(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 575 493**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **85 19394**

(51) Int Cl⁴ : C 12 Q 1/68.

# (12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 30 décembre 1985.

(30) **Priorité :** FI, 2 janvier 1985, n° 850004.

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** BOPI « Brevets » n° 27 du 4 juillet 1986.

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *ORION-YHTYMA OY, société régie par les lois en vigueur en Finlande.* — FI.

(72) **Inventeur(s) :** Hans Erik Söderlund.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** Cabinet Orès.

## (54) Méthode pour l'identification d'acides nucléiques.

(57) La présente invention est relative à une méthode pour l'identification d'acides nucléiques.

Cette méthode est caractérisée en ce qu'on utilise au moins deux sondes qui sont dans la même phase en solution dans une méthode d'hybridation, la sonde de détection étant marquée avec une substance de marquage détectable et un membre d'une paire d'affinité étant attaché à la sonde de capture, et qu'on isole l'hybride sonde de capture - acide nucléique cible - sonde de détection formé dans la réaction d'hybridation au moyen de l'autre membre de la paire d'affinité.

Application aux méthodes d'hybridation.

FR 2 575 493 - A1



Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention — 75732 PARIS CEDEX 15

La présente invention est relative à une méthode pour l'identification d'acides nucléiques au moyen d'une hybridation en solution. La méthode conforme à la présente invention est caractérisée par l'utilisation d'au moins deux sondes dans la réaction d'hybridation. Une marque est fixée à la sonde de détection et à l'autre sonde, la sonde dite de capture, est fixé un composant ayant une affinité pour un autre composant, au moyen duquel l'hybride sonde de capture : acide nucléique cible : sonde de détection résultant de l'hybridation peut être séparé des autres composants présents dans le mélange d'hybridation.

Diverses méthodes d'hybridation ont été mises en oeuvre pour l'identification d'acides nucléiques. On peut citer par exemple, les méthodes d'hybridation directe et les méthodes d'hybridation sandwich. Dans des méthodes d'hybridation directe, le spécimen d'acide nucléique est soit en solution, soit fixé à un support solide. L'acide nucléique à identifier est mis en évidence à l'aide d'une sonde marquée. Dans des méthodes d'hybridation sandwich (US 4 486 539), on utilise deux sondes séparées au moyen desquelles l'acide nucléique à identifier est mis en évidence dans la solution d'échantillon. La sonde de détection est marquée avec une substance de marquage et l'autre sonde est fixée au support solide.

On a mis au point une nouvelle méthode d'hybridation dans laquelle deux sondes différentes sont utilisées et ces deux sondes sont dans la phase en solution. Comme l'acide nucléique cible participant à l'hybridation et les deux sondes sont dans la même phase en solution, la réaction d'hybridation est considérablement plus rapide que dans une hybridation sandwich, dans laquelle une sonde est fixée à un support solide. Dans la méthode conforme à la présente invention, une durée d'incubation d'une heure est suffisante. Dans l'hybridation sandwich à une seule étape (US 4 486 539) on n'obtient pas une hybridation suffisante en moins de 12 heures. Lorsqu'on effectue une hybridation sandwich à deux étapes (Dunn

& Hassel, Cell. Vol. 12 pp. 23-36, 1977), il faut une durée d'hybridation d'au moins 24 heures.

On emploie avantageusement au moins deux sondes dans la méthode conforme à la présente invention. Les sondes sont des fragments d'acide nucléique suffisamment homologues de l'acide nucléique cible. Il est avantageux mais pas nécessaire, que les sondes soient homologues de sites situés relativement près les uns des autres dans l'acide nucléique à identifier. Les sondes ne doivent pas se recouvrir les unes les autres.

Les sondes peuvent être préparées par synthèse, semi-synthèse, par des technique d'ADN recombinant ou à partir d'acides nucléiques directement isolés à partir de la nature. Des sondes sont aussi disponibles industriellement en provenance de plusieurs sources. Une sonde peut être liée à un vecteur convenable. Elle peut contenir des parties de vecteur ou être complètement dépourvue de celles-ci.

La sonde de détection est marquée avec un agent de marquage convenable. On peut utiliser à ce propos, divers isotopes radioactifs ou composés marqués radioactivement. La substance de marquage peut être fluorescente, luminescente, émettre de la lumière, être mise en évidence par voie enzymatique ou immunologique, etc... On peut citer par exemple, des marques à base de biotine et d'avidine ou de streptavidine, des chélates de lanthanides, des composés de ferritine et d'hème et des haptènes pouvant être mis en évidence par voie immunologique, comme des dérivés d'acétoxyacétylfluorène (WO 8302286). On peut aussi procéder à l'identification par l'intermédiaire de protéines. La méthode conforme à la présente invention ne dépend pas du marquage utilisé. Toutes les substances de marquage bien connues, convenables pour l'hybridation d'acide nucléique ou celles qui seront ultérieurement mises au point, peuvent être librement appliquées dans cette méthode.

On attache à l'autre sonde, la sonde dite de cap-

ture, un composant ayant une affinité pour un autre composant. Des paires d'affinité convenables comprennent par exemple, la biotine-avidine ou streptavidine, des dérivés de métaux lourds - des groupes thio, divers homopolynucléotides, comme poly dG - poly dC, poly dA - poly dT, et poly dA - poly U. D'autres paires d'affinité peuvent aussi être utilisées à condition que les composants aient une affinité suffisamment forte l'un pour l'autre. On trouve des paires d'affinité convenables parmi des ligands et des conjuguats utilisés dans des méthodes immunologiques.

Avant d'effectuer la réaction d'hybridation, on traite le spécimen pour qu'il libère 8 acides nucléiques cibles sous une forme à brin unique dans la solution d'hybridation. L'hybridation est réalisée dans un mélange d'hybridation dans lequel les acides nucléiques cibles, la sonde marquée et la sonde de capture ont été rendus, si nécessaire, sous une forme à brin unique. Divers tampons convenables peuvent être mis en oeuvre comme solutions d'hybridation. L'hybridation a lieu dans une gamme de température de 0 à 80°C, mais il est avantageux de travailler à 65°C. Si la solution d'hybridation contient du formamide (40 à 55 %), on peut utiliser une température de 37°C. Une heure suffit comme durée d'hybridation.

Lorsque l'hybridation a eu lieu, la solution est diluée, si cela est nécessaire, pour rendre les conditions avantageuses pour la paire d'affinité : le mélange est ensuite mis en contact avec l'autre membre de la paire d'affinité. Des colonnes de chromatographie d'affinité, des filtres, des surfaces plastiques, et surfaces de verre, etc... peuvent être utilisés pour capturer l'hybride sonde de capture : acide nucléique cible : sonde de détection.

La matière servant de support de la colonne d'affinité peut être par exemple une cellulose, un latex, un polyacrylamide, un dextrane ou de l'agarose. Ces matières peuvent aussi être utilisées en suspensions dans un tube à

essais. Il est aussi avantageux d'employer des tubes à essais sur la surface intérieure desquels est fixé l'autre composant de la paire d'affinité. Qu'il soit possible de fixer sur cette matière, un composant ayant une affinité pour le composant attaché à la sonde de capture, constitue une condition préalable pour la matière choisie.

Si le spécimen contient l'acide nucléique à identifier, l'hybridation fournira un hybride sonde de capture : acide nucléique cible : sonde de détection. Cet hybride adhère au support pendant le fractionnement. La substance de marquage de la fraction collant au support peut être mesurée par des méthodes classiques, directement à partir du support ou après élution, à partir de la solution éluée.

On peut aussi mettre en oeuvre d'autres systèmes, par exemple une extraction de phase à champs magnétiques à la place de la chromatographie d'affinité dans le fractionnement.

La méthode conforme à la présente invention est décrite plus en détail dans les exemples suivants. La méthode de la présente invention ne dépend pas des fragments d'acide nucléique utilisés dans les exemples.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples de mise en oeuvre sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1

Identification de l'ADN d'adénovirus provenant d'un lysat de cellules par l'acide d'homopolynucléotides.

La sonde de détection utilisée était le phage recombinant mKTH 1206 marqué par l'$^{125}I$, qui contient un fragment Bgl II du génome de l'adénovirus des positions 42-45,3 % sur la carte génétique du type 2 d'adénovirus. Le phage recombinant a été déposé dans la collection de cultures Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen sous le numéro DSM 2827. Son activité spécifique est de $7 \times 10^7$ cpm/µg d'ADN. La sonde est davantage décrite par Ranki et Coll. 1983, Gene 21, 77 - 85.

La sonde de capture utilisée était le plasmide recombinant pKTH 1202, qui a été déposé dans la Collection de Cultures Deutsche Sammlung von Mikroorganismen sous le numéro DSM 2824 et comprend un fragment BamHI D d'adénovirus (position sur la carte : 29-42 %), cloné dans le plasmide pBR 322. Le plasmide recombinant pKTH 1202 (DSM 2824) a été coupé à l'aide de l'enzyme de restriction Hae III et une queue poly-A a été liée aux extrémités 3' des fragments avec une enzyme tranférase terminale. La longueur de la queue a été mesurée par incorporation de $^3H$-A. La longueur était en moyenne d'environ 70 résidus A. On a dénaturé la sonde de capture en la portant à ébullition avant de l'utiliser. L'échantillon utilisé consistait en cellules A-549 infectées avec l'adénovirus. Les cellules ont été incubées pendant 21 heures après l'infection. Les cellules ont été collectées et lysées avec une solution à 1 % de dodécylsulfate de sodium. La solution contenait environ $10^6$ cellules/ml. Sa viscosité a été abaissée par un traitement ultrasonique. On a utilisé comme témoin, des cellules A-549 non-infectées et traitées de façon identique. Avant hybridation, on a porté le spécimen à ébullition pendant 5 minutes dans du NaOH 0,02 M, on l'a refroidi à 0°C et neutralisé avec de l'acide acétique.

Pour effectuer le test, on a combiné dans un tube à essais, une sonde de détection (500 000 cpm), 50 ng de sonde ADN de capture et 10 µl de spécimen. On a ajusté le volume à 50 µl et la solution tampon utilisée comprenait 0,6 M

de chlorure de sodium, 0,06 M de citrate de sodium, 0,02 M de phosphate de sodium, (pH = 7,6) et 0,5 % de dodécylsulfate de sodium. On a incubé le mélange pendant 1 heure à 65°C.

Après l'hybridation, on a refroidi la solution à + 20°C et on l'a fait s'écouler lentement à travers une colonne de chromatographie ayant 1 ml d'oligo dT-cellulose. La solution ainsi recueillie a été à nouveau envoyée dans la colonne. On a ensuite lavé la colonne avec 20 ml d'une solution qui contenait 0,15 M de chlorure de sodium, 0,015 M de phosphate de sodium (pH = 7,6) et 0,5 % de dodécylsulfate de sodium. On a enfin détaché l'ADN fixé en utilisant 1 ml de NaOH 0,02 M. On a récupéré cette solution et déterminé sa radioactivité.

Résultat : Activité de l'$^{125}$I (cpm)

| Acide nucléique cible : cellules infectées | Cellules du témoin |
|---|---|
| 5230 | 325 |

EXEMPLE 2

Identification de l'ADN de Chlamydia trachomatis à l'aide de biotine-streptavidine

La sonde de détection utilisée était le phage recombinant mKTH 1245 marqué par l'$^{125}$I, qui contient deux fragments BamHI-SalI d'ADN provenant du clone pKTH 1220, qui sont liés ensemble au vecteur M13np8. Le clone pKTH 1220 a été déposé dans la Collection de Cultures Deutsche Sammlung von Mikroorganismen sous le numéro DSM 2825 et il est décrit dans Palva et Coll., FEMS Microbiology Letters 23 pp. 83-89, 1984.

La sonde de capture utilisée était le plasmide recombinant pKTH 1250. Ce plasmide comprend un fragment SalI-ClaI de 2,9 kb provenant du plasmide pKTH 1220 (DSM 2825) et le vecteur pAT153.

Des molécules de biotine ont été liées à l'ADN du

pKTH 1250 de façon covalente, suivant la méthode connue de "nick-translation" (Rigby et Coll. J.Mol.Biol. 113, pp. 237-251, 1977), avec la biotine-11-UTP comme substrat (Bethesda Research Laboratories). On a porté à ébullition la sonde ADN de capture dans un tampon comprenant 10 mM de Tris-Cl, pH = 7,6 et 1 mM d'EDTA, pendant 5 minutes avant de l'utiliser.

L'acide nucléique cible était le plasmide recombinant pKTH 1220 (DSM 2825). Ce plasmide contient environ 10 kb de l'ADN caractéristique de Chlamydia trachomatis, lié au vecteur pBR 322. Le plasmide sert d'ADN modèle, représentant l'ADN du génome de la bactérie. Avant utilisation, on a chauffé à ébullition le plasmide pendant 5 minutes dans 0,02 M de NaOH, puis on a neutralisé la solution avec de l'acide acétique.

La streptavidine, utilisée comme matière d'affinité, a été fixée sur du Sépharose activé par du $CNB_r$ (Pharmacia) selon Axen et Coll. Nature 214 pp. 1302-1304, 1967.

Pour effectuer ce test, on a combiné dans un tube à essais, la sonde (500 000 cpm), 50 ng de sonde ADN de capture et 10 ng d'ADN cible. On ajuste le volume à 20 µl et la solution tampon était la même que celle qui est utilisée dans l'Exemple 1. L'ADN témoin était de l'ADN de thymus de veau.

On a incubé le mélange pendant 60 minutes à 65°C. Ensuite, on a ajouté 500 µl d'une solution tampon ayant la composition suivante : 0,1 M de Tris-Cl pH 7,5, 0,1 M de NaCl, 2 mM de $MgCl_2$, 0,05 % de Triton x-100. Enfin, on a fractionné la solution dans une colonne de Streptavidine-Sépharose de 0,2 ml. On a lavé la colonne avec 10 ml du tampon mentionné ci-dessus et 10 ml comprenant 0,015 M de chlorure de sodium, 0,015 M de phosphate de sodium (pH = 7,6), 0,5 % de dodécylsulfate de sodium (50°C). L'ADN biotinylé adhérait donc à la streptavidine, tandis que l'autre ADN traversait la colonne. La sonde radioactive n'adhérait qu'à la suite d'une formation d'hybride. On a déterminé la radio-

activité capturée en transférant la colonne entière dans le tube de comptage du compteur gamma.

| | Activité de l'$^{125}I$ (cpm) | |
|---|---|---|
| Résultat : | Acide nucléique cible : 10 ng de pKTH 1220 | 10 ng d'ADN témoin |
| | 1350 | 115 |

EXEMPLE 3

Identification de l'ADN du plasmide pBR322 à l'aide d'une paire antigène anticorps

La sonde de détection utilisée était un dérivé du plasmide pBR322 (disponible industriellement chez plusieurs sources), dont on a enlevé le fragment PstI-SalI (3613 - 651). On a marqué le plasmide avec de la photobiotine en utilisant une méthode connue (Forster et Coll. Nucleic Acids Res. 13, pp. 745-761, 1985) et des réactifs industriels (Bresa, Adelaide, Australie).

La sonde de capture utilisée était l'ADN provenant d'un phage recombinant M13mp11, dans lequel avait été introduit le fragment PstI-SalI de pBR322. L'ADN a été sulfoné selon une méthode connue (Organics Ltd. Yavne, Israël).

Le spécimen était l'E. coli HB101 portant le plasmide pBR322 dont la quantité avait été augmentée par amplification au chloramphénicol (Maniatis et Coll. Molecular cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982). On a lysé des cellules bactériennes avec du lysozyme, puis on les a portées à ébullition dans du NaOH, de la façon qui est décrite dans la publication de Palva, J. Clin. Microbiol. 18, pp. 92-100, 1983).

Des anticorps monoclonaux antisulfone ont été utilisés pour enduire des puits de microtitrage en polystyrène, selon des méthodes classiques (McKearn, dans Hybridomas : A New Dimension in Biological Analyses, ed. Kennett et Coll.,

Plenum Press 1980).

Pour réaliser ce test, on a combiné $5.10^6$ cellules d'E. coli lysées (à la fois avec et sans pBR322) avec 100 ng de chacune des sondes de capture et de détection dans 50 µl de mélange d'hybridation. Les conditions étaient celles de l'Exemple 1, sauf que 5 % de polyéthylène glycol (PEG 6000) ont été ajoutés au mélange et que la concentration de dodécylsulfate de sodium était de 0,1 %. Après hybridation, on a dilué la solution à 250 µl en ajoutant du phosphate de sodium 0,02 M (pH = 7,6), puis on a transféré la solution dans le puits de microtitrage enduit d'anticorps. On a alors effectué une incubation pendant 2 heures à 37°C. On a ensuite lavé le puits avec une solution contenant 0,15 M de chlorure de sodium, 0,02 M de phosphate de sodium, pH = 7,6 et 0,05 % de triton x-100. On a rendu visible la présence de la sonde de détection en ajoutant de la streptavidine (Bethesda Research Laboratories BRL) en lavant, en ajoutant de la phosphatase alcaline biotinylée (BRL) et en lavant de la façon qui est décrite par Leary et Coll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, pp. 4045-4049, 1983. On a enfin ajouté 250 µl d'une solution à 36 mg/ml de phosphate de paranitrophényle (Sigma) dans un tampon de diéthanolamine (pH 10). Soixante minutes plus tard, la réaction a été stoppée et le taux d'absorption mesuré à 410 nm.

Résultat :

| $A_{410}$ nm | |
|---|---|
| Acide nucléique cible : cellules avec pBR322 | Cellules sans pBR322 |
| > 2 | 0,15 |

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Méthode pour l'identification d'acides nucléiques, caractérisée en ce qu'on utilise au moins deux sondes qui sont dans la même phase en solution dans une méthode d'hybridation, la sonde de détection étant marquée avec une substance de marquage détectable et un membre d'une paire d'affinité étant attaché à la sonde de capture, et qu'on isole l'hybride sonde de capture : acide nucléique cible : sonde de détection formé dans la réaction d' hybridation au moyen de l'autre membre de la paire d'affinité.

2°) Méthode suivant la revendication 1, caractérisée en ce que la paire d'affinité comprend la biotine et la streptavidine ou la biotine et l'avidine.

3°) Méthode suivant la revendication 1, caractérisée en ce que la paire d'affinité est une paire d'homopolynucléotides.

4°) Méthode suivant les revendications 1 et 3, caractérisée en ce que la paire d'affinité est poly dC - poly dG.

5°) Méthode suivant les revendications 1 et 3, caractérisée en ce que la paire d'affinité est poly dA - poly dT.

6°) Méthode suivant les revendications 1 et 3, caractérisée en ce que la paire d'affinité est poly dA - poly U.

7°) Méthode suivant la revendication 1, caractérisée en ce que la paire d'affinité est un dérivé de métal lourd - un groupe thio.

8°) Méthode suivant la revendication 1, caractérisée en ce que la paire d'affinité comprend un antigène - un anticorps.