

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 162124 B

(21) Patentansøgning nr.: 3427/84

(51) Int.Cl.⁵ G 01 N 33/531

(22) Indleveringsdag: 12 jul 1984

C 07 H 21/04

// C 12 Q 1/68

(41) Alm. tilgængelig: 15 jan 1985

(44) Fremlagt: 16 sep 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 14 jul 1983 US 513932 18 maj 1984 US 611668

(71) Ansøger: *MOLECULAR DIAGNOSTICS INC.; 400 Morgan Lane; West Haven, Ct. 06516, US

(72) Opfinder: Nanibhushan *Dattagupta; US, Donald M. *Crothers; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Mærkede nucleinsyresonder og addukter til fremstilling heraf

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammen drag:

3427-84

En mærket nucleinsyresonde omfatter (a) en nucleinsyrekomponent, (b) en nucleinsyre-bindende ligand fotokemisk bundet til nucleinsyrekomponenten og (c) et mærkestof kemisk bundet til den nucleinsyrebindende ligand. Mærkestoffet kan være en ligand, der kan bindes specifikt såsom en hapten eller biotin, et enzym såsom β -galactosidase eller peberrodsperoxidase, en fluorescerende gruppe, et phycobiliprotein, en lysafgivende gruppe eller en radioisotop. Sonden kan anvendes til analyser for nucleinsyrer, idet nucleinsyrekomponentens evne til at hybridisere udnyttes.

DK 162124 B

Den foreliggende opfindelse angår en mærket nucleinsyresonde samt en fotokemisk fremgangsmåde og et mellemprodukt til fremstilling deraf. Den her omhandlede, mærkede nucleinsyresonde er udviklet med henblik på påvisning ved

5 hybridiseringsanalyser til bestemmelse af særlige polynucleotid-sekvenser.

Den mest effektive og følsomme fremgangsmåde til påvisning af nucleinsyrer, såsom DNA, efter hybridisering kræver radioaktivt mærket DNA. Anvendelsen af autoradiografi

10 og enzymer gør analysen tidsrøvende og kræver et erfarent teknisk personale. For nylig er en ikke-radioaktiv fremgangsmåde til mærkning af DNA blevet beskrevet i EP offentliggørelsesskrift nr. 63.879, ved hvilken der anvendes en nicktranslation for at indsætte biotinyleret U-rest på DNA

15 i stedet for T. Biotinresten afprøves derefter med antibiotinantistof eller et avidin-holdigt system. Påvisningen er i dette tilfælde hurtigere end autoradiografi, men fremgangsmåden med nicktranslation er en højt udviklet teknik. Desuden fungerer biotinylering ved hjælp af biotinyleret UTP kun

20 for thymin-holdige polynucleotider. Anvendelse af andre nucleotidtriphosphater er meget vanskelig, fordi den kemiske derivatisering af A eller G eller C (indeholdende $-NH_2$) med biotin kræver veluddannede og yderst erfarne organiske kemikere.

25 Det er således opfindelsens formål at tilvejebringe et forenklet system til påvisning af nucleinsyrer ved hjælp af hybridiseringsanalyser, hvilket system let kan produceres og anvendes uden de ulemper, der er anført ovenfor.

Dette og andre formål med og fordele ved fremgangsmåden opnås ifølge opfindelsen ved, at nucleinsyren er fotokemisk bundet til en fotoreaktiv, nucleinsyre-bindende ligand, f.eks. en intercalator(indskudt)-forbindelse, såsom en furokumarin- eller en phenanthridinforbindelse, eller en ikke-intercalatorforbindelse, såsom netropsin, distamycin,

35 Hoechst 33258 og bis-benzimidazol, som på sin side er bundet til et mærkestof, der kan "aflæses" eller afprøves på gængs

måde, herunder ved fluorescenspåvisning. I overensstemmelse hermed er den her omhandlede, mærkede nucleinsyresonde ejendommelig ved, at den består af (a) en nucleinsyrekomponent, (b) en nucleinsyrebindende ligand, som ved en fotokemisk
 5 reaktion er bundet til nucleinsyrekomponenten, og (c) et mærkestof, som er kemisk bundet til (b).

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af den her omhandlede, mærkede nucleinsyresonde er ejendommelig ved, at sonden bringes i berøring med et mellemprodukt
 10 bestående af en nucleinsyrebindende ligand og et mærkestof, som er kemisk bundet hertil, og at sonden og mellemproduktet udsættes for fotokemisk bestråling.

Tilsvarende er det her omhandlede mellemprodukt ejendommeligt ved, at det omfatter en nucleinsyrebindende ligand
 15 og et mærkestof, som er kemisk bundet dertil.

Denne fotokemiske fremgangsmåde giver mere gunstige reaktionsbetingelser end den sædvanlige kemiske koblingsmetode for biokemisk følsomme stoffer. Ved at anvende de rigtige bølgelængder til stråling kan DNA, RNA og proteiner
 20 modificeres uden på negativ måde at påvirke polymerenes oprindelige struktur. Den nucleinsyre-bindende ligand, der herefter eksemplificeres af en intercalator, og mærkestof kobles først og fotoreageres derefter med nucleinsyren. Et almengyldigt skema for kobling af en nucleinsyre, f.eks.
 25 dobbeltstrenget DNA, med et mærkestof, såsom en hapten eller et enzym, er følgende:

Mærkestof
 +
 fotoreaktiv
 30 intercalator
 ↓
 Mærket foto-
 reaktiv in-
 tercalator

35

dobbeltstrenget DNA
 ↓
 ←————→
 ↓
 mærket DNA

Når den hybridiserbare del af sonden er i dobbeltstrenget form, denatureres denne del derpå, således at der fås en hybridiserbar, enkeltstrenget del. Alternativt kan, når det mærkede DNA omfatter en hybridiserbar del, der allerede foreligger i enkeltstrenget form, en sådan denaturering undgås, om ønsket. Alternativt kan dobbeltstrenget DNA mærkes ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, efter at hybridisering er sket ved hjælp af et hybridiseringssystem, der kun danner dobbeltstrenget DNA i nærvær af den sekvens, der skal påvises.

Til fremstilling af specifikke og effektive fotokemiske produkter er det ønskeligt, at nucleinsyrekomponenten og den fotoreaktive intercalatorforbindelse først undergår en intercalationsreaktion i mørke, hvorefter fotoadditionsproduktet dannes ved bestråling med UV-lys.

Til kobling med DNA er aminomethylpsoralen, aminomethylangelicin og aminoalkylethidium- eller -methidiumazider særlig anvendelige forbindelser. De bindes til dobbeltstrenget DNA, og kun komplekset giver fotoaddukt. I tilfælde af, at mærket dobbeltstrenget DNA skal denatureres for at give en hybridiserbar, enkeltstrenget region, anvendes sådanne betingelser, at der forhindres samtidig indbyrdes virkning mellem de to DNA-strenger med et enkelt fotoaddukt. Det er nødvendigt, at modifikationsfrekvensen langs en hybridiserbar enkeltstrenget del af sonden ikke er så stor, at den i det væsentlige hindrer hybridisering, og følgelig vil der fortrinsvis kun være ét modifikationssted pr. 25, mere almindeligt 50 og fortrinsvis 100 nucleotidbaser. Angelicinderivater er bedre end psoralenforbindelser til monoadduktdannelse. Hvis en enkeltstrenget sonde bindes covalent til noget ekstra dobbeltstrenget DNA, er anvendelse af phenanthridium- eller psoralenforbindelser ønskelig, eftersom disse forbindelser indbyrdes virker specifikt for dobbeltstrenget DNA i mørke. Kemien ved syntesen af de koblede reagenser til modificering af nucleinsyrer med henblik på mærkning, der er beskrevet me-

0

re detaljeret nedenfor, foregår på lignende måde i alle tilfælde.

Nucleinsyrekomponenten kan være enkelt- eller-dobbeltstrenget DNA eller RNA eller fragmenter deraf, som produceres af restriktionsenzymmer eller endog forholdsvis korte oligomere.

Nucleinsyre-bindende ligander ifølge den foreliggende opfindelse, der anvendes til at binde nucleinsyrekomponenten med mærkestoffet, kan være en hvilken som helst passende fotoreaktiv form af kendte nucleinsyrebindende ligander. Særlig foretrukne nucleinsyrebindende ligander er intercalatorforbindelser såsom furukumariner, f.eks. angelicin (isopsoralen) eller psoralen eller derivater deraf, der reagerer fotokemisk med nucleinsyrer, f.eks. 4'-aminomethyl-4,5'-dimethylangelicin, 4'-aminomethyltrioxsalen, 4'-aminomethyl-4,5',8'-trimethyl-psoralen, 3-carboxy-5- eller -8-amino- eller -hydroxypsoralen samt mono- eller bis-azidoaminoalkylmethidium- eller -ethidiumforbindelser. Fotoreaktive former af en række forskellige andre intercalaterende midler kan også anvendes, således som eksempelvis anført i nedenstående tabel:

Intercalator-
klasser og re-
præsentative

forbindelser

Litteraturreferencer

A. Acridinfarvestoffer proflavin, acridin- orange, quinacrin, acriflavin	Lerman, J. Mol. Biol. 3:18(1961); Bloomfield m.fl. "Physical Chemistry of Nucleic Acids", kap. 7, side 429-476, Harper & Rowe, NY (1974), Miller m.fl. Biopolymers 19:2091 (1980).
B. Phenanthridiner ethidium coralyn	Bloomfield m.fl. supra Miller m.fl. supra Wilson m.fl. J. Med. Chem. 19: 1261 (1976)

30

35

0

Intercalator-
klasser og re-
præsentative
forbindelser

5

ellipticin, ellip-
ticinkation og de-
rivater

10

C. Phenaziner
5-methylphenazinkat-
ion

D. Phenothiaziner

15

chlopromazin

E. Quinoliner

chlorquin

kinin

F. Aflatoxin

20

G. Polycycliske carbon-
hydrider og deres
oxiranderivater

3,4-benzpyrenbenzo-
pyrendiolepoxid, 1-

25

pyrenyloxiran

benzanthracin-5,6-
oxid

H. Actinomyciner
actinomycin D

30

I. Anthracyclinoner

β -rhodomycin A

Daunamycin

J. Thiazanthenoner

miracil D

35

K. Anthramycin

Litteraturreferencer

Festy m.fl., FEBS Letters 17:
321 (1971)

Kohn m.fl., Cancer Res. 36:71
(1976), LePecq m.fl., PNAS (USA)
71:5078, Pelaprat m.fl., J.

Med.Chem. 23:1330 (1980).

Bloomfield, m.fl. supra

samme

samme

samme

samme

Yang m.fl., Biochem. Biophys.
Res. Comm. 82:929 (1978)

Amea m.fl., Science 176:47 (1972)

Bloomfield m.fl., supra.

samme

samme

samme

0	Intercalator- klasser og re- præsentative for- bindelser	<u>Litteraturreferencer</u>
5	L. Mitomycin	Ogawa m.fl., Nucl. Acids Res., Spec. Publ. 3:79(1977), Akhtar m.fl., Can. J. Chem. Res. 11:211 (1978)
	M. Platinkomplekser	Lippard, Accts. Chem. Res. 11:211 (1978)
10	N. Polyintercalatorer ethinomycin	Warin m.fl., Nature 252: 653 (1974) Wakelin, Biochem. J. 157: 721 (1976)
15	quinomycin triostin BBM028A tandem	Lee m.fl., Biochem. J. 173: 115(1978), Huang m.fl. Bio- chem. 19:5537(1980), Viswa- mitra m.fl., Nature 289:817 (1981)
20	diacridiner	LePecq m.fl., PNAS(USA) 72: 2915(1975), Carrelakis m.fl. Biochim. Biophys. Acta 418: 277(1976), Wakelin m.fl., Biochem 17:5057(1978), Wake- lin m.fl., FEBS Lett. 104: 261(1979), Capelle m.fl., Biochem. 18:3354(1979), Wright m.fl., Biochem. 19: 5825(1980), Bernier m.fl., Biochem. J. 199:479(1981), King m.fl., Biochem. 21: 4982(1982)
25		
30	ethidiumdimer	Gaugain m.fl., Biochem. 17: 5078(1978), Kuhlman m.fl., Nucl. Acids Res. 5:2629(1978),
35		

0

Intercalator-
klasser og re-
præsentative
forbindelser

5

ellipticendimere og
 analoge

10

heterodimere

15

trimere

O. Norphillin A

20

P. Fluorener og fluorenoner
 fluorenodiaminer

25

Q. Furokumariner
 angelicin

4,5'-dimethylangelicin

30

psoralen

8-methoxypsoralen

35

Litteraturreferencer

Marlcovits m.fl., Anal.Bio-
 chem. 94:259(1979), Dervan
 m.fl., JACS 100:1968(1978),
 samme 101:3664(1979).

Debarre m.fl., Compt. Rend.
 Ser. D. 284:81(1977), Pe-
 laprat m.fl., J. Med. Chem.
 23:1336(1980).

Cain m.fl., J. Med. Chem.
 21:658(1978), Gaugain m.fl.
 Biochem. 17:5078(1978)

Hansen m.fl., JCS Chem. Comm.
 162(1983), Atnell m.fl.,
 JACS 105:2913(1983)

Loun m.fl., JACS, 104:3213
 (1982)

Bloomfield m.fl., supra.
 Witkowski m.fl., Wiss. Beitr.-
 Martin-Luther-Univ. Halle
 Wittenberg, 11(1981).

Venema m.fl., MGG, Mol. Gen.
 Genet. 179:1(1980)

Vedaldi m.fl., Chem.-Biol.
 Interact. 36:275(1981)

Marciani m.fl., Z.Naturforsch
 B 27(2):196(1972)

Belognzov m.fl., Mutat. Res.
 84:11(1981), Scott m.fl.,
 Photochem. Photobiol. 34:63
 (1981)

0

Intercalator-
klasser og re-
præsentative
forbindelser

Litteraturreferencer

- | | | |
|----|---|---|
| 5 | 5-aminomethyl-8-me-
thoxypsoralen | Hansen m.fl., Tet. Lett. 22:
1847(1981). |
| | 4,5,8-trimethylpso-
ralen | Ben-Hur m.fl., Biochem. Biophys.
Acta 331:181(1973) |
| | 4'-aminomethyl-4,5,-
8-trimethylpsoralen | Issacs m.fl., Biochem. 16:1058
(1977) |
| 10 | xanthotoxin | Hradecma m.fl., Acta Virol.
(Engl. udg.) 26:305(1982). |
| | khellin | Beaumont m.fl., Biochim.Biophys.
Acta 608:1829(1980) |
| 15 | R. Benzodipyrone | Murx m.fl., J. Het. Chem. 12:417
(1975), Horter m.fl., Photochem.
Photobiol. 20:407(1974) |
| | S. Monstral Fast Blue | Juarranz m.fl., Acta Histochem.
70:130(1982) |

20

Særlig anvendelige fotoreaktive former af så-
 danne intercalaterende midler er azidointercalatorerne.
 Reaktive nitrener deraf dannes let ved langbølget ultra-
 violet eller synligt lys, og nitrener af arylazider fore-
 25 trækker indsætningsreaktioner frem disses omlejringspro-
 dukter (jfr. White m.fl., Methods in Enzymol. 46:644
 (1977)). Repræsentative azidointercalatorer er 3-azido-
 acridin, 9-azidoacridin, ethidiummonoazid, ethidiumdi-
 azid, ethidium-dimerazid (Mitchell m.fl., JACS 104:4265
 30 (1982)), 4-azido-7-chlorquinolin og 2-azidofluoren. An-
 dre anvendelige fotoomsættelige intercalatorer er foruku-
 marinerne, der danner (2+2) cycloaddukter med pyrimidin-
 rester. Alkyleringsmidler kan også anvendes såsom bis-
 chlorethylaminer og -epoxider eller -azidiriner, f.eks.
 35 aflatoxiner, polycykliske carbonhydridepoxider, mitomy-
 cin og norphillin A.

0

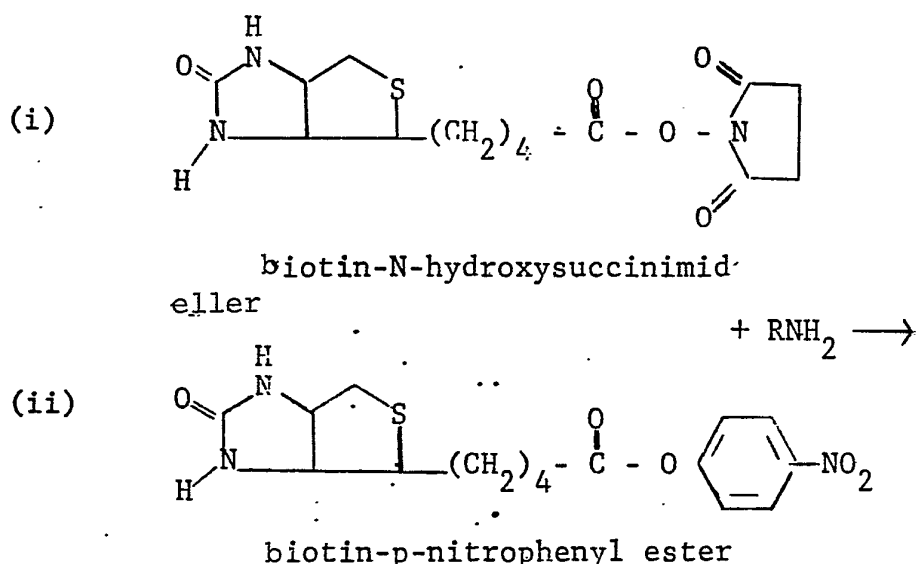
Mærkestoffet, der bindes til nucleinsyrekomponenten ifølge den foreliggende opfindelse, kan være en hvilken som helst kemisk gruppe eller rest, der har en påviselig fysisk eller kemisk egenskab. Mærkestoffet skal have en funktionel kemisk gruppe, der gør det muligt at den kan bindes kemisk til intercalatorforbindelsen. Sådanne mærkningsmaterialer er stærkt udviklet inden for immunanalyseområdet, og i reglen kan de fleste mærkestoffer, der kan anvendes til sådanne fremgangsmåder, og bruges i forbindelse med den foreliggende opfindelse. Særlig anvendelige er enzymatisk aktive grupper såsom enzymer (jfr. Clin. Chem. (1976)22:1243), enzymsubstrater (jfr. engelsk patentskrift nr. 1.548.741), coenzymer (jfr. US patentskrifterne nr. 4.230.797 og 4.238.565) og enzyminhibitorer (jfr. US patentskrift nr. 4.134.792), fluoresceringsmidler (jfr. Clin. Chem. (1979)25:353) og chromophorer herunder phycobiliproteiner, lysende midler såsom kemisk lysende midler og biologisk lysende midler (jfr. Clin. Chem. (1979)25:512 og samme 1531), ligander, der bindes specifikt og rester omfattende radioisotoper såsom ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I og ^{14}C . Sådanne mærkestoffer påvises på basis af deres egne fysiske egenskaber (f.eks. fluoresceringsmidler, chromophorer og radioisotoper) eller deres reaktive eller bindende egenskaber (f.eks. enzymer, substrater, coenzymer og inhibitorer). Således kan en co-faktor-mærket nucleinsyre påvises ved tilsætning af det enzym, for hvilket mærkestoffet er en cofaktor og et substrat for enzymet. En med hapten eller ligand (f.eks. biotin) mærket nucleinsyre kan påvises ved tilsætning af et antistof eller antistoffragment til haptenen eller et protein (f.eks. avidin), der binder liganden, mærket med et påviseligt molekyle. Et sådant påviseligt molekyle kan være et eller andet molekyle med en målelig fysisk egenskab (f.eks. fluorescens eller absorbans) eller en deltager i en enzymreaktion (f.eks. se listen ovenfor). Således kan

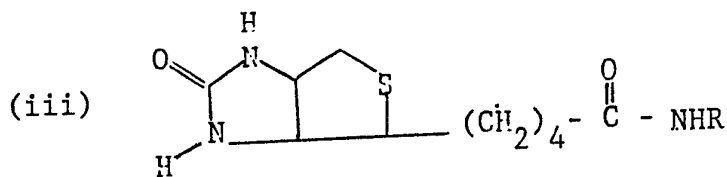
35

der anvendes et enzym, der på et substrat virker således, at der dannes et produkt med en målelig fysisk egenskab. Eksempler på sidstnævnte omfatter, men er ikke begrænset til β -galactosidase, alkalisk phosphatase, papain og peroxidase. Med henblik på hybridiseringsundersøgelser in situ er slutproduktet ideelt vandopløseligt. Andre mærkestoffer vil være indlysende for fagfolk på området.

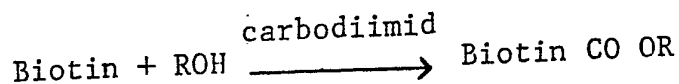
Mærkestoffet vil blive bundet til intercalatorforbindelsen ved direkte kemisk binding, såsom covalente bindinger. Fremgangsmåder, ved hvilke mærkestoffet bindes til intercalatorforbindelser, er kendt teknik, og en hvilken som helst egnet metode kan anvendes til fremstilling af det her omhandlede mellemprodukt.

Ifølge opfindelsen kombineres intercalatorforbindelsen først kemisk med mærkestoffet og derefter med nucleinsyrekomponenten. Eftersom f.eks. biotin har en carboxylgruppe, kan det kombineres med en furokumarin ved hjælp af amid- eller esterdannelse, uden at der gribes ind i furokumarins fotokemiske reaktivitet eller biotins biologiske aktivitet, f.eks.

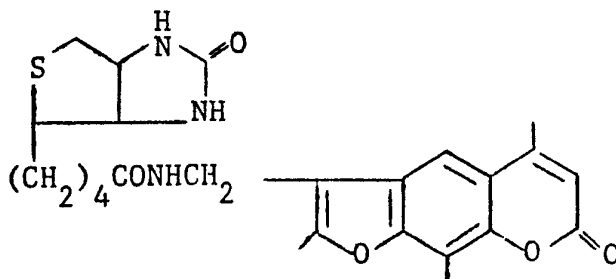
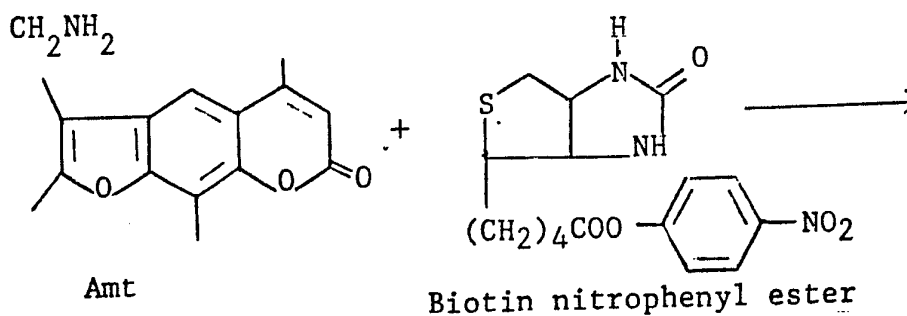




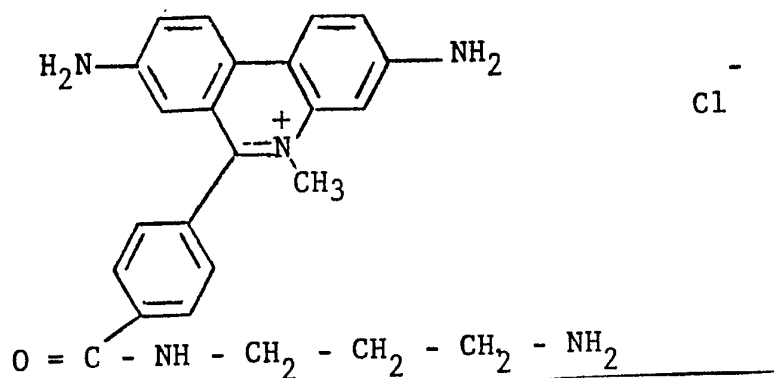
eller



Eksempelvis



Andre aminomethylangelicin-, psoralen- og phenanthridiumderivater kan omsættes på lignende måde lige som phenanthridiumhalogenider og derivater deraf, såsom aminopropylmethidiumchlorid, dvs.



0

(jfr. Hertzberg m.fl., J. Amer. Chem. Soc. 104:313(1982)).

Alternativt kan et bifunktionelt reagens, såsom dithiobis-succinimidylpropionat eller 1,4-butandiol-diglyciylether, anvendes direkte til at koble det fotokemisk reaktive molekyle med mærkestoffer, når reaktanterne har alkylaminogrupper, og atter på kendt måde med hensyn til opløsningsmidler, mængdeforhold og reaktionsbetingelser. Visse bifunktionelle reagenser, eventuelt glutaraldehyd, kan ikke anvendes, fordi, medens de kobler, kan de modificere nucleinsyre og således gribe ind i analysen. Der skal tages rutineforholdsregler for at forhindre sådanne vanskeligheder.

Afstandskædelængden mellem nucleinsyre-bindingsliganden og mærkestoffet kan udvides via carbonhydrid eller peptid. Et typisk eksempel indebærer forlængelse af et 8-hydroxy-psoralenderivat med et alkylhalogenid, ifølge den af J.L. deCour og J.Lhomme i Photochemistry Photobiology, 37, 155-161 (1983) beskrevne fremgangsmåde. Det halogenalkylerede derivat omsættes derpå enten med thiol eller aminer til fremstilling af en reaktiv gruppe, som det er beskrevet af W.A. Saffran m.fl., i Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 4594 (1982).

Hvis mærkestoffet er et enzym f.eks., anbringes produktet til sidst på et passende medium, og katalyseomfanget bestemmes. Hvis således enzymet er en phosphatase, kan mediet indeholde nitrophenylphosphat, og den dannede mængde nitrophenol overvåges ved at iagttage farven. Hvis enzymet er et β -galactosidase, kan mediet indeholde o-nitrophenyl-D-galacto-pyranosid, der også frigør nitrophenol.

Den mærkede nucleinsyre ifølge den foreliggende opfindelse kan anvendes i alle gængse hybridiseringsanalysesystemer og i reglen til et hvilket som helst system, der er muligt baseret på dannelse af et hybridiseringsprodukt eller -aggregat, der omfatter den mærkede

35

0 nucleinsyre. Især kan den særegne mærkede sonde ifølge den foreliggende opfindelse anvendes i opløsnings- eller fastfase-hybridiseringssystemer, herunder i sidstnævnte tilfælde systemer, der indebærer immobilisering af enten prøve- eller sondenucleinsyrer, og sandwichsystemer.

5 Den mærkede nucleinsyresonde omfatter mindst én enkeltstrenget basesekvens, der i hovedsagen er komplementær med eller homolog med den sekvens, der skal påvises. Imidlertid behøver en sådan basesekvens ikke være et enkelt kontinuerligt polynucleotidsegment, men
10 kan indbefatte to eller flere individuelle segmenter af brudt af ikke-homologe sekvenser. Disse ikke-homologe sekvenser kan være lineære, eller de kan være selv-komplementære og danne hårnåleløkker. Desuden kan sondens homologe region være flankeret i 3'- og 5'-endestillingerne af ikke-homologe sekvenser, såsom dem, der indbefatter DNA'et eller RNA'et i en vektor, hvori den homologe sekvens er blevet indsat med henblik på formering.
15 I begge tilfælde vil sonden, når den forekommer som et analytisk reagens, udvise påviselig hybridisering på et eller flere steder med de pågældende nucleinsyrer i prøven. Lineære eller cirkulære enkeltstrengede polynucleotider kan anvendes som sondeelement, idet større eller mindre dele er fordoblet med en komplementær polynucleotid streng eller strenge, forudsat at det eller de kritiske homologe segment(er) forefindes i enkeltstrenget form og er til rådighed for hybridisering med prøvens DNA eller RNA. Anvendelige sonder omfatter lineære eller cirkulære sonder, hvor den homologe sondesekvens forekommer i hovedsagelig kun enkeltstrenget form (jfr.
20 især Hu og Messing, Gene 17:271 (1982)).

25 Den mærkede sonde ifølge opfindelsen kan anvendes ved enhver gængs hybridiseringsteknik. Efterhånden som der foretages forbedringer og der udvikles idémæssigt ny systemer, kan disse let anvendes på den foreliggende mærkede sonde. Gængse hybridiseringssystemer,
35 som er særlig anvendelige, indbefatter sådanne, hvor prø-

0 vens nucleinsyrer eller den polynucleotide sonde immobiliseres på et fast underlag (fastfase-hybridisering), og sådanne, hvor polynucleotidarter alle findes i opløsning (opløsningshybridisering).

5 I fastfase-hybridiseringssystemer er én af de polynucleotide arter, der deltager i hybridiseringen, fastgjort på en passende måde i sin enkeltstrengede form på et fast underlag. Anvendelige faste underlag er kendt og indbefatter sådanne, der binder nucleinsyrer enten covalent eller ikke-covalent. Ikke-covalente underlag, som i reglen indebærer hydrophob binding, indbefatter naturligt forekommende og syntetiske polymere materialer, såsom nitrocellulose, derivatiseret nylon og fluoreret polycarbonhydrider i en række forskellige former såsom filtre eller faste ark. Covalente bindings-
10 underlag er også anvendelige og omfatter materialer med kemisk reaktive grupper eller grupper såsom dichlortriazin, diazobenzylloxymethyl og lignende, der kan aktiveres med hensyn til binding på polynucleotider.

20 En typisk fastfase-hybridiseringsteknik begynder med immobilisering af prøvens nucleinsyre på underlaget i enkeltstrenget form. Dette indledende trin forhindrer hovedsagelig genannellering af komplementære strenge fra prøven og kan anvendes som et middel til at koncentrere prøvematerialet på underlaget med henblik på bedre påviselighed. Den polynucleotide sonde bringes
25 derpå i berøring med underlaget, og hybridisering påvises ved måling af mærkestoffet som beskrevet her. Det faste underlag udgør et passende middel til at adskille den mærkede sonde, der er blevet hybridiseret til sekvensen, fra den, der ikke er blevet hybridiseret.

30 En anden interessant fremgangsmåde er sandwich-hybridiseringsteknikken, hvor det ene af to indbyrdes eksklusive fragmenter i sondens homologe sekvens immobiliseres, og den anden mærkes. Tilstedeværelsen af den pågældende polynucleotide sekvens resulterer i dob-

0 belt hybridisering til de immobiliserede og mærkede son-
desegmenter, jfr. Methods in Enzymology 65:468 (1980) og
Gene 21:77-85 (1983) med hensyn til yderligere enkelthe-
der.

5 Opfindelsen vil i det følgende blive nærmere
beskrevet i forbindelse med eksempler, hvor dele er
vægtdele, medmindre andet er angivet.

Eksempel 1

10 50 mg N-hydroxysuccinimido-biotin opløses i
2 ml dimethylsulfoxid (opl. A). 10 mg 4'-aminomethyl-
trioxsalen (formel 1) (eller andre aminoalkylforbindel-
ser) opløses i 10 ml vandig puffer (opl. B), (f.eks. 10
mmolær natriumtetraborat, pH indstillet med HCl), opløs-
nings-pH ~ 8 . Opløsning (A) og (B) blandes i et volu-
15 menforhold på 10:1, så at den aktiverede haptten forekom-
mer i stort overskud. Reaktionen får lov at forløbe ved
35°C i en time. Omfanget af reaktionen overvåges ved
tyndtlagschromatografi på slicagelplader med en fluo-
rescensindikator i et opløsningsmiddel - 1:1:8 methanol/
20 eddikesyre/chloroform. Under disse TLC-betingelser be-
væger uomsat aminomethyltrioxalan sig med opløsningsmid-
delfronten, hvorimod produktet har lavere mobilitet.
Biotin viser ikke nogen fluorescens, men adduktet fluo-
rescerer på grund af trioxsalen. Vækst af den nye fluo-
25 rescensplet og den oprindelige fluorescensplets for-
svinden viser omfanget af produktdannelse. Eftersom
det aktiverede biotin findes i stort overskud, svinder
fluorescens svarende til udgangsmaterialet ved TLC, ef-
ter at reaktionen er afsluttet. Overskud af aktivt bio-
30 tin omsættes med glycyl-glycin eller lysin. Tilstede-
værelse af aminosyre-biotinprodukt griber ikke ind i
psoralen-biotin-forbindelsernes fotokemiske reaktion med
DNA. Derfor er et rensningstrin efter ovennævnte reak-
35 tion ikke væsentligt.

0

Eksempel 2

100 mg biotin-nitrophenylester opløses i 2-5 ml tørt DMSO, og 10 mg 4'-aminomethyl-trioxsalen opløses i 5 ml tørt DMSO. De to opløsninger blandes i et sådant molforhold, at biotin-nitrophenylester er ca. 10 gange så meget som 4'-aminomethyl-trioxsalen. 100 ml triethylamin tilsættes til blandingen og rystes godt. Forløbet af reaktionen kontrolleres med TLC, og overskud af ureageret biotin-nitrophenylester omsættes med lysin som i eksempel 1. Reaktionen får lov at forløbe i en time ved 35°C, og derpå tilsættes lysin for at lække reaktionen. Herefter afdampes DMSO under vakuum, og den gummiagtige remanens tages op i methanol og kan renses chromatografisk på en LH 20-kolonne ved hjælp af methanol som elueringsmiddel. Det sidste trin er ikke væsentligt for den fotokemiske vekselvirkning mellem psoralenaddukt og DNA.

15

Eksempel 3

20 Biotin kan kobles med aminoalkylhydroxyalkylforbindelser ved en carbodiimid-formidlet reaktion. 10 mg biotin opløses i 1 ml dimethylformamid. Til denne opløsning tilsættes 5 mg 4'-hydroxymethyl-trioxsalen og derefter 10 mg dicyclohexyl-carbodiimid. Reaktionen får lov at forløbe i 20 timer ved stuetemperatur, dicyclohexylurinstofbundfaldet fjernes, og produktet udvindes ved at fjerne DMF under vakuum. Den samme reaktion kan udføres i pyridin.

25

De foregående eksempler vil give lignende resultater, hvis aminoalkyl-trioxsalenet erstattes med andre aminoalkyl-furokumariner, phenanthridium-halogenider og lignende.

30

35

0

Eksempel 4

Kobling af et enzym til en fotoaktiv amino-forbindelse og derefter covalent binding til DNA

5 Et typisk eksempel er papain. 0,1 mg/ml papainopløsning i 100 mmolær phosphatpuffer (pH 8) tilsættes til 10 mg/ml aminomethyl-trioxsalen. Slutopløsningen er 1:1 med hensyn til volumen af enzym og fotoaktivatoropløsning. Derefter tilsættes fast dithiobissuccinimidyl-propionat eller dimethyl-superimidat indtil en slutkoncentration på 20 µg/ml. pH overvåges kontinuerligt og holdes på den oprindelige værdi ved hjælp af 0,001 molær natriumhydroxid. Efter at tværbinderen er tilsat to gange, får reaktionen lov at forløbe i 30 minutter ved stuetemperatur. Den frie fotoaktive amin skilles fra de enzymbundne forbindelser ved gelfiltrering på "Sephadex"[®] G-10. Adduktet udelukkes sammen med konjugaterne af frit protein og protein-protein. De fleste af disse urenheder har kun meget ringe virkning på DNA-binding. Eventuelt enzym, der er blevet modificeret og stadig bibeholder sin aktivitet, kan kobles på lignende måde.

20 Efter rensningen blandes enzymkonjugatet med DNA i vandig puffer (pH 7,5) og bestråles ved 390 nm i en time. Adduktet fraskilles fra den uomsatte rest på "Sephadex"[®] (G-100)-kolonne. Aktiviteten afprøves på følgende måde: DNA-enzymkonjugat dialyseres mod 10 mmolær EDTA indeholdende puffer (pH 6,2). Til 8 ml af DNA-enzymopløsningen tilsættes 10 ml 60 mmolær mercaptoethanol og 1 ml 50 mmol cystein (frisk fremstillet). Dette behandles som enzymopløsning. Substratopløsningen fremstilles på følgende måde:

592 mg benzoyl-L-arginin-ethylester-hydrochlorid opløses i 30 ml vand (BAEE).

35 Til denne BAEE-opløsning tilsættes 1,6 ml 0,01 molær EDTA, 1,6 ml 0,05 molær cystein frisk frem-

0 stillet, pH justeres til 6,2, og slutvolumen bringes
op på 42 ml.

Fremgangsmåde. Ved hjælp af et pH-meter
fremstilles følgende prøvesystem ved 25°C:

5 5 ml substrat
 5 ml H₂O
 5 ml 3 molær NaCl
 1 ml enzymfortynding.

 Den mængde 0,01 molær NaOH i ml, der kræves
10 for at opretholde et pH på 6,2, noteres. Et tidsrum
på 5 minutter er i reglen tilfredsstillende.

 Eftersom enzym ikke er stabilt ved højere
temperatur, hvis konjugaterne anvendes til hybridise-
ringsanalyser, skal der anvendes lave temperaturer.
15 (Der skal benyttes enten oligonucletider eller en ion-
styrke på under 2 mmolær, så at hybridisering kan ske
ved lave temperatur).

Eksempel 5

20 Der dannes identiske produkter, hvis aminoal-
kylfotoaktive forbindelser fotoreageres først med DNA,
derpå med proteinerne eller enzymer eller haptener.
1 mg/ml DNA og 0,1 mg/ml aminomethyl-trioxsalen blan-
des i vandig puffer med pH 7,5 og fotobestråles ved
25 390 nm i 1 time; produktet fældes med ethanol, genop-
løses derpå i tværbindingspuffer som i eksempel 4, og
resten af proceduren foregår på lignende måde.

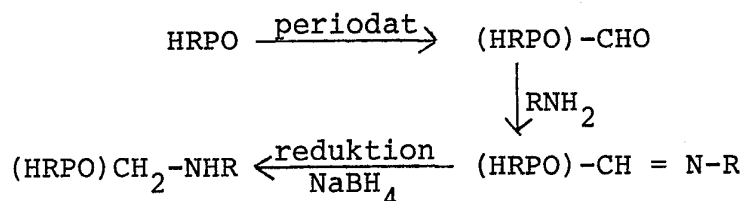
 Hvis monoadduktdannelse er væsentlig, anven-
des monoazidoaminopropyl-methidium- eller aminomethyl-
angelicinforbindelser under ellers identiske forbindel-
30 ser.

Eksempel 6

 Et glycoprotein kan ved hjælp af redox-reak-
35 tion kobles til en alifatisk amin. Et typisk eksempel
gives nedenfor med peberrods-peroxidase-(HRPO)-kobling

til 4'-aminomethyltrioxsalen. Der kan anvendes identiske betingelser med en hvilken som helst aminoalkylforbindelse.

Skema:



Forsøg:

10 mg HRPO (Sigma Chemical Co.) opløses i 2 ml frisk fremstillet 0,3 molær natriumbicarbonat (pH 8,1). Til enzymopløsningen tilsættes 200 mikroliter 1% 2,4-dinitrofluorobenzen i ethanol til blokering af α - og ϵ -aminogrupper og nogle af enzymet hydroxygrupper. Blandingen rystes blidt i en time ved stuetemperatur. Derpå tilsættes 2 ml 80 mmolær natriumperiodat i destilleret vand og blandes i 30 minutter ved stuetemperatur. For at lække det uomsatte periodat tilsættes ethylenglycol til en endelig koncentration på 50 mmolær. Opløsningen dialyseres mod 10 mmolær natriumcarbonatpuffer (pH 9,5) i et koldt rum ($\sim 4^\circ\text{C}$). Til den dialyserede opløsning tilsættes ca. 1 mg fast aminomethyltrioxsalen, og blandingen ryste blidt i 1 time ved 25°C . Der tilsættes 10 mg natriumborhydrid (NaBH_4)-faststof, og reaktionen får lov at forløbe i 12 timer ved 4°C . Adduktet dialyseres mod den DNA-bindende puffer og fotoreageres derpå ved blanding i et vægtforhold på 1:1 (enzym:DNA) som tidligere beskrevet. Adskillelsen af DNA-enzymadduktet fra enzymet sker ved gelfiltrering på en "Sephadex"[®] G-100-kolonne, hvor adduktet udelukkes.

For at forbedre den fotokemiske effektivitet kan der foretages blokering af reaktive HRPO-steder før oxidation med periodat med allylisothiocyanat, som det

er beskrevet af P.K. Nakane m.fl. i Enzyme Labeled Antibodies for Light and Electron Microscopic Localization of Antigens, J. Histochem Cytochem, 14, 790 (1966).

Medmindre andet er anført udføres alle reaktionerne i mørke, eller der opretholdes betingelser med rødt lys.

Perioxidase-aktiviteten måles på følgende måde:

100-500 mikroliter af prøven blandes med 3 ml 14 mmolær para-Cresol i 50 mmolær tris HCl-puffer (pH 7,5). Hertil tilsættes 1 ml 1% H_2O_2 . Efter 2 minutters forløb tilsættes 3 ml 5 mmolær natriumcyanid i vand for at lække reaktionen. Opløsningens fluorescens måles ved magnetisering 320 nm, emission 410 nm. H. Perschke og E. Broda, Nature 190, 257 (1961), M. Roth, Methods of Biochemical Analysis, bd. 17, udg. D. Glick, Interscience Publisher, N.Y., 1969, side 236.

Eksempel 7

Analyse for mærkestoffer efter DNA-DNA-hybridisering.

Et illustrerende eksempel gives her med en DNA-DNA-hybridisering med et enkelt stadium. Den metode, der anvendes, når det drejer sig om hybridisering i to-stadier (USSN 511,063) kan også anvendes. Plasmid pBR322 (New England Biolab) omsættes med restriktionsendonuclease Pst 1 og Pvu 1. Denne dobbeltomsætning giver ét fragment på 126 basepar langs DNA indeholdende den del med ampicillinresistensgen og et andet fragment af 4236 basepar langs DNA. Det 126 basepar lange fragment isoleres ved at foretage dobbeltomsætningen på 5%'s polyacrylamidgel. En del af dette DNA mærkes enten med biotin eller med enzymer som tidligere beskrevet og anvendes som den mærkede sonde. Med henblik på hybridisering bindes pBR322 afskåret med Pst 1 eller analyseprøvens DNA covalent med cellulose ved hjælp af en fotokemisk metode (USSN 511.064) ved

0 hjælp af cyanogenbromid-aktivering eller ved en diazo-
tiseringsmetode (H. Bünemann, Nucleic Acids Res., 10,
7181 (1982)).

5 Cellulosen, der indeholder det denaturerede
DNA, suspenderes i 5 mmolær saltopløsning til hybridise-
ring med enzymkoblet DNA eller suspenderes i 2,4 mol
tetraethylammoniumchlorid, når der anvendes biotinyle-
ret DNA. Derpå foretages hybridiseringen som beskrev-
vet af H. Bünemann i Nucleic Acids Research, 10, 7181
10 (1982) til påvisning af apicillinresistensgenet ved
hjælp af mærket fragment på 126 basepar som sonde.
Ved lavt saltindhold foretages hybridisering ved 30-40°C,
i 2,4 molær (højt saltindhold) mellem 40 og 50°C.

15 Efter hybridisering anvendes FITC-mærket avi-
din til afprøvning for biotin, eller en egentlig enzym-
analyse foretages med partiklerne.

20

25

30

35

P A T E N T K R A V.

1. Mærket nucleinsyresonde, k e n d e t e g n e t ved, at den består af (a) en nucleinsyrekomponent, (b) en nucleinsyrebindende ligand, som ved en fotokemisk reaktion
5 er bundet til nucleinsyrekomponenten, og (c) et mærkestof, som er kemisk bundet til (b).

2. Sonde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den nucleinsyrebindende ligand er en intercalatorforbindelse valgt blandt acridinfarvestoffer, phenanthridiner,
10 phenaziner, furokumariner, phenothiaziner og quinoliner.

3. Sonde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at mærkestoffet (c) er en ligand, der kan bindes specifikt.

4. Sonde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved,
15 at ligandmærkestoffet omfatter haptent eller biotin.

5. Sonde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at mærkestoffet (c) er et enzym, et phycobilliprotein eller en fluorescerende eller luminiscerende gruppe, fortrinsvis en fluoresceingruppe.

20 6. Sonde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at nucleinsyrekomponenten hovedsagelig fuldstændig foreligger i enkeltstrenget form.

7. Sonde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at nucleinsyrekomponenten omfatter en dobbeltstrenget del.
25

8. Fremgangsmåde til fremstilling af en mærket nucleinsyresonde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at nucleinsyrekomponenten bringes i berøring med et mellemprodukt bestående af en nucleinsyrebindende ligand og et
30 mærkestof, som er kemisk bundet dertil, og at nucleinsyrekomponenten og mellemproduktet udsættes for fotokemisk bestråling.

9. Mellemprodukt til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter
35 en nucleinsyrebindende ligand og et mærkestof, som er kemisk bundet dertil.