. Chem., 4, 700-706. Områder i eller på en overflate kan også være definert ved modifikasjon av selve over-

20 flaten. En plastoverflate kan f.eks. omfatte deler laget av modifisert eller derivatisert plast som f.eks. kan tjene som seter for tilsetning av spesifikke typer polymerer (f.eks. kan PEG være festet til en polystyrenoverflate og deretter derivatisert med karboksyl- eller aminogrupper, dobbeltbindinger,

25 aldehyder og lignende). Alternativt kan en plastoverflate omfatte støpte strukturer, slik som fremspring eller humper, som kan tjene som plattformer for tilsetningen av ankere. Den relative orientering av testområdene kan innta enhver forskjellig form, inkludert, men ikke begrenset til, parallelle

30 eller perpendikulære rekker innen et kvadrat eller et rektangel eller en annen overflate, radiale rekker innen en sirkulær eller annen overflate, eller lineære rekker etc.

De romlig atskilte områder ifølge oppfinnelsen er til stede i et stort antall kopier. Det vil si at det er minst to,

35 fortrinnsvis minst 20, eller minst ca. 24, 50, 96, 256, 384, 864, 1536, 2025 eller flere, hovedsakelig identiske, romlig atskilte (separerte) områder. Forskjellige antall gjentatte områder kan tillate analyser med stadig høyere effektivitet. Hovedsakelig identiske områder, som anvendt heri, refererer

til områder som inneholder identiske eller hovedsakelig identiske rekker av ankere og/eller anker-/linkerkomplekser. Hovedsakelig identisk, som anvendt heri, betyr at en rekke eller et område er ment å ha vesentlig den samme funksjon som
5 en annen rekke eller et område i sammenheng med analysering av et mål i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse. Forskjeller som ikke vesentlig påvirker funksjon, det vil si påviselighet av mål, fører til rekken av små nukleotid--ufullkommenheter (utelatelser/innføyelser/substitusjoner)
10 eller oligo-ufullkommenheter (dårlig overflatebinding) etc., som ikke signifikant påvirker målbestemmelsesresultater innenfor analysenøyaktigheten.

En fagperson vil selvsagt erkjenne at ikke alle områdene på en overflate behøver å være hovedsakelig identiske
15 med hverandre. Hvis to forskjellige sett av rekker skal testes parallelt, kan det f.eks. være fordelaktig å inkludere begge sett av rekker på en enkelt overflate. De to forskjellige sett av rekker kan f.eks. være arrangert i alternerende stripete mønstre for å lette sammenligning mellom dem. I en annen utførelsesform kan utøveren ønske å inkludere ett eller flere
20 områder som kan påvises på en skjnelig måte fra de andre områdene på overflaten, og kan derved anvendes som et "registreringsområde". Et registreringsområde kan f.eks. omfatte oligonukleotider eller peptider som fremviser et karakteristisk mønster av fluorescerende molekyler som kan gjenkjennes
25 ved hjelp av en skanningsdeteksjonsanordning som et "startpunkt" for linjeoppstilling av beliggenhetene av områdene på en overflate.

Størrelsen og den fysiske atskillelse av testområdene
30 er ikke begrensende. Typiske områder har et areal fra ca. 1 til ca. 700 mm², fortrinnsvis ca. 1 til ca. 40 mm², og har en avstand på ca. 0,5 til ca. 5 mm fra hverandre, og blir rutinemessig utvalgt avhengig av de involverte arealer. I en foretrukket utførelsesform har områdene en avstand på ca. 5 mm fra
35 hverandre. Hvert område kan f.eks. omfatte et rektangulært gitter med f.eks. 8 rader og 6 kolonner av omtrent sirkulære flekker av ankere med en diameter på ca. 100 mikrometer og med en avstand på ca. 500 mikrometer fra hverandre; et slikt om-

råde vil dekke et areal på ca. 20 mm². Områder med større og mindre arealer og avstander er inkludert.

Områdene kan også være ytterligere inndelt, slik at noen eller alle ankere innen et område er fysisk separert fra naboliggende ankere ved hjelp av f.eks. et innsnitt eller en
 5 fordypning. Antallet underinndelinger (underområder) i et område kan f.eks. variere fra ca. 10 til ca. 100 eller flere eller færre. I én utførelsesform kan et område som er en brønn på en 1536-brønners skål, videre underinndeles i mindre
 10 brønner, f.eks. fra ca. 4 til ca. 900, fortrinnsvis fra ca. 16 til ca. 36 brønner, for derved å danne en rekke av brønner innen brønner. Se figur 4. En slik gropet overflate reduserer toleransen som fordres for fysisk plassering av ett enkelt anker (eller gruppe ankere) i hvert utformet rom (sted), og
 15 størrelsen av områdene inneholdende ankere er mer ensartet, hvilket derved letter påvisningen av mål som bindes til proben. .

Betegnelsen "anker", som anvendt heri, refererer til enhver entitet eller stoff, f.eks. molekyl (eller "gruppe" av
 20 hovedsakelig identiske slike substrater (se f.eks. figur 7)), som er assosiert med (f.eks. immobilisert på, eller festet enten kovalent eller ikke-kovalent til) overflaten, eller som er en del av en slik overflate (f.eks. derivatisert del av en plastoverflate), og som kan gjennomgå spesifikk interaksjon
 25 eller assosiasjon med en linker eller et annet stoff som beskrevet heri. Som anvendt heri, eksisterer et "anker-/linker-kompleks" når et anker og en linker er blitt sammenbundet gjennom molekylær assosiasjon på en spesifikk måte. Interaksjonen med linkeren kan enten være irreversibel, slik som
 30 via bestemte kovalente bindinger, eller reversibel, slik som via nukleinsyrehybridisering. I en foretrukket utførelsesform er ankeret en nukleinsyre som kan være av enhver lengde (f.eks. et oligonukleotid) eller type (f.eks. DNA, RNA, PNA eller et PCR-produkt av et RNA- eller DNA-molekyl). Nukleinsyren kan være modifisert eller substituert (f.eks. omfattende
 35 ikke-naturlig forekommende nukleotider, slik som f.eks. inosin; forbundet via forskjellige kjente bindingsgrupper, slik som sulfamat, sulfamid, fosfortionat, metylfosfonat, karbamat etc.; eller et semisyntetisk molekyl, slik som et

DNA-streptavidinkonjugat etc.). Enkelttrådede nukleinsyrer er foretrukket. Ankeret kan også være et peptid eller et protein. Det kan f.eks. være et polyklonalt eller monoklonalt antistoffmolekyl eller et fragment derav, eller et enkeltkjedet antistoff eller et fragment derav, som bindes spesifikt til delen av en linker som er et antigen eller et anti-antistoffmolekyl; motsvarende kan ankeret være et peptid, og delen av linkerens som bindes til dette, kan være et antistoff eller lignende. I en annen utførelsesform kan ankeret være et lektin (slik som concanavalin A eller agglutininer fra organismer som Limulus, peanøtt, mongbønne, Phaseolus, hvetekim etc.) som er spesifikt for et spesielt karbohydrat. I en annen utførelsesform kan ankeret være et organisk molekyl, slik som en modifisert eller derivatisert plastpolymer, som f.eks. kan tjene som trinnet for spesifikk fastfase-kjemisk syntese av et oligonukleotid. I dette tilfellet kan den derivatiserte plast være fordelt som en rekke av atskilte, derivatiserte steder som er dannet integralt i plastoverflaten av en kombinasjon under produksjonsprosessen. I en annen utførelsesform kan ankeret dra fordel av spesifikk eller preferensiell binding mellom metallioner, f.eks. Ni, Zn, Ca, Mg etc., og spesielle proteiner eller chelatdannende midler. Ankeret kan f.eks. være polyhistidin, og den ankerspesifikke del av linkerens kan være nikkel som er festet via et nikkelchelatlannende middel til en målspesifikk probe. Alternativt kan det chelatdannende middel være ankeret, og polyhistidinet kan være den proberelaterte del. Alternativt kan ankeret være et uorganisk stoff. Det kan f.eks. være et metall, slik som kalsium eller magnesium, og den ankerspesifikke del av linkerens kan være et preferensielt chelatdannende middel, slik som EDTA eller EGTA, som er festet til en målspesifikk probe. En fagperson vil erkjenne at mange forskjellige andre molekyltyper også kan tjene som ankere, slik som de generelle typer som også er diskutert i forbindelse med prober og mål.

Antallet ankere i et testområde kan være minst to, fortrinnsvis mellom ca. 800 og ca. 900 (flere eller færre er inkludert), mer foretrukket mellom ca. 8 og ca. 300, og mest foretrukket mellom ca. 30 og ca. 100 (f.eks. ca. 64). I noen foretrukne utførelsesformer er det ca. 16, 36, 45 eller

100 ankere/testområde for en overflate med 96 testområder (f.eks. brønner), eller ca. 9, 16 eller 25 ankere/testområde for en overflate med 384 testområder (f.eks. brønner). I en mest foretrukket utførelsesform har hvert anker i et test-
5 område en forskjellig spesifisitet i forhold til ethvert annet anker i rekken. To eller flere av ankerene kan imidlertid ha den samme spesifisitet, og alle ankerene kan være identiske. I én utførelsesform, hvori en kombinasjon av oppfinnelsen omfatter et meget stort antall testområder (f.eks. ca. 864, 1536
10 eller flere), slik at et stort antall testprøver kan bearbejdes samtidig, kan det være av interesse å teste disse prøver for kun et begrenset antall (f.eks. ca. 2, 4, 6 eller 9) parametere. For kombinasjoner som omfatter et meget stort antall områder, kan det med andre ord være fordelaktig å ha kun ca.
15 2-9 ankere pr. område.

Den fysiske avstand og den relative orientering av ankerene i eller på et testområde er ikke begrensende. Typisk er avstanden mellom ankerene ca. 0,003 til ca. 5 mm eller mindre, fortrinnsvis mellom ca. 0,03 og ca. 1 mm. Større og
20 mindre ankeravstander (og områder) er inkludert. Ankerene kan være arrangert i enhver orientering i forhold til hverandre og til grensene av området. De kan f.eks. være arrangert i en todimensjonal orientering, slik som kvadratisk, rektangulær, heksagonal eller en annen rekke, eller en sirkulær rekke der
25 ankerene stråler ut fra sentrum i radiale linjer eller konsentriske ringer. Ankerene kan også være arrangert i en endimensjonal, lineær rekke. Oligonukleotider kan f.eks. være hybridisert til spesifikke posisjoner langs en DNA- eller RNA-sekvens for å danne en supramolekylær rekke. Alternativt kan
30 ankerene være plassert i en "bar-code"-lignende dannelsel (se figur 6). Ankerene kan f.eks. være plassert som lange linjer parallelle med hverandre. Avstanden mellom eller bredden av hver lang linje kan varieres på en vanlig måte for å gi et enkelt, gjenkjennelig mønster som er mye likt en strekkode,
35 f.eks. kan de første og tredje linjer være dobbelt så store som resten, linjer kan utelates etc. En ekstra tom linje kan plasseres etter den siste linjen for å avgrense et testområde, og strekkodemønsteret kan gjentas i etterfølgende testområder.

Mønsteret av ankere behøver ikke å passe nøyaktig med posisjonene til de separerte analysebrønner (testområder) eller de separate analysedråper. Betegnelsen "analyseposisjoner" vil benyttes for å referere til posisjonene på analyseoverflaten hvor analyseprøver appliseres. (Disse kan defineres ved posisjonen til separate dråper av analyseprøve eller ved posisjonen til vegger eller separatorer som definerer individuelle analysebrønner på en flerbrønnsplate.) Selve ankermønsteret (f.eks. et "strekkode"-lignende mønster av oligonukleotidankere) anvendes for å definere hvor nøyaktig hvert separat anker er beliggende ved mønstergjenkjennelse - slik som hver linje i en strekkode gjenkjennes ved dens posisjon i forhold til de resterende linjer. Det første anker behøver således ikke å være på én kant eller ett hjørne av hver analyseposisjon. Det første anker vil finnes ved hjelp av mønstergjenkjennelse istedenfor posisjon i forhold til analyseposisjonen. Så lenge som arealet anvendt av hver analyseposisjon (f.eks. arealet til dråpen eller arealet til brønnen) er stort nok til at det er sikkert at det inneholder minst én hel enhet av det gjentakende mønster av ankere, så vil hvert analysepunkt teste prøven for denne analyseposisjon for alle målene spesifisert ved (det strekkodede) mønsteret, uansett hvor mønsteret ligger innen området for analyseposisjonen.

Ankerene behøver ikke å være arrangert i en streng eller et fast mønster innen hvert testområde. Hvert anker kan f.eks. være festet til en partikkel, en kule eller lignende, som antar en vilkårlig posisjon innen et testområde. Beliggenheten av hvert anker kan bestemmes ved anvendelse av f.eks. en påvisbar markør. Linkermolekylet som er spesifikt for hver type anker, kan f.eks. være merket med en forskjellig fluorescerende, luminescerende markør etc., og posisjonen til en partikkel som omfatter et spesielt linker-/ankerpar, kan identifiseres ved hjelp av beskaffenheten av signalet som utgår fra linkeren, f.eks. eksitasjons- eller emisjonsspekteret. En fagperson kan preparere et sett av linkere med mange forskjellige slike festede markører som har hvert sitt distinkte spektrum. Alternativt kan ankerene være merket direkte. Hver type anker kan f.eks. være merket med en markør

som fluorescerer med et spektrum forskjellig fra markørene på andre typer ankere. Alternativt kan partiklene, kulene eller lignende være forskjellige fra hverandre i størrelse eller form. Enhver av merkings- og påvisningsmetodene beskrevet heri
5 kan anvendes. Fluorescens kan f.eks. måles ved hjelp av et CCD-basert avbildningssystem, et skanningsfluorescensmikroskop eller Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS).

Et anker kan reagere med eller bli bundet spesifikt til én del - den ankerspesifikke del - av et linkermolekyl.
10 Med betegnelsen "reagere" eller "assosiere" er det ment heri at to stoffer eller forbindelser (f.eks. anker og ankerspesifikk del av en linker, en probe og dens mål, eller et mål og en målspesifikk rapportør) er bundet (f.eks. festet, bundet, hybridisert, forbundet med, annealed, kovalent bundet eller på
15 annen måte assosiert) til hverandre tilstrekkelig til at den tilsiktede analyse kan utføres. Med betegnelsen "spesifikk" eller "spesifikt" er det ment heri at to komponenter (f.eks. anker og ankerspesifikt område av en linker, en probe og dens mål, eller et mål og en målspesifikk rapportør) bindes selektivt til hverandre og, i fravær av enhver beskyttelsesteknikk, ikke generelt til andre komponenter som ikke er ment for binding til de aktuelle komponenter. Parameterne som fordres for å oppnå spesifikke interaksjoner, kan bestemmes rutinemessig, f.eks. ved anvendelse av konvensjonelle metoder i
20 teknikken.
25

For nukleinsyrer kan f.eks. en fagperson bestemme eksperimentelt de trekk (slik som lengde, basesammensetning og grad av komplementaritet) som vil muliggjøre at en nukleinsyre (f.eks. et oligonukleotidanker) kan hybridisere med en annen
30 nukleinsyre (f.eks. den ankerspesifikke del av en linker) under betingelser for utvalgt stringens, under minimalisering av uspesifikk hybridisering til andre stoffer eller molekyler (f.eks. andre oligonukleotidlinkere). DNA eller en annen nukleinsyresekvens av et anker, en del av en linker eller et
35 detektoroligonukleotid vil typisk ha tilstrekkelig komplementaritet til bindingspartneren for å muliggjøre at den hybridiserer under utvalgte stringente hybridiseringsbetingelser, og T_m vil være ca. 10-20 °C høyere enn romtemperatur (f.eks. ca. 37 °C). Generelt kan et oligonukleotidanker ha en lengde fra

ca. 8 til ca. 50 nukleotider, fortrinnsvis ca. 15, 20, 25 eller 30 nukleotider. Som anvendt heri, betyr "høyststringente hybridiseringsbetingelser" alle betingelser der hybridisering vil forekomme når det er minst 95 %, fortrinnsvis ca. 97-
 5 100 %, nukleotidkomplementaritet (identitet) mellom nukleinsyrene. Avhengig av det ønskede formål kan det imidlertid utvelges hybridiseringsbetingelser som fordrer mindre komplementaritet, f.eks. ca. 90 %, 85 %, 75 %, 50 % etc. Blant hybridiseringsreaksjonsparameterne som kan varieres, er salt-
 10 konsentrasjon, buffer, pH, temperatur, inkubasjonstid, mengde og type denatureringsmiddel, slik som formamid etc. (se f.eks. Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. utg.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, New York; Hames et al. (1985), *Nucleic Acid Hybridization*, IL Press; Davis et
 15 al. (1986), *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Sciences Publishing, Inc., New York). Nukleinsyrer (f.eks. linkeroligonukleotider) kan f.eks. tilsettes til et testområde (f.eks. en brønn på en flerbrønnsplate - i en foretrukket utførelsesform en plate med 96 eller 384 brønner eller flere) i
 20 et volum som varierer fra ca. 0,1 til ca. 100 µl eller mer (i en foretrukket utførelsesform ca. 1 til ca. 50 µl, mest foretrukket ca. 40 µl), i en konsentrasjon som varierer fra ca. 0,01 til ca. 5 µM (i en foretrukket utførelsesform ca. 0,1 µM), i en buffer som f.eks. 6 x SSPE-T (0,9 M NaCl, 60 mM
 25 NaH₂PO₄, 6 mM EDTA og 0,05 % Triton X-100), og hybridiseres til en bindingspartner (f.eks. et oligonukleotidanker på overflaten) i mellom ca. 10 minutter og mer enn ca. 3 timer (i en foretrukket utførelsesform minst ca. 15 minutter) ved en temperatur som varierer fra ca. 4 °C til ca. 37 °C (i en
 30 foretrukket utførelsesform ved ca. romtemperatur). Betingelser kan utvelges for å tillate høy effektivitet. I én utførelsesform av oppfinnelsen kan reaksjonsbetingelsene være tilnærmet fysiologiske betingelser.

Utformingen av andre typer stoffer og molekyler
 35 (f.eks. polypeptider, lektiner etc.), som f.eks. kan tjene som ankere eller som deler av linkere, og reaksjonsbetingelsene som er nødvendig for å oppnå spesifikke interaksjoner med deres bindingspartnere, er rutinemessige og konvensjonelle i teknikken (f.eks. som beskrevet av Niemeyer et al. (1994),

Nucl. Acid Res., 22, 5530-5539; Fodor et al. (1996), US-patent nr. 5 510 270; Pirrung et al. (1992), US-patent nr. 5 143 854). Blant inkubasjonsparametrene er buffer, salt-konsentrasjon, pH, temperatur, inkubasjonstid, tilstedeværelse
5 av bærer og/eller midler eller betingelser for å redusere uspesifikke interaksjoner etc. Til et testområde (f.eks. en brønn på en flerbrønnsplate - i en foretrukket utførelsesform en plate med 96 eller 384 brønner eller flere) som inneholder antistoffer som ankere, kan det f.eks. tilsettes anti-anti-
10 stoffer (f.eks. antigener eller antistoffspesifikke sekundære antistoffer) i et volum som varierer fra ca. 0,1 til ca. 100 µl eller mer (i en foretrukket utførelsesform ca. 1 til ca. 50 µl, mest foretrukket ca. 40 µl), i en konsentrasjon som varierer fra ca. 10 pM til ca. 10 nM (i en foretrukket
15 utførelsesform ca. 1 nM), i en buffer som f.eks. 6 x SSPE-T, PBS eller fysiologisk saltvann, og inkuberes med ankerene på overflaten i mellom ca. 10 minutter og minst 3 timer (i en foretrukket utførelsesform minst ca. 15 minutter), ved en temperatur som varierer fra ca. 4 °C til ca. 45 °C (i en
20 foretrukket utførelsesform ca. 4 °C). For peptidankere er en lengde på ca. 5-20 aminosyrer foretrukket.

I noen utførelsesformer av oppfinnelsen kan hvert anker i en rekke reagere med den ankerspesifikke del av dens tilsvarende linker i vesentlig den samme grad som til de andre
25 ankerene i rekken, under utvalgte reaksjonsbetingelser. Dette kan sikre at ankerene spesifiserer en hovedsakelig ensartet rekke av linkere, og derfor prober.

Ankerene innen et testområde kan være et "generisk" sett, der hvert anker kan reagere med én eller flere forskjellige
30 like linkere som hver har en del som er spesifikk for et slikt anker, men med forskjellige "probe"-deler; en enkelt rekke av generiske ankere kan således anvendes for å programmere eller definere et variert sett av prober. Den fleksible beskaffenhet av en slik generisk rekke ankere kan illustreres med referanse
35 til figurene 1 og 2. Figur 2 illustrerer en overflate som omfatter 15 testområder som hvert inneholder en rekke av seks forskjellige ankere, som i dette eksemplet kan være oligonukleotider. Figur 1 illustrerer skjematisk ett av disse (oligonukleotid)ankere, anker 1, som er i kontakt med linker 1

som omfatter en del som er spesifikk for anker 1, og en andre del som er spesifikk for mål-mRNA 1. Alternativt kan det innsettes en linker 2, som lik linker 1 omfatter en del som er spesifikk for anker 1, men som omfatter en andre del som er spesifikk for mål-mRNA 2 istedenfor mål-mRNA 1. Anker 1 kan således anvendes for å spesifisere (eller programmere, definere eller bestemme) prober for hvert av to eller flere forskjellige mål-mRNA. Prosessen med å danne og tilknytte et høyresolusjonsmønster (rekke) av oligonukleotider eller peptider, kan være kostbar, tidkrevende og/eller fysisk vanskelig. Evnen til å anvende en forhåndsdannet rekke av ankere for å programmere mange forskjellige proberekker er en fordel ved foreliggende oppfinnelse.

Selv om de generiske ankere illustrert i figur 2 definerer et mønster for oligonukleotidprober, kan den identiske ankerrekke også anvendes for å programmere en rekke av andre prober, f.eks. reseptorproteiner (se f.eks. figur 3). Mange permutasjoner er åpenbart mulig, gitt området for typene av anker-/linkerinteraksjoner, f.eks. enda mer komplekse lag av "sandwiched" eller "piggybacked" prober, slik som protein-/antistoffkombinasjoner. Overflatene av ankerene ifølge foreliggende oppfinnelse gir således i seg selv nye fordeler.

I én utførelsesform av oppfinnelsen kan ankere reagere reversibelt med linkere; et generisk sett av ankere kan således anvendes på nytt for å programmere et variert sett av prober. Et oligonukleotidanker kan f.eks. separeres fra oligonukleotiddelen av en linker ved f.eks. et oppvarmings-trinn som forårsaker at de to oligonukleotider dissosierer, og kan deretter bli gjenbundet til en andre linker. Evnen til gjenbenyttelse av ankerrekker, som kan være kostbare, tidkrevende og/eller fysisk vanskelig å utføre, er således en annen fordel ved foreliggende oppfinnelse.

Et anker behøver nødvendigvis ikke å reagere med en linker. Et anker kan f.eks. koples (direkte eller indirekte) til et påvisbart molekyl, slik som en fluorokrom, og kan der- ved tjene til å lokalisere en flekk innen et gitter, f.eks. for formålet registrering mellom testoverflaten og detektoren. Et anker kan alternativt være merket med en kjent mengde av et

påvisbart molekyl for å tjene som en intern kvantifiseringsmarkør, f.eks. for kalibreringsformål.

Betegnelsen "linker", som anvendt heri, refererer til et bifunksjonelt stoff som omfatter en første porsjon (eller
5 halvpart eller del) som er spesifikk for et valgt (utpekt) anker eller undersett av ankerene ("ankerspesifikk"), og en andre del som er en probe som er spesifikk for et mål av interesse ("målspesifikk"). De to deler av linkeren kan være bundet via kovalente eller ikke-kovalente bindinger og kan
10 være bundet direkte eller gjennom et intermediat.

Den kjemiske beskaffenhet av den ankerspesifikke del av linkeren er selvsagt en funksjon av ankeret eller ankerene som den reagerer med. Dersom ankeret er et oligonukleotid, kan f.eks. delen av linkeren som reagerer med dette være et peptid
15 som bindes spesifikt til oligonukleotidet, eller en nukleinsyre som kan hybridisere effektivt og spesifikt med dette under utvalgte stringente hybridiseringsbetingelser. Nukleinsyren kan f.eks. være et oligonukleotid, DNA, RNA, PNA, PCR-produkt eller substituert eller modifisert nukleinsyre (f.eks.
20 omfattende ikke-naturlig forekommende nukleotider som f.eks. inosin; forbundet via forskjellige kjente bindingsgrupper, slik som sulfamat, sulfamid, fosfortionat, metylfosfonat, karbamat; eller et semisyntetisk molekyl, slik som et DNA-streptavidinkonjugat etc.). Enkelttrådede deler er foretrukket. Delen av en linker som er spesifikk for et oligonukleotidanker, kan ha en lengde som varierer fra ca. 8 til ca. 50 nukleotider, fortrinnsvis ca. 15, 20, 25 eller 30 nukleotider. Hvis ankeret er et antistoff, kan delen av linkeren som reagerer med dette f.eks. være et anti-antistoff, et antigen
25 eller et mindre fragment av et av disse molekyler som kan reagere spesifikt med ankeret. Stoffer eller molekyler som reagerer spesifikt med de andre typer av ankere beskrevet ovenfor, og som kan tjene som den ankerspesifikke del av en linker, er vel kjent i teknikken og kan utformes ved anvendelse av konvensjonelle prosedyrer (se f.eks. ovenfor).
35

Den kjemiske beskaffenhet av den målspesifikke del av linkeren er selvsagt en funksjon av målet som den er en probe for, og som den reagerer med. Dersom målet f.eks. er et spesielt mRNA, kan den målspesifikke del av linkeren f.eks.

være et oligonukleotid som bindes spesifikt til målet, men ikke til interfererende RNA eller DNA, under utvalgte hybridiseringsbetingelser. En fagperson kan ved anvendelse av anerkjente metoder bestemme eksperimentelt de trekk av et oligonukleotid som vil hybridisere optimalt til målet, med minimal hybridisering til uspesifikke interfererende DNA eller RNA (se f.eks. ovenfor). Lengden av en oligonukleotidprobe anvendt for å skjelne et mål-mRNA til stede i en bakgrunn av et stort overskudd av ikke-merkede RNA kan generelt ha en lengde som varierer fra ca. 8 til ca. 50 nukleotider, fortrinnsvis ca. 18, 20, 22 eller 25 nukleotider. En oligonukleotidprobe for anvendelse i en biokjemisk analyse der det ikke forekommer en høy bakgrunn av konkurrerende mål, kan være kortere. Ved anvendelse av anerkjente metoder i teknikken (f.eks. data-programmet BLAST) kan sekvensen av oligonukleotidprober utvelges slik at de er innbyrdes ubeslektede og er forskjellige fra potensielt forstyrrende sekvenser i kjente gendatabaser. Utvelgelsen av hybridiseringsbetingelser som vil tillate spesifikk hybridisering av en oligonukleotidprobe til et RNA, kan bestemmes rutinemessig ved anvendelse av anerkjente prosedyrer i teknikken (se f.eks. ovenfor). Mål-RNA [f.eks. totalt RNA eller mRNA ekstrahert fra vev eller celler dyrket (og eventuelt behandlet med et middel av interesse) i enhver beholder, slik som brønnen i en flerbrønnsmikrotiterplate (f.eks. 96 eller 384 eller flere brønner)] kan f.eks. tilsettes til et testområde inneholdende en oligonukleotidprobe-rekke (se ovenfor) i en buffer som 6 x SSPE-T eller andre, eventuelt inneholdende et middel for å redusere uspesifikk binding (f.eks. ca. 0,5 mg/ml spaltet silde- eller lakse-sperma-DNA, eller gjær-RNA), og inkuberes ved en empirisk bestemt temperatur i en periode som varierer fra ca. 10 minutter til minst 18 timer (i en foretrukket utførelsesform ca. 3 timer). Stringensen av hybridiseringen kan være den samme eller mindre enn stringensen benyttet for å forbinde ankerene med den ankerspesifikke del av linkerne. Utformingen og anvendelsen av andre typer prober er også rutinemessig i teknikken, f.eks. som diskutert ovenfor.

De ankerspesifikke og målspesifikke deler av en linker kan være forbundet (festet, bundet) ved hjelp av enhver

av forskjellige kovalente eller ikke-kovalente bindinger, og beskaffenheten av disse er ikke essensiell for oppfinnelsen. De to delene kan være bundet direkte eller gjennom et inter-
mediært molekyl. I én utførelsesform, der begge deler av
5 linkerer er oligonukleotider, kan de være bundet ved kovalente bindinger, slik som fosfodiesterbindinger, for å danne en enkel, kolineær nukleinsyre. I en annen utførelsesform, der den ankerspesifikke del er et oligonukleotid og den målspe-
fikke del er en reseptor, f.eks. et reseptorprotein, kan de to
10 delene være bundet via interaksjonen av biotin- og strept-
avidinmolekyler, og et eksempel på dette er illustrert i figur 3. Mange variasjoner av slike bindinger er kjent (se f.eks. Niemeyer et al. (1994), NAR, 22, 5530-5539). Alternativt kan de to delene være bundet direkte, et oligonukleotid kan f.eks.
15 amideres og deretter bindes direkte (f.eks. kryssbindes) til et peptid eller et protein via en amidbinding, eller bindes til en membrankomponent via en amidbinding eller en lipid-tilknytning. Metoder for å danne slike kovalente eller ikke-kovalente bindinger er konvensjonelle og kan lett optimali-
20 seres av en fagperson.

Etter at to stoffer er forbundet med hverandre (f.eks. ved inkubasjon av to nukleinsyrer, to proteiner, et protein pluss en nukleinsyre eller andre) for å danne et kompleks (slik som f.eks. et anker-/linkerkompleks), kan det
25 resulterende kompleks eventuelt behandles (f.eks. vaskes) for å fjerne ubundne stoffer (f.eks. linkere) ved anvendelse av betingelser som bestemmes empirisk til å etterlate spesifikke interaksjoner intakte, men for å fjerne uspesifikt bundet materiale. Reaksjonsblandinger kan f.eks. vaskes mellom én og
30 tre ganger eller flere under de samme eller noe mer stringente betingelser enn dem som anvendes for å danne komplekset (f.eks. anker-/linkerkompleks).

Kombinasjonene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles rutinemessig ved anvendelse av konvensjonell
35 teknologi.

Noen av overflatene som kan anvendes ved foreliggende oppfinnelse, er lett tilgjengelige fra kommersielle leveran-
dører. I en foretrukket utførelsesform er overflaten en 96-,
384- eller 1536-brønners mikrotiterplate, slik som modifiserte

plater solgt av Corning Costar. Alternativt kan en overflate som omfatter brønner, som i sin tur omfatter perforeringer eller "fordypninger", dannes ved mikrobearbeidelse av et stoff, slik som aluminium eller stål, for å fremstille en støpeform, og deretter mikroinjeksjon av plast eller et lignende materiale i støpeformen for å danne en struktur, slik som illustrert i figur 4. Alternativt kan en struktur som vist i figur 4, bestående av glass, plast, keramikk eller lignende, sammensettes, f.eks. fra tre deler som illustrert i figur 5: en første del betegnet en brønnseparator (figur 5a), som vil danne skillene mellom prøvebrønnene; en andre del betegnet en underinndeler (figur 5b), som vil danne underinndelingene, eller fordypninger, innen hver testbrønn; og en tredje del betegnet en basis (figur 5c), som vil danne basisen på platen og den nedre overflate av testbrønnene. Separatoren kan f.eks. være et materiale, f.eks. silikon, med utsprede hull slik at hvert hull vil danne veggene i en testbrønn når de tre delene er sammenføyd. Underinndeleren kan f.eks. være et tynt materiale, f.eks. silikon, formet som et trådnnett eller et fint maskenett. Basis kan være et flatt materiale, f.eks. glass, f.eks. i form av den nedre del av en typisk mikroplate anvendt for en biokjemisk analyse. Toppoverflaten av basis kan være flat, som vist i figur 5c, eller den kan være utformet med perforeringer som vil passe sammen med underinndelerformen for å tilveiebringe hele underinndelinger, eller brønner, innen hver prøvebrønn. De tre delene kan være sammenbundet ved hjelp av standardprosedyrer, f.eks. prosedyrene anvendt ved sammensetning av silikonlaminater.

Oligonukleotidankere, linkerdelar eller detektorer kan syntetiseres ved hjelp av konvensjonell teknologi, f.eks. et kommersielt oligonukleotidsyntetiseringsapparat, og/eller ved ligering av subfragmenter som er blitt syntetisert. I én utførelsesform av oppfinnelsen kan forhåndsformede nukleinsyreankere, slik som oligonukleotidankere, plasseres på eller i overflaten av et testområde ved hjelp av enhver av forskjellige konvensjonelle teknikker, inkludert fotolitografisk eller silkeskjerm-kjemisk binding, anbringelse ved hjelp av blekkstråleteknologi, kapillær-, screen- eller fluidkanal-"chip", elektrokjemisk mønsterstøping ved anvendelse av elektrode-

rekker, radering med en nål eller en pigg eller denaturering etterfulgt av brenning eller UV-bestråling på filteret (se f.eks. Rava et al. (1996), US-patent nr. 5 545 531; Fodor et al. (1996), US-patent nr. 5 510 270; Zanzucchi et al. (1979),
5 US-patent nr. 5 643 738; Brennan (1995), US-patent nr. 5 474 796; PCT WO 92/10092; PCT WO 90/15070. Ankere kan plasseres på toppen av overflaten av et testområde eller kan f.eks. for en polyakrylamidgelpute innstøpes i overflaten på en slik måte at noe av ankeret stikker ut fra overflaten og er
10 tilgjengelig for interaksjoner med linkeren. I en foretrukket utførelsesform blir forhåndsformede oligonukleotidankere derivatisert ved 5'-enden med en fri aminogruppe; oppløst i en konsentrasjon som rutinemessig bestemmes empirisk (f.eks. ca. 1 μ M), i en buffer, slik som 50 mM fosfatbuffer, pH 8,5, og
15 1 mM EDTA; og fordeles med en Pixus nanojet-dispenser (Cartesian Technologies) i dråper på ca. 10,4 nanoliter på forskjellige steder i en testbrønn hvis øvre overflate er en frisk, tørr DNA-bindingsplate (Corning Costar). Avhengig av den relative hastighet for oligonukleotidbinding og for-
20 dampning kan det være påkrevd å kontrollere fuktigheten i brønnene under prepareringen. I en annen utførelsesform kan oligonukleotidankere syntetiseres direkte på overflaten av et testområde ved anvendelse av konvensjonelle metoder, slik som f.eks. lysaktivert avbeskyttelse av voksende oligonukleotid-
25 kjeder (f.eks. i forbindelse med anvendelse av en setedirigerende "maske") eller ved hjelp av mønstret applisering av nanoliterdråper av deaktiverende forbindelse ved anvendelse av en nanojet-dispenser. Avbeskyttelse av alle voksende sekvenser som skal motta ett enkelt nukleotid, kan f.eks. utføres, og
30 nukleotidet kan deretter tilsettes gjennom overflaten.

Peptider, proteiner, lektiner, chelatdannende utførelsesformer, plast og andre typer ankere eller linkerdelene kan også dannes rutinemessig, og ankere kan plasseres på eller i overflater ved anvendelse av passende tilgjengelig teknologi
35 (se f.eks. Fodor et al. (1996), US-patent nr. 5 510 270; Pirrung et al. (1992), US-patent nr. 5 143 854; Zanzucchi et al. (1979), US-patent nr. 5 643 738; Lowe et al. (1985), US-patent nr. 4 562 157; Niemeyer et al. (1994), NAR, 22, 5530-5539).

I noen utførelsesformer av oppfinnelsen anvendes de beskrevne kombinasjoner i mange forskjellige screeningsprosedyrer og/eller for å oppnå informasjon om nivå, aktivitet eller struktur av probene eller målmolekylene. Slike analyser er betegnet Multi Array Plate Screen(MAPS)-metoder eller
5 -analyser, og overflatene som omfatter rekker av ankere eller ankere pluss prober som anvendes for analysene, betegnes som MAPS-rekker eller MAPS-plater.

Komponentene av en reaksjonsblanding, analyse eller
10 screeningsprosedyre kan samles i enhver rekkefølge. Ankere, linkere og mål kan f.eks. sammensettes sekvensielt; eller mål og linkere, i nærvær eller fravær av rapportører, kan samles i løsning og deretter bringes i kontakt med ankerene.

En utførelsesform angår en fremgangsmåte for
15 påvisning av minst ett mål, omfattende:

a) en prøve som kan omfatte målet (målene), bringes i kontakt med en bifunksjonell linker som inneholder en første del som er spesifikk for et oligonukleotidanker, og en andre del som omfatter en probe som er spesifikk for målet (målene),
20 under betingelser som er effektive for å oppnå et første hybridiseringsprodukt mellom målet (målene) og linkeren,

b) det første hybridiseringsprodukt bringes i kontakt med en kombinasjon under betingelser som er effektive for å oppnå et andre hybridiseringsprodukt mellom det første hybridiseringsprodukt og kombinasjonen, hvori kombinasjonen omfatter, før tilsetning av det første hybridiseringsprodukt,
25

1) en overflate som omfatter et stort antall romlig atskilte områder, der minst to av disse er vesentlig identiske, og der hvert område omfatter:

30 2) minst åtte forskjellige oligonukleotidankere,

c) det første hybridiseringsprodukt eller det andre hybridiseringsprodukt bringes i kontakt med en merket detektorprobe, og

d) detektorproben påvises.

35 Hver av analysene eller prosedyrene beskrevet nedenfor kan utføres på en høyeffektiv måte, hvor et stort antall prøver (f.eks. så mange som ca. 864, 1036, 1536, 2025 eller flere, avhengig av antallet områder i kombinasjonen) blir analysert på hver plate eller overflate hurtig og samtidig.

Mange plater eller overflater kan dessuten bearbeides samtidig. Ved metoder for oppdagelse av legemidler kan f.eks. et stort antall prøver som hver omfatter en legemiddelkandidat (f.eks. et medlem av et kombinatorisk kjemisk bibliotek, slik
5 som varianter av små molekyler, peptider, oligonukleotider eller andre stoffer), tilsettes for å separere områder av en kombinasjon som ønsket, eller de kan tilsettes til biologiske eller biokjemiske prøver som deretter tilsettes til separate områder av en kombinasjon, og inkuberes med proberekker
10 lokalisert i områdene; og analyser kan utføres på hver av prøvene. Ved den senere fremkomst og fortsatte utvikling av høydensitetsmikroplater, DNA-flekkingsverktøy og metoder som laserteknologi for å danne og oppsamle data fra enda tettere mikroplater, robotteknikk, forbedrede dispensere, raffinerte
15 deteksjonssystemer og datasystemer kan metodene ifølge foreliggende oppfinnelse anvendes for å screene eller analysere tusener eller titusener eller flere forbindelser pr. dag.

I utførelsesformer hvori probene er oligonukleotider, kan f.eks. analysen være en diagnostisk nukleinsyre- eller
20 polynukleotidscreening (f.eks. en bindingsanalyse eller annen analyse) av et stort antall prøver for tilstedeværelse av genetiske variasjoner eller defekter (f.eks. polymorfisme eller spesifikke mutasjoner forbundet med sykdommer som cystisk fibrose, se f.eks. Iitia et al. (1992), Molecular and
25 Cellular Probes, 6, 505-512); patogene organismer (slik som bakterier, virus og protozoer hvis verter er dyr, inkludert mennesker, eller planter), eller mRNA-transkripsjonsmønstre som er diagnostiske for spesielle fysiologiske tilstander eller sykdommer. Nukleinsyreproberekker omfattende deler av
30 EST (inkludert fullengdede kopier) kan anvendes for å evaluere transkripsjonsmønstre produsert av celler fra hvilke EST ble avledet (eller andre). Nukleinsyreprober kan også påvise peptider, proteiner eller proteindomener som bindes spesifikt til spesielle nukleinsyresekvenser (og vice versa).

35 I en annen utførelsesform kan kombinasjonene ifølge oppfinnelsen anvendes for å overvåke biokjemiske reaksjoner, slik som f.eks. interaksjoner av proteiner, nukleinsyrer, små molekyler eller lignende - f.eks. effektiviteten eller spesifisiteten av interaksjoner mellom antigener og antistoffer;

eller av reseptorer (slik som rensede reseptorer eller reseptorer bundet til cellemembraner) og deres ligander, agonister eller antagonist; eller av enzymer (slik som proteaser eller kinaser) og deres substrater, eller økninger eller reduksjoner i mengden av substrat omdannet til et produkt; så vel som mange andre. Slike biokjemiske analyser kan anvendes for å karakterisere egenskapene til proben eller målet, eller som basis for en screeningsanalyse. For å screene prøver for tilstedeværelse av spesielle proteaser (f.eks. proteaser involvert i blodkoagulasjon, slik som proteaser Xa og VIIa) kan f.eks. prøvene analyseres på kombinasjoner hvori probene er fluorogene substrater som er spesifikke for hver protease av interesse. Hvis en målprotease bindes til og spalter et substrat, vil substratet fluorescere, vanligvis som et resultat av f.eks. spaltning og separering mellom de to energioverføringspar, og signalet kan påvises. I et annet eksempel kan, for å screene prøver for tilstedeværelse av en spesiell kinase (f.eks. Src, tyrosinkinase eller ZAP70), prøver inneholdende én eller flere kinaser av interesse analyseres på kombinasjoner hvori probene er peptider som kan fosforyleres selektivt av én av kinasene av interesse. Ved anvendelse av kjente betingelser som kan bestemmes rutinemessig, kan prøver inkuberes med rekken av substrater i en egnet buffer og med de nødvendige kofaktorer i en empirisk bestemt tidsperiode. (I noen analyser, f.eks. for biokjemiske studier av faktorer som regulerer aktiviteten av kinaser av interesse, kan konsentrasjonen av hver kinase justeres slik at hvert substrat fosforyleres med en lignende hastighet.) Etter behandling (f.eks. vasking) av hver reaksjonsblanding under empirisk bestemte betingelser for å fjerne kinaser og uønskede reaksjonskomponenter (eventuelt), kan de fosforylerte substrater påvises ved f.eks. inkubasjon med detekterbare reagenser, slik som f.eks. fluoresceinmerkede antifosfotyrosin- eller antifosfoserin-antistoffer (f.eks. i en konsentrasjon på ca. 10 nM eller mer eller mindre), og signalet kan påvises. I et annet eksempel kan bindingsanalyser utføres. For eksempel kan SH2-domener, slik som GRB2-SH2 eller ZAP70-SH2, analyseres på proberekker av passende fosforylerte peptider; eller blodsera kan screenes på proberekker av spesielle reseptorer for tilstedeværelse av

immunmangler. Enzymbundet analyse kan også utføres i et slikt analyserekkeformat. Kombinasjoner ifølge oppfinnelsen kan også anvendes for å påvise mutante enzymer som er enten mer eller mindre aktive enn deres villtypemotparter, eller for å screene
5 for forskjellige midler, inkludert herbicider eller pesticider.

MAPS-analyser kan selvsagt anvendes for å kvantifisere (måle, mengdebestemme) mengden av aktivt mål i en prøve, forutsatt at proben ikke er fullstendig okkupert, det vil si
10 at ikke mer enn ca. 90 % av de tilgjengelige probeseter er bundet (eller reagert eller hybridisert) med mål. Under disse betingelser kan mål kvantifiseres fordi mer mål vil resultere i mer probe bundet. På den annen side vil under betingelser hvor mer enn ca. 90 % av tilgjengelige probeseter er bundet,
15 mer tilstedeværende mål ikke vesentlig øke mengden av mål bundet til probe. Enhver av de hittil nevnte typer mål kan kvantifiseres på denne måten. Eksempel 6 beskriver f.eks. kvantifisering av oligonukleotidmål. Det viser dessuten at selv hvis et mål er til stede i stort overskudd (f.eks. hvis
20 det er til stede i slike store mengder at det metter mengden av tilgjengelig probe i en MAPS-proberekke) ved tilsetning av kjente mengder umerket mål til bindingsblandingen, kan man "skifte sensitiviteten" av reaksjonen for å tillate at selv slike store mengder mål kan kvantifiseres.

25 I en annen utførelsesform kan kombinasjoner ifølge oppfinnelsen anvendes for å screene for midler som modulerer interaksjonen av et mål og en gitt probe. Et middel kan modulere mål-/probeinteraksjonen ved å reagere direkte eller indirekte med enten proben, målet eller et kompleks dannet av
30 målet pluss proben. Moduleringen kan innta forskjellige former, inkludert, men ikke begrenset til, en økning eller reduksjon i bindingsaffiniteten av målet for proben, en økning eller reduksjon av hastigheten ved hvilken målet og proben bindes, en kompetitiv eller ikke-kompetitiv inhibering av
35 bindingen av proben til målet, eller en økning eller reduksjon av aktiviteten av proben eller målet som i noen tilfeller kan føre til en økning eller reduksjon av probe-/målinteraksjonen. Slike midler kan være kunstig syntetiserte eller naturlig forekommende stoffer. Slike midler kan også benyttes i uendret

tilstand eller som aggregater med andre stoffer; og de kan bindes, kovalent eller ikke-kovalent, til et bindingsmedlem, enten direkte eller via et spesifikt bindingsstoff. For å identifisere potensielle "blodtynnere", eller midler som reagerer med en av kaskaden av proteaser som forårsaker blod-koagulasjon, kan f.eks. blandinger av proteasene av interesse testes med mange forskjellige kandidatmidler og deretter testes for aktivitet, som beskrevet nedenfor. Andre eksempler på midler som kan anvendes ved foreliggende oppfinnelse, er meget uensartede og inkluderer pesticider og herbicider. Eksempelene 16 og 17 beskriver høyeffektive analyser for midler som selektivt inhiberer spesifikke kinaser, eller for selektive inhibitorer av interaksjonen mellom SH2-domener og fosforylerte peptider.

I en annen utførelsesform kan kombinasjonene ifølge oppfinnelsen anvendes for å screene for midler som modulerer et mønster av genekspresjon. Rekker av oligonukleotider kan anvendes, f.eks. for å identifisere mRNA-typer hvis mønster for ekspresjon fra et sett av gener er korrelert med en spesiell fysiologisk tilstand eller et utviklingsstadium, eller med en sykdomstilstand ("korrelative" gener, RNA eller ekspresjonsmønstre). Med betegnelsen "korrelere" eller "korrelativ" er det ment at syntesemønsteret for RNA er assosiert med den fysiologiske tilstand av en celle, men ikke nødvendigvis at ekspresjonen av et gitt RNA er ansvarlig for, eller årsaken til, en spesiell fysiologisk tilstand. Det kan f.eks. identifiseres et lite undersett av mRNA som blir uttrykt, oppregulert og/eller nedregulert i celler som tjener som en modell for en spesiell sykdomstilstand; dette endrede ekspresjonsmønster, sammenlignet med mønsteret i en normal celle som ikke oppviser en patologisk fenotype, kan tjene som en indikator for sykdomstilstanden ("indikator"-gener, RNA eller ekspresjonsmønstre). Betegnelsene "korrelativ" og "indikator" kan anvendes om hverandre. Celler behandlet med en tumorpromotor, slik som forbolmyristat, kan f.eks. oppvise et mønster for genekspresjon som etterligner mønsteret observert i de tidlige stadier av tumorvekst. I en annen modell for cancer oppviser museinsulinomceller (f.eks. cellelinje TGP61), når den infiseres med adenovirus, en økning i ekspresjonen av

f.eks. c-Jun og MIP-2, mens ekspresjonen av husholdningsgener, slik som GAPDH og L32, forblir vesentlig upåvirket.

Midler som etter at de er brakt i kontakt med en celle fra en sykdomsmodell, enten direkte eller indirekte, og
5 enten *in vivo* eller *in vitro* (f.eks. i vevskultur), modulerer indikatorekspresjonsmønsteret, kan virke som terapeutiske midler eller legemidler for organismer (f.eks. humane eller andre dyrepasienter, eller planter) som lider av sykdommen. Midler kan også modulere ekspresjonsmønsteret ved å kontakte
10 nukleinsyren direkte, f.eks. i et *in vitro* (testrør) ekspressjonssystem. Som anvendt heri, betyr "modulere" å forårsake å øke eller redusere mengden og/eller aktiviteten av et molekyl eller lignende som er involvert i en målbar reaksjon. Kombinasjonene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes for å
15 screene for slike midler. En serie av celler (f.eks. fra en sykdomsmodell) kan f.eks. bringes i kontakt med en serie midler (f.eks. for en tidsperiode som varierer fra ca. 10 minutter til ca. 48 timer eller mer), og ved anvendelse av rutinemessige, kjente metoder i teknikken (f.eks. kommersielt
20 tilgjengelige sett) kan det lages ekstrakter av totalt RNA eller mRNA. Hvis det er ønsket å amplifisere mengden av RNA, kan det benyttes standardprosedyrer, slik som RT-PCR-amplifikasjon (se f.eks. Innis et al., red. (1996), PCR Protocols: A Guide to Methods in Amplification, Academic Press, New
25 York). Ekstraktene (eller amplifiserte produkter fra disse) kan tillates å komme i kontakt (f.eks. inkubere med) mange forskjellige, vesentlig identiske rekker som omfatter prober for passende indikator-RNA, og de midler som er assosiert med en endring i indikatorekspresjonsmønsteret, kan identifiseres.
30 Eksempel 15 beskriver en høyeffektiv analyse for å screene for forbindelser som kan endre ekspresjonen av gener som korrelerer med en sykdomstilstand.

Midler kan likeledes identifiseres som modulerer ekspresjonsmønsteret assosiert med spesielle fysiologiske
35 tilstander eller utviklingsstadier. Slike midler kan være syntetiserte eller naturlig forekommende stoffer, inkludert miljøfaktorer, slik som stoffer involvert i embryonisk utvikling eller regulering av fysiologiske reaksjoner, eller stoffer som er viktige for jordbruksøkonomi, slik som pesti-

cider eller herbicider. Slike midler kan også benyttes i uendret tilstand eller som aggregater med andre stoffer; og de kan være bundet, kovalent eller ikke-kovalent, til et bindingsmedlem, enten direkte eller via et spesifikt bindings-
5 stoff.

En annen utførelsesform av oppfinnelsen er et sett anvendelig for påvisning av minst ett mål i en prøve, omfattende:

a) en overflate som omfatter et stort antall romlig
10 atskilte områder, hvor minst to av disse er hovedsakelig identiske, og hvert område omfatter minst åtte forskjellige ankere (oligonukleotid eller en av de andre typer beskrevet heri), og

b) en beholder omfattende minst ett bifunksjonelt
15 linkermolekyl som inneholder en første del som er spesifikk for minst ett av ankerene, og en andre del som omfatter en probe som er spesifikk for minst ett av målene.

I én utførelsesform tilveiebringes en overflate som beskrevet i a) ovenfor og et sett av instruksjoner for til-
20 knytning til minst ett av ankerene som et bifunksjonelt linkermolekyl som inneholder en første del som er spesifikk for minst ett av ankerene, og en andre del som omfatter en probe som er spesifikk for minst ett mål. Instruksjonene kan f.eks. inkludere (men er ikke begrenset til) en beskrivelse av
25 hvert av ankerene på overflaten, en indikasjon på hvor mange ankere som finnes og hvor på overflaten de er lokalisert, og en protokoll for spesifikk tilknytning (assosiasjon, binding etc.) av linkerne til ankerene. Dersom ankerene er oligonukleotider, kan instruksjonene f.eks. inkludere sekvensen for
30 hvert anker, og fra disse kan en utøver utforme komplementære ankerspesifikke deler av linkere som skal reagere spesifikt med (f.eks. hybridisere til) ankerene; dersom ankerene er peptider, kan instruksjonene gi informasjon om f.eks. anti-stoffer som vil reagere spesifikt med peptidene. Instruksjonene kan også inkludere en protokoll for sammenbinding av
35 ankerene og linkerne, f.eks. betingelser og reagenser for hybridisering (eller annen type binding), slik som temperatur og inkubasjonstid, betingelser og reagenser for fjerning av uassosierte molekyler (f.eks. vask) og lignende. Instruk-

sjonene kan dessuten inkludere informasjon og konstruksjonen og anvendelsen av enhver av typene av kontrollinkere diskutert heri, og metoder for f.eks. å kvantifisere, normalisere, "fine tune" eller kalibrere analyser som skal utføres med kombinasjonene. Instruksjonene kan omfatte enhver av parameterne, betingelsene eller utførelsesformene beskrevet i foreliggende patentsøknad, som alle kan utføres rutinemessig ved hjelp av konvensjonelle prosedyrer av en fagperson.

Som diskutert på annet sted i foreliggende patent-søknad, kan en utøver feste til en overflate ifølge oppfinnelsen, som omfatter en gitt rekke (eller rekker) ankere, mange forskjellige typer linkere, for derved å programmere enhver av et stort antall proberekker. En utøver kan dessuten fjerne et gitt sett av linkere fra en overflate ifølge oppfinnelsen og tilføye til denne et annet sett av linkere (enten det samme eller forskjellig fra det første sett), hvilket tillater at en gitt overflate kan gjenbrukes mange ganger. Denne fleksibilitet og gjenbrukbarhet utgjør ytterligere fordeler ved oppfinnelsen.

I en annen utførelsesform kan kombinasjoner ifølge oppfinnelsen anvendes for å kartlegge EST (Expressed Sequence Tags). Det vil si at MAPS-analyser kan anvendes for å bestemme hvilke, hvis noen, av en gruppe av EST som ble dannet fra forskjellige (eller delvis overlappende) deler av det samme gen (gener), og hvilke, hvis noen, som er unike. Figurene 18, 19, 20 og 21 illustrerer en slik analyse, i dette eksemplet en analyse for å bestemme hvilke, hvis noen, av 16 EST som er "bundet" til et felles gen. Et første trinn i analysen (se figur 18) er å samle rekker hvori hver av EST som skal kartlegges, er representert med minst én oligonukleotidprobe som tilsvarende denne. Et antall rekker som er likt (eller høyere enn) antallet EST som skal kartlegges, fordeles i separate områder (f.eks. brønner) av en overflate; i det illustrerte eksempel omfatter overflaten av kombinasjonen 16 brønner, som alle inneholder en rekke av 16 forskjellige EST-spesifikke oligonukleotider, nummerert 1-16. Et oligonukleotid som "tilsvarende" en EST (er "EST-spesifikt"), er et som er tilstrekkelig komplementært med en EST, slik at under utvalgte stringente hybridiseringsbetingelser vil oligonukleotidet

hybridisere spesifikt til denne EST, men ikke til andre ubeslektede EST. En EST tilsvarende et oligonukleotid av denne typen kan bindes spesifikt (under optimale betingelser) til den kodende eller ikke-kodende tråd av et cDNA syntetisert fra genet som EST ble dannet fra, eller til et mRNA syntetisert fra genet som EST opprinnelig ble dannet fra. Faktorer som skal vurderes ved utforming av oligonukleotider, og hybridiseringsparametere som skal optimaliseres for å oppnå spesifikk hybridisering, er diskutert på annet sted i foreliggende patentsøknad. For å sammensette rekkene fremstilles linker-molekyler som alle omfatter en del som er spesifikk for et av ankerene i en genetisk rekke pluss en del som omfatter en oligonukleotidprobe som tilsvarende en av EST som skal kartlegges; og linkerne er festet til ankere, som beskrevet på annet sted i foreliggende patentsøknad. I et etterfølgende trinn blir en aliquot av en prøve som omfatter en blanding av nukleinsyrer (f.eks. mRNA eller enkelttrådet eller denaturert cDNA), som kan inneholde sekvenser som er komplementære med én eller flere av oligonukleotidprobene, tilsatt til hvert av områdene (brønner) som omfatter en proberekke; blandingen inkuberes deretter under rutinemessig bestemte, optimale betingelser, som derved tillater at nukleinsyre bindes til komplementære prober. Hvis flere av de EST-spesifikke prober er komplementære med forskjellige deler av en enkelt nukleinsyre, så vil denne nukleinsyren bindes til hvert av stedene i rekken som en av disse prober er lokalisert til.

I et etterfølgende trinn blir et forskjellig detektoroligonukleotid (i det illustrerte eksempel detektorer nr. 1-16) tilsatt til hvert område (brønn) (se figur 19). Et detektoroligonukleotid blir utformet for hver av EST som skal kartlegges. Hver EST-spesifikk detektor tilsvarende en forskjellig (minst delvis ikke-overlappende) del av EST enn det probeoligonukleotidet gjør, slik at probe- og detektoroligonukleotidene ikke forstyrrer hverandre. Vurder f.eks. EST avbildet i figur 21, som tilsvarende EST 1, 2 og 6 på figurene 18-20. Figur 21 indikerer at EST nr. 1 og nr. 2 begge ble oppnådd fra gen X (de er "bundet"), mens EST nr. 6 ble oppnådd fra et forskjellig, ubeslektet gen. Hvis aliquoter av en prøve inneholdende en blanding av mRNA, inkludert en dannet fra gen

X, blir inkubert med proberekkene vist i figurene 18-20, vil gen X-mRNA under optimale betingelser hybridisere på stedet med prober 1 og 2, men ikke med probe 6. (Hvert mRNA må selv-
sagt tilsettes i molart overskudd i forhold til summen av
5 probene som det kan hybridisere til.) Hvis detektoroligo-
nukleotid 1 tilsettes til område (brønn) 1, vil det hybridisere til gen X-mRNA som er bundet på stedene 1 og 2 av probe-
rekken, men ikke på sted 6. Hvis likeledes detektoroligo-
nukleotid 2 tilsettes til en annen brønn - f.eks. brønn nr. 2
10 - vil det altså bindes på stedene 1 og 2, men ikke 6. På denne måten kan man bestemme på en høyeffektiv måte hvilke av EST som er bundet, f.eks. koder for deler av det samme gen, og hvilke EST som er unike. For det hypotetiske eksempel vist i figur 20 koder de første 3 EST for deler av det samme gen, de
15 siste 5 EST koder for deler av et annet gen, og de resterende EST synes ikke å være bundet. Betingelser for hybridisering, eventuelle vasketrinn, påvisningsmetoder og lignende er diskutert på annet sted i foreliggende patentsøknad med hensyn til andre MAPS-analyser. For å bekrefte bindingsdataene oppnådd
20 ved hjelp av MAPS-analysen kan PCR-reaksjoner utføres ved anvendelse av par av EST-spesifikke oligonukleotidprober som sense- og antisenseprimere. Hvert par av bundne EST bør gi et PCR-produkt. Legg merke til at denne parvise PCR-test kan utføres for å bestemme binding direkte uten anvendelse av
25 bindings-MAPS-analysen; men mange reaksjoner vil imidlertid fordres, og hver EST-primer ville måtte syntetiseres som både sense- og antisensetråder. For det illustrerte eksempel ville det kreves 180 slike reaksjoner.

I ett aspekt beskrives en fremgangsmåte for bestemmelse av hvilke av mange forskjellige EST som er komplementære med en gitt nukleinsyre, omfattende:

a) inkubasjon av en immobilisert rekke av oligonukleotidprober, der minst én av disse tilsvarer hver av EST, med en testprøve som kan inneholde den gitte nukleinsyre for å
35 oppnå et hybridiseringsprodukt mellom oligonukleotidprobene og nukleinsyren,

b) inkubasjon av hybridiseringsproduktet med et detektoroligonukleotid som tilsvarer en EST som en av oligonukleotidprobene tilsvarer, men som er spesifikk for en for-

skjellig del av EST enn det oligonukleotidproben er spesifikk for, og

c) påvisning av hvilke oligonukleotidprober av rekken som er merket av detektoroligonukleotidet,

5 hvori rekken av oligonukleotidprober er immobilisert på et område av en kombinasjon som omfatter:

1) en overflate som omfatter et antall romlig atskilte, vesentlig identiske områder som er like mange som antallet EST som skal undersøkes, der hvert område omfatter:

10 2) et antall forskjellige ankere som er like mange som antallet EST som skal undersøkes, der hvert anker er forbundet med:

3) en bifunksjonell linker som inneholder en første del som er spesifikk for ankeret, og en andre del som omfatter
15 en oligonukleotidprobe som tilsvarer minst én av EST.

I et annet aspekt beskrives en fremgangsmåte som beskrevet ovenfor, hvori én eller flere av EST kan være komplementære med nukleinsyren, og hvori hver av EST omfatter to forskjellige oligonukleotidsekvenser, der den første av
20 disse definerer en oligonukleotidprobe som tilsvarer EST, og den andre av disse definerer et detektoroligonukleotid som tilsvarer EST, omfattende:

a) en prøve som omfatter molekyler av nukleinsyren bringes i kontakt med minst ett område av en kombinasjon,
25 hvori området omfatter en rekke oligonukleotidprober, der minst én av disse tilsvarer hver av EST,

b) prøven inkuberes med området, hvilket derved tillater at molekyler av nukleinsyren bindes til de EST-tilsvarende oligonukleotidprober som er komplementære med deler
30 av nukleinsyren,

c) området som omfatter molekyler av nukleinsyren bundet til én eller flere av de EST-tilsvarende oligonukleotidprober, inkuberes med et detektoroligonukleotid som tilsvarer en EST, som en gitt av oligonukleotidprobene i rekken
35 tilsvarer, hvilket derved binder detektoroligonukleotider til nukleinsyremolekyler som er bundet til den gitte oligonukleotidprobe, eller til andre oligonukleotidprober som er komplementære med nukleinsyren,

d) tilstedeværelse av detektoroligonukleotidene påvises, hvilket derved identifiserer hvilke EST-tilsvarende oligonukleotidprober av rekken som er komplementære med deler av en nukleinsyre som bindes til den gitte oligonukleotid-EST-tilsvarende probe, hvilket derved identifiserer hvilke EST som er komplementære med den gitte nukleinsyre,

hvor i rekken av oligonukleotidprober er immobilisert på et område av en kombinasjon som omfatter:

1) en overflate som omfatter et antall romlig atskilte, vesentlig identiske områder som er like mange som antallet EST som skal undersøkes, der hvert område omfatter:

2) et antall forskjellige ankere som er like mange som antallet EST som skal undersøkes, der hvert anker er forbundet med:

3) en bifunksjonell linker som inneholder en første del som er spesifikk for ankeret, og en andre del som omfatter en oligonukleotidprobe som tilsvare minst én av EST.

Komponentene i en EST-kartleggingsanalyse kan sammen-settes i enhver rekkefølge. Ankerene, linkerne og EST kan f.eks. sammensettes sekvensielt; eller linkere og EST, i nær-vær eller fravær av rapportører, kan sammensettes i oppløsning og deretter tilsettes til ankerene.

I et annet aspekt beskrives en fremgangsmåte for bestemmelse av hvilke av mange forskjellige EST som er komplementære med en gitt nukleinsyre, omfattende:

a) inkubasjon av en samling av bifunksjonelle oligonukleotidlinkermolekyler, som hvert omfatter en første del som er en probe som tilsvare minst én av EST, og en andre del som er spesifikk for et ankeroligonukleotid, med en testprøve som kan inneholde den gitte nukleinsyre, for å oppnå et første hybridiseringsprodukt mellom oligonukleotidprobene og nukleinsyren,

b) inkubasjon av det første hybridiseringsprodukt med en immobilisert rekke av ankeroligonukleotider, hvor i hvert ankeroligonukleotid tilsvare den ankerspesifikke del av minst ett av linkermolekylene, for å danne et andre hybridiseringsprodukt som omfatter ankerene, oligonukleotidprobene og nukleinsyren, og

c) inkubasjon av enten det første eller det andre hybridiseringsprodukt med et detektoroligonukleotid som tilsvarer en EST som en av oligonukleotidprobene tilsvarer, men som er spesifikt for en forskjellig del av EST enn det oligonukleotidproben er spesifikk for, og

d) påvisning av hvilke oligonukleotidprober av rekken som er merket av detektoroligonukleotidet,

hvor i rekken av ankeroligonukleotider immobilisert på et område av en kombinasjon omfatter:

1) en overflate som omfatter et antall romlig atskilte, vesentlig identiske områder som er like mange som antallet EST som skal undersøkes, der hvert område omfatter:

2) et antall forskjellige ankere som er like mange som antallet EST som skal undersøkes.

De ovenfor beskrevne metoder for kartlegging av EST kan selvsagt anvendes for å kartlegge testsekvenser (f.eks. polynukleotider) på enhver nukleinsyre av interesse. Det kan f.eks. bestemmes hvorvidt to eller flere klonede DNA-fragmenter eller cDNA kartlegges til det samme genomiske DNA. En slik prosedyre kan f.eks. være en hjelp ved den strukturelle belysning av lange, komplekse gener. På lignende måte kan det bestemmes hvorvidt én eller flere spleisede sekvenser eller kodingssekvenser kartlegges til det samme genomiske DNA. En slik bestemmelse kan f.eks. anvendes i en diagnostisk test for å skjelne mellom en normal og en sykdomstilstand, som er kjennetegnet ved forskjellige spleisingsmønstre. Mange andre anvendelser av kartleggingsmetoden vil fremgå for en fagperson.

I et annet aspekt beskrives en fremgangsmåte for bestemmelse av hvilke av et stort antall polynukleotider som er komplementære med en gitt nukleinsyre, hvor i ett eller flere av polynukleotidene kan være komplementære med nukleinsyren, og hvor i hvert av polynukleotidene omfatter to forskjellige oligonukleotidsekvenser, der den første av disse definerer en oligonukleotidprobe som tilsvarer polynukleotidet, og den andre av disse definerer et detektoroligonukleotid som tilsvarer polynukleotidet, omfattende:

a) en prøve som omfatter molekyler av nukleinsyren bringes i kontakt med minst ett område av en kombinasjon,

hvor i dette området omfatter en rekke oligonukleotidprober, der minst én av disse tilsvarende hvert av polynukleotidene,

b) prøven inkuberes med området, hvilket derved tillater at molekyler av nukleinsyren bindes til de polynukleotidtilsvarende oligonukleotidprober som er komplementære med deler av nukleinsyren,

c) området som omfatter molekyler av nukleinsyren bundet til én eller flere av de polynukleotidtilsvarende oligonukleotidprober, inkuberes med et detektoroligonukleotid som tilsvarende et polynukleotid, som en gitt av oligonukleotidprobene i rekken tilsvarende, hvilket derved binder detektoroligonukleotidene til nukleinsyremolekylene som er bundet til den gitte oligonukleotidprobe, eller til andre oligonukleotidprober som er komplementære med nukleinsyren,

d) tilstedeværelse av detektoroligonukleotidene påvises, hvilket derved identifiserer hvilke polynukleotidtilsvarende oligonukleotidprober av rekken som er komplementære med deler av en nukleinsyre som bindes til den gitte oligonukleotidpolynukleotid-tilsvarende probe, hvilket derved identifiserer hvilke polynukleotider som er komplementære med den gitte nukleinsyre,

hvor i rekken av oligonukleotidprober er immobilisert på et område av en kombinasjon som omfatter:

1) en overflate som omfatter et antall romlig atskilte, vesentlig identiske områder som er like mange som antallet polynukleotider som skal undersøkes, der hvert område omfatter:

2) et antall forskjellige ankere som er like mange som antallet polynukleotider som skal undersøkes, der hvert anker er forbundet med:

3) en bifunksjonell linker som inneholder en første del som er spesifikk for ankeret, og en andre del som omfatter en oligonukleotidprobe som tilsvarende minst ett av polynukleotidene.

I et annet aspekt av oppfinnelsen omfatter videre de ovenfor beskrevne metoder for å kartlegge EST eller andre polynukleotider fjerning av ubundne deler av prøven mellom ett eller flere av trinnene.

I en annen utførelsesform blir ett eller flere RNA-mål av interesse (f.eks. mRNA eller andre typer av RNA) omdannet til cDNA ved hjelp av reverstranskriptase, og disse cDNA blir deretter hybridisert til en proberekke. Denne typen analyse er illustrert skjematisk i figur 8. RNA-ekstrakter (eller rensset mRNA) prepareres fra celler eller vev, som beskrevet heri. Reverstranskriptase og oligonukleotidprimere som er spesifikke for RNA av interesse, tilsettes deretter til RNA-prøven, og ved anvendelse av kjente betingelser og prosedyrer som kan bestemmes og optimaliseres rutinemessig, dannes de første tråder av cDNA. Betegnelsen "spesifikk" primer refererer til en primer som er tilstrekkelig komplementær med et mRNA av interesse for å bindes til dette under utvalgte stringente hybridiseringsbetingelser og bli gjenkjent av reverstranskriptase, men som ikke bindes til uønsket nukleinsyre (se ovenfor for en diskusjon om passende reaksjonsbetingelser for å oppnå spesifikk hybridisering). Resterende RNA-mRNA som ikke ble gjenkjent av de spesifikke primere og/eller andre typer av kontaminerende RNA i en RNA-ekstrakt, slik som tRNA eller rRNA, kan fjernes med enhver av forskjellige ribonukleaser eller ved hjelp av kjemiske prosedyrer, slik som behandling med alkali, som etterlater det enkelttrådede cDNA, som deretter bringes i kontakt med en MAPS-proberekke. Anvendelsen av reverstranskriptase ved denne fremgangsmåten minimaliserer behovet for omfattende håndtering av RNA, som kan være sensitivt for nedbrytning av nukleaser og således vanskelig å arbeide med. Den ytterligere spesifisitet forårsaket av de spesifikke reverstranskriptaseprimere gir dessuten analysen ytterligere spesifisitet.

cDNA beskrevet ovenfor kan eventuelt amplifiseres før hybridisering til proberekken for å øke signalstyrken. Oligonukleotid-reverstranskriptaseprimere beskrevet ovenfor kan omfatte, ved deres 5'-ender, sekvenser (som kan være ca. 22-27 nukleotider lange) som spesifiserer initieringsseter for en RNA-polymerase (f.eks. T7-, T3- eller SP2-polymerase eller lignende). I eksemplet vist i figur 8 er en T7-promotorsekvens tilføyd til reverstranskriptaseprimeren. Polymerasegjenkjennessettet blir inkorporert i cDNA og kan deretter tjene som et gjenkjennessete for et stort antall transkripsjonsrunder

ved hjelp av den egnede RNA-polymerase (*in vitro*-transkripsjon, eller IVT). De således dannede mRNA kan eventuelt amplifiseres videre ved anvendelse av PCR og passende primer, eller selve cDNA kan amplifiseres. Prosedyrer for transkripsjon og
5 PCR er rutinemessige og velkjente i teknikken.

Den ovenfor beskrevne metode, hvori mRNA-mål omdannes til cDNA med reverstranskriptase før analysering på MAPS-plater, kan anvendes istedenfor standard-MAPS-analyseprosedyren for enhver av de RNA-baserte analyser beskrevet ovenfor.

10 I en annen utførelsesform blir ett eller flere nukleinsyremål av interesse hybridisert til spesifikke polynukleotidbeskyttelsesfragmenter og underkastet en nukleasebeskyttelsesprosedyre, og de beskyttelsesfragmenter som har hybridisert til målet (målene) av interesse,
15 analyseres på MAPS-plater. Hvis målet av interesse er et RNA, og beskyttelsesfragmentet er DNA, kan en nukleasebeskyttelses-/MAPS-analyse (NPA-MAPS) redusere behovet for omfattende håndtering av RNA, som kan være sensitivt overfor nedbrytning av kontaminerende nukleaser og således vanskelig å arbeide
20 med. I en slik NPA-MAPS-analyse er probene i proberekken oligonukleotider av den samme trådehet som nukleinsyremålene av interesse istedenfor å være komplementære med disse, slik som i en standard-MAPS-analyse. Et eksempel på en NPA-MAPS-analyse er skjematisk vist i figur 9.

25 I en NPA-MAPS-analyse kan målet av interesse være enhver nukleinsyre, f.eks. genomisk DNA, cDNA, virus-DNA eller RNA, rRNA, tRNA, mRNA, oligonukleotider, nukleinsyrefragmenter, modifiserte nukleinsyrer, syntetiske nukleinsyrer eller lignende. I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen
30 anvendes prosedyren for å analysere for ett eller flere mRNA-mål som er til stede i et vev eller cellulær RNA-ekstrakt. En prøve som inneholder målet (målene) av interesse, blir først hybridisert under utvalgte stringente betingelser (se ovenfor for en diskusjon om passende reaksjonsbetingelser for å oppnå
35 spesifikk hybridisering) til ett eller flere spesifikke beskyttelsesfragmenter. Et beskyttelsesfragment er et polynukleotid som f.eks. kan være RNA, DNA (inkludert et PCR-produkt), PNA eller modifisert eller substituert nukleinsyre som er spesifikk for en del av et nukleinsyremål av interesse.

Med "spesifikt" beskyttelsesfragment er det ment et polynukleotid som er tilstrekkelig komplementært med dets tilsiktede bindingspartner for å bindes til dette under utvalgte stringente betingelser, men som ikke vil bindes til andre utilsiktede nukleinsyrer. Et beskyttelsesfragment kan inneholde minst 10 nukleotider, fortrinnsvis 50 til ca. 100, eller det kan være så langt som et fullengdet cDNA. I en foretrukket utførelsesform er beskyttelsesfragmentene enkelttrådede DNA-oligonukleotider. Beskyttelsesfragmenter som er spesifikke for så mange som 100 mål eller flere, kan inkluderes i en enkelt hybridiseringsreaksjon. Etter hybridisering blir prøven behandlet med en blanding av én eller flere nukleaser for å nedbryte vesentlig all nukleinsyre, med unntak av beskyttelsesfragmentet (-fragmentene) som har hybridisert til nukleinsyren(e) av interesse og (eventuelt) delen(e) av nukleinsyremålet som har hybridisert og blitt beskyttet mot nukleasespaltning under nukleasebeskyttelsesprosedyren (i en duplekshybrid). Dersom prøven f.eks. omfatter en celleekstrakt, kan uønskede nukleinsyrer, slik som genomisk DNA, tRNA, rRNA og mRNA, nedbrytes i dette trinnet. Enhver av forskjellige nukleaser kan anvendes, inkludert f.eks. pankreas-RNase, mongbønnenuklease, S1-nuklease, RNase A, ribonuklease T1, exonuklease III eller lignende, avhengig av beskaffenheten av hybridkompleksene og av de uønskede nukleinsyrer til stede i prøven. RNase H kan være spesielt anvendelig for spaltning av rest-RNA bundet til et DNA-beskyttelsesfragment. Reaksjonsbetingelser for disse enzymer er vel kjent i teknikken og kan optimaliseres empirisk. Kjemiske prosedyrer kan også anvendes, f.eks. alkalisk hydrolyse av RNA. Etter behov kan prøvene behandles ytterligere ved hjelp av velkjente prosedyrer i teknikken for å fjerne ikke-hybridisert materiale og/eller for å inaktivere eller fjerne resterende enzymer (f.eks. fenolekstraksjon, utfelling, kolonnefiltrering etc.). Prosessen med hybridisering etterfulgt av nukleasespaltning og (eventuelt) kjemisk nedbrytning betegnes som en nukleasebeskyttelsesprosedyre; mange forskjellige nukleasebeskyttelsesprosedyrer er blitt beskrevet (se f.eks. Lee et al. (1978), Meth. Enzymol., 152, 633-648; Zinn et al. (1983), Cell, 34, 865-879). Prøver behandlet ved nukleasebeskyttelse

etterfulgt av en (eventuell) prosedyre for å inaktivere nukleaser bringes i kontakt med en MAPS-proberekke, og de vanlige trinn i en MAPS-analyse utføres. Bundne beskyttelsesfragmenter kan påvises ved hybridisering til merkede, målspe-
5 spesifikke rapportører, som beskrevet heri for standard-MAPS-analyser, eller selve beskyttelsesfragmentene kan merkes, kovalent eller ikke-kovalent, med et påvisbart molekyl.

I en foretrukket utførelsesform blir beskyttelsesfragmentet direkte merket, f.eks. istedenfor å bli merket ved
10 hybridisering til en målspesifikk rapportør. Rapportøren blir f.eks. bundet til beskyttelsesfragmentet gjennom en ligand-antiligandinteraksjon, f.eks. blir et streptavidin-enzym-kompleks tilsatt til et biotinyllert beskyttelsesoligo-nukleotid. I et annet eksempel blir beskyttelsesfragmentet
15 modifisert kjemisk (f.eks. ved direkte kopling av pepperrotperoksidase (HRP) eller et fluorescerende fargestoff), og denne kjemiske modifikasjonen påvises, enten med nukleinsyredelen av beskyttelsesfragmentet eller uten dette (f.eks. etter spaltning av modifikasjonen ved f.eks. en enzymatisk eller
20 kjemisk behandling). I alle de ovenfor beskrevne metoder kan et beskyttelsesfragment merkes før eller etter at det har hybridisert til et tilsvarende linkermolekyl.

For å kontrollere at nukleasebeskyttelsesprosedyren har fungert riktig, det vil si at ikke-hybridiserte nukleinsyrer er blitt spaltet som ønsket, kan ett eller flere beskyttelsesfragmenter utformes til å inneholde overhengende (ikke-hybridiserende) segmenter som burde spaltes av nukleasene hvis prosedyren virker riktig. Tilstedeværelse eller fravær av de overhengende fragmenter kan bestemmes ved hybridisering med en
30 komplementær, merket påvisningsprobe, eller selve den overhengende del av beskyttelsesfragmentet kan merkes, kovalent eller ikke-kovalent, med et påvisbart molekyl. Denne kontrollen kan utføres før prøven bringes i kontakt med proberekkene, eller som en del av selve MAPS-analysen. Et eksempel på en
35 slik kontrollanalyse er beskrevet i eksempel 15. Fordi forskjellige markører lett kan skjelnes fra hverandre (f.eks. fluorescerende stoffer med forskjellige absorpsjonsspektra), kan flere forskjellige merkede oligonukleotider inkluderes i en enkelt analyse. Standard nukleasebeskyttelsesanalyse, som

analysert ved gelelektroforese, kan dessuten anvendes under analyseutviklingen for å verifisere at beskyttelsesfragmentene blir bearbeidet som forventet.

NPA-MAPS-analyser kan anvendes for å kvantifisere
5 mengden av et mål i en prøve. Hvis beskyttelsesfragmentet tilsettes i et tilstrekkelig stort molart overskudd i forhold til målet for å drive hybridiseringsreaksjonen til fullførelse, vil den resterende mengde av beskyttelsesfragment etter nukleasebeskyttelsestrinnet avspeile hvor mye mål som var til
10 stede i prøven. Et eksempel på en slik kvantifiseringsreaksjon er beskrevet i eksemplene 12 og 13.

NPA-MAPS-analyser kan anvendes for å gjennomføre enhver av metodene beskrevet ovenfor som anvender standard-MAPS-analyser.

15 I en foretrukket utførelsesform blir polynukleotid-beskyttelsesfragmentene målt ved hjelp av massespektrometer istedenfor på MAPS-plater. I en mest foretrukket utførelsesform blir ingen av polynukleotidene bundet (festet) til en fast overflate under hybridiseringen eller nukleasespaltnings-
20 trinnene. Etter hybridisering kan det hybridiserte mål nedbrytes, f.eks. av nukleaser eller ved kjemiske behandlinger, hvilket etterlater beskyttelsesfragmentet i direkte proporsjon med hvor mye fragment som var blitt hybridisert til mål. Alternativt kan prøven behandles for å etterlate den (enkelt-
25 trådede) hybridiserte del av målet, eller duplekken dannet av det hybridiserte mål og beskyttelsesfragmentet, for å bli ytterligere analysert. Prøvene som skal analyseres, separeres fra resten av hybridiserings- og nukleaseblandingen (f.eks. ved etanolutfelling eller ved adsorpsjon eller affinitets-
30 kromatografi etc.), elueres eller oppløses og injiseres i massespektrometeret ved løkkeinjeksjon for høy effektivitet. I en foretrukket utførelsesform blir prøvene som skal analyseres (f.eks. beskyttelsesfragmenter), adsorbent til en overflate og analysert ved laserdesorpsjon ved anvendelse av velkjente
35 metoder i teknikken. For å oppnå høyest sensitivitet kan Fourier Transform Mass Spectrometry (FTMS) (eller en annen lignende høyutviklet teknikk) anvendes, slik at femtomol eller mindre av hvert beskyttelsesfragment kan påvises.

Beskyttelsesfragmentene som skal påvises i én prøve (eller flere), kan utformes for å gi et unikt signal for det anvendte massespektrometer. I én utførelsesform har hvert beskyttelsesfragment en unik molekylvekt etter hybridisering og nukleasebehandling, og deres molekylvekter og karakteristiske ioniserings- og fragmenteringsmønster vil være tilstrekkelig til å måle deres konsentrasjon. For å oppnå mer sensitivitet, eller som en hjelp ved analyse av komplekse blandinger, kan beskyttelsesfragmentene modifiseres (f.eks. derivatiseres) med kjemiske komponenter utformet til å gi klare unike signaler. Hvert beskyttelsesfragment kan f.eks. derivatiseres med en forskjellig naturlig eller unaturlig aminosyre bundet gjennom en amidbinding til oligonukleotidtråden i én eller flere posisjoner langs hybridiseringsdelen av tråden. Med et massespektrometer med en passende energi foregår fragmentering ved amidbindingene og frigjør en karakteristisk andel av aminosyrene. Denne type metode hvori kjemiske komponenter med moderat størrelse (molekylvekt ca. 80-200) anvendes som massespektrometriske markører, er ønskelig fordi molekyler av denne størrelsen generelt er lettere å påvise. I et annet eksempel er den kjemiske modifikasjon et organisk molekyl med et definert massespektrometrisk signal, slik som en tetraalkylammoniumgruppe, som f.eks. kan derivatisere et annet molekyl, slik som f.eks. en aminosyre. I et annet eksempel blir positive eller negative ionesignaler forhøyet ved reaksjon med ethvert antall forbindelser. For å forhøye positiv ionedeteksjon kan f.eks. et pyryliumsalt (slik som f.eks. 2,4-dietenyl, 6-etylpyryliumtetrafluorborat eller mange andre) omsettes med et amin for å danne et pyridinsalt; ethvert antall andre forsterkningsmidler kan anvendes for å danne andre positivt ladede funksjonelle grupper (se f.eks. Quirke et al. (1994), Analytical Chemistry, 66, 1302-1315). Ethvert antall kjente midler i teknikken kan likeledes omsettes for å danne negative ioneforsterkende komponenter. Den kjemiske modifikasjon kan selvsagt påvises, enten etter å ha blitt spaltet fra nukleinsyren eller mens den er forbundet med nukleinsyren. Ved å tillate hvert beskyttelsesfragment å bli identifisert på en skjellnelig måte, er det mulig å analysere (f.eks. screene) for et stort antall forskjellige mål (f.eks.

for 2, 6, 10, 16 eller flere forskjellige mål) i en enkelt analyse. Mange slike analyser kan utføres hurtig og lett. En slik analyse, eller sett av analyser, kan derfor utføres med høy effektivitet, som definert heri.

5 Uansett hvorvidt oligonukleotider blir påvist direkte ved hjelp av deres masse, eller om unike molekyllmarkører anvendes, kan signalene for hvert molekyl som skal påvises fullstendig karakteriseres i rene preparater med kjent konsentrasjon. Dette vil tillate at signalet kan kvantifiseres nøyaktig (måles, mengdebestemmes). For ethvert molekyl som skal påvises ved hjelp av massespektrometri, kan intensiteten og profilen ikke forutsies med nøyaktighet. Tendensen til at molekylet blir ionisert, sensitiviteten av alle kjemiske bindinger innen molekyler overfor fragmentering, hvilken grad
10 hvert fragment blir ladet enkelt eller mangedobbelt, er alle for komplekse til å kunne forutsies. For et gitt instrument med fiksert energi og prøvehåndteringskarakteristika er imidlertid intensiteten av profilen for signalet meget reproduserbar. For hver probe kan således signalet karakteriseres med rene standarder, og eksperimentsignalene kan for-
15 tolkes kvantitativt med nøyaktighet.

I ett aspekt beskrives en fremgangsmåte for påvisning av én eller flere nukleinsyrer av interesse, omfattende at en prøve som omfatter nukleinsyren(e) av interesse underkastes
25 nukleasebeskyttelse med ett eller flere beskyttelsesfragmenter, og at de hybridiserte dupleksmolekyler eller den beskyttede nukleinsyre eller beskyttelsesfragmentet påvises ved massespektrometri.

Metoder for analysering av nukleinsyrer ved massespektrometri er vel kjent i teknikken (se f.eks. Alper et al. (1988), Science, 279, 2044-2045; og Koster, US-patent nr. 5 605 798.

I tillegg til de mange forskjellige høyeffektive analyser beskrevet ovenfor vil mange andre fremgå for fagfolk.

35 En fordel ved å anvende multiprobeanalyser er evnen til å inkludere et antall "kontroll"-prober i hver proberekke som utsettes for de samme reaksjonsbetingelser som de virkelige eksperimentprober. Hvert område i rekken kan f.eks. omfatte positive og/eller negative kontroller. Betegnelsen "en

positiv kontrollprobe" anvendes heri for å bety en kontrollprobe som er kjent for f.eks. å reagere hovedsakelig med målet, eller å reagere med målet på en kvantitativt eller kvalitativt kjent måte og derved virke som en (intern)

5 standard for probe-/målintersaksjonen. En slik probe kan f.eks. kontrollere for hybridiseringseffektivitet. Betegnelsen "en negativ kontrollprobe" anvendes heri for å bety en kontrollprobe som er kjent for ikke vesentlig å reagere med målet. En slik probe kan f.eks. kontrollere for hybridiseringsspesifisitet.

10 Som eksempler på typen kontroller som kan benyttes, vurderes en analyse hvori en rekke oligonukleotidprober anvendes for å screene for midler som modulerer ekspresjonen av et sett av korrelative gener for en sykdom. Som en intern normaliseringskontroll for variabler, slik som antallet celler

15 lysert for hver prøve, gjenvinningen av mRNA eller hybridiseringseffektiviteten, kan en proberekke omfatte prober som er spesifikke for ett eller flere basisnivå- eller konstitutive husholdningsgener, slik som strukturelle gener (f.eks. aktin, tubulin eller andre) eller DNA-bindingsproteiner (f.eks.

20 transkripsjonsreguleringsfaktorer eller andre), hvis ekspresjon ikke forventes å bli modulert av midlene som testes. For å bestemme hvorvidt midlene som testes resulterer i uønskede bivirkninger, slik som celledød eller toksisitet, kan dessuten en proberekke omfatte prober som er spesifikke for gener som

25 er kjent for å bli indusert som en del av apoptoseprosessen (programmert celledød), eller som induseres under betingelser for celletraume (f.eks. varmesjokkproteiner) eller celledøds toksisitet (f.eks. p450-gener).

Andre kontrollprober kan inkluderes i en rekke for å

30 "fine tune" sensitiviteten av en analyse. Det vurderes f.eks. en analyse for et middel som modulerer produksjonen av mRNA forbundet med en spesiell sykdomstilstand. Hvis tidligere analyser har indikert at et av de korrelative mRNA (f.eks. mRNA-A) i dette settet produseres i så høye mengder sammen-

35 lignet med de andre at dets signal utviser de andre mRNA, kan linkerne justeres for å "fine tune" analysen for å utjevne styrken av signalene. "Blokerte linkere", som omfatter den ankerspesifikke oligonukleotidsekvens utformet for mRNA-A-målet, men som mangler den probespesifikke sekvens, kan til-

settes for å fortynne mengden av målspesifikke linkere og således å redusere sensitiviteten av analysen overfor dette mRNA. De passende forhold mellom blokkerte og ublokkerte linkere kan bestemmes av en fagperson ved hjelp av rutine-
5 messige, konvensjonelle metoder.

Prøver som skal testes i en analyse som beskrevet heri, kan omfatte ethvert av målene beskrevet ovenfor, eller andre. Flytende prøver som skal analyseres, kan ha ethvert volum som passer for størrelsen av testområdet, varierende fra
10 ca. 100 nanoliter til ca. 100 mikroliter. I en foretrukket utførelsesform appliseres væskedråper på ca. 1 mikroliter i hver brønn på en 1536-brønners mikrotiterskål. Prøver kan plasseres i kontakt med proberekkene ved hjelp av ethvert antall metoder som er egnet for høyeffektiv analyse, f.eks.
15 ved pipettering, blekkstrålebasert utlevering eller ved anvendelse av et replikasjonsnålverktøy. Prøver inkuberes under betingelser (f.eks. saltkonsentrasjon, pH, temperatur, inkubasjonstid etc. - se ovenfor) som er effektive for å oppnå binding eller annen stabil interaksjon mellom proben og målet.
20 Disse betingelser kan bestemmes rutinemessig. Etter inkubasjon kan prøvene eventuelt behandles (f.eks. vaskes) for å fjerne ubundet mål ved anvendelse av betingelser som bestemmes empirisk til å etterlate spesifikke interaksjoner intakte, men til å fjerne ikke-spesifikt bundet materiale. Prøver kan
25 f.eks. vaskes mellom ca. én og ti ganger eller mer under de samme eller noe mer stringente betingelser enn dem anvendt for å oppnå probe-/målbindingen.

Prøver inneholdende mål-RNA, f.eks. mRNA, rRNA, tRNA, virus-RNA eller totalt RNA, kan prepareres ved hjelp av enhver
30 av mange forskjellige prosedyrer. *In vitro*-cellekulturer som mRNA skal ekstraheres fra, kan f.eks. utspres på områdene av en overflate, slik som i individuelle brønner på en mikrotiterplate. Disse celler kan etter oppnåelse av en ønsket celledensitet eventuelt behandles med et middel av interesse,
35 slik som et stimulerende middel eller et potensielt terapeutisk middel, som kan tilsettes til cellene på mange forskjellige måter, f.eks. med et repetisjonsnålverktøy (slik som 96- eller 384-nålverktøyene tilgjengelige fra Beckman), ved pipettering eller blekkstråleutlevering, og inkuberes med

cellene i en passende tidsperiode, f.eks. mellom ca. 15 minutter og ca. 48 timer, avhengig av analysen. Totalt RNA, mRNA etc., ekstrakter fra vev eller celler fra en *in vitro*- eller *in vivo*-kilde kan prepareres ved anvendelse av rutinemessige, kjente metoder i teknikken (f.eks. kommersielt tilgjengelige sett).

Nukleinsyrer som kan konkurrere med et RNA av interesse for hybridisering til en spesifikk probe (det vil si genomisk DNA, rRNA, tRNA eller mRNA som deler minst partiell sekvenshomologi med RNA av interesse), kan eventuelt, i det minste delvis, fjernes fra en RNA-prøve ved å forhåndsbehandle prøven ved en nukleasebeskyttelses(NP)prosedyre før hybridisering. En nukleinsyre (et "beskyttelsesfragment", som f.eks. kan være RNA, DNA eller PNA) som er komplementær med minst en del av RNA av interesse, og hvis sekvens delvis eller fullstendig overlapper sekvensen av proben som er spesifikk for RNA av interesse, innføres i overskudd i prøven og inkuberes med denne under utvalgte stringente hybridiseringsbetingelser hvori beskyttelsesfragmentet hybridiserer spesifikt med RNA av interesse (se ovenfor for en diskusjon om passende reaksjonsbetingelser). På dette trinn kan beskyttelsesfragmenter som er spesifikke for ethvert, eller alle, RNA av interesse i prøven, tilsettes (f.eks. så mange som 100 eller flere). Etter hybridisering behandles prøven med en blanding av én eller flere nukleaser for å nedbryte vesentlig all nukleinsyre, med unntak av de deler av hvert RNA av interesse som er komplementære med beskyttelsesfragmentet (-fragmentene), eller unntatt dupleksene dannet mellom beskyttelsesfragmentet (-fragmentene) og det beskyttede RNA. I et etterfølgende trinn kan beskyttelsesfragmentet (-fragmentene) elimineres fra slike duplekser ved denaturering av dupleksene og spalting med et passende enzym som vil nedbryte beskyttelsesfragment (-fragmenter) og etterlate det beskyttede RNA hovedsakelig intakt. Enhver av mange forskjellige nukleaser kan anvendes for de ovenfor diskuterte spaltingstrinn, inkludert f.eks. pankreas-RNase, mungbønnenuklease, RNase H, S1-nuklease (under spaltningsbetingelser med enten høy eller lav saltkonsentrasjon), RNase A, ribonuklease T1, exonnuklease III, exonnuklease VII, RNase CL3, RNase PhyM, RNase U2 og lignende, avhengig av beskaffenheten

av de hybridiserte komplekser og av de uønskede nukleinsyrer til stede i prøven. Reaksjonsbetingelser for disse enzymer er vel kjent i teknikken og kan optimaliseres empirisk. Etter behov kan prøvene behandles ved hjelp av velkjente prosedyrer i teknikken for å fjerne ikke-hybridisert materiale og/eller å inaktivere eller fjerne resterende enzymer (f.eks. fenol-ekstraksjon, utfelling, kolonnefiltrering etc.). De behandlede prøver plasseres deretter i kontakt med proberekken. For å kontrollere at spesifikk hybridisering og etterfølgende nukleasebeskyttelse har foregått riktig, kan merkede beskyttelsesfragmenter inkluderes i reaksjonsblandingen. For å kontrollere at nukleasebeskyttelsesprosedyren har fungert riktig, det vil si at ikke-hybridiserte nukleinsyrer er blitt spaltet som ønsket, kan ett eller flere beskyttelsesfragmenter utformes til å inneholde overhengende (ikke-hybridiserende) segmenter som burde spaltes av nukleasene hvis analysen virker riktig. Tilstedeværelse eller fravær av de overhengende fragmenter kan bestemmes ved hybridisering med en komplementær, merket probe, eller den overhengende del av selve beskyttelsesfragmentet kan merkes med et påvisbart molekyl.

For enhver av metodene som beskrevet her kan mål merkes ved hjelp av enhver av forskjellige prosedyrer som er vel kjent i teknikken, og/eller som er beskrevet på annet sted i foreliggende patentsøknad (f.eks. for deteksjon av nukleasebeskyttelsesfragmenter). Målmolekylene kan f.eks. koples direkte eller indirekte med kjemiske grupper som gir et signal for påvisning, slik som kjemiluminescerende molekyler eller enzymer som katalyserer produksjonen av kjemiluminescerende molekyler, eller fluorescerende molekyler, slik som fluorescein eller Cy5, eller et tidsoppløst fluorescerende molekyl, slik som et av de chelaterte lantanidmetaller, eller en radioaktiv forbindelse. Målene kan alternativt merkes etter at de har reagert med proben med én eller flere målspesifikke rapportører (f.eks. antistoffer, oligonukleotider, som vist i figur 1), eller ethvert av de generelle typer molekyler diskutert ovenfor i forbindelse med prober og mål. Mange forskjellige, mer komplekse sandwich-typepåvisningsprosedyrer kan også benyttes. Et mål kan f.eks. hybridiseres til et bifunksjonelt molekyl inneholdende en første komponent som er spesifikk for

målet, og en andre komponent som kan gjenkjennes av et felles (det vil si det samme) rapportørreagens, f.eks. et merket polynukleotid, antistoff eller lignende. De bifunksjonelle molekyler kan være utformet slik at ethvert antall felles
 5 rapportører kan anvendes i hver analyse.

Metoder ved hvilke mål kan inkuberes med en målspe-
 fikk rapportør (rapportører) under betingelser som er effek-
 tive for å oppnå binding eller annen stabil interaksjon, kan
 bestemmes rutinemessig (se ovenfor). Fluorescerende oligo-
 10 nukleotidrapportører (i en konsentrasjon på ca. 10 nM til 1 µM
 eller mer, fortrinnsvis ca. 30 nM, i en buffer som 6 x SSPE-T
 eller andre), kan f.eks. inkuberes med de bundne mål i ca.
 15 minutter til 2 timer eller mer (fortrinnsvis ca. 30 til
 60 minutter), ved en temperatur mellom ca. 15 °C og ca. 45 °C
 (fortrinnsvis ca. romtemperatur). Etter inkubasjon kan prøvene
 eventuelt behandles (f.eks. vaskes) for å fjerne ubundne, mål-
 spesifikke rapportører ved anvendelse av betingelser som
 bestemmes empirisk til å etterlate spesifikke interaksjoner
 intakt, men for å fjerne uspesifikt bundet materiale. Prøver
 20 kan f.eks. vaskes mellom ca. én og ti ganger eller mer under
 de samme eller noe mer stringente betingelser enn dem anvendt
 for å oppnå mål-/rapportørbindingen.

Merking med en målspesifikk rapportør (rapportører)
 kan gjøre den innledende hybridiseringsreaksjon enda mer
 25 spesifikk, f.eks. i det tilfellet hvori en målspesifikk oligo-
 nukleotidrapportør blir målrettet til en mer forskjellig del
 av sekvensen av en målnukleinsyre enn probeoligonukleotidet,
 eller hvori probe- og rapportørantistoffer gjenkjenner for-
 skjellige epitoper på et målantigen. Merking med målspesifikke
 30 rapportører kan dessuten tillate "tuning" av sensitiviteten av
 reaksjonen. Hvis f.eks. et mål-mRNA, som er en del av et
 korrelativt ekspresjonsmønster, blir uttrykt i meget små
 mengder, kan signalnivået forhøyes (signalamplifikasjon) ved å
 hybridisere det bundne mål til flere (f.eks. ca. to til fem
 35 eller flere) målspesifikke oligonukleotidrapportører, som hver
 hybridiserer spesifikt med en forskjellig del av mål-mRNA.

Evnen til å påvise to typer markører uavhengig av
 hverandre tillater en ytterligere type kontroll i MAPS-
 analyser. Noen (f.eks. ca. 10 til ca. 100 %) av linkerne

utformet for et spesielt ankersted (figur 7 viser tre typiske ankersteder, som hvert omfatter et stort antall hovedsakelig identiske ankere (A, B eller C)) kan inneholde en markør (f.eks. en fluorescerende gruppe) festet til én ende. Et

5 rodamin eller Cy5-fluor kan f.eks. være festet ved 5'-enden av linkerens. Slike modifiserte linkere betegnes "kontrollinkere". Etter at en blanding av linkere og kontrollinkere er blitt forbundet med ankere, og en prøve inneholdende et mål er blitt inkubert med den resulterende proberekke, kan en målspesifikk

10 rapportør som inneholder en forskjellig fluorescerende gruppe (f.eks. fluorescein eller en annen påvisningsmarkør, slik som en kjemiluminescerende markør) anvendes (eller målet kan merkes direkte med en fluorescerende gruppe eller en annen påvisningsmarkør); og forholdet mellom de to signaler kan

15 bestemmes. Tilstedeværelsen av kontrollinkere tillater kalibrering av antallet funksjonelle (f.eks. i stand til å reagere med linkere) ankere innen og mellom testområder (det vil si tester kapasiteten av hvert sted i rekken til å binde mål, for formålene å normalisere signaler) tjener som en basis for

20 kvantifisering av mengden av bundet mål, medhjelper til lokalisering av ankerstedene og/eller tilveiebringer en positiv kontroll, f.eks. i tilfeller hvori det ikke er noe signal som et resultat av fravær av mål i en prøve. I én utførelsesform av oppfinnelsen kan to forskjellige markører (f.eks.

25 fluoroformer) også anvendes for å påvise to forskjellige populasjoner av mål-molekyler; men evnen til å gjenkjenne tilstedeværelsen av mål ved romlig oppløsning av signaler tillater imidlertid anvendelse av en enkelt type markør for forskjellige mål-molekyler.

30 I en annen utførelsesform av oppfinnelsen er "ankere" som er spesifikke for et mål av interesse ikke forbundet med linkere, men er isteden forbundet direkte med målet (målene); målet (målene) kan i sin tur eventuelt reagere med en målspesifikk rapportør (rapportører).

35 Mål, enten de er merket eller umerket, kan påvises ved hjelp av mange forskjellige prosedyrer som er rutinemessige og konvensjonelle i teknikken (se f.eks. Fodor et al. (1996), US-pat. nr. 5 510 270; Pirrung et al. (1992). US-pat. nr. 5 143 854; Koster (1997), US-pat. nr. 5 605 798; Hollis et

al. (1997), US-pat. nr. 5 653 939; Heller (1996), US-pat. nr. 5 565 322; Eggers et al. (1997), US-pat. nr. 5 670 322; Lipshutz et al. (1995), *BioTechniques*, 19, 442-447; Southern (1996), *Trends in Genetics*, 12, 110-115). Påvisningsmetoder inkluderer enzymbasert påvisning, kolorimetrisk metode, SPA, autoradiografi, massespektrometri, elektriske metoder, påvisning av absorbans eller luminescens (inkludert kjemiluminescens eller elektroluminescens) og påvisning av lysspredning fra, f.eks. mikroskopiske partikler anvendt som markører.

Fluorescerende markører kan også påvises, f.eks. ved avbildning med en ladningskoplet anordning (CCD) eller fluorescensmikroskopi (f.eks. skanning eller konfokal fluorescensmikroskopi), eller ved kopling av et skanningssystem med en CCD-rekke eller et fotomultipliseringsrør, eller ved anvendelse av rekkebasert teknologi for påvisning (f.eks. kan et overflatepotensial på en 10-mikrondel av et testområde påvises, eller overflateplasmonresonans kan anvendes hvis oppløsningen kan gjøres høy nok). Alternativt kan en rekke inneholde en markør (f.eks. én av et par energioverføringsprober, slik som fluorescein og rodamin) som kan påvises ved energioverføring til (eller modulering av) markøren på en linker, et mål eller en rapportør. Blant den store mengde fluorescensbaserte påvisningssystemer er fluorescensintensitet, fluorescenspolarisering (FP), tidsoppløst fluorescens, fluorescensresonansenergioverføring og homogen tidsfrigjort fluorescens (HTRF). Analyse av gjentatte strekkodelignede mønstre kan oppnås ved mønstergjenkjennelse (å finne den passende flekk eller linje for hvert spesifikt merket mål ved dets posisjon i forhold til de andre flekker eller linjer), etterfulgt av kvantifisering av intensiteten av markørene. Strekkodegjenkjennelsesutstyr og dataprogramvare for analyse av en- eller todimensjonale rekker kan dannes rutinemessig og/eller er kommersielt tilgjengelige (se f.eks. Rava et al. (1996), US-patent nr. 5 545 531).

Fremgangsmåter for fremstilling og anvendelse av rekkene som beskrevet heri, inkludert preparering av overflater eller områder som beskrevet heri, syntetisering eller rensing og binding eller sammensetning av stoffer, slik som dem for ankerene, linkerne, probene og detektorprobene beskrevet heri, og påvisning og analysering av merkede eller

markerte stoffer, som beskrevet heri, er velkjent og konvensjonell teknologi. I tillegg til metoder beskrevet i referansene anført ovenfor se f.eks. patenter tilhørende Affymax, Affymetrix, Nanogen, Protogene, Spectragen, Millipore og Beckman (fra hvilke produkter som er anvendelige ved foreliggende oppfinnelse er tilgjengelige); standard lærebøker i molekylær biologi og proteinvitenskap, inkludert dem anført ovenfor; og Cozette et al. (1991), US-pat. 5 063 081; Southern (1996), Current Opinion in Biotechnology, 7, 85-88; Chee et al. (1996), Science, 274, 610-614; og Fodor et al. (1993), Nature, 364, 555-556.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 illustrerer et utformingsskjema for oligonukleotider hvori en linker 1 inneholder en del som er spesifikk for anker 1, og en annen del (en probe) som er spesifikk for mål-mRNA 1, og hvori en merket deteksjonsprobe 1 er spesifikk for en sekvens av mål-mRNA 1 som er forskjellig fra sekvensen av den målspesifikke del av linkeren.

Figur 2 illustrerer en overflate som omfatter 15 testområder, som hvert omfatter en rekke av seks ankeroligonukleotider.

Figur 3 illustrerer utformingen av en linker for en reseptorbindingsanalyse hvori den ankerspesifikke del av linkeren er forbundet med probedelen (reseptorproteinet) via biotin- og streptavidinmolekyler, og hvori en ligand som er spesifikk for reseptoren er merket med et fluorescerende markørmolekyl. B: biotin. SA: streptavidin. Rec: reseptorprotein. Ligand: en naturlig eller syntetisk ligand for reseptoren. *: et fluorescerende markørmolekyl bundet til liganden.

Figur 4 illustrerer en overflate som omfatter 21 testområder, som hvert er ytterligere delt i 16 underområder (perforeringer, fordypninger).

Figurene 5a, 5b og 5c illustrerer tre biter fra hvilke en overflate, slik som den vist i figur 4, kan sammensettes. Figur 5a representerer en brønnseparator; figur 5b representerer en underinnleder; og figur 5c representerer en basis.

Figur 6 representerer to testområder, som begge omfatter en lineær rekke av prober (eller ankere) som er i en ("strekkode"-lignende formasjon).

Figur 7 representerer skjematisk et testområde som
5 omfatter tre ankere (A, B og C), som alle er til stede i mange kopier (en "gruppe"). Beliggenheten av hver gruppe ankere er betegnet "en beliggenhet".

Figur 8 illustrerer en analyse hvori cDNA dannet ved hjelp av spesifikk reverstranskriptase analyseres på MAPS-
10 plater.

Figur 9 illustrerer en analyse som anvender en nukleasebeskyttelsesprosedyre (NPA-MAPS-analyse). Prøve-RNA prepareres fra celler eller fra vev og er representert som tynne bølgelinjer. Til RNA-prøven tilsettes en gruppe av poly-
15 nukleotidbeskyttelsesfragmenter, avbildet som tykke, mørke og lyse linjer. De mørke deler av beskyttelsesfragmentene representerer segmenter som er komplementære med spesifikke RNA-mål og hybridiserer til disse mål. De lyse seksjoner representerer overhengende deler: sekvenser som er tilgrens-
20 ende den komplementære sekvens, men ikke komplementære med målet. Beskyttelsesfragmentene tilsettes i overskudd. Etter hybridisering av alt tilgjengelig mål med beskyttelsesfragmentene behandles prøvene med en passende blanding av nukleaser og med kjemiske behandlinger som nedbryter uønsket
25 ikke-hybridisert RNA og ikke-hybridisert polynukleotid. S1-nuklease kan f.eks. nedbryte ethvert tilstedeværende enkelt-trådet DNA. Overskytende beskyttelsesfragmenter blir således hydrolysert, hvilket også er tilfelle med den overhengende ikke-hybridiserte del av bundet beskyttelsesfragment. RNA kan
30 hydrolyseres ved tilsetning av ribonukleaser, inkludert ribonuklease H, og/eller ved oppvarming av prøver i en base. Det som står igjen, er en oppsamling av spaltede beskyttelses-fragmenter som avspeiler hvor mye av hvert mål-RNA som hadde vært til stede i prøven. De resterende beskyttelsesfragmenter
35 måles ved hjelp av en MAPS-hybridiseringsanalyse.

Figur 10 illustrerer hybridiseringsspesifisitet i en MAPS-analyse.

Figur 11 illustrerer bindingskinetikk for et anker til en linker.

Figur 12 illustrerer en MAPS-analyse av to oligonukleotidmål.

Figur 13 illustrerer kvantifiseringen av et sensitivitetsskift.

5 Figur 14 illustrerer smeltetemperaturbestemmelser for fire oligonukleotidlinker-/ankerkombinasjoner.

Figur 15 illustrerer en mRNA-analyse ved hjelp av NPA-MAPS.

10 Figur 16 illustrerer en fortynningskurve med NPA-MAPS.

Figur 17 illustrerer en analyse for påvisning av peptider inneholdende fosfotyrosinrester.

Figur 18 illustrerer det første trinn i en analyse for å kartlegge EST: sammensetning av linkere som tilsvarer
15 hver av EST som skal kartlegges på rekker av generiske ankere på en MAPS-plate. Til overflaten av hver av 16 brønner på en mikroplate bindes linkere som omfatter 16 forskjellige oligonukleotidprober, arrangert i en 4 x 4-matriks. Den første beliggenhet har oligo 1, som er komplementær med en del av den
20 første EST-sekvens, og så videre for de 16 EST som skal testes.

cdNA eller mRNA dannet fra genene, fra hvilke EST ble oppnådd, blir tilsatt til alle 16 brønner og tillatt å hybridisere under passende betingelser. Ethvert cdNA eller mRNA som
25 inneholder en av de 16 EST-sekvenser, vil således sammensettes på det sted hvor dets komplementære probe ble plassert.

Figur 19 illustrerer et etterfølgende trinn i en analyse for å kartlegge EST: tilsetning av detektoroligonukleotider til MAPS-platen. Hver brønn på platen mottar et
30 detektoroligonukleotid som tilsvarer en av EST som skal kartlegges. Hvert detektoroligonukleotid er et oligonukleotid koplet til et molekyl anvendt for deteksjon, f.eks. fluorescein, hvis fluorescensavbildning er deteksjonsmetoden. Hvert detektoroligonukleotid er komplementært til en av EST, men
35 forskjellig fra den EST-spesifikke probe, slik at en probe og et detektoroligonukleotid som er komplementært med en enkelt EST begge kan bindes samtidig.

Etter vask blir ett enkelt detektoroligonukleotid tilsatt til hver brønn, som nummerert i figuren. Det vil si at

detektoroligonukleotidet med sekvenser som er komplementære med den første EST tilsettes til den første brønn, og så videre.

Figurene 20a og 20b illustrerer resultatene fra analysen for å kartlegge EST vist i figurene 18 og 19. Etter hybridisering av detektoroligonukleotider og vask under passende stringensbetingelser avbildes de 16 brønner på mikroplassen med et CCD-basert fluorescensavbildningsapparat for eksempel. Figur 20a viser stiliserte resultater. Det er forventet at hvert EST-spesifikt detektoroligonukleotid bør merke mRNA eller cDNA holdt nede av den tilsvarende EST-spesifikke probe. Probe 5 sammensetter f.eks. cDNA eller mRNA inneholdende den femte EST-sekvens på dette stedet, slik at det femte detektoroligonukleotid også burde hybridisere til cDNA eller mRNA på samme sted. Dette er tilfellet for disse stiliserte data, der hvert deteksjonsoligonukleotid merker den tilsvarende probe. De første tre detektoroligonukleotider merker dessuten cDNA eller mRNA holdt nede av de første tre prober, hvilket viser at disse sekvenser ligger langs det samme gen. De siste fem EST synes likeledes å være sammenbundet. Bindingen bestemt fra disse data er vist grafisk i figur 20b.

Figur 21 illustrerer forholdene mellom probene, detektoroligonukleotidene og EST nr. 1, 2 og 6 vist i figurene 18-20.

Figur 22 illustrerer en høyeffektiv analyse.

Eksempler

Eksempel 1

Hybridiseringsspesifisitet (se figur 10)

En generisk MAPS-plate ble produsert ved anvendelse en blekkstråledispenser, Pixus-systemet (Cartesian Technologies, Inc., Irvine, CA) for å danne et identisk DNA-gitter i hver brønn på en mikrotiterplate. Alle oligonukleotider ble innkjøpt fra Biosource International (Camarillo, CA). For denne platen ble sju forskjellige oligonukleotidankere fordelt i hver brønn i mønsteret vist som "Key" (venstre side av figuren). Hvert oligonukleotid ble applisert som en 10 nanoliter dråpe på to flekker, fra en 2 μ M oppløsning inneholdende 500 mM natriumfosfat, pH 8,5, og 1 mM EDTA i brønnene på en

DNA-bindingsplate (Corning Costar) og ble tillatt å tørke. Etter binding ble brønnene blokkert med 50 mM Tris, pH 8, og oligonukleotid som ikke var kovalent bundet til overflaten, ble deretter vasket bort med 0,1 % SDS i 5 x SSP-buffer.

5 Fluorescensmerkede linkeroligonukleotider ble tilsatt til den vaskede platen og tillatt å hybridisere i 6 x SSPE med 0,1 % Triton X-100 ved romtemperatur i 30 minutter. Dette er en foretrukket protokoll for binding av linkere. Linkeroligonukleotidene var Cy5-derivatisert under syntese og var komple-
10 mentære i 25 baseparsegmenter med spesifikke forankringsoligonukleotider. Sekvensene av de sju ankere og linkere var som følger (alle vist 3' til 5'):

#1 Anchor^{*}: SEQ ID:1
TCCACGTGAGGACCGGACGGCGTCC

Linker^{**} SEQ ID:2
GTCGTTTCCATCTTTGCAGTCATAGGATACTGAGTGGACGCCGTCCGGTCCTCACGTG
GA

RNA mimic(mouse C-jun): SEQ ID:3
CTATGACTGCAAAGATGGAAACGACGATACTGAGTTGGACCTAACATTCGATCTCATTCA

Detector Oligonucleotide^{***} SEQ ID:4
TGAATGAGATCGAATGTTAGGTCCA

#2 Anchor^{*}: SEQ ID:5
CACTACGGCTGAGCACGTGCGCTGC

Linker^{**} SEQ ID:6
CTAGGCTGAAGTGTGGCTGGAGTCTGCAGCGCACGTGCTCAGCCGTAGTG

RNA mimic (mouse MIP-2): SEQ ID:7
AGACTCCAGCCACACTTCAGCCTAGGATACTGAGTCTGAACAAAGGCAAGGCTAACT
GAC

Detector Oligonucleotide^{***} SEQ ID:8
GTCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTTCAG

#3 Anchor^{*}: SEQ ID:9
GTCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTTCAG

Linker^{**} SEQ ID:10
ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGGGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

RNA mimic (mouse GAPDH): SEQ ID:11
CCTTCATTGACCTCAACTACATGGTGATACTGAGTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATG
AC

Detector Oligonucleotide^{***} SEQ ID:12
GTCATCATACTTGGCAGGTTTCTCC

#4 Anchor^{*}: SEQ ID:13
GAACCGCTCGCGTGTCTACAGCCA

Linker^{**} SEQ ID:14
CTACCGAGCAAACCTGGAAATGAAATTGGCTGTAGAACACGCGAGCGGTTC

RNA mimic (mouse L32 protein): SEQ ID:15
ATTTCAATTCCAGTTTGCTCGGTAGGATACTGAGTGAGTCACCAATCCCAACGCCAGG
CT

Detector Oligonucleotide^{***} SEQ ID:16
AGCCTGGCGTTGGGATTGGTGACTC

#5 Anchor:	SEQ ID:17
CTCGTTCCGCGTCCGTGGCTGCCAG	
Linker**	SEQ ID:18
CTGGCAGCCACGGACGCGGAACGAG	
 #6 Anchor:	 SEQ ID:19
CGGTCGGCATGGTACCACAGTCCGC	
Linker**	SEQ ID:20
GCGGACTGTGGTACCATGCCGACCG	
 #7 Anchor:	 SEQ ID:21
GCGCGCCGCGTTATGCATCTCTTCG	
Linker**	SEQ ID:22
CGAAGAGATGCATAACGCGGCGCCG	

*Ankere ble syntetisert med C12-spacer med amid ved 5'-enden

**Linkere ble syntetisert med Cy5 festet ved 5'-enden

5 ***Detektoroligonukleotider ble syntetisert med biotin festet ved 5'-enden

Til hver brønn ble det tilsatt enten én linker eller en blanding av linkere (som angitt i figuren) i én porsjon.

10 (Til brønnen merket "all" ble det tilsatt en blanding av alle sju linkere.) Etter inkubasjon og vask i 5 x SSP tre ganger ble fluorescensbildet vist på høyre side av figuren tatt med et Tundra-avbildningsapparat (IRI, St. Catherines, Ontario). Som det fremgår, samlet linkerne seg selv til overflaten ved

15 spesifikt å binde seg til sine komplementære ankere.

Denne prosessen gjentas, med unntak av at åtte forskjellige ankere blir utspreddt i hver brønn, og linkere blir deretter fortrinnsvis bundet til disse. Hele prosessen gjentas med 36, 64 etc. forskjellige ankere i hver brønn på en 24-,

20 96-, 384-, 864- eller 1536-brønners plate.

Eksempel 2

Bindingskinetikk (se figur 11)

Hastigheten for hybridisering av Cy5-derivatisert

25 linker nr. 1 til dens komplementære festede anker er vist for forskjellige konsentrasjoner av linker. Den generiske MAPS-platen ble preparert som for figur 1, med unntak av at anker 1

ble festet på fire flekker pr. brønn. Inkubasjoner ble utført ved romtemperatur i 5 x SSP med 0,1 % Tween-20, brønnene ble vasket tre ganger med 5 x SSP, og bundet fluorescens ble målt. Et fluorescensbilde av platen ble tatt med Tundra, og bak-
5 grunnen ble subtrahert, og den integrerte intensitet av hver flekk innen hver brønn ble beregnet med Tundra software. Gjennomsnittet og standardavviket for den integrerte intensitet for de fire flekker innen hver av to brønner er plottet.

10 Eksempel 3

Fluorescerende linker

En generisk MAPS-plate produseres med ett forankringsoligonukleotid applisert i enten 1 flekk pr. brønn (øverste to rader), 4 flekker pr. brønn (neste fire rader)
15 eller 16 flekker pr. brønn (nederste to rader), i overensstemmelse med metodene diskutert ovenfor. Til hver brønn blir det festet komplementær, fluorescensmerket linker ved hjelp av den foretrukne protokoll beskrevet i eksempel 1. Etter vask ble fluorescensbildet av platen tatt med Tundra. Mengden
20 fluorescens i hver flekk viser hvor mye funksjonell linker som er tilgjengelig for å hybridisere til mål. Mengden av signal påvist på gjentatte flekker er ytterst reproducerbar.

Eksempel 4

25 Bindingskurver

Til platen preparert som beskrevet i eksempel 3 tilsettes forskjellige konsentrasjoner av et måloligonukleotid. Linkeren som er blitt bundet, inneholder en 25-mer-sekvens som er komplementær med en del av målet. Målet tilsettes i 5 x SSC
30 med 0,05 % SDS i et totalvolum på enten 30 eller 100 mikroliter, og platen dekkes og inkuberes ved 50 °C over natten. Etter hybridisering av målet til den bundne linker blir målet visualisert ved hjelp av en foretrukket protokoll ved anvendelse av kjemiluminescens. Et biotinyllert detektoroligonukleotid, inneholdende en 25-mer-sekvens som er komplementær med en
35 separat del av målet (ikke til den samme del som er komplementær med linkeren), tilsettes i en konsentrasjon på 30 nM. Biotinyllert detektor kan tilsettes i 30 minutter etter at overskudd av ubundet mål er vasket bort, eller den kan til-

settes sammen med mål i hele tiden for hybridiseringen over natten. Etter binding av detektor blir overflaten vasket to ganger med 5 x SSC, én gang med 1 x SSP inneholdende 0,1 % Tween-20 og 1 % PEG (SSPTP), og en 1:50000 fortynning av

5 250 µg/ml pepperrotperoksidase konjugert til streptavidin (HRP:SA, fra Pierce, Rockford, Ill.) tilsettes i 5 timer i SSPTP ved romtemperatur. Brønnene vaskes fire ganger med SSPTP og vaskes én gang og inkuberes deretter med Super Signal Ultra-reagens (Pierce). Etter noen få minutter oppsamles

10 bilder av luminescens med Tundra-avbildningsapparatet, f.eks. kan bildet akkumulere med CCD-rekken i 5 minutter. Lave nivåer av mål kan visualiseres i noen brønner ved en målkonsentrasjon så lav som $\sim 5 \times 10^{-13}$ M; mengden av signal blir generelt mettet ved en målkonsentrasjon på $\sim 10^{-10}$ M. Mengden av signal påvist

15 på gjentatte flekker er ytterst reproducerbar.

Eksempel 5

Analyse av to oligonukleotider (se figur 12)

En bindingskurve som viser en MAPS-hybridiserings-

20 analyse ved anvendelse av den foretrukne protokoll diskutert ovenfor for to forskjellige måloligonukleotider, er vist. En generisk MAPS-plate ble preparert med fire forskjellige forankringsoligonukleotider, som hvert ble applisert fire ganger i hver brønn. For det andre og fjerde anker ble komplementære

25 linkeroligonukleotider selvsammensatt på overflaten, som beskrevet. To mål ble tilsatt i de viste konsentrasjoner i 40 mikroliter til hver brønn, som beskrevet, og inkubert ved 50 °C over natten. Mengden av hvert bundet mål ble visualisert ved binding av biotinyllert deteksjonsoligonukleotid spesifikt

30 for hvert mål, etterfulgt av HRP:SA og kjemiluminescensavbildning, som beskrevet. I det nedre panel er intensiteten av avbildningen kvantifisert. Software som er en del av Tundra Imager-pakningen, ble anvendt for å skanne intensiteten av avbildningene langs linjer mellom pilene vist i det øvre

35 panel. Ved den laveste konsentrasjon av mål, 1,1 pM, viser de skannede avbildninger veldefinerte Gauss-topper på hver flekk, mens det ikke kan observeres noen skjellnelige bakgrunnstopper i prøven lengst til venstre, ved 0 konsentrasjon av mål.

Eksempel 6Sensitivitetsskifting (se figur 13)

En MAPS-hybridiseringsanalyse kan anvendes for måling av konsentrasjonen av et sett oligonukleotider ved å binde dem
 5 til en overflate og merke dem. Dette fungerer godt for de oligonukleotider som foreligger i beskjeden eller lav konsentrasjon. To prøver kan skjelnes i et slikt tilfelle fordi hvis en prøve inneholder mer oligonukleotid, så vil mer bindes. Hvis på den annen side konsentrasjonen av målrettet oligo-
 10 nukleotid er mettende for overflaten (det vil si hvis den er høy nok til å okkupere alle bindingssteder), så kan ikke mer bindes hvis konsentrasjonen stiger slik at mengden ikke kan måles. Bindingskurven for et mål kan imidlertid skiftes ved å tilsette umerket konkurrerende ligand.

15 Bindingsdata er oppnådd for fire forskjellige oligonukleotidmål, hvilke alle metter overflaten (det vil si når maksimal binding) ved ca. 3 nM. Ved tilsetning av umerkede kompetitive mål til alle brønner skiftes bindingen av merket oligonukleotid, slik at mindre bindes ved den lavere konsen-
 20 trasjon, og nivået ved hvilket metning forekommer, heves. Det kan tilsettes kompetitive oligonukleotider for f.eks. målene 1 og 3, men ikke 2 og 4. Dette skifter sensitiviteten av analysen kun for målene 1 og 3. På denne måten kan oligonukleotidmål med svært forskjellige konsentrasjoner måles
 25 innen én analysebrønn hvis den relative mengde av forventet oligonukleotid er kjent.

Dataene kan kvantifiseres som forklart ovenfor for binding av et av oligonukleotidmålene. Figur 13 viser kvantitativt at inkludering av kompetitivt oligonukleotid i analysen
 30 skifter bindingskurven anvendt for å analysere for dette mål til høyere konsentrasjoner.

Eksempel 7Smeltetemperatur for fire prøver (se figur 14)

35 Mengden av fire forskjellige fluorescensmerkede linkeroligonukleotider, spesifikt hybridisert til ankeroligonukleotider ved hjelp av MAPS-analysen, er plottet som en funksjon av temperaturstigningen. De fire oligonukleotider ble først tillatt å hybridisere ved 15 °C i 1 time ved 300 nM.

Brønnene ble deretter vasket med SSC uten prober, og den bundne mengde ble målt som ovenfor ved hjelp av fluorescens (50 °C). Overflaten ble deretter inkubert ved 55 °C i 30 minutter, og bundet fluorescens ble målt, og så videre for alle de
5 viste temperaturer.

Eksempel 8

Deteksjonsmetoder

To deteksjonsmetoder kan sammenlignes direkte. Til en
10 MAPS-plate med fire festede oligonukleotidankere, hvert i fire flekker pr. brønn, tilsettes to oligonukleotider til hver brønn, som begge inkluderer en kovalent bundet Cy5-komponent, eller begge inneholder en biotingrouppe. Epifluorescensmålingen utføres som beskrevet for betraktning og måling av fluor-
15 escenslinkeren. Kjemiluminescensmålingene utføres som beskrevet for MAPS-analysen ved anvendelse av etterfølgende tilsetning av HRP:SA og et kjemiluminescenssubstrat. De dannede signaler er grovt sett av den samme størrelse. For geometrien av mikroplatene, som inneholder vegger som sepa-
20 rerer hver brønn, og tilfeldige bobler av væske eller en menisk av fluid kan refleksjoner i epifluorescensavbildningene imidlertid forårsake interferens i datafortolkning.

Eksempel 9

Kjemiluminescensprodukter

To produkter som er tilgjengelige som kjemiluminescenssubstrater for pepperrotperoksidase, kan sammenlignes som deteksjonsprosedyrer for MAPS-analysen. En MAPS-plate prepareres som for eksempel 8 og inkuberes med biotinylerte
30 linkeroligonukleotider. Enten alkalisk fosfatase koplet til streptavidin (AlkPhos:SA) eller HRP:SA tilsettes deretter, etterfulgt av vask og tilsetning av enten CDP-Star (Tropix) til brønnene med AlkPhos:SA eller ECL-Plus til brønnene med HRP:SA. Merking med SA-derivatiserte enzymer og substrater er
35 som foreslått av fabrikantene for anvendelse ved merking av western-blots. Disse to (så vel som andre tilgjengelige substrater) kan begge anvendes for å bestemme oligonukleotidhybridisering til MAPS-plater.

Eksempel 10

Oppløsning ved 0,6 mm

Oppløsning av det verserende system for MAPS-analyse testes ved å preparere en MAPS-plate med fire forskjellige
5 oligonukleotidankere pr. brønn, hvert flekket fire ganger pr. brønn med en avstand (sentrum til sentrum) på 0,6 mm. Enten Cy5-derivatiserte linkere eller biotinylerede linkere blir deretter hybridisert og påvist og skannet som ovenfor. For epifluorescensmålingen er oppløsningen høyere (og avstanden
10 kan sannsynligvis reduseres). For kjemiluminescensdeteksjonsprosedyren blir naboflekker ikke fullstendig separert, men i denne avstand kan allikevel individuelle topper oppløses entydig ved hjelp av et dataprogram.

15 Eksempel 11

Testnukleasebeskyttelsesprotokoll

I en analyse for å teste for de optimale betingelser for hybridisering og nukleasebehandling for nukleasebeskyttelsesprotokollen anvendes nukleasebeskyttelsesanalysesettet fra
20 Ambion (Austin, Texas) for å tilveiebringe betingelser, buffere og enzymer. Åtte prøver prepareres i én av tre buffere. Hyb Buff 1 er 100 % hybridiseringsbuffer (Ambion); Hyb Buff 2 er 75 % hybridiseringsbuffer og 25 % hybridiseringsfortynningsbuffer (Ambion); og Hyb Buff 3 er 50 % av hver
25 av disse. Et 70-mer-oligonukleotid som inneholder 60 rester som er komplementære med et test-mRNA, syntetiseres (Biosource International, Camarillo, CA) og merkes med Psoralen-fluorescein (Schleicher og Schuell, Keene, NH) ved å følge den foreslåtte protokoll for merking av Psoralen-biotin ved hjelp
30 av Ambion. Kort beskrevet blir beskyttelsesfragment fortynnet til 50 µg/ml i 20 µl TE-buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8), kokt i 10 minutter og hurtig avkjølt i isvann. 4 µl av 130 µg/ml Psoralen-fluorescein i DMF tilsettes, og prøven belyses i 45 minutter ved 40 °C med en langbølgelengdet UV-
35 kilde. Fritt Psoralen-fluorescein fjernes ved ekstraksjon med mettet butanol. Det anvendte mRNA er GAPDH-antisense-mRNA, preparert fra antisenseplasmid (pTRI-GAPDH-muse-antisense-kontrolltemplat fra Ambion) ved anvendelse av T7-promotor og MaxiScript-settet (Ambion). Det korte beskyttelsesfragment er

den 60-mer komplementære del syntetisert separat og merket på samme måte. Sekvensene av beskyttelsesfragmentene er som følger:

Full length protection fragment:	SEQ ID: 23
CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGCT	
TGTCTAA	
Short protection fragment:	SEQ ID: 24
CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTT	

5 Hybridiseringer utføres ved å blande 20 nM beskyttelsesfragment og 60 nM GAPDH-mRNA i 10 µl sluttvolum i 2 timer ved 22 °C eller 37 °C. Etter hybridisering tilsettes 200 µl av en blanding av nukleaser i overensstemmelse med instruksjoner fra fabrikanten (Ambion Nuclease Protection Kit, 1:200 fortynning av nukleaseblanding) og inkuberes på nytt ved de samme temperaturer i 30 minutter. Hydrolysen stanses med hybridiseringsinhiberingsbuffer (Ambion), og oligonukleotider pelleteres og vaskes med etanol. 10 µl 1 x gelappliseringsbuffer (Ambion) tilsettes, og oligonukleotider separeres på en 15 % TBE-ureagel. Gelen virvles i elueringsbuffer i 30 minutter, plasseres på en plastplate og avbildes med Tundra ved anvendelse av fluoresceinfiltre for seleksjon av eksitasjons- og emisjonsbølgelengder. Avbildningen akkumuleres på CCD-rekken i 2 minutter. Beste betingelser er de for prøver 20 inkubert i Hyb Buff 2 ved 37 °C eller i Hyb Buff 3 ved 22 °C. I disse prøver er det ingen rester av påvisbart fullengdet beskyttelsesfragment, og det observeres betydelige mengder av en del av det fullengdede beskyttelsesfragment med en størrelse som er cirka den samme som det korte beskyttelses- 25 fragment.

Eksempel 12

mRNA-analyse ved NPA-MAPS (se figur 15)

30 Hele NPA-MAPS-protokollen ble anvendt med betingelser for hybridisering og nukleasebehandling som var lignende dem beskrevet i eksempel 11. Ti prøver ble anvendt i analysen. Alle inneholdt den samme mengde av 70-mer-oligonukleotid-beskyttelsesfragmentet og forskjellige mengder av GAPDH-mRNA. Hybridiseringsprøver i 10 µl i 50 % hybridiseringsbuffer og

50 % fortynningsbuffer inneholdende 0,08 mg/ml gjær-RNA (Ambion) ble oppvarmet til 90 °C i 6 minutter, sentrifugert i kort tid, oppvarmet til 70 °C i 5 minutter og tillatt å avkjøles til 19 °C og inkubert i 19 timer. 200 µl nuklease-

5 blanding ble deretter tilsatt til hver prøve i 30 minutter ved 19 °C. Aliquoter på 60 µl av hver prøve ble uttatt for MAPS-analysen. 2 µl 10 N NaOH og 2 µl 0,5 M EDTA ble tilsatt, og prøven ble oppvarmet til 90 °C i 15 minutter, 37 °C i 15 minutter og tillatt å henstå ved romtemperatur i 20 minutter.

10 Prøvene ble deretter nøytralisert med 2 µl 10 M HCl, og 12 µl 20 x SSC inneholdende 2 M HEPES, pH 7,5, og 200 nM biotinylert detektoroligonukleotid spesifikt for beskyttelsesfragmentet ble tilsatt sammen med 1 µl 10 % SDS. Prøvene ble blandet, oppvarmet til 80 °C i 5 minutter, og to 35 µl aliquoter av hver

15 prøve ble pipettert over i to brønner på en MAPS-plate (hver prøve ble delt i to og kjørt i to paralleller på MAPS-platen). Platen var blitt preparert som for standard-MAPS-protokoll, der selvsammensatt Cy5-derivatisert linker spesifikk for beskyttelsesfragmentet allerede var festet. MAPS-platen ble

20 dekket og inkubert ved 50 °C over natten, og deteksjon og luminescens ble utført som beskrevet. I den siste prøven ble det ikke tilsatt noen nukleaser under analysen som en kontroll for å visualisere hvordan beskyttelsesfragmentet alene ville påvises av MAPS. I den nedre del av figuren er intensitets-

25 skanningen (som analysert ved hjelp av avbildningsapparatet) vist for den øverste rad av brønner. Mengden GAPDH-mRNA til stede i prøven (det vil si mengden i hver duplikatbrønn etter tilsetning av aliquoter på MAPS-platen) er oppført i figuren.

Oligonukleotidene anvendt for MAPS-platene var som

30 følger:

Anchor^{*}: SEQ ID: 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

Linker^{**}: SEQ ID: 26

CTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGG
CG

Protection fragment (complementary to mouse antisense mRNA for GAPDH)

SEQ ID: 27

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGC
TTGCTTGTCTAA

Detector Oligonucleotide^{***} – labeled at 5' end with biotin

SEQ ID: 28

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCAT

*Ankere ble syntetisert med C12-spacer med amid ved 5'-enden

**Linkere ble syntetisert med Cy5 festet ved 5'-enden

***Detektoroligonukleotider ble syntetisert med biotin festet ved 5'-enden

5

Eksempel 13

Fortynningskurve, NPA-MAPS (se figur 16)

Dataene diskutert i eksempel 12 og vist i figur 15 ble kvantifisert og plottet som en fortynningskurve. Gjennom-
 10 snitt og standardavvik for alle åtte flekker i de to duplikatbrønner plottes for hver konsentrasjon av mRNA. En bindingskurve er inntegnet, av formen:

$$\text{fraksjonsbinding} = \text{maks. binding} * 1/(1 + IC_{50}/L)$$

15

hvor maks. binding er den maksimale binding ved metning, fraksjonsbinding er bindingsmengden ved ligandkonsentrasjon L, og IC_{50} er konsentrasjonen av ligand ved hvilken fraksjonsbindingen er halvparten av den maksimale binding. Kurven er
 20 vist som røde prikker på figuren og tegnet med en beste tilpasningsverdi på $IC_{50} = 4,2$ femtomol, som avmerket på figuren.

Eksempel 14

NPA-MAPS-analyse av GAPDH-mRNA i en total muselever-RNA-ekstrakt

25

En total muse-RNA-ekstrakt analyseres for GAPDH-mRNA med en NPA-MAPS-analyse, og en fortynningskurve oppføres. Totalt RNA fra muselever prepareres ved anvendelse av et Qiagen-sett. RNA utfelles i 70 % EtOH med 0,5 M Mg-acetat og
 30 resuspenderes i 10 μ l 5 x SSC med 0,05 % SDS med 1,8 nM beskyttelsesfragment. Det tilsatte beskyttelsesfragment er et oligonukleotid med lengde på 70 baser, av hvilke 60 baser er komplementære med muse-GAPDH. Det anvendes enten et fragment som er komplementært med muse-GAPDH-mRNA ("beskyttelses-
 35 fragment"), eller komplementet av sekvensen anvendes som en negativ kontroll ("antisensefragment").

RNA-prøver med beskyttelsesfragmenter oppvarmes til 90 °C i 5 minutter, og hybridiseringer utføres ved å bringe prøver til 70 °C og tillate dem å avkjøles langsomt til rom-

temperatur over natten. S1-nuklease (Promega) ved 1:10 for-
 tynning tilsettes i 30 µl 1 x S1-nukleasebuffer (Promega) i
 30 minutter ved 19 °C, og stoppes med 1,6 µl 10 N NaOH og
 2,7 µl 0,5 M EDTA. Prøver oppvarmes til 90 °C i 15 minutter og
 5 deretter til 37 °C i 15 minutter for å denaturere og nedbryte
 RNA, nøytraliseres med 1,6 µl 10 M HCl og inkuberes på MAPS-
 plater over natten i 5 x SSC med 0,05 % SDS supplert med
 200 mM HEPES, pH 7,5, som er tilsatt 30 nM biotinyllert detek-
 sjonsoligonukleotid. Vask og visualisering med SA-HRP utføres
 10 som beskrevet. Signalmengden synker parallelt med synkende
 mengder av muse-RNA (prøver inkluderer 500, 170, 50, 5 eller
 0,5 µg totalt muse-RNA). Det inkluderes to kontrollprøver som
 ikke tilsettes noe S1-nuklease. Signal blir kun observert for
 det komplementære beskyttelsesfragment.

15 Anvendte oligonukleotider:

For antisensekontroll (samme oligonukleotider som for
 eksempel 12):

Anchor^{*}: SEQ ID: 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

Linker^{**}: SEQ ID: 26

CTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGG
 CG

Protection fragment (complementary to mouse antisense-mRNA for GAPDH)

SEQ ID: 27

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGC
 TTGCTTGTCTAA

Detector Oligonucleotide^{***}: SEQ ID: 28

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCAT

For Sense GAPDH mRNA samples:

Anchor^{*}: SEQ ID: 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

Linker^{**}: SEQ ID: 29

ATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

Protection fragment (complementary to mouse mRNA for GAPDH): SEQ ID: 30

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCATTGCTGACAATCTTGAGTGAGTTGTCATATTTCT
 CGGCTTGTCTAA

Detector Oligonucleotide^{***}: SEQ ID: 31

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAG

*Ankere ble syntetisert med C12-spacer med amid ved 5'-enden

20 **Linkere ble syntetisert med Cy5 festet ved 5'-enden

***Prober ble syntetisert med biotin festet ved 5'-enden

Eksempel 15

En nukleasebeskyttelses-MAPS-analyse med kontroller

mRNA ekstraheres fra muselever, og nukleasebeskyttelse utføres vesentlig som beskrevet i eksempel 14, med unntak av at det GAPDH-spesifikke beskyttelsesfragment omfatter 60 nukleotider som er komplementære med muse-GAPDH, etterfulgt av 15 "overhengende" nukleotider ved 3'-enden av fragmentet som ikke er komplementært med målet. Etter hybridisering og nukleasespaltning hybridiseres det resterende beskyttelsesfragment til en MAPS-plate, som angitt i eksempel 14, med unntak av at to forskjellige oligonukleotiddeteksjonsfragmenter anvendes for å påvise det immobiliserte beskyttelsesfragment. Et deteksjonsfragment er komplementært med den GAPDH-spesifikke del av beskyttelsesfragmentet, og den andre, en kontroll, er komplementær med overhengdelen på 15 baser av beskyttelsesfragmentet. Hvert deteksjonsfragment anvendes på forskjellige prøvekopier (det vil si i forskjellige brønner), slik at begge deteksjonsfragmenter kan merkes med det samme deteksjonsmolekyl. I det foreliggende eksempel merkes begge fragmenter med HRP. Uten tilsetning av nuklease observeres signaler fra begge deteksjonsfragmenter; mens når nukleasespaltning utføres, kan det kun påvises signal som tilsvarer GAPDH-sekvensene. Mengden av GAPDH-spesifikt signal reduseres i forhold til det som observeres i fravær av nukleasespaltning, fordi beskyttelsesfragmentet tilsettes i overskudd i forhold til mengden av tilstedeværende GAPDH-mRNA. Dette tillater at mengden av GAPDH-mRNA er begrensende for den beskyttende hybridisering, slik at mengden av dannet dobbelttrådet hybrid (og derfor mengden av beskyttelsesfragment som beskyttes mot nukleasen) avspeiler mengden av mRNA. Når det ikke inkluderes noe mRNA i reaksjonsblandingen, kan heller ikke signal påvises når nukleaser tilsettes. De ovenfor angitte funn viser at hybridiserings- og spaltningstrinnene i analysen foregikk som ønsket.

Når beskyttelsesfragmenter som tilsvarer mange forskjellige mål inkluderes i en gitt analyse, kan hvert av beskyttelsesfragmentene omfatte det samme overheng på 15 baser. Dette tillater at ett deteksjonsfragment anvendes for å teste for resterende overheng for alle prøver.

Eksempel 16

En transkripsjonsanalyse screening for forbindelser som kan endre ekspresjonen av gener som korrelerer med en sykdomstilstand

5 En cellelinje avledet fra en human tumor anvendes. Den er funnet å uttrykke 30 gener på høyere nivåer enn normale celler. (Det vil si at disse 30 gener anvendes mer enn i normale celler for å danne mRNA og deretter danne proteinet som genene er instruksjoner for. En transkripsjonsanalyse
10 måler hvor mye genene anvendes ved å måle hvor mye mRNA som er til stede for hvert gen.) Ved anvendelse av en nukleasebeskyttelsesanalyse på MAPS-plater (NPA-MAPS) blir 8800 kjemiske forbindelser testet for å observere om dyrkning av cellene i nærvær av forbindelsene kan redusere ekspresjonen av noen av
15 de 30 korrelative gener uten å påvirke ekspresjonen av seks normale (konstitutive, "husholdnings")gener. Alle forbindelser som har denne effekten, kan være anvendelige i den fremtidige utvikling av legemidler for behandling av denne type tumor.

 Cirka 10 000 til 100 000 celler tilsettes til hver
20 brønn på 100 96-brønners polystyrenplater, og cellene dyrkes i 2 dager inntil de dekker overflaten av hver brønn. For 8 brønner på hver plate henses cellene til å vokse uten tilsetninger. Til de resterende 88 brønner på hver plate tilsettes en forskjellig kjemisk forbindelse, slik at effekten av
25 denne alene kan testes. For de 100 plater anvendt samtidig kan 8800 forbindelser testes eller screenes. Cellene dyrkes i 24 timer i nærvær av forbindelsene, og cellene høstes deretter for analyse. Cellene i hver plate behandles i overensstemmelse med instruksjonene for preparering av RNA i prøver fra 96-
30 brønners plater (f.eks. i overensstemmelse med Qiagen RNeasy 96-settet). Etter at RNA er preparert, blir mengden av hver av 36 forskjellige mRNA-typer kvantifisert ved hjelp av NPA-MAPS-metoden, inkludert de 30 samsvarende gener og de 6 normale "husholdnings"-gener. 36 DNA-oligonukleotidbeskyttelses-
35 fragmenter som hvert tilsvarende ett av genene av interesse, tilsettes til hver brønn og tillates å hybridisere under utvalgte stringente betingelser til sine mål-mRNA-sekvenser. Sl-nuklease tilsettes deretter for å nedbryte overskudd av ikke-hybridisert DNA, og prøvene behandles kjemisk for også å

nedbryte RNA. Det som er tilbake, er oligonukleotidbeskyttelsesfragmentet for hvert av de 36 gener i forhold til hvor mye mRNA som var til stede i de behandlede celler for hver prøve.

Ett hundre 96-brønners plater som hver omfatter en rekke med 36 forskjellige ankeroligonukleotider i hver brønn, 5 prepareres ved tilsetning av 36 forskjellige linkeroligonukleotider til hver brønn. Linkerne samler seg selv på overflaten av hver brønn og omdanner de generiske plater til MAPS-plater omfattende spesifikke prober for hvert av de 36 oligonukleotidbeskyttelsesfragmenter. Hver linker har en del som er 10 spesifikk for ett av de 36 ankerene og en del som er spesifikk for et segment av ett av de 36 beskyttelsesoligonukleotider. Oligonukleotidprøven fra hver brønn på 100 prøvers-platene tilsettes til en tilsvarende brønn på 100 MAPS-platene. Etter 15 hybridisering under utvalgte stringente betingelser tilsettes et deteksjonsoligonukleotid for hvert mål med et bundet kjemiluminescerende enzym, slik at hver spesifikk flekk i hver brønn lyser i forhold til hvor mye mRNA som var til stede i prøven. Alle brønner som viser reduserte mengder av korrelative gener uten noen effekt på de seks husholdningsgener, er 20 interessante. Forbindelsene tilsatt til cellene for disse prøver er mulige startpunkter for å utvikle antitumormidler.

Eksempel 17

25 Indusert og konstitutiv genekspresjon

RNA ble preparert vesentlig som beskrevet i eksempel 14 fra museleverer som enten ikke var infisert ("kontroll") eller 1 time etter infeksjon ("infisert") med adenovirus. 60 µg lever-RNA ble anvendt for hver prøve, og prøvene ble 30 preparert i duplikat. Hver analysebrønn inneholdt tre sett av duplikatsteder som tilsvarende de tre gener beskrevet ovenfor. Hvert sted inneholdt et anker, bundet til en linker omfattende en probe som var komplementær med et beskyttelsesfragment som tilsvarende ett av de tre gener. En nukleasebeskyttelses-MAPS-analyse ble utført vesentlig som beskrevet i figur 12, og 35 avbildningene ble oppsamlet og skannet som beskrevet. De ubehandlede, oppsamlede avbildningsdata og intensitets-skanningene for duplikatbrønner for hvert av de tre mRNA-mål er vist. Antallene over skanningslinjene er de integrerte

intensitetsverdier og standardavvik for hver tilstand ($n = 4$). Husholdningsgenet GAPDH, som ikke var forventet å endres, viste en beskjeden økning på 1,3 ganger i den infiserte prøve som ikke var statistisk signifikant. Transkripsjonen av MIP-2 og c-jun ble henholdsvis økt fire og seks ganger. Disse funn viser at to gener, MIP-2 og c-jun, oppviser forhøyet ekspressjon som respons på adenovirusinfeksjon, sammenlignet med en kontroll, konstitutivt uttrykt gen - GAPDH.

10 Eksempel 18

En enzymanalysescreening for forbindelser som selektivt inhiberer tyrosin- eller serinkinase (se figur 17)

Kinaser er enzymer som fester et fosfat til proteiner. Mange av disse er blitt vist å stimulere normal og neoplastisk cellevekst. Forbindelser som inhiberer spesifikke kinaser (men ikke alle kinaser), kan således anvendes for å teste hvorvidt kinasene er involvert i patologi, og hvis dette er tilfellet, kan de tjene som startpunkter for farmasøytisk utvikling. Fem tyrosinkinaser som er involvert i stimulering av cellevekst eller i regulering av den inflammatoriske respons, er f.eks. src, lck, fyn, Zap70 og yes. Hver kinase har substrater som er delvis identifisert som korte peptider som inneholder et tyrosin. Noen av kinasespesifisitetene overlapper, slik at forskjellige kinaser kan fosforylere noen peptider i like høy grad, men andre preferensielt. For de fem kinaser ble det utvalgt 36 peptidsubstrater som viser spektrum av spesifikke og overlappende spesifisiteter.

Ett hundre 96-brønners plater anvendes; hver brønn omfatter 36 generiske oligonukleotidankere. 36 linkere prepareres for å omdanne den generiske oligonukleotidrekke (kun med ankere) til rekker som omfatter peptidsubstrater. De 36 peptidsubstrater syntetiseres, og hvert av disse bindes kovalent gjennom en amidbinding, f.eks. til et oligonukleotid som inneholder en 5'-aminogruppe. Oligonukleotidene inneholder sekvenser som hybridiserer spesifikt til ankerene. Peptid-/oligolinkerne samler seg selv på overflaten ved å tilsette dem til alle brønner på MAPS-platene.

For screening tilsettes de fem kinaser i passende konsentrasjoner (slik at graden av fosforylering av

substratene balanseres så mye som mulig) til hver brønn, sammen med en av de 8800 forskjellige forbindelser som skal testes. Forbindelsene testes for sin evne til direkte å inhibere de isolerte enzymer. Graden av fosforylering av hvert peptid i rekken påvises ved å tilsette merkede antistoffer som kun bindes til peptider som er fosforylert på tyrosin. Alle brønner som viser en reduksjon i noen av fosfotyrosinflekkene, men ikke alle flekkene, er interessante. Forbindelser som var blitt tilsatt til disse brønner, kan testes videre som mulige selektive inhibitorer av noen av de testede kinaser.

Skjemaet for analysen er vist i topppanelet på figur 17. Et kimært linkermolekyl prepareres hvori et 25 basepar oligonukleotid komplementært med ett av ankerene blir kryssbundet til et peptidsubstrat for et tyrosinfosfokinaseenzym. Det kimære oligopeptidsubstrat samler seg selv på en rekke av oligonukleotidankere, kinaseenzymet anvendes for å fosforylere peptiddelen av kimærene, og etter at enzymreaksjonen er tillatt å foregå, blir mengden av fosforylering av peptidet bestemt ved hjelp av antifosfotyrosin- eller antifosfoserin-antistoffer med en bundet deteksjonsfluorofor eller et enzym.

Resultatene av analysen er vist i det nedre panel. Den homobifunksjonelle kryssbindingsforbindelse, DSS (Pierce), ble anvendt for å binde 5'-aminogruppen i en oligonukleotid-linker til N-terminalen av et peptid syntetisert med et fosforylert tyrosin. Sekvensen av peptidet i enkeltbokstavkode var: TSEPQpYQPGENL (SEQ ID: 32), hvor pY representerer fosfotyrosin. Kimærene ble enten anvendt direkte eller først brakt til pH 14 i 60 minutter for partiell hydrolysering av fosfatgruppen fra tyrosinet. De fosforylerte eller partielt defosforylerte kimære molekyler ble selvsamlet på komplementære ankermolekyler i en MAPS-plate i de viste konsentrasjoner i 1 time. Etter vask og blokkering av brønnene med 0,3 % BSA i SSPTP ble antifosfotyrosinantistoff kryssbundet til HRP (antistoff 4G10 fra Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) tilsatt ved 1:3000 fortynning i SSPTP i 1 time, og mengden av bundet antistoff ble påvist med kjemiluminescenssubstrat, Super Signal Blaze. Den viste avbildning ble akkumulert på CCD-rekken i 1 minutt. Som forventet, ble det observert en forskjell i mengden av fosfat bundet til oligopeptidet. Denne

forskjellen er basis for en analyse som måler hvor aktiv en kinaseserie er når den behandles med forskjellige mulige inhibitorer.

5 Eksempel 19

En bindingsanalyse for deteksjon av selektive inhibitorer av interaksjonen mellom SH2-domener og fosforylerte peptider

SH2-domener tjener som "docking"-subenheter av noen vekstregulerende proteiner. Domenene bindes til fosfotyrosin-
10 inneholdende proteiner eller peptider med ufullkommen spesifisitet. Det vil si at noen fosfotyrosinpeptider bindes spesifikt til ett eller noen få SH2-proteiner, mens andre bindes bredt til mange SH2-proteiner.

For denne analysen er linkerne fosforylerte peptider
15 som er kovalent bundet til oligonukleotider. Peptidkomponentene er utvalgt for sin evne til å bindes til en gruppe av utvalgte SH2-proteiner. Linkerne omdanner generiske MAPS-plater til plater med ligander som er spesifikke for gruppen av SH2-proteiner. 100 96-brønners MAPS-plater inneholdende ligandene
20 dannes. Proteinene isoleres og merkes med f.eks. et Cy5-fluorescerende molekyl.

For å screene for inhibitorer av SH2-domene-/fosfopeptidinteraksjonen tilsettes gruppen av merkede SH2-proteiner til hver brønn på de 100 96-brønners MAPS-plater, og i hver
25 brønn tilsettes en forskjellig testforbindelse. Effekten av hver forbindelse blir således testet individuelt med hensyn til interaksjonen av SH2-proteinene med deres fosfopeptidligander. Analysen utføres for å måle fluorescensen av bundet SH2-protein assosiert med hver overflatebundet peptidlinker.
30 For enhver brønn som viser redusert fluorescens i noen flekker, men ikke alle flekker, kan den tilsatte forbindelse testes ytterligere som en antatt selektiv inhibitor av SH2-"docking".

35 Eksempel 20

Høyeffektiv screening (se figur 22)

Det er vist en høyeffektiv MAPS-plate som viser deteksjonen av signal fra 96 brønner i ett enkelt eksperiment. Hybridisering til det samme oligonukleotid ble målt med

16 gjenparter i 80 brønner. Som vist, var reproduserbarheten av de 1280 hybridiseringsanalyser meget høy. Kolonnene lengst til venstre og lengst til høyre tjente som kontroller for å standardisere signalet for forskjellige konsentrasjoner av
5 oligonukleotidet.

På lignende måte kan 16 forskjellige oligonukleotider testes i hver brønn, og testen kan gjentas i de 80 forskjellige brønner på platen. Et enda større antall forskjellige oligonukleotider eller andre prober (f.eks. 100 nukleotid-
10 prober) kan selvsagt analyseres i hver brønn, og mange plater kan testes samtidig (f.eks. 100 plater, slik som 96-brønners mikrotiterplater). Det store antall analyser som kan utføres på hver prøve (f.eks. i det sistnevnte tilfellet ca. 100 forskjellige analyser), og det store antall prøver som kan
15 analyseres samtidig (f.eks. i det sistnevnte tilfellet ca. 96 x 100, eller 9600 forskjellige prøver), gir meget høy effektivitet.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for påvisning av minst ett
5 nukleinsyremål,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter
a) å bringe en prøve som kan omfatte målet (målene), i kontakt
med et nukleasebeskyttelsesfragment (-fragmenter) som er
spesifikt for, og som binder til, målet (målene) for derved å
10 danne et nukleasebeskyttelsesfragment-/målnukleinsyredupleks,
b) å eksponere prøven for en nuklease som er effektiv til å
kløyve den resterende enkelttrådede nukleinsyre, og deretter
c) å bringe den resulterende prøven i kontakt med en
kombinasjon som omfatter, før tilsetning av prøven,
15 i) en overflate som omfatter et stort antall romlig
atskilte områder, minst to av disse er i det
vesentlige identiske og hvert område omfatter
ii) minst to forskjellige oligonukleotidankere som
hvert er i forbindelse med
20 iii) en bifunksjonell linker som inneholder en første
del som er spesifikk for ankeret, og en andre
del som omfatter en probe som er spesifikk for
delen (delene) i duplekse,
d) under betingelser som er effektive for hybridisering og
25 e) for påvisning av enhver bundet beskyttet del (deler).
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter
a) å bringe en prøve som kan omfatte målet (målene), for
30 derved å danne et nukleasebeskyttelsesfragment-
/målnukleinsyredupleks, i kontakt med et nukleasebeskyttelses-
fragment (-fragmenter) som er spesifikt for, og som binder
til, målet (målene) for derved å danne et nukleasebeskyttel-
sesfragment-/målnukleinsyredupleks,
35 b) å eksponere prøven for en nuklease som er effektiv til å
kløyve den gjenværende enkelttrådede nukleinsyren, og deretter
c) å bringe den resulterende prøven i kontakt med en
kombinasjon som omfatter, før tilsetning av prøven,

- i) en overflate som omfatter et stort antall romlig atskilte områder, minst to som er vesentlig identiske og hvert område omfattende
- ii) minst to forskjellige ankere som hvert står
5 forbindelse med
- iii) en bifunksjonelt linker som inneholder en første del som er spesifikk for ankeret, og en andre del som omfatter en probe som er spesifikk for nukleasebeskyttelsesfragmentet (-fragmentene),
- 10 d) under betingelser som er effektive for nukleasebeskyttelsesfragmentet (-fragmentene) til å binde til kombinasjonen, og
- e) å påvise det bundne beskyttelsesfragmentet (-fragmentene).

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at hvert område omfatter minst ca. fire forskjellige oligonukleotidankere.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at hvert område omfatter
20 minst ca. åtte forskjellige oligonukleotidankere.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at hvert område omfatter
minst ca. 64 forskjellige oligonukleotidankere.

25 6. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at hver overflate omfatter minst fra ca. 96 til ca. 1536 i det vesentlige identiske, romlig atskilte områder.

30 7. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at hver overflate omfatter ca. 4-1536 i det vesentlige identiske, romlig atskilte områder, der hvert område omfatter fra ca. 8 til ca. 100
35 forskjellige oligonukleotidankere.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at hver overflate omfatter ca. 4, 8, 96 eller 384 i det vesentlige identiske, romlig

atskilte områder, der hvert område omfatter fra ca. 4 til ca. 100 forskjellige oligonukleotidankere.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 2,

5 k a r a k t e r i s e r t v e d at områdene omfatter fra ca. 30 til ca. 100 prober, hvert spesifikt for et forskjellig mål.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 2,

10 k a r a k t e r i s e r t v e d at områdene er ytterligere inndelt i mindre underområder.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at hvert område er en
15 mikrotiterplatebrønn.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at ankerene er oligonukleotider med en lengde på fra ca. 0 til ca. 50
20 nukleotider.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at ett eller flere områder ytterligere omfatter kontroller for hybridiseringseffektivitet
25 eller -spesifisitet.

14. Fremgangsmåte ifølge krav 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at ett eller flere områder ytterligere omfatter kontroller for kapasiteten til et sted
30 for å binde mål.

15. Fremgangsmåte ifølge krav 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter å bringe kombinasjonen og ethvert bundet nuklease-
35 beskyttelsesfragment i kontakt med en merket påvisningsprobe, og å påvise påvisningsproben.

16. Fremgangsmåte ifølge krav 2 og 15,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere
omfatter å bringe kombinasjonen og enhver bundet nuklease-
beskyttelsesprobe i kontakt med en merket påvisningsprobe som
danne et kjemiluminesent signal, og påvisning av
5 påvisningsproben.

17. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere
omfatter

- 10 a) behandle prøven som omfatter målet (målene) som
er bundet til nukleasebeskyttelsesfragmentet
eller -fragmentene med én eller flere nukleaser
som er effektive for opptaking av annen
nukleinsyre enn nukleasebeskyttelsesfragmentet
15 (-fragmentene) som har hybridisert til
nukleinsyren (-syrene) av interesse, og
eventuelt, delen (delene) av nukleinsyren (-
syrene) som er blitt hybridisert, og
- 20 b) fjerning av annet nukleinsyremateriale enn
nukleasebeskyttelsesfragmentet (-fragmentene)
som har hybridisert til nukleinsyren (-syrene)
av interesse, for å tilveiebringe en prøve
inneholdende nukleasebeskyttelsesfragmentet
(-fragmentene).

25 18. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den identifiserer et
RNA ekspresjonsmønster, hvori minst to av nuklease-
beskyttelsesfragmentene er spesifikke for forskjellige RNA-
30 molekyler.

19. Fremgangsmåte ifølge krav 18,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den identifiserer et
middel som modulerer et RNA-ekspresjonsmønster, og at den
35 ytterligere omfatter å sammenligne RNA-ekspresjonsmøsteret,
som er dannet i nærvær av middelet, med RNA-ekspresjons-
mønsteret som er fremstilt under et forskjellig sett av
betingelser.

20. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den identifiserer et
middel som modulerer interaksjonen mellom nuklease-
beskyttelsesfragmentet (-fragmentene) og proben (probene).
- 5 21. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nukleasebeskyttelses-
fragmentet er DNA.
- 10 22. Fremgangsmåte ifølge krav 20,
k a r a k t e r i s e r t v e d at DNA'et er amplifisert
før prøven som omfatter nukleasebeskyttelsesfragmentet
(-fragmentene), blir brakt i kontakt med kombinasjonen.
- 15 23. Fremgangsmåte ifølge krav 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d at amplifikasjonen er PCR-
amplifikasjon.
24. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at nukleinsyremålet
omfatter en polymorfisme.
25. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at kombinasjonen omfatter
25 et stort antall av områdene, og hvori fremgangsmåten er en
høyeffektiv fremgangsmåte.
26. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at et stort antall prøver
30 analyseres raskt.
27. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere
omfatter å fjerne de bifunksjonelle linkerne fra
35 oligonukleotidankerene og erstatte dem med i det vesentlige
identiske, eller med forskjellige bifunksjonelle linkere, for
derved å reprogrammere overflatene og gjenta fremgangsmåten
for påvisning av et mål.

28. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at ankerene er blitt
atskilt fra bifunksjonelle linkere som har en forskjellig
målspesifisitet.
- 5 29. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at prøven er utviklet *in*
vitro eller *in vivo*.
- 10 30. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at prøven er utviklet ved
inkubering eller dyrking av celler som kan inneholde målet
(målene) og ekstrahering av nukleinsyre fra cellene.
- 15 31. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er diagnostisk for
en sykdom, måler en medisins bivirkning eller påviser et
middel som har en terapeutisk effekt.
- 20 32. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at målene er DNA-
molekyler.
33. Sett som er anvendbart for påvisning av minst ett
25 nukleinsyremål i en prøve,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter
- a) minst ett nukleasebeskyttelsesfragment som er
spesifikt for nukleinsyren (-syrene), men ikke
for noen av oligonukleotidankerene i settet,
 - 30 b) en overflate som omfatter flere romlig atskilte
områder der minst to er i det vesentlige
identiske, hver region omfatter minst to
forskjellige oligonukleotidankere, og
 - c) en beholder som inneholder minst ett bifunk-
35 sjonelt linkermolekyl som har en første del som
er spesifikk for minst ett av oligonukleotid-
ankerene og en andre del som omfatter en probe
som er spesifikk for, og i påvisningen binder

til, minst ett av nukleasebeskyttelsesfragmentene.

34. Sett ifølge krav 33,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter
 d) én eller flere nukleaser som er effektive til å
 kløyve enkelttrådet nukleinsyre og/eller RNA-
 tråden i en DNA/RNA-dupleks.
- 10 35. Sett ifølge krav 33,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at det videre omfatter én
 eller flere nukleaser som er effektive for å kløyve
 enkelttrådet nukleinsyre og/eller RNA-tråden i en DNA/RNA-
 dupleks.
- 15 36. Sett ifølge krav 33,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at det videre omfatter
 et sett av instruksjoner for i) utførelse av en nuklease-
 beskyttelsesprosedyre på nukleinsyren (-syrene) av interesse,
20 ved anvendelse av et nukleasebeskyttelsesfragment (-frag-
 menter) spesifikt for nukleinsyren (-syrene), og ii) kobling
 til minst ett av oligonukleotidankerene, et bifunksjonelt
 linkermolekyl som har en første del som er spesifikk for minst
 ett av oligonukleotidankerene og en andre del som omfatter en
25 probe som er spesifikk for minst ett av nukleasebeskyttelses-
 fragmentene.

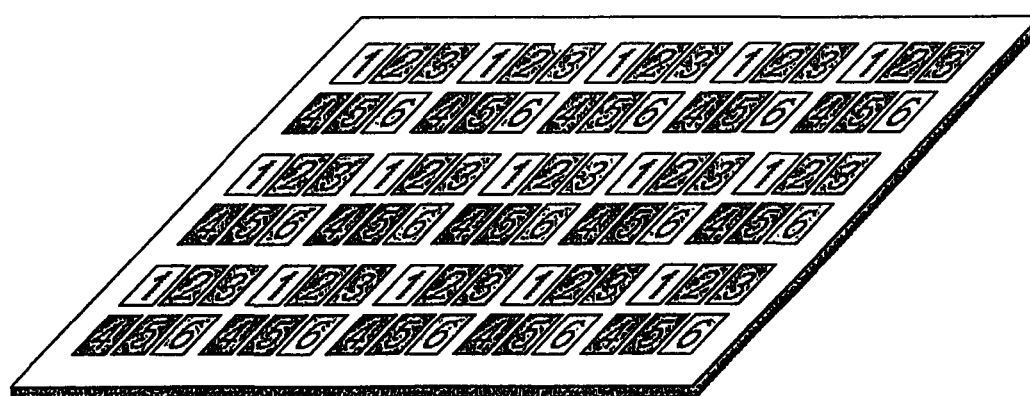
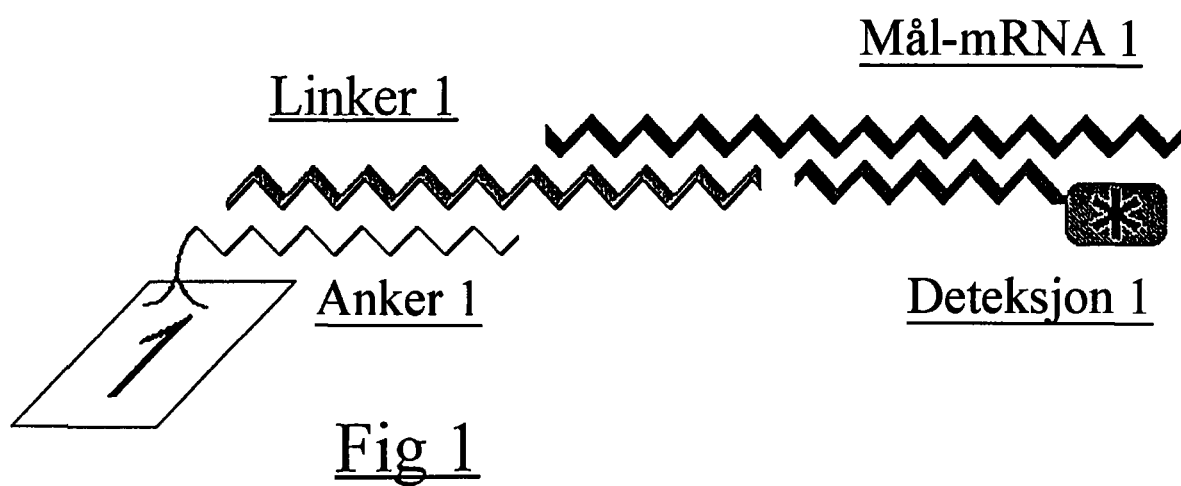


Fig 2

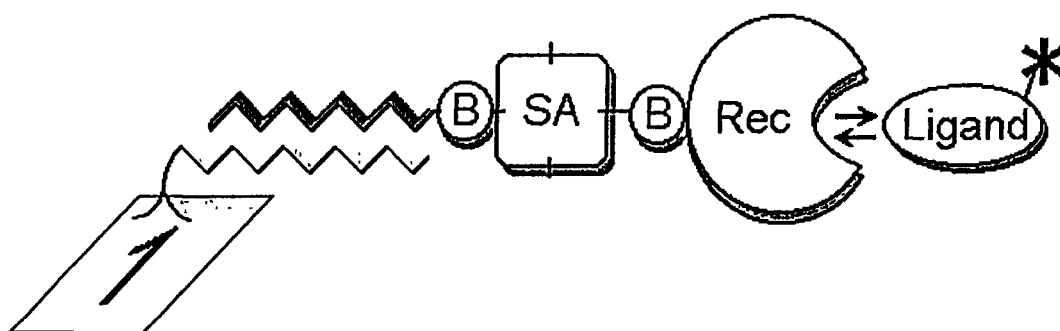


Fig 3

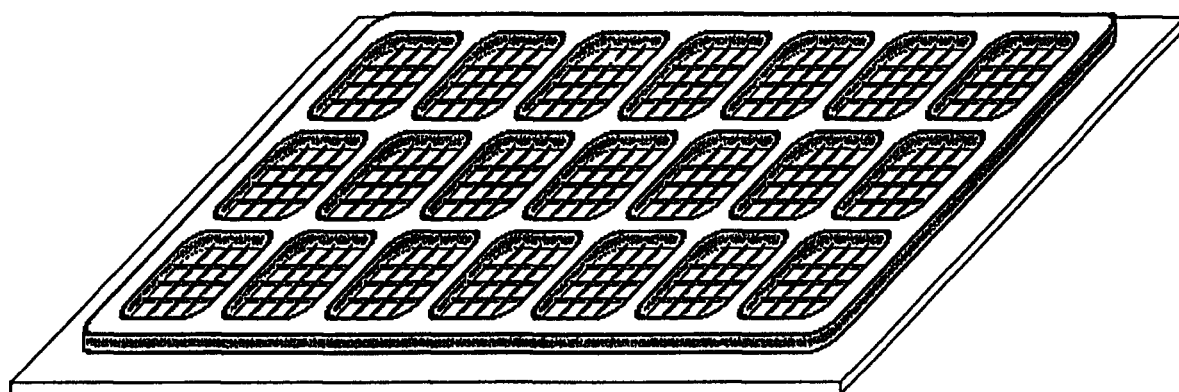


Fig 4

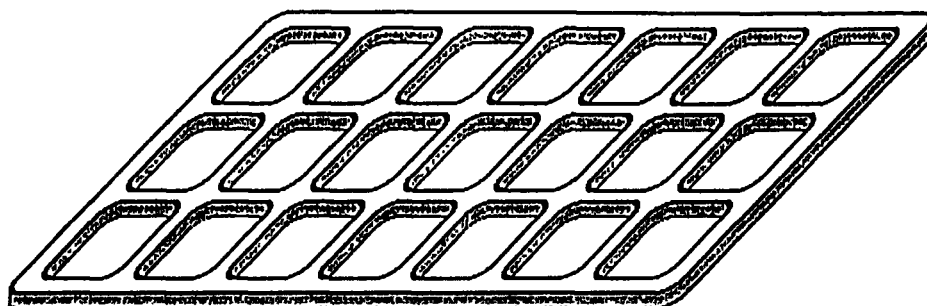


Fig 5a

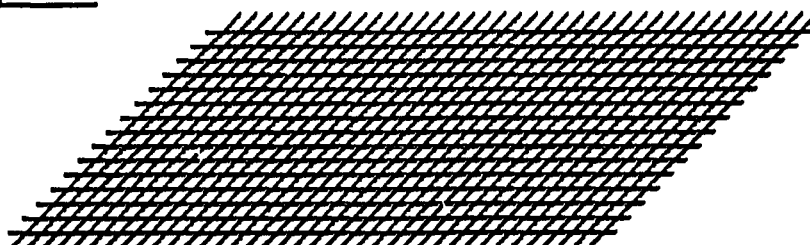


Fig 5b

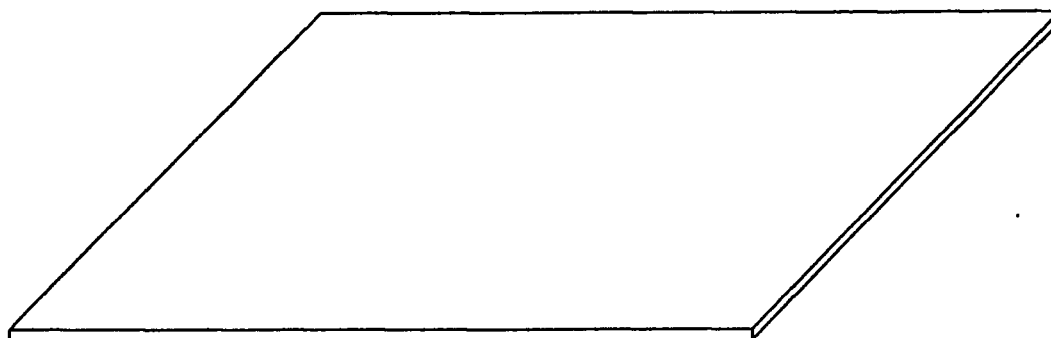


Fig 5c

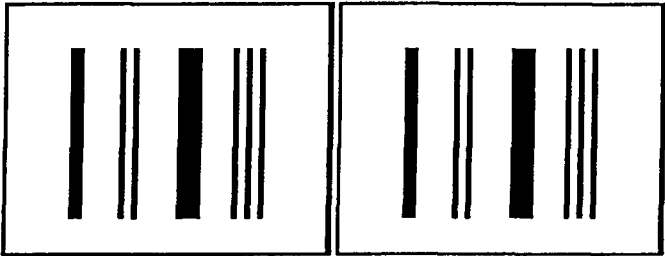


Fig 6

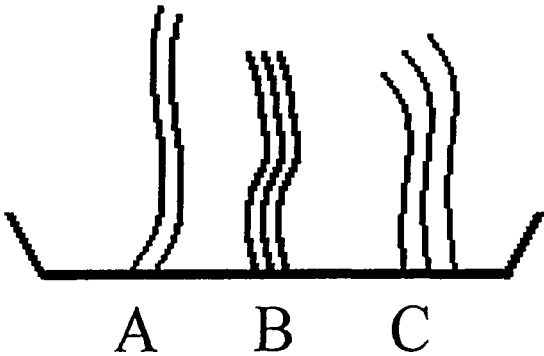
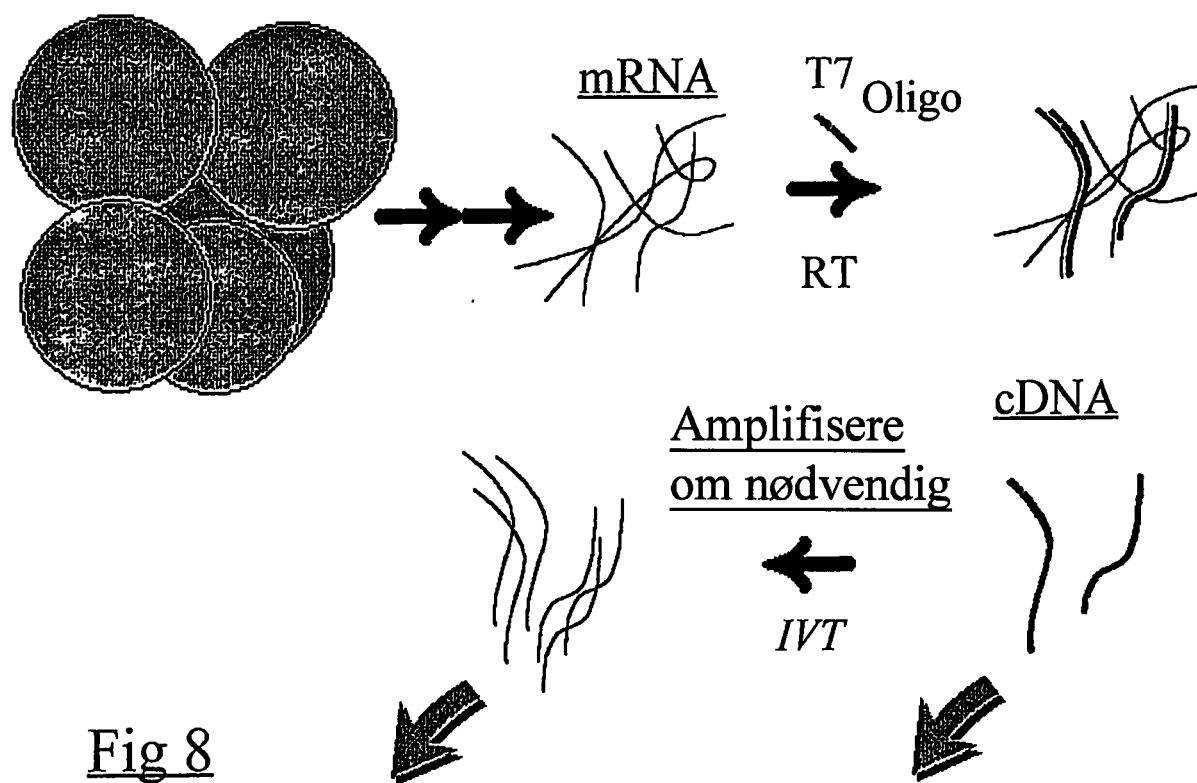
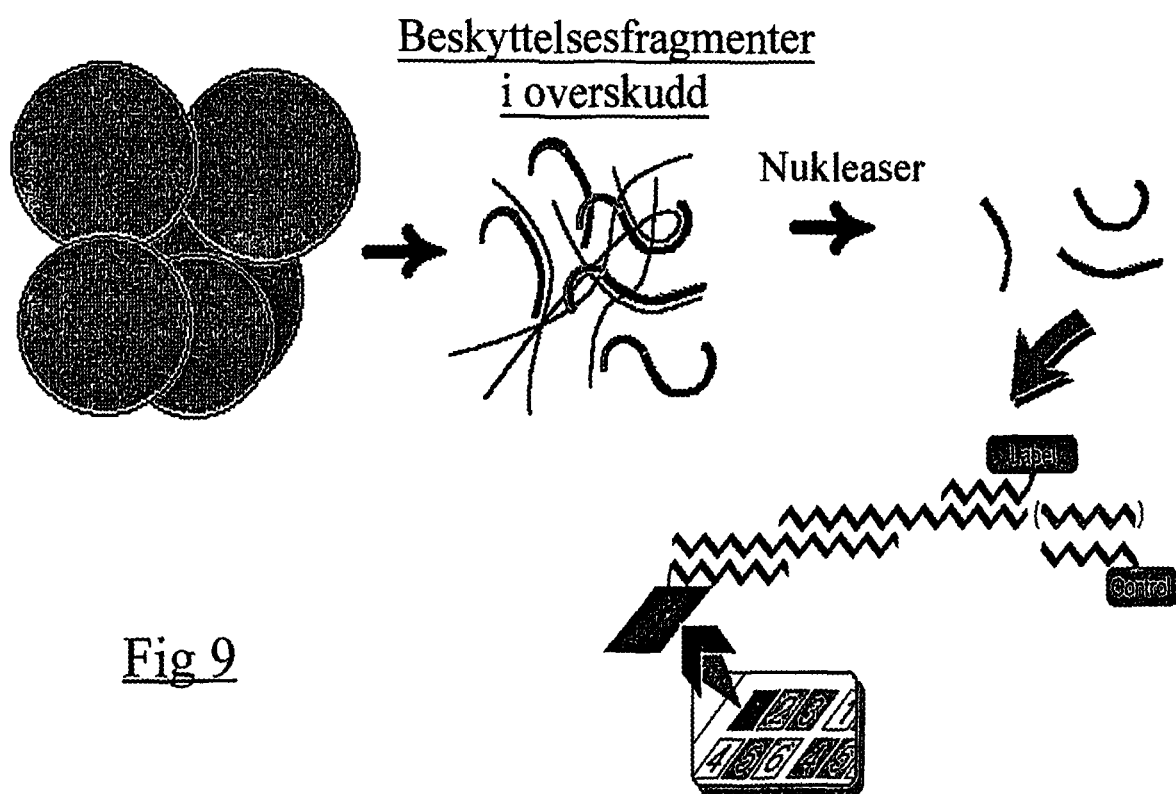


Fig 7





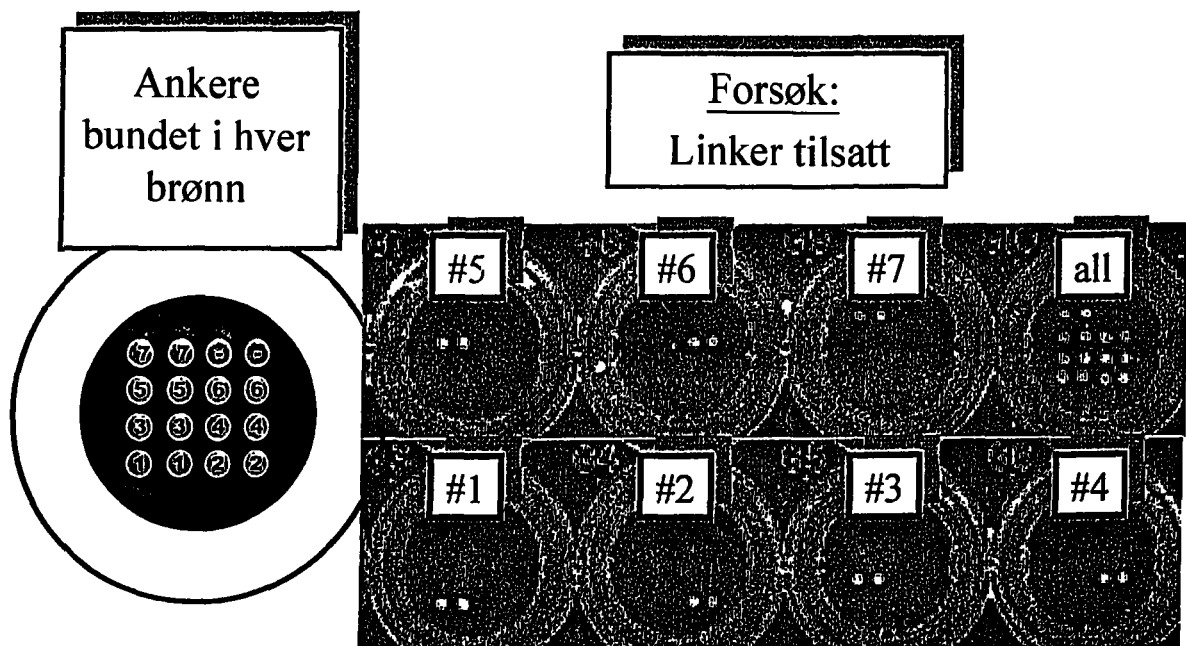


Fig 10

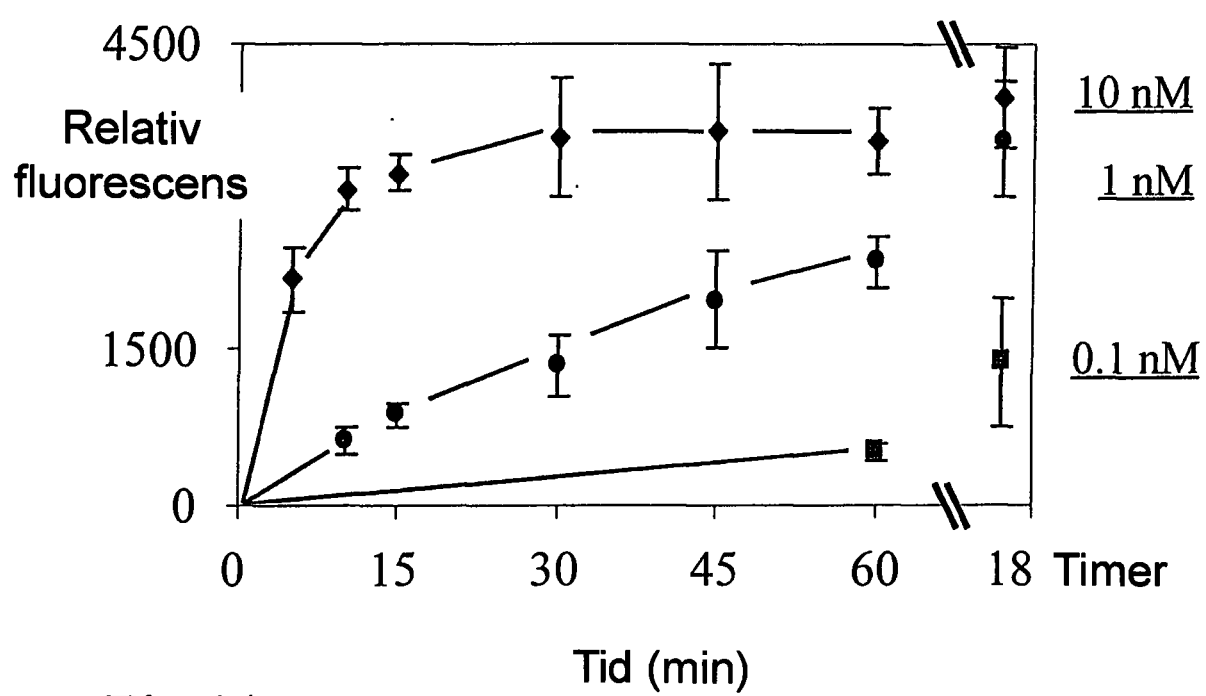


Fig 11

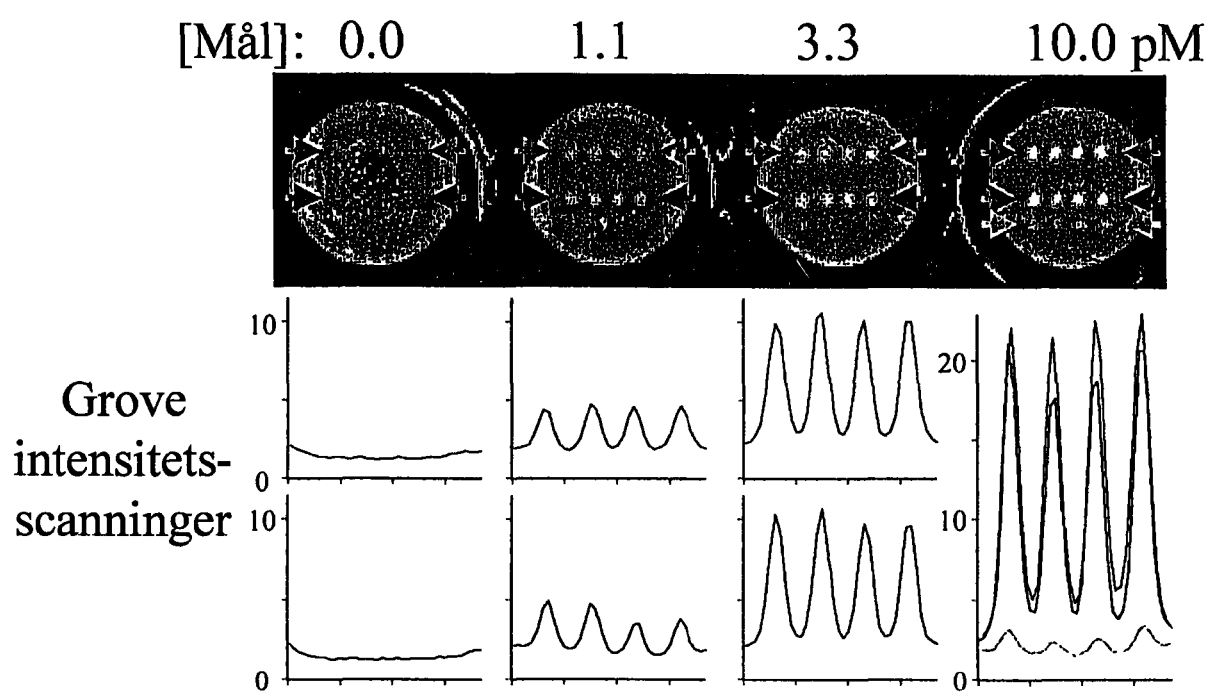
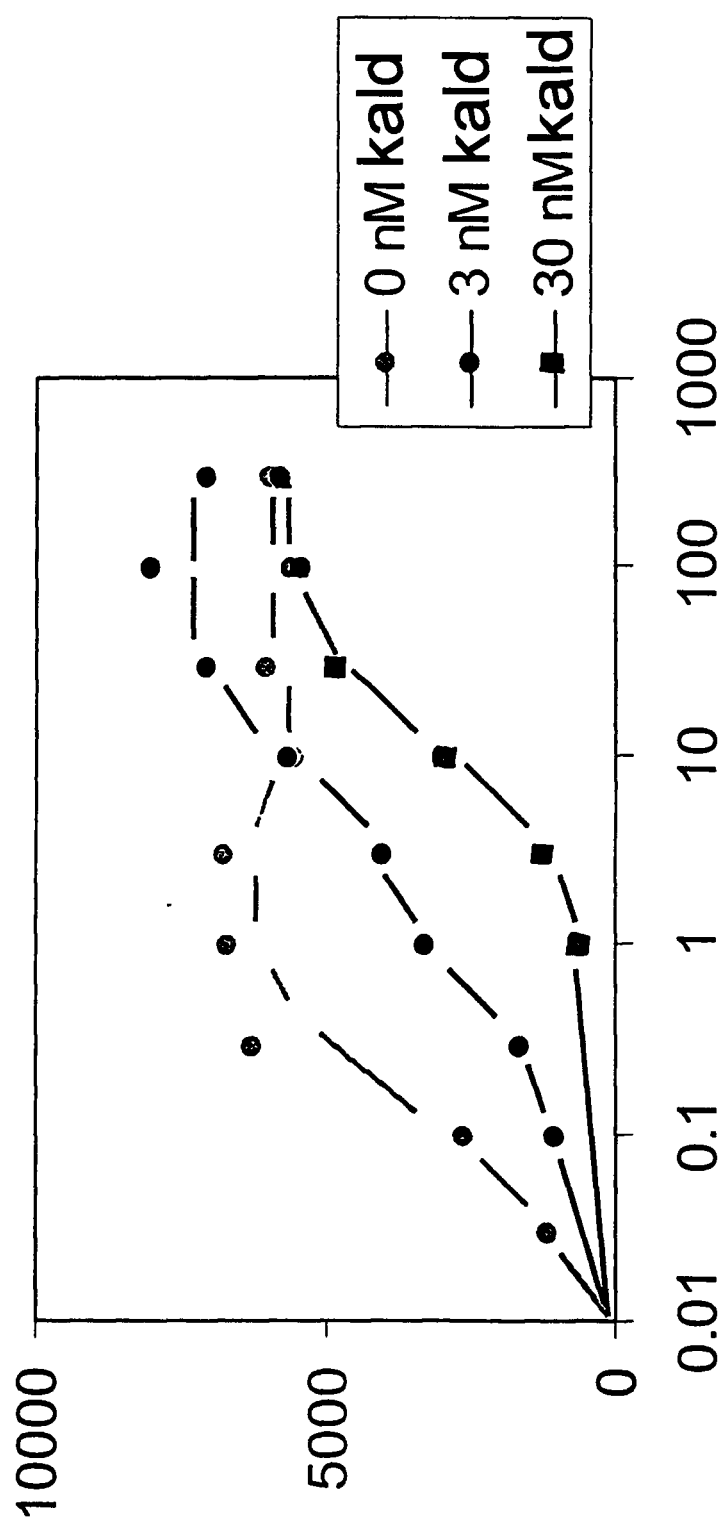
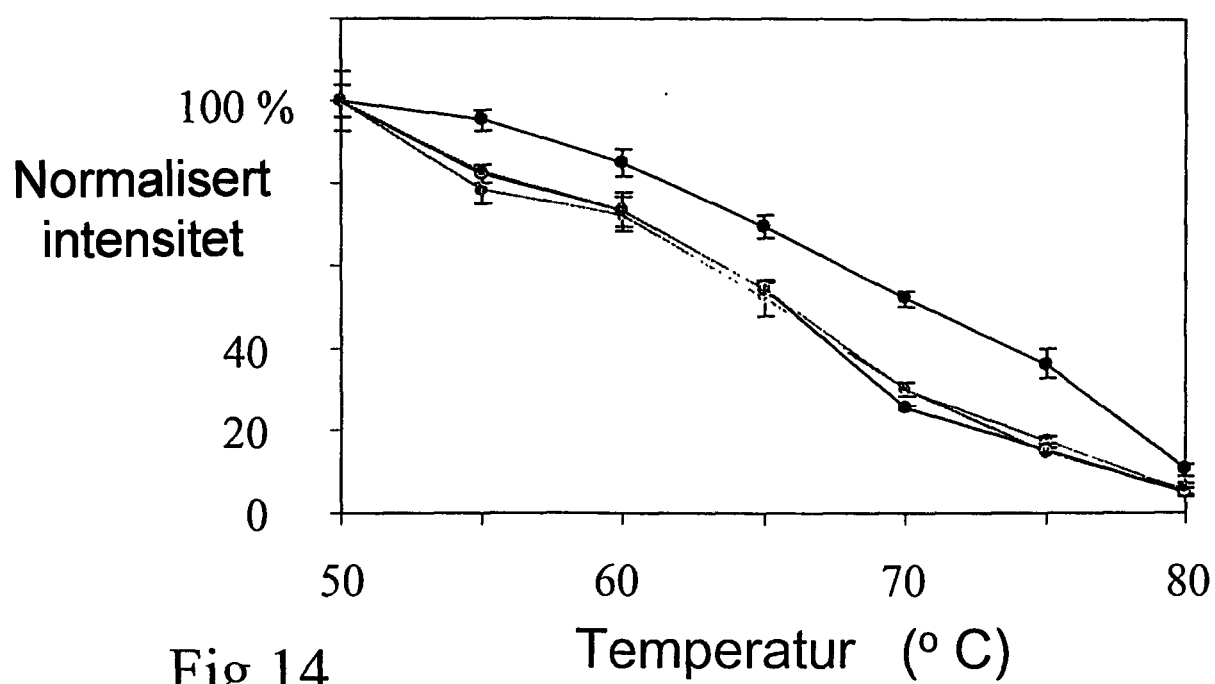


Fig 12

Fig 13

Fig 14

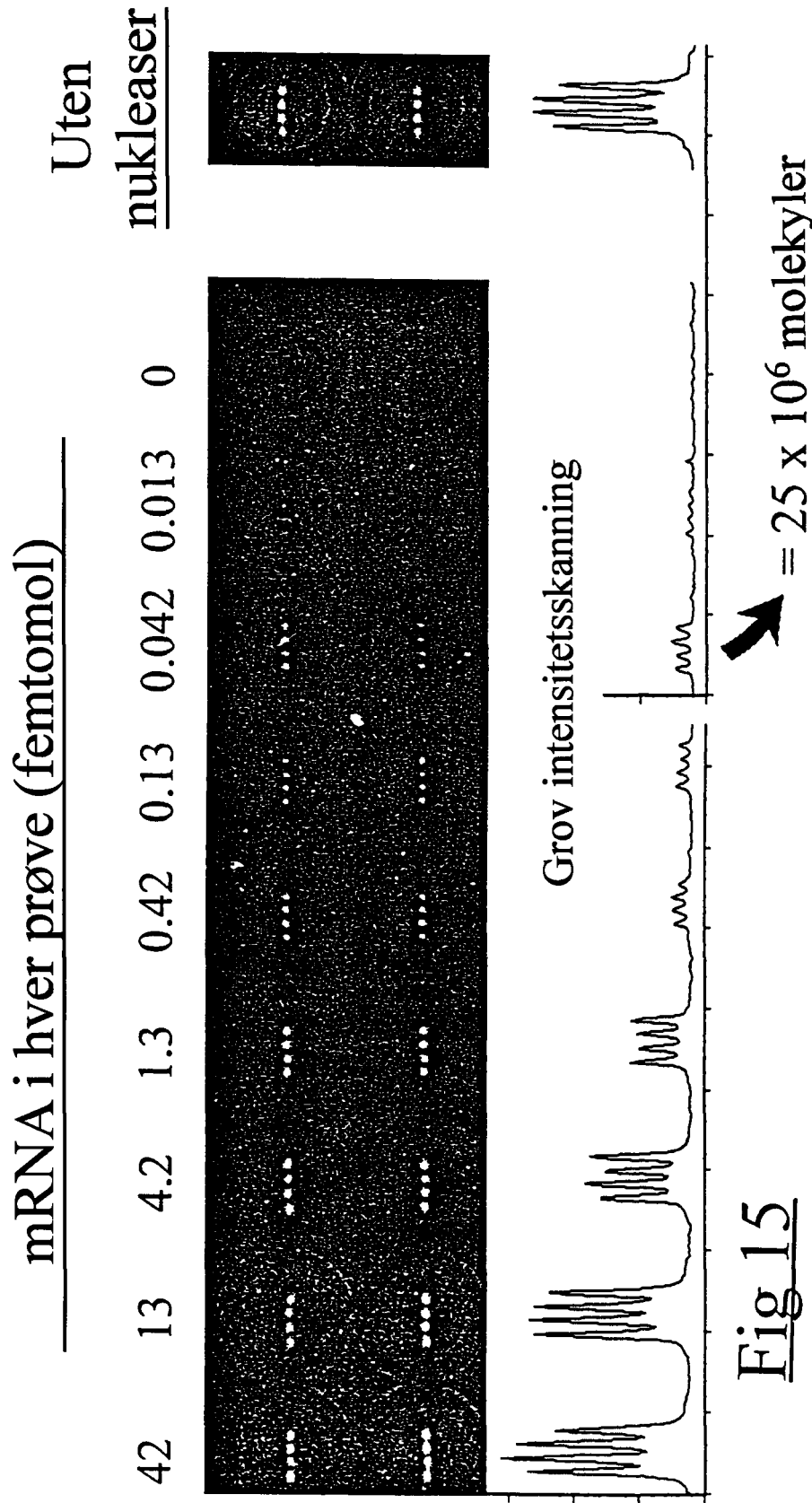
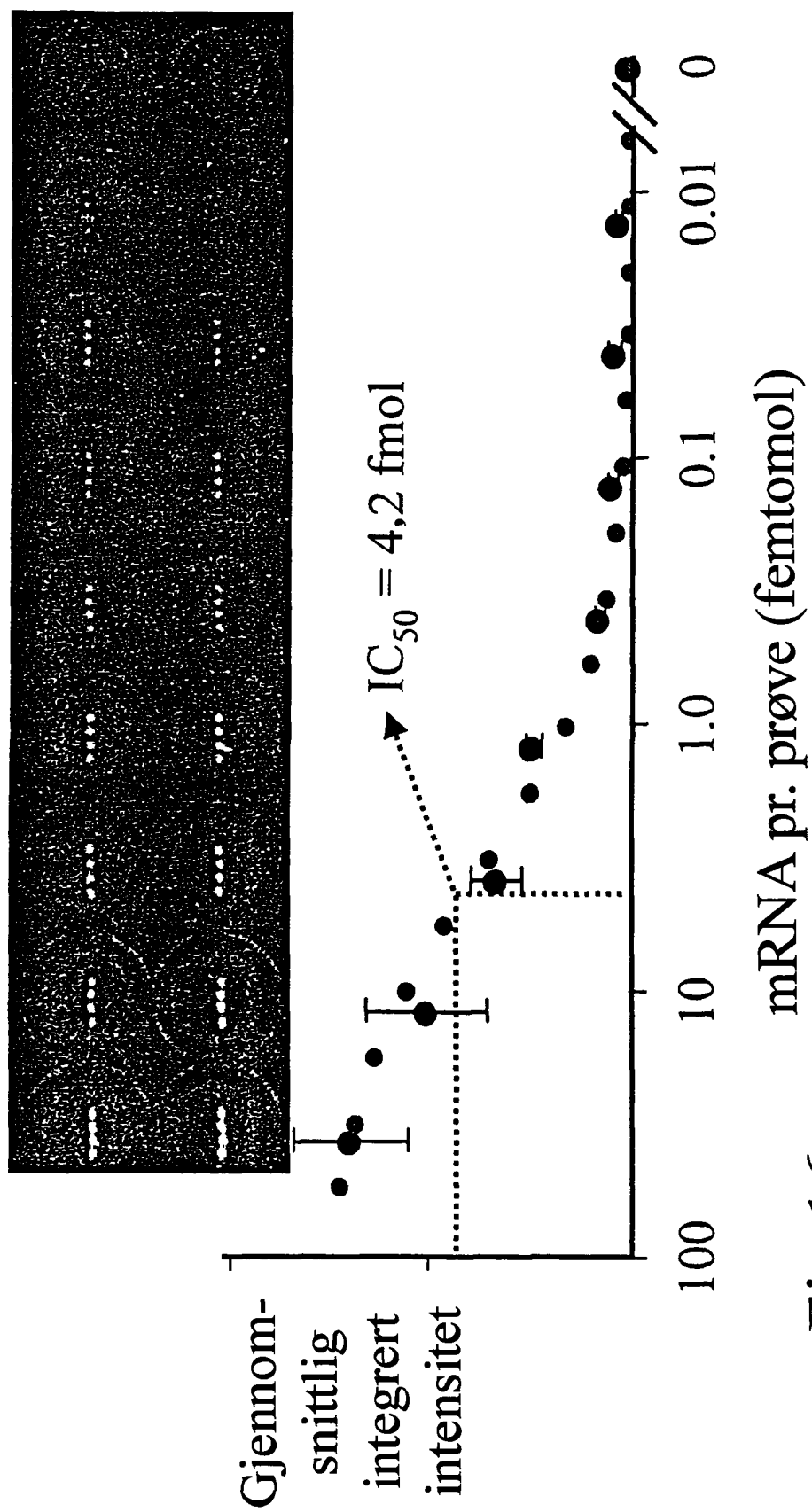
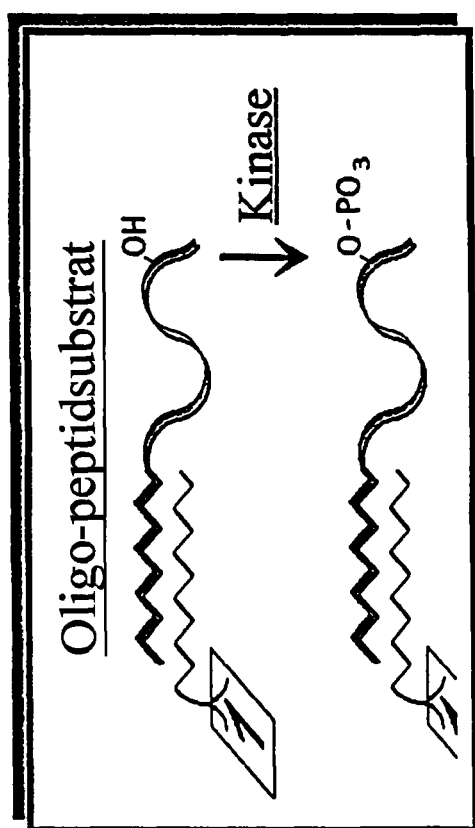


Fig 15





Konsentrasjon av oligo-peptid
10 nM 3 nM

Fosforylerte
kimærer

Delvis*
de-fosforylert



Fig 17

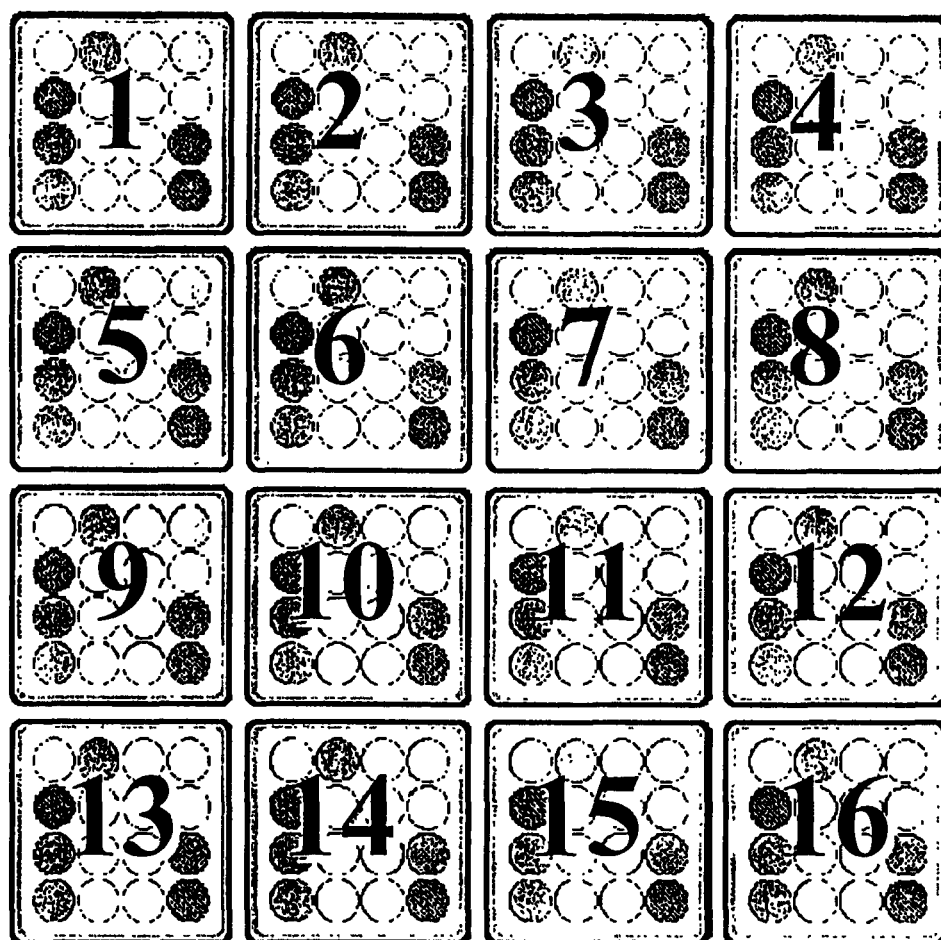


Fig 19

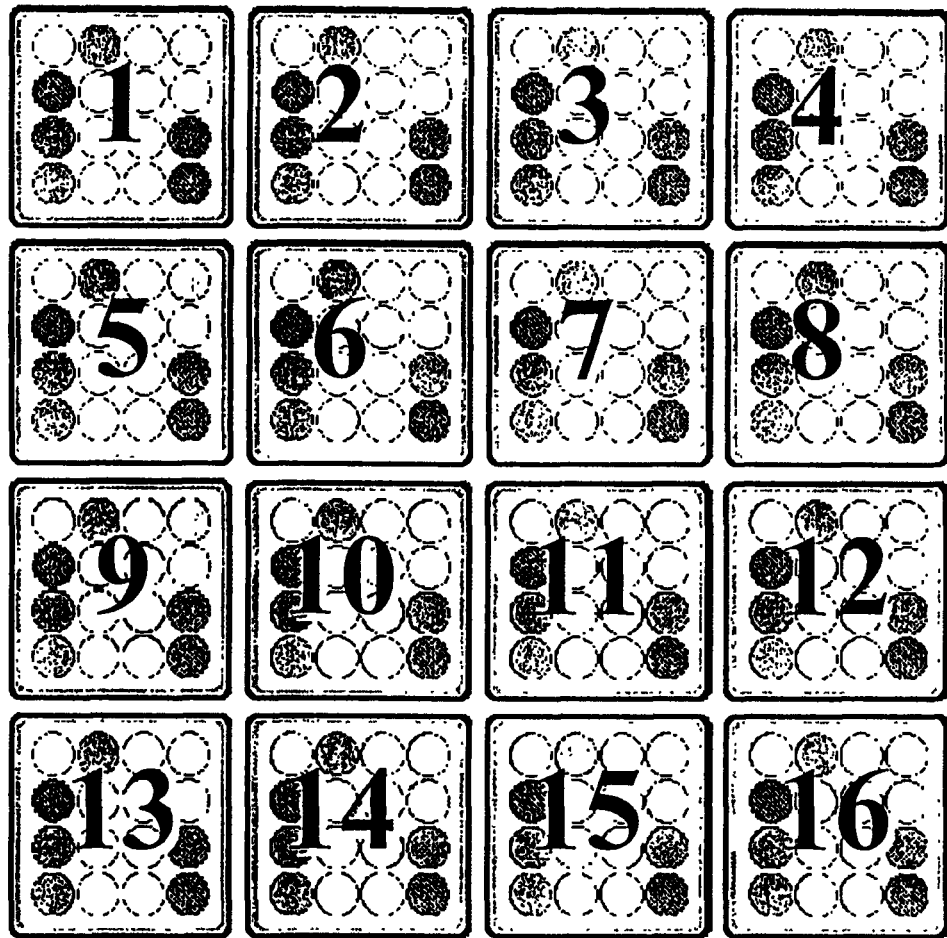


Fig 19

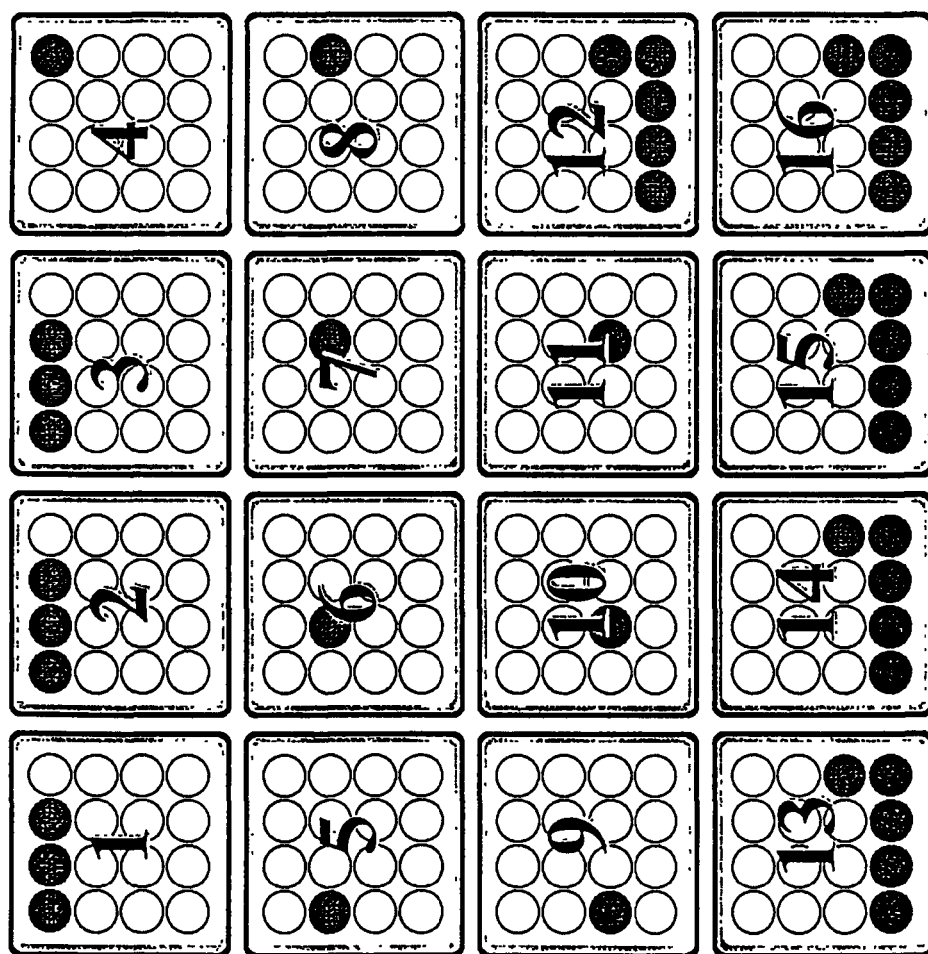


Fig 20a

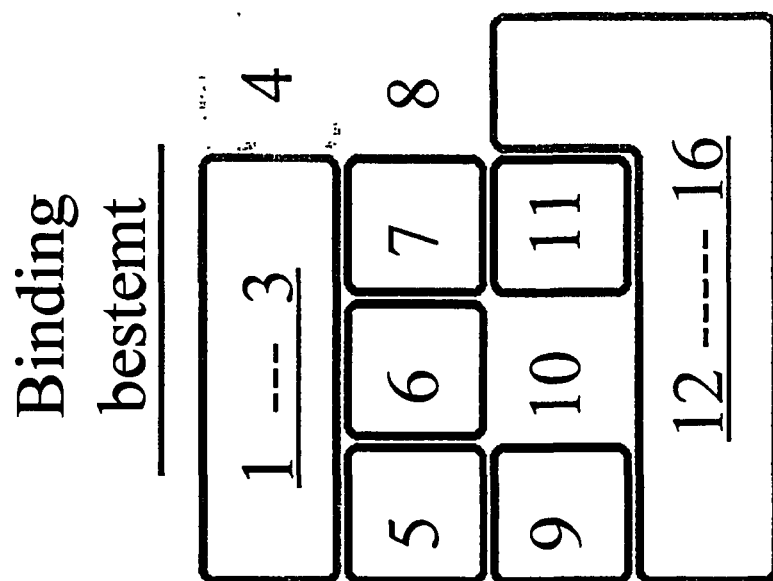


Fig 20b

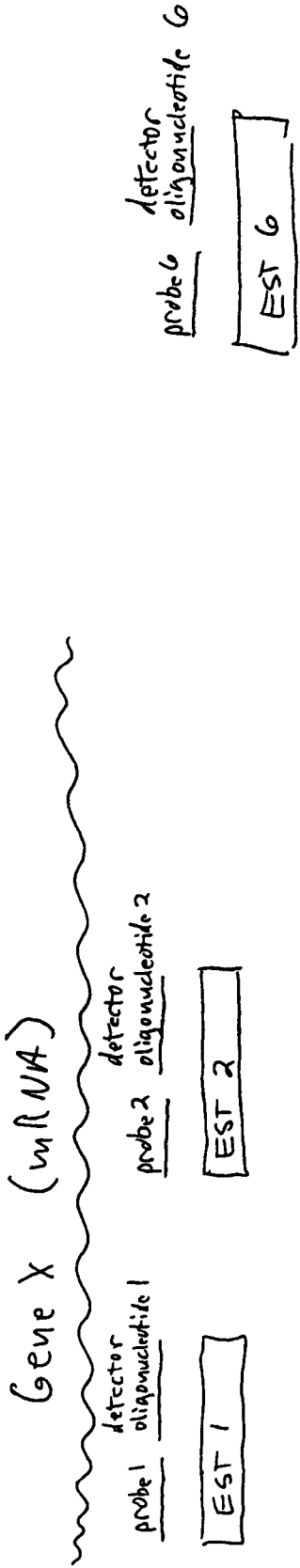
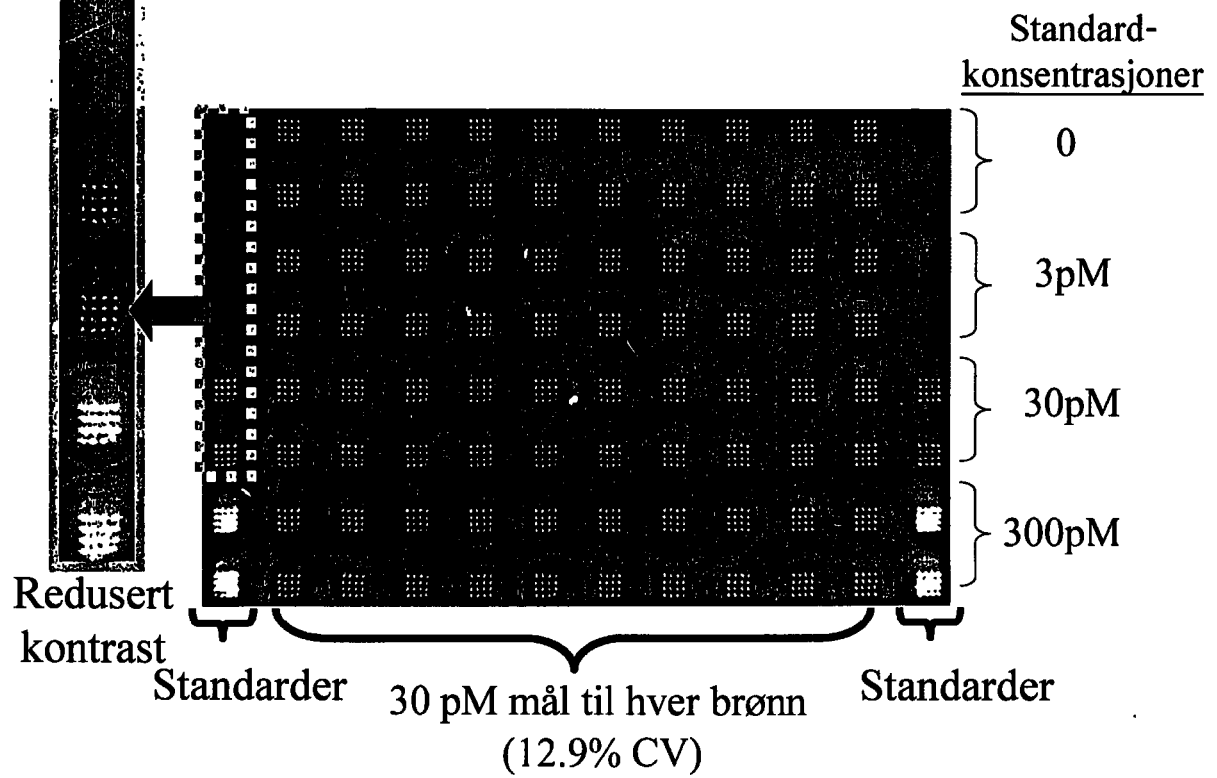


Fig 21

Fig 22