

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 891126 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 891126

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 09.03.1989

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 09.03.1989

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 11.09.1989

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

10.03.1988 GB 8805692 15.06.1988 GB 8814170

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • ZENECA Limited, Imperial Chemical House, 9 Millbank, London, SW1P 3JF, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Newton, Clive Robert, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

2 • Markham, Alexander Fred, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä nukleotidisekvenssien toteamiseksi

Förfarande för detektering av nukleotidsekvenser

1007.55, 6.1.85

Menetelmä nukleotidisekvenssien toteamiseksi

5 Kyseinen keksintö koskee menetelmää yhden tai useamman varianttinukleotidisekvenssin läsnäolon tai puuttumisen toteamiseksi vahvistuksesta tai sen puuttumisesta päätellen sekä tarkoitukseen käytettyjä määrityspakkauksia.

10 Kyseinen keksintö on erityisen tärkeä diagnosoidaessa DNA-näytteistä perinnöllisiä sairauksia, taipumuksia tai somaattisia mutaatioita, ja se tarjoaa mm. yleis-
menetelmän pistemutaatioiden helpoksi toteamiseksi. Se on
hyödyllinen myös tarttuvien taudinaiheuttajien toteamiseksi ja tyypittämiseksi näiden DNA:ta tai RNA:ta analysoimalla.

15 Ihmisessä tiedetään esiintyvän useita satoja geneettisiä sairauksia, jotka ovat seurausta tietyistä mutaatioista DNA-tasolla. Joittenkin näistä sairauksista
molekulaarinen perusta tunnetaan jo nyt, ja tutkimus paljastaa nopeaa tahtia sellaisen geneettisten sairauksien
20 molekulaarista perustaa, joiden kohdalla tapahtuneen mutaation luonne on tällä hetkellä tuntematon. Niissä tapauksissa, joissa perinnöllisen sairauden täsmällistä
molekyyli-tason syytä ei tunneta, häiriö voidaan diagnosoida tai kantajien sijainti selvittää informatiivisina sukutauluina RFLP-tekniikalla käyttäen DNA-koettimia, jotka
25 on geneettisesti kytketty sairauden syntykeskukseen. Täten esimerkiksi tällä hetkellä Duchennen lihassurkastuminen, kystinen fibroosi ja Huntingtonin korea muiden muassa
voidaan diagnosoida RFLP-tekniikkaa käyttäen. Tällainen
30 testaus joudutaan kuitenkin suorittamaan erikseen kunkin sairauden osalta, jolloin tarvittava työmäärä on huomattava kunkin diagnosoitavan sairauden edellyttäessä mm. DNA:n puhdistamista, pilkkomista restriktioentsyymeillä, agarosigeelielektroforeesi-ajoa, Southernin blot-määrityksen suorittamista, hybridointia, hybridoituneen geeni-

35

koettimen toteamista sekä sukutauluanalyysiä. Tiettyjen muiden perinnöllisten sairauksien tiedetään johtuvan geeneissä tapahtuneista yksittäisistä pistemutaatioista, mutta kukin näistä sairauksista on analysoitava erikseen, jolloin erityisiä lisävaikeuksia ilmenee pistemutaatioiden ollessa heterogeenisiä. Täten esimerkiksi yli 40 erilaista pistemutaatiota voi aiheuttaa perinnöllisen beta-anemian ja ainakin 5, todennäköisesti huomattavasti yli 12, eri pistemutaatiota voi aiheuttaa A-verenvuototaudin. Tällaisten heterogeenisten tilanteiden esiintyessä tällä hetkellä saatetaan joutua analysoimaan erikseen kukin mahdollinen mutaatiokeskus. Tähän voi liittyä monimutkainen RFLP-haplotyyppianalyysi, jossa käytetään useita restriktioentsyymejä.

Somaattisten solujen lukuisat pistemutaatiot on esitetty syypääksi erilaisten syöpäkasvaimien kehittymiseen, esimerkiksi pistemutaatiot ras-kasvaintekijässä (J.L. Boos et.al., Nature 327 (1987) 293).

Cetus Co.:n omistamassa EP-A-hakemusjulkaisussa n:o 87302196.8 (julkaisun:o 237,362) kuvataan menetelmää ainakin yhden nukleotidivariaation läsnä- tai poissaolon toteamiseksi näytteen sisältämän yhden tai useamman nukleinihapon sekvenssissä, jolloin menetelmän mukaan:

(a) näytettä käsitellään joko samanaikaisesti tai toisiaan seuraten neljällä eri nukleotiditrifosfaatilla, nukleotiditrifosfaatteja polymeroivalla aineella sekä yhdellä oligonukleotidiprimerisäikeellä kutakin säiettä kohden jokaisessa läsnäolevassa nukleinihappossa, jonka epäillään sisältävän sanottu variaatio, hybridointiolosuhteissa, jolloin kutakin nukleinihapposäiettä kohden, joka sisältää todettavia eri variaatioita, syntetisoidaan kustakin primerisäikeestä laajennustuote, joka komplementoi kutakin läsnäolevaa vastaavaa nukleinihapposäiettä, jolloin sanottu yksi tai useampi primerisäie valitaan kutakin eri variaatioita sisältävää nukleinihapposäiettä oleel-

lisesti komplementoivaksi, mistä seuraa, että yhdestä primerisäikeestä syntetisoitua laajennustuotetta komplementistaan erotettuna voidaan käyttää templaattina syntetisoitaessa toisen primerisäikeen laajennustuotetta;

5 (b) näytettä käsitellään denaturoivissa olosuhteissa primerilaajennustuotteiden erottamiseksi templaateistaan, jos todettava/-ia variaatio/-ita sisältyy näytteen seen;

(c) näytettä käsitellään samanaikaisesti tai toisiaan seuraten sanotuilla neljällä nukleotiditrifosfaatilla, nukleotiditrifosfaatteja polymeroivalla aineella sekä oligonukleotidiprimerisäikeillä siten, että tulee syntetisoiduksi primerilaajennustuote käyttäen kutakin vaiheessa (b) valmistettua yksittäistä säi'että templaattina, 10 jolloin vaiheita (b) ja (c) toistetaan riittävän monta kertaa sekvenssivariaation/-oita sisältävän nukleiinihapon todettavaksi vahvistumiseksi, silloin kun mainittuja variaatioita on läsnä;

(d) vaiheen (c) tuote kiinnitetään kalvoon;

20 (e) kalvoa käsitellään hybridointiolosuhteissa leimatulla sekvenssispesifisellä oligonukleotidikoettimella, joka kykenee hybridoitumaan vahvistettuun nukleiinihapposekvenssin vain, jos koettimen jokin sekvenssi komplementoi vahvistetun sekvenssin jotain aluetta; ja

25 (f) määritetään, onko koetin hybridoitunut vahvistettuun nukleiinihaponäytteen sisältämään sekvenssiin.

Ainakin yhden nukleotidivariaation läsnäolo tai puuttuminen voidaan tietyissä erityisolosuhteissa todeta toisenlaisilla menetelmillä. Täten niissä epätavallisissa 30 tapauksissa, joissa pistemutaatio luo tai tuhoaa restriktiokeskuksen (esim. sirppisoluanemia), voidaan pilkkoa restriktioentsyymeillä joko ennen vahvistamista tai sen jälkeen [F.F. Chehab *et.al.*, *Nature* 329 (1987) 293]. Lisäksi jos kyseessä on laaja deletoitunut nukleiinihapposekvenssi vahvistusprimereitä voidaan valmistaa epäillyn 35

deletion kattamille alueille kuten esimerkiksi sitä 23 kb:n deletiota silmälläpitäen, joka aiheuttaa perinnöllisen α -anemian; näissä tapauksissa deletoituneen sekvenssin vahvistamisen epäonnistuminen varmistaa deletion, jolloin voidaan diagnosoida esimerkiksi perinnöllinen α -anemia [F.F. Chehab et.al., Nature 329 (1987) 293].

EP-patenttijulkaisussa n:o 237,362 esitetty vahvistamisenmenettely tarjoaa RFLP:hen (restriktiofragmenttipituuspolymorfismi) nähden sekä alleelispesifisiin oligonukleotidimenettelyihin nähden tiettyjä etuja, joita kuvataan esimerkiksi lähteissä Kan ja Dozy, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 75 (1978) 5631, Rubin ja Kan, Lancet 1985-I, 75 (1985), Conner et.al. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 80 (1983) 78, Kidd et.al., Nature 304 (1983) 230 ja Piratsu et.al., New England Journal of Medicine 309 (1983) 284.

EP-patenttijulkaisussa n:o 237,362 kuvataan kuitenkin menetelmää, jonka mukaan tiettyä kiinnostavaa sekvenssiä rajoituksetta vahvistetaan, minkä seurauksena väistämättä joudutaan käyttämään lukuisia aikaa vieviä jatkomääritysvaiheita, joissa joko käytetään edelleen leimattua sekvenssispesifistä oligonukleotidikoetinta, jonka mahdollisesti täytyy kyetä erottamaan sekvenssejä, jotka poikkeavat toisistaan vain yhden yksittäisen nukleotidin osalta, ja/tai joissa käytetään spesifistä restriktioendonukleaasia niissä rajoitetuissa tapauksissa, joissa kiinnostava pistemutaatio luo tai tuhoaa entsyymitunnistussekvenssin, ja/tai käytetään vahvistetun DNA:n suoria sekvenssointimenetelmiä [katso C. Wong et.al., Nature 330 (1987) 384].

On olemassa tarve saada yksinkertainen menetelmä nukleiinihappojen kuten genomi-DNA:n käsittämän ainakin yhden yksittäisen emäseroavaisuuden suoraksi toteamiseksi, jossa toteamisvaiheiden lukumäärä on minimoitu, jolloin käyttöön saadaan menetelmä, joka on suoritettavissa no-

peasti, tarkasti sekä helposti mahdollisimman alhaisella käyttäjän taidon tasolla.

Kyseinen keksintö perustuu havaintoon, että valitsemalla oligonukleotidiprimerin nukleotidisekvenssi sopivasti on mahdollista saada selektiivisesti primerilaajennustuote joko oletetun varianttinukleotidin sisältävästä sekvenssistä tai normaalin nukleotidin sisältävästä vastaavasta sekvenssistä tai estää mainittu primerilaajennus, jolloin tarvittavat toteamismenettelyt yksinkertaistuvat huomattavasti.

Kyseisen keksinnön erään ominaispiirteen mukaan tarjotaan menetelmä ainakin yhden varianttinukleotidin läsnäolon tai puuttumisen toteamiseksi näytteen sisältämässä yhdessä tai useammassa nukleiinihapossa, jolloin menetelmän mukaan:

näytettä käsitellään samanaikaisesti tai toisiaan seuraten sopivilla nukleosiditrifosfaateilla, nukleosiditrifosfaatteja polymeroivalla aineella ja kohde-emässekvenssin diagnoosiosuuden diagnoosiprimerillä hybridointiolosuhteissa, jolloin sanotun diagnoosiprimerin nukleotidisekvenssin on valittu siten, että se oleellisesti komplementoi sanottua diagnoosiosuutta, diagnoosiprimerin päätynukleotidin komplementoidessa joko oletettua varianttinukleotidia tai vastaavaa normaalia nukleotidia, jolloin diagnoosiprimeristä syntetisoituu laajennustuote silloin, kun diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emässekvenssissä, kun taas laajennustuotetta ei muodostu, jos diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ei komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emässekvenssissä; minkä jälkeen oletetun varianttinukleotidin[✓] läsnäolo tai puuttuminen todetaan vastaavasti laajennustuotteen läsnäolosta tai puuttumisesta.

Huomattakoon, että vaikka kyseisen keksinnön mukainen menetelmä on erityisen kiinnostava pistemutaatioiden läsnäolon tai puuttumisen toteamiseksi, menetelmä soveltuu

yhtä hyvin deletioiden läsnäolon tai puuttumisen havaitsemiseen, mukaanlukien useamman kuin yhden nukleotidin deletiot, sekä useamman kuin yhden nukleotidin korvauksen läsnäolon tai puuttumisen toteamiseen. Tällöin on ainoastaan tiedettävä, mitkä ovat oleelliset nukleotidit, erityisesti mikä on oleellinen päätynukleotidi, jotta tarvittava yksi tai useampi diagnoosiprimeri voidaan suunnitella ja rakentaa tarkoituksenmukaiseksi.

Huomattakoon, että kulloinkin muodostuneet laajennustuotteet voidaan todeta missä tahansa käteväksi katsotussa muodossa, esimerkiksi yksi- tai kaksisäikeisessä muodossa.

Huomattakoon edelleen, että kulloinkin saatuja laajennustuotteita voidaan haluttaessa vahvistaa polymeraasi-ketjureaktiota (PCR) käyttäen US-patenttijulkaisuihin n:o: 4,683,195 ja 4,683,202 kuvatus mukaisesti, tai käyttäen Q-beta-replikaasia PCT-patenttijulkaisussa WO87/06270 sekä lehdessä Biotechnology 6(lokakuu) (1988) kuvatus mukaisesti, tai käyttäen Siska Co.:n transkriptioon pohjautuvaa nukleiinihappovahvistusta PCT-patenttijulkaisussa WO88/10315 kuvatus mukaisesti, tai käyttäen lineaarista vahvistamista. Tässä yhteydessä ilmaisulla 'lineaarinen vahvistaminen' tarkoitetaan vahvistamista, jossa käytetään yhtä primeriä jokaista diagnoosiosuutta kohden polymeroivan aineen ja tarkoituksenmukaisten nukleotiditrifosfaattien läsnäollessa, jolloin vahvistus tapahtuu primerilaa-jennuksena, joka käyttää näytenukleiinihapon yksittäistä säiettä templaattina.

Kyseisen keksinnön ensimmäisessä ja erityisen edullisessa suoritusmuodossa menetelmän mukaan:

1) näytettä käsitellään samanaikaisesti tai toisiaan seuraten tarkoituksenmukaisilla nukleosiditrifosfaateilla, nukleosiditrifosfaatteja polymeroivalla aineella sekä kohde-emässekvenssin diagnoosiosuuden diagnoosiprimerillä ja vastaavalla vahvistusprimerillä hybridointiolo-

suhteissa, jolloin sanotun diagnoosiprimerin nukleotidisekvenssi on valittu siten, että se oleellisesti komplementoi sanottua diagnoosiosuutta, diagnoosiprimerin pääty-
 5 nukleotidin komplementoidessa joko oletettua varianttinukleotidiä tai vastaavaa normaalia nukleotidiä, jolloin
 diagnoosiprimeristä syntetisoituu laajennustuote silloin, kun diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi komplementoi
 vastaavaa nukleotidia kohde-emässekvenssissä, kun taas laajennustuotetta ei muodostu, jos diagnoosiprimerin sa-
 10 nottu päätynukleotidi ei komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emässekvenssissä; minkä jälkeen jokaista muodostunutta ja sitten komplementistaan erotettua diagnoosiprimerin laajennustuotetta voidaan käyttää templaattina laajennustuotteen syntetisoimiseksi sanotusta vahvistusprime-
 15 ristä;

2) näytettä käsitellään denaturoivissa olosuhteissa primerilaajennustuotteen erottamiseksi templaattistaan tapauksissa, joissa tällainen laajennustuote on muodostunut;

20 3) vaiheessa (2) saadut yksittäiset säikeet saate-
 taan kosketuksiin joko samanaikaisesti tai toisiaan seura-
 ten tarkoituksenmukaisten nukleosiditrifosfaattien, nuk-
 leosiditrifosfaatteja polymeroivan aineen, diagnoosipri-
 merin ja vahvistusprimerin kanssa edellä määritellyn mu-
 25 kaisesti muiden laajennustuotteiden syntetisoimiseksi,
 silloin kun tämä on mahdollista, vaiheessa (2) saatuja
 yksittäisiä säikeitä templaatteina käyttäen;

4) vaiheita (2) ja (3) toistetaan riittävän monta kertaa halutun nukleotidisekvenssin todettavan vahvistuk-
 30 sen saamiseksi; ja

5) oletetun varianttinukleotidin läsnäolo tai puuttuminen todetaan vaiheessa (4) saatavan vahvistustuotteen vastaavasta läsnäolosta tai puuttumisesta.

Kyseisen keksinnön toisessa suoritusmuodossa sanot-
 35 tua näytettä käsitellään samanaikaisesti tai toisiaan seu-

raten (a) ensimmäisellä diagnoosiprimerillä, jonka sekvenssi oleellisesti komplementoi ensimmäisen nukleiinihapposekvenssin diagnoosiosuutta, jolloin ensimmäisen diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi sanottua oletettua varianttinukleotidia, ja toisella diagnoosiprimerillä, jonka sekvenssi oleellisesti komplementoi toisen nukleiinihapposekvenssin diagnoosiosuutta, jolloin toisen diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi komplementoivaa oletettua varianttinukleotidia; tai

10 (b) ensimmäisellä diagnoosiprimerillä, jonka sekvenssi oleellisesti komplementoi ensimmäisen nukleiinihapposekvenssin diagnoosiosuutta, jolloin ensimmäisen diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi sanottua oletettua varianttinukleotidia vastaavaa normaalia nukleotidia, ja toisella diagnoosiprimerillä, jonka sekvenssi
15 oleellisesti komplementoi toisen nukleiinihapposekvenssin diagnoosiosuutta, jolloin toisen diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi sanottua oletettua varianttinukleotidia vastaavaa normaalia nukleotidia;

20 jolloin ensimmäisen diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ja toisen diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ovat joko molemmat vastaavien primerien 5'-päädyssä tai molemmat niiden 3'-päädyssä ja jolloin ensimmäisen nukleiinihapposekvenssin suunta on toiseen nukleiinihapposekvenssiin nähden vastakkainen.
25

Tämän vuoksi tässä suoritusmuodossa esiintyvää toista diagnoosiprimeriä voidaan pitää edellä ja jatkossa esiintyvän mukaisena vahvistusprimerinä.

Tämän toisen suoritusmuodon avulla voi olla mahdollista parantaa erotusta ja lisätä spesifisyyttä, sillä valetuotteen muodostuminen edellyttää primerisäikeen läsnäoloa kahden keskenään epäsojivan oligonukleotidin oleellisissa päädyissä (joka on yleensä 3'-pääty), eikä vain yhdessä yksittäisessä päädyssä kuten on asian laita käytettäessä vain yhtä diagnoosiprimeriä.
30
35

Oletetun varianttinukleotidin läsnäolo tai puuttuminen voidaan todeta esimerkiksi jäljempänä kuvatun mukaisesti.

Kyseisen keksinnön kolmannessa suoritusmuodossa
5 näytettä, joka käsittää oletetun varianttinukleotidin sisältävää DNA:ta, vahvistetaan käyttäen esimerkiksi edellä määritellyn mukaisesti lineaarista vahvistamista, esimerkiksi kuten kuvattu US-patenttijulkaisuissa n:o 4,683,195 ja 4,683,202, PCT-patenttijulkaisussa WO87/06270, lehdessä
10 Biotechnology 6(lokaluu) (1988) tai PCT-patenttijulkaisussa WO88/10315, minkä jälkeen vahvistustuotetta käsitellään kohde-emässekvenssin diagnoosiosuuden diagnoosiprimerillä hybridointiolosuhteissa tarkoituksenmukaisten nukleosiditrifosfaattien ja nukleosiditrifosfaatteja polymeroivan
15 aineen läsnäollessa, jolloin sanotun diagnoosiprimerin nukleotidisekvenssi on valittu siten, että se oleellisesti komplementoi sanottua diagnoosiosuutta diagnoosiprimerin päätynukleotidin komplementoidessa joko oletettua varianttinukleotidia tai vastaavaa normaalia nukleotidia.

20 Näin muodoin tämän keksinnön kolmannen suoritusmuodon mukaan tavanomainen vahvistaminen voidaan suorittaa käyttäen haluttua toistokertaa, jolloin seuraavana vaiheena ennen toteamisvaihetta kokeillaan hybridointia diagnoosiprimeriin. Vahvistusprimeriä ei tarvitse käyttää.

25 Kyseinen kolmas suoritusmuoto on kiinnostava, koska polymeroivan aineen/-eiden käytettävää määrää voidaan huomattavasti alentaa (esimerkiksi se voidaan vähintään puolittaa), jolloin jopa myös käytettävää nukleosiditrifosfaattien määrää voidaan alentaa sekä tarvittavien polyme-
30 raasiketjureaktio- (PCR-) lämmityslaitteiden lukumäärää laskea. Tätä kolmatta suoritusmuotoa käyttämällä on siten mahdollista säästää huomattavasti kustannuksissa. Lisäksi koska vahvistusvaihe voidaan haitatta suorittaa käytännön kannalta otollisissa lämpötiloissa, kyseinen kolmas suoritusmuoto edellyttää ainoastaan lämpötilalle herkemmän
35

hybridointiyrityksen diagnoosikoettiin suorittamista kerran, jolloin vaara päätyepäsopivan (yleensä 3'-epäsopivan) diagnoosiprimerin virheellisestä liittymisestä edelleen alenee. Kyseinen kolmas suoritustyyppi tarjoaa täten mahdollisesti luotettavamman ja 'kulutuskestävämmän' menetelmän ei-asiantuntijakäyttöön menetelmän suhtautuessa suopeammin käyttäjän tekemiin virheisiin. Tämä kolmas suoritustyyppi niinikään vähentää haluja ylimääräisen polymeerasiketjureaktiokontrollivaiheen suorittamiseen, sillä alkuperäinen vahvistusvaihe on samalla oma kontrollinsa.

Diagnoosiprimeri voi haluttaessa sisältää signaalin tai leiman, joka ei ole vaarassa tuhoutua esimerkiksi käytettäessä korkeaa lämpötilaa edellyttävää reaktioiden toistomenettelyä kuten PCR. Leimaukseen voidaan käyttää esimerkiksi sopivaa leima- tai signaaliolosuutta, esimerkiksi kuvatus mukaisesti alkalista fosfataasia tai piparjuuri-peroksidaasia.

Tässä yhteydessä lämpöstabiilien entsyymien, kuten Thermus aquaticus -fosfataasin, käyttö leimaukseen saattaa olla kiinnostava vaihtoehto.

Kyseisen keksinnön neljännessä ja edullisessa suoritustyyppiosuudessa kyseisen keksinnön kolmatta suoritustyyppiosuutta modifioidaan lisäämällä kyseisen keksinnön toisessa suoritustyyppiosuudessa kuvatus mukaisena lisäpiirteenä kahden diagnoosiprimerin käyttö, jolloin toinen diagnoosiprimeri voi toimia vahvistusprimerinä.

Täten kyseisen keksinnön neljännessä suoritustyyppiosuudessa näytettä, joka käsittää oletetun varianttinukleotidin sisältävää DNA:ta, vahvistetaan ja vahvistustuotetta käsitellään samanaikaisesti tai toisiaan seuraten joko:

(a) ensimmäisellä diagnoosiprimerillä, jonka sekvenssi oleellisesti komplementoi ensimmäisen nukleinihapposekvenssin diagnoosiosuutta, jolloin ensimmäisen diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi sanottua oletettua varianttinukleotidia, ja toisella diagnoosiprime-

rillä, jonka sekvenssi oleellisesti komplementoi toisen nukleiinihapposekvenssin diagnoosiosuutta, jolloin toisen diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi nukleotidia, joka komplementoi sanottua oletettua varianttinukleotidia; tai

(b) ensimmäisellä diagnoosiprimerillä, jonka sekvenssi oleellisesti komplementoi ensimmäisen nukleiinihapposekvenssin diagnoosiosuutta, jolloin ensimmäisen diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi sanottua oletettua varianttinukleotidia vastaavaa normaalia nukleotidia, ja toisella diagnoosiprimerillä, jonka sekvenssi oleellisesti komplementoi toisen nukleiinihapposekvenssin diagnoosiosuutta, jolloin toisen diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi nukleotidia, joka komplementoi sanottua oletettua varianttinukleotidia vastaavaa sanottua normaalia nukleotidia;

jolloin ensimmäisen diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ja toisen diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ovat joko molemmat vastaavien primerien 5'-päädyssä tai molemmat niiden 3'-päädyssä ja jolloin ensimmäinen nukleiinihapposekvenssi komplementoi toista nukleiinihapposekvenssiä.

Yleensä ensimmäisen diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ja toisen diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ovat kumpikin vastaavien primeriensä 3'-päädyssä.

Kyseisen keksinnön neljännessä suoritusmuodossa yhdistyy täten keksinnön edellä määriteltyjen toisen ja kolmannen suoritusmuodon edut näiden ollessa mm. mahdollisesti kasvanut spesifisyys, alentuneet kustannukset sekä kulutuskestävä, käyttäjäystävällinen tekniikka.

Oletetun varianttinukleotidin läsnäolo tai puuttuminen voidaan todeta esimerkiksi jäljempänä kuvatun mukaisesti.

Huomattakoon, että sitten kun vahvistettua tuotetta on käsitelty joko (a):n tai (b):n mukaisesti kuten edellä

määriteltä, menettely voidaan toistaa yhden tai useamman kerran toivomusten mukaan. Käytettäessä useampaa kuin yhtä toistokertaa saadaan mahdollisesti uusi tuote, joka on diagnoosiprimerien laajennustuotteiden hybridi. Muodostu-

5 vien eri tuotteiden määrausuhteet riippuvat alkuperäisten PCR- (polymeraasiketjureaktio-) primerioligonukleotidien ja lisättyjen diagnoosiprimerioligonukleotidien keskinäisistä määrausuhteista.

Suoritettaessa vahvistaminen joko käyttäen diagnoosi- ja vahvistusprimereitä tai käyttäen kahta diagnoosiprimeriä esimerkiksi kuten kuvattu kyseisen keksinnön ensimmäisessä ja toisessa suoritusmuodossa tai osana EP-patenttijulkaisussa n:o 237,362 kuvattua vahvistusmenettelyä vaihe (a), jossa denaturoidaan primerilaajennustuotteiden

15 erottamiseksi templaateistaan, ja vaihe (b), jossa näin saadut yksittäiset säikeet saatetaan kosketuksiin joko samanaikaisesti tai toisiaan seuraten tarkoituksenmukaisten nukleosiditrifosfaattien kanssa, nukleosiditrifosfaatteja polymeroivan aineen kanssa sekä uusien laajennustuotteiden syntetisoimiseksi oleellisten primerien kanssa,

20 toistetaan edullisesti vähintään 5 kerrasta (toistosta) aina määrittelemättömään kertalukuun, erityisesti primerin vastustaessa vahvistamista, tämän haittaamatta kyseisen keksinnön suoritusta. Näytteen sisältäessä ihmisgenomi-DNA:ta käytetään edullisemmin 15-60, esim. 15-30, kierrosta (toistokertaa). Jos näyte käsittää soluja, niitä kuumennetaan edullisesti ennen vaiheen (a) suorittamista niiden sisältämien nukleiinihappojen paljastamiseksi reagenssien vaikutukselle. Tämän suoritusvaiheen käytöllä

25 vältetään nukleiinihappojen reagenssilisäystä edeltävä puhdistus. Tässä suhteessa todetaan kyseisen keksinnön edustavan huomattavaa parannusta aiempiin menetelmiin nähden silloinkin, kun DNA puhdistetaan näytteestä, ennen kuin sitä pyritään vahvistamaan.

35 Huomattakoon, että vaiheessa (b) vaiheessa (a) muodostetut yksittäiset säikeet sekä kulloinkin tarkoituksen-

mukaiset nukleosiditrifosfaatit, nukleosiditrifosfaatteja
 polymeroiva aine, primeri/-it, esimerkiksi diagnoosipri-
 meri/-it ja/tai vahvistusprimeri/-it, voidaan saattaa kos-
 ketuksiin joko lisäämällä mainitut reaktioseokseen, sitten
 5 kun primerilaajennustuote on erotettu templaattistaan (vai-
 he a), tai toisaalta voidaan turvautua reaktioseoksessa
 valmiiksi läsnäoleviin ainesosiin. Itse asiassa mikä ta-
 hansa yksittäinen tai useampi erilainen nukleosiditrifos-
 faatti ja/tai polymeroiva aine ja/tai primeri/-it, esimer-
 10 kiksi diagnoosiprimi-er i/-it ja/tai vahvistusprimeri, voi-
 daan lisätä keksinnön mukaisen menetelmän missä tahansa
 vaiheessa.

Kyseisen keksinnön viidennen ja edullisen suoritus-
 muodon mukaan tarjotaan edellä määritellyn mukainen mene-
 15 telmä, jonka mukaan vahvistaminen tapahtuu primerilaajen-
 nuksena, joka käyttää näytenukleiinihapon yksittäistä säi-
 että templaattina.

Täten tässä suoritusmuodossa primerilaajennus suo-
 ritetaan käyttäen näytenukleiinihapon samaa säi'että temp-
 20 laattina, jolloin siis vahvistusprimeriä ei ole läsnä.
 Näin muodo in vahvistus on aritmeettinen, eikä eksponen-
 tiaalinen, jolloin viime mainittuun voidaan ainakin teo-
 reettisesti päästä polymeraasiketjureaktioita (PCR:ia)
 käyttämällä. Tämän kyseisen keksinnön viidennen suoritus-
 25 muodon (jota tässä kutsutaan myös lineaariseksi vahvista-
 miseksi) etu on, että mahdollisesti muodostuvat valetuot-
 teet ei^{vät} pääse eksponentiaalisesti vahvistumaan.

Lineaarinen vahvistaminen voidaan suorittaa millä
 tahansa käyttökelpoisella tavalla, ja niin muodo in myös
 30 käyttämällä komplementoivia nukleosiditrifosfaatteja niitä
 polymeroivan aineen läsnäollessa määrittelemättömän pi-
 tuisten primerilaajennustuotteiden valmistamiseksi, edel-
 lyttäen että diagnoosiprimi-er i ja näytenukleiinihappo komp-
 lementoivat toisiaan riittävästi. Käytettäessä kaikkia
 35 komplementoivia nukleosiditrifosfaatteja näytenukleiini-
 happoa pilkotaan edullisesti endonukleaasilla, jolloin

kyseinen restriktioendonukleaasi valitaan pyrkien varmistamaan näytenukleiinihapon pilkkoutuminen tietyn mittaisen primerilaajennustuotteiden muodostuksen kannalta sopivasta kohdasta. Suositeltavasti lineaarinen vahvistaminen

5 suoritetaan kuitenkin vain yhden, suositeltavasti vain kahden tai edullisesti vain kolmen nukleosiditrifosfaatin läsnäollessa, jolloin diagnoosiprimeri sidotussa tilassaan (eli hybridoituna näytenukleiinihappoon) voi laajentua vain sen pituiseksi, kuin vain yhden, kahden tai kolmen

10 nukleosiditrifosfaatin läsnäolo sallii. Heti kun näytenukleiinihaposta ilmaantuu nukleosiditrifosfaatti, jota komplementoivaa nukleosiditrifosfaattia ei ole läsnä, primerilaajennusreaktio pysähtyy.

Haluttaessa lineaarinen vahvistaminen voidaan suorittaa kyseisen sekvenssin sulamislämpötilassa (T_m). Tässä

15 lämpötilassa diagnoosiprimeri näytenukleiinihapon komplementoivaan sekvenssiin hybridoituneena on tasapainossa vapaana liuoksessa olevan diagnoosiprimerin kanssa, jolloin diagnoosiprimeri (valinnaisesti laajennetussa muodossaan) hybridoituu näytenukleiinihappoon nopeasti ja denaturoituu sitten nopeasti irti siitä. Haluttaessa lineaarinen vahvistaminen voidaan suorittaa myös lämpöoskillatiota käyttäen. Kyseisessä lämpöoskillaatiossa käytettäisiin yleensä lämpötilan nopeaa vaihtelua sekvenssin sulamislämpötilan vaiheilla.

20

25

Jos läsnä on vain 1, 2 tai 3 nukleosiditrifosfaattia, diagnoosiprimeri laajentuu vain niin pitkäksi kuin näiden nukleosiditrifosfaattien läsnäolo sallii. Kuten edellä mainittu, jos esimerkiksi diagnoosiprimerin 3'-pääty ja vastaava näytenukleiinihapon sisältämä nukleosiditrifosfaatti ovat keskenään epäsojivat, ei tapahdu primerilaajennusta. Jos kuitenkin 3'-päädyn nukleosiditrifosfaatti ja näytenukleiinihapon vastaava nukleosiditrifosfaatti komplementoivat toisiaan, tapahtuu primerilaajennusreaktio.

30

35

Jos käytetään tai käytössä on vain 1, 2 tai 3 nukleosiditrifosfaattia, laajentuneen diagnoosiprimerin pääty nukleosiditrifosfaatti tulee käytetyksi vain kerran, jolloin saattaa olla edullista käyttää nukleosiditrifosfaattina dideoksinukleosiditrifosfaattia, joka sitä käytettäessä muodostaa diagnoosiprimerilaajennustuotteen pääty nukleosiditrifosfaatin. Tämä edesauttaa selkeäpäättyisen laajennustuotteen muodostumista diagnoosiprimeristä.

Haluttaessa reaktioseoksen sisältämä yksi tai useampi, yhteen tai useampaan laajennettuun primeriin sisällytettäväksi tarkoitettu nukleosiditrifosfaatti voidaan leimata tai merkitä millä tahansa käyttökelpoisella tavalla. Täten esimerkiksi yksi tai useampi nukleosiditrifosfaatti voidaan leimata fluoroivalla leimalla. Tämä nukleosiditrifosfaattien leimaus on erityisen kiinnostavaa kyseisen keksinnön viidennen suoritusmuodon yhteydessä, jolloin diagnoosiprimerin laajennustuotteen muodostuminen voidaan todeta määrittämällä laajennustuotteeseen siirtynyt yksi tai useampi leimattu tai merkitty nukleosiditrifosfaatti. Ellei laajennustuotetta muodostu, ei tapahdu kyseistä siirtymistä, jolloin leimatut tai merkityt nukleosiditrifosfaatit voidaan poistaa esimerkiksi pesemällä. Erityisesti kyseisen keksinnön viidennen suoritusmuodon mukaan vältetään valetuotteiden vahvistumisen aiheuttama ongelma, jolloin mahdollista saada hyvä erotus yhden tai useamman leimatun tai merkityn nukleosiditrifosfaatin läsnäollessa. Suoritettaessa vahvistaminen esimerkiksi PCR:ää käyttäen valetuotteen kaikkinaisen muodostuminen saattaa johtaa kyseisen tuotteen vahvistumiseen, ja siis leimatun tai merkityn nukleosiditrifosfaatin kulutukseen tähän tarkoitukseen, mikä alentaa erotusta.

Edeltävän lisäksi saattaa olla toivottavaa, että diagnoosiprimeri sisältää immunologisen sitoutumisparin toisen jäsenen, esimerkiksi vasta-aineen tai antigeenin, tai kompleksinmuodostusparin toisen jäsenen, esimerkiksi biotiini, sanotun sitoutumisparin tai kompleksinmuodostus-

parin jäljellä olevaan jäseneen sitomista silmälläpitäen tuotteen kytkemiseksi kiinteään faasiin.

Kyseisen keksinnön seuraavan ominaispiirteen mukaan tarjotaan määrittyspakkaus vähintään yhden varianttinukleotidin läsnäolon tai puuttumisen toteamiseksi näytteen sisältämässä yhdessä tai useammassa nukleiinihapossa, jolloin kyseinen määrittyspakkaus sisältää:

(1) diagnoosiprimerin kohde-emässekvenssin kutakin diagnoosiosuutta kohden, jolloin kunkin diagnoosiprimerin nukleotidisekvenssi on valittu siten, että se oleellisesti komplementoi sanottua diagnoosiosuutta, diagnoosiprimerin päätynukleotidin komplementoidessa joko oletettua varianttinukleotidia tai vastaavaa normaalia nukleotidia, jolloin pakkausta käytettäessä diagnoosiprimeristä syntetisoituu laajennustuote, jos diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emässekvenssissä, kun taas laajennustuotetta ei syntetisoidu, jos diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ei komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emässekvenssissä;

(2) kutakin neljää eri nukleosiditrifosfaattia; ja

(3) pakkausosan (2) nukleosiditrifosfaatteja polymeroivaa ainetta.

Kyseisen keksinnön mukainen määrittyspakkaus sisältää edullisesti lisäksi kutakin diagnoosiprimeriä vastaavan vahvistusprimerin, jolloin vahvistusprimerin nukleotidisekvenssi on valittu siten, että vastaavan diagnoosiprimerin kutakin laajennustuotetta voidaan komplementistaan erotettuna käyttää templaattina laajennustuotteen syntetisoimiseksi vahvistusprimeristä. Esimerkiksi kyseisen keksinnön mukainen määrittyspakkaus sisältää joko jommankumman tai kummankin keksinnön edellä määritellyn mukaisen toisen suoritusmuodon yhteydessä selostetun diagnoosiprimerisarjan.

Kyseisen keksinnön mukaiseen määrittyspakkaukseen voi haluttaessa sen ollessa tarkoituksenmukaista sisältyä myös primereitä sisäistä kontrollia varten.

Erityisen edullisesti kyseisen keksinnön mukainen määrityspakkaus sisältää kuitenkin PCR- (polymeraasiketjureaktio-) primereitä ja diagnoosiprimerin (jäljempänä määritellyn mukaisesti) kutakin oletettua varianttinukleotidia varten. Haluttaessa pakkaus voi lisäksi sisältää joko jommankumman tai kummankin edellä keksinnön toisen suoritustyylin yhteydessä selostetun diagnoosiprimerisarjan.

Kukin kohdissa (1), (2) ja (3) täsmennetty materiaali ja/tai vahvistusprimeri voidaan käytännöllisesti pakata omaan säilytysastiaansa, mutta edullisesti ne kaikki pakataan yhdessä yhteen säilytysastiaan, johon analysoitava materiaali lisätään. Yksittäinen säilytysastia sisältää suositeltavasti lisäksi puskurin.

Huomattakoon, että kyseisen keksinnön mukaisen määrityspakkauksen sisältäessä kummankin edellä keksinnön toisen suoritustyylin yhteydessä selostetun diagnoosiprimerisarjan (a) ja (b) nämä kaksi diagnoosiprimerisarjaa eivät ole samassa säilytysastiassa, vaikka kumpikin primerisarja sinänsä voi olla pakattu samaan säilytysastiaan kunkin kohdassa (2) ja (3) määritellyn mukaisen materiaalin kanssa ja/tai vahvistusprimerien kanssa tällöin kuitenkin toisen primerisarjan pakkauksesta erilliseen säilytysastiaan. Jos tutkittavaa näytettä on määrä aluksi vahvistaa EP-patenttijulkaisun n:o 237,362 mukaan, saattaa olla suositeltavaa sisällyttää PCR-primert sekä yksi tai useampi diagnoosiprimeri yhteen ja samaan säilytysastiaan yhdessä kohtien (2) ja (3) edellä materiaalien kanssa. Haluttuaessa diagnoosiprimeri/-it voidaan kuitenkin pakata erilliseen säilytysastiaan käytettäväksi myöhemmin vahvistamisen jälkeen.

Ilmaisulla 'nukleosiditriposfaatti' tarkoitetaan tässä käytettynä joko DNA:n tai RNA:n sisältämiä nukleosideja, jolloin ilmaisun piiriin kuuluvat nukleosidit, jotka käsittävät emäsosuuksena adeniinin, sytosiinin, guaniinin, tyymiinin tai urasiilin, sokeriosuuden ollessa deoksiriboo-

si tai riboosi. Yleensä ottaen deoksiribonukleosideja käytetään yhdessä DNA-polymeraasin kanssa. Huomattakoon kuitenkin, että voidaan käyttää muita modifioituja emäksiä, jotka kykenevät muodostamaan emäsparin jonkin tavanomaisen emäksen adeniinin, sytosiinin, guaniinin, tymiinin tai urasiilin kanssa. Tällaisia modifioituja emäksiä ovat esimerkiksi 8-atsaguanini ja hypoksantiini.

Ilmaisulla 'nukleotidi' tarkoitetaan tässä käytettynä joko DNA:n tai RNA:n käsittämiä nukleotideja, jolloin ilmaisun piiriin kuuluvat nukleotidit, jotka sisältävät emäsosuuksena adeniinin, sytosiinin, guaniinin, tymiinin tai urasiilin sokeriosuuden ollessa deoksiriboosi tai riboosi. Huomattakoon, että muita modifioituja emäksiä, jotka kykenevät muodostamaan emäsparin jonkin tavanomaisen emäksen adeniinin, sytosiinin, guaniinin, tymiinin tai urasiilin kanssa, voidaan käyttää kyseisessä keksinnössä käytettävässä diagnoosiprimerissä ja vahvistusprimerissä. Tällaisia modifioituja emäksiä ovat esimerkiksi 8-atsaguanini ja hypoksantiini.

Huomattakoon, että silloin kun kyseisen keksinnön mukaista menetelmää on määrä käyttää sellaisen oletetun varianttinukleotidin läsnä- tai poissaolon toteamiseksi, joka sijaitsee kohde-emässekvenssiosuuden vieressä, joka ei sisällä kaikkia neljää eri nukleotidia, laajennustuote diagnoosiprimeristä ja haluttaessa laajennustuote vahvistusprimeristä voidaan muodostaa tarkoituksenmukaisten vastaavien nukleosiditrifosfaattien pelkästään läsnäollessa, jolloin kaikkien neljän eri nukleosiditrifosfaatin läsnäolo ei ole välttämätöntä.

Nukleosiditrifosfaatteja polymeroiva aine voi olla mikä tahansa yhdiste tai järjestelmä, joka toimii primerilaajennustuotteiden synteesin tuottavalla tavalla, jolloin se voi olla myös entsyymi. Tähän tarkoitukseen sopivia entsyymejä ovat esimerkiksi E.coli DNA-polymeraasi-I, E.coli DNA-polymeraasi-I:n Klenow-fragmentti, T4-DNA-polymeraasi, muu käytettävissä oleva DNA-polymeraasi, käänteis-

transkriptaasi tai muu entsyymi, mukaanlukien lämpöstabiili entsyymi. Tässä käytettynä ilmaisulla 'lämpöstabiili entsyymi' tarkoitetaan entsyymiä, joka on stabiili lämmön suhteen ja sietää lämpöä ja joka katalysoi (helpottaa)

5 nukleotidien yhdistymistä oikealla tavalla kyseisten primerilaajennustuotteiden muodostamiseksi, jotka komplementoivat kutakin nukleiinihapposäiettä. Yleensä synteesi käynnistyy kunkin primerin 3'-päädyssä ja se etenee sitten

10 5'-suunnassa pitkin templaattisäiettä synteesin päätökseen, jolloin synteesissä muodostuu vaihtelevan pituisia sekvenssejä. On kuitenkin olemassa entsyymejä, esimerkiksi lämpöstabiileja entsyymejä, jotka käynnistävät synteesin 5'-päädyssä ja etenevät edelliseen nähden vastakkaiseen suuntaan kuitenkin samaa prosessia kuin edellä käyttäen.

15 Edullinen lämpöstabiili entsyymi, jota voidaan käyttää kyseisen keksinnön mukaisessa menetelmässä, on mikrobista Thermus aquaticus uutettava ja puhdistettava entsyymi. Tämän entsyymin molekyyllipaino on noin 86 000 - 90 000 daltonia kuten kuvattu EP-patenttijulkaisussa n:o 237,362

20 (katso myös EP-patenttijulkaisu n:o 258,017). Thermus aquaticus -kantaa YT1 on saatavana rajoituksetta talletuslaitoksesta The American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA, hakunumerolla ATCC 25104.

25 Tässä käytetyllä ilmaisulla 'diagnoosiosuus' tarkoitetaan kohde-emässekvenssin (jäljempänä määritellyn mukaisesti) sitä osuutta, joka sisältää päätynukleotidinaan mahdollisen varianttinukleotidin, jonka läsnäolo tai puuttuminen siis halutaan määrittää. Yleensä mahdollinen varianttinukleotidi on diagnoosiosuuden 5'-päädyssä, koska

30 yleensä ottaen primerilaajennustuotteiden synteesi alkaa edellä kuvatun mukaisesti kunkin primerisäikeen 3'-päädyssä. Jos kuitenkin aiotaan käyttää polymeroivaa ainetta, joka aloittaa synteesin diagnoosiprimerin 5'-päädyssä ja

35 etenee 3'-suunnassa templaattisäiettä pitkin synteesin

päätökseen, 'diagnoosiosuus' sisältää mahdollisen varianttinukleotidin 3'-päädyssään. Jatko-osuudessa esitetyt diagnoosiprimetit ovat tässä suhteessa asianmukaisesti merkityt.

5 Tässä käytettynä ilmaisulla 'kohde-emässekvenssi' tarkoitetaan nukleotidisekvenssiä, joka käsittää ainakin yhden diagnoosiosuuden (edellä määritellyn mukaisesti). Täten esimerkiksi yksittäisessä testissä, jossa tutkitaan perinnöllisen beta-anemian mahdollista esiintymistä, kohdesekvenssi voi sisältää aina 60, esimerkiksi 50, diagnoosiosuutta, jolloin kukin diagnoosiosuus sisältää yhden yksittäisen mahdollisen varianttinukleotidin.

10

 Tässä käytettynä ilmaisu 'oligonukleotidi' tarkoittaa määritelmän mukaan molekyyliä, joka koostuu kahdesta tai useammasta deoksiribonukleotidista tai ribonukleotidista, edullisesti useammasta kuin kolmesta. Sen täsmällinen koko riippuu monista tekijöistä, joita ovat esimerkiksi reaktiolämpötila, suolapitoisuus, formamidin mahdollinen läsnäolo sekä yhden tai useamman muun likeisen mutaation läsnäolo, kuten sirppisolu-Hb-C-sairauden kyseessä ollen, jotka puolestaan ovat riippuvaisia kyseisen oligonukleotidin loppufunktiosta tai käytöstä. Itse asiassa oligonukleotidin täsmällinen sekvenssi saattaa myös riippua lukuisista tekijöistä jäljempänä kuvatun mukaisesti.

15

20 Oligonukleotidi voidaan saada synteettisesti tai kloonamalla.

25

 Tässä käytettynä ilmaisulla 'primeri' tarkoitetaan oligonukleotidia joka riippumatta siitä, esiintyykö se luontaisesti esimerkiksi puhdistetussa restriktioentsyymipilkkomistuotteessa vai syntetisoidaanko se, kykenee toimimaan synteσιαlkukohtana olosuhteisiin vietynä, jotka indusoivat nukleinihapposäi'että komplementoivan primerilaajennustuotteen synteisiä, eli olosuhteisiin, joissa läsnä on tarkoituksenmukaiset nukleosiditrifosfaatit ja

30

35 polymeroiva aine kuten DNA-polymeraasi sopivassa puskuris-

sa (käsitteen 'puskuri' piiriin kuuluu pH, ionivahvuus, kofaktorit jne.) ja sopivassa lämpötilassa.

Maksimitehoa vahvistuksessa silmälläpitäen primeri on edullisesti yksisäikeinen, mutta voi vaihtoehtoisesti olla kaksisäikeinen. Jos primeri on kaksisäikeinen, sitä käsitellään säikeiden erottamiseksi toisistaan ennen primerin käyttöä laajennustuotteiden valmistuksessa. Primeri on edullisesti oligodeoksiribonukleotidi. Primerin tulee olla riittävän pitkä, jotta se käynnistäisi laajennustuotesynteesin polymeroivan aineen läsnäollessa. Primerien tarkat pituudet riippuvat monista tekijöistä, mukaanlukien lämpötila sekä primerilähde sekä menetelmän käyttötapa. Esimerkiksi kohdesekvenssin kompleksisuuden mukaan diagnoosi- ja vahvistusprimerit sisältävät tyypillisesti 12-35, esimerkiksi 15-35, nukleotidia, vaikka ne voivat sisältää niitä useampia tai harvempiakin. Lyhyet primerit-molekyylit edellyttävät yleensä matalien lämpötilojen käyttöä muodostaakseen riittävän stabiileja hybridikomplekseja templaatin kanssa.

Tässä käytettynä ilmaisulla 'komplementoiva' viitataan nukleotideihin, jolloin tarkoitetaan toisen nimenomaisen nukleotidin kanssa emäspareiksi asettuvaa nukleotidia. Täten adenosiinitrifosfaatti komplementoi uridiinitrifosfaattia tai tymidiinitrifosfaattia ja guanosiinitrifosfaatti komplementoi sytidiinitrifosfaattia. Todettakoon, että vaikka tymidiinitrifosfaatti ja guanosiinitrifosfaatti voivat tietyissä olosuhteissa muodostaa emäsparin, niitä ei tämän patenttiselityksen käytännössä katsota toisiaan komplementoiviksi. Todetaan edelleen, että vaikka sytosiinitrifosfaatti ja adenosiinitrifosfaatti voivat tietyissä olosuhteissa muodostaa emäsparin, niitä ei tämän patenttiselityksen käytännössä katsota toisiaan komplementoiviksi. Sama koskee sytosiinitrifosfaattia ja urasiilitrifosfaattia.

Tässä esiintyvät primerit valitaan kunkin nimenomaisen vahvistettavan sekvenssin eri säikeitä 'oleelli-

sesti' komplementoiviksi. Tällä tarkoitetaan, että primerien tulee komplementoida kulloistakin säi'että riittävästi hybridoituakseen siihen. Tämän vuoksi primerisekvenssin ei tarvitse tarkasti vastata templaatin sekvenssiä. Esimerkiksi jos diagnoosiprimeri käsittää nukleotidisekvenssin, jossa 3'-pääty nukleotidi komplementoi joko oletettua varianttinukleotidia tai vastaavaa normaalia nukleotidia, primerin 5'-päätyyn voi liittyä ei-komplementoiva nukleotidifragmentti loppuosan primerisekvenssistä komplementoidessa kohde-emäsekvenssin diagnoosiosuutta. Tavallisesti primerit kuitenkin ovat täysin komplementoivia lukuunottamatta niitä tapauksia, joissa ennaltamäärätty primeripääty voi käsittää ei-komplementoivia nukleotideja edellä kuvatun mukaisesti.

Huomattakoon kuitenkin, että tietyissä olosuhteissa diagnoosiprimerin laajennustuotteen synteesi voidaan indusoida tapahtuvaksi myös ei-komplementoivan 3'-päätyjään-
nöksen läsnäollessa. Tällainen valetuote saattaa syntyä liian alhaisen lämpötilan käytön tuloksena, jolloin lämpötilaa voidaan nostaa, liian pitkästä inkubointi- tai juottoajasta, jolloin kyseistä aikaa voidaan lyhentää, liian korkeasta suolapitoisuudesta, jolloin suolapitoisuutta voidaan laskea, liian korkeasta entsyymipitoisuudesta, liian korkeasta nukleosiditrifosfaattipitoisuudesta, väärästä pH-arvosta tai oligonukleotidiprimerin väärin valitusta pituudesta. Kaikkia näitä tekijöitä käsitellään EP-patenttijulkaisussa n:o 237,362. Valetuotteiden pääasiallinen syntysyy on mahdollisesti reaktiolämpötilojen antaminen pudota liian alas, jolloin tullaan sallineeksi liian alhainen (säikeiden) jäykkyys, ja tämä lämpötilan lasku voi tapahtua esimerkiksi poistettaessa reaktioseos lämpökiertolaitteesta, vaikkapa vain lyhyeksi ajaksi esimerkiksi polymeroivan aineen (esim. Taq-polymeraasi) lisäämistä silmälläpitäen, jolloin erityisen haitallista on, jos kyseessä on ensimmäinen reaktiotoistokerta. Edeltävän lisäksi olemme todenneet, että kyseisiä valetuotteita voidaan

saada tuloksena myös, jos käytetään diagnoosiprimeriä, joka sisältää erityisen runsaasti G- (guanosiini-) ja C- (sytidiini-) jäännöksiä. Diagnoosiprimeri voi aiheuttaa tässä suhteessa hankaluuksia, jos se kokonaisuudessaan on G/C-pitoinen tai erityisesti, jos sen merkitsevä pääty, tavallisesti 3'-pääty, on G/C-pitoinen. Lisäksi emäsparimuodostuksen täsmällinen luonne diagnoosiprimerin merkitsevän päädyn, tavallisesti 3'-päädyn, alueella tätä käytettäessä voi olla syypää valetuotesaaliiseen. Täten As:n (adenosiinin) läsnäololla diagnoosiprimerin merkitsevässä päädyssä, tavallisesti 3'-päädyssä, on emäsparimuodostuksessa taipumus nostaa spesifisyyttä, kun taas Gs:n (guanosiinin) läsnäololla ei ole mainittua taipumusta. Edelleen pariepäsopivuuden täsmällinen luonne diagnoosiprimerin merkitsevässä päädyssä, tavallisesti 3'-päädyssä, voi olla tärkeä tekijä määräämässä, saadaanko tuloksena valetuote vai ei. Täten esimerkiksi AA- tai CT-epäsopivuus ei yleensä johda hybridoitumiseen, mutta GT- tai AC-epäsopivuuden tuloksena voi olla riittävä hybridoitumisaste yhden tai useamman valetuotteen muodostumiseksi. Valetuotteiden muodostuminen voidaan välttää lisäämällä diagnoosiprimeriin tarkoituksellisesti yksi tai useampi ylimääräinen epäsopiva jäännös, tai haluttaessa deletio tai insertio, primerin epästabiloimiseksi edelleen hybridoinnin aikaista sitoutumisastetta alentamalla.

Täten esimerkiksi mitä tahansa yhtä tai useampaa niistä kymmenestä, esimerkiksi kuudesta, nukleotidista, jotka sijaitsevat päätyepäsopivuuden vieressä, voidaan muuttaa kyseisen epäsopivuuden lisäämiseksi edelleen.

Yleensä ottaen päätyepäsopivuuden ohella tarvitaan mahdollisesti vain yksi epäsopivuus sijoitettuna esimerkiksi 1, 2 tai 3 emäksen päähän päätyepäsopivuudesta. Täten esimerkiksi tutkiessamme normaalin homotsygootin, heterotsygootin tai muuntuneen homotsygootin esiintymistä α -1-anti-trypsiinigeenin Z-alleelin suhteen totesimme, että hyviä tuloksia saadaan, jos 3. nukleotidia 3'-päädynukleotidista

lukien muutetaan epäsopivuuden luomiseksi. Täten olemme esimerkiksi todenneet, että C:n esiintyminen A:n asemesta 3. nukleotidina diagnoosiprimerin 3'-päädyssä lukien mahdollistaa Z-alleelin suhteen normaalien homotsygootti-, heterotsygootti- ja muuntuneiden homotsygoottiyksilöiden vaikeuksitta tapahtuvan erotuksen. Diagnoosiprimerin paras mahdollinen rakenne voidaan täten määrittää suoraviivaisen, edeltäviin kriteereihin perustuvan kokeilun avulla, jolloin tämantapainen kokeilu mahtuu hyvin taitavan molekyylibiologin ammattitaidon puitteisiin.

Ilmaisulla 'diagnoosiprimeri' tarkoitetaan tässä käytettynä primerisäi'että, jonka nukleotidisekvenssi on valittu sellaiseksi, että päätynukleotidi komplementoi joko oletettua varianttinukleotidia tai vastaavaa normaalia nukleotidia, jolloin diagnoosiprimeristä syntetisoituu laajennustuote, jos sen päätynukleotidi komplementoi oikeaa päätynukleotidia kohde-emäsekvenssin vastaavassa diagnoosiosuudessa, mutta jolloin kyseistä laajennustuotetta ei syntetisoidu siinä tapauksessa, että diagnoosiprimerin päätynukleotidi ei ole homologinen oikeaan päätynukleotidiin nähden kohde-emäsekvenssin vastaavassa diagnoosiosuudessa.

Ilmaisulla 'vahvistusprimeri' tarkoitetaan tässä käytettynä primeriä, joka kykenee hybridoitumaan nukleinihapposäikeeseen, joka komplementoi sitä nukleinihapposäi'että, johon diagnoosiprimeri kykenee hybridoitumaan, 'vahvistusprimerin' nukleotidisekvenssin ollessa valittu sellaiseksi, että se kykenee hybridoitumaan templaattistaan erotettuun diagnoosiprimerilaajennustuotteeseen, jolloin diagnoosiprimerilaajennustuote toimii templaattina laajennustuotteen syntetisoimiseksi vahvistusprimeristä, mikä helpottaa haluttua vahvistusta.

Kyseinen keksintö koskee näin muodoin ainakin osittain parannusta vahvistusmenetelmiin, joita on esimerkiksi EP-patenttijulkaisussa n:o 237,362 kuvattu menetelmä, jossa parannus tekee mahdolliseksi vahvistaa selektiivisesti

joko oletetun varianttinukleotidin sisältävää sekvenssiä, silloin kun tällainen on läsnä, tai vastaavan normaalin nukleotidin sisältävää sekvenssiä, silloin kun tällainen on läsnä, jolloin kyseinen parannus yksinkertaistaa toteamista, vaikka ei käytetäkään sekvenssointia, alleelispesifisiä oligonukleotideja ja restriktioentsyymeillä pilkkomista. Näin muodoin tietyn nukleotidivariaation, esimerkiksi pistemutaation, kohdalla pystytään läsnäolo tai puuttuminen toteamaan joko 1) suunnittelemalla ja rakentamalla diagnoosiprimeri, joka käsittää tarkoituksenmukaisen, oletettua varianttinukleotidia komplementoivan päätynukleotidin, jolloin vahvistetun tuotteen syntetisoituminen osoittaa oletetun nukleotidivariaation läsnäolon ja vahvistetun tuotteen puuttuminen puolestaan osoittaa oletetun nukleotidivariaation puuttumisen; tai 2) suunnittelemalla ja rakentamalla diagnoosiprimeri, joka käsittää tarkoituksenmukaisen, vastaavaa normaalia nukleotidia komplementoivan päätynukleotidin, jolloin vahvistetun tuotteen syntetisoituminen osoittaa oletetun nukleotidivariaation puuttumisen ja vahvistetun tuotteen puuttuminen osoittaa oletetun nukleotidivariaation läsnäolon. Tässä yhteydessä viitattaessa 'tarkoituksenmukaiseen päätynukleotidiin' tarkoitetaan primerin päätynukleotidia, joka sitä käytettäessä toimisi synteessin, silloin kun se on mahdollinen, alkukohtana. Täten koska yleensä ottaen polymeroiva aine käynnistäisi synteessin primerin 3'-päädyistä, tarkoituksenmukainen päätynukleotidi olisi yleensä 3'-pääty-nukleotidi.

Varmuus esimerkiksi tietyn pistemutaation läsnäolosta tai puuttumisesta voidaan saada soveltamalla kumpaakin edellä esitetyn mukaista menetelmävaihtoehtoa (1) ja menetelmävaihtoehtoa (2). Näiden kahden lähestymistavan yhdistelmä tarjoaa menetelmän heterotsygoottien toteamiseksi, joka menetelmä on arvokas dominoivien perinnöllisten häiriöiden analysoimiseksi sekä resessiivisten perinnöllisten häiriöiden kantajien tunnistamiseksi.

Edullisessa suoritusmuodossa kyseinen keksintö koskee useamman kuin yhden oletetun varianttinukleotidin läsnäolon tai puuttumisen toteamista samasta näytteestä. Kyseisen keksinnön kyky selektiivisesti vahvistaa sekvenssejä ennalta määrätystä diagnoosiprimerien nukleotidisekvenssistä riippuvaisella tavalla mahdollistaa monenlaisten vahvistustuotteiden erottamisen yksinkertaisesti, tarkasti ja minimaalista menetelmän käyttäjän taidonastetta edellyttäen, jolloin on mahdollista tarjota 'kulutuskestävä' menetelmä yksittäisen näytteen seulomiseksi monilukuisten nukleotidivariaatioiden suhteen. Kyseinen keksintö on täten erityisen kiinnostava yksittäisen DNA- tai RNA-näytteen seulomiseksi kokonaisen patteriston suhteen perinnöllisiä, erilaisiin sairauksiin johtavia häiriöitä, kuten geneettiset häiriöt, taipumukset ja somaattiset mutaatiot. Tällainen DNA tai RNA voidaan esimerkiksi uuttaa verestä tai kudospateriaalista kuten suonikalvon nukkalisäkkeet tai lapsivesisolut lukuisten erilaisten menetelmien mukaan kuten esimerkiksi Maniatiksen et.al., Molecular Cloning (1982) 280-281, kuvaamien menetelmien mukaan. Lisäksi sitä mukaa kun muiden perinnöllisten häiriöiden molekyylitason perusta tulee tunnetuksi, nämä uudet häiriöt voidaan yksinkertaisesti sisällyttää kyseisen keksinnön mukaiseen seulontamenettelyyn.

Runsaslukuiset vahvistustuotteet voidaan erottaa lukuisten erilaisten menettelyiden avulla. Näin esimerkiksi voidaan käyttää koettimia, yhtä kutakin oletettua vahvistustuotetta kohden, jolloin kukin koetin käsittää muista poikkeavan ja erottuvan signaalin tai signaalin tuottamaan kykenevän jäännöksen.

Tällaisia signaaleja ja signaalin tuottamaan kykeneviä ja jäännöksiä käsitellään yksityiskohtaisesti omistamassamme EP-patenttijulkaisussa n:o 246,864, mutta kyseeseen saattaisi tulla esimerkiksi kiinteäfaasivahvistusjärjestelmä, jota kuvaa Wang, C.G. lähteessä World Biotech Report 2:2 (1986) 33-37 (Diagnostics Healthcare Proceed-

ings, konferenssista, joka pidettiin San Fransiskossa marraskuussa 1986), jonka mukaan koettiin konjugoidaan useista valituista hivenaineista muodostettuja mikrohelmiä. Spesifisten koettimien läsnäolo voidaan todeta röntgensäde-fluoresenssianalyysin avulla. Tällaisten menetel-
 5 lyiden käyttö on periaatteessa yleensä yksinkertaista ja suoraviivaista, koska niitä käytettäessä on ainoastaan pystyttävä toteamaan vahvistustuotteen läsnäolo, eikä erottamaan toisistaan sekvenssejä, jotka poikkeavat toisistaan vaikkapa vain yhden yksittäisen nukleotidin osalta.
 10 ta.

Huomattavasti yksinkertaisemman ja edullisen menetelmän vahvistustuotteiden erottamiseksi mukaan vahvistusprimerien nukleotidisekvenssit valitaan siten, että kunkin
 15 kyseisen keksinnön mukaisessa menetelmässä muodostuneen vahvistustuotteen pituus poikkeaa muista. Tältä osin vahvistustuotteen käsittämien emäsparien lukumäärän määrää diagnoosi- ja vahvistusprimerin välinen ero. Täten vahvistusprimerit voidaan suunnitella ja rakentaa siten, että
 20 kukin mahdollinen varianttinukleotidi liittyy pituudeltaan muista poikkeavaan mahdolliseen vahvistustuotteeseen.

Tietyn mahdollisen varianttinukleotidin läsnäolo tai puuttuminen voidaan täten edullisesti todeta elektroforeettisin keinoin, jolloin saadut erilaiset vahvistustuotteet jakaantuvat kukin molekyyllipainonsa mukaisesti
 25 ja voidaan siten tunnistaa esimerkiksi autoradiografisesti tai fluoresenssia hyödyntävillä menetelmillä. Eri tuotteet voivat pituudeltaan poiketa toisistaan vain yhden nukleotidin verran, mutta edullisesti pituudet poikkeavat toisistaan ainakin 3 nukleotidin osalta. Kyseisen keksinnön mukainen menetelmä suoritetaan edullisesti käyttäen väleihin tunkeutuvaa väriainetta kuten etidiumbromidia, joka
 30 saadaan näkyväksi UV-valossa väriltään oranssina fluoresenssina. Täten monilukuisten mahdollisten varianttinukleotidien läsnäolo tai puuttuminen yksittäisessä näytteessä voidaan määrittää nopeasti, tarkasti ja helposti. Ha-

luttaessa yksi tai useampi diagnoosiprimeri ja/tai vahvis-
 tusprimeri voi olla merkitty tai leimattu esimerkiksi jol-
 lain fluoroforilla. Täten esimerkiksi kukin eri diagnoosi-
 primeri tai vahvistusprimeri voi käsittää muista poikkeaa-
 5 van fluoroforin, jolloin testipatteriston tulokset voidaan
 lukea elektroforeesigeelistä esimerkiksi laser-pyyhkäisi-
 jällä, mikä mahdollistaa kyseisen keksinnön mukaisen mene-
 telmän automatisoinnin. Vaihtoehtoisesti vahvistustuotteen
 läsnäolo tai puuttuminen voidaan määrittää yksinkertaisesti
 10 käyttämällä liuotinta, joka kykenee selektiivisesti liuot-
 tamaan nukleosiditrifosfaatteja, mutta ei kykene liuotta-
 maan nukleotidisekvenssiä (esimerkiksi DNA:ta). Tällainen
 liuotin on esimerkiksi trikloorietikkahappo (TCA). Täten
 vahvistetun tuotteen läsnäolo tai puuttuminen voidaan mää-
 15 rittää esimerkiksi saostamalla TCA:lla vahvistustuotteet
 sisältävä reaktioseos. Tapauksissa, joissa sopivien nuk-
 leosiditrifosfaattien siirtymistä tuotteisiin on tapahtu-
 nut eksponentiaalisen reaktiosarjan puitteissa, läsnä on
 huomattavasti suurempia määriä TCA:han liukenematonta ma-
 20 teriaalia kuin jos diagnoosiprimerin laajentumista ei ole
 tapahtunut. Liukenematon materiaali voidaan kvantitoida
 tunnettujen menetelmien avulla. Täten esimerkiksi nukleo-
 siditrifosfaatit voidaan leimata (esimerkiksi radioaktii-
 visella tai fluoroivalla merkillä), reaktiosoes voidaan
 25 esimerkiksi sentrifugoida, saatu neste dekantoida eroon
 ja kohdistaa joko nestemäiseen tai ei-liukoiseen saalis-
 erään sopivia toteamismenetelyitä kuten tuikelaskenta tai
 fluoresenssimääritys.

Kyseisen keksinnön edelleen seuraavan ominaispiir-
 30 teen mukaan tarjoamme noin 5 - 50 emäsparin nukleotidisek-
 venssin käytettäväksi kyseisen keksinnön mukaisessa mene-
 telmässä sanotun sekvenssin päätynukleotidin komplementoi-
 dessa joko johonkin tunnettuun geneettiseen häiriöön liit-
 tyvää oletettua varianttinukleotidia tai vastaavaa normaa-
 35 lia nukleotidia, jolloin sanotun sekvenssin loppuosa kom-
 plementoi oleellisesti vastaavaa, oletetun varianttinukleo-

tidin tai vastaavan normaalin nukleotidin viereistä kohde-
emäsekvenssiä sanotun nukleotidisekvenssin ollessa valit-
tu siten, että käytettäessä sitä diagnoosiprimerinä kysei-
sen keksinnön mukaisessa menetelmässä diagnoosiprimeristä
5 syntetisoituu laajennustuote, jos diagnoosiprimerin sanot-
tu päätynukleotidi komplementoi vastaavaa nukleotidia koh-
de-emäsekvenssissä, kun taas laajennustuotetta ei synte-
tisoidu, silloin kun diagnoosiprimerin sanottu päätynuk-
leotidi ei komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emäs-
10 sekvenssissä.

Joko oletettua varianttinukleotidia tai vastaavaa
normaalia nukleotidia komplementoiva päätynukleotidi si-
jaitsee käytännöllisesti nukleotidisekvenssin 3'-päädyssä.
Edullisesti oletettu varianttinukleotidi on syntynyt pis-
15 temutaation tuloksena vastaavasta normaalista sekvenssis-
tä.

Sanotun nukleotidisekvenssin pituus voi olla esi-
merkiksi 10 - 50 emäsparia, esimerkiksi 10 - 36 emäsparia.

Kyseisen keksinnön neljän seuraavan ominaispiir-
20 teen mukaan tarjoamme välittömästi edellä määritellyn mu-
kaisia nukleotidisekvenssejä, joissa nukleotidisekvenssin
pätynukleotidi komplementoi varianttinukleotidia, joka
on syntynyt vastaavassa normaalissa nukleotidissa tapah-
tuneessa muutoksessa (i) A:ksi, (ii) G:ksi, (iii) C:ksi,
25 (iv) T:ksi tai vastaavasti U:ksi.

Kyseisen keksinnön edelleen seuraavan ominaispiir-
teen mukaan tarjoamme edellä määritellyn mukaisesti sarjan
kahden nukleotidin muodostamia pareja, jolloin toisen sek-
venssin päätynukleotidi komplementoi oletettua, tunnettuun
30 geneettiseen häiriöön liittyvää varianttinukleotidia ja
jälkimmäisen sekvenssin päätynukleotidi komplementoi vas-
taavaa normaalia nukleotidia.

Kyseisen keksinnön edelleen seuraavan ominaispiir-
teen mukaan tarjotaan koettimia, jotka käsittävät edellä
35 määritellyn mukaisesti leima- tai merkkirakenneosan sisäl-
tävän nukleotidisekvenssin.

Esimerkin antamiseksi esitellään yksityiskohtaisesti seuraavat tunnetut geneettiset häiriöt esittäen häiriöön johtaneet mutaatiot sekä keskeinen kirjallisuusviite kullekin mutaatiolle. Edellä määritellyn mukaiset nukleotidisekvenssit ja koettimet voivat perustua esimerkiksi alla lueteltuihin geneettisiin häiriöihin, jolloin oleellisen nukleotidisekvenssin tai koettimen sekvenssi on saatavissa taulukossa esitetystä keskeisestä kirjallisuusviitteestä.

10 **TAULUKKO** Geneettisiä sairauksia aiheuttavia mutaatioita

A Autosomisairauksia

15	Sairaus	Mutaatio	Viite
	antitrombiini-III-vajaus	CG → TG	Duchange et.al., <u>Nucleic Acids Research</u> <u>14</u> (1986) 2408
20	amyloidikertymän aiheuttama hermosairaus	CG → CA	Maeda S., et.al., <u>Mol.Biol.Med.</u> <u>1986</u> 329-338
		AC → GC	Wallace, M.R. et.al., <u>J.Clin.Invest.</u> <u>78</u> (1986) 6-12
25		AG → GG	Wallace, M.R. et.al., <u>J.Clin.Invest.</u> <u>78</u> (1986) 6-12
30	alfa-1-antirypsiini-vajaus	TG → CG	Nukiwa, T. et.al., <u>J.Biol.Chem.</u> <u>261</u> (1986) 15989-15994
		CG → CA	Kidd, V.J. et.al., <u>Nature</u> <u>304</u> (1983) 230-234
35		GAT → GTT	Asp 256 -Val, eksoni-III; julkistamaton

Sairaus	Mutaatio	Viite
	CTT → CTC	kodonin 51 (normaali) deletio, M. Malton, painossa
5	GGC → TGC	Arg ³⁹ - Cys, eksoni-III, I-variant- ti, julkistamaton
Emäspari	Mutaatio	Viite
10 adenosiinideaminaasi- vaja	CG → CA	Bonthron, D.T. <u>et.al.</u> , <u>J.Clin.Invest.</u> 76 (1985) 894-897
	AA → AG	Valerio, D. <u>et.al.</u> , <u>EMBO J.</u> 5 (1986) 113-119
15	CT → CG	" "
apolipoproteiini-E- vaja	GT → GC	Cladaras <u>et.al.</u> , <u>J.Biol.Chem.</u> 262 (1987) 2310-2315
20 sokeritauti, lievä	TC → CC	Haneda, M. <u>et.al.</u> , <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A.</u> 80 (1983) 6366-6370
25	TC → TG	Shoelson, S. <u>et.al.</u> , <u>Nature</u> 302 (1983) 540-543
	TG → TT	" "
30 Gaucherin sairaus, tyyppi 2	CT → CC	Tsuji, S. <u>et.al.</u> , <u>New Engl.J.Med.</u> 316 (1987) 570-575
liiallinen insuliinin esiintyminen veressä	CG → CA	Shibasaki, Y. <u>et.al.</u> , <u>J.Clin.Invest.</u> 76 (1985) 378-380
35	CA → GA	Chan, S.J. <u>et.al.</u> , <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A.</u> 84 (1987) 2194-2197

	Sairaus	Mutaatio	Viite
	immunoglobuliini- kappa-vajaus	CT → CG	Stavnezer-Nordgren, J. <u>et.al.</u> , <u>Science</u> <u>230</u> (1985) 458-461
5		CG → TG	" "
	LDL-reseptori- vajaus	GG → GA	Lehrman, M.A. <u>et.al.</u> , <u>Cell</u> <u>41</u> (1985) 735-743
10	perinnöllinen hauras- luusairaus (tyyppi II)	TG → TT	Cohn, D.H. <u>et.al.</u> , <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A.</u> <u>83</u> (1986) 6045-6047
15	fenyyliketonuria	AG → AA	Dilella, A.G. <u>et.al.</u> , <u>Nature</u> <u>322</u> (1986) 799-803
		CG → TG	Dilella, A.G. <u>et.al.</u> , <u>Nature</u> <u>327</u> (1987) 333-336
20	proteiini-C-vajaus	CG → TG	Romeo, G. <u>et.al.</u> , <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A.</u> <u>84</u> (1987) 2829-2832
		GG → GC	"
25	puriininukleosidi- fosforylaasivajaus	TG → TA	Williams, S.R. <u>et.al.</u> , <u>J.Biol.Chem.</u> <u>262</u> (1987) 2332-2339
30	sirppisoluanemia	GAG → GTG	Chang J.C. & Kan, Y.W., <u>Lancet</u> <u>2</u> (1981) 1127-1129; Orkin, S.H. <u>et.al.</u> , <u>New Engl. J.Med.</u> <u>307</u> (1982) 32-36; ja Conner, B.J. <u>et.al.</u> , <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A.</u> <u>80</u> (1983) 278-282
35			

Sairaus		Mutaatio	Viite
Tangier-sairaus		AG → AT	Law, S.W., Brewer, H.B., <u>J.Biol.Chem.</u> <u>260</u> (1985) 12810-12814
5			
Sairaus			
perinnöllinen beta-anemia			
Mutanttiluokka		Tyyppi Viite	
10	(a) Ei-funktionaalinen mRNA		
Ei-koodimutantit			
	(1) kodoni 17 (A → T)	0	Chang, J.C. <u>et.al.</u> , <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A.</u> <u>76</u> (1979) 2886
15	(2) kodoni 39 (C → T)	0	Trecartin, R.F. <u>et.al.</u> , <u>J.Clin.</u> <u>Invest.</u> <u>68</u> (1981) 1012; Chehab, F.F. <u>et.al.</u> , <u>Lancet</u> <u>1</u> (1986) 3
20	(3) kodoni 15 (C → A)	0	Kazazian, H.H. <u>et.al.</u> , <u>Eur.Molec.Biol.Org.J.</u> <u>3</u> (1984) 593
	(4) kodoni 37 (G → A)	0	Boehm, C.D. <u>et.al.</u> , <u>Blood</u> <u>67</u> (1986) 1185
25	(5) kodoni 121 (G → T)	0	Kazazian, H.H. <u>et.al.</u> , <u>Am.J.Hum.Genet.</u> <u>38</u> (1986) A860
Lukualuesiirtomutantit			
30	(6) -2 kodoni 8	0	Orkin, S.H. <u>et.al.</u> , <u>J.Biol.Chem.</u> <u>256</u> (1981) 9782
	(7) -1 kodoni 16	0	Kazazian, H.H. <u>et.al.</u> , <u>Eur.Molec.Biol.Org.J.</u> <u>3</u> (1984) 593
35	(8) -1 kodoni 44	0	Kinniburgh, A.J. <u>et.al.</u> , <u>Nucleic Acids Res.</u> <u>10</u> (1982) 5421

Mutanttiluokka	Tyyppi	Viite
(9) -1 kodonit 8 ja 9	0	Kazazian, H.H. <u>et.al.</u> , <u>Eur.Molec.Biol.Org.J.</u> <u>3</u> (1984) 593; Wong, C. <u>et.al.</u> , <u>Proc.Natl.</u> <u>Acad.Sci. U.S.A.</u> <u>83</u> (1986) 6529
5		
(10) -4 kodonit 41 ja 42	0	Kazazian, H.H. <u>et.al.</u> , <u>Eur.Molec.Biol.Org.J.</u> <u>3</u> (1984) 593; Kimura, A. <u>et.al.</u> , <u>J.Biol.Chem.</u> <u>258</u> (1983) 2748
10		
(11) -1 kodoni 6	0	Kazazian, H.H. <u>et.al.</u> , <u>Am.J.Hum.Genet.</u> <u>35</u> (1983) 1028
(12) +1 kodonit 71 ja 72	0	Cheng, T.C. <u>et.al.</u> , <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A.</u> <u>81</u> (1984) 2821
15		
(b) RNA-prosessoointimutantit		
(1) IVS-1 asema 1 GT → AT	0	Orkin, S.H. <u>et.al.</u> , <u>Nature</u> <u>296</u> (1982) <u>627</u> ; Treisman, R. <u>et.al.</u> , <u>Nature</u> <u>302</u> (1983) 591
20		
(2) IVS-1 asema 1 GT → TT	0	Kazazian, H.H. <u>et.al.</u> , <u>Eur.Molec.Biol.Org.J.</u> <u>3</u> (1984) 593
25		
(3) IVS-2 asema 1 GT → AT	0	Orkin, S.H. <u>et.al.</u> , <u>Nature</u> <u>296</u> (1982) 627; Treisman, R. <u>et.al.</u> , <u>Cell</u> <u>29</u> (1982) 903
(4) IVS-1 3'-pääty: 17 bp	0	Bunn, H.F. <u>et.al.</u> , Haemoglobin: Molecular Genetic and Clinical Aspects, Saunders, Filadelfia, 1986, s.283
30		

Mutanttiluokka	Tyyppi	Viite
(5) IVS-1 3'-pääty: 25 bp	0	Kazazian, H.H. <u>et.al., Eur.Molec. Biol.Org.J. 3 (1984)</u> 593; Orkin, S.H. <u>et.al., J.Biol.Chem.</u> <u>258 (1983) 7249</u>
(6) IVS-2 3'-pääty: AG → CG	0	Padanilam, B.J. <u>et.al., Am.J.Hematol.</u> <u>22 (1986) 259</u>
(7) IVS-2 3'-pääty: AG → CG	0	Antonarakis, S.E. <u>et.al., Proc.Natl.</u> <u>Acad.Sci. U.S.A.</u> <u>81 (1984) 1154;</u> Atweh, G.F. <u>et.al.,</u> <u>Nucleic Acids Res.</u> <u>13 (1985) 777</u>
Konsensusmuutokset		
(8) IVS-1 asema 5 (G → C)	+	Kazazian, H.H. <u>et.al., Eur.Molec.</u> <u>Biol.Org.J. 3 (1984)</u> 593; Treisman, R. <u>et.al., Nature</u> <u>302</u> <u>(1983) 591</u>
(9) IVS-1 asema (G → T)	0	Wong, C. <u>et.al.,</u> <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A. 83 (1986)</u> 6529; Atweh, G.F. <u>et.al., Nucleic</u> <u>Acids Res. 13</u> <u>(1985) 777</u>
(10) IVS-1 asema 6 (T → C)	+	Orkin, S.H. <u>et.al.,</u> <u>Nature</u> <u>296 (1982)</u> 627; Atweh, G.F. <u>et.al., Am.J.Hum.</u> <u>Genet. 38 (1986) 85</u>
Sisäiset IVS-muutokset		
(11) IVS-1 asema 110 (G → A)	+	Westaway, D. <u>et.al.,</u> <u>Nucleic Acids Res.</u> <u>9 (1981) 1777</u>

Mutanttiluokka

Tyyppi Viite

- 5 (12) IVS-2 asema 705 (T → G) + Dobkin, C. et.al.,
Proc.Natl.Acad.Sci.
U.S.A. 80 (1983)
1184
- (13) IVS-2 asema 745 (C → G) + Orkin, S.H. et.al.,
Nature 296 (1982)
627;
Treisman, R. et.al.,
Nature 302 (1983)
591
- 10 (14) IVS-2 asema 654 (C → T) 0 Cheng, T.C. et.al.,
Proc.Natl.Acad.Sci.
U.S.A. 81 (1984)
2821
- 15 (15) IVS-1 asema 116 (T → G) ? Feingold, E.A.
et.al., Ann.N.Y.
Acad.Sci. 445
(1985) 159

Koodialuesubstituutiot

- 20 (16) kodoni 26 (G → A) β^+, β^e Thein, S.L. et.al.,
J.Med.Genet. (1986
painossa);
Orkin, S.H. et.al.,
Nature 300 (1982)
768
- 25 (17) kodoni 24 (T → A) + Goldsmith et.al.,
Proc.Natl.Acad.Sci.
U.S.A. 88 (1983)
2318
- (18) kodoni 27 (G → T) $\beta^+, \text{BKnoossos}$ Orkin, S.H. et.al.,
Blood 64 (1984) 311

30 (c) Transkriptiomutantit

- 35 (1) -88 C → T + Wong, C. et.al.,
Proc.Natl.Acad.Sci.
U.S.A. 83 (1986)
6529; Orkin, S.H.
et.al., J.Biol.Chem.
259 (1984) 8679

Mutanttiluokka	Tyyppi	Viite
(2) -87 C → G	+	Orkin, S.H. et.al., <u>Nature</u> <u>296</u> (1982) <u>627</u> ; Treisman, R. et.al., <u>Nature</u> <u>302</u> (1983) <u>591</u>
5		
(3) -31 A → G	+	Takahara, Y. et.al., <u>Blood</u> <u>67</u> (1986) <u>547</u>
(4) -29 A → G	+	Antonarakis, S.E. et.al., <u>Proc.Natl.</u> <u>Acad.Sci. U.S.A.</u> <u>81</u> (1984) <u>1154</u> ; Wong, C. et.al., <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A.</u> <u>83</u> (1986) <u>6529</u>
10		
(5) -28 A → C	+	Surrey, S. et.al., <u>J.Biol.Chem.</u> <u>260</u> (1985) <u>6507</u>
(6) -28 A → G	+	Orkin, S.H. et.al., <u>Nucleic Acids Res.</u> <u>11</u> (1983) <u>4727</u>
20		
(d) Polyadenylaatiomutantti		
(1) AATAAA → AACAAA	+	Orkin, S.H. et.al., <u>Eur.Molec.Biol.</u> <u>Org.J.</u> <u>4</u> (1985) <u>453</u>
25		
(e) Deletiot		
(1) 3'β(-619 bp)	0	Spritz, R.A. et.al., <u>Nucleic Acids Res.</u> <u>10</u> (1982) <u>8025</u> ; Orkin, S.H. et.al., <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A.</u> <u>76</u> (1979) <u>2400</u>
30		
(2) 5'β(-1.35 kb)	0, HbF	Padanilam, B.J. et.al., <u>Blood</u> <u>64</u> (1984) <u>941</u>
35		
(3) β (-10 kb)	0, HbF	Gilman, J.G. et.al., <u>Br.J.Haemat.</u> <u>56</u> (1984) <u>339</u>

+ = perinnöllisen beta-anemian mutantti (β^-), joka aiheuttaa beta-globiiniketjun alentunutta tuotantoa;
 O = mutantti (β^0), joka aiheuttaa beta-globiiniketjutuotannon puuttumisen.

5

Sairaus	Mutaatio	Viite
trioosifosfaatti-isomeraasivajaus	AG → AC	Daar, I.O. et.al., <u>Proc.Natl.Acad.Sci.</u> <u>U.S.A. 83</u> (1986) 7903-7907
uroporfyrinogeeni-dekarboksylaasivajaus	GG → GA	DeVerneuil, H. et.al., <u>Science</u> <u>234</u> (1986) 732-734

10

15

B X-liitteinen

Sairaus	Geeni	Mutaatio	Viite
A-verenvuototauti	tekijä-VIII	CG → TG (24)	Gitschier, J. et.al., <u>Nature</u> <u>315</u> (1985) 427-430
		CG → TG (26)	" "
		CG → TG (18)	Antonarakis, S.E. et.al., <u>New Engl.J.</u> <u>Med.</u> <u>313</u> (1985) 842-848
		CG → CA (26)	Gitschier, J. et.al., <u>Science</u> <u>232</u> (1986) 1415-1416
		CG → TG (18)	Youssofian, H. et.al. <u>Nature</u> <u>324</u> (1986) 380- 382
		CG → TG (22)	" "
		CG → TG (22)	" "

20

25

30

35

	Sairaus	Geeni	Mutaatio	Viite
	Verenvuototauti-B	tekijä-IX	CG → CA	Bentley, A.K. <u>et.al.</u> , <u>Cell</u> 45 (1986) 343-348
5			GT → TT	Rees, D.J.G. <u>et.al.</u> , <u>Nature</u> 316 (1985) 643-645
10			GA → GG	Davis, L.M. <u>et.al.</u> , <u>Blood</u> 69 (1987) 140-143

Esimerkkejä deletioista löytyy seuraavista lähteistä:

- 15 Forrest, S.M., Cross, G.C., Speer, A., Gardner-Medwin, D., Burn, J. ja Davies, K.E., 'Preferential Deletion of Exons in Duchenne and Becker Muscular Dystrophies' (suom. 'Ensisijaiset eksonideletiot Duchennen ja Beckerin lihassurkastumataudissa'), Nature 320 (1987) 638-640.

- 20 Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertselson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C. ja Kunkel, L.M., 'Complete Cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and Preliminary Genomic Organisation of the DMD gene in Normal and Affected Individuals' (suom. 'Duchennen lihassurkastumataudin (DMD-) cDNA:n täydellinen kloonauk ja DMD-geenin alustava genomijärjestelmä terveessä ja sairaassa yksilössä'), Cell 50 (1987) 509-517.

- 30 Malhotra, S.B., Hart, K.A., Klamut, H.J., Thomas, N.S.T., Bodrug, S.E., Burghes, A.H.M., Bobrow, M., Harper, P.S., Thompson, M.W., Ray, P.N. ja Worton, R.G., 'Frame-Shift Deletions in Patients with Duchenne and Becker Muscular Dystrophy' (suom. 'Lukualueen siirtodeletiot Duchennen ja Beckerin lihassurkastumatautia potevissa potilaissa'), Science 242 (1988) 755-759.

- 35 Read, A.P., Mountford, R.C., Forrest, S.M., Kenwright, S.J., Davies, K.E. ja Harris, R., 'Patterns of Exon Deletions in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy'

(suom. 'Eksonideletiookaavoja Duchennen ja Beckerin lihassurkastumataudissa'), Hum.Genet. 80 (1988) 152-156.

- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N. ja Caskey, C.T., 'Deletion Screening of the DMD Locus via Multiplex DNA Amplifications' (suom. 'DMD-geeni-
- 5 paikan deletioseulonta monikertaisen DNA-vahvistuksen avulla'), Nucl.Acids Res. 16:23 (1988) 11141-11156.

- Roberts, R.G., Cole, C.G., Hart, K.A., Bobrow, M. ja Bentley, D.R., 'Rapid Carrier and Prenatal Diagnosis
- 10 of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy' (suom. 'Duchennen ja Beckerin lihassurkastumataudin nopea kantaja- ja syntymääedeltävä diagnoosi'), Nucl.Acids.Res. 17:2 (1989) 811.

- Usein analyysia varten on käytettävissä vain pieniä
- 15 määriä genomi-DNA:ta. On todettu, että diagnoosiprimerien spesifisyys oleellisten normaalien nukleotidien tai varianttinukleotidien suhteen voidaan määrittää kätevästi nostamalla kyseisen yhden tai useamman sekvenssin kopiolukua hybridisaatiomäärityksessä. Tähän voidaan päästä
- 20 esimerkiksi rakentamalla kaksisäikeinen 'kasetti', joka käsittää normaalin sekvenssin juotettuna varianttisekvenssiin viereisten säikeiden kahden nukleotidin välisen epä-
- sopivuuden sijaitessa edullisesti kasetin keskikohdan vaiheilla. Kasetista saadaan sitten kätevästi kopioita inser-
- 25 toimalla se plasmidi-isäntään, mitä seuraa plasmidin replikointi ja haluttujen sekvenssien eristys, jotka eri vaiheet suoritetaan alan piirissä hyvin tunnettuja menetelmiä käyttäen. Tätä menettelytapaa on kätevässä muodossa havainnollistettu kuviossa 10.

- 30 Jotta kyseinen keksintö tulisi ymmärrettävämmäksi, sitä kuvataan jatko-osuudessa esimerkkien avulla oheisiin piirroksiin nojautuen, joissa piirroksissa:

- kuviot 1(a) ja 1(b) havainnollistavat keksinnön ensimmäistä suoritustapausta, kuvio 1(c) havainnollistaa
- 35 tyyppillistä tulosta mahdollisesti suoritettavasta elektroforeesi-ajosta;

kuviot 2(a) ja 2(b) havainnollistavat kyseisen keksinnön toista suoritustapaa;

kuvio 3 havainnollistaa edullista menetelmää monilukuisten vahvistustuotteiden erottamiseksi toisistaan;

5 kuviot 4(a) ja 4(b) havainnollistavat kyseisen keksinnön kolmatta suoritustapaa;

kuviot 5(a), (b) ja (c) havainnollistavat kyseisen keksinnön neljättä suoritustapaa;

10 kuvio 6 esittää ihmisen α -1-antitrypsiinigeeniä (ei oikeassa mittakaavassa); ja

kuviossa 7 esitetään tulos esimerkeissä 1 ja 2 saadun geenin visualisoinnista.

15 Kuviossa 8 esitetään tulos geenin visualisoinnista, jolloin vyöhykkeet 1-4 edustavat tulosta esimerkistä 3, vyöhykkeet 5-8 edustavat osaa tuloksista esimerkistä 4 ja vyöhyke 9 edustaa kokomerkkiä.

Kuviossa 9 esitetään tulos esimerkissä 4 saadun geenin visualisoinnista.

20 Kuviossa 10 esitetään kasetti-plasmidijärjestelmän käyttö halutun DNA-dupleksin vahvistamiseksi.

Kuvio 11 havainnollistaa keksinnön viidettä suoritustapaa (lineaarinen vahvistaminen).

Kuviossa 12 esitetään tulos esimerkissä 5 saadun geenin visualisoinnista.

25 Kuviossa 13 esitetään tulos esimerkissä 6 saadun geenin visualisoinnista.

Kuvio 1 havainnollistaa kyseisen keksinnön ensimmäisen suoritustapaa mukaista menetelmää. Kuvio 1(a) esittää denaturoituja genomi-DNA-säikeitä, jotka sisältävät normaalin nukleotidin (N) asemassa, joka esimerkiksi geneettisen häiriön seurauksena saattaisi käsittää varianttinukleotidin. Kuviossa 1(b) esitetyn mukaisesti nukleiinihapposäikeen saattaminen hybridointiolosuhteissa kosketuksiin diagnoosikoettimen kanssa, joka omaa normaalia nukleotidia (-N) komplementoivan 3'-pääty nukleotidin, 35 tarkoituksenmukaisten nukleosiditrifosfaattien sekä niitä

polymeroivan aineen läsnäollessa johtaa diagnoosiprimerin ketjunpidennykseen 3'-suunnassa. Tällaista ketjun pitene-

mistä ei tapahdu käytettäessä diagnoosiprimeriä, jonka 3'-

pääty nukleotidi komplementoi oletettua varianttinukleoti-

5 dia (-M). Diagnoosiprimerin mahdollisesti saatu ketjunpi-

dennystuote voidaan sitten denaturoida, minkä jälkeen de-

naturoituun tuotteeseen voidaan hybridoida vahvistuspri-

meri (A) uuden ketjunpidennystuotteen saamiseksi. Kyseinen

ketjunpidennystuote voidaan sitten denaturoida, minkä jäl-

10 keen menettelyä voidaan toistaa vahvistuksen saamiseksi.

Diagnoosiprimerin vaikutuksesta vahvistuva genomi-DNA-alue

on kuviossa 1(b) merkitty DG:llä. Tältä alueelta peräisin

olevat diagnoosit tuotteet tuottavat kuviossa 1(c) DG:llä

merkityt nauhat. Verrokkina voidaan käyttää PCR- (polyme-

15 raasiketjureaktio-) primereitä (P), jotka on kuviossa 1(a)

merkitty P:llä, vaikuttamassa nukleiinihapposäikeen johon-

kin muuhun kohtaan tai johonkin muuhun nukleiinihapposäi-

keeseen, esimerkiksi johonkin muuhun kromosomiin esim.

ihmis-DNA:n kyseessä ollen. Tämä erillinen kohta on ku-

20 viossa 1(c) merkitty PCR:llä ja tästä kohdasta peräisin

olevat PCR-verrokkituotteet tuottavat kuviossa 1(c) PCR:-

llä merkityt nauhat. Huomattakoon, että PCR:llä merkityt

nauhat voivat merkitä joko suuri- tai pienikokoisempia

tuotteita kuin DG:llä merkityn nauhan edustama tuote.

25 Kuviossa 1(c) esitetään kuvioissa 1(a) ja 1(b) esi-

tetyn menetelmän tulos nauhoina, jotka on erotettu agaroo-

sigeelielektroforeesi-ajossa, jolloin kyseessä on esimer-

kiksi geneettisen häiriön aiheuttava pistemutaatio analy-

soituna joko -M- tai -N-diagnoosiprimeriä tarpeen mukaan

30 käyttäen. Jos tutkimuskohteena oleva yksilö on kyseisen

geneettisen häiriön kantaja (C), nauhoja muodostuu sekä

normaaleja nukleotidisekvenssejä (N) käytettäessä että

varianttinukleotidisekvenssiä (M) käytettäessä. Normaalit

homotsygootit (N) tuottavat nauhan normaalia nukleotidi-

35 sekvenssiä käytettäessä, mutta eivät tuota nauhaa [merkit-

ty ()] varianttinukleotidin vaikutuksesta, jolloin vas-

takkaisesti häiriön aiheuttavan mutaation käsittävät homotsygootit [geneettisen häiriön (D) omaavat yksilöt] eivät tuota nauhaa [merkitty ()] normaalin nukleotidisekvenssin vaikutuksesta, mutta tuottavat nauhan varianttinukleotidisekvenssillä käsiteltäessä.

Kuvio 2 havainnollistaa kyseisen keksinnön toista suoritustapausta. Kaksisäikeisen nukleiinihapon kumpaakin säi'että kohden käytetään oma diagnoosiprimerinsä. Kuvion osassa (a) diagnoosiprimerit on suunniteltu ja rakennettu siten, että 3'-pääty nukleotidi komplementoi normaalia nukleotidia. Menetelmä suoritetaan siis kuten kuvattu kuvion 1 yhteydessä, mutta käyttäen oleellisen nukleotidin läsnäollessa kahta erilaista diagnoosiprimeriä vahvistusta käynnistämässä. Näin muodoin tässä suoritustapaossa jälkimmäinen diagnoosiprimeri vastaa kuvion 1 mukaista vahvistusprimeriä (A). Täten kuviossa 2(a) vahvistuksen käynnistävät primerit -N ja N-, mutta eivät varianttinukleotidisekvenssiä (-M ja M-) komplementoivan 3'-pääty nukleotidin käsittävät diagnoosiprimerit. Kuvion 2(b) kohdalla tilanne on vastakkainen, sillä näytteen nukleiinihapposäikeisiin sisältyy varianttisekvenssi. Kuviossa 2 esitetyn menetelmän suorituksesta saadut tulokset voidaan esittää vastaavalla tavalla kuin tulokset on esitetty kuviossa 1(c), mutta viimeainitussa normaalia ja varianttia (N ja M) tarkoittavat merkinnot vastaavat tällöin tällaisten sekvenssien muodostamia pareja. Kuviossa 2 kirjain P merkitsee verrokkeina käytettyjä PCR-primereitä.

Kuvio 3 esittää erään tavan, jolla monilukuiset vahvistustuotteet voidaan erottaa toisistaan, jolloin on mahdollista tutkia yksittäinen RNA- tai DNA-näyte perinnöllisten häiriöiden muodostaman patteriston suhteen. Kuviossa on esitetty kaksi näytteestä saatua (denaturoitua) DNA- tai RNA-säi'että, jotka sisältävät kolme erillistä geenipaikkaa numeroituina 1, 2 ja 3. Näistä geenipaikoista erillisesti sijaitsevaa toista aluetta käytetään PCR-vahvistuksessa verrokin saamiseksi. Geenipaikan 1 osalta käy-

tetään 20-meeridiagnoosiprimeriä (5'-N 3') yhdessä toisen 20-meeridiagnoosiprimerin (3'-N- 5') kanssa. Jos geenipaikassa 1 tapahtuu vahvistuminen, saadaan vahvistustuotteena 39-meerisekvenssi. Koska kuviossa 3'-pääty nukleotidi on normaali samoin kuin tutkittavan näytteen käsittämä oleellinen nukleotidi, tapahtuu vahvistuminen. Samoin tapahtuu vahvistuminen, jos tutkittavan näytteen käsittämä oleellinen nukleotidi on varianttinukleotidi ja diagnoosiprimetit niinikään käsittävät 3'-päädyssään varianttinukleotidin. Kyseistä vahvistusta ei kuitenkaan esiinny, jos näytteen sisältämä oleellinen nukleotidi ja diagnoosiprimerin 3'-pääty nukleotidi ovat keskenään epäsoveluvat. Geenipaikan 2 osalta diagnoosiprimetit on suunniteltu ja rakennettu siten, että vahvistuksen tapahtuessa muodostuu vahvistustuotteena 49-meerisekvenssi, jolloin puolestaan geenipaikan 3 osalta diagnoosiprimetit on siten suunniteltu ja rakennettu, että vahvistuksen tapahtuessa muodostuu vahvistustuotteena 59-meerisekvenssi. Koska edeltävästä ilmenevän mukaisesti vahvistustuotteen nauhakoko on luku, joka saadaan, kun kyseisen kahden diagnoosiprimerin sekvenssikokojen summasta vähennetään yksi, on mahdollista suorittaa yhdestä ja samasta näytteestä useita määrittäyksiä yhdessä ja samassa reaktioastiassa, jos yksittäiset diagnoosiprimetit suunnitellaan ja rakennetaan tarkoituksenmukaisesti karakterisoimaan kutakin kiinnostavaa geenipaikkaa. Diagnoosiprimerien nauhakokojen summan muuttuessa aina suuremmaksi vahvistustuotteet voidaan erottaa esimerkiksi agarosegeeleissä. Parempaan erotukseen voidaan mahdollisesti päästä, jos diagnoosiprimetit on leimattu tai merkitty jollain tavanomaisella tavalla ja erotettu myöhemmin esimerkiksi akryyliamidigeelissä. Kuviossa 3 kirjain P viittaa verrokkeina käytettyihin PCR-primereihin.

Kuviossa 4 esitetään kyseisen keksinnön kolmas suoritustapa, jossa vahvistetaan tavanomaiseen tapaan esimerkiksi tavanomaisia PCR-primereitä käyttäen nukleiinihapposekvenssiä, joka sisältää normaalin nukleotidin ase-

massa, jossa voisi sijaita oletettu varianttinukleotidi. Vastaavasti tapahtuisi tavanomainen vahvistuminen, jos normaalin nukleotidin asemesta läsnä olisi oletettu varianttinukleotidi. Vahvistustuote saatetaan kosketuksiin
 5 diagnoosiprimerin kanssa edellä keksinnön kolmannen suoritusmuodon yhteydessä kuvatun mukaisesti. Vahvistustuotteen käsittäessä edeltävän mukaisesti normaalin nukleotidin sisältävän nukleinihihapposekvenssin ja käytetyn diagnoosiprimerin omatessa 3'-päädyssään normaalin nukleotidin
 10 diagnoosiprimeristä muodostuu laajennustuote [jolloin käytetään tavanomaisella PCR-vahvistuksella muodostettua nukleotidisekvenssiä (johon viitataan tässä PCR-kontrollituotteena)] edellyttäen, että läsnä on tarkoituksenmukaisia nukleosiditrifosfaatteja ja sopiva niitä polymeroiva
 15 aine. Vahvistusprimerin läsnäolo ei ole tarpeen, koska diagnoosiprimerilaajennustuotteen muodostamiseksi tarvittava templaatti on jo vahvistettu. Kuviossa 4(b) DG:llä merkityn diagnoosiprimerilaajennustuotteen läsnäolo tai puuttuminen sekä PCR-verrokkituotteen [joka kuviossa 4(b) on merkitty PCR:llä] läsnäolo voidaan todeta esimerkiksi
 20 elektroforeettisia menettelyitä käyttäen.

Huomattakoon, että diagnoosiprimerilaajennustuote muodostuu myös silloin, kun PCR-verrokkituote sisältää varianttinukleotidin ja käytetty diagnoosiprimeri käsittää
 25 3'-päädyssä komplementoivan varianttinukleotidin.

Saadut tuotenauhat voidaan visualisoida esimerkiksi kuten esitetty kuviossa 4(b). Symbolien N-, M-, C-, N, D, DG ja PCR merkitykset ovat kuten määritelty kuvion 1(c) yhteydessä. Diagnoosiprimerilaajennustuotteen nauhaa vastaava molekyylipaino on kuitenkin alhaisempi kuin PCR-verrokkinauhan [kuviossa 4(b) esitetyn mukaisesti]. Tässä tapuksessa verrokkinauha edustaa todellista sisäistä kontrollia, koska yksi PCR-primereistä toimii vahvistusprimerinä
 30 diagnoosiprimerilaajennustuotteen vahvistamiseksi. PCR-verrokkituotteen sisältäessä varianttinukleotidin samalla, kun diagnoosiprimeri omaa 3'-päädyssä normaalin

nukleotidin, tai esitettyyn nähden vastakkaisessa tilanteessa, laajennustuotetta ei muodostu.

Haluttaessa kyseisen keksinnön kolmas suoritustapa voidaan suorittaa saattamalla tutkittava näyte koetta
 5 aloitettaessa kosketuksiin PCR-primerien ohella diagnoosiprimerin kanssa. Näin ollen diagnoosiprimerin käytön osalta ei ole tarpeen odottaa, kunnes on päästy PCR-verrokkituotteen halutun asteiseen vahvistumiseen. Itse asiassa diagnoosiprimeri voidaan lisätä PCR-primerilisäyksen
 10 yhteydessä tai koska tahansa sen jälkeen. Määritys voidaan näin ollen suorittaa esimerkiksi yksinkertaisesti lisäämällä tutkittava näyte yhteen reaktioastiaan, jossa on valmiiksi PCR-primerit, diagnoosiprimeri, tarkoituksenmukaiset nukleosiditrifosfaatit sekä viimeksi mainittuja polyme-
 15 roiva aine. Saadut tuotteet ja siten myös saadut ja visualisoidut tuotenauhat ovat samat kuin edellä kuvattu sekä esitetty kuviossa 4.

Kuvio 5 esittää kyseisen keksinnön neljättä suoritustapaa, jonka mukaan suoritetaan tavallinen vahvistaminen kuvion 4 yhteydessä kuvatun mukaisesti. Näin saatu vahvistustuote saatetaan sitten hybridointiolosuhteissa kosketuksiin joko (a) edellä määritellyn mukaisesti kahden erillisen diagnoosiprimerin kanssa, joista kummankin 3'-pääty käsittää normaalin nukleotidin, tai (b) edellä määritellyn mukaisesti kahden diagnoosiprimerin kanssa,
 25 joista kummankin 3'-pääty käsittää varianttinukleotidin (katso kuvio 5a). Menetelmän yhden toistokerran tuloksena muodostuneet laajennustuotteet osoittavat, sisältääkö näytenukleiinihappo normaalin nukleotidin vai oletetun varianttinukleotidin, jolloin elektroforeettisia menettelyitä käyttäen saadaan vastaavanlainen nauhakuvio kuin esitetty kuviossa 5(b). Huomattakoon kuitenkin, että käytettäessä kahta diagnoosiprimeriä toinen diagnoosiprimeri toimii jälkimmäisen diagnoosiprimerin vahvistusprimerinä.
 30 Tämän vuoksi haluttaessa mahdollisesti saatua yhtä tai useampaa vahvistustuotetta sinänsä voidaan vahvistaa. Tä-

ten menetelmän usean lisätoistokerran tuloksena muodostuu alhaisemman molekyylipainon omaavia tuotteita, kuten esimerkiksi kuviossa 5(c) ylimääräisenä nauhana esitetyt tuotteet, alkuperäisten PCR-primerioligonukleotidien ja lisättyjen diagnoosiprimerien keskinäisistä määrasuhteista riippuvaisissa määrasuhteissa. PCR-vahvistustuotteet ovat vaikeuksitta erotettavissa diagnoosiprimerilajennustuotteiden vahvistustuotteista esimerkiksi kasvattamalla tai pienentämällä PCR-primerien sitoutumiskohtien genomissa välistä etäisyyttä.

Haluttaessa kyseisen keksinnön neljäs suoritusmuoto voidaan suorittaa saattamalla koetta aloitettaessa tutkittava näyte kosketuksiin PCR-primerien ohella myös diagnoosiprimerien kanssa. Näin ollen diagnoosiprimerin käytön osalta ei ole tarpeen odottaa, kunnes on päästy PCR-verokkituotteen halutun asteiseen vahvistumiseen. Itse asiassa diagnoosiprimeri voidaan lisätä PCR-primerilisäyksen yhteydessä tai koska tahansa sen jälkeen. Määritys voidaan näin ollen suorittaa esimerkiksi yksinkertaisesti lisäämällä tutkittava näyte yhteen reaktioastiaan, jossa on valmiiksi PCR-primerit, diagnoosiprimeri, tarkoituksenmukaiset nukleosiditrifosfaatit sekä viimeksimainittuja polymeeroiva aine. Mikäli määritys suoritetaan mainitulla tavalla muodostuu alhaisemman molekyylipainon omaavia diagnoosituotteita, joihin edellä viitattiin, ja ne tuottavat siten kuviossa 5 esiintyvät ylimääräiset nauhat.

Kuvio 6 esittää (ei oikeassa mittakaavassa) ihmisen α -1-antitrypsiinigeeniä, joka on alalla sangen tunnettu [Long, G.L. et.al., Biochemistry 23 (1984) 4828-4837], jolloin esitetään mm. eksonien III ja V suhteellinen sijainti mainittujen käsittäessä α -1-antitrypsiiniproteiinin mahdollisen S- ja vastaavasti Z-mutaation. Erityisesti kuviossa esitetään α -1-antitrypsiinigeenin eksoni III, sekä S-variantin asema, jossa variantissa kodoni GAA on mutatoitunut GTA:ksi, mistä seuraa valiniinjäännöksen muodostuminen aminohappojäännökseksi 264 glutamiinihappo-

jäännöksen asemesta. Kätevästi voidaan käyttää primeriä I, jonka sekvenssi on:

5' CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG 3' I

5

joka hybridoiduu α -1-antitrypsiinigeenin asemiin 7440-7469, tai sitten primeriä II, jonka sekvenssi on:

5' GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG 3' II

10

tai primeriä IIa (II:een nähden CT-3'-epäsopivuus), jonka sekvenssi on:

5' GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTT 3' IIa

15

joista kumpikin on suunniteltu α -1-antitrypsiinigeenin asemia 7770-7799 varten.

Kuviossa esitetään lisäksi α -1-antitrypsiinigeenin eksoni V, sekä esitetään Z-variantti, jossa kodoni GAG on mutatoitunut AAG:ksi, mistä seuraa lysiinijäännöksen muodostuminen aminohappojäännösasemaan 342 glutamiinihappojäännöksen asemesta. Kätevästi voidaan käyttää primeriä III, jonka sekvenssi on:

25 5' TGTCCACGTGAGCCTTGCTCGAGGCCTGGG 3' III

joka hybridoiduu α -1-antitrypsiinigeenin asemiin 9890-9919, ja primeriä IV, jonka sekvenssi on:

30 5' GAGACTTGGTATTTTGTTCATCATTAAAG 3' IV

joka hybridoiduu α -1-antitrypsiinigeenin asemiin 10081-10109. Edellä käytetty emäsnumerointi on lähteen Biochem. 23 (1984) 4828-4837 mukainen.

35 Kuviossa 7 esitetään tulos, joka saatiin visualisoitaessa esimerkeissä 1 ja 2 saatu geeli. Vyöhyke 1 edus-

taa eksonin V sisältävää plasmidia pilkottuna AluI:llä; vyöhyke 2 esittää kokomerkkiä, joka on bakteriofagi-0/-X174-DNA HaeIII:lla pilkottuna; vyöhyke 3 esittää eksonin III vahvistusta edellä määritellyn mukaisia primereitä I ja II käyttäen ja eksonin V vahvistusta edellä määritellyn mukaisia primereitä III ja IV käyttäen samassa reaktio-seoksessa, jolloin on saatu 360 bp:n ja vastaavasti 220 bp:n tuote. Vyöhyke 4 esittää, ettei eksonin III vahvistumista ole tapahtunut käytettäessä edellä määritellyn mukaisia primereitä I ja IIa, mutta eksonin V vahvistuminen edellä määritellyn mukaisia primereitä III ja IV käyttäen on tapahtunut. Vyöhyke 5 esittää negatiivista verrokkia, jossa läsnä ovat primerit I, II, III ja IV vahvistusta edistävissä olosuhteissa, mutta genomi-DNA:n puutuessa.

Kuviossa 8 esitetään vyöhykkeinä 1-3 esimerkissä 3 saadut tulokset, vyöhykkeinä 5-8 tulokset, jotka saatiin käytettäessä normaaleja diagnoosiprimereitä ja mutantti-diagnoosiprimereitä, joissa esimerkin 4 mukaisesti ei ollut tapahtunut epästabiloitumista, ja vyöhykkeenä 9 kokomerkki bakteriofagi-0/-X174. Vyöhykkeenä 1 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssia:

5'TGGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTT

V

diagnoosiprimerinä ja edellä määritellyn mukaista I:ksi merkittyä oligonukleotidia vahvistusprimerinä. Käytetty ihmisen genomi-DNA oli peräisin normaalista homotsygootista, joka omaa normaalin nukleotidin (A) ihmisen α -1-anti-trypsiinigeenin mahdollisessa S-mutaatiopisteessä. Odotettu 267 bp:n vahvistustuote on selvästi nähtävissä. Vyöhykkeenä 2 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä:

5'TGGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTA

VI

diagnoosiprimerinä ja edellä määritellyn mukaista I:ksi merkittyä oligonukleotidia vahvistusprimerinä. Käytetty ihmisen genomi-DNA oli peräisin normaalista homotsygootista, joka omaa normaalin nukleotidin (A) ihmisen α -1-antitrypsiinigeenin mahdollisessa S-mutaatiopisteessä. A-A-epäsopivuuden läsnäollessa ei muodostu 267 bp:n vahvistustuotetta. Vyöhykkeenä 3 esitetään verrokkinauha, joka saatiin ihmisen apolipoproteiini-B-geenistä, jolloin käytetyt sekvenssit olivat:

10

AATGAATTTATCAGCCAAAACTTTACAGG

XIII

ja

15

CTCTGGGAGCACAGTACGAAAAACCACTT

XIV

Vyöhyke 4 on jätetty tyhjäksi.

Vyöhykkeenä 5 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä

20

5'CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACG 3'

VII

25

diagnoosiprimerinä esimerkissä 4. Diagnoosiprimeri käsitteää 3'-pääty nukleotidin (G), joka kykenee muodostamaan emäsparin normaalin nukleotidin (C) kanssa mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä, ja komplementoi muuten täysin näyte-DNA:ta. Käytetty näyte-DNA oli peräisin normaalista homotsygootista, joka omaa normaalin nukleotidin (C) ihmisen α -1-antitrypsiinigeenin mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä. Vyöhykkeenä 6 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä:

30

5'CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACA 3'

VIII

35

diagnoosiprimerinä esimerkissä 4. Diagnoosiprimeri käsitteää 3'-pääty nukleotidin (A), joka kykenee muodostamaan

emäsparin mutanttinukleotidin (T) kanssa Z-mutaatiopisteessä, mutta komplementoi muuten täysin näyte-DNA:ta. Käytetty näyte-DNA oli peräisin normaalista homotsygootista, joka omaa normaalin nukleotidin (C) ihmisen α -1-antitrypsiinigeenin mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä. Vyöhykkeenä 7 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä kaavan VII mukaista nukleotidisekvenssiä diagnoosiprimerinä esimerkissä 4. Käytetty näyte-DNA oli peräisin ihmisen α -1-antitrypsiinigeenihäiriön käsittävästä homotsygootista, joka omaa mutanttinukleotidin (T) Z-mutaatiopisteessä. Vyöhykkeenä 8 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä kaavan VIII mukaista nukleotidisekvenssiä diagnoosiprimerinä esimerkissä 4. Käytetty näyte-DNA oli peräisin ihmisen α -1-antitrypsiinigeenihäiriön käsittävästä homotsygootista, joka omaa mutanttinukleotidin (T) Z-mutaatiopisteessä. Kokeissa, joiden tulokset on esitetty vyöhykkeinä 5-8, käytettiin kussakin vahvistusprimeriä, jonka nukleotidisekvenssi oli edellä määritellyn kaavan IV mukainen. Voidaan havaita, että 150 bp:n vahvistustuotteen tuotanto ei supressoidu täysin A-C-epäsopivuuden läsnäolon vaikutuksesta (vyöhyke 6) ja supressoitu vielä vähemmän GT-epäsopivuuden läsnäolon vaikutuksesta (vyöhyke 7).

Vyöhykkeenä 9 esitetään tulos, joka saatiin visualisoitaessa esimerkissä 4 saatu geeli. Vyöhykkeinä 1 ja 14 esitetään kokomerkki HaeIII:lla pilkottu bakteriofagi 0/-X174-DNA; vyöhykkeenä 2 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä:

5'CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATAGACG 3'

IX

diagnoosiprimerinä näyte-DNA:ta tutkittaessa, joka omasi normaalin nukleotidin (C) ihmisen α -1-antitrypsiinigeenin mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä (näyte-DNA peräisin normaalista homotsygootista). Diagnoosiprimeri käsittää tarkoituksellisen muutoksen (alleliivattu sekvenssissä IX; C:n asemesta A) viidentenä nukleotidina 3'-päädyistä lu-

kien, mutta 3'-pääty nukleotidin (G), joka kykenee muodostamaan emäsparin mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä sijaitsevan normaalin nukleotidin (C) kanssa. Vyöhykkeenä 3 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä:

5'CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATAGACA 3'

X

diagnoosiprimerinä tutkittaessa näyte-DNA:ta, joka omasi normaalin nukleotidin (C) mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä (näyte-DNA peräisin normaalista homotsygootista). Diagnoosiprimeri käsittää tarkoituksellisen muutoksen (alleliivattu sekvenssissä X; C:n asemesta A) viidentenä nukleotidina 3'-päädyistä lukien, ja 3'-pääty nukleotidin (A), joka kykenee muodostamaan emäsparin mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä sijaitsevan mutanttinukleotidin (T) kanssa; vyöhykkeenä 4 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä IX (edellä määritellyn mukainen sekvenssi) diagnoosiprimerinä tutkittaessa Z-mutaation suhteen heterotsygootista peräisin olevaa näyte-DNA:ta, joka siten käsitti geneettisenä häiriönä ihmisen α -1-antitrypsiinivajauden; vyöhykkeenä 5 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä X (edellä määritellyn mukainen sekvenssi) diagnoosiprimerinä tutkittaessa Z-mutaation suhteen heterotsygootista peräisin olevaa näyte-DNA:ta, joka siten käsitti geneettisenä häiriönä ihmisen α -1-antitrypsiinivajauden; vyöhykkeenä 6 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä IX (edellä määritellyn mukainen sekvenssi) diagnoosiprimerinä tutkittaessa homotsygootista peräisin olevaa näyte-DNA:ta, joka käsitti geneettisenä häiriönä ihmisen α -1-antitrypsiinivajauden; vyöhykkeenä 7 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä X (edellä määritellyn mukainen sekvenssi) diagnoosiprimerinä tutkittaessa homotsygootista peräisin olevaa näyte-DNA:ta, joka käsitti geneettisenä häiriönä ihmisen α -1-antitrypsiinivajauden.

Vyöhykkeenä 8 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssia:

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGCCG 3'

XI

5

diagnoosiprimerinä tutkittaessa näyte-DNA:ta, joka omasi normaalin nukleotidin (C) ihmisen α -1-antitrypsiinigeenin mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä (näyte-DNA peräisin normaalista homotsygootista). Diagnoosiprimeri käsittää tar-

10 koituksellisen muutoksen (alleliivattu sekvenssissä XI; A:n asemesta C) kolmantena nukleotidina 3'-päädyistä lukien, mutta 3'-päädynukleotidin (G), joka kykenee muodostamaan emäsparin mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä sijaitsevan normaalin nukleotidin (C) kanssa; vyöhykkeenä 9 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä:

15

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGCCA 3'

XII

20 diagnoosiprimerinä tutkittaessa näyte-DNA:ta, joka omasi normaalin nukleotidin (C) mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä (näyte-DNA peräisin normaalista homotsygootista). Diagnoosiprimeri käsittää tarkoituksellisen muutoksen (alleliivattu sekvenssissä XII; A:n asemesta C) kolmantena nukleotidina 3'-päädyistä lukien, ja 3'-päädynukleotidin (A),

25 joka kykenee muodostamaan emäsparin mahdollisessa Z-mutaatiopisteessä sijaitsevan mutanttinukleotidin (T) kanssa; vyöhykkeenä 10 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä XI (edellä määritellyn mukainen sekvenssi)

30 (diagnoosiprimerinä tutkittaessa Z-mutaation suhteen heterotsygootista peräisin olevaa näyte-DNA:ta, joka siten käsitti geneettisenä häiriönä ihmisen α -1-antitrypsiinivajauden; vyöhykkeenä 11 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä XII (edellä määritellyn mukainen sekvenssi))

35 diagnoosiprimerinä tutkittaessa Z-mutaation suhteen heterotsygootista peräisin olevaa näy-

te-DNA:ta, joka siten käsitti geneettisenä häiriönä ihmisen α -1-antitrypsiinivajauden. Vyöhykkeenä 12 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä XI (edellä määritellyn mukainen sekvenssi) diagnoosiprimerinä

5 tutkittaessa homotsygootista peräisin olevaa näyte-DNA:ta, joka käsitti geneettisenä häiriönä ihmisen α -1-antitrypsiinivajauden. Vyöhykkeenä 13 esitetään tulos, joka saatiin käyttämällä nukleotidisekvenssiä XII (edellä määritellyn mukainen sekvenssi) diagnoosiprimerinä

10 taessa homotsygootista peräisin olevaa näyte-DNA:ta, joka käsitti geneettisenä häiriönä ihmisen α -1-antitrypsiinivajauden.

Vyöhykkeinä 2-13 esitettyjä tuloksia muodostettaessa käytettiin kussakin tapauksessa kaavan IV mukaista nukleotidisekvenssiä vahvistusprimerinä, jolloin verrokkina käytettiin nukleotidisekvenssejä, joiden kaavat olivat

15 XIII:

AATGAATTTATCAGCCAAAACCTTTTACAGG XIII

20

CTCTGGGAGCACAGTACGAAAAACCACTT XIV.

25 Verrokkia vastaavat nauhat on kuviossa 9 merkitty C:llä ja ne edustavat 510 bp:n vahvistustuotetta ihmisen apoliipoproteiini-B-geenin eksonista 26.

Kuviossa 10 esitellään kasettiplasmidijärjestelmän käyttöä. Plasmidia pAT153, joka käsittää antibioottiresistenssin ampisilliinille (Ap^R) ja tetrasykliinille (Tc^R) tuottavat alueet sekä EcoRI-, BamHI- ja Sali-restriktio-

30 keskukset, pilkotaan EcoRI:llä ja BamHI:llä. Synteettinen kasetti, joka käsittää epäsojivan nukleotidin (keskellä) sisältävän DNA-dupleksin sekä normaalin sekvenssin että

35 varianttisekvenssin samanaikaisen läsnäolon johdosta, ligatoidaan T4-DNA-ligaasia käyttäen plasmidi-isäntään esi-

tetyn mukaisesti. Sitten plasmidi replikoidaan ja replikoitumistuotteet seulotaan esitetyn mukaisesti.

Järjestelmää selostetaan yksityiskohtaisemmin seuraavasti: valmistettiin synteettisiä DNA-kasetteja, joista
 5 kukin sisälsi kaksi EcoRI- ja BamHI-restriktiopäädyt käsittävää toisiinsa juotettua 65-meerisekvenssiä, keskimäisen emäsparin ollessa varianttinukleotidin läsnäolosta johtuen epäsopeva. Nämä kasetit vietiin pAT153-plasmidi-
 isäntiin edellä kuvatun mukaisesti, minkä jälkeen suori-
 10 tettiin transformointi, tetrasykliinille herkät kloonit eristettiin ja niistä uutettiin plasmidi-DNA. Saaduilla plasmidiuutteilla suoritettiin sitten sekundaaritransformointi kloonien saamiseksi, jotka sisältäisivät joko normaalin insertin tai variantti-insertin. Sen varmistamiseksi,
 15 että kloonit sisälsivät joko täydellisen normaalisekvenssin tai täydellisen mutanttisekvenssin, noin 2 µg:tä kutakin denaturoitiin natriumhydroksilla ja sekvensoitiin sitten käyttäen T4-DNA-polymeraasia (Sequenase, US Biochemicals) ja ³²P-päätyleimattua primeriä. Kun oli löydetty
 20 ainakin yksi kumpaakin tyyppiä edustava, joko normaali- tai varianttimuoto, kummankin tyyppin edustavaa yksilöä lisäännytettiin runsaasti, plasmidi-DNA uutettiin eroon ja puhdistettiin käyttäen seesiumkloridigradienttia. Sitten kasetteja pilkottiin SalI:llä, suoritettiin fenoli-
 25 liuos/kloroformiuutto, saostettiin DNA ja pestiin se 70-%:isella etanolilla. Tällöin kasetit olivat valmiita käytettäväksi, esimerkiksi polymeraasiketjureaktioissa eri oligonukleotidien herkkyyden ja spesifisyyden määrittämiseksi.

30 Kuviossa 11 havainnollistetaan keksinnön viidettä suoritustapaa (lineaarinen vahvistaminen). Kuvio-osassa a) esitetään normaaligenomista peräisin oleva DNA-sekvenssi sekä kaksi diagnoosiprimiä, joista toinen komplementoi 3'-päädyssään normaaligenomista peräisin olevaa DNA-
 35 sekvenssiä jälkimmäisen omatessa 3'-päädyssään oletettua varianttinukleotidia komplementoivan nukleotidin. Kuvio-

osassa b) esitetään variantin käsittävästä genomista peräisin oleva DNA-sekvenssi sekä samat kaksi diagnoosiprimeriä. Saatettaessa kumpi tahansa genomi-DNA-sekvenssi kosketuksiin kyseisten primerien kanssa komplementoivan hybridisaation sallivissa olosuhteissa tapahtuu hybridisaatio molemmissa tapauksissa. Kaikkien neljän nukleosiditri-fosfaatin lisääminen primerilaajennuksen sallivissa olosuhteissa johtaa laajennustuotteeseen tapauksessa a) vain normaalisekvenssin omaavasta primeristä ja tapauksessa b) vain varianttisekvenssiprimeristä, jolloin esiintyvä epäsovivuus estää kummassakin tapauksessa laajennustuotteen muodostumisen toisesta primeristä. Lisäksi, kuten esitetty kuvio-osassa c), lisättäessä neljän asemesta vain kolme, tai alle kolme, tarkoituksenmukaista nukleosiditri-fosfaattia laajennustuotteen muodostus muutoin sopivasta primeristä pysähtyy tietyssä vaiheessa (yhden tai useamman) tarkoituksenmukaisen nukleosiditri-fosfaatin puuttuessa.

Kuviossa 8 esitetään tulokset, jotka saatiin visua-lisoitaessa esimerkissä 5 saatu geeli.

Vyöhykkeet 1 ja 2 vastaavat normaalista homotsygootista (MM) peräisin olevaa DNA:ta, vyöhykkeet 3 ja 4 heterotsygootista (MS) peräisin olevaa DNA:ta ja vyöhykkeet 5 ja 6 varianttihomotsygootti- (SS) DNA:ta. Vyöhykkeet 1, 3 ja 5 antaneita tuloksia muodostettaessa käytettiin oligonukleotidia XXII (normaali), ja vyöhykkeet 2, 4 ja 6 antaneita tuloksia muodostettaessa käytettiin oligonukleotidia XXI (variantti). Kuten oli ennustettavissa oligonukleotidilaajennusta ei tapahtunut vyöhykkeitä 2 ja 5 vastaavissa kokeissa. Todetut tuotenauhat on merkitty nuolimerkein.

Kuviossa 13 esitetään tulokset, jotka saatiin visua-lisoitaessa esimerkissä 6 saatu geeli.

Äärimmäisenä vasemmalla oleva vyöhyke esittää kokomerkkejä, joita käytettiin saatujen tuotteiden koon varmistamiseksi. Vyöhykkeet 1 ja 2 vastaavat normaalista ho-

motsygootista (MM) peräisin olevaa DNA:ta, vyöhykkeet 3 ja 4 heterotsygootista (MZ) peräisin olevaa DNA:ta ja vyöhykkeet 5 ja 6 varianttihomotsygootista (ZZ) peräisin olevaa DNA:ta. Vyöhykkeet 1, 3 ja 5 antaneita tuloksia muodostettaessa käytettiin primereitä XIX ja XI; vyöhykkeet 2, 4 ja 6 antaneita tuloksia muodostettaessa käytettiin primereitä XII ja XX. Kuten oli ennustettavissa oligonukleotidilajennusta ei tapahtunut vyöhykkeitä 2 ja 5 vastaavissa kokeissa. Todetut tuotenauhat on merkitty nuolimerkein.

A α -1-antitrypsiini-S-geenipaikan (eksoni III) sekvenssi

Pienemmällä kirjasinlajilla esitetyt emäkset edustavat kyseisen geenipaikan normaalisekvenssiä. Primerisekvensseissä alleviivatut emäkset osoittavat primerien epästabiloimiseksi tarkoituksellisesti insertoidun epäsopivuuden. Koordinaatit on esitetty Longin et.al., Biochemistry 23 (1984) 4828-4837, mukaan.

20 5' GCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGT XXI
5' GCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGA XXII

5' CTTCCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGa
3' GAAGGACGGACTACTCCCCTTTGATGTCGTGGACct
25 I
7642

7718

30 I
aAAATGAACTACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAA 3'
tTTTACTTGAGTGGGTGCTATAGTAGTGGTTCAAGGACCTTT 5'
TTTTACTTGAGTGGGTGCTATAGTAGTGGT 5' XXIII
35 ATTTACTTGAGTGGGTGCTATAGTAGTGGT 5' XXIV

CACACCTCTTAGCCATGTTGGGACTGAGGCCCATCAGGACTGGC 3'

GTGTGGAGAATCGGTACAACCCTGACTCCGGGTAGTCCTGACCG 5'

7811

5

GTGGAGAATCGGTACAACCCTGACTCCGGG 5'

TTGGAGAATCGGTACAACCCTGACTCCGGG 5'

10

venssi

α -1-antitrypsiini-Z-geenipaikan (eksoni V) sek-

Pienemmällä kirjasinlaajalla esitetyt emäkset edustavat kyseisen geenipaikan normaalisekvenssiä. Primerisekvensseissä alleviivatut emäkset osoittavat primerien epästabiloimiseksi tarkoituksellisesti insertoidun epäsopivuuden.

15

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCCTCGACA XVI

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCCTCGACG XV

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATAGACA X

20

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATAGACG IX

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGCCA XII

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGCCG XI

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACA VIII

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACG VII

25

5' TCCAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACg

3' AGGTCCGGCACGTATTCGACACGACTGGTAGCTGc

9954

30

10030

gAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTAGAGGCC 3'

cTCTTTCCTGACTTCGACGACCCCGGTACAAAAATCTCCGG 5'

35

CTCTTTCCCTGACTTCGACGACCCCGGTAC 5' XVII
 TTCTTTCCCTGACTTCGACGACCCCGGTAC 5' XVIII
 CTCATTCCCTGACTTCGACGACCCCGGTAC 5' XIX
 TTCATTCCCTGACTTCGACGACCCCGGTAC 5' XX

5

Seuraavat esimerkit havainnollistavat kyseistä keksintöä sitä rajoittamatta. Ellei toisin mainittu esimerkeissä on käytetty eri materiaaleja seuraavat määrät tai

10 pitoisuudet:

substraatti-DNA: 1 µg ihmisen genomi-DNA:ta;

oligonukleotidit: 100 pmol kutakin tarkoituksenmukaista oligonukleotidia;

15 deoksinukleosiditrifosfaatit: kutakin 1,5 mM loppupitoisuutena;

puskuri (loppupitoisuus reaktioseoksessa):

67 mM Tris (pH 8,8 /HCl)

16,6 mM ammoniumsulfaatti

6,7 mM magnesiumkloridi

20 10 mM β-merkaptetoetanol

6,7 µM EDTA

panostuspuskuri:

35 % Ficoll 70 (Ficoll 70 on synteettinen polymeeri, joka on valmistettu kopolymeroimalla sakkaroosia ja epikloorihydriiniä; kopolymerin keskimääräinen molekyylipaino on 70 000; valmistaja Pharmacia)

25

200 mM Tris-asetaatti

100 mM natriumasetaatti

5 mM EDTA

30 0,2 % bromifenolisininenkokomerkit: bakteriofagi-0/-X174-DNA, jota pilkottu HaeIII:lla; nauhakoot emäspareina ovat: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 ja 72.

Esimerkki 1

35 1 µg ihmisen genomi-DNA:ta, 100 pmol kutakin edellä määritellyn mukaista oligonukleotidia I, II, III ja IV,

- 1,5 mM:n loppupitoisuus kutakin neljää deoksinukleosidi-
trifosfaattia sekä puskuria, joka käsitti edellä esitetyn
mukaiset loppupitoisuusdet, sekoitettiin keskenään kier-
rekorkilla varustetussa 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkessa,
5 minkä jälkeen tilavuus säädettiin 100 µl:ksi lisäämällä
steriloitua tislattua vettä. Putki suljettiin, minkä jäl-
keen se sijoitettiin kiehuvaan vesihauteeseen 5 minuutik-
si. Reaktio käynnistettiin lisäämällä 1 µl Taq-polymera-
sia yhtä entsyymiyksikköä vastaava määrä (Anglian Biotech
10 -erä 3, jota laimennettiin edellä esitetyllä puskurilla
pitoisuuteen 1 yksikkö/µl). Putken sisältöä inkuboitiin
58°C:ssa 4 minuutin ajan ja sitten 91°C:ssa 2 minuutin
ajan. Putken sisältö jäähdytettiin, minkä jälkeen 58°C/-
91°C-kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 5
15 kertaa, minkä jälkeen lisättiin vielä 1 yksikkö entsyymiä
(kuten edellä). Putken sisältö jäähdytettiin, minkä jäl-
keen 58°C/91°C-kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin
vielä 6 kertaa, minkä jälkeen lisättiin vielä 1 yksikkö
entsyymiä (kuten edellä). Putken sisältö jäähdytettiin,
20 minkä jälkeen edeltävä kuumennus/jäähdytys-menettely
toistettiin vielä 6 kertaa, minkä jälkeen putken sisältö
jäähdytettiin, lisättiin vielä 1 yksikkö entsyymiä (kuten
edellä) ja kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä
5 kertaa, putken sisältö jäähdytettiin ja lisättiin vielä
25 1 yksikkö entsyymiä (kuten edellä), minkä jälkeen kuume-
nus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 2 kertaa, putken
sisältö jäähdytettiin ja lisättiin vielä 1 yksikkö entsyy-
miä (kuten edellä). Kun edeltävä oli suoritettu, inkuboi-
ttiin 58°C:ssa 20 minuutin ajan.
- 30 Vahvistustuotteet todettiin yhdistämällä 15 µl
edeltävää reaktioseosta ja erillinen 5 µl:n erä geelipa-
nostuspuskuria keskenään ja suorittamalla elektroforeesi-
ajo agarosigeelissä (3-%-nen NuSieve-tuote), joka sisälsi
etidumbromidia (2 µg/ml). Elektroforeesi-ajo suoritettiin
35 kokomerkkien läsnäollessa, jotta voitiin varmistua vahvis-
tustuotteiden halutun mukaisesta koosta. Geeli visualisoi-

tiin läpivalaisulaitteessa (300 nm:n aallonpituus) ja otettiin polaroid-valokuva. Tämän visualisoinnin tulos on esitetty kuvion 7 vyöhykkeenä 3. Täten vyöhykkeessä 3 nähdään eksonin III vahvistuminen edellä määritellyn mukaisilla primereillä I ja II, jolloin on muodostunut 360 bp:n tuote, sekä eksonin V vahvistuminen edellä määritellyn mukaisilla primereillä III ja IV, jolloin on muodostunut 220 bp:n tuote.

Esimerkki 2

10 Toistettiin esimerkki 1, jolloin kuitenkin primeri II korvattiin edellä määritellyn mukaisella primerillä IIa. Tulos, joka saatiin visualisoitaessa tässä esimerkissä saatu geeli, on esitetty kuvion 7 vyöhykkeenä 4. Voidaan todeta, että eksonista III ei ole muodostunut vahvistustuotetta käytettäessä edellä määritellyn mukaisia primereitä I ja IIa, mutta että eksoni V on vahvistunut edellä määritellyn mukaisilla primereillä III ja IV, jolloin on muodostunut sama 220 bp:n vahvistustuote kuin esimerkissä 1.

20 Esimerkin 2 tulos osoittaa täten, että epäsopivuus oligonukleotidiprimerin 3'-päädyssä estää polymeraasiaktiivisuuden käynnistymisen tai ainakin oleellisesti inhiboi sitä.

Esimerkki 3

25 Ihmisen α -1-antitrypsiinin S-alleeli

1 μ g ihmisen genomi-DNA:ta, 100 pmol kutakin alla määritellyn mukaista oligonukleotidia, 1,5 mM:n loppupitoisuus kutakin neljää deoksinukleosiditrifosfaattia sekä puskuria, joka käsitti edellä esitetyn mukaiset loppupitoisuusdet, sekoitettiin keskenään kierrekorkilla varustetussa 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkessa, minkä jälkeen tilavuus säädettiin 100 μ l:ksi lisäämällä steriloitua tislattua vettä. Putki suljettiin, minkä jälkeen se sijoitettiin kiehuvaan vesihauteeseen 5 minuutiksi. Reaktio käynnistettiin lisäämällä 1 μ l Taq-polymeraasia yhtä entsyymiyksikköä vastaava määrä (Anglian Biotech -erä 3, jota lai-

- mennettiin edellä esitetyllä puskurilla pitoisuuteen 1 yksikkö/ μ l). Putken sisältöä inkuboitiin 58°C:ssa 4 minuutin ajan ja sitten 91°C:ssa 2 minuutin ajan. Putken sisältö jäähdytettiin, minkä jälkeen 58°C/91°C-kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 5 kertaa, minkä jälkeen lisättiin vielä 1 yksikkö entsyymiä (kuten edellä). Putken sisältö jäähdytettiin, minkä jälkeen 58°C/91°C-kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 6 kertaa, minkä jälkeen lisättiin vielä 1 yksikkö entsyymiä (kuten edellä).
- 10 Putken sisältö jäähdytettiin, minkä jälkeen edeltävä kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 6 kertaa, minkä jälkeen putken sisältö jäähdytettiin, lisättiin vielä 1 yksikkö entsyymiä (kuten edellä) ja kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 5 kertaa, putken sisältö
- 15 jäähdytettiin ja lisättiin vielä 1 yksikkö entsyymiä (kuten edellä), minkä jälkeen kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 2 kertaa, putken sisältö jäähdytettiin ja lisättiin vielä 1 yksikkö entsyymiä (kuten edellä). Kun edeltävä oli suoritettu, inkuboitiin 58°C:ssa 20 minuutin
- 20 ajan.

Edeltävän menettelyprotokollan mukaan suoritettiin seuraavat kokeet:

a) käytetyt oligonukleotidit olivat

25 5'TGGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTT V

sekä edellä määritellyn mukainen, I:ksi nimetty oligonukleotidi. Käytetty ihmisen genomi-DNA oli peräisin normaalista homotsygootista, joka ei käsittänyt ihmisen α -1-antirypsiini-geenihäiriötä; ja

30

b) käytetyt oligonukleotidit olivat

TGGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTA VI

35 sekä edellä määritellyn mukainen, I:ksi nimetty oligonukleotidi. Käytetty ihmisen genomi-DNA oli peräisin normaali-

lista homotsygootista, joka ei käsittänyt ihmisen α -1-antirypsiini-geenihäiriötä.

Vahvistustuotteet todettiin yhdistämällä 15 μ l edeltävää reaktioseosta ja erillinen 5 μ l:n erä geelipainostuspuskuria keskenään ja suorittamalla elektroforeesi-
 5 ajo agarosigeelissä (3-%-nen NuSieve-tuote), joka sisälsi etidiumbromidia (2 μ g/ml). Elektroforeesi-ajo suoritettiin kokomerkkien (kuvion 8 vyöhyke 9) läsnäollessa, jotta voitiin varmistua vahvistustuotteiden halutun mukaisesta
 10 koosta. Geeli visualisoitiin läpivalaisulaitteessa (300 nm:n aallonpituus) ja otettiin polaroid-valokuva. Tämän visualisoinnin tulos on esitetty kuvion 8 vyöhykkeinä 1 ja 2. Täten vyöhykkeestä 1 nähdään, että vahvistuminen tapahtuu käytettäessä kaavan V mukaista nukleotidisekvenssiä,
 15 joka käsittää vastaavaa nukleotidia näyte-DNA:n mahdollisessa S-mutaatiopisteessä komplementoivan 3'-pääty-nukleotidin, ja saadaan 267 bp:n vahvistustuote. Vyöhykkeestä 2 nähdään, että vahvistumista ei tapahdu, jos diagnoosiprimerin 3'-päätyyn muodostuu epäsopivuus, jolloin
 20 tässä tapauksessa käytetty diagnoosiprimeri käsittää 3'-päätynään nukleotidin (A), joka on epäsopiva normaalista homotsygootista peräisin olevan näyte-DNA:n mahdollisen S-mutaatiopisteen nukleotidiin (A) nähden.

Esimerkki 4

Z-Alleeli

25 1 μ g ihmisen genomi-DNA:ta, 100 pmol kutakin alla määritellyn mukaista oligonukleotidia, 1,5 mM:n loppupitoisuus kutakin neljää deoksinukleosiditrifosfaattia sekä puskuria, joka käsitti edellä esitetyn mukaiset loppupitoisuusdet,
 30 sekoitettiin keskenään kierrekorkilla varustetussa 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkessa, minkä jälkeen tilavuus säädettiin 100 μ l:ksi lisäämällä steriloitua tislattua vettä. Putki suljettiin, minkä jälkeen se sijoitettiin kiehuvaan vesihauteeseen 5 minuutiksi. Reaktio käynnistettiin lisäämällä 1 μ l Taq-polymeraasia yhtä entsyymi-
 35 yksikköä vastaava määrä (Anglian Biotech -erä 9, jota lai-

mennettiin edellä esitetyllä puskurilla pitoisuuteen 0,5 yksikköä/ μ l). Putken sisältöä inkuboitiin 60°C:ssa 4 minuutin ajan ja sitten 91°C:ssa 2 minuutin ajan. Putken sisältö jäähdytettiin, minkä jälkeen 60°C/91°C-kuumennus/-

5 jäähdytys-menettely toistettiin vielä 5 kertaa, minkä jälkeen lisättiin vielä 0,5 yksikköä entsyymiä (kuten edellä). Putken sisältö jäähdytettiin, minkä jälkeen 60°C/-91°C-kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 6 kertaa, minkä jälkeen lisättiin vielä 0,5 yksikköä entsyymiä (kuten edellä). Putken sisältö jäähdytettiin, minkä

10 jälkeen edeltävä kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 6 kertaa, minkä jälkeen putken sisältö jäähdytettiin, lisättiin vielä 0,5 yksikköä entsyymiä (kuten edellä) ja kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 5

15 kertaa, putken sisältö jäähdytettiin ja lisättiin vielä 0,5 yksikköä entsyymiä (kuten edellä), minkä jälkeen kuumennus/jäähdytys-menettely toistettiin vielä 3 kertaa, putken sisältö jäähdytettiin ja lisättiin vielä 0,5 yksikköä entsyymiä (kuten edellä). Kun edeltävä oli suoritettu,

20 inkuboitiin 60°C:ssa 20 minuutin ajan.

Seuraavat kokeet suoritettiin edeltävän menettelyprotokollan mukaan:

a) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja IX ja IV sekä normaalista homotsygootista peräisin olevaa ihmisen genomi-DNA:ta, joka ei käsittänyt ihmisen α -1-antitrypsiinigeenihäiriötä;

25

b) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja X ja IV sekä normaalista homotsygootista peräisin olevaa ihmisen genomi-DNA:ta, joka ei käsittänyt ihmisen α -1-antitrypsiinigeenihäiriötä;

30

c) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja IX ja IV sekä ihmisen genomi-DNA:ta, joka oli peräisin ihmisen α -1-antitrypsiini-Z-alleelin käsittävästä heterotsygootista;

d) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja X ja IV sekä ihmisen genomi-DNA:ta, joka oli

35

peräisin ihmisen α -1-antitrypsiini-Z-alleelin käsittävästä heterotsygootista;

e) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja IX ja IV sekä ihmisen genomi-DNA:ta, joka oli peräisin α -1-antitrypsiinigeenihäiriön käsittävästä homotsygootista (ZZ);

f) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja X ja IV sekä ihmisen genomi-DNA:ta, joka oli peräisin α -1-antitrypsiinigeenihäiriön käsittävästä homotsygootista (ZZ);

g) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja XI ja IV sekä ihmisen genomi-DNA:ta, joka oli peräisin normaalista homotsygootista, joka ei käsittänyt ihmisen α -1-antitrypsiinigeenihäiriötä;

h) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja XII ja IV sekä ihmisen genomi-DNA:ta, joka oli peräisin normaalista homotsygootista, joka ei käsittänyt ihmisen α -1-antitrypsiinigeenihäiriötä;

i) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja XI ja IV sekä ihmisen genomi-DNA:ta, joka oli peräisin ihmisen α -1-antitrypsiini-Z-alleelin käsittävästä heterotsygootista;

j) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja XII ja IV sekä ihmisen genomi-DNA:ta, joka oli peräisin ihmisen α -1-antitrypsiini-Z-alleelin käsittävästä heterotsygootista;

k) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja XI ja IV sekä ihmisen genomi-DNA:ta, joka oli peräisin α -1-antitrypsiinigeenihäiriön käsittävästä homotsygootista (ZZ);

l) käytettiin edellä määritellyn mukaisia oligonukleotideja XII ja IV sekä ihmisen genomi-DNA:ta, joka oli peräisin α -1-antitrypsiinigeenihäiriön käsittävästä homotsygootista (ZZ);

Kussakin kokeessa käytettiin vahvistusverrokkeina kaavojen XIII ja XIV mukaisia nukleotidisekvenssejä.

Vahvistustuotteet todettiin yhdistämällä 15 µl kutakin reaktioseosta ja erillinen 5 µl:n erä geelipanos-

tuspuskuria keskenään ja suorittamalla elektroforeesi-ajo

1,4-%:isessa agarosigeelissä, joka sisälsi etidiumbromi-

5 dia (0,5 µg/ml). Elektroforeesi-ajo suoritettiin edellä

määritellyn mukaisten kokomerkkien läsnäollessa, jotta

voitiin varmistua vahvistustuotteiden halutun mukaisesta

koosta. Geeli visualisoitiin läpivalaisulaitteessa (300

nm:n aallonpituus) ja otettiin polaroid-valokuva. Tämän

10 visualisoinnin tulos on esitetty kuvion 9 vyöhykkeinä 2-13

vyöhykkeiden 1 ja 14 edustaessa kokomerkkien antamia nau-

hoja. Täten vyöhykkeistä 2-7 nähdään, että diagnoosipri-

merin epästabilisointi muuttamalla 5. nukleotidia 3'-päädy-

tä lukien ei täysin riitä tekemään primeristä kelvollista

15 erottamaan normaali- ja mutantti-DNA-näyte toisistaan käy-

tetyissä reaktio-olosuhteissa. Vyöhykkeistä 8-13 nähdään

kuitenkin, että muuttamalla diagnoosiprimerin 3. nukleoti-

dia 3'-päädytystä lukien primeri saadaan erottamaan normaali-

li- ja mutantti-DNA-näyte toisistaan, jolloin sitä voidaan

20 käyttää diagnosoitaessa normaaleja homotsygootteja, hete-

rotsygootteja (kantajia) tai ihmisen α -1-antitrypsiinige-

nihäiriön käsittäviä ZZ-homotsygootteja.

Tämän esimerkin edellä selostetut kokeet suoritettiin myös käyttäen diagnoosiprimiä, jossa ei ollut suor-

25 ritettu ylimääräisiä epästabiloivia nukleotidimuutoksia,

jolloin 7. nukleotidia 3'-päädytystä lukien oli muutettu (A

C:ksi) epästabiilisuuden aikaansaamiseksi. Missään koe-

muunnoksessa diagnoosiprimeri ei ollut täysin kelvollinen

erottamaan normaali- ja mutantti-DNA-näytettä toisistaan,

30 mikä asiaintila ilmenee kuvioista 8, vyöhykkeet 5-8 ja joh-

tuu siitä, että diagnoosiprimeri ei käsittänyt ylimääräi-

siä nukleotidimuutoksia.

Esimerkki 5

Primereinä käytettiin oligonukleotideja XXII (nor-

35 maali) ja XXI (variantti). Tässä esimerkissä dNTP-seosta

A + G + T käyttämällä saadaan 7 emäsparilla laajentunut

primeri, kunnes tarvittaisiin C-nukleotiditriposfaattia. Näiden oligonukleotidien sulamispisteeksi (T_m) laskettiin 94°C kaavasta $T_m = 4(G+C)$ ja $2(A+T)$, mutta tämän arvellaan pätevän vain oligonukleotideille 23-meerisekvenssiin asti, joten T_m -arvoksi valittiin edullisesti 75°C .

Oligonukleotidien (8 pmol kutakin) 5'-päädyn hydroksyyli-ryhmä leimattiin käyttäen $d^{32}\text{P}$ -ATP:tä (Amersham, 2 μCi) T4-polynukleotidikinaasia (4 yksikköä) sekä 80 μl reaktiotilavuutta, joka käsitti pitoisuudet 5 mM Tris·Cl, pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 100 μM spermiidiini ja 100 μM EDTA. Kinaasireaktio suoritettiin 37°C :ssa 20 minuuttia kestävänä, minkä jälkeen oligonukleotidileimauksen onnistuminen tarkastettiin suorittamalla elektroforeesi-ajo 15-%:isessa polyakryyliamidi-denaturointigeelissä/8 M urea (esiajo 1 tunti, 500 V, pääajo 4 tuntia, 800 V).

Käytettiin kahta plasmidia, joista toinen sisälsi ihmisen α -1-antitrypsiinigeenin III-eksonin S-geenipaikassa normaalin sekvenssin (MM) ja jälkimmäinen varianttihomotsygoottia (SS) vastaavan varianttisekvenssin. Valmistettiin 6 koeputkea, joista jokaisen sisältö vastasi yhtä kyseeseen tulevaa DNA-tyyppiä. Homotsygoottityypeille käytettiin 1 fmol tarkoituksenmukaista plasmidia, kun taas heterotsygooteille käytettiin 0,5 fmol kutakin kahta plasmidia. Kuhunkin koeputkeen muodostettiin 200-kertainen ylimäärä leimattua oligonukleotidia lisäämällä 200 fmol (2 μl leimattua liuosta) joko normaali- (XXII-) tai variantti- (XXI-) oligonukleotidia kunkin DNA-tyypin kohdalla. Kukin koeputki sisälsi tarvittavia 3 dNTP:tä, A:tä, G:tä ja T:tä (Pharmacia) kunkin loppupitoisuutena 5 mM kohti kutakin 20 μl :n reaktiotilavuutta, joka käsitti pitoisuudet 6,7 mM EDTA, 6,7 mM MgCl_2 , 67 mM Tris·HCl, pH 8,8, 10 mM merkaptotaanoli ja 16,6 mM ammoniumsulfaatti. Reaktiotilavuudet kolminkertaistettiin, eli olivat 60 μl , kussakin kokeessa haihtumisvaikutuksien vähentämiseksi. Koeputkien sisältöä keitettiin 5 minuutin ajan, minkä jälkeen putkia pidettiin jäissä ja kuhunkin putkeen lisättiin

3 yksikköä Taq-polymeraasia (Cetus laimennettuna 1:5 liuoksella 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8,3, ja 0,01 % gelatiinia, jolloin saadaan pitoisuus 1 yksikkö/ μ l). Putkien sisältöä pyöritettiin 13 000 kierr./min kierrosnopeudella 2 minuutin ajan, minkä jälkeen 2 μ l:n näyte-erä lisättiin 5 μ l:aan formamidi/bromifenolisininen-liuosta. Sitten putket sijoitettiin 75°C:seen vesihauteeseen. Kun oli kulunut neljä tuntia, putket poistettiin vesihauhteesta, niitä pyöritettiin 1 minuutin ajan 13 000 kierr./min kierrosnopeudella ja otettiin toinen 2 μ l:n erä, joka lisättiin 5 μ l:aan väriliuosta. Sitten putket siirrettiin takaisin vesihauteeseen 75°C:seen. Kuuden tunnin kuluttua putket poistettiin jälleen vesihauhteesta, kuhunkin lisättiin edelleen 3 yksikköä Taq-polymeraasia, sentrifugoitiin 15 minuutin ajan 13 000 kierr./min kierrosnopeudella sekä lisättiin pisara kevyttä mineraaliöljyä (Sigma) haihtumisen vähentämiseksi, mutta ei otettu näyte-eriä. Sitten putket jätettiin 75°C:seen yön ajaksi. Kun oli kulunut 24 tuntia laskettuna ensimmäisestä sentrifugoinnista, putket 20 poistettiin vesihauhteesta, sentrifugoitiin minuutin ajan sekä otettiin ja lisättiin viimeiset 2 μ l:n näyte-erät 5 μ l:n väriliuoseriin. Kaikille näyte-erille suoritettiin elektroforeesi-ajo 15-%:isessa denaturointipolyakryyliamidigeelissä, jolle oli suoritettu esiajo (1 tunti, 500 25 V), käyttäen ajoliuoksena liuosta, jossa oli 8 M ureaa 1 x TBE-puskurissa (0,089 M Tris-boraatti, 0,089 M boorihappo, 0,002 M EDTA), jolloin ajoaika oli 5,5 tuntia ja jännite 880 V. Sitten geeleistä otettiin autoradiokuvat valottaen yön yli huoneen lämpötilassa ja käyttäen hidasta 30 valokuvausfilmiä ilman suotimia. Tulokset on esitetty kuviona 12.

Vyöhykkeet 1 ja 2 vastaavat normaalista homotsygootista (MM) peräisin olevaa DNA:ta, vyöhykkeet 3 ja 4 heterotsygootista (MS) ja vyöhykkeet 5 ja 6 varianttihomotsygootista (SS) peräisin olevaa DNA:ta. Vyöhykkeitä 1, 3 ja 35 5 vastaavissa kokeissa käytettiin oligonukleotidia XXII

(normaali) ja vyöhykkeitä 2, 4 ja 6 vastaavissa kokeissa oligonukleotidia XXI (variantti). Ennakko-odotusten mukaisesti oligonukleotidilaajennusta ei tapahtunut vyöhykkeitä 2 ja 5 vastaavissa kokeissa. Havaitut tuotenauhat on merkitty nuolilla.

Esimerkki 6

1 ng kasettiplasmidi-DNA:ta, 100 pmol kumpaakin oligonukleotidiprimeriä

TTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
ja TATGCGACTCCCTGCATTAGGAGCAGCCCA,

1,5 mM:n loppupitoisuus kutakin neljää deoksinukleosiditri-fosfaattia sekä puskuria, joka käsitti edellä täsmennetyt loppupitoisuudet, sekoitettiin keskenään 1,5 ml:n kierrekorkilla varustetussa mikrosentrifugiputkessa, ja tilavuus säädettiin 100 µl:ksi lisäämällä steriloitua de-ionisoitua vettä (Milli-Q). Putki suljettiin ja sijoitettiin kiehuvaan vesihauteeseen 5 minuutiksi. Reaktio käynnistettiin lisäämällä 2 yksikköä Taq-polymeraasia (Cetus-), minkä jälkeen reaktioseos sinetöitiin lisäämällä kerros kevyttä mineraaliöljyä (Sigma) haihtumisen estämiseksi. Putken sisältöä inkuboitiin 4 minuutin ajan 60°C:ssa ja sitten 90°C:ssa 2 minuutin ajan. Tämä menettely toistettiin kaikkiaan 30 toistokertaa.

Sitten otettiin 60 µl reaktioseosta ja lisättiin siihen 60 pmol joko primereitä XIX ja XI (normaali) tai primereitä XII ja XX (variantti). Sitten jatkoreaktioiden käynnistämiseksi lisättiin 1 yksikkö Taq-polymeraasia (Cetus). Seosta inkuboitiin 92°C:ssa 2 minuutin ajan ja sitten 60°C:ssa 4 minuutin ajan. Menettely toistettiin kaikkiaan neljä toistokertaa. Vahvistustuotteet todettiin lisäämällä 10 µl:n erä kutakin reaktioseosta geelipanos-tuspuskuriin ja suorittamalla liuoksen elektroforeesi-ajo 3-8%:isessa agarosigeelissä (NuSieve, FMC Bioproducts),

joka sisälsi 0,5 µg/ml etidiumbromidia. Geeli visualisoi-
ttiin läpivalaisulaitteessa (300 nm:n aallonpituus) ja
otettiin polaroid-valokuva. Tulokset on esitetty kuviona
13. Äärimmäisenä vasemmalla esiintyvä vyöhyke edustaa ko-
5 komerkkejä, joita käytettiin saatujen tuotteiden koon täs-
mentämiseksi. Vyöhykkeet 1 ja 2 vastaavat normaalista ho-
motsygootista (MM) peräisin olevaa DNA:ta, vyöhykkeet 3
ja 4 heterotsygootista (MZ) ja vyöhykkeet 5 ja 6 variant-
tihomotsygootista (ZZ) peräisin olevaa DNA:ta. Vyöhykkei-
10 tä 1, 3 ja 5 vastaavia kokeissa käytettiin primereitä XIX
ja XI, kun taas vyöhykkeitä 2, 4 ja 6 vastaavissa kokeissa
käytettiin primereitä XII ja XX. Ennakko-odotusten mukai-
sesti vyöhykkeitä 2 ja 5 vastaavissa kokeissa ei muodos-
tunut primerilaajennustuotteita. Havaitut tuotenauhat on
15 merkitty nuolilla.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä ainakin yhden varianttinukleotidin läsnäolon tai puuttumisen toteamiseksi näytteen sisältä-
5 mässä yhdessä tai useammassa nukleiinihapossa, joka menetelmä on t u n n e t t u siitä, että siinä:

näytettä käsitellään joko samanaikaisesti tai toisiaan seuraten tarkoituksenmukaisilla nukleosiditrifosfaateilla, nukleosiditrifosfaatteja polymeroivalla aineella
10 sekä kohde-emäsekvenssin jonkin diagnoosiosuuden diagnoosiprimerillä hybridointiolosuhteissa, jolloin sanotun diagnoosiprimerin nukleotidisekvenssi on valittu siten, että se oleellisesti komplementoi sanottua diagnoosiosuutta, diagnoosiprimerin päätynukleotidin komplementoidessa
15 joko oletettua varianttinukleotidia tai vastaavaa normaalia nukleotidia, jolloin diagnoosiprimeristä syntetisoituu laajennustuote, jos diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emäsekvenssissä, kun taas laajennustuotetta ei syntetisoidu silloin,
20 kun diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ei komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emäsekvenssissä; sekä todetaan oletetun varianttinukleotidin läsnäolo tai puuttuminen laajennustuotteen läsnäolosta tai vastaavasti puuttumisesta.

25 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä:

1) näytettä käsitellään joko samanaikaisesti tai toisiaan seuraten tarkoituksenmukaisilla nukleosiditrifosfaateilla, nukleosiditrifosfaatteja polymeroivalla aineella
30 la sekä kohde-emäsekvenssin jonkin diagnoosiosuuden diagnoosiprimerillä hybridointiolosuhteissa, jolloin sanotun diagnoosiprimerin nukleotidisekvenssi on valittu siten, että se oleellisesti komplementoi sanottua diagnoosiosuutta, diagnoosiprimerin päätynukleotidin komplementoidessa
35 joko oletettua varianttinukleotidia tai vastaavaa normaalia nukleotidia, jolloin diagnoosiprimeristä syntetisoituu

6.11.81
H. L. astSana
sana
Alue...

laajennustuote, jos diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emässekvenssissä, kun taas laajennustuotetta ei syntetisoidu silloin, kun diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ei komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emässekvenssissä; jolloin diagnoosiprimeristä muodostunut mikä tahansa laajennustuote kykenee komplementistaan erotettuna toimimaan templaattina laajennustuotteen syntetisoimiseksi sanotusta vahvistusprimeristä;

2) näytettä käsitellään denaturoivissa olosuhteissa primerilaajennustuotteen, jos sellainen on muodostunut, erottamiseksi templaatistaan;

3) vaiheessa (2) saadut yksittäiset säikeet saate-
taan kosketuksiin joko samanaikaisesti tai toisiaan se-
uraten tarkoituksenmukaisten nukleosiditrifosfaattien, nuk-
leosiditrifosfaatteja polymeroivan aineen, diagnoosipri-
merin ja vahvistusprimerin kanssa edellä määritellyn mu-
kaisesti muiden laajennustuotteiden syntetisoimiseksi,
silloin kun tämä on mahdollista, vaiheessa (2) saatuja
yksittäisiä säikeitä templaatteina käyttäen;

4) vaiheita (2) ja (3) toistetaan riittävän monta
kertaa halutun nukleotidisekvenssin todettavan vahvistuk-
sen saamiseksi; ja

5) oletetun varianttinukleotidin läsnäolo tai puut-
tuminen todetaan vaiheessa (4) saatavan vahvistustuotteen
vastaavasta läsnäolosta tai puuttumisesta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että siinä näytettä käsitellään saman-
aikaisesti tai toisiaan seuraten joko

(a) ensimmäisellä diagnoosiprimerillä, jonka sek-
venssi oleellisesti komplementoi ensimmäisen nukleiiniha-
pon jotain diagoosiosuutta, jolloin ensimmäisen diagnoo-
siprimerin päätynukleotidi komplementoi sanottua oletettua
varianttinukleotidia, ja toisella diagnoosiprimerillä,
jonka sekvenssi oleellisesti komplementoi toisen nukleiini-
happosekvenssin jotain diagnoosiosuutta, jolloin toisen

diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi komplementoivaa oletettua varianttinukleotidia; tai

(b) ensimmäisellä diagnoosiprimerillä, jonka sekvenssi oleellisesti komplementoi ensimmäisen nukleiinihapposekvenssin jotain diagnoosiosuutta, jolloin ensimmäisen diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi sanottua oletettua varianttinukleotidia vastaavaa normaalia nukleotidia, ja toisella diagnoosiprimerillä, jonka sekvenssi oleellisesti komplementoi toisen nukleiinihapposekvenssin jotain diagnoosiosuutta, jolloin toisen diagnoosiprimerin päätynukleotidi komplementoi sanottua oletettua varianttinukleotidia vastaavaa normaalia nukleotidia;

jolloin ensimmäisen diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ja toisen diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ovat joko molemmat vastaavien primerien 5'-päädyssä tai molemmat niiden 3'-päädyssä ja jolloin ensimmäisen nukleiinihapposekvenssin suunta on toiseen nukleiinihapposekvenssiin nähden vastakkainen.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että ensin vahvistetaan ainakin osa oletetun varianttinukleotidin sisältävästä näytenukleiinihaposta, minkä jälkeen näin saatua vahvistustuotetta käytetään käsiteltävänä näytteenä.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että ensin vahvistetaan ainakin osa oletetun varianttinukleotidin sisältävästä näytenukleiinihaposta, minkä jälkeen näin saatua vahvistustuotetta käytetään käsiteltävänä näytteenä.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että lisäksi toistetaan näytenukleiinihapolle suoritettu käsittely ainakin kerran, jolloin saadaan laajennustuotteen lineaarinen vahvistuminen samaa kohde-emässekvenssiä templaattina käyttäen.

7. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että diagnoosiprimerin päätynukleotidi, joka komplementoi joko oletettua variant-

tinukleotidia tai vastaavaa normaalia nukleotidia, sijaitsee diagnoosiprimerin 3'-päädyssä.

8. Noin 5 - 50 emäsparin nukleotidisekvenssi kyseisen keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettäväksi,
 5 t u n n e t t u siitä, että sanotun sekvenssin pääty-
 nukleotidi komplementoi joko tunnettuun geneettiseen häi-
 riöön liittyvää oletettua varianttinukleotidia tai vastaa-
 vaa normaalia nukleotidia, jolloin sanotun sekvenssin lop-
 puosa komplementoi oleellisesti vastaavaa, oletetun vari-
 10 anttinukleotidin tai vastaavan normaalin nukleotidin vie-
 reistä kohde-emässekvenssiä sanotun nukleotidisekvenssin
 ollessa valittu siten, että käytettäessä sitä diagnoosi-
 primerinä kyseisen keksinnön mukaisessa menetelmässä diag-
 noosiprimeristä syntetisoituu laajennustuote, jos diagnoo-
 15 siprimerin sanottu päätynukleotidi komplementoi vastaavaa
 nukleotidia kohde-emässekvenssissä, kun taas laajennustuo-
 tetta ei syntetisoidu silloin, kun diagnoosiprimerin sa-
 nottu päätynukleotidi ei komplementoi vastaavaa nukleoti-
 dia kohde-emässekvenssissä.

20 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen nukleotidisek-
 venssi, t u n n e t t u siitä, että päätynukleotidi si-
 jaitsee nukleotidisekvenssin 3'-päädyssä.

10. Määrittyspakkaus ainakin yhden varianttinukleo-
 tidin läsnäolon tai puuttumisen toteamiseksi näytteen si-
 25 sältämässä yhdessä tai useammassa nukleiinihapossa, joka
 määrittyspakkaus on t u n n e t t u siitä, että se sisäl-
 tää:

(1) diagnoosiprimerin kohde-emässekvenssin kutakin
 diagnoosiosuutta kohden, jolloin kunkin diagnoosiprimerin
 30 nukleotidisekvenssi on valittu siten, että se oleellisesti
 komplementoi sanottua diagnoosiosuutta, diagnoosiprimerin
 päätynukleotidin komplementoidessa joko oletettua variant-
 tinukleotidia tai vastaavaa normaalia nukleotidia, jolloin
 pakkausta käytettäessä diagnoosiprimeristä syntetisoituu
 35 laajennustuote, jos diagnoosiprimerin sanottu päätynukleo-
 tidi komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emässekvenss-

sissä, kun taas laajennustuotetta ei syntetisoidu, jos diagnoosiprimerin sanottu päätynukleotidi ei komplementoi vastaavaa nukleotidia kohde-emässekvenssissä;

(2) kutakin neljää eri nukleosiditrifosfaattia; ja

5 (3) pakkausosan (2) nukleosiditrifosfaatteja polymeroivaa ainetta.

Fig.1(a)

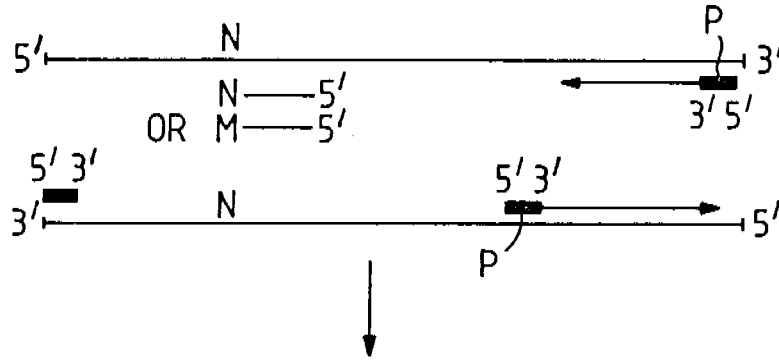


Fig.1(b)

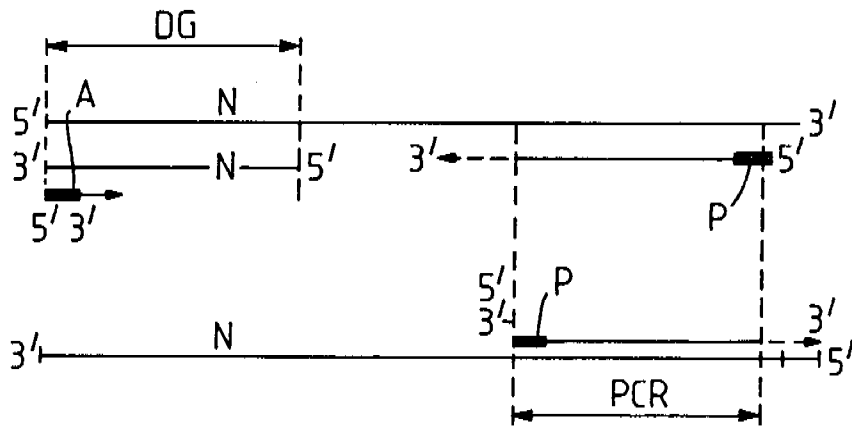


Fig.1(c)

N-	M-	N-	M-	N-	M-	
—	—	—	()	()	—	DG
—	—	—	—	—	—	PCR
C		N		D		

Fig.2(a)

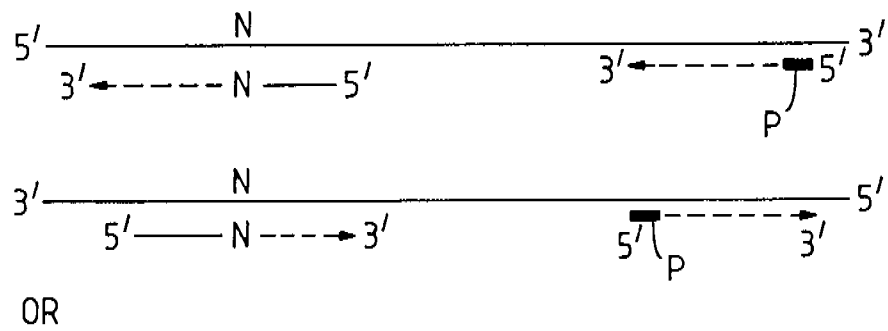


Fig.2(b)

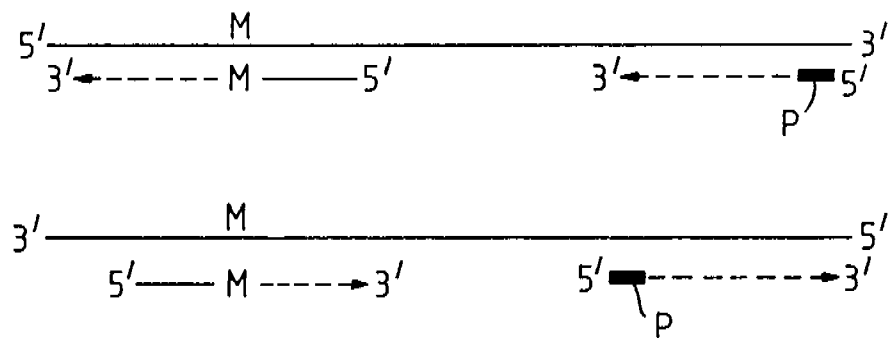


Fig.3.

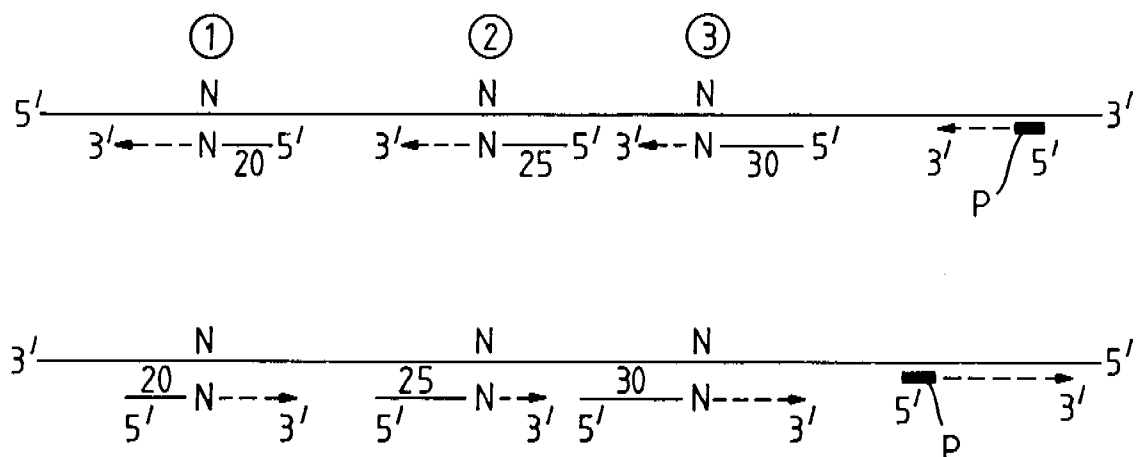


Fig.4(a)

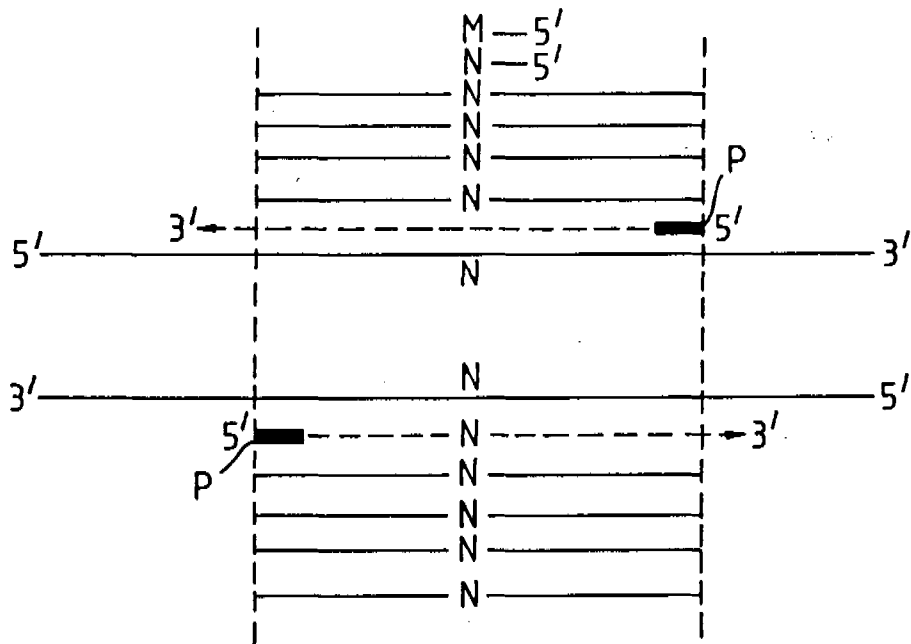


Fig.4(b)

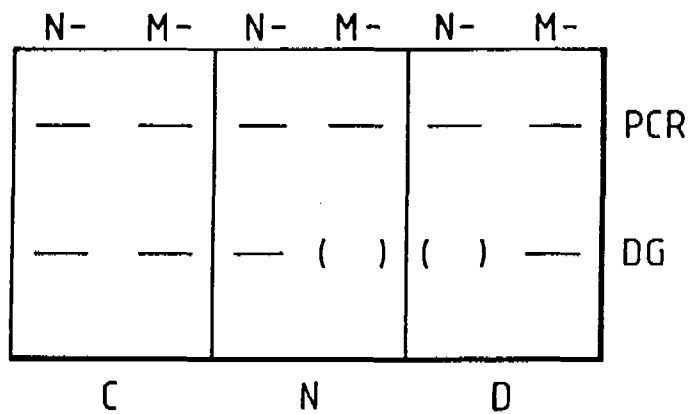


Fig.6.

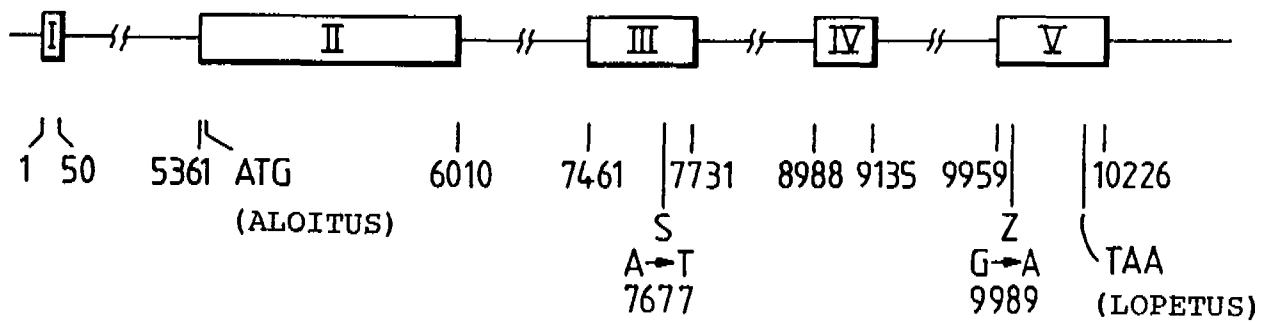


Fig.5(a)

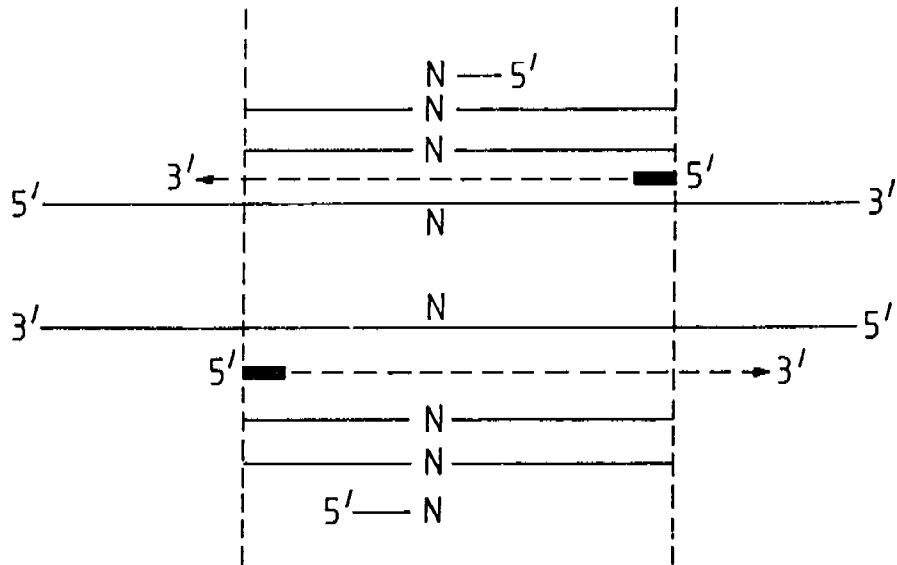


Fig.5(b)

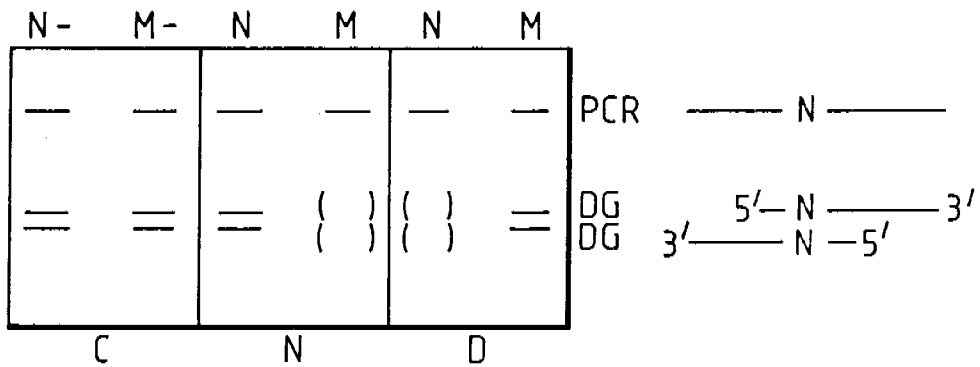


Fig.5(c)

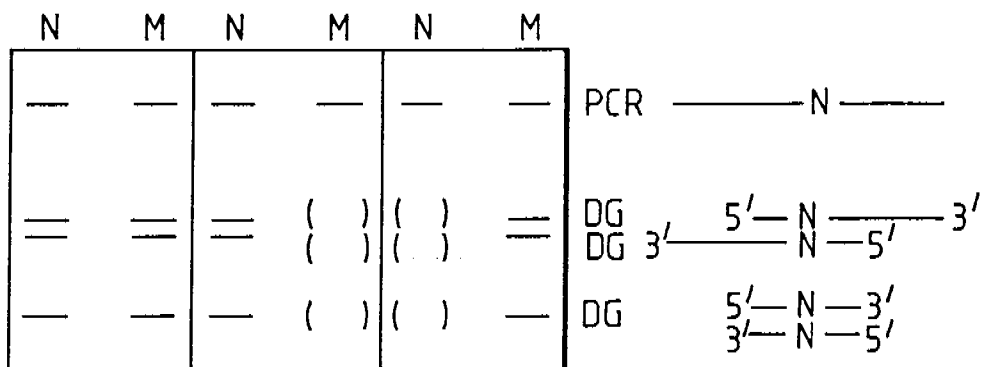


Fig.7.

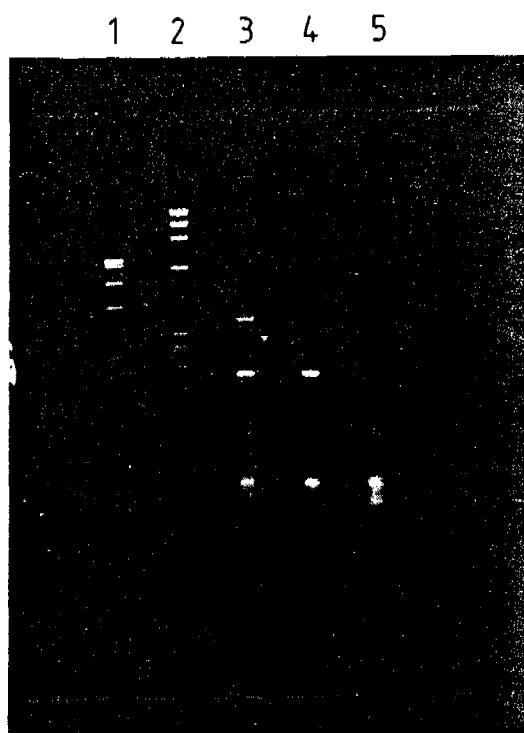


Fig.8.

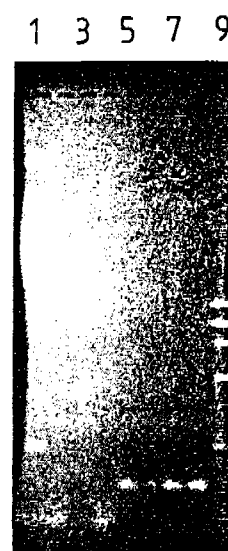
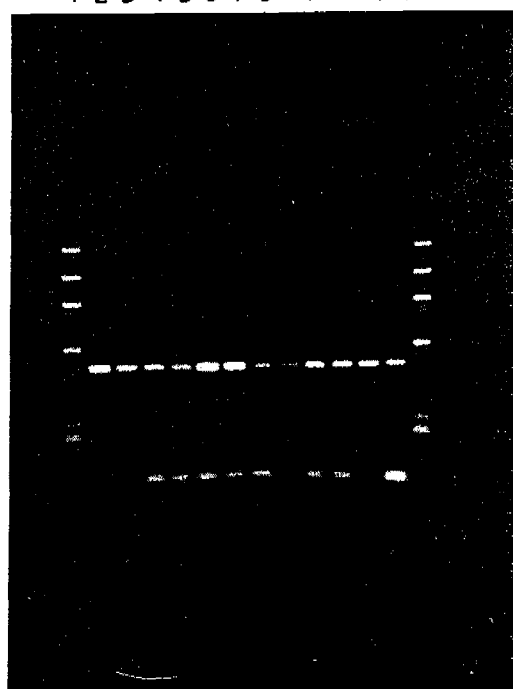


Fig.9.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



C

Fig. 10.

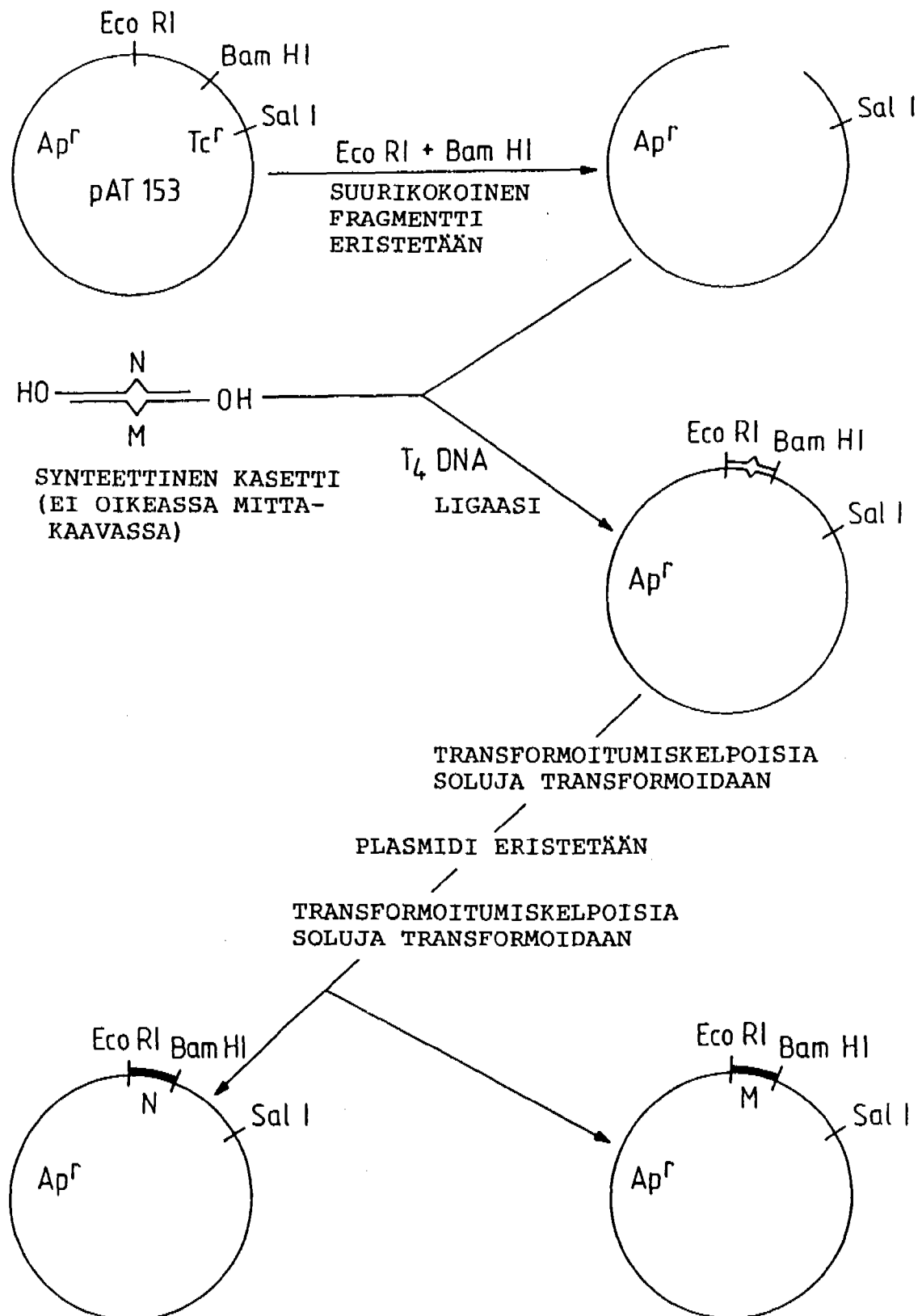


Fig. 11(a)

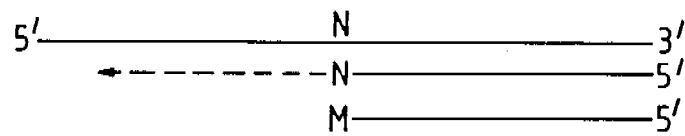


Fig. 11(b)

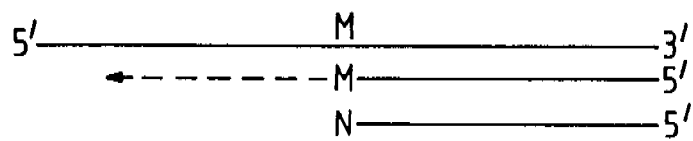
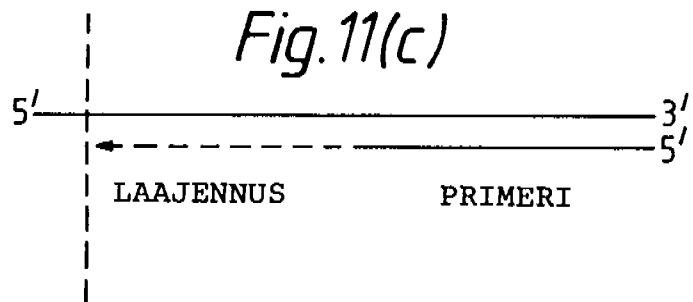


Fig. 11(c)



TÖRMÄTÄÄN
RAJOITTAVAAN
D NTP: HEN

Fig. 13.

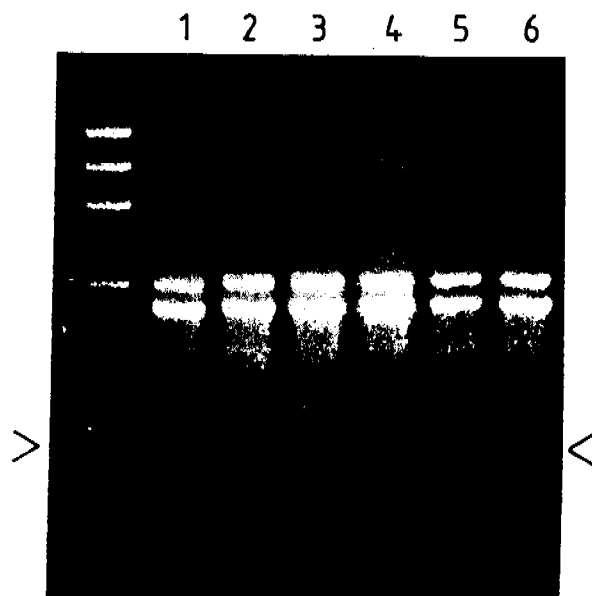
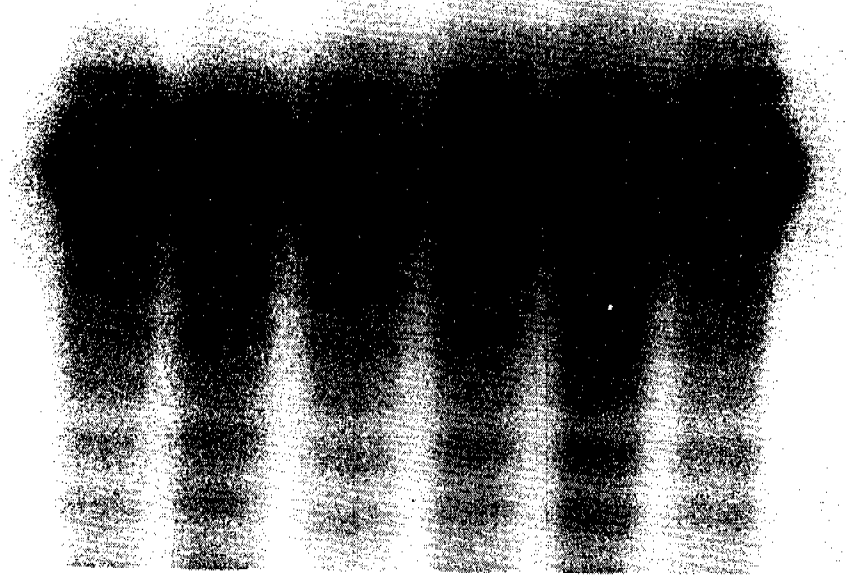


Fig. 12.

1 2 3 4 5 6

>

<



030403

030403

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

TUTKIMUSRAPORTTI

Patentti- ja innovaatiolinja

HAKEMUSNUMERO	LUOKITUS
891126	
	☐ jatkuu kääntöpuolella

TUTKITTU AINEISTO
Patenttivirastojen julkaisut FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US:
☐ jatkuu kääntöpuolella
Muu aineisto
☐ jatkuu kääntöpuolella

VIITEJULKAISUT		
Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
	US-P- 4683195	
	EP-H- 237362, C12Q 1/68	
	EP-H- 246864, C12Q 1/68	
	Science, vol 237, 1987, s. 175-178	
	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, 1988, s. 544-548.	
		☐ jatkuu kääntöpuolella
*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este		
Päiväys	Tutkija	
4.10.95	PEK	