

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 163383 B

Patentdirektoratet  
TAASTRUP

---

(21) Patentansøgning nr.: 2426/85	(51) Int.Cl.5	G 01 N 33/543
(22) Indleveringsdag: 30 maj 1985		C 12 Q 1/68
(41) Alm. tilgængelig: 02 dec 1985		G 01 N 33/50
(44) Fremlagt: 24 feb 1992		G 01 N 33/58
(86) International ansøgning nr.: -		
(30) Prioritet: 01 jun 1984 US 616132 01 mar 1985 US 707420		
(71) Ansøger: *MILES Inc.; 1127 Myrtle Street; Elkhart; Indiana 46514, US		
(72) Opfinder: Robert J. *Carrico; US		

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

---

(54) Fremgangsmåde og reagenssystem til bestemmelse henholdsvis detektering af en bestemt polynucleotidsekvens i et testmedium indeholdende enkeltstrengede nucleinsyrer

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 5919/84  
Andre publikationer: Biochemistry, bind 17 (1978) side 5791-5798,  
Chem. Abstr. bind 70 (1969) nr. 113344d og bind 98 (1983) nr. 1157 s

(57) Sammen drag

2426-85

Ved en nucleinsyre-hybridiseringsbestemmelse anvendes der en immobiliseret eller immobiliserbar polynucleotid-sonde, der er udvalgt til dannelse af DNA·RNA- eller RNA·RNA-hybrider med den bestemte polynucleotidsekvens, der skal bestemmes. Resulterende hybrider detekteres ved binding med et antistof-reagens, fortrinsvis mærket med en detekterbar kemisk gruppe, der er selektivt til binding af hybriderne i nærværelse af de enkeltstrengede prøve- og sonde-nucleinsyrer. Ingen immobilisering eller mærkning af prøve-nucleinsyrer er nødvendig, og hybridisering kan udføres udelukkende i opløsning.

DK 163383 B

fortsættes

2426-85

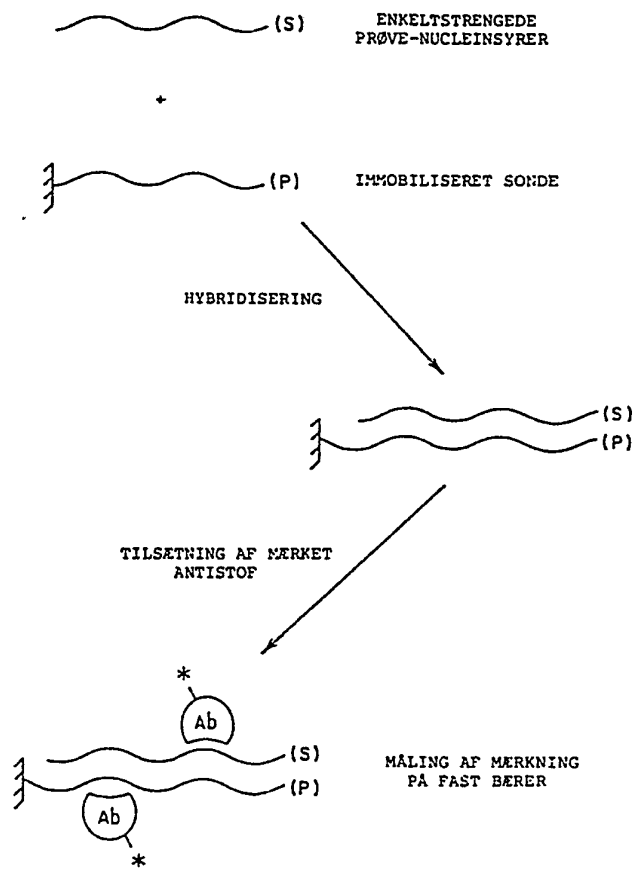


FIG. 1

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til bestemmelse af en bestemt polynucleotidsekvens i et testmedium indeholdende enkeltstrengede nucleinsyrer, ved hvilken man kombinerer testmediet med en sonde, der omfatter  
5 i det mindste én enkeltstrengt basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til den sekvens, der skal bestemmes, og den komplementære sondesekvens, og detekterer hybridiseret sonde ved binding af et antistofreagens, der er i stand til at blive bundet til DNA/RNA- eller RNA/RNA-duplexer, der  
10 dannes mellem den sekvens, der skal bestemmes, og den komplementære sonde-sekvens, og bestemmer det antistofreagens, der bliver bundet til sådanne duplexer, og opfindelsen angår desuden et reagenssystem til detektering af en bestemt polynucleotidsekvens i et testmedium ved nucleinsyre-hybridisering, omfattende (i) en polynucleotid-sonde, der indeholder  
15 i det mindste én enkeltstrengt basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til den sekvens, der skal bestemmes, og (ii) et antistof-reagens, der kan bindes til DNA/RNA- eller RNA/RNA-duplexer, der dannes mellem den sekvens, der  
20 skal bestemmes, og den komplementære sonde-sekvens.

Princippet for nucleinsyre-hybridiserings-bestemmelser er blevet udviklet af forskere på rekombinant-DNA-området som et middel til bestemmelse og isolering af bestemte polynucleotid-basesekvenser, der har interesse. Det vist sig,  
25 at enkeltstrengede nucleinsyrer, f.eks. DNA og RNA, således som opnået ved denaturering af deres dobbeltstrengede former, vil hybridisere eller rekombinere under passende betingelser med komplementære, enkeltstrengede nucleinsyrer. Ved mærkning af sådanne komplementære sonde-nucleinsyrer med en  
30 let detekterbar kemisk gruppe blev det dernæst gjort muligt at detektere tilstedeværelsen af enhver polynucleotidsekvens af interesse i et testmedium indeholdende prøve-nucleinsyrer på enkeltstrengt form.

Foruden på rekombinant-DNA-området kan den analytiske hybridiseringsteknik anvendes til detektering af betydningsfulde nucleotider i den humane og veterinære medicin,  
35

0

i landbruget, i næringsmiddelvidenskaben og på andre områder. I særdeleshed kan teknikken anvendes til detektering og identifikation af etiologiske midler såsom bakterier og vira, til screening af bakterier for antibiotisk resistens, til hjælp ved diagnose af genetisk unormale tilstande, f.eks. seglcelleanæmi og thalassemia, samt til detektering af cancerceller. En generel oversigt over teknikken og dens nuværende og fremtidige signifikans fremgår af Biotechnology (august 1983), side 471-478.

10

De nucleinsyre-hybridiserings-bestemmelsesmetoder, der hører til teknikkens stadiet, omfatter i almindelighed immobilisering af prøve-nucleinsyren på en fast bærer. Hybridisering mellem bestemte basesekvenser eller gener af interesse i prøve-nucleinsyren bestemmes ved adskillelse af den faste bærer fra den resterende del af reaktionsblandingen, som indeholder ubundet mærket sonde, efterfulgt af detektering af mærkningen på den faste bærer.

15

Nødvendigheden af at immobilisere prøve-nucleinsyrer for at kunne udføre hybridiseringsbestemmelsen ifølge den kendte teknik frembyder to signifikante problemer. For det første er de procedurer, der kræves til at gennemføre immobiliseringen, tidsrøvende og tilføjer et trin, der er uønsket til rutineanvendelse af teknikken i et klinisk laboratorium. For det andet kan proteiner og andre materialer i den heterogene prøve, navnlig i tilfælde af kliniske prøver, interferere med immobiliseringen af nucleinsyrerne.

20

25

Som alternativer til immobilisering af prøve-nucleinsyrer og tilsætning af mærket sonde kan man anvende en immobiliseret sonde og mærke prøve-nucleinsyrerne in situ, eller man kan anvende en dobbelt-hybridiseringsteknik, der kræver to sonder, hvoraf den ene immobiliseres, og den anden mærkes, jfr. Methods in Enzymology 65, 468 (1968) samt Gene 21, 77-86 (1983). Det førstnævnte alternativ er imidlertid mindre ønskeligt, eftersom mærkningen af prøve-nucleinsyrerne in situ kræver en høj grad af teknisk ekspertise, der ikke rutinemæssigt findes hos kliniske teknikere, og der fin-

30

35

0

des ingen enkle og pålidelige metoder til styring af mærkningsudbyttet, hvilket kan være et signifikant problem, såfremt mærkningsmedierne indeholder varierende mængder af inhibitorer for mærkningsreaktionen. Den dobbelte hybridiserings-

5 ringsteknik har de ulemper, at den kræver et yderligere reagens- og inkuberingstrin, og de kinetiske forhold ved hybridiseringsreaktionen kan være langsomme og ineffektive. Nøjagtigheden af bestemmelsen kan også variere, såfremt komplementariteten af de to sonder med prøve-sekvensen er variabel.

10

Metoder til direkte detektering af det polynucleotid-duplex, der dannes som produktet af hybridisering mellem prøve- og sonde-polynucleotiderne, idet der herved undgås kemisk mærkning og immobilisering af prøve- eller sonde-polynucleotider, har generelt vist sig at være utilfredsstillende.

15 Forsøg på at frembringe antistoffer, der selektivt vil binde dobbeltstrengede DNA/DNA-hybrider via enkeltstrengt DNA, er slået fejl, jfr. Parker og Halloran, "Nucleic Acids in Immunology", ed. Plescia og Braun, Springer-Verlag, NY (1969), side 18 ff. Der er blevet opnået nogen succes ved frembringelse af antistoffer, der vil binde DNA/RNA-blandede

20 hybrider eller RNA/RNA-hybrider og har lav affinitet til de enkeltstrengede polynucleotider, jfr. f.eks. Rudkin og Stollar, Nature 265, 472 (1977). Rudkin og Stollar fikserede hele celler på mikroskop-objektglas og afdækkede DNA'en

25 i kernen. Den blev hybridiseret med en RNA-sonde, og hybrididen blev detekteret ved fluorescensmikroskopi med fluorescein-mærket antistof til DNA/RNA. Disse metoder er imidlertid beskrevet, ligesom i tilfælde af de ovenfor diskuterede hybridiseringsmetoder under anvendelse af mærkede son-

30 der, som krævende immobilisering af prøve-nucleinsyrerne. Immobilisering af cellulær DNA til in situ-hybridisering er særlig svag, fordi DNA'en skal forblive fikseret til skrøbelige cellerester under hybridiseringen og immunkemiske detekteringstrin. De resultater, der iagttages ved fluorescens-

35 mikroskopi, giver ikke kvantitative data vedrørende mængden af dannet hybrid.

Der forefindes således et fastslået behov for en nucleinsyre-hybridiseringsbestemmelse, der ikke kræver immobilisering eller mærkning af prøve-nucleinsyrer, og som ikke kræver dobbeltsonder. Endvidere bør en sådan teknik tillade anvendelsen af en række forskellige mærkninger, navnlig af den ikke-radioisotope type. Tilvejebringelsen af en nucleinsyre-hybridiseringsbestemmelsesmetode og et reagenssystem med disse og andre fordele er hovedformålet med den foreliggende opfindelse.

10 Der er nu ifølge opfindelsen blevet tilvejebragt en nucleinsyre-hybridiseringsbestemmelsesmetode, som eliminerer nødvendigheden af at immobilisere eller mærke prøve-nucleinsyrer, og som kun kræver et enkelt sonde-element. Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes der en fremgangsmåde  
15 til bestemmelse af en bestemt polynucleotidsekvens i et egnet testmedium indeholdende enkeltstrengede nucleinsyrer. Testmediet kombineres med en immobiliseret eller immobiliserbar polynucleotid-sonde, der omfatter i det mindste én enkeltstrengt basesekvens, der er i det væsentlige komplementær  
20 til den sekvens, der skal bestemmes, under betingelser, der er favorable for hybridisering mellem den sekvens, der skal bestemmes, og den komplementære sonde-sekvens. Den komplementære sonde-sekvens vil udvælges således, at den i det væsentlige er sammensat af RNA, når den sekvens, der skal bestemmes, er RNA eller DNA, hvilket vil sige, at en sådan sonde-sekvens kan vælges til at være RNA, når den prøve-sekvens, der har interesse, er RNA eller DNA. Når alternativt prøve-sekvensen, der har interesse, er RNA, kan den komplementære sonde-sekvens vælges til at være i det væsentlige sammensat af enten DNA eller RNA. Hybrider, der fremkommer som et  
30 resultat af hybridisering mellem sonde- og prøve-sekvensen, vil således være DNA/RNA- eller RNA/RNA-duplexer.

De resulterende hybrider kan dernæst detekteres, efter eller samtidig med immobilisering af sonden, når en sådan kombineres med testmediet i en immobiliserbar form, ved  
35 tilsætning af et antistofreagens, der er i stand til at bli-

ve bundet til de dannede DNA/RNA- eller RNA/RNA-duplexer, hvorpå man bestemmer det antistofreagens, der bliver bundet til sådanne duplexer. Der kan anvendes en række forskellige metoder og reagenskombinationer til udførelse af den foreliggende metodes princip. Betydningsfulde træk ved den foreliggende opfindelse er, at prøve-nucleinsyrerne ikke immobiliseres eller behøver at blive mærket inden kontakt med sonden.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der er af den allerede i det foregående angivne art, er således ejendommelig ved, at sonden er en immobiliseret RNA- eller DNA-sonde, og reagenssystemet ifølge opfindelsen, der er af den ligeledes i det foregående angivne art, er ejendommeligt ved, at sonden er immobiliseret RNA- eller DNA-sonde.

I Chemical Abstracts 70 (1969), nr. 113344d beskrives fremstillingen af anti-RNA/RNA-antiserum, der undersøges for specificitet ved todimensional immunodiffusion og komplement-fikseringsteknik. Der udføres imidlertid ingen hybridiseringsbestemmelser, og der stilles ingen forslag om anvendelse af immobiliserede eller immobiliserbare sonder ved hybridiseringsbestemmelser.

I Chemical Abstracts 98 (1983), nr. 1157s er der beskrevet en indirekte fluorescens-immunocytologisk metode til visualisering af DNA/RNA-hybrider dannet på vævssektioner. Specifikke DNA-sekvenser i chromosomerne af celler fikseret til glasplader detekteres ved hybridisering med RNA-sonder efterfulgt af binding af anti-DNA/RNA-antistoffer. Den beskrevne bestemmelse involverer således immobilisering af prøve-polynucleotidstrengen i stedet for sonde-strengen som ifølge den foreliggende opfindelse.

Ifølge Biochemistry 17, nr. 26, 5791-5798 (1978) anvendes der anti-DNA/RNA til rensning af DNA, der koder for en bestemt rRNA, der har interesse. Som i den ovenfor først omtalte artikel i Chemical Abstracts udføres der ingen hybridiseringsbestemmelser, og der stilles ingen forslag om at anvende immobiliserede eller immobiliserbare sonder ved

hybridiseringsbestemmelser.

Antistofreagenset er nøglen til specifik og følsom detektering af hybridisering mellem sonde- og prøve-nucleinsyrerne. Naturligvis kan hele antistoffer eller passende  
5 fragmenter og polyfunktionelle former deraf anvendes som nærmere beskrevet i det følgende, og det vil forstås, at udtrykket "antistofreagens", således som det anvendes i det følgende, skal betyde hele antistoffer og deres polyfunktionelle og fragmenterede former, medmindre andet er angivet.

10 Bestemmelse af binding af antistofreagenset til hybridiserings-duplexer kan udføres på enhver bekvem måde. Det foretrækkes, at antistofreagenset mærkes med en detekterbar kemisk gruppe, f.eks. en enzymatisk aktiv gruppe, et fluorescerende middel, en chromophor, et luminescerende middel,  
15 en ligand, der kan bindes specifikt, eller en radioisotop, idet ikke-radioisotope mærkninger navnlig foretrækkes. Det mærkede antistofreagens, der bliver bundet til resulterende immobiliserede hybrid-duplexer, kan let skilles fra det reagens, der ikke bliver bundet på denne måde, og den detekterbare kemiske gruppe eller mærkning måles i hver særskilt  
20 fraktion, sædvanligvis i den førstnævnte.

Ved eliminering af nødvendigheden af at immobilisere eller mærke prøve-nucleinsyrerne tilvejebringes der med den foreliggende opfindelse en i høj grad fordelagtig hybridiserings-bestemmelsesteknik. Den person, der udfører analysen, behøver ikke at have særlige kvalifikationer eller at anvende megen tid på udførelsen af immobiliserings- eller mærknings-procedurerne. Der opnås endvidere fuldstændig  
25 eliminering af potentialet for prøve-interferenser med immobiliseringsproceduren. Det testsæt, der tilvejebringes til den kliniske bruger, vil omfatte den allerede immobiliserede sonde eller denne i en let immobiliserbar form, f.eks. ved binding til en immobiliseret bindingspartner. I systemerne ifølge den kendte teknik kan interferenser fra frem-  
35 medproteiner og andre materialer i prøven være et alvor-

0

ligt problem, hvadenten de prøve-nucleinsyrer, der skal immobiliseres, er RNA eller DNA.

Ved metoderne ifølge den kendte teknik gennemføres immobiliseringen ved adsorption på en mikroporøs membran, f.eks. nitrocellulose, eller ved covalent binding til reaktive steder på en fast bærer. I det førstnævnte tilfælde kan proteiner fra prøven overtrække overfladen og blokere adsorptionen af nucleinsyrer. Endvidere kræver mange procedurer varmebehandling ved forhøjede temperaturer, almindeligvis højere end 80°C, i vakuum til fiksering af adsorberede nucleinsyrer til bæreren. Såfremt slimstoffer eller andre materialer, der er endogene i forhold til prøven, er til stede, kan de blive tørret til bæreren til dannelse af en film, som kan adsorbere den mærkede sonde under hybridisering og forøge baggrundssignalet og som følge deraf nedsætte sensitiviteten. Såfremt et enzym eller et andet proteinstof er involveret i detekteringen af mærkningen, kan dette også ofte bindes ikke-specifikt til filmen og bidrage yderligere til baggrundsproblemet. Såfremt der anvendes covalent immobilisering, kan proteiner og andre materialer fra prøven forventes at have tilgængelige reaktive grupper, der vil deltage i koblingsreaktionen og neutralisere koblingen af de ønskede nucleinsyrer.

Eftersom der med den foreliggende opfindelse tilvejebringes den omhandlede sonde i foretrukne udførelsesformer på en allerede immobiliseret form eller på en form, der let immobiliseres ved binding til en immobiliseret bindingspartner, overvindes de ineffektiviteter, der er iboende i den kendte tekniks immobiliseringsmetoder, og derved opretholdes bestemmelsens detekteringsgrænser. En yderligere fordel består i, at ikke-specifik binding af prøve-RNA eller -DNA til den faste bærer ikke genkendes af antistofreagenset. Baggrundssignalet vil derfor være lavt, og detekteringsgrænsen forbedres tilsvarende. I forhold til den dobbelte hybridiseringsmetode, ved hvilken der anvendes såvel en mærket sonde som en immobi-

35

0

liseret sonde, kan det mærkede nucleotid bindes ikke-specifikt til den faste bærer og bidrage til baggrundssignal. Dette er ikke en mulighed ved den foreliggende fremgangsmåde, eftersom der ikke er involveret nogen mærket sonde.

5

På tegningen er der skematisk illustreret foretrukne fremgangsmåder til udøvelse af den foreliggende opfindelse. Anvendelsen af nucleinsyre-hybridisering som et analytisk værktøj er fundamentalt baseret på den dobbeltstrengede duplex-struktur af DNA. Hydrogenbindingerne mellem purin- og pyrimidinbaserne i de respektive strenge i dobbeltstrengt DNA kan opbrydes reversibelt. De to komplementære enkeltstrenge af DNA, der er resultatet af denne opsmeltning eller denaturering af DNA, vil associeres (også betegnet genforstærkning eller hybridisering) til gendannelse af duplex-strukturen. Som det nu er velkendt i teknikken, vil kontakt med en første enkeltstrengt nucleinsyre, enten DNA eller RNA, som indeholder en basesekvens, der er tilstrækkeligt komplementær til en anden enkeltstrengt nucleinsyre under passende opløsningsbetingelser, resultere i dannelsen af DNA/DNA-, DNA/RNA- eller RNA/RNA-hybrider, alt efter forholdene.

I den udførelsesform, der er vist i fig. 1 på tegningen, bringes de enkeltstrengede prøve-nucleinsyrer i kontakt med den immobiliserede sonde under favorable hybridiseringsbetingelser. De resulterende immobiliserede, hybridiserede duplexer, eventuelt efter adskillelse af sådanne duplexer fra resten af reaktionsblandingen, bringes i kontakt med en mærket form af antistoffer, der er specifikke for DNA/RNA- eller RNA/RNA-duplexerne. Efter vaskning til fjernelse af ubundet, mærket antistof, måles den mærkning, der er til stede på den faste bærer.

I den udførelsesform, der er illustreret i fig. 2 på tegningen, bringes de enkeltstrengede prøve-nucleinsyrer i kontakt med en opløselig form for sonden, der er blevet passende kemisk modificeret til at omfatte biotindele, der kan

35

0 bindes. Til de resulterende, opløselige hybrider, som dan-  
nes, sættes der en immobiliseret form for avidin, en bin-  
dingspartner for biotin, hvilket resulterer i dannelse af  
immobiliserede hybrider. De således immobiliserede duplex-  
5 er, eventuelt efter adskillelse deraf fra resten af reak-  
tionsblandingen, bringes i kontakt med mærkede anti-hybrid-  
-antistoffer, og efter vaskning måles den mærkning, der er  
til stede på den faste bærer på samme måde som ovenfor.

#### 10 Sonden

Sonden vil indeholde mindst én enkeltstrenget base-  
sekvens, der er i det væsentlige komplementær til den se-  
kvens, der skal detekteres. En sådan basesekvens behøver  
imidlertid ikke at være et enkelt kontinuerligt polynucleo-  
15 tid-segment, men kan være sammensat af to eller flere indi-  
viduelle segmenter, der er afbrudt af ikke-komplementære  
sekvenser. Disse ikke-hybridiserbare sekvenser kan være li-  
neære, eller de kan være selv-komplementære og danne hårnå-  
lesløjfer. Desuden kan den komplementære region af sonden  
20 være flankeret ved 3'-og 5'-terminalerne af ikke-hybridi-  
serbare sekvenser, f.eks. de, der indeholder DNA'en eller  
RNA'en af en vektor, hvori den komplementære sekvens er ble-  
vet indsat til propagering. I hvert enkelt tilfælde vil son-  
den som præsenteret som et analytisk reagens udvise detek-  
25 terbar hybridisering ved et eller flere punkter med de prø-  
ve-nucleinsyrer, der har interesse. Lineære eller cirkulæ-  
re, enkeltstrengede polynucleotider kan anvendes som sonde-  
-elementet, idet væsentlige eller mindre portioner danner  
duplex med en komplementær polynucleotidstreng eller -stren-  
30 ge, forudsat at det kritiske homologe segment eller segmen-  
ter er på enkeltstrenget form og tilgængelig til hybridise-  
ring med prøve-DNA eller -RNA, og forudsat, at det antistof-  
reagens, der udvælges til anvendelse sammen med sonden, ikke  
på signifikant måde krydsreagerer med de dobbeltstrengede  
35 regioner i sonden, f.eks. når antistofreagenset er specifikt

0 for DNA/RNA-hybrider, og sonden indeholder RNA/RNA-dobbelt-  
strengede regioner eller omvendt. Den komplementære sonde-  
sekvens kan have enhver bekvem eller ønsket længde, der  
strækker sig fra så lidt som et dusin til så mange som  
5 10.000 baser, og inkluderende oligonucleotider med mindre  
end ca. 50 baser.

RNA- eller DNA-sonden kan fås på en række forskel-  
lige konventionelle måder. Eksempelvis kan RNA i tilfælde  
af RNA-sonder isoleres som det naturlige produkt af celler,  
10 f.eks. som 5s, 16s og 23s ribosomale RNA'er fra bakterier  
eller celleoverførings-RNA'er. Det er også praktisk muligt  
at isolere specifikke budbringer-RNA'er fra celler, der er  
specialiseret i produktion af store mængder af et protein,  
for hvilket budbringeren koder.

15 In vitro-syntese af RNA-sonder kan udføres med en  
vektor, der indeholder den meget aktive Salmonella typhi-  
murium bakteriofag SP6-transskriptions-promotor, jfr. Green  
et al (1983), Celle 32, 681. En vektor med multiple restriktions-  
endonuclease-steder stødende op til promotoren kan fås  
20 fra Promega Biotec, Madison, WI. En DNA-sonde kloner i vek-  
toren, som dernæst propageres i en bakterievært. Multiple  
RNA-kopier af den klonede DNA-sonde kan syntetiseres in vi-  
tro under anvendelse af DNA-afhængig RNA-polymerase fra bak-  
teriofag SP6.

25 DNA-sonder kan fremstilles ud fra en række forskel-  
lige kilder. Et helt bakterie-genom kan immobiliseres til  
en hybridiseringsbestemmelse, der er beregnet til detekte-  
ring af bakterier i en typisk steril prøve. Ved bestemmel-  
sen vil det være muligt at detektere talrige bakterie-RNA'er,  
30 f.eks. ribosimale RNA'er og transfer-RNA'er. Alternativt kan  
specifikke DNA-sekvenser, der er komplementære til cellulære  
RNA'er, kloner ind i velkendte plasmid- eller viral-vektor-  
er og anvendes som hybridiseringssonder.

Det vil forstås, at når udtrykkene "RNA-sonde" og  
35 "DNA-sonde" anvendes, er det ikke hensigten, at alle nucleo-

0 tider indeholdt i sonden skal være ribonucleotider eller 2'-  
-desoxyribonucleotider. Det fundamentale træk ved en RNA-  
eller DNA-sonde til den foreliggende opfindelses formål er,  
at sonden skal være af en sådan karakter, at den muliggør  
5 stimulering af antistoffer til DNA/RNA- eller RNA/RNA-hy-  
brider indeholdende en RNA- eller DNA-sonde, som ikke kryds-  
reagerer i en analytisk signifikant grad med de individuelle  
enkelte strenge, der danner sådanne hybrider. En eller flere  
af 2'-stillingerne på de nucleotider, der er indeholdt i son-  
10 den, kan derfor modificeres kemisk, forudsat at antistof-bin-  
dingsegenskaberne, der er nødvendige til udførelsen af den  
foreliggende bestemmelse, opretholdes i en væsentlig grad.  
Ligeledes kan en sonde, udover eller alternativt til en så-  
dan begrænset 2'-desoxy-modifikation, i almindelighed have  
15 enhver anden modifikation langs dens ribose-phosphat-skelet,  
forudsat at der ikke er nogen væsentlig interferens med spe-  
cificiteten af antistoffet til det dobbeltstrengede hybridi-  
seringsprodukt, sammenlignet med dets individuelle enkelte  
strenge.

20 Når sådanne modifikationer eksisterer i en RNA- eller  
DNA-sonde, vil det immunogen, der anvendes til at frembringe  
antistofreagenset, fortrinsvis omfatte én streng, der har i  
det væsentlige tilsvarende modifikationer, idet den anden  
streng er i det væsentlige umodificeret RNA eller DNA afhæn-  
25 gigt af, om det er prøve-RNA eller -DNA, som det er hensig-  
ten at detektere. Fortrinsvis vil den modificerede streng i  
immunogenet være identisk med den modificerede streng i en  
RNA- eller DNA-sonde. Et eksempel på et immunogen er hybri-  
den poly-(2'-O-methyladenylsyre)·poly(2'-desoxythymidylsyre).  
30 Et andet eksempel er poly-(2'-O-ethylinosinsyre)·poly-(ribo-  
cytidylsyre). De følgende eksempler er yderligere eksempler  
på modificerede nucleotider, der kan være indeholdt i en mo-  
dificeret sonde: 2'-O-methylribonucleotid, 2'-O-ethylribonu-  
cleotid, 2'-azidodesoxyribonucleotid, 2'-chlordesoxyribonu-  
35 cleotid, 2'-O-acetylribonucleotid og phosphorthiolaterne el-

0 ler methylphosphonaterne af ribonucleotider eller desoxy-  
ribonucleotider. Modificerede nucleotider kan forekomme i  
sonder som et resultat af indføring under enzymatisk syn-  
5 -5'-O-(1-thiotriphosphat) (ATP $\alpha$ S) og dATP $\alpha$ S substrater for  
henholdsvis DNA-afhængige RNA-polymeraser og DNA-polymera-  
ser. Alternativt kan den kemiske modifikation indføres, ef-  
ter at sonden er blevet fremstillet. Eksempelvis kan en RNA-  
-sonde 2'-O-acetyleres med eddikesyreanhydrid under milde  
10 betingelser i et vandigt opløsningsmiddel, jfr. D.L. Steward  
et al., (1972), Biochim. Biophys. Acta 262, 227.

Den kritiske egenskab af en RNA- eller DNA-sonde til  
den her omhandlede anvendelse er, at antistoffer frembragt  
mod sonden duplexeret med en komplementær RNA- eller DNA-  
15 -streng efter ønske, i deres bindingsegenskaber vil skelne  
mellem duplex-formen af sonden og enkeltstrengede nuclein-  
syrer. Det er denne egenskab, der muliggør detektering af  
hybridiseret sonde i analyseblandingen uden signifikant bag-  
grundsbinding til den uhybridiserede, enkeltstrengede form  
20 af sonden eller vilkårlige, ikke-specifikt bundne, enkelt-  
strengede prøve-nucleinsyrer. Medens som ovenfor beskrevet  
visse modifikationer langs ribonucleotid- eller desoxyribo-  
nucleotid-strengen kan tolereres uden tab af antistof-skel-  
nen af duplexet fra enkeltstrengede, vil det almindeligvis  
25 foretrækkes at anvende RNA-sonder, der er sammensat udeluk-  
kende af ribonucleotider, når prøve-polynucleotidet er RNA  
eller DNA. DNA-sonder kan anvendes med fordel, når prøven  
er RNA.

### 30 Immobilisering af sonden

Som allerede beskrevet anvendes sonden til hybridi-  
sering med prøve-nucleinsyrer på enten en immobiliseret el-  
ler en immobiliserbar form. En immobiliserbar form af son-  
den vil være en form, på hvilken sonden bekvemt kan gøres  
35 immobiliseret efter hybridiseringsreaktionen. De midler,

0 ved hjælp af hvilke sonden til sidst immobiliseres, er ikke kritiske for den foreliggende opfindelse, og der kan anvendes enhver tilgængelig metode, sålænge hybrider dannet mellem sonden og den sekvens, der har interesse, immobiliseres ved hjælp af en egenskab af sonden. Prøve-nucleinsy-  
5 rer underkastes således ikke direkte immobilisering.

Når sonden anvendes til hybridiseringsreaktionen på en immobiliseret form, kan den have enhver egnet form, der bevirker, at sonden og vilkårlige bestanddele af reaktions-  
10 blandingen, der er blevet associeret dermed ved hybridisering og/eller ved binding af anti-hybrid-reagenset, derefter kan isoleres eller adskilles fra den resterende blanding ved f.eks. centrifugering, filtrering, chromatografi eller dekantering. En række forskellige sammensætninger og  
15 konfigurationer af en immobiliseret sonde vil således være åbenbare og tilgængelige for fagmanden på området. I det væsentlige enhver form for sonden, der er uopløselig i reaktionsblandingen, kan anvendes. Eksempelvis kan sonden aggregeres eller på anden måde udfældes, bundet til et uopløseligt materiale, en polymer eller en bærer, eller inde-  
20 sluttet i en gel såsom agarose eller polyacrylamid, jfr. Meth. Enzymol. 12B, 635 (1968) og PNAS 67, 807 (1970). Det foretrækkes navnlig at anvende en fast bærer, hvortil sonden er knyttet eller fikseret ved covalente eller ikke-  
25 -covalente bindinger, idet sidstnævnte omfatter adsorptionsmetoder, der tilvejebringer en passende stabil og kraftig tilknytning. Den faste bærer kan antage en række forskellige former og sammensætninger, herunder mikropartikler, perler, porøse og impermeable strimler og membraner, den indre  
30 overflade af reaktionskar, f.eks. reagensglas og mikrotiterplader, og lignende. Midler til binding af en ønsket reaktionspartner til en udvalgt fast bærer vil være en rutinesag for fagmanden på området.

En metode til adsorption af sonden på nitrocellulose-  
35 membraner involverer mætning af en opløsning af sonde med

0

natriumiodid og anbringelse af pletter eller filtrering af aliquoter på membranen, jfr. Bresser et al., (1983), DNA 2, 243. Natriumiodidet letter denaturering af sonden og forøger adsorptionen på membranen. Alternativt kan sonden be-

5 handles med glyoxal, sædvanligvis ved koncentrationer omkring 1 molær, og dernæst adsorberes på membranen. Sonden fikseres ved varmebehandling ved ca. 80°C under vakuum i et tidsrum af størrelsesorden fra 2-4 timer, jfr. P.S. Thomas, (1983), Meth. in Enzymol. 100, 255.

10

Covalent immobilisering af RNA- eller DNA-sonder kan også udføres. Der kan anvendes en lang række forskellige bærematerialer og koblingsmetoder. Eksempelvis kan sonden kobles til phosphocellulose gennem fosfatgrupper aktiveret med carbodiimid eller carbonyldiimidazol, jfr. E.K.F. Bautz og B.D. Hall, (1962), Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 48, 400-408, T.Y. Shih og M.A. Martin, (1974), Biochem. 13, 3411-3418. Også diazogrupeer på m-diazobenzoyloxymethylcellulose kan reagere med guanin- og thymidin-rester af polynucleotidet, jfr. B.E. Noyes og G.R. Stark, (1975), Cell 5, 301-310,

15 J. Reiser et al., (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1104-1112. Polysaccharid-bærere eller -understøtninger kan også anvendes med kobling gennem phosphodiester-bindinger dannet mellem det terminale fosfat af polynucleotidet og understøtningens hydroxylgrupper ved vandopløseligt carbodiimid-aktivering, jfr. D. Richwood, (1972), Biochim. Biophys. Acta 269, 47-50, P.T. Gilham, (1968), Biochem. 7, 2809-2813, eller ved kobling af nucleofile steder på polynucleotidet med en cyanogenbromid-aktiveret bærer, jfr. D.J. Arndt-Jovin et al., (1975), Eur. J. Biochem. 54, 411-418 og

20 U. Linberg og S. Eriksson, (1971), Eur. J. Biochem. 18, 474-479. Endvidere kan 3'-hydroxyl-terminalen af sonden oxideres med periodat og kobles ved Schiff-basedannelse med understøtninger, der bærer amin- eller hydrazidgrupper, jfr. P.T. Gilham, (1971), Method. Enzymol. 21, 191-197 og H.D. Hansske et al., (1979), Method. Enzymol. 59, 172-181. Un-

25  
30  
35

0

derstøtninger med nucleofile steder kan omsættes med cyanurchlorid og derpå med polynucleotidet, jfr. H.D. Hunger et al., (1981), Biochem. Biophys. Acta 653, 344-349.

5 I almindelighed kan der anvendes en vilkårlig metode til immobilisering af sonden, forudsat at den komplementære enkeltstrengede sekvens er tilgængelig til hybridisering til prøve-nucleinsyrer. Bestemte metoder eller materialer er ikke kritiske for den foreliggende opfindelse.

10 Et særlig attraktivt alternativ til anvendelse af direkte immobiliseret sonde er anvendelsen af en immobiliserbar form for sonde, der tillader, at hybridiseringen foregår i opløsning, hvor de kinetiske forhold er hurtigere. Normalt vil man ved en sådan udførelsesform anvende en sonde, der omfatter et reaktivt sted, der er i stand til at danne  
15 en stabil covalent eller ikke-covalent binding med en reaktionspartner og opnå immobilisering ved udsættelse for en immobiliseret form for en sådan reaktionspartner. Fortrinsvis er et sådant reaktivt sted i sonden et bindingssted, f.eks. en biotin- eller haptendel, der kan bindes specifikt og ikke-covalent med et bindingsstof, f.eks. avidin eller et anti-  
20 stof, der tjener som reaktionspartneren.

I det væsentlige ethvert par af stoffer kan omfatte parret af reaktivt sted/reaktiv partner, der udviser en passende affinitet til reaktion til dannelse af en stabil binding, dvs. en binding eller kobling mellem de to, der forbliver i det væsentlige intakte under de påfølgende analyse-  
25 trin, principielt adskillelses- og detekterings-trinene. Den dannede binding kan være en covalent binding eller en ikke-covalent sammenknytning, idet sidstnævnte især foretrækkes, når den er karakteriseret ved en grad af selektivitet eller  
30 specificitet. I tilfælde af en sådan foretrukken bindingsdannelse vil det reaktive sted på sonden blive betegnet som et bindingssted, og reaktionspartneren som et bindingsstof, hvormed den danner en ikke-covalent, almindeligvis specifik binding eller sammenknytning.  
35

0

I en sådan foretrukken udførelsesform kan bindingsstedet være til stede i en enkeltstrenget hybridiserbar del eller i en enkeltstrenget eller dobbeltstrenget, ikke-hybridiserbar del af sonden eller kan være til stede som et resultat af en kemisk modifikation af sonden. Eksempler på bindingssteder, der eksisterer i nucleotidsekvensen, findes, når sonden omfatter en promotorsekvens, f.eks. lac-promotor eller trp-promotor, der kan bindes med et promotor-protein, f.eks. bakteriofag-promotorer, RNA-polymerase, eller omfatter en operator-sekvens, f.eks. lac-operator, der kan bindes ved hjælp af et repressor-protein, f.eks. lac-repressor, eller omfatter sjældne, antigene nucleotider eller sekvenser, f.eks. 5-brom- eller 5-iod-desoxy-uridin eller Z-DNA, der kan bindes ved hjælp af specifikke antistoffer, jfr. også GB patentskrift nr. 2.125.964. Bindingssteder indført ved kemisk modifikation af det polynucleotid, der er indeholdt i sonden, er særlig nyttige og involverer normalt binding af en del af et specifikt bindingspar til sonde-nucleinsyren. Egnede bindingspar, hvorfra der kan vælges, omfatter biotin/avidin (inklusive æggehvide-avidin og streptavidin), haptener og antigener/antistoffer, carbonhydrater/lectiner, enzymer/inhibitorer og lignende. Når bindingsparret består af en proteindelen og en ikke-proteindelen, vil det normalt være foretrukket at binde ikke-proteindelen til sonden, eftersom protein-delen kan være instabil under denatureringsbetingelserne ved hybridisering af sonden. Foretrukne systemer omfatter binding af sonden med biotin eller et haptent og anvendelse af immobiliseret avidin eller anti-haptent-antistofreagens.

25

Når sonden anvendes til hybridisering med den sekvens, der har interesse, på en immobiliserbar form, kan de påfølgende trin med immobilisering af de dannede duplexer ved hjælp af en egenskab af sonden og tilsætning af anti-hybrid-antistofreagenset, foregå i en vilkårlig ønsket orden. Immobilisering og anti-hybrid-tilsætning kan udføres ved samtidig tilsætning af de involverede reagenser og materialer,

35

0 eller den ene operation kan gå forud for den anden, med el-  
ler uden indskudte vaske- eller adskillelsestrin, og i vil-  
kårlig rækkefølge. Når ordnede tilsætninger følges, vil man  
naturligvis tage koncentrationerne af de tilsatte reagenser  
5 i betragtning, således at man ikke overmætter de dannede hy-  
brider og inhiberer interaktion dermed af de øvrige tilsatte  
materialer.

Skønt immobiliserede sonder eller immobiliserbare son-  
der, der bliver bundet til faste bærere ved specifikke bin-  
10 dingsprocesser, der er beskrevet ovenfor, foretrækkes, kan  
immobiliserbare sonder bindes til bærere ved processer med  
forholdsvis lav specificitet. I dette tilfælde vil bæreren  
binde den hybridiserede sonde, men ikke den ikke-hybridise-  
rede form. Mængden af hybrid måles dernæst med antistof-rea-  
15 genset. Et eksempel på en bærer af denne type er hydroxyl-  
apatit, der binder DNA/RNA- og RNA/RNA-duplexer, men ikke  
den enkeltstrengede type, jfr. Brenner og Falkow, Adv. in  
Genet. 16, 81 (1973).

En kemisk aktiv eller aktiverbar gruppe kan også ind-  
20 føres i sonden og tillades at reagere med den faste bærer  
efter hybridiseringen. Dette system vil give en covalent im-  
mobiliseret sonde, og mængden af hybrid, der er koblet til  
bæreren, kan bestemmes med antistofreagenset.

#### 25 Anti-hybrid-antistofreagens og detekteringsmetoder

Det her omhandlede antistofreagens er principielt  
karakteriseret ved dets evne til at binde de DNA/RNA- eller  
RNA/RNA-hybrider, der dannes mellem sonden og komplementæ-  
re prøve-nucleinsyrer til signifikant udelukkelse af enkelt-  
30 strengede polynucleotider. Som allerede angivet ovenfor kan  
antistofreagenset bestå af hele antistoffer, antistof-frag-  
menter, polyfunktionelle antistof-aggregater eller i almin-  
delighed ethvert stof, der omfatter et eller flere speci-  
fikke bindingssteder fra et antistof for RNA/RNA eller  
35 DNA/RNA, alt efter tilfældet. Når stoffet har form af et

0 helt antistof, kan det tilhøre enhver af klasserne og un-  
derklasserne af kendte immunoglobuliner, f.eks. IgG eller  
IgM. Ethvert fragment af ethvert sådant antistof, der bi-  
beholder specifik bindingsaffinitet for den hybridiserede  
5 sonde, kan også anvendes, f.eks. fragmenterne af IgG, der  
konventionelt kendes som Fab, F(ab') og F(ab')<sub>2</sub>. Desuden  
kan der, når dette er passende, anvendes aggregater, poly-  
mere, derivater og konjugater af immunoglobuliner eller de-  
res fragmenter.

10 Immunoglobulin-kilden til antistofreagenset kan fås  
på enhver tilgængelig måde, f.eks. ved hjælp af konventio-  
nelle antiserum- og monoklonale metoder. Antiserum kan fås  
ved veletablerede metoder, der involverer immunisering af  
dyr, f.eks. en mus, en kanin, et marsvin eller en ged, med  
15 et passende immunogen. Immunoglobulinerne kan også fås ved  
somatiske cellehybridiseringsmetoder, og disse resulterer  
i, hvad der almindeligvis betegnes som monoklonale antistof-  
fer, idet metoderne også indbefatter anvendelsen af et pas-  
sende immunogen.

20 Immunogener til stimulering af antistoffer, der er  
specifikke for DNA/RNA-hybrider, kan omfatte homopolymere  
eller heteropolymere polynucleotid-duplexer. Blandt de mu-  
lige homopolymere-duplexer foretrækkes især poly(rA)·poly(dT),  
jfr. Kittagwa og Stollar (1982), Mol. Immunol. 19, 413. I  
25 almindelighed vil man imidlertid fortrinsvis anvende hetero-  
polymer-duplexer, og disse kan fremstilles på en række for-  
skellige måder, herunder transskription af  $\phi$ X174-virion-DNA  
med RNA-polymerase, jfr. Nakazato (1980), Biochem. 19, 2835.  
De udvalgte RNA/DNA-duplexer adsorberes til et methyleret pro-  
30 tein eller forbindes på anden måde til et konventionelt immu-  
nogen bæremateriale, f.eks. okseserumalbumin, og injiceres  
i det ønskede værtsdyr, jfr. også Stollar, (1980), Meth.  
Enzymol. 70, 70.

Antistoffer til RNA/RNA-duplexer kan frembringes mod  
35 dobbeltstrengede RNA'er fra vira såsom rheovirus eller Fiji-

0 syge-virus, der bl.a. inficerer sukkerrør. Også homopolymer-  
-duplexer såsom blandt andre poly(rI)·poly(rC) eller poly-  
(rA)·poly(rU), kan anvendes til immunisering som ovenfor om-  
talt.

5 Bindingen af antistofreagenset til det hybridiserede  
sonde-duplex ifølge den foreliggende opfindelse kan detek-  
teres ved hjælp af enhver bekvem teknik. Med fordel vil an-  
tistofreagenset selv være mærket med en detekterbar kemisk  
gruppe. En sådan kemisk gruppe kan være ethvert materiale  
10 med en detekterbar fysisk eller kemisk egenskab. Sådanne ma-  
terialer er blevet udviklet godt inden for immunobestemmel-  
sesområdet, og i almindelighed kan så godt som enhver mærk-  
ning, der kan anvendes ved sådanne metoder, anvendes i for-  
bindelse med nærværende opfindelse. Særligt anvendelige er  
15 enzymatisk aktive grupper, f.eks. enzymer, jfr. Clin. Chem.  
22, 1243 (1976), US Reissue patentskrift nr. 31.006 og GB patent-  
skrift nr. 2.019.408, enzymsubstrater, jfr. US patentskrift nr.  
4.492.751, cofaktorer, jfr. US patentskrifterne nr. 4.230.797  
og 4.238.565, og enzyminhibitorer, jfr. US patentskrift nr.  
20 4.134.792, endvidere fluorescerende midler, jfr. Clin. Chem.  
25, 353 (1979), chromoforer, luminescerende midler såsom ke-  
miluminescerende midler og bioluminescerende midler, jfr. US  
-patentskrift nr. 4.380.580, specifikt bindelige ligander så-  
som biotin, jfr. EP patentskrift nr. 63.879, eller et  
25 haptent, jfr. PCT-publikation nr. 83-2286, og endvidere radio-  
isotoper såsom <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, <sup>32</sup>P, <sup>125</sup>I og <sup>14</sup>C. Sådanne mærkninger  
og mærkningspar detekteres på basis af deres egne fysiske  
egenskaber, f.eks. fluorescerende midler, chromoforer og ra-  
dioisotoper, eller deres reaktive egenskaber eller bindings-  
30 egenskaber, f.eks. enzymer, substrater, cofaktorer og inhi-  
bitorer. Eksempelvis kan et med cofaktor mærket antistof de-  
tekteres ved tilsætning af det enzym, for hvilket mærkningen  
er en cofaktor, og et substrat for enzymet. Et antistof, der  
er mærket med et haptent eller en ligand, f.eks. biotin, kan  
35 detekteres ved tilsætning af et antistof til haptentet eller

0 et protein, f.eks. avidin, der binder liganden, mærket med  
et detekterbart molekyle. Et sådant detekterbart molekyle  
kan være et eller andet molekyle med en målelig fysisk egen-  
skab, f.eks. fluorescens eller absorptions, eller en deltager  
5 i en enzymreaktion, jfr. f.eks. den ovenstående liste. Eksem-  
pelvis kan man anvende et enzym, der indvirker på et sub-  
strat til dannelsen af et produkt med en målelig fysisk egen-  
skab. Eksempler på sidstnævnte omfatter, men er ikke begræn-  
set til  $\beta$ -galactosidase, alkalisk phosphatase og peroxidase.  
10 Andre mærkningsmetoder vil være åbenbare for en almindelig  
fagmand på området.

Alternativt kan antistofreagenset detekteres på basis  
af en nativ egenskab, f.eks. dens egen antigenicitet. Et mær-  
ket anti-(antistof)-antistof vil bindes til det primære anti-  
15 stofreagens, når mærkningen for det andet antistof er en kon-  
ventionel mærkning som ovenfor. Endvidere kan antistof detek-  
teres ved komplement-fiksering eller anvendelse af mærket  
protein A, samt ved andre metoder, der kendes inden for tek-  
nikken til detektering af antistoffer.

20 Når antistofreagenset er mærket, hvilket er det fore-  
trukne, associeres eller forbindes mærkningsdelen og anti-  
stofreagenset til hverandre ved direkte kemisk binding, f.eks.  
en sådan, der omfatter covalente bindinger, eller ved indi-  
rette binding, f.eks. ved inkorporering af mærkning i en mi-  
25 krokapsel eller et liposom, som igen er forbundet til anti-  
stoffet. Mærkningsmetoder er velkendte i teknikken, og der  
kan i forbindelse med den foreliggende opfindelse anvendes  
enhver bekvem metode.

### 30 Reaktionsblanding

Den testprøve, der skal analyseres, kan være ethvert  
medium af interesse og vil almindeligvis være en væskeprøve  
af medicinsk, veterinær, miljømæssig, ernæringsmæssig eller  
industriell betydning. Humane og animalske prøver og legems-  
35 væsker kan specielt analyseres ved hjælp af den foreliggende

0 metode, herunder urin, blod (serum eller plasma), mælk, cere-  
brospinalvæske, sput, fækalt materiale, lungeaspirater,  
svælgtamponer, genitaltamponer og -exudater, rektal-tampo-  
ner og nasofaryngale aspirater. Når testprøven, der fås fra  
5 patienten eller en anden kilde, og som skal analyseres, in-  
deholder principielt dobbeltstrengede nucleinsyrer, således  
som indeholdt i celler, behandles prøven til denaturering  
af nucleinsyrerne, og om nødvendigt først til frigørelse af  
nucleinsyrer fra celler. Denaturering af nucleinsyrer udfø-  
res fortrinsvis ved opvarmning i kogende vand eller ved al-  
kalisk behandling, f.eks. i 0,1 N natriumhydroxidopløsning,  
10 som om ønsket samtidig kan anvendes til lyse af celler. Fri-  
gørelse af nucleinsyrer kan f.eks. også opnås ved mekanisk  
sprængning (frysning/optøning, friktionsbehandling eller so-  
nisk behandling), fysisk-kemisk sprængning (detergenter så-  
som Triton, Tween, natriumdodecylsulfat, alkalibehandling,  
osmotisk chok eller varmebehandling) eller enzymatisk lyse  
(lysosym, proteinase K eller pepsin). Det fremkomne test-  
medium vil indeholde nucleinsyrer på enkeltstrengt form,  
20 som dernæst kan bestemmes i overensstemmelse med den omhand-  
lede hybridiseringsmetode.

Som det er kendt i teknikken, kan der anvendes for-  
skellige hybridiseringsbetingelser ved analysen. Typisk vil  
hybridisering foregå ved svagt forøgede temperaturer, f.eks.  
25 mellem ca. 35 og ca. 75°C og almindeligvis omkring 65°C, i  
en opløsning indeholdende puffer ved en pH-værdi mellem ca.  
6 og ca. 8 og med passende ionstyrke, f.eks. 2XSSC, hvor  
1XSSC = 0,15 M natriumchlorid og 0,015 M natriumcitrat, pH  
= 7,0, protein såsom okseserumalbumin, Ficoll (et varemærke,  
30 der identificerer en copolymer af sucrose og epichlorhydrin,  
hvilken copolymer sælges af Pharmacia Fine Chemicals, Piscat-  
away, NY), polyvinylpyrrolidon og en denatureret fremmed-DNA,  
f.eks. fra kalvethymus eller laksesperma. Graden af komple-  
mentaritet mellem prøve- og sonde-strengene, som kræves for,  
35 at hybridisering kan finde sted, afhænger af betingelsernes

0

strengthed. Udstrækningen og specificiteten af hybridisering påvirkes af de følgende principielle betingelser:

1. Renheden af nucleinsyrepræparatet.

2. Basesammensætning af sonden. G-C-basepar vil ud-  
5 vise større termisk stabilitet end A-T- eller A-U-basepar. Hybridiseringer, der involverer højere G-C-indhold, vil således være stabile ved højere temperaturer.

3. Længde af homolog basesekvens. Enhver kort se-  
kvens af baser, f.eks. mindre end 6 baser, har en høj grad  
10 af sandsynlighed for at være til stede i mange nucleinsyrer. Der kan således opnås lille eller ingen specificitet ved hybridiseringer, der involverer sådanne korte sekvenser. Den omhandlede homologe sondesekvens vil være mindst 10 baser, almindeligvis 20 baser eller mere, og fortrinsvis mere end  
15 100 baser. Fra et praktisk synspunkt vil den homologe sondesekvens ofte ligge mellem 300 og 1000 nucleotider.

4. Ionstyrke. Graden af forstærkning tiltager, når ionstyrken af inkuberingsopløsningen tiltager. Den termiske stabilitet af hybrider forøges også.

5. Inkuberingstemperatur. Optimal forstærkning fore-  
20 kommer ved en temperatur ca. 25-30°C under smeltetemperaturen ( $T_m$ ) for et givet duplex. Inkubering ved temperaturer signifikant under optimum tillader mindre relaterede basesekvenser at hybridisere.

6. Nucleinsyrekoncentration og inkuberingstid. Med  
25 henblik på at drive reaktionen mod hybridisering vil normalt enten en hybridiserbar prøve-nucleinsyre eller en sonde-nucleinsyre være til stede i overskud, almindeligvis i et 100 ganges overskud eller mere.

7. Denatureringsreagenser. Tilstedeværelsen af mid-  
30 ler, der opbryder hydrogenbindinger, f.eks. formamid og urinstof, forøger stringensen af hybridisering.

8. Inkuberingstid. Jo længere inkuberingstiden er, desto mere fuldstændig vil hybridiseringen være.

35 9. Rumfangseksklusionsmidler. Tilstedeværelsen af

0 disse midler, f.eks. dextran og dextransulfat, antages at  
forøge de effektive koncentrationer af de hybridiserende  
elementer, hvorved graden af resulterende hybridisering  
forøges.

5           Normalt vil de temperaturbetingelser, der vælges til  
hybridisering, være uforenelige med bindingen af antistof-  
reagens til dannede hybrider og detektering af det omhand-  
lede mærknings-respons. Som følge heraf vil antistofrea-  
gens-bindingstrinet og mærkningsdetekteringstrinet fore-  
10 gå efter fuldendelse af hybridiseringstrinet. Reaktions-  
blandingen vil sædvanligvis blive bragt på en temperatur i  
området fra ca. 3°C til ca. 40°C, hvorpå bindings- og de-  
tekterings-trinene udføres. Fortynding af hybridiserings-  
blandingen forud for tilsætning af antistofreagens er øn-  
15 skelig, når salt- og/eller formamid-koncentrationerne er  
tilstrækkeligt høje til at interferere signifikant med an-  
tistofbindingsreaktionen.

Det kan vise sig ved en bestemt analysesituation un-  
der anvendelse af en RNA-sonde, at sonden er udsat for par-  
20 tiel degradering ved alkalisk hydrolyse af phosphodiester-  
bindingerne eller ved nærværelsen af ribonucleaser. I det  
førstnævnte tilfælde kan hydrolyse reguleres ved undgåelse  
af udsættelse af sonden for en pH-værdi højere end ca. 10.  
Ribonucleaser kan effektivt inhiberes ved tilstedeværelsen  
25 af sådanne stoffer som natriumdodecylsulfat, aurintricarb-  
oxylsyre, ribonucleosid-vanadyl-komplekser, heparin, di-  
ethylpyrocarbonat og proteinholdige inhibitorer isolerede  
fra pattedyrskilder.

### 30 Reagenssystem

Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes der  
som nævnt et reagenssystem, dvs. en reagenskombination  
eller reagensmidler, der omfatter alle de essentielle be-  
standdele, der kræves til gennemførelse af en ønsket ana-  
35 lysemetode. Reagenssystemet foreligger i en kommerciel,

0 pakket form, som en komposition eller blanding, når foreneligheden af reagenserne tillader dette, i en testmaterialekonfiguration eller mere almindeligt i form af et testsæt, dvs. en pakket kombination af en eller flere beholdere, organer eller lignende, der indeholder de fornødne reagenser, og som almindeligvis omfatter skrevne instruktioner til udførelse af analyser. Reagenssystemet ifølge den foreliggende opfindelse omfatter alle konfigurationer og sammensætninger til udførelse af de forskellige hybridiseringer, der er beskrevet i den foreliggende beskrivelse.

10 I alle tilfælde vil reagenssystemet omfattet (1) en immobiliseret eller immobiliserbar sonde som her beskrevet og (2) antistofreagenset, fortrinsvis mærket med en detekterbar kemisk gruppe. En test-sæt-form for systemet kan yderligere omfatte hjælpekemikalier, f.eks. bestanddelene af hybridiseringsopløsningen og denatureringsmidler, der er i stand til at omdanne dobbeltstrengede nucleinsyrer i en prøve til den enkeltstrengede form. Fortrinsvis inkluderes der også et kemisk lyse- og denatureringsmiddel, f.eks. alkali, til behandling af prøven til frigørelse af enkeltstrenget nucleinsyre derfra.

Opfindelsen illustreres nærmere i de efterfølgende udførelseseksempler.

#### 25 Eksempel 1

#### Hybridiseringsanalyse til detektering af bakteriuri under anvendelse af immobiliseret RNA-sonde

##### A. Fremstilling af RNA-sonden

30 Et 800 basepar-fragment af tuf A-genet, der koder for proteinet EF-Tu i Escherichia coli, er afledt af bakteriofagen M13-10(ATCC 39403-131). Fragmentet klones mellem Hind III- og Eco RI-restriktions-endonuclease-steder af M13mp9 (New England Biolabs, Beverly, MA). Dette plasmid dyrkes i en E. coli-vært JM103 ( $\Delta$ lac, pro), supE, thi, strA, sbcB15, hsdR4, F'traD36, proABlac IqZM15. tuf A-fragmentet udskæres

0 fra M13-10 og kloner i Hind III- og Eco RI-stederne af den pSP64-plasmidvektor, der kan fås fra Promega Biotec., Madison, WI.

15 ml af en natten over henstillet kultur af E. coli  
5 JM103, der bærer pSP64-plasmidet indeholdende tuf A-fragmentet, podes i 1 liter 2xYT-næringsvæske i en toliterkolbe. Kulturen inkuberes ved 37°C i 3 timer, og cellerne indhøstes. De lyses, og DNA'en isoleres ved phenol/chloroform-ekstraktioner. Det lukkede, cirkulære plasmid-DNA renses ved cen-  
10 trifugering i en cesiumchlorid-ethidiumbromid-gradient, jfr. T. Maniatis, E.F. Fritsch og J. Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982).

Det rensede plasmid chromatograferes på Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) i 10 mM tris-hydrochlorid-puffer, pH = 7,5, indeholdende 0,1 M NaCl og 1 mM  
15 EDTA. Den udstrømmende væske, der indeholder DNA, opsamles, og DNA'en fældes med kold ethanol. Fældningen optages i 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> og 1 mM dithiothreitol og fordøjes i 1 time med en enhed EcoRI pr. mikrogram (µg) DNA. Dernæst ekstraheres reaktionsblandingen én gang med en blanding af phenol  
20 og chloroform og én gang med chloroform, og DNA'en fældes med kold ethanol. Fældningen opløses i 10 mM tris-hydrochlorid-puffer, pH = 7,4, hvorved der fås 500 µg DNA pr. ml.

En reaktionsblanding på 500 mikroliter (µl) fremstilles med følgende sammensætning: 50 µg af EcoRI-fordøjelses-  
25 produktet, 40 mM tris-hydrochlorid-puffer, pH = 7,5, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermin, 0,5 mM ATP, CTP, UTP og GTP, 10 mM dithiothreitol, 500 enheder RNAasin (Promega Biotec) og 50 enheder RNA-polymerase fra bakteriofagen SP6 (Promega Biotec).  
30 Reaktionsblandingen får lov at henstå i 1 time ved stuetemperatur, og der tilsættes dernæst 50 enheder yderligere RNA-polymerase, og blandingen får lov at reagere i yderligere 1 time.

DNA i reaktionsblandingen fordøjes i 10 minutter ved  
35 37°C med 10 µg RNase-fri DNase. Reaktionsblandingen ekstra-

0 heres med en blanding af phenol og chloroform og chromato-  
graferes på Sephadex G-50 i 10 mM tris-hydrochlorid-puffer,  
pH = 7,4, og 0,1 M NaCl. RNA'en opsamles og fældes med kold  
ethanol. Fældningen opløses i 50 mM natriumacetatpuffer, pH  
5 = 5,0, indeholdende 1 mM EDTA.

Den ovenfor beskrevne RNA-sonde immobiliseres på acryl-  
perler med reaktive epoxidgrupper, der er tilgængelige under  
handelsnavnet Eupergit C fra Accurate Chemical and Scientific  
Corporation, Westbury, NY. 3 ml 50 mM natriumacetatpuffer,  
10 pH = 4,5, indeholdende 250 mg RNA-sonde, omrystes ved stue-  
temperatur i 10 timer sammen med 200 mg Eupergit C. Pufferen  
fjernes og analyseres for RNA til bestemmelse af udstrækning-  
gen af immobilisering, der har fundet sted.

Harpiksen vaskes derpå ved kortvarig omrystning med  
15 1 ml 0,1 M natriumphosphatpuffer, pH = 6,5, indeholdende  
1,2 M NaCl, 0,5% (vægt/rumfangsenhed) natriumdodecylsulfat,  
1 mg polyvinylpyrrolidon pr. ml og 5 mg okseserumalbumin pr.  
ml. Denne hybridiseringsopløsning fjernes og erstattes med  
1 ml frisk hybridiseringsopløsning, og suspensionen inkube-  
20 res ved 65°C i 1 time til fjernelse af ikke-covalent bundet  
RNA-sonde. Opløsningen fjernes, og harpiks-RNA-sonde-konju-  
gatet suspenderes i 50 ml af hybridiseringsopløsningen.

#### B. Fremstilling af methyleret thyroglobulin

25 100 mg oksethyroglobulin (Sigma Chemical Co., St.  
Louis, MO) kombineres med 10 ml vandfri methanol og 400 µl  
2,55 M HCl i methanol. Denne blanding omrøres i en roterende  
blander ved stuetemperatur i 5 dage. Fældningen opsamles ved  
centrifugering og vaskes to gange med methanol og to gange  
30 med ethanol, hvorpå den tørres under vakuum natten over. Der  
fås ca. 82 mg tørt pulver.

0

C. Fremstilling af antistof til DNA/RNA-hybrid

En DNA/RNA-hybrid fremstilles ved transskription af  $\phi$ X174-virion-DNA med RNA-polymerase som beskrevet af Nakazato, jfr. Biochem. 19, 2835 (1980). 150 mikrogram af hybrid-  
5 briden i 250  $\mu$ l 20 mM tri-hydrochlorid-puffer, pH = 7,4, og 1 mM EDTA kombineres med 150  $\mu$ g methyleret thyroglobulin i 250  $\mu$ l vand. Der dannes en fældning, der suspenderes i tris-puffer. Den fremkomne blanding emulgeres med et lige så stort rumfang af Freund's adjuvans. Mus immuniseres hver  
10 for sig med 0,5 ml af suspensionen, og når der udvikles serum-antistof-titere til RNA/DNA, fremstilles der hybridomer, der screenes for monoklonalt antistof specifikt for RNA/DNA, jfr. Stuart et al., (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3751 og Galfre og Milstein (1981), Meth. in Enzymol. 73, 1.

15 De klonede hybridomer propageres i den peritoneale hulhed hos mus til frembringelse af en stor mængde antistof. Ascitesvæsken påføres en søjle af Affigel-Blue-harpiks (Bio-Rad Laboratories, Richmond, VA), ækvilibreret med 10 mM tris-hydrochlorid-puffer, pH = 8,0, og 0,15 M NaCl. Ved den-  
20 ne chromatografi fjernes albumin, og det eluerede protein, der indeholder antistoffet, chromatograferes på DEAE-sepharose (Pharmacia Fine Chemicals). Chromatogrammet udvikles med en lineær gradient af 10 mM tris-hydrochlorid, pH = 8,0, til 10 mM tris-hydrochlorid, pH = 8,0, 200 mM NaCl. Hoved-  
25 spidsen af elueret protein indeholder det monoklonale antistof frit for transferrin og albumin.

D. Fremstilling af  $\beta$ -galactosidase-antistof-konjugat

30 Sulfhydryl-rester på  $\beta$ -galactosidase blotlægges ved reduktion med dithiothreitol.  $\beta$ -galactosidase (30000 enheder, kvalitet VIII, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) i 2 ml 0,1 M N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethan-sulfonat (HEPES), pH = 7,0, 0,09 M NaCl, kombineres med 3,5  $\mu$ mol di-  
thiothreitol og får lov at henstå ved stuetemperatur i  
35 4 timer. Dithiothreitolen fjernes ved chromatografi på en

0 2,5 cm x 80 cm-søjle af Sepharose 6B Cl (Pharmacia Fine  
Chemicals) i den ovenfor beskrevne puffer. Fraktioner inde-  
holdende protein kombineres i en pool. Antallet af mol af  
sulfhydrylgrupper pr. mol enzym måles ved metoden ifølge  
5 Ellman, jfr. Ellman (1959), Arch. Biochem. Biophys. 82, 70.

5,3 mg succinimidyl-4-(N-maleinimidomethyl)-cyclo-  
hexan-1-carboxylat (SMCC) (Pierce Chemical Co., Rockford,  
IL) opløses i 250 µl vandfrit N,N-dimethylformamid, og der  
sættes en aliquot på 40 µl til 3 ml 0,1 M HEPES-puffer, pH  
10 = 7,0, 0,15 M NaCl. En 25 µl aliquot af denne vandige op-  
løsning sættes til 825 µl HEPES/NaCl-puffer og 100 µl 1 mM  
glutathion. Når denne reaktionsblanding har været henstil-  
let ved stuetemperatur i 15 minutter, bestemmes den uomsat-  
te glutathion ved hjælp af Ellman's metode.

15 Monoklonalt antistof til DNA/RNA kombineres med  
400 µmol SMCC i et slutrumfang på 533 µl HEPES/0,15 M NaCl-  
puffer og får lov at reagere i 1 time ved 30°C. Reaktions-  
blandingen chromatograferes på en 1 cm x 24 cm-søjle af Bio-  
gel P-2-harpiks (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca) og  
20 elueres med HEPES/0,15 M NaCl-puffer. Udstrømmende væske in-  
deholdende protein pooles, og proteinkoncentrationen bestem-  
mes ved metoden ifølge Sedmack og Grossberg, Anal., Biochem.  
79, 544 (1977), og antallet af maleinimidgrupper bestemmes  
ved titrering med glutathion som ovenfor beskrevet.

25 En portion på 2,8 mg af antistof-maleinimid-adduktet  
kombineres med 10 mg af dithiothreitol-behandlet β-galacto-  
sidase og får lov at reagere i 4 timer ved stuetemperatur.  
Reaktionsblandingen chromatograferes ved 4°C på en 2,5 cm  
x 80 cm-søjle af Sepharose 6B Cl i HEPES/0,15 M NaCl ved  
30 4°C. Strømningshastigheden sættes til 4 ml pr. time, og der  
opsamles fraktioner på hver 3 ml. Fraktionerne analyseres  
for β-galactosidase-aktivitet og antistof-bindingsaktivitet.  
Fraktioner, der har begge aktiviteter, slås sammen.

0

E. Hybridiseringsbestemmelse

10 ml aliquoter af urin fra patienter med mulige urinvejsinfektioner centrifugeres ved 10000 x G i 10 minutter, og de ovenstående væsker dekanteres og kasseres. Sedi-  
5 menterne suspenderes i 50 µl 10 mM tris-hydrochlorid-puffer, pH = 8,0, indeholdende 20 mg æggehvide-lysozym pr. ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0,1 M NaCl, og 5 mM EDTA. Reaktionsblandingen får lov at henstå ved stuetemperatur i 30 minutter, og der tilsættes derefter 10 µl 1 M NaOH, og  
10 den fremkomne alkaliske opløsning får lov at henstå ved stuetemperatur i 10 minutter til denaturering af DNA fra mulige bakterier i den oprindelige prøve. Reaktionsblandingerne neutraliseres ved tilsætning af 250 µl af den tidligere beskrevne pufrede suspension af harpiks-RNA-konjugatet.  
15 Dette hybridiseringssystem inkuberes ved ca. 65°C i 15 timer under forsigtig omrystning.

Harpiks-RNA-sonde-konjugatet får lov at sætte sig, og væsken dekanteres. Harpiksen vaskes to gange ved suspension i 0,5 ml 0,1 M natriumphosphat-puffer, pH = 7,4,  
20 pr. gang, og 5 mg okseserumalbumin pr. ml. Harpiksen kombineres med 300 µl 0,1 M natriumphosphat-puffer, pH = 7,4, indeholdende 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mg okseserumalbumin pr. ml og 0,4 µg β-galactosidase-antistof pr. ml (anti-DNA/RNA). Blandingen omrystes forsigtigt i 1 time ved stuetemperatur, og harpiksen vaskes to gange, i 1 minut pr. gang, med 5 ml 0,1 M natriumphosphat-puffer, pH = 7,4, indeholdende 0,1% Tween 20-  
25 -detergent. Den vaskede harpiks omrøres forsigtigt i 30 minutter ved stuetemperatur i 1,0 ml 0,1 M natriumphosphat-puffer, pH = 7,4, indeholdende 800 µM 7-β-galactosyl-3-  
30 -[6-aminohexylcarboxamid]coumarin, jfr. Worah et al., Clin. Chem., 27, 673 (1981). Ved afslutningen af denne inkubering måles fluorescensen af opløsningen under anvendelse af excitation ved 400 nm og emission ved 450 nm.

Fluorescens-signaler, der fremkaldes med urinprøver  
35 indeholdende mere end 100000 bakterier pr. ml, vil være

0

signifikant højere end for de prøver, der indeholder mindre end 5000 bakterier pr. ml. Denne metode kan anvendes som en kvalitativ test for bakteriuri.

5

## Eksempel 2

### Hybridiseringsbestemmelse for E. Coli 23s-ribosomal RNA under anvendelse en immobiliseret DNA-sonde

#### A. DNA-sonde for 23s RNA

DNA-sonden er et EcoRI/BglIII-fragment fra rrnD-operationen, der koder for 23s RNA i E. coli, jfr. Jinks-Robertson et al., Cell 33, 865 (1983). Sonden omfatter ca. 2/3 af 23s RNA-sekvensen fra 3'-hydroxylet og klones i en M13-virus-vektor, hvorved der fås enkeltstrenget virion-DNA, der er komplementær til cellulær, ribosomal RNA. M13-virusen dyrkes i E. coli stamme JM103 og isoleres fra dyrkningsmediet ved fældning med polyethylenglycol. Virion-DNA'en renses fra viruspartiklerne ved phenolekstraktion, jfr. Maniatis et al., ovenfor.

Den rensede DNA gøres 0,3 M med hensyn til NaOH og inkuberes ved 37°C i 4 timer til nedbrydning af forurenede RNA. Blandingen neutraliseres ved tilsætning af 30% eddikesyre, og DNA fældes med kold ethanol.

#### B. Antistof til DNA/RNA

Mus immuniseres med DNA/RNA-hybrid som beskrevet i eksempel 1, og miltceller fusioneres med SP 2/O-Ag14-myelomceller (tilgængelige fra American Type Culture Collection, Rockville, MD). Hybridomer, der sekreterer antistoffer, der er specifikke for DNA/RNA, identificeres som beskrevet ovenfor. Det mest foretrukne hybridom er det, der er deponeret ved American Type Culture Collection, Rockville, MD, under ATCC HB 8730.

Antistoffer renses fra ascitesvæske ved HPLC under anvendelse af en LDC/Milton Roy-væskechromatograf udstyret med CI-10-integrator. Ascitesvæsken dialyseres mod 0,01 M

35

0 kaliumphosphatpuffer, pH = 6,8, centrifugeres til fjernelse  
af partikelformet materiale og ledes gennem et 0,22 µm ni-  
trocellulosefilter. 1-2 ml af behandlet ascitesvæske påsæt-  
tes en 10 mm x 250 mm-anionbyttersøjle, der er ækvilibreret  
5 med 0,01 M kaliumphosphat, pH = 6,84. Chromatogrammet frem-  
kaldes med en 60 minutters lineær gradient fra 0,01 M kalium-  
phosphatpuffer, pH = 6,84, til 0,085 M kaliumphosphat, pH =  
6,40, ved en strømningshastighed på 1 ml/minut. Den spids,  
der indeholder IgG, koncentrerer, dialyseres mod phosphat-  
10 -pufret saltopløsning, pH = 7,4, centrifugeres til fjernel-  
se af muligt denatureret protein, og IgG-koncentrationen be-  
stemmes på basis af absorbansen ved 280 nm under anvendelse  
af  $E_1^{1 \text{ mg/ml}} = 1,40$ .

15 C. Immobilisering af DNA-sonden

Meta-nitrophenylgrupper indføres på cellulosepulver  
og omdannes derpå til diazoniumsaltet til covalent immobili-  
sering af DNA'en.

690 mg (2,46 mM) 1-[(m-nitrobenzyloxy)-methyl]-pyri-  
20 diniumchlorid (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) kombine-  
res med 128 mg natriumacetat i 7,7 ml vand. Der tilsættes  
2 g Sigmacell, type 20 cellulose (Sigma Chemical Co.), og der  
blandes i ca. 15 minutter i et bægerglas nedsænket i et vand-  
bad ved 60°C. Cellulosen bliver næsten tør, og den anbringes  
25 i en ovn ved 135-140°C i 45 minutter. God inkorporering af  
m-nitrophenyl-rester er afhængig af vedligeholdelse af tem-  
peraturen ved en så høj værdi som muligt i løbet af dette  
tidsrum. Såfremt temperaturen er for høj, karameliseres cel-  
lulosen.

30 Efter varmebehandlingstrinet suspenderes cellulosen  
i vand, og klumper opbrydes ved gnidning af cellulosen i  
vand, indtil partiklerne kan passere gennem en 150 µm-tråd-  
sigte. Cellulosen vaskes tre gange med 120 ml vand pr. gang  
og to gange med 50 ml ethanol pr. gang. Cellulosen tørres  
35 dernæst natten over i vakuum.

0

Nitrophenylgrupper på cellulosen reduceres ved inkubering af cellulosen ved 65°C i 1 time i 10 ml 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> indeholdende 2,0 g natriumdithionit. Dernæst vaskes cellulosen flere gange med vand på en tragt af sintret glas og én gang med 30%'s eddikesyre. Endelig vaskes den tre yderligere gange med vand og tørres i vakuum ved 40-50°C natten over.

250 mg af den reducerede cellulose sættes til 5,0 ml 1,2 M HCl ved 0°C, og der tilsættes 13 µl 100 mg NaNO<sub>2</sub> pr. ml. Denne blanding får lov at henstå i 1 time, og i løbet af dette tidsrum testes blandingen for nærværelsen af NaNO<sub>2</sub> med stivelse-iod-papir. Såfremt testen er svag eller negativ, tilsættes der 20 µl NaNO<sub>2</sub>.

Ved afslutning af reaktionsperioden vaskes cellulosen i rækkefølge med fra 30 til 50 ml koldt (0°C) vand på en tragt af koldsintret glas med fra 10 til 15 ml kold 10 mM urinstof, med yderligere koldt vand og til slut med ca. 1 ml 0,2 M natriumacetatpuffer, pH = 4,0. Cellulosen overføres hurtigt til en kolbe indeholdende 0,92 ml kold 0,2 M natriumacetatpuffer, pH = 4,0, indeholdende 69 µg af DNA-sonden.

Blandingen omrystes ved 0-4°C i 15 timer og vaskes derpå med 1 x SSPE (20 mM natriumphosphatpuffer, pH = 7,8, 0,18 M NaCl, 1 mM EDTA), 0,1%'s natriumdodecylsulfat (SDS) på en glastragt af sintret glas. Cellulosen inkuberes ved 55°C i 4 timer i en hybridiseringsopløsning sammensat af følgende bestanddele:

2,0 ml formamid  
 1,5 ml 20 x SSPE  
 0,3 ml 10 mg okseserumalbumin/ml,  
 10 mg Ficoll/ml, 10 mg polyvinylpyrrolidon/ml  
 0,03 ml 10% SDS (w/v)  
 0,140 ml 4,25 mg laksesperma-DNA/ml

Inden anvendelsen inkuberes laksesperma-DNA ved 37°C i 17 timer i 0,3 M NaOH, neutraliseres med 30%'s eddike-

35

0

syre og indsamles ved fældning med kold ( $-15^{\circ}\text{C}$ ) ethanol.

Efter inkubering ved  $55^{\circ}\text{C}$  vaskes cellulosen to gange med ca. 10 ml af 1 x SSPE og 0,1% SDS. Cellulosen gensuspenderes i 5,0 ml af hybridiseringsopløsningen, og 0,2 ml  
5 aliquoter af-opslæmningen anbringes i reaktionsglas til hybridisering.

#### D. Fremstilling af 23s ribosomal RNA

Ribosomal RNA fremstilles ud fra E. coli, og 23s bestanddelen isoleres ved sucrose-densitetgradient-centrifugering, jfr. M. Takanami, Meth. Enzymol. 12A, 491 (1967) og E.H. McConkey, Meth. Enzymol. 12A, 620 (1967).  
10

#### E. Hybridiseringsbestemmelse af 23s RNA

Hybridiseringsopløsningen aspireres fra reaktionsglassene indeholdende cellulosen med den immobiliserede DNA-sonde. Dernæst sættes der 100  $\mu\text{l}$  hybridiseringsopløsning indeholdende 10 ng 23s RNA/ml til hvert glas, og disse inkuberes ved  $55^{\circ}\text{C}$  i de angivne tidsrum. Ved afslutningerne af inkuberingerne fjernes hybridiseringsopløsningerne, og cellu-  
20 losen vaskes med 0,5 ml 1 x SSPE, 0,1% SDS, inkuberes ved  $55^{\circ}\text{C}$  i 30 minutter i 0,5 ml 1 x SSPE, 0,1% SDS og vaskes én gang med 0,5 ml 1 x SSPE, 0,1% SDS.

De dannede mængder DNA/RNA måles ved immunoanalyse.  
25 Cellulosen i hvert glas rystes ved stuetemperatur i 30 minutter med 50  $\mu\text{l}$  20 mM natriumphosphatpuffer, pH = 7,4, indeholdende 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% (rumfang/rumfang) Tween 20 og 5,0 mg BSA pr. ml. Dernæst sættes 100  $\mu\text{l}$  af denne opløsning indeholdende 1,0  $\mu\text{g}$  antistof til DNA/RNA til  
30 hvert glas, og omrystningen fortsættes i 30 minutter. Væsken fjernes ved aspirering, og cellulosen vaskes fire gange med hver gang 0,5 ml 0,1 M tris-hydrochloridpuffer, pH = 8,0, indeholdende 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5% Tween 20 og 5,0 mg oksealbumin pr. ml (tris/ $\text{MgCl}_2$ /Tween/BSA). Dernæst sættes der til  
35 hvert glas 150  $\mu\text{l}$  af med alkalisk phosphatase mærket anti-

0 muse-IgG (Sigma Chemical Co.), fortyndet 200 gange i tris/  
MgCl<sub>2</sub>/Tween/BSA, og der omrystes ved stuetemperatur i 1,0  
timer.

5 Cellulosen fra hver analyse vaskes to gange med hver  
gang 0,5 ml tris/MgCl<sub>2</sub>/Tween/BSA indeholdende 0,5 M NaCl,  
hvorefter cellulosen overføres til rene reagensglas under  
anvendelse af fra 1,5 til 2,0 ml af denne pufferopløsning.  
Pufferen fjernes, og den alkaliske phosphatase-mærkning, der  
er bundet til cellulosen, måles.

10 Til dette formål tilsættes der 200 ml 1,0 M dietha-  
nolamin-hydrochlorid-puffer, pH = 9,8, indeholdende 1 mM  
MgCl<sub>2</sub> og 1 mg p-nitrophenylphosphat pr. ml, og der inkube-  
res ved 25°C i 30 minutter. Dernæst undertrykkes den en-  
zym-katalyserede reaktion ved tilsætning af 1,5 ml 0,1 M  
15 Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, og absorbanserne ved 405 nm optegnes. Resultaterne  
er som følger:

	Hybridiseringstid (timer)	Absorbans
	0	0,34
20	0,5	1,18
	1,0	1,36
	2,0	1,85
	8,0	2,27
	12,0	2,32
25	24,0	2,34

Absorbanserne forøges med hybridiseringstiden, hvil-  
ket viser, at der er dannet stigende mængder af DNA/RNA-hy-  
brider.

### 30 Eksempel 3

#### Hybridiseringsbestemmelse for 23s ribosomal RNA under anven- delse af en immobiliserbar DNA-sonde

35 Prøve-RNA'en hybridiseres med en opløselig DNA-sonde  
med tilknyttede biotinrester. Dernæst bindes den hybridise-  
rede og ikke-hybridiserede DNA-sonde til en fast bærer med

0 immobiliseret streptavidin. Mængden af DNA/RNA på bæreren måles ved en immunoanalyse under anvendelse af enzym-mærket antistof til DNA/RNA.

#### 5 A. Biotinyleret sonde-DNA

Den i eksempel 2 ovenfor beskrevne M-13-virus med indsætningen komplementær til 23s RNA propageres i E. coli stammen JM103, og bakteriecellerne indhøstes til isolering af den replikative form af den virale DNA. Denne dobbeltstrengede DNA renses ved cesiumchlorid-ethidiumbromid-10 densitets-gradient-centrifugering, jfr. Maniatis et al. ovenfor.

Biotin-rester indføres i denne dobbeltstrengede DNA ved nick-translation under anvendelse af biotinyleret dUTP, der er tilgængelig fra Enzo Biochem. Inc., NY, jfr. P.R. 15 Langer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 6633 (1981) og J.J. Leary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 4045 (1983).

Kontaminerende RNA nedbrydes ved behandling med alkali som beskrevet i eksempel 2. Umiddelbart inden anvendelsen denatureres den biotinylerede sonde ved anbringelse 20 af opløsningen i et bad med kogende vand i 4 minutter.

#### B. Immobilisering af streptavidin

Streptavidin (Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, CA) immobiliseres på Act-Ultrogel<sup>®</sup> AcA 22 (tilgængelig 25 fra LKB Instruments, Inc., Gaithersburg, MD), der er en acrylamid-agarose-bærer aktiveret med glutaraldehyd, jfr. S.G. Doley et al., FEBS Letters 65, 87 (1976). Immobiliseringen udføres i overensstemmelse med fabrikantens instruktioner, hvorved der fås ca. 0,5 µg streptavidin pr. 30 10 µl pakket Act-Ultrogel AcA 22.

#### C. Hybridiseringsbestemmelse

2 ml Aliquoter af urinprøver, der mistænkes for at 35 indeholde bakterieinfektion, centrifugeres ved 3000 x G

0 til sedimentering af bakterierne, og de ovenstående væsker  
dekanteres fra. 90 µl af den i eksempel 2 beskrevne hybri-  
diseringsopløsning sættes til hver pellet, og 5 µl af den  
biotinylerede sonde (ved en koncentration på 0,5 µg/ml i  
5 20 mM natriumphosphatpuffer, pH = 7,0, 0,5 mM EDTA) tilsæt-  
tes. Blandingerne omrystes til suspendering af de tilstede-  
værende pellets (såfremt disse findes), og de inkuberes ved  
55°C i 4,0 timer.

Dernæst sættes der til hver blanding 700 µl 20 mM  
10 natriumphosphatpuffer, pH = 7,4, indeholdende 5,0 mg okse-  
albumin og 50 µl af Ultrogelen med immobiliseret streptavi-  
din til fortynding af hybridiseringsopløsningen og immobi-  
lisering af den biotinylerede sonde.

Blandingerne omrystes ved stuetemperatur i 2 timer,  
15 og væsken fjernes fra bæreren.

Den mængde DNA/RNA-hybrid, der er forbundet med Ul-  
trogel-bæreren, måles ved immunoanalyse som beskrevet i  
eksempel 2 i forbindelse med cellulose-bæreren.

Til sammenligning testes de ikke-behandlede urinprø-  
20 ver for bakterier ved hjælp af 1 µl-sløjfekulturmetoden un-  
der anvendelse af MacConkey- og blodagarplader. Pladerne in-  
kuberes ved 37°C i 36 timer, og kolonierne optælles.

Urinprøver med høje bakterieniveauer ifølge kulturme-  
toden giver høje absorbanser ved hybridiseringsbestemmelsen.

25

30

35

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af en bestemt polynucleotidsekvens i et testmedium indeholdende enkeltstrengede nucleinsyrer, ved hvilken man kombinerer testmediet med en  
5 sonde, der omfatter i det mindste én enkeltstrenget basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til den sekvens, der skal bestemmes, og den komplementære sondeseqvens, og detekterer hybridiseret sonde ved binding af et antistofreagens, der er i stand til at blive bundet til DNA/RNA- eller  
10 RNA/RNA-duplexer, der dannes mellem den sekvens, der skal bestemmes, og den komplementære sonde-sekvens, og bestemmer det antistofreagens, der bliver bundet til sådanne duplexer, k e n d e t e g n e t ved, at sonden er en immobiliseret RNA- eller DNA-sonde.

15 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at antistoffet er et monoklonalt antistof sekretet af hybridom-cellelinien HB 8730, der er deponeret i American Type Culture Collection.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at antistofreagenset er mærket med en  
20 detekterbar kemisk gruppe, der er udvalgt blandt en enzymatisk aktiv gruppe, et fluorescerende middel, en chromofor, et luminescerende middel, en specifikt bindelig ligand og en radioisotop.

25 4. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at testmediet omfatter en biologisk prøve, der er blevet underkastet betingelser til frigørelse og denaturering af deri tilstedeværende nucleinsyrer.

5. Reagenssystem til detektering af en bestemt polynucleotidsekvens i et testmedium ved nucleinsyre-hybridisering, omfattende (i) en polynucleotid-sonde, der indeholder  
30 i det mindste én enkeltstrenget basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til den sekvens, der skal bestemmes, og (ii) et antistof-reagens, der kan bindes til DNA/RNA- eller RNA/RNA-duplexer, der dannes mellem den sekvens, der  
35 skal bestemmes, og den komplementære sonde-sekvens, k e n -

d e t e g n e t ved, at sonden er immobiliseret RNA- eller DNA-sonde.

6. Reagenssystem ifølge krav 5, k e n d e t e g -  
n e t ved, at antistoffet er et monoklonalt antistof sekre-  
5 teret af hybridom-cellelinien HB 8730, der er deponeret i  
American Type Culture Collection.

7. Reagenssystem ifølge krav 5 eller 6, k e n d e -  
t e g n e t ved, at sonden er immobiliseret ved fiksering  
til en fast bærer.

10 8. Reagenssystem ifølge ethvert af kravene 5-7,  
k e n d e t e g n e t ved, at antistof-reagenset er mærket  
med en detekterbar kemisk gruppe, der er valgt blandt en  
enzymatisk aktiv gruppe, et fluorescerende middel, en chromo-  
for, et luminescerende middel, en specifikt bindelig ligand  
15 og en radioisotop.

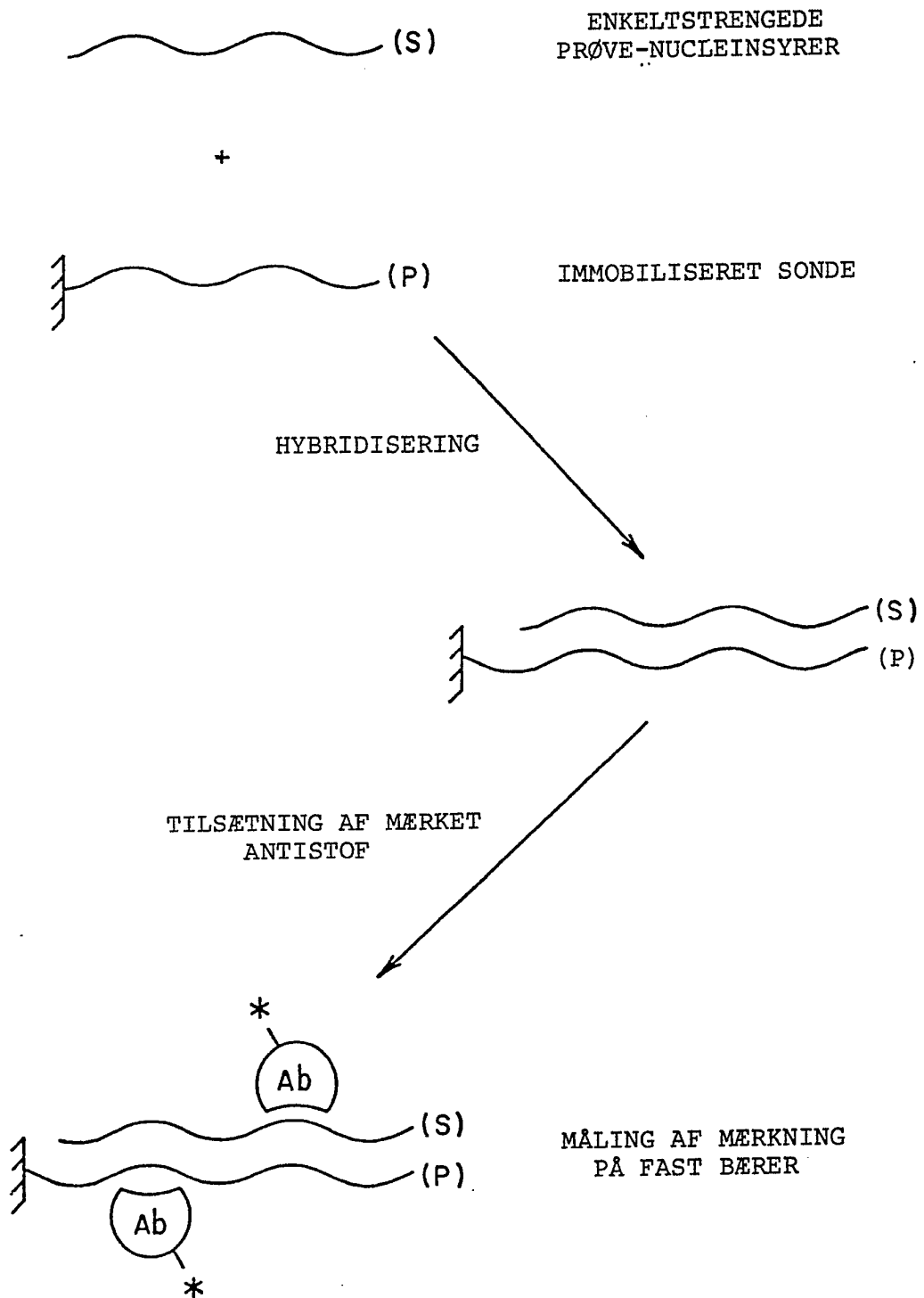


FIG. I

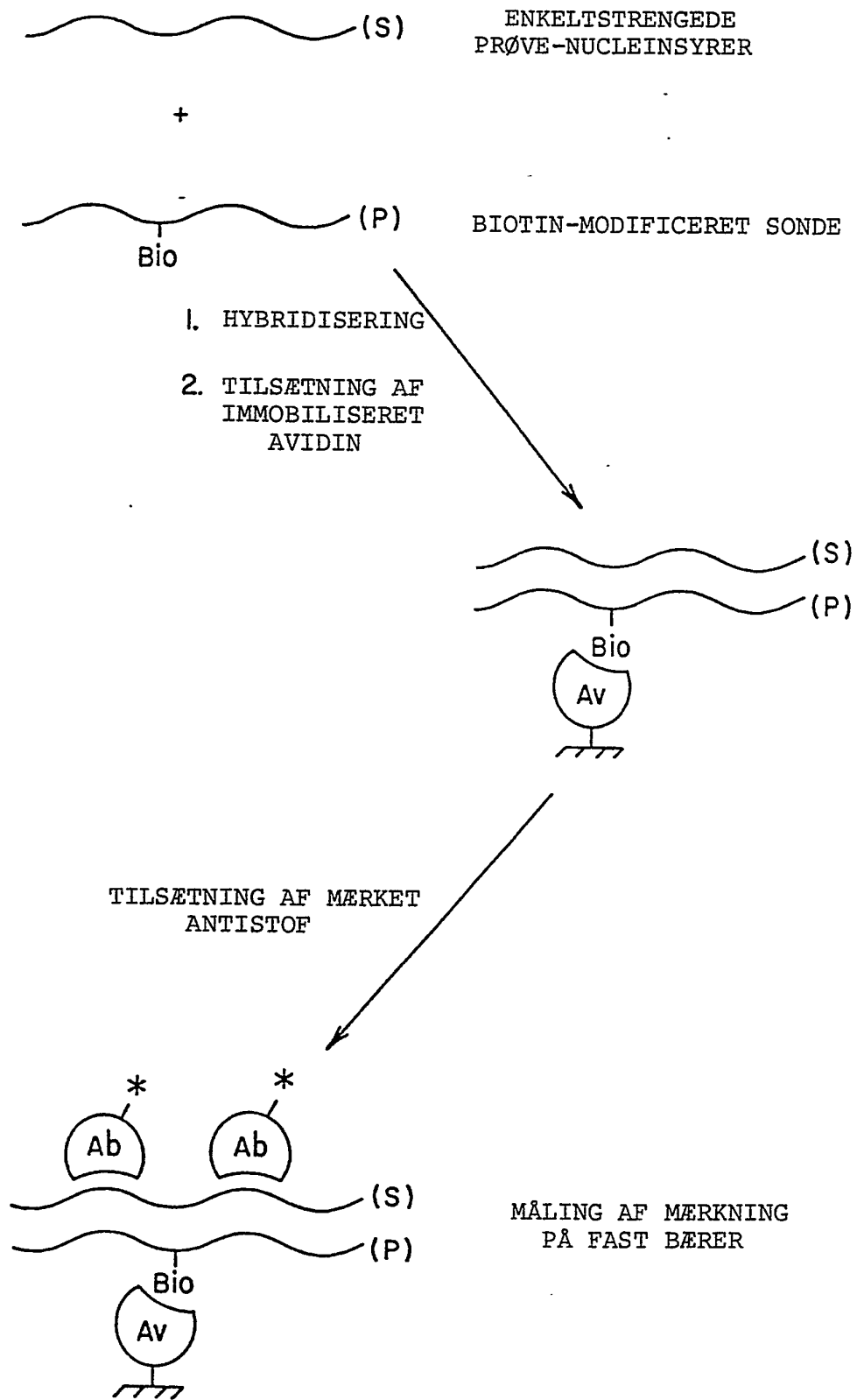


FIG. 2