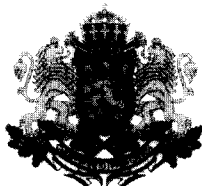


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 97041A

(51) G01N 33/539

C12Q 1/68

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 97041				(71) Заявител(и):			
(22) Заявено на 03.11.1992				CHIRON CORPORATION , , 94608			
(24) Начало на действие				EMERYVILLE , 4560 HORTON STREET			
на патента от:				CALIFORNIA (US) ;			
Приоритетни данни				(72) Изобретател(и):			
				URDEA , Michael S . , 94501 Alamo			
				CALIFORNIA (US) ;			
(31)	519212	(32)	04.05.1990	(33)	US	(74) Представител по индустриална	
				собственост:			
				Фани Владимирова Божинова , 1000			
				София , п.к.728			
(41) Публикувана заявка в				(86) № на РСТ заявка:			
бюлетин № 101 24.12.1993				PCT/ US91/0 / 2925 , 06.05.1991			
(45) Отпечатано на				(87) № и дата на РСТ публикация:			
(46) Публикувано в бюлетин №				91/174 / 42 , 14.11.1991			
на							
(56) Информационни източници:							
(62) Разделена заявка от рег. №							

(54) ПРОБИ НА БАЗА ПРОТЕИН-НУКЛЕИНОВА КИСЕЛИНА И МЕТОД И
ИМУНОИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ ИЗПОЛЗВАНЕ НА СЪЩОТО

(57) 1. Молекулярна проба за използване като усилвател на сигнали при имуноизследвания, включваща първи домен (А), който е полипептид и функционира като антитель специфично за познат антиген, втори домен (В), който е двуверижен полинуклеотид, способен да функционира като промотор на ензим с активност на ДНК зависима РНК полимераза и трети домен (С), който е или едно- или двуверижен и е съседен на втори я домен и е способен да функционира като матрица за промоторната активност на втория домен.

35 претенции , 11 фигури

BG 97041A

- 8 -

M 113 92041

Средство на база на
ПРОТАМИН-НОКЛЕИНОВА КИСЕЛИНА И ИМУНОИЗСЛЕДВАНЕ
ПРИ ИЗПОЛЗУВАНЕ НА СЪЩОТО

ОПИСАНИЕ

Техническа област

Това изобретение се отнася общо до областта на имунологията и химията на нуклеиновата киселина. По-специфично, то се отнася до използването хибрилизирани на нуклеиновата киселина като средство за подсилване на откриваем сигнал при имуноизследвания.

НАБЪ НА ТЕХНИКАТА

Хибрилизирани на нуклеиновата киселина се използва сега общо при генетичните изследвания, биомедицинските проучвания и клиничната диагностика за откриване и количествено определяне на отделни нуклеотидни последователности, които са налични в

хетерогенни смеси на ДНК, РНК и/или други материали. при хибри-
зирането на базични нуклеинови киселини се изследва при еноле-
тови нуклеинова киселина (или ДНК или РНК) директно или индиректно
към белезани нуклеиново киселин средство, и дуплекси съдържащи
белега се определят количествено. Използват се радиоактивни и
нерадиоактивни бележки средство.

Друг основното използване липсва чувствителност. Когато ана-
литът (*analyte*) е наличен в малък брой или в разрежена концен-
трация, сигналът не може да бъде различен от фоновия шум. Разра-
ботени са вариации на основната схема за улесняване сепарирането
на мишенните дуплекси от външния материал и/или за подсилване
на аналитните последователности с оглед улесняване на откриването,
но тези вариации страдат обикновено поради комплексния и изисква-
щи голяма консумация процедури, висок фон, слаба чувствителност
и трудности при количественото определяне. За общо обсъждане на
тези вариации виж Интернационалният патент Пуб. N 39/03891.

Имуноизследвания се използват също често при генетични про-
учвания, биомедицински изследвания и при клинични диагностички за
откриване и количествено определяне на отделни антигенни епитопи,
които са налични в хетерогенни смеси на кръвни пробни образци,
клетъчни екстракти и в други материали. Едно основно имуноизслед-
ване включва специфично свързване на антигено, или моноклонално
или поликлонално, към мишенен антиген и средства за откри-
ване на реакцията. Такива средства са включени в различни изслед-
вания включително директни, индиректни и сандвичеви имуноизслед-
вания.. Обаче чувствителността за откриване на есенциалните
взаимодействия антиген/антигено предлага същите проблеми като
описаните по-горе за хибризации на нуклеинова киселина.

Напоследък се използват различни методики като радиоимуно-
изследване, имунопероксидаза и ELISA при имуноизследванията.

Обаче радионуклеоидследванията имат недостатъка за изискване на спасни и неблагоприятни за околната среда реактиви и имунопероксидази, а ЕЦДЗА страда от слаб сигнал спрямо стромелинът на шум и е лишен от усилване на сигнала.

Една от първите задачи на изобретенията е из създаване на усилване на сигнала, да изпозволи на единични полинуклеотидни молекули, които се свързват полезни преустройства за хибрилизирани на нуклеинова киселина преустройства за имуноследвания. Тези усилващи средства предлагат силно репродуцируем сигнал съответно подсилване, силно репродуцируемо отношение сигнал към шум, сами са определени количествено и репродуцируеми и са пригодни да се комбинират специфично в анализ антиген, наличие в ниска концентрация и да оформя "универсален" реагент за киселина за оформяне на стабилни комплекси.

В патент № 4,368,105, изпатен на 19 септември 1980 година, чиято изводи са включени тук като литература, описва едно изследване разтворима форма хибрилизационен анализ, в което анализът нуклеинова киселина хибрилизира до "обелязано средство" и до "захващащо средство". Комплексът средство-анализ е свързан чрез хибризацията към твърда опора. Това позволява аналитичният олигонуклеотид да бъде отстраняван от разтвор като беза твърди комплекс, като с това се концентрира анализът, улеснявайки сепарацията от други реактиви и повишавайки последващото откриване.

Патентното описание публикация № 0/13867 публикувана на 15 ноември 1980 година претендира за линейни и разклонени мултимерни полинуклеотидни средства които имат две области, и методи за използване на тези средства като усилватели на сигнала при изследвания за хибризацията на нуклеинова киселина. Първата област е допълнителна към еднодентова олигонуклеотидна последователност

представляваща интерес, а втората област е съставена от множество еднодентови олигонуклеотидни подединици които са допълнителни към един елементарен белязан олигонуклеотид.

Патентното описание публикация № ГСТ/САЩ 91/0213 претендира за полинуклеотидни средства, които имат три области, както и методи за използване на тези средства като усилватели на сигнал при изследвания за хибрилизирание на нуклеинова киселина. Първата област е допълнителна към еднодентова олигонуклеотидна последователност, втората област е пригодна да функционира като промотер за един бактериален гат зависеща от ДНК РНК-полимеразна ензимна активност и третата област е пригодна да функционира като транскрипционен шаблон за полимеразната активност..

Протеин/ДНК хибридни молекули се използват като средство при изследвания за хибрилизирание на нуклеинова киселина, когато протеинната молекула функционира като белязан компонент (виж /1/ и /2/).

Протеин/ДНК хибридни молекули се използват също като средства при имуноизследвания. В /3/ се описва едно радиоактивно белязано средство, представляващо протеин и ковалентно свързан радиоактивен олигонуклеотид. Радиоактивната половина се използва за показва наличността на протеиновата половина при едно биологично изследване. В /4/ е описана и една протеин/ДНК хибридна молекула, в която протеинната половина разпознава специфично един мишенен протеин а половината нуклеинова киселина предпазва реакцията за белязване.

Обобщение на изобретението

Една страна на изобретението е полипептидно/полинуклеотидно-хибридно молекулярно средство за използване като усилвател на откриваем сигнал при имуноизследвания. При едно изпълнение "полимеразното средство" обхваща три области:

(а) една първа област (А) която е полипептид и функционира като антигено специфично за познат антиген;

(б) една втора област (В) която е двойно лентова полидеоксирибонуклеотид пригледен за функционира като промотер за зареждане от ДНК РНК-полимеразна ензимна активност; и

(с) една трета област, която е или едно- или двулентова и е свързана на втората област, така че третата област е в състояние да функционира като шаблон за промотерната активност на втората област.

Второ включване е едно полипептид/полидеоксирибонуклеотид-хибридно молекулярно средство за прилагане като усилвател за откриваем сигнал при имуноизследвания. Това "мултимерно средство" обхваща две области:

(а) една първа област която е полипептид пригледен за функционира като антиген, което се свързва специфично към познат антиген; (б) една втора област обхващаща ^{номе} ~~молекулярност~~ от еднолентови олигонуклеотидни последователности, които са приготвени да се свързват специфично към еднолентови последователности на нуклеинова киселина; и

(с) средството за свързване на първата и втората област.

Друга страна на изобретението е метод за получаване на откриваем сигнал при имуноизследване чрез прилагане на полимерните средства, описани по-горе. Този метод обхваща:

(а) имобилизиране на антигенен анализ, директно или индиректно върху твърд субстрат;

() директно или индиректно свързване към анализът първо молекулярно средство, обхващащо:

(I) свързване на област (А);

(II) една втора област (В) която е двойно лентова ДНК последователност пригодна да функционира като промотер за

зависяща от ДНК РНК-полимеразна ензимна активност; и

(III) една трета област (C), която е или едно- или двуелентова и е ~~свързана~~ съседна на област B, така че третата област е в състояние да функционира като шаблон за промотерната активност на втората област;

(с) отстраняване на несвързаното средство;

(d) транскрибиране на мултиплиените копия на ДНК олигомери които са допълнителни към шаблонната последователност с' на третата област C на средството конструирано по пътя на зависяща от ДНК РНК-полимеразна активност;

(е) количествено определяне на транскриптите.

Друга страна на изобретението е друг метод за посилване на откриваем сигнал при имуноизследване чрез използване на мултимерните средства описани по-горе. Този метод обхваща:

(a) имобилизиране на анализе, директно или индиректно, върху твърд субстрат;

() директно или индиректно свързване към анализе на хибридно молекулярно средство, обхващащо:

(I) една свързваща област (A), която е полипептид, приготвен да функционира като анти тяло, което се свързва специфично към интересувания ни антиген; и

(II) една втора област (B) обхващаща множественост от енолентови ДНК олигонуклеотидни последователности, които са пригодни да се свързват специфично към една енолентова белазана олигонуклеотид; и

(III) едно средство за конструирание на първата и втората ~~област~~ области;

(с) отстраняване на несвързаното средство;

(d) имобилизиране на енолентовете белазани зигонуклео-

тилки които обхващат една нуклеотидна последователност, която е по същество допълнителна към допълващата последователност на М областта средство към допълващите на втората област;

(в) отстраняване на несвързания белязан олигонуклеотид;

(г) количествено определяне на количеството на белязания олигонуклеотид свързан към средството.

Още по-друго приложение на е един метод за подсичане на откриваем сигнал при конкуриращо имуноизоелектране, което обхваща:

(а) конструиране на хибридна молекула в която областта А е полипептид приготвен на функционира като хаптен и тази област е конигрирана или към В/С областта на полимеризащото средство или към М областта на мултимерното средство;

(б) имобилизиране на хибридната молекула директно или индиректно върху твърд субстрат при наличието на конкуриращ анализ;

(с) отстраняване на несвързаното средство, и или

(д) транскрибиране на мн теплени копие до РНК олигомери по пътя на зависяща от ДНК РНК-полимеразна активност и идентифициране и количествено определяне на транскриптите - това в случай че се използва полимеразно средство; или

(е) хибрилизирание на етилолентни белязани олигонуклеотиди към поделниците на М областта, отстраняване на несвързаното белязано и определяне количествено на свързаното белязано, това в случай че мултимерното средство е използвано.

ДЕТАЛНО ОПИСАНИЕ НА ЧЕРТЕЖИТЕ

Фигура 1А е схематично представяне на полимеризащото средство от мономерен полимеразен тип. Различните букви означават областите а малките букви означават дупките в областта. Една праймерна буква означава по-висока ниво (обичайно 3' до 5' от ляво на дясно).

Областта А е едно анти тяло, което разпознава мишенен епитоп (последователност ID № 3). Областта В е промотера за РНК-полимераза (послед. ID №: 3), (послед. ID №: 10), (послед. ID №: 11) и (послед. ID №: 12). Последователността с' е наобла за РНК-полимеразата. Средството се ~~активизира~~ като екзоментово. ~~ааааааа~~ (послед. ID №: 1) в края на областта С представлява рол-а свързвател добавен за позволява самоотгряване. А/Т зоната между А и В области се изисква по избор за позволяване на пълна активност на анти тяло.

Фигура 1В е ДНК последователност на едно изпълнение на подсилването средство от полимеразен тип. Промоторната област В се състои от съвпащата последователност на промотера на бактериофаг T7 (5'-ТААТАСНАСТСАСТА-3') (послед. ID №: 3) плюс 15 допълнителни остатъка 5' към промоторната последователност.

Фигура 1С е схематично представяне на мултимерно от полимеразен тип проследявано средство, в което областта А функционира като анти тяло и промоторната област В и с областта се самоотгряват се.

Фигура 1D е схематично представяне на мултимерно подсилващи средства в които областта А функционира като анти тяло и В областта е съставена от множественоост на олигонуклеотиди. По очени са както разклонени така и пообозте на пробен отгряване..

Фигура 2А е схематично представяне на сензорната използвателска система, която включва патентовано средство от полимеразен тип. Аналитичният протеин е индиректно фиксиран върху твърд субстрат чрез комплексиране с едно първо анти тяло, например *gab* (заемко) анти тяло и индиректно свързан към подсилващото средство чрез комплексиране с едно второ анти тяло (например едно второ анти тяло).

Фигура 1Б е схематично представяне на санвичева система за хормонизационно изследване. Аналитичният протейн е индиректно имобилизиран както по-горе. Второто анти тяло (миш-анти-аналит) е комплексирано с хормона анти тяло/полинуклеотидна молекула, в която протейната половина функционира като анти-миш анти тяло и полинуклеотидната половина е допълнителна към един а' нуклеотиден участък на хормоналното средство (в този случай едно мултимерно средство).

Фигура 3 показва използването на РНК-полимеразни транскрипти като събителни молекули при изследване. Сял като санвичев комплекс, който включва полимеразното средство в оформен, РНК-полимераза се добавя и се продуцират РНК-транскрипти (с) допълнително към молекулата на субстрата (с'). Този последователен ход е предпочетен, защото е допълнителна към захватното средство, полимеразата върху твърд субстрат, и аз, която е допълнителна към едно субстратно средство. Това позволява индиректно имобилизиране на белтъка и количествено изследване на сигнала за имуносертификантно изследване. "ж" означава имкорпорирания белтък който може да е радиоактивен, флуоресцентен, флуоресцентен или елюментиран.

Фигура 4 (части А - Е) илюстрират използването на процедури използване на правене на изпит за наличие на треска и/или различна структура.

ИЗПОЛЗВАНЕ НА ПОЛИНУКЛЕОТИДНА МОЛЕКУЛА

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Използването на полинуклеотидна молекула е един трансформирания показател за появата на биохимическо явление, като имобилизиране на полинуклеотидна молекула на субстрата на изпит и анти тяло. Приложението на субект означава метода за приемане на откриване сигнал при изследване.

"Зависяща от ДНК РНК-полимераза" е един ензим, който улеснява полимеризирането на РНК до специфична последователност от допълнителен ДНК шаблон.

"Област" е отделен участък върху биохимическата молекула, характеризирана по своята функция.

"Епитоп" е тази част от една имуногенна молекула, която се разпознава специфично от и се комплексира със своето съответно анти тяло при една имунологична реакция.

Една нуклеотид/пептидна "хибридна" молекула обхваща както остатъци на нуклеинова киселина така и остатъци на аминокиселини, всяка в отделна функционална област на молекулата.

"Имуноген" е субстанция, която реагира по специфичен начин с едно анти тяло.

"Имунологична реакция" е специфичното разпознаване и свързване на анти тяло към епитопа на един имуноген. "Имуноизследване" е един метод за определяне наличиостта на епитоп чрез комбиниране на имунобиологична реакция със средство за откриване и количествено определяне на реакцията.

"Полидеоксирибонуклеотид" е една полимерна ДНК молекула.

"Полинуклеотид" е една полимерна ДНК или РНК молекула.

"Промотор" е страната на една полидеоксирибонуклеотид, към която РНК-полимеразен ензим се свързва препаратно за започване на транскрипция.

"Зависяща от РНК РНК-полимераза" е един ензим, който улеснява полимеризацията на РНК със специфична последователност от един допълнителен шаблон.

"Транскрипция" е процес, посредствван от един ензим, , чрез който РНК се формира от един допълнителен полинуклеотиден шаблон.

"Горната лента" е двойно лентова ДНК молекула е лентата, чието 5'-край е от ляво като последователност прочитано от ляво наляво. Последователността на тази лента е представена винаги

над последователността за нещата допълнително "долна лента", която се отбелязва с 3' до 5' от ляво на дясно.

Начини за използване на изобретението

I - Подсилващи средства

A - Полимеразни средства

Една страна на това изобретение е ЛНК подсилващо средство (отбелязвано като "полимеразно средство"), съдържащо три функционални области. Това средство се използва за повишаване на един откриваем сигнал при имуноизследвания.

Първата област -A - фигура 1A+ е един полипептид, който функционира като анти тяло със специфичност за избрания антиген. Функционалният участък се последва от зона на остатъци или от аминокиселини или от нуклеинови киселини, т.е. един разделящ участък, който по същество не взаимодейства с активността на анти тялото. Активността на анти тялото може да е специфична за един епитоп на самия анализ; обаче при едно предпочитано изпълнение анти тялото е насочено към един антигенен детерминант със специален имуногенезис използван при описаното по-долу изследване (например анти-защитни имуноглобулини 6 - виж фигура 2A). Както се прилага анализът контактува с едно специфично анти тяло, излишната анти тяло се отстранява подсилващото средство се оставя тогава да реагира със свързаното анти тяло.

За предпочитане, анализът първо се имобилизира върху твърд субстрат за уресняване на последващите процедури на промиване. Това имобилизиране може да е директно (например биологични препарати съдържащи анализа може да бъдат свързани към нитроцелулозен филтър) или индиректно (например едно специфично анти тяло може да бъде имобилизирано върху твърд субстрат и анализът впоследствие да бъде свързан към имобилизирано анти тяло).

Втората област (B - фигура 1A) обикновено 10 до 40 базови

двойки в дължина, за предпочитане 20 до 35 базови двойки, още повече за препоръчване 30 до 35 базови двойки, е двојно лентова и функционира като насочване от ДНК РНК(полимеразен промотер. Този промотер произхожда обикновено от промотерната последователност на един бактериален фаз, за предпочитане някои от фазите T3, T7 или ϕ 16, за предпочитане от бактериофаг T7.. Този клас РНК(полимераза е слабо промотерно специфичен. T7 промотерът е характеризиран може би най-добре (фигура 1B). ДНК последователностите от 17 T7 промотера са познати и е изведена обща последователност: 5'-TaaTaaCTaCTaCTaTa+/' (последов. T₇ N0:2) (виж /4/ и /5/). Последователности 3' към промотера върху допълнителната лента (с' сегмента, чийто 3' край е съседен на 5' края на 6' сегмента) служат като шаблон за транскрипция и транскрипцията на много мишенни последователности вариация може да бъде пригодена (фигура 1B) Само самия промотерен участък трябва да бъде нвоинолентов (виж /6/).

Утъжавания на 5' края на помотера има слаб ефект върху транскрипцията. Например, при едно предпочитано изпълнено В участка се състои от обща последователност на Т7 промотера плюс допълнителни ~~налични~~ ~~налични~~ ~~налични~~ фази към общата последователност на Т7 плазмида (могат да се получат от САЩ биохимикалри) до Р_u II ограничително място (фигура 1В). Тези последователности може да са или да не са външни.

Третата област (С - фигура 1А) е директно 3' към втората област и с' лентата на тази област служи като шаблон за областта В промотера. Областта С е обикновено с дължина 30 до 80 нуклеотида, за предпочитане 35 до 50 нуклеотида и най-много за предпочитане 40 до 45 нуклеотида. Тази област може да е или единично или двукратно лентова, 3' края на с' шаблонната лента (директно съседна към промотера) е обикновено цитозинов остатък и следователно 5' края на горната лента е обикновено гуанизинов остатък.

МНК транскрипционният продукт (с) на С областта функционира като съобщителна молекула за наличността и количеството на аналита (фигура 3). Подсилване на сигнала се явява защото всеки шаблон продуцира 10^1 до 10^4 транскрипти. Последователността на тази област е означена със случайна последователност чрез компютерен анализ на кръстосана реакция с други средство в системата.

Последователността на областта С е предназначена за специфична схема за откриване и няколко такива схеми може да бъдат използвани за количествено определяне на транскриптите. Например, транскрипционният продукт (с) на С областта може да бъде подразделен на две подобласти (c_1 и c_2 (фигура 3). Подобластта c_1 е допълнителна към транскриптно захващащо средство, което е имобилизирано върху твърд субстрат. Подобластта c_2 е допълнителна към c_1 белязано средство. След хибридиране количеството на захвърания белег е линейно пропорционален на количеството на аналит наличен в изходния пробен образец.

При едно друго изпълнение МНК транскрипта на С областта има само една c_1 подобласт. С областта е транскрибирана в присъствието на белязан/рибонуклеотидни трифосфати и белязаният транскрипт е впоследствие свързан към имобилизирано транскриптно захващащо средство чрез своята c_1 подобласт и количествено определено.

При още по-друго изпълнение МНК транскрипта на С областта има само една c_2 подобласт. С областта е транскрибирана в присъствието на биотинилирани рибонуклеази и транскриптите са захванати в авидинови легла. Тогава транскриптът се отгрява до белязано средство чрез своята допълнителна c_2 подобласт и се определя количествено.

Възможни са няколко други методи за белязване и откриване

~~използване~~

на транскрипти на полимеризационни средства, включително едновременно използване на боязани рибонуклеици и на авидин/биотиново свързване и те са явни за специалистите в тази област.

В и С областите на полимеризационни средства може да бъдат получени чрез клониране, електрично свързване, химически методи за кръстосано съединяване, директен химически синтез или комбинация от тези. Когато се получава чрез клониране, нуклеиновата киселина последователност, която кодира пята В/С област или фрагменти от нея може да бъде едно- или двулентова и да бъде оформена чрез обикновените процедури за клониране.

В областта е двоен лентов, а С областта може да е или еднолентова или двулентова. Двоен лентови области могат да бъдат получавани при два начина: лентите могат да бъдат клонирани отделно и впоследствие да бъдат хибридазирани допълнителни ленти; или алтернативно, средството може да бъде клонирано като единичен лентов и самоотгрята полинуклеотид (например с' с 6). В този случай се добавят четири до десет допълнителни нуклеотида, за предпочитане 5 до 7 нуклеотида се добавят към една последователност като разделителят между с и с' за да се позволи правилно контуриране на двулентовата зона когато тя се самоотгрява. Разделителят е обикновено поли-А, но може да бъде модифициран по съвпадение до минимум хибридационна кръстосана реактивност между различни средства при изследването.

А областта може да бъде контирана към В/С областта чрез механично поставени свързващи средства като нуклеинова киселина, аминокиселина, карбохипрат или полиолни мостове или чрез други кръстосани свързващи елементи. В/С областта може да бъде синтетизирана с 5' остатък от нуклеинова киселина която е била получена като произволно да има една функционална група която предлага свързващо място за А областта или остатъкът може да бъде производно

след като олигонуклеотидът е бил синтезиран за съзаване на
такова място. Една предпочитана процедура за химическо кръстосано
свързване е да се включи елиа N^4 модифициран цитозин база към 5'-
края на полинуклеотида, както е описано в В.Р.А. патентния
№ 0225807.

Пря едно от по-предпочитано изпълнение контролирането на
В/С областта в ДНК към А областта анти тяло може да бъде извършено
по начин аналогичен с ензимното контролиране. В/С областта се синте-
тизира да съдържа алкиламинова половина. Алкиламинът реагира с
елиа хетеробифункционален свързващ елемент като суминимитил
4-малеимидометил циклохексен-1-карбоксидат (ЗМСС). След колонно
пречистване, ДНК може да реагира специфично със сулфхидрилни
функционалности. Едно анти тяло може да съдържа реактивен сулфхидрил
(както в януциран α β')₂ или може да бъде модифициран да съдържа
елиа сулфхидрил както когато е модифициран с N -сукцинимидил
3-пиримидил тию)пролионат (SPDP) и тогава редуциран). Възможно
е също директно контролиране ДНК-амиа към анти тяло-амиа с хетероби-
функционални реактиви, не е типично по-трудно за контролиране.

В - МУЛТИМЕРНИ СРЕДСТВА

Друга приложение на изобретението е едно ДНК подсилващо сред-
ство (отбелязано като "мултимерно средство") съдържащо две функ-
ционални области, А, която е същата като област А на полимерното
средство, описано по-горе и една втора (М - фигура 1Д), която
съдържа няколко повтарящи поделения. Това средство, полезно на
полимерното средство описано по-горе, се също използва за
подсилване на сигнала при имуноизследвания.

Полинуклеотидът на М областта може да е линеен или разклонен
полимер от същата повтаряща олигонуклеотидна поделеница или раз-
лична едноелементова олигонуклеотидна поделеница. Тези поделеници
са пригодни да хибрилизират специфично и стабилно до ^{нуклеотид} ~~нуклеотид~~
нуклеотид представляващ се термс, типично елиа белязан олигонуклеотид

или друг мултимер. Тези елементи са нормално 15 до 50, за предпочитане 15 до 30 нуклеотидна единица и имат GC съдържание в обхвата от 40 до 60 процента. Общият брой нуклеотидни единици в мултимера са обикновено в обхвата от 3 до 50, по обикновено 10 до 25. Олигонуклеотидните единици на мултимера може да са съставени от РНК, ДНК, модифицирани нуклеотиди или от комбинации от тях.

Олигонуклеотидните последователности на мултимера може да бъдат ковалентно свързани директно помежду си чрез фосфоестерни връзки или чрез междинно поставени свързващи елементи като нуклеинова киселина, амини киселина, карбохидрат или полиолни остове или чрез други кръстосано свързани елементи, които са пригодни за кръстосано свързване на нуклеиново кисели или модифицирани нуклеиново кисели ленти. Местото (местата) на свързване може да се в краищата на последователността при или нормална 3' - 5' ориентация или към една или повече нуклеотиди в лентата.

При линейните мултимери отделните последователности са свързани край към край за оформяне на линеен полимер. При един тип разклонен мултимер три или повече олигонуклеотидни единици  манират от една точка на произход за оформяне на разклонена структура. Точката на произход може да е друга олигонуклеотидна последователност или една функционална молекула към която може да се ковалентно свързани най-малкото три единици. При един друг тип, има един нуклеотиден гръбнак на последователността с една или повече допълнителни олигонуклеотидни последователности. Тези тип мултимери са "подобни на вилица", "подобни на гребен" по структура. Допълнителните единици са нормално зависящи от един модифициран нуклеотид или друга органична половина имаща подходящи функционални групи към които олигонуклеотидите могат да бъдат контирани или прикачени по друг начин -вж фигура 1D.

Мултимерът може да бъде изцяло линейен, изцяло разклонен или да е комбинация от линейна и разклонена част. За предпочитане има най-малкото две точки на разклонение в мултимера, повече за предпочитане най-малкото 15 и за предпочитане 15 до 50. Мултимерът може да включва един или повече сегменти на двойнолентови последователности.

Област М може да бъде приготвена чрез клониране (ако е линейна), ензиматично свързване, химическо кръстосано свързване, директен химически синтез или комбинация от тези. Тези методи на синтез са изцяло включени в Интернационалния патент пуб. № 89/03891, 5 март, 1989 година. В случая с линейни мултимери, приготвени чрез клониране, последователностите на нуклеинови киселини които копират целия мултимер или фрагменти от него може да бъде оформена в единично или двойно лентова форма чрез обикновените процедури на клониране. Когато са изработва в двойно навита форма, мултимерите/фрагментите са крайно денатурирани за да дадат еднолантови мултимери/фрагменти. Мултимери могат да бъдат клонирани в еднолентова форма при използване на обикновени еднолентови фагови вектори като M13. Фрагменти могат да бъдат свързани ензиматично или химически да оформят областта В мултимер. Когато се свързват ензиматично отделните единици се лигират с една лигаза, като ДНК или РНК лигаза, какъвто може да е случая. Когато се получават чрез химически кръстосано свързване, отделните единици може да бъдат синтезирани с една или повече нуклеинови киселини, които са били изведени да имат функционални групи, които предлагат свързващи места или да са изведени след като олигонуклеотидът е синтезиран да паде такива места. Предпочитана процедура за кръстосано свързване е да се включи N^4 -модифицирана цитозинова база в нуклеотида, както е описано в Е.Р.А. №225,807, изволите от които са включени тук.

Кожато се приготвя чрез директен химически синтез, олигонуклеотидите съставлящи изведени нуклеинови киселини или еквивалентни многофункционални молекули, чиито функционални групи са блокирани, може да бъдат получавани чрез обикновени методики за синтез на олигонуклеотиди. Функционалните групи са отблокирани и олигонуклеотидните единици са синтезирани от отблокирани места.

Една генерична структура за молекулите, използвани за получаване на точки на разклоняване в мултимерите е както следва:

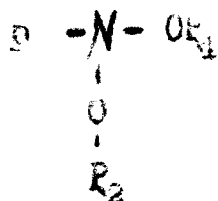


където R е една органична половина, за предпочитане нуклеинова киселина, R^1 е хидроксилна защитна група, която може да бъде отстранена при условия, които не отстраняват синтетичната нуклеинова киселина от твърдата фаза и не отстраняват екзоциклическия азот или фосфатните защитни групи, X е една съдържаща фосфор група, която улеснява синтеза на нуклеинова киселина като защитна фосфорамидитна, фосфатна или фосфонатна група, Y е радикал произлизащ от една нуклеофилна група като амино, хидроксил, сулфхидрил или защитен фосфат и R^2 е R^1 или една блокираща или защитна група, която може да бъде отстранена и заместена с азот без засягане на R^1 . В молекулите, използвани за получаване на разклонени или "подобни на вилца" клонове, R^1 и R^2 са еднакви; докато в молекулите използвани за получаване на "подобно на гребен" разклоняване R^2 е блокираща група, която е стабилна при наличие на R^1 деблокиращ реактив. Фигура 4 илюстрира схематично използваните процедури за синтезиране на мултимери имат "подобно на гребен" разклонения, "подобни на вилца" разклонения или комбинация от тях.

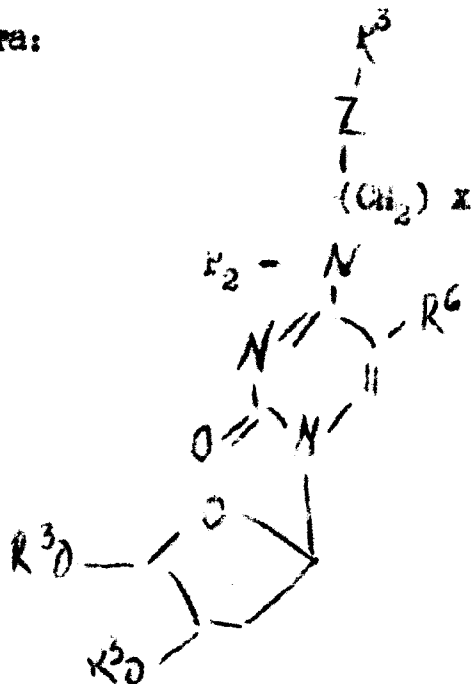
Част А от фигура 4 представя обикновената схема за олигонуклеотиден синтез за получаване на линейен олигонуклеотид, като автоматизиран фосфорамидитен метод (вжж /7/). Тъмният блок представя

твърда опора, N представя един нуклеотид и $p-Ner_1$ (K_1 е еквивалентен на $\mathbb{Q}^1$ по-долу), ~~сво~~ обикновено нуклеотида произволно, ~~нама~~ подходящи защитни групи.

Част В показва процедурата за получаване на подобен на гребен мултимер. Съединението

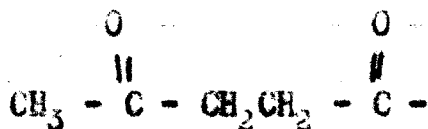


представлява модифицирана база на формула (2) по-долу. Една олигомерна единица с желана големина и последователност се синтезира и остава върху опората. Една или повече R^4 -модифицирани пирозински бази се включват тогава в веригата чрез споменатата автоматична процедура. За предпочитане, модифицираната база има формулата:

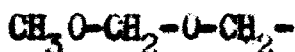
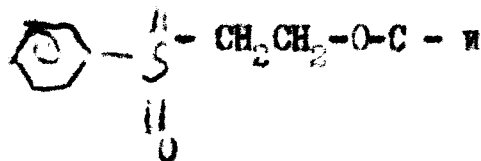
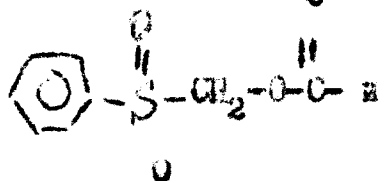
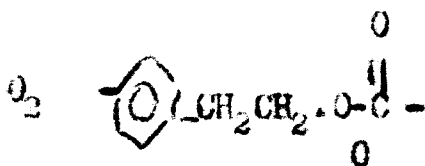
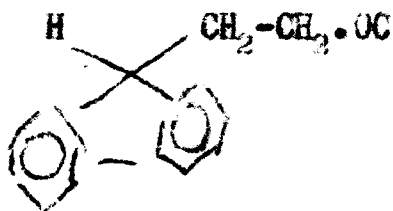


където Z е нуклеонна маса $-O-$, $-NH-$, $-S-$, PO_4- и

ОС¹ - О-, К¹ е блокираща или защитна група като диметоксифенил (DMT) или пиксил, който е обикновено базово стабилен и чувствителен на киселина, К² е водород или метил, К³ е блокираща или защитна група, която може да бъде отстранена и заместена с водород без да се засяга К⁴ като



0

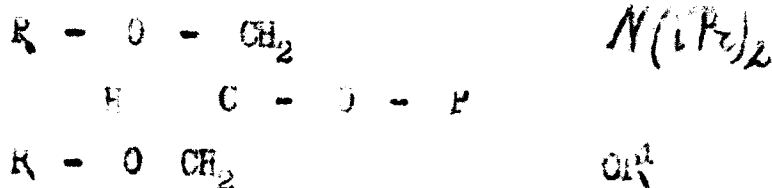


R^3 е фосфорамидит или друга фосфорно производно което позволява добавянето на нуклеотиди към 5' позицията на една олигонукреотидна верига по време на химически синтез, например еден фосфориестер, фосфотриестер и т.н., R^6 е етил, водород, бром, йод или флуор и X е показател в обхвата от 1 до 3 включително. Когато е включена повече от една модифицирана база те са за предпочитане раздалечени през междинни бази във веригата, най-много за предпочитане еднотелмер. Допълнителни олигонуклеотидни откъпки може да бъдат включени в гръбнака, посочено от допълнителни модифицирани бази и т.н.

N^3 нуклеотидната група тогава се лишава от защитата (R^3 е отстра-

нено) и се създават олигонуклеотидни единици чрез автоматизираната процедура. Остатъчните R^1 групи в края на веригата се отстраняват и разклонения "холобен на гробен" мултимер се отцепва от опората.

Част С от фигура 4 представя общата процедура за получаване на "подобни на вилица" мултимери. Отново, една олигомерна единица с желана големина и последователност се синтезира чрез обикновените методи и се оставя върху опората. Една блокирана, бифункционална съдържаща фосфор група представена като XP в част С, както и един блокиран фосфорамидит се включва тогава във веригата чрез автоматизираната процедура. Препоръчителни бифункционални съдържащи фосфор групи са блокирани фосфорамидати с формула



където R е споменатата хидроксилна защитна група, P е изопропил и R^1 е метил или бета-цианостил. Предпочтава се препоръчване R е DMT и R^1 е бета-цианостил.

алтернативно, N^4 -модифицираната цитозинова база, където $R^1 = R_2$ (например DMT) може също да бъде използвано.

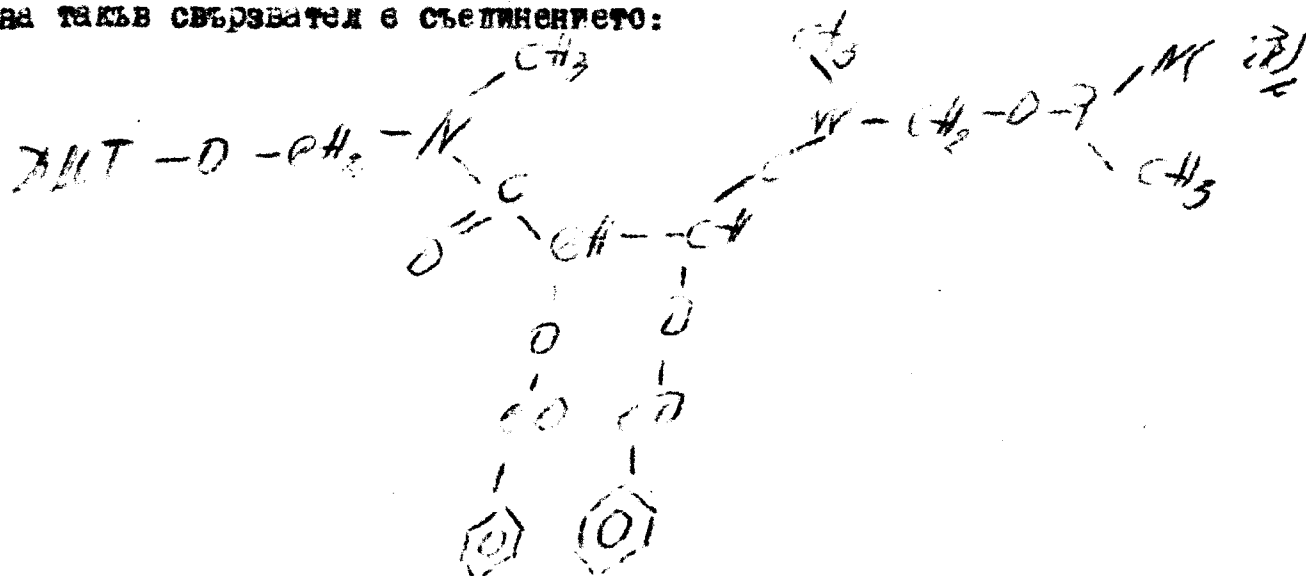
Двете защитни групи по-горе се отстраняват и се получават допълнителни олигонуклеотидни единици от тях чрез автоматизираната процедура. Остатъчните R^1 групи се отстраняват и виличният мултимер се отцепва от опората.

Част Д и Е представят процедури, при които два или повече двезилични мултимера, "подобни на Гребен" мултимера или комбинации от тях се съчетават заедно ензиматично или химически. Обикновено двезилични и/или "подобни на Гребен" мултимери се получават както по-горе и се отстраняват от опората. Тогава те се комбинират в разтвор използвайки ензиматични или химически процедури на

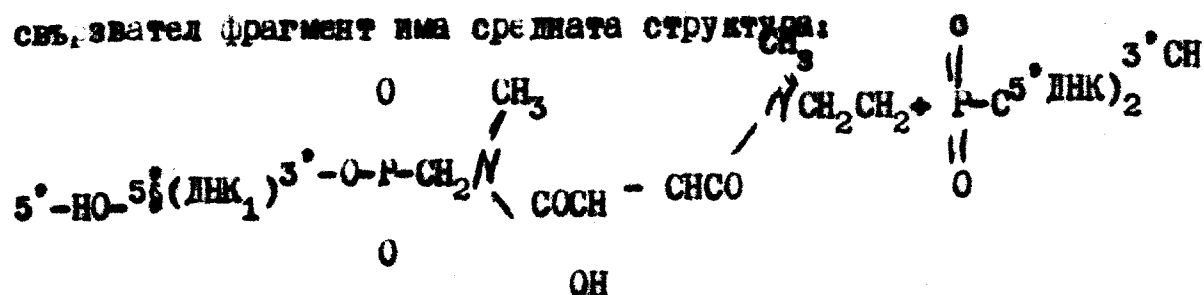
на свързване, както е описано
по-горе.

Част F показва процедура за синтезиране на множествен "моду-
лен на гребен" мултимер. Таз процедура е вариация от процедурата
посочена в част B и включва вграждане на модифицирани бази в за-
висящата странична верига и генериране на вторични олигонуклео-
тидни странични вериги от тях.

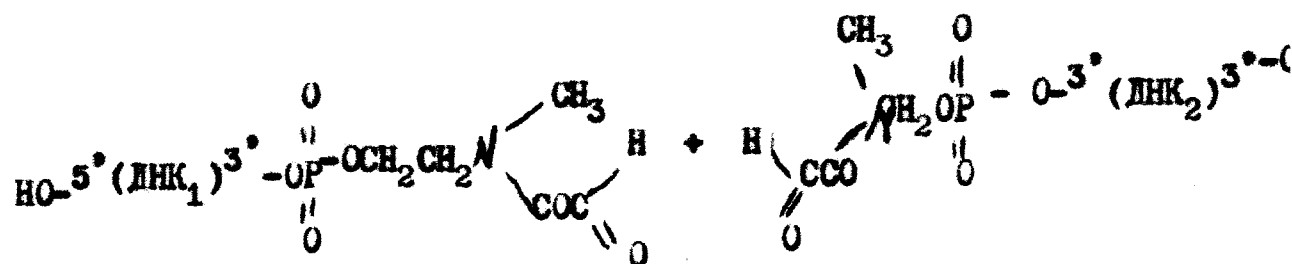
Подходящи свързващи молекули могат да бъдат вградени в мулти-
мери на предварително определени места за целите на анализиране
на структурата на мултимера или като средство за освобождаване
на предварително определени сегменти (като частите от мултимера, към
които свързва към обелязаните олигонуклеотили). След мултимерната
синтеза и пречистване тези свързватели може да бъдат разцепени
специфично без допълнително разрушаване на нуклеотидната структу-
ра на мултимера. Предпочитан тип на свързваща молекула се опре-
деля да съдържа една 2-пиолна група (която може да бъде отцепена
селективно чрез перилоати) както и една защитена хидроксилна и
произхожда от фосфорамидит хидроксилна група за позволяване
свързвателят да бъде вграден във всеки ДНК фрагмент чрез стандарт-
ни фосфорамидитни химически обработки. Предпочитано вграждане
на такъв свързвател е съединението:



където Δ MT и Δ R₂ са както е посочено по-горе. След включване в ДНК фрагмент и цялостно премахване на защитата, съдържащият свързвател фрагмент има следната структура:



където ДНК₁ и ДНК₂ представляват подфрагменти които може да са еднакви или различни. Реакцията на този фрагмент с натриев йодат разцепва този фрагмент на следващите подфрагменти:



алтернативно, 1,2-диолната група може да бъде заместена със свързваща група която съдържа един чувствителен на аламин свързвател, един чувствителен сулфон свързвател или един чувствителен към дисульфид свързвател. Такива свързващи групи могат да произхождат от обикновени кръстосано свързващи вещества, които се използват като конюгантни протеини за други съставки. Подобно, могат да се използват защитни групи различни от Δ MT.

Функционалните страни на полимерното средство може да бъдат комбинирани с мултимерна структура на средството чрез интетиизиране на мултимерно средство, което има M област с поделеници обхващащи множество от промотер/шаблон (Б/С) области на полимерното средство. Подобно на мултимерните средства мултимерните поделеници могат да бъдат или свързваща насока или разклонени молекули.

Подобно на полимерните средства A областта на мултимерните средства може да бъдат конигирани в M областта чрез междини

свързващи елементи като нуклеинова киселинна, аминокиселинна, карбохидрат или полиолни мостове или чрез други кръстосано свързващи елементи. И областта може да бъде синтезирана с един 5'-нуклеинов кисел остатък който е произволно което да има функционална група, създаваща свързващо място за А областта или остатъкът може да е като произволно след като олигонуклеотидът е бил синтезиран за получаване на такова място. Предпочитана процедура за химическо кръстосано свързване е включено в № 4-модифицирана цитозинова база в 5'-края на полинуклеотида, както е описано Е.Р.А. публикация № 0225807 и в точка А по-горе.

II - Имунизирания

Друга страна на изобретението използва подсилващо средство при имунизирания за откриване и количествено определяне на наличността и концентрацията на имунологичен анализ. Тези подсилващи средства са от два класа: хибридни средства включени в точка I по-горе (или полимеразни средства или мултимерни средства); или полинуклеотидните средства включени в /8/. Тези средства са еднакви с хибридните средства, но с А област съдържаща една полинуклеотидна последователност а не един полипептид.

Анализът може да е всеки известен имуноген представляващ интерес. Анализът може да е наличен в ниска концентрация в един приготвен пробен образец или може да е по-малък вил в хетерогенна структура на биологически материал. Анализът може да е наличен в различни източници, например биологически течности или тъкани, хранителни материали, материали от околната среда и т.н., или може да бъде синтезиран in vitro.

При един пръв ход, пробният образец съдържащ анализът се приготвя чрез всеки от различните методи, познати на специалистите в тази област.

Подсилващи средства могат да бъдат използвани за откриване на анализ при голям брой начини на имуноизследване, ако извършени или в разтвор или имобилизирани върху твърда фаза. Имуноизследването се извършва в разтвор, пробният образец съдържащ анализа е или свързан към подсилващото средство директно, индиректно чрез едно или повече антитела специфични за анализа или ако се използва полинуклеотидно средство във връзка с хибридна свързваща молекула (разгледано в точка II) по-долу). Подсилващи средства могат да бъдат използвани по този начин при повечето начини за имуноизследване в разтвор. Виж например /9/.

При имуноизследване използващо твърда фаза, анализът, който може да е или антиген или анти тяло, е или имобилизиран директно върху твърда фаза, индиректно чрез свързване на анализа към едно първо анти тяло, което е първо било свързано към твърда фаза или чрез сандвичево изследване (фигура 2А) при което едно второ анти тяло разпознава анализа и обратно се разпознава чрез първото анти тяло свързано към твърдата фаза.

Ако анализът трябва да бъде директно свързан към твърда фаза пробният образец съдържащ анализа се поставя в контакт с нитро-целулозен филтър или с подобно средство на неселективно свързващ протеин. Ако анализът трябва да бъде директно и селективно свързан към една твърда фаза, едно първо анти тяло, насочено към епитоп на анализа или към второ анти тяло, се конюгира към твърдата фаза и в последствие се използва за свързване на анализа или едно второ анти тяло свързано към анализа.

А - ИЗПОЛЗВАНЕ НА ДИБРИДНИ СРЕДСТВА

Едно допълнително анти тяло, насочено към един втори епитоп на анализа може тогава да бъде използвано като свързвател между анализа и подсилващото средство. Подсилващото средство, или полимерно средство или мултимерно средство, чията А област е насочена

към второ антиляло, може тогава да бъде контирано към свързано антиляло, оформящо ивица състояща се от първото антиляло свързано към твърда фаза, второ антиляло, анализта, едно свързано антиляло, и подсилващото средство (фигура 2А).

В - ИЗПОЛЗУВАНЕ НА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНИ СРЕДСТВА

При едно друго приложение, подсилващото средство използвано тук е едно от полинуклеотидните мултимерни средства разглеждани в /10/.

Тези средства се различават от пептид/нуклеотид хибридите мултимерни средства при бързото прилагане в тази област А по олигонуклеотидната последователност а не по функциониращия като антиляло полипептид. Следователно един антиляло/полипептид хибриден свързвател трябва да бъде използван за индиректно прикачване на анализа към подсилващото средство (фигура 2В). Този хибриден свързвател има една първа област, която е полипептид, който функционира като антиляло специфично за епитоп на анализа или епитоп на антиляло, което разпознава анализа и една втора област допълнителна към нуклеотидната последователност на А областта на подсилващото средство.

По подобно, при едно друго приложение, едно от полинуклеотидните полимеразни средства, посочено в /11/ може също да бъде използвано. Тези средства се различават от хибридите полимеразни средства при бързото прилагане по това, че област А е полинуклеотидна последователност, а не функциониращ като антиляло полипептид. Тези средства също изискват използването на хибриден свързвател, както е описано по-долу.

Чрез използване на полинуклеотидни подсилващи средства и хибриден свързвател а не хибридно подсилващо средство описано в точка I по-горе, подсилващото средство може да бъде "универсален" реактив. Използваем както за хибридационни изследвания на

нуклеинова киселина и за имуноизследвания.

С - УСЛОВИЯ ЗА ОБЪЗНАВАНЕ И ХИБРИДИЗИРАНЕ

При едно предпочитано приложение, анализът е непосредствено имобилизиран върху твърда фаза, например плочка от поливинил хлорид с 16 клапчетата. При стандартното изследване посочено на фигура 2а, 50 микролитра от първото анти тяло антизащо в концентрация от 20 микрограма/мл в 0,3 мола натриев бикарбонат се поставят във клапчето. Клапчето се покрива и се инкубира 2 часа при стайна температура в влажна атмосфера. Тогава разтворът се изсмуква от клапчето. Клапчето се промива тогава два пъти с блокиращ буфер съдържащ 3 процента говедски серум в буфериран с фосфат физиологически разтвор съдържащ 0,2 процента натриев азид. След това клапчето се инкубира с блокиращ буфер за 30 минути при стайна температура във влажна атмосфера и тогава се промива два пъти още с блокиращ буфер,

10 микролитра от второто анти тяло (защо-анти анализ, следователно при концентрация от 20 микрограма/милилитър се добавят към клапчето и се повтаря процедурата, описана по-горе. Приготвя се следваща серия от разреждания в блокиращ буфер на анализа. 50 микролитра от всяко разреждане се добавят към едно клапчето. Плочката се покрива и се инкубира за 2 часа при стайна температура във влажна атмосфера. След това инкубиране клапчетата се промиват четири пъти с блокиращ буфер. Третото анти тяло (милитер-антианализ) се добавя след това по същия начин, последвано от добавянето на хибридна подсилващо средство. Тъй като случайни тъканни препарати може да съдържат анти-ДНК антитела, използваният буфер за промиването, който следва добавянето на средството също съдържа 20 микрограма/милилитър ДНК от сперма на пъстърва.

Когато се използват нуклеотидни подсилващи средства или хибридни мултимерни средства, , една стъпка на хибрилизирание на

на нуклеинова киселина след комплексирането на анализа и антителата. Обикновено, условията на хибрилизирание се състоят от водна среда, специално буферизирана водна среда, която включва различни добавки. Тези добавки може да включват полинуклеотидите, които ще бъдат хибрилизирани, соли, например натриев цитрат 0,017 до 0,17 мола или натриев хлорид 0,17 до 1,7 мола, не-йонни детергенти като R-40 или Тритон X-100 (0,1 до 1,0 процента), които не взаимодействуват с комплекса антиген/антитяло и носели нуклеиновата киселина. Сместа се инкубира 15 до 75 минути при 25 до 35°C.

Ако използваните условия за хибрилизирание на безизменен олигонуклеотид до мултимерна поделница причинява нестабилност на комплексите антиген/антитяло, холът на хибрилизирание може да бъде премахнат от третиране на комплекса с протеинов напречен свързва-тел като глутар алдехид или подобен метод за стабилизиране на комплекса. След като белтък-протеиновият комплекс е стабилизирал, условията за хибрилизирание на нуклеинова киселина може да бъдат променени да включват SDS до 1 процент, неводни разтворители като диметилформамид, диметилсулфоксид и формамид и температури до 70°C.

Важно е да се нагледат условията за хибрилизирание на нуклеинова киселина за поддържане стабилността на комплексите антиген/антитяло. Например, хибрилизирането на по-къси пътеки от по-дългителни последователности може да се извърши при по-ниски температури. При едно предпочитано изпълнение, допълнителните еднолентови участъци са 12 до 20 бази. При едно предпочитано изпълнение температурата на хибрилизирание е 35 до 45°C. Освен това, тъй като само еднолентови олигонуклеотиди нелични при този хол са допълнителни ленти, може да бъде толерирана по-висока строгост и следователно по-ниска концентрация на сол (0,3 мола натрий).

1 - мултимерно средство

Ако се използва мултимерно средство се добавя белязан олигонуклеотид, който е по същество допълнителен повтарящ се нуклеотид във областта при условия които позволяват той да хибрилизират до допълнителни олигонуклеотидни единици на мултимера. Резултиращият първа фаза комплекс белязана нуклеинова киселина се сепарира тогава от излишна комплекс белязана нуклеинова киселина чрез премиване за отстраняване на несвързания белязан олигонуклеотид и се отчита.

Подсилването може да бъде повишено чрез използването на повече от един вид мултимер (както се определя чрез мултимерната последователност) при изследването. В такива случаи се предвижда втори мултимер за свързване на повторната последователност на първия мултимер и комплексът се бележи след това с един олигонуклеотид, който е по същество допълнителен към повторната последователност на втория мултимер. Всякакъв брой мултимери може да бъдат свързани в серия по този начин за постигане на по-силно подсилване.

2 - Полимеразно средство

Ако се използва полимеразно средство се пролуцира РНК полимера специфична за промотерния участък (област В) на подсилващото средство като се добавя при подходящи условия на транскрипция и мултиплени копия (с) на С областта шаблон (с'). Количеството на транскрипт е пропорционално на количеството на анализа в изходния препарат.

Условията за транскрипция се състоят във водна среда за предпочитане буферирана водна среда с подходящи соли включващи обикновено магнезиева сол γ АТР, γ ГТР, γ СТР, един РНК полимеразен ензим и включва обикновено различни денатуриращи елементи, пратенини носители и инхибитори на рибонуклеаза. Инкубирането е обикновено за 15 до 90 минути, обикновено 60 минути и при

температура, която е оптимална за избрания ензим, обикновено 5 до 42°C, обикновено 37°C.

Последователността на С областта е проектирана за специфична схема за откриване и няколко текучи схеми може да бъдат използвани за количествено определяне на транскриптите. Например, транскрипционният продукт (с) на С областта може да бъде попределен на две подобласти - c_1 и c_2 (фигура 2В). Подобластта c_1 е допълнителна към едно транскриптно захващащо средство, което е имобилизирано върху твърд субстрат. Подобласт c_2 е допълнителна към едно белязано средство. След хибридиране количеството на захванат белег е линейно пропорционално на количеството на анализ наличен в изходния пробен образец.

При едно друго изпълнение транскриптът на С областта има само една c_1 подобласт. С областта е транскрибирана при наличност на белязани рибонуклеотидни трифосфати и белязаният транскрипт е впоследствие свързан към едно белязано транскриптно захващащо средство чрез своята допълнителна c_1 подобласт и е определено количествено.

При още по-друго изпълнение транскриптът на С областта има само c_2 подобласт. Областта С е транскрибирана при наличността на биотинилирани рибонуклеинови трифосфати и транскриптите са обхващани в авилинови легла. Тогава транскриптът се отгрява по белязано средство чрез неговата допълнителна подобласт c_2 и се определя количествено.

Възможни са няколко други методи за белязване и откриване на транскрипти на полсидващо средство, включително едновременно използване на белязани рибонуклеотиди и куплиране авилин/биотин и те се ясно повелят на специалистите в тази област.

3 - ОБЩИ ОБЩЕДАННИ

Твърдата фаза, която се използва при изследването може да

взима участие и да бъде твърда повърхнина върху всеки от различните контейнери, например центриружни епруетки, колонни, клаленчета на микротитрационни плочки, филтри, тръби и т.н. За предпоставяне се използват частици с големина в обхвата от около 0,4 до 200 микрона, по-обичайно от 0,3 до 4,0 микрона. Частиците могат да бъдат всеки обикновен материал, например латекс или стъкло. Първото анти тяло специфично за анализа или за едно второ анти тяло което е специфично за анализа, може да бъде стабилно прикрепено към твърдата повърхнина чрез функционални групи по известните рецептури.

Бележните средства, ако се използват полимерни средства включват последователности допълнителни към C_2 ~~анализираните~~ на транскриптите на използваното средство ~~и анализът~~ се използват мултимерни средства, включващи белязани средства с последователности допълнителни към повтарящите се единици на В областта. Белязаното средство ще включва едно или повече молекули ("белези"), които директно или индиректно създават откриваем сигнал. Белегът може да е свързан към отделни членове на допълнителната последователност или може да се намира като терминален член или терминална опашка, имаща голям брой белези. В литературата са съобщени различни средства за създаване на белези свързани към последователността. Например виж , виж /11/, /12/, /13/, /14/, /15/, /16/ и /17/. Бележите могат да бъдат свързани или ковалентно или не-ковалентно към допълнителната последователност. Белези, които могат да бъдат използвани включват радиоизотопи, флуоресценти, химилуминесцентни, багрила, ензими, ензимни субстрати, ензимни кофактори, ензимни инхибитори, ензимни поединици, метали йони и други подобни. Илюстративно, специфични белези включват флуоресценция, ролемин, Текваско червено, пикокритин, умбелиферон, луминол /ФРН, галактозилаза, конска ранична пероксидаза и т.н. Виж /12/ за сравняване на методите за радиоизотопно белязание.

Бележещите средства могат да бъдат ковалентно приготвени чрез химически синтез, като този описан в /18/. Чрез снабдяване с терминална група, която има благоприятна функционалност, различни белези могат да бъдат обединени по функционалност. Така може да се създаде карбокси, тиол, амин, хидрамин или друга функционалност, към които различните белези могат да бъдат свързани без разрушително влияние дуплекс. Като вече беше посочено, може да има молекула с множественост белези свързани към една последователност, допълнителна към бележещата последователност. От друга страна може да има един лиганд свързан към бележещата последователност и използване на белязан репептор за свързване към лиганда за получаване на белязан аналитен комплекс.

В зависимост от естеството на белега могат да бъдат използвани различни методи за откриване наличието на белега. За флуоресцентни материали са на разположение голям брой флуоресценатори. С ензими може да бъде създаден и определен или флуоресцентен или оцветен продукт чрез флуорометрия, спектрофотометрия или визуално. Различните белези, които се използват при имуноизследвания и методите използвани за имуноизследвания може да бъдат използвани при изследване на обекта. Процедурата, използвана при ходовете за сепариране при изследването варира в зависимост от естеството на твърдата фаза. За частици се използва центрифугиране или филтриране за сепариране на частиците, отстраняване на налягащата течност или изолирането ѝ. Когато се изследват частиците те се промиват основно от един до пет пъти с подходяща суферирана среда съдържаща детергент например PBS с SDS. Когато средството за сепариране е стена или опора, налягащата течност може да бъде изолирана или отстранена и стената да бъде прамита по същия начин, както е посочено за частиците.

Конкуриращо имуноизследване

Хибричните полимеризиращи средства от настоящето изобретение може също да се използват като средство за белязване на антиген при едно конкуриращо имуноизследване. При типично изследване, издигнат антиген, за предпочитане поликлонален или моноклонален, което се свързва специфично към анализа, се имобилизира върху твърда фаза, обикновено в плочка с голям брой клетъчничета. Една стандартна концентрация от белязан антиген се смесва със серийни разреждания на пробния образец и се приема че съдържа **количество** неизвестно **бележи** от анализ. Отделните разреждания се излагат отново на имобилизиращия антиген и се измерва количеството на свързания белег. Пригодността на небелязания анализ да конкурира с белязания анализ се използва за изчисляване количеството на анализ в пробния образец.

При едно изпълнение една B/C областна полинуклеотидна половина на полимеризащото средство се конюгира към един конкуриращ имуноген. Тази хибридна молекула се използва тогава като белязан антиген както е описано по-горе. След конкурентното свързване, се добавя полимеризираща опосредствена за промотера на областта и транскрипционният продукт се изследва, както е описано в точка I(A) по-горе.

При едно друго изпълнение II област полинуклеотидна активностна половина на мултимерното средство се конюгира към конкуриращ имуноген. Тази хибридна молекула се използва тогава като белязан антиген, описан по-горе. След конкурентното свързване II областта се бележи и се измерва количествено, както е описано по-горе.

За имуноген, свързан към ДНК, хидрофункционални реактиви като нискомолекуларен субстрат (PSS), етилен гликол бис(сулфин-имид) (BS_2) или p-фенилен диизотиоцианат (DITC) са може би по-полезен метод за свързване, отколкото описаните в точка I(A) по-горе.

Комплекти за извършване на подсилени имуноизследвания според изобретението съдържат в събита комбинация следващите реактиви: една твърда фаза, която е или пригодна да свързва антиген анализ или, от друга страна има едно първо свързващо анти тяло свързано с нея ако формата на изследване е такава при която анализът е индиректно свързан към твърдата фаза чрез свързване на първото анти тяло или чрез второ анти тяло, по избор свързващ второ и трето анти тяло които са специфични за анализа и едно хибридно свързващо средство, ако формата на изследване е такава, при която полинуклеотидното подсилващо средство се използва или се използва подходяща насочвана от ДНК РНК-полимераза и транскрипционни захващащи средства, ако полимеразното подсилващо средство бъде използвано и едно подходящо белязано средство. Тези реактиви са типично в отделни контейнери в комплекта. Комплектът може също да включва хибрилизационни буфери, разтвори за промиване, отрицателни и положителни контроли и писмени инструкции за извършване на изследването.

Следващите примери са представени като илюстрации, но като ограничения за настоящето изобретение. Други приложения в духа и обхвата на изобретението се подсказват от само себе си за специалистите в тази област.

ПРИМЕР 1 - ИМУНОИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ НАЛИЧНОСТ НА HCV АНТИГЕН В СЕРУМ ОТ ЧОВЕК

Това изследване е проектирано за изпитване директно за наличие на С-100 антиген на вируса на хепатит С. Общото провеждане на това имуноизследване е както е описано по-горе. Микротитрационни плочки се приготвят при използване на анти-мишо като първо анти тяло. Това анти тяло се имобилизира в кладенчетата на микротитрационна плочка с 96 кладенчета. Второто анти тяло е мишо моноклонално анти тяло специфично за епитопа на HCV-100. Двоични разреждания серум от индивиди които трябва да бъдат изследвани

за HCV се приготвят в блокиращ буфер и се инкубират в микротитрационните кладенчета заедно с подходящи не-инфектирани контроли. Третото анти тяло е комбинация от поликлонални захватващото анти тяло, които разпознават всеки от HCV антигените. Крайното анти тяло е елиа хибрид Т7 полимеразно подсилващо средство. Полипептидната половина на област А функционира като козъо-антизащо анти тяло и завършва имуноизследването "сандвич".

След добавяне на Т7 полимеразното средство, транскрипцията на област С се извършва чрез инкубиране на комплекса в 20 микролитра разтвор съдържащ 40 милимола трис солна киселина, рН 8, 20 милимола магнезиев дихлорид, 1 милимол спермидин, 10 милимола дитиотритол, 0,15 мг/мл гозекли серум албумин, 1,25 милимола всеки от γ АТР, γ СТР, γ ГТР, γ УТР, 1600 единици/милилитър Никки РНКазин и 9000 единици/милилитър Т7 РНК полимераза.

Тази смес се инкубира при 37°C за 1 час, Транскрипцията е завършва чрез добавянето на 20 микролитра от елиа разтвор съдържащ в $1 \times \text{SSC}$, 9 процента SDS и цялата смес е пренесена в нови кладенчета съдържащи имобилизирано захващащо средство със c_1 последователности. Захванатото от област С транскриптите (фиг. 3) става чрез инкубиране при 55°C за 1 час последвано от две промивания с $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1 процент SDS.

Тогава транскриптите област С се бележат чрез добавяне на 50 fmol белязано с ензим средство (средство c_2) в 40 микролитра $4 \times \text{SSC}$ 100 микрограма поли А за 15 минути при 55°C . Най-после комплексът се промива два пъти с $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1 процента SDS последвано от две промивания с $0,1 \times \text{SSC}$.

За откриване на АР, се използва захватващата с ензим диоксетанова реакция (виж /19/ и /20/. Процедурата за откриване е както следва: За хопа за белязване се добавя към всяко кладенче 20 микролитра НМ буфер с АР средството и кладенчетата се инкубират

при 55°C за 15 минути. Надстоящата течност се отстранява и кладенчетата се промиват два пъти с 380 микролитра 0,1 X SSC и 1 процент SDS. Кладенчетата се промиват тогава два пъти с 380 микролитра от 0,1 X SSC за отстраняване на всяка остатъчно SDS. Добавя се 20 микролитра $3,3 \times 10^{-4}$ M лиоксетан в СТАВ буфер към всяко кладенче. Кладенчетата се разбъркват слабо така че реактивът да падне на дъното и се разбърква слабо за разпределение на реактива равномерно по дъното. Кладенчетата се покриват с капачето на микротитрационната плочка и се инкубират при 37°C за 1 час. Тогава кладенчетата се отчитат с думинометър и се определят количествено по отношение на една стандартна крива, получена с познати количества на антиген.

ПРОБЪР 2 - ИМУНОИЗСЛЕДВАНЕ ЗА НАЛИЧНОСТТА НА АНТИТЕЛО ЗА HCV В СЕРУМ ОТ ЧОВЕК

Микротитрационните плочки са покриват най-напред с HCV-100 антиген от вируса на хепатит С. Точно преди добавянето се приготвя разтвор съдържащ покриван буфер (50 милимола натриев борат, pH 9,0), 31 мл за плочка В А (25 микрограма/мл, HCV-100 (2,50 микрограма/мл). След размесване за пет минути се добавя 0,2 мл/кладенчеот разтвора към плочките, те се покриват и се инкубират за два часа при 37°C, след което разтворът се отстранява чрез изсмукване. Кладенчетата се промиват два пъти с 0,4 мл промивен буфер (100 милимола натриев фосфат, pH 7.4, 14 милимола натриев хлорид, 0,1 процента казеин, 1 проценто (тегло/обем) тритон X 100, 0,1 процента (тегло/обем) хистан. След отстраняване на промивния разтвор се добавя 200 микролитра/кладенче от Посткот разтвор (10 милимола натриев фосфат, pH 7,2, 150 милимола натриев хлорид, 0,1 процента (тегло/обем) казеин, 1 процент захароза и 2 милимола фенилметилсулфонил флуорид (PMSF), плочките се покриват хлабаво за предотвратяване на изпаряване и се оставят

да стои при стайна температура за 30 минути. Тогава клаленчетата се изсмукват за отстраняване на разтвора и се деохидрират за една нощ без разклащане на шкафа.

За извършване на имуноизследването 20 микролитра от лъсните разреджания на серумни пробни образци или контроли се добавят към клаленчетата, съдържащи 200 микролитра от разредител за пробния образец (100 милимола натриев асат, рН 7,4, 100 милимола натриев хлорид, 1 милимола MgCl_2 , 0,1 процент (тегло/обем) казеин, 0,01 процент (тегло/обем) хиотан, 1 процент (тегло/обем) тритон X-100, 100 микрограма/мл тропон екстракт. Палочките са залепват и се инкубират при 37°C за 3 часа след което разтворът се отстранява чрез изсмукване и клаленчетата се промиват три пъти с 400 микролитра от промивния буфер (съдържащ 1% Туун 20).

След добавянето на серумни пробни образци клаленчетата се третират както в пример 1 по-горе, с изключение на това, че заличит-анти-човешки серум се замества с тропон антигло (за ч-анти-аналит).

Пример 3 - използване на мултимерно средство при откриването на НСУ индикатор

В двата примера по-горе мултимерното средство може да бъде заместено с полимеразно средство. Палочките хопове са смити във всеки пример до добавянето на полисилващо средство. освен разбира се, че едно мултимерно средство се използва вместо полимеразно средство. След свързването на полисилващото средство се добавя един разтвор с 50% от белизат олигонуклеотид с съществена комплимент мултимерната полимеризация на областта 3. Това белизано с ензим средство се добавя в 50 микролитра 4 X 500 . 10 микрограма) милилитър поли А 30-15 минути при 55°C . Нак-после комплексът се промива два пъти с 0,1 X 100.

За откриване на АР, се използва задествявана от ензим

лиоксетанова реакция (всх /27/ и /28/) получавана от Лумиген Инк. Процедурата за откриване е както следва: За холна на белязване се добавя 20 микролитра НМ буфер към АР средството към всяко кляненче и кляненчетата се инкубират при 55°C за 15 минути. Налоставлята течност се отстранява и кляненчетата се промиват два пъти с 80 микролитра $0,1 \times \text{SSC}$ и $0,1$ процента SDS . Тогава кляненчетата се промиват два пъти с 380 микролитра $0,1 \times \text{SSC}$ по отстраняване на всеки остатък SDS . 20 микролитра от $3,3 \times 10^4$ мола лиоксетан СТАВ буфер се добавя към всяко кляненче. Кляненчетата се почукват лека така че реактивът да падне на дъното и се разбърква нежно за разпределяне на реактива равномерно по дъното. Кляненчетата се покриват с микротитрационната плочка леко и се инкубира при 37°C за един час. Тогава кляненчетата се отчитат с луминометър и се определят количествено по отношение на стандартна крива получена с познати количества антиген.

ПРИМЕР 4 - ИЗПОЛЗВАНЕ НА ПОЛИНУКЛЕОТИДНИ ПОЛИМЕРАЗНИ СРЕДСТВА ПРИ ОТКРИВАНЕТО НА НСУ ИНФЕКЦИЯ

Във всеки от примерите 1 или 2 по-горе, полинуклеотидните полимеразни средства могат да бъдат заместени с хибридни полимеразни средства. Всичките холове са същите във всеки пример чак до добавянето на третото анти тяло, което е комбинация от поликлонални зайчи антитела които разпознават всеки от НСУ антигените. Това се последва от добавянето на 50 микролитра хибридна свързваща молекула в концентрация от 20 микрограма/милилитър в 2 мола натриев бикарбонат. Това инкубиране се извършва според същите правила както при предишните експерименте на анти тяло. Хибридната свързваща молекула има една първа област, която функционира като анти-зайчо анти тяло и свързва всички по-рано свързани зайчи греди анти тяла. Втората област на хибридният свързващ е от полинуклеотид с 15 остатъка последователности AG които са допълнителни към област

А на полинуклеотидното полимеразно средство. След инкубиране и промиване се добавя полимеразно средство в 50 микролитра хибрилизационен буфер 30, μ мола натриев хлорид, 0,1 процент NP-40 и се инкубира за 50 минути при 50°C . След инкубиране излишното средство се отстранява и комплекси се премева три пъти с хибрилизационен буфер. Областта В се транскрибира и транскрипцията се определя количествено както е описано в пример 1.

ПРИМЕР 5 - ИЗПОЛЗУВАНЕ НА ПОЛИНУКЛЕОТИДНИ МУЛТИМЕРНИ СРЕДСТВА ПРИ ОБИДНАВИТЕ НА НСУ ИМУНОГЛОБУЛИНИ

Това изследване е идентично с описаното в пример 4 до добавянето на полинуклеотидното средство. След това хибрилизирателното белоза към полинуклеотидите на област М е същото както в пример 3.

Полобен на гребен полинуклеотид, имащ 15 зависими странични вериги, всяка съдържаща три места (общо 45 места) допълнителен към белозано средство и една терминална биотинова молекула, приложена към гръбнака, се приготвя както е описано по-горе.

Човешки имуноглобулин G при различни концентрации се имобилизира върху твърда опора. Иммобилизираният имуноглобулин G се инкубира с биотинилиран аднитетно пречистен кози анти-човешки имуноглобулин G (концентрация на биотин 40 нанограма) и издишният антисерум се отмива от опората. Тогава опората се инкубира с 200 нанограма авилин- D и тогава с $100 \mu\text{m}$ или $500 \mu\text{m}$ от положения на гребен разклонен полинуклеотид, при подходящо промиване. Тогава опората се инкубира с пуроксилаза от конска рапица белозано нуклеотидно средство, допълнително към свързващите места на белозаното средство върху полинуклеотида. Отчитанията на оптичестката прътност се извършва при 492/620 нанометра.

За целите на сравняване се извършват изследвания както по-горе при използване на полинуклеотид със само едно свързващо място на белозаното средство.

Таблицата по-долу представя резултатите от тези изпитвания:

конц. на човешки

Оптическа плътност

Ig 6 (нанограма/ мл)	45 място	1 място	45 място	1 място
	по 100 f_m	по 10 f_m	по 100 f_m	по 10 f_m
100	1.116	0,005	2,505	0,002
50	1,089	0,002	0,564	0,02
25	0,432	0,001	0,295	0,001
12,5	0,303	0,001	0,451	0

Както е съобщено 45 място полинуклеотид предлага много по-висок сигнал отколкото еднично място полинуклеотид.

XXXX

Други варианти и приложения на различни подсилващи средства, описани в това изобретение са явни за специалистите в тази област и са предвидени да са в обхвата на предложеното изобретение.

СПИСК НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИ

(1) ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ:

(I) Предлагач: *Ardea, Michael S.*

(II) ЗАГЛАВИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО: СРЕДСТВА НА БАЗА НА ПРОТЕИН-ВЪВЕЖИНОЕ КИСЕЛИНА И ИХ ИЗОБРЕЩАВАНЕ ПРИ ИЗПОЛЗВАНЕ НА СЪЩЕ-

(III) БРОЙ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ: 12

(IV) АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ: *Irene and Manella*

(B) Улица: *545 Middlefield Road Suite 200*

(C) Град: *Мунло Парк*

(D) Щат: *Калифорния*

(E) Страна: *САЩ*

(F) ZIP *9025*

(V) Отчетана с компютър форма:

(A) Среден тип: *свои диск*

(B) КОМПЮТЕР: *IBM PC съгласуван*

(C) Кабелна система: *PC-DOS/MS-DOS*

(D) Софтуер: Патент $\neq$ 1.1, Версия $\neq$ 1.25

(VI) СЪГЛАШНИ ДАННИ ЗА ПРИЛОЖЕНИЕ:

(A) НОМЕР НА ПРИЛАГАНЕ: *ПСТ/ US 81/02925*

(B) ДАТА НА ПОДЪВАНЕ: *06 - май - 1991*

(C) КЛАСИФИКАЦИЯ:

(VII) Изпълнители/агент информация:

(A) Име: *Gloff, Thomas, E.*

(B) Регистрационен номер: *21013*

(C) Литература/ номер на списъка: *2300-0047.51*

(VIII) Информация за телекомуникация:

(A) Телефон: *415-327-7250*

(B) Телефакс: *415-327-2952*

(C) Телекс: *706141*

(A) Характеристика на последователност:

(A) Дължина : 7 базови двойки

(B) Тип: нуклеинова киселина

(C) Навитост: еднинична

(D) Топология: линейна

(I) Описание на последователност: Последов. H/ N 0:1:

AAAAA

(2) Информация за последов. IJ N 0:2

(I) Характеристика на последователност

(A) Дължина: 17 базови двойки

(B) Тип: нуклеинова киселина

(C) Навитост: еднинична

(D) Топология: линейна

(XI) Описание на последователност: Последов. I 0:2:

TAA TACCACTA TA

(2) Информация за последов. IJ N 0:3:

(I) Характеристика на последователност:

(A) Дължина: 17 базови двойки

(B) Тип: Нуклеинова киселина

(C) Навитост: еднинична

(D) Топология: линейна

(XI) Описание на последователност: последов. IJ N 0:3:

TATCT CATT TA

(2) Информация за последов. IJ N 0:4:

(I) Характеристика на последователност:

(A) Дължина: 32 базови двойки

(B) Тип: нуклеинова киселина

(C) Навитост: еднинична

(D) Топология: линейна

(XI) Описание на последователност: последов. 1D №0: 4:
 КТХССТАТС АААТТААТ ОВАСТАТ ТА

(2) Информация за последов. 1D №0:5:

(1) Характеристика на последователност:

(A) Дължина: 32 базови двоички

Тип: Нуклеинова киселина

(B)

(C) Навитост: еднинична

(D) Топология: линейна

(XI) Описание на последователност: Последов. 1X №0:5:
 ТАТАТАСТ ОСТАТААТТ ТСОАТАССС АС

(2) Информация за последов. 1X №0:6:

(1) Характеристика на последователност:

(A) Дължина: 43 базови двоички

(B) Тип: Нуклеинова киселина

(C) Навитост: еднинична

(D) Топология: линейна

(XI) Описание на последователност: Последов: I 0:6
 БВВНТТТС СТТТСТАС ТТСССАААТ АСТТСССАС ТСС

(2) Информация за послед. 1X №0:5:

(1) Характеристика на последователност:

(A) Дължина: 43 базови двоички

(B) Тип: Нуклеинова киселина

(C) Навитост: еднинична

(D) Топология: линейна

(XI) Описание на последователност: Последов I 0:7:
 ОВАСОВАС АСТАТТТОВС ТАСТАОВАС АССАТАТТ ССС

(2) Информация за последов. 1X №0:8:

(I) Характеристика на последователността:

(A) Дължина: 10 базови двойки

(B) Тип: Нуклеинова киселина

(C) Навитост: елинична

(D) Топология: линейна

(XI) Описание на последователност: Последов. IX №0:8:

AAAAAAAA

(2) Информация за последов. IX №0:9

(I) Характеристика на последователност:

(A) Дължина: 41 базови двойки

(B) Тип: Нуклеинова киселина

(C) Навитост: елинична

(D) Топология: линейна

(XI) Описание на последователност: Последов. IX №0:9:

TTTTTTTTTC TGGTTATGC AATTAAATC GATGAGTAT A

(2) Информация за последователност IX №0:10:

(I) Характеристика на последователност

(A) Дължина: 41 базови двойки

(B) Тип: Нуклеинова киселина

(C) Навитост: елинична

(D) Топология: линейна

-XI) Описание на последователност: Последов. IX №0:10:

ATGAGTAT GATTAAAT TGGTAAATC AAAAAAAAAA A

(2) Информация за Последов. IX №0:11:

(I) Характеристика на последователност:

(A) Дължина: 43 базови двойки

(B) Тип: Нуклеинова киселина

(C) Навитост: елинична

(D) Топология: линейна

Фигура 1: 1. Разклонен мултимер; 2. Гребенен мултимер

Фигура 2.1. Микротитрационно бледо; 3. Мили анти-аналит;
4. Анти-защит-ениго -ениго-аналит; Анти мило-токоиздава средство
6. Анти-милл свързвател

Фигура 3. 1. Антияло; 2. Промотор; 3. Наблюдна лента;
4. РНК полимераза; 5. Транскрипция; 6. РНК транскрипти;
7. Микротитрационно бледо; 8. Зехватано средство;
9. Бележко средство.

Фигура 4а. 1. Динейна синтетична ДНК; 2. 3. Разклонена ДНК,
Гребенова структура.

Фигура 4с. 1. С. Разклонена ДНК, Билана структура

Фигура 4д. 1. Местостъени ринци (през обща разтвор)
2. Мелленев свързвател използван за химическо лигирание на T₄ лигаза

Фигура 4 е. Б. Билана гребенова структура;
2. Мелленев свързвател използван за свързване на лигаза.
Възможно е също химическо свързване.

XXXXXXXXXX

~~SECRET~~
JF

PSHOUSS/DAHA INTERFATY EN

1. Czichos, J. et al. Nucl. Acid Res. (1989) 17:1563
2. US Patent N 4,873,187
3. US Patent N 4,737,454
4. E.P.A. N 154,884
5. Coleman and Oakley, Proc. Nat. Acad. Sci. (1977), 74:4266
6. Milligan et al. Nuc. Acids Res. (1987) 15: 8783
8. US Serial N 463,022
9. US Patent N 4,778,742
10. International Publication N 89/13891
11. US Application N 463,022
12. Urdea et al. Nucl. Acids Res. (1986) 16: 4937
13. Leary et al., Proc. Natl Acad. Sci. (1983) 80:4045
14. Henz and Kurz, Nucl. Acids Res. (1984) 12:3435
15. Richardson and Gumpert, Nucl. Acids. Res. (1983) 11: 5156
16. Smith et al., Nucl. Acids Res. (1985) 13:2339
17. Meinkoth and Wahl, Abal. Biochem. (1984) 138:267
18. E.P.A. Pub. 225907
19. Schap et al. (1987), Lett 28:1159-1162
20. US Patent 4,857,652
21. Scharp et al., (1987) Tet.Lett. 28:1159-1162
22. US Patent 4,847,552

99

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Молекулярно средство за използване като усилвател на сигнала при имуноизследвания, обхващаш:

(a) една първа област (A), която е полипептид и функционира като антигенно специфично за познат антиген;

(b) една втора област (B), която е двулентов полинуклеид пригоден да функционира като промотер за зависеща от ДНК РНК полимеразна ензимна активност; и

(c) една трета област (C), която е или едно- или двулентова навита и е съвпадна на втората област, така че третата област е в състояние да функционира като шаблон за промотерна активност на втората област.

2. Средството от претенция 1, в което зависещата от ДНК РНК-полимеразна активност произхожда от бактериофага Т7.

3. Средството от претенция 1 или 2, в което втората област В е с дължина най-малко 10 и не повече от 40 нуклеотида.

4. Средството от претенция 3 в което третата област С е най-малко 30 и не повече от 70 нуклеотида дълга.

5. Средството от претенция 2, характеризирано се с това, че полимеразната активност произхожда от бактериофага Т7 и последователността за втората област В обхваща последователността:

5'-ТАА ТАС САС ТСАСТ-3' (последов. 1 №0:2)

3'-АТТ АТГ СТГ АСТ САТ АГ-5' (последов. 2 №0:3)

6. Средството от претенция 2, характеризирано се с това че полимеразната активност произхожда от бактериофага Т7 в който нуклеотидната последователност на втората област В е:

5'-СТГ ССТ ТАТ САА ААТ ТАС САС ТСА СТА ТА-3' (последов. 3 №0:4).

3'-САА САА АТА ССТ ТАА АТТ АТГ СТГ АСТ САТ АГ-5' (последов. 4 №0:5).

7. Средството от претенция 1, 2, 3, 4, 5, или 6 при

което 5' остатъкът от горната лента на нуклеотидната последователност на третата област С е съставена от втората област В и е гванинов остатък,

8. Средството от претенция 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 в което последователността на третата област е:

5'-GGG AAA TGT CGT TGT CGT ACT TAG CGA AAT ACT CTC CGA
CTC 6-3' Последов. 1A (01F)

1'-CCC TCT ACA CGA ACA GCA TGA AGC GGT TTA TGA CAG GGT
CAG C-5' (последов. 1B No:7).

9. Средството от претенция 8 в което 3' края на горната лента на ДНК нуклеотидната последователност на втората област В е прикачена към 5' края на горната лента на нуклеотидната последователност на областта С.

10. Средството от претенция 1 в което транскриптът на третата област С има две подобласти:

(а) една първа подобласт C_1 , която е пригодна да хибрилизира по един нуклеотиден захващащ свързвател, като захващащия свързвател е пригоден да хибрилизира до един палинуклеотид, иммобилизиран върху твърд субстрат; и

(б) една втора подобласт C_2 , която е пригодна да се свързва към един нуклеотиден белязан свързвател, като белязаният свързвател е пригоден за се свързва към количествено определимо средство.

11. Средството от претенция 1 в което една функционална единица обхваща втората и третата области, В и С, са налични в мултиплени реактивни единици.

12. Метод за подсилване на един откриващ сигнал при имуноизследването, който обхваща:

(а) директно или индиректно свързване към един аналит (analyt) биохимическо молекулярно средство, обхващащо една свърз-

първа област (A), една втора област (B), която е пълно лентова ДНК последователност пригодна за функциониране като промотер за забавяне от ДНК РНК-полимеразна свързана активност, и една трета зона (C), която е или едно- или двулентова и е свързана на област), така че третата област е пригодна да функционира като шаблон за промоторната активност на втората област;

(b) отстраняване на несвързаното средство;

(c) транскрибиране на мултиплени копия на РНК олигомери, които са допълнителни към шаблонната последователност, с', на третата област C на конструкцията на средството по пътя на РНК-полимеразната активност зависеща от ДНК;

(d) определяне количествено на РНК транскриптите;

13. Методът според претенция 12 при което анализът се имобилизира на-напред директно или индиректно върху твърд субстрат.

14. Методът според претенция 12 или 13 при което областта A е полипептид пригоден да функционира като антиген и средството е свързано директно или индиректно към анализът чрез областта A.

15. Методът според претенция 12 или 13 в който:

(a) областта A на средството е еднолентово нивел олигонуклеотид; и

(b) анализът е индиректно свързан към молекулярното средство по пътя на протеин/полинуклеотид хорилен свързвател с две области ~~области~~:

(I) една първа област която е еднолентова полинуклеотидна последователност допълнителна към последователността на областта A на средството;

(II) една втора област която функционира като антиген, специфично за анализа или за един епитоп на антигена, което е специфично за анализа.

16. Методът според претенция 13, 14 или 15 при който втората област B произхожда от зависимост от РНК РНК-полимераза на бактерията T7.

17. Методът според претенция 12, 13, 14, 15 или 16, при който:

(a) третата област C на средството е транскрибирана при наличие на безызанг рибонуклеотидни трифосфатази;

(b) транскриптите на третата област имат една първа половина C₁, допълнителна към една олигонуклеотидно захващащо средство, което е имобилизирано към твърд субстрат; и

(c) споменатите транскрипти се имобилизират и определят количествено.

18. Методът според претенция 12, 13, 14, 15 или 16 в който:

(a) третата област C на първото средство е транскрибирана при наличието на биотинилирани рибонуклеотидни фосфатази;

(b) транскриптите на третата област имат една първа половина C₂ която е допълнителна към една безызанг олигонуклеотидно средство;

(c) транскриптите са имобилизирани върху авидинилиран твърд субстрат; и

(d) транскриптите са определят количествено.

19. Методът според претенция 12, 13, 14, 15 или 16 при който:

(a) третата област C на средството е транскрибирана при наличието както на безызанг така и на биотинилирана нуклеотидна фосфатаза;

(b) транскриптите се имобилизират върху авидинилиран твърд субстрат; и

(c) транскриптите се определят количествено.

20. Методът според претенция 12, 13, 14, 15 или 16 при който:

(а) транскриптът на третата област С на средството има две подобласти;

(I) една първа подобласт с₁, която е допълнителна към едно олигонуклеотидно захващащо средство, като захващащото средство е имобилизирано върху твърд субстрат; и

(II) една втора подобласт с₂, която е допълнителна към едно белязано нуклеотидно средство;

(b) транскриптът е хибрилизирал към захващащото средство;

(с) белязаното средство е хибрилизирал към споменатата транскрипция; и

(d) белязаното средство се определя количествено.

21. Методът според претенция 12 при който елинидата съставя втората и третата област (В и С, на първото средство са налични мултиплени повтарящи се В/С елиниди.

22. Молекулярно средство за използване като усилвател на сигнал при имуноизследване, обхващащо:

(а) една първа област (А) обхващаща елин полипептид пригоден за функциониране като антиген, което се свързва специфично към известен анализ; и

(b) една втора област (М) обхващаща множественост на енолентови олигонуклеотидни поделници, които са пригодни да се свързват специфично към енолентова кисела последователност, представляваща интерес.

23. Средството от претенция 22, в което всяка олигонуклеотидна единица на втората област, М, обхваща около 15 до 30 бази и има 4С съдържание в обхвата от около 40 процента до около 50 процента.

24. Средството според претенция 22 в което молекулата има линейна структура.

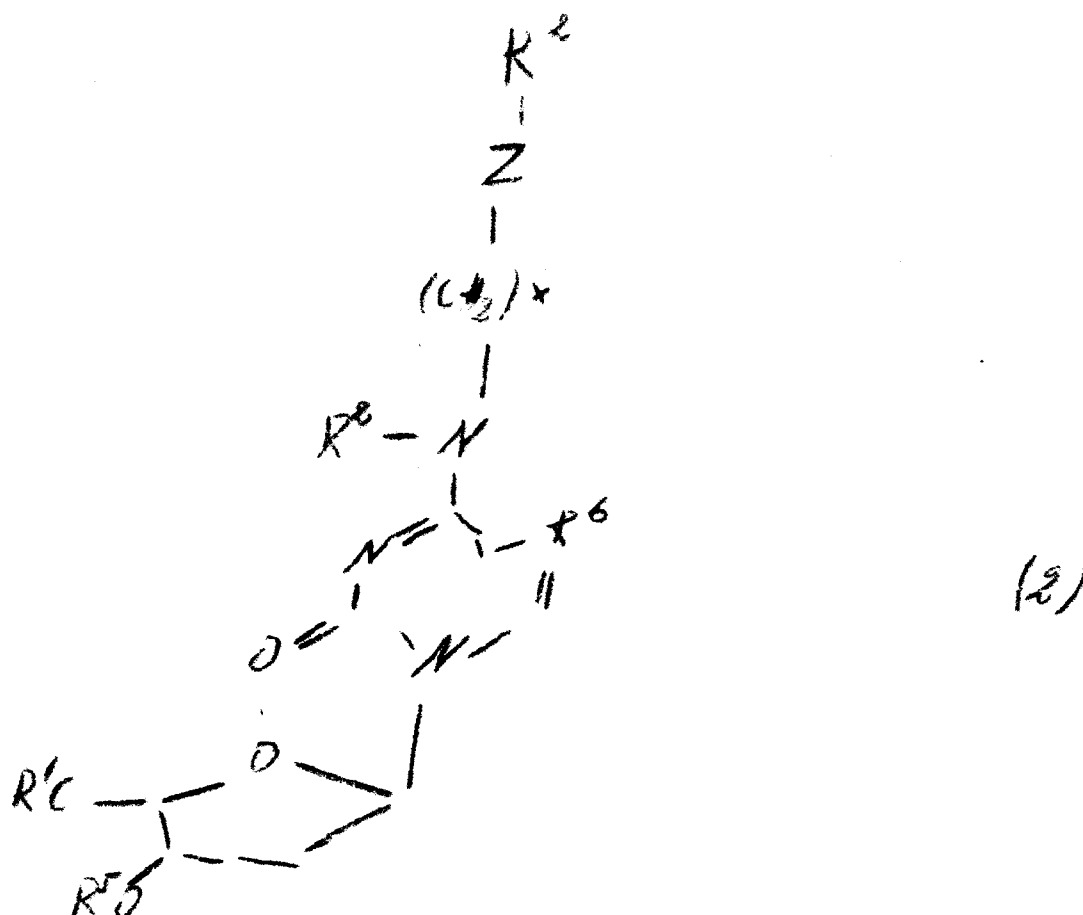
25. Средството според претенция 22 в което молекулата има разклонена структура.

26. Средството от претенция 22 което ~~содържа~~ най-малкото една част от олигонуклеотидните поединици на втората област са свързани по пътя на една многофункционална половина, произхождаща от съединение с формулата:



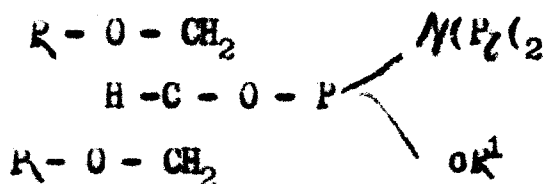
при което K е органична половина, за предпочитане нуклеинова киселина, K^1 е хидроксилна защитна група която може да бъде отстранена при условия, които не отстраняват синтетична нуклеинова киселина от твърда фаза и не отстраняват екзоцикличесен азот или фосфатна защитна група, X е една съдържаща фосфор група, която ускорява синтеза на нуклеинова киселина, Y е радикал произхождащ от една нуклеофилна група, и K^2 е R^1 или блокираща или защитна група, която може да бъде отстранена и заместена с водород без засяжане на K^1 .

27. Средството от претенция 22, характеризиращо се с най-малкото една част на олигонуклеотидните поединици, свързани по пътя на една многофункционална половина от едно съединение с формулата: (виж на следващата страница)



при което Z е нуклеофил, K^1 е една защитна група, която е обикновено фазово стабилна и чувствителна към киселина, K^2 е водород или метил, K^3 е защитна група, която може да бъде отстранена и заместена с водород без засягане на K^1 , K^5 е фосфорно производно което позволява добавянето на нуклеотиди към 5' позицията на олигонуклеотидната верига по време на химическия синтез, K^6 е метил, водород, йод, бром или флуор и X е показател от 1 до 8 включително.

28. Средството според претенция 22 при което най-малкото една част от олигонуклеотидните единици са свързани по пътя на една многофункционална половина, произхождаща от съединение с формулата:



при което R е спеманатата хидроксилна защитна група.

R^1 е изопропил и R^2 е метил или бета-цианоетил.

29. Един метод за подсилване на откриваем сигнал, използвайки за откриване и за количествено определяне на антиген при имуноизследване, който обхваща:

(а) директно или индиректно свързване към един анализ на биохимично молекулярно средство, обхващащо една свързваща област (А) и една втора област (М), която обхваща множественост на еднолентови ДНК олигомерни поделници пригодни за хибрилизирание към еднолентови белязани олигонуклеотиди;

(б) отстраняване на несвързано средство;

(с) хибрилизирание на еднолентови белязани нуклеотиди, които обхващат една нуклеотидна последователност която е допълнителна към поделниците последователност на областта М средство-то, към поделници на втората област;

(д) отстраняване на небелязаните олигонуклеотиди; и

(е) количествено определяне количеството на белязания олигонуклеотид свързан към средството.

30. Методът според претенция 29 при който анализът е първо имобилизиран, директно или индиректно, върху твърд субстрат.

31. Методът според претенция 30 при който областта А е един полипептид пригетен да функционира като антиген и средството е свързано директно или индиректно към анализът от областта А.

32. Методът според претенция 31, при който полипептидът на областта А се свързва специфично към един епитоп на антиген, което се свързва специфично към анализа.

33. Методът според претенция 29 при който:

(а) областта А на средството е еднолентов полинуклеотид; и

(б) анализът е индиректно свързан към молекулярното средство по пътя на една протеин/полинуклеотиден хибриден свърз-

ватор с две области:

(I) първа област, която е еднолентова полинуклеотидна последователност по същество допълнителна към последователността на областта А на средството;

(II) втора област която функционира като антители, специфично за анализа.

34. Метод за подсилване на откриваем сигнал при конкуриращо имуноизследване, който обхваща:

(а) конструиране на молекулярно средство, обхващащо:

(I) първа област (А) която е пригодна да функционира като имуноген;

(II) втора област В, която е двоенлентов полинуклеотид пригоден да функционира като промотор ^{на} ~~на~~ ^{връзка} от ДНК РНК-полимеразна ензимна активност;

(III) трета област (С), която е или еднолентова или двоенлентова и е свързана до втората област, така че третата област е пригодна да функционира като шаблон за промоторната активност на втората област;

(б) имобилизиране на средството, директно или индиректно, върху твърд субстрат при наличност на един конкуриращ анализ;

(с) отстраняване на несвързаното средство;

(д) транскрибиране на множествени копия на РНК олигомери, които са допълнителни към шаблонната последователност с' на третата област, С, на средството по пътя на РНК-полимеразна активност;

(е) количествено определяне на транскриптите.

35. Метод за подсилване на откриваем сигнал при конкуриращо имуноизследване, което обхваща:

(а) конструиране на молекулярно средство, обхващащо:

(I) една първа област (A) която е пригодна да функционира като антиген; и

(II) множественост на еднолентови олигонуклеотидни подединици които са в състояние да се свързват специфично към еднолентова нуклеиново кисела последователност представяваща интерес;

(b) имобилизиране на средството директно или индиректно, върху твърд субстрат при наличие на конкурращ анализ;

(c) отстраняване на несвързаното средство;

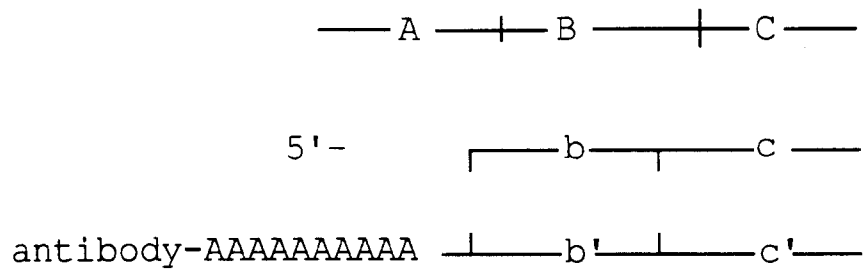
(d) хибрилизирание на еднолентовите белязани олигонуклеотиди, които обхващат една нуклеотидна последователност, която е по същество допълнителна към подединицата последователност на област A на средството, към подединицата на втората област;

(e) отстраняване на несвързания белязан олигонуклеотид; и

(f) количествено определяне на количеството на белязания олигонуклеотид свързан към средството.

1/11

A -



B -

< A > < B (T7PROMOTER) >

5'-TTTTTTTTTCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATA...

ANTIBODY-3'-AAAAAAAAAAGACCGAATAGCTTTAATTATGCTGAGTGATAT...

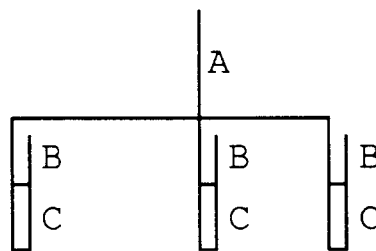
< C (TRANSCRIBED REGION) >

...GGGAGATGTGGTTGTCGTAAGCTTAGCGAAATACTGTCCGAGTCG

...CCCTCTACACCAACAGCATGAATCGCTTTATGACAGGCTCAGC

template strand

C -



D -

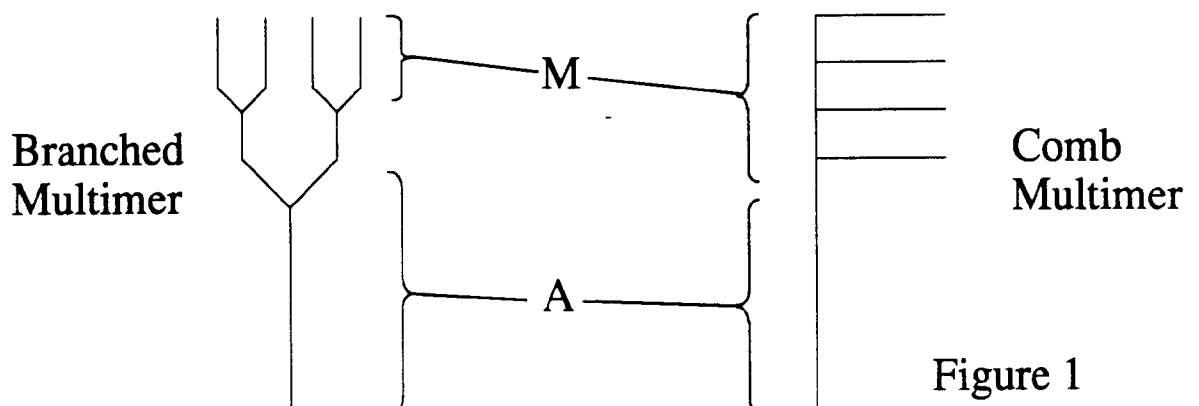


Figure 1

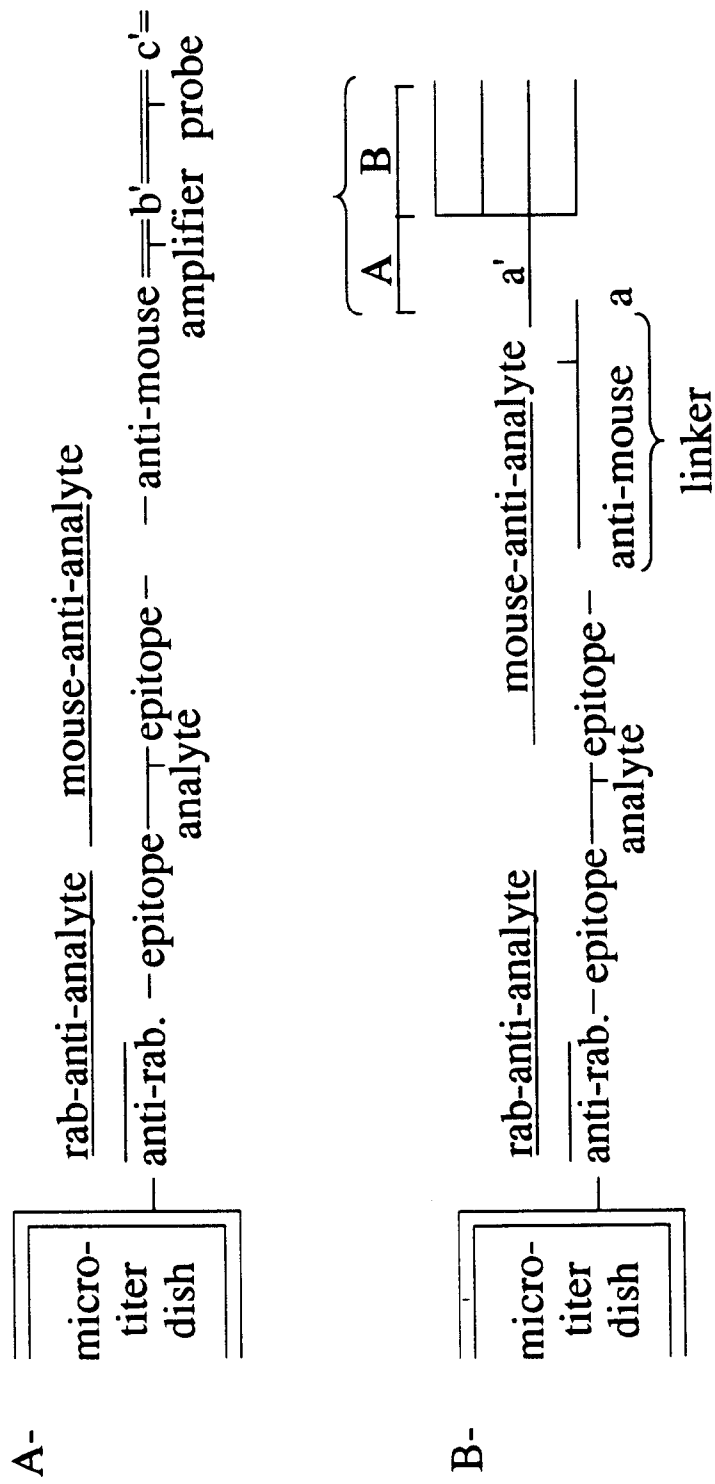


Figure 2

3/11

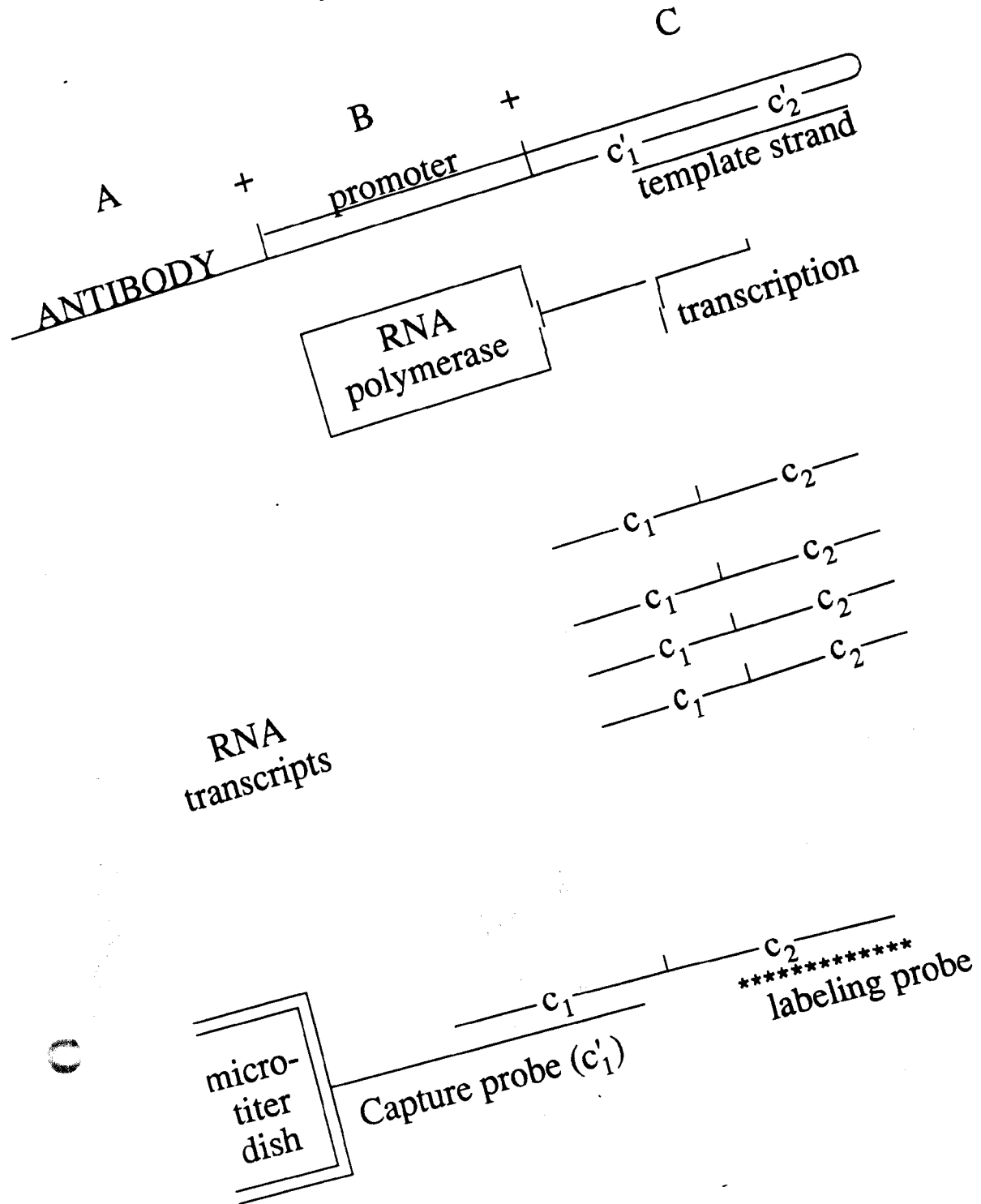
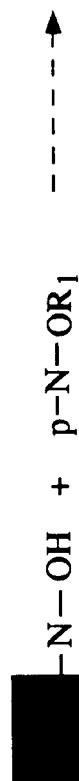


Figure 3

A. Linear synthetic DNA



B. Branched DNA, comb structures.

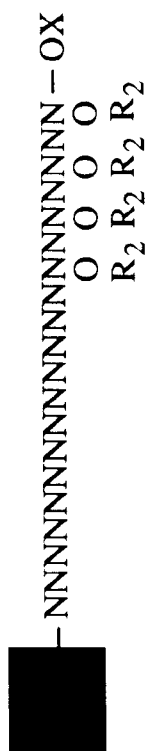
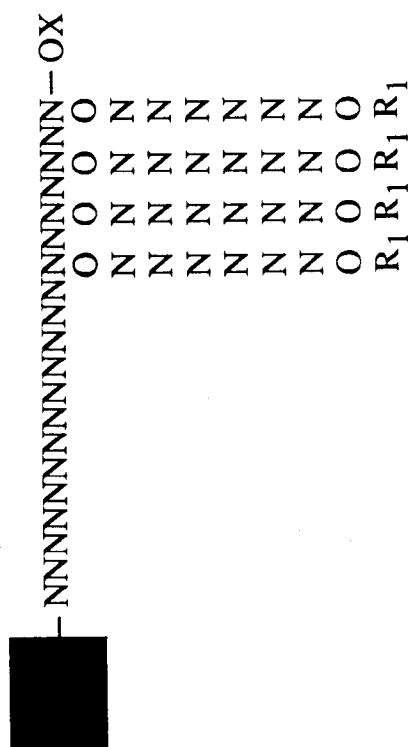
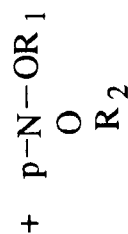


Figure 4a

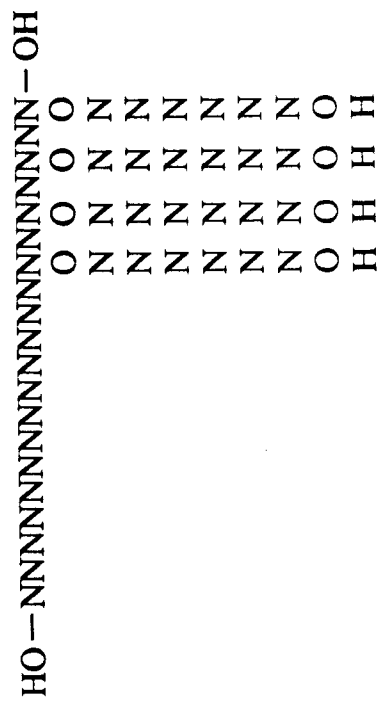


Figure 4b

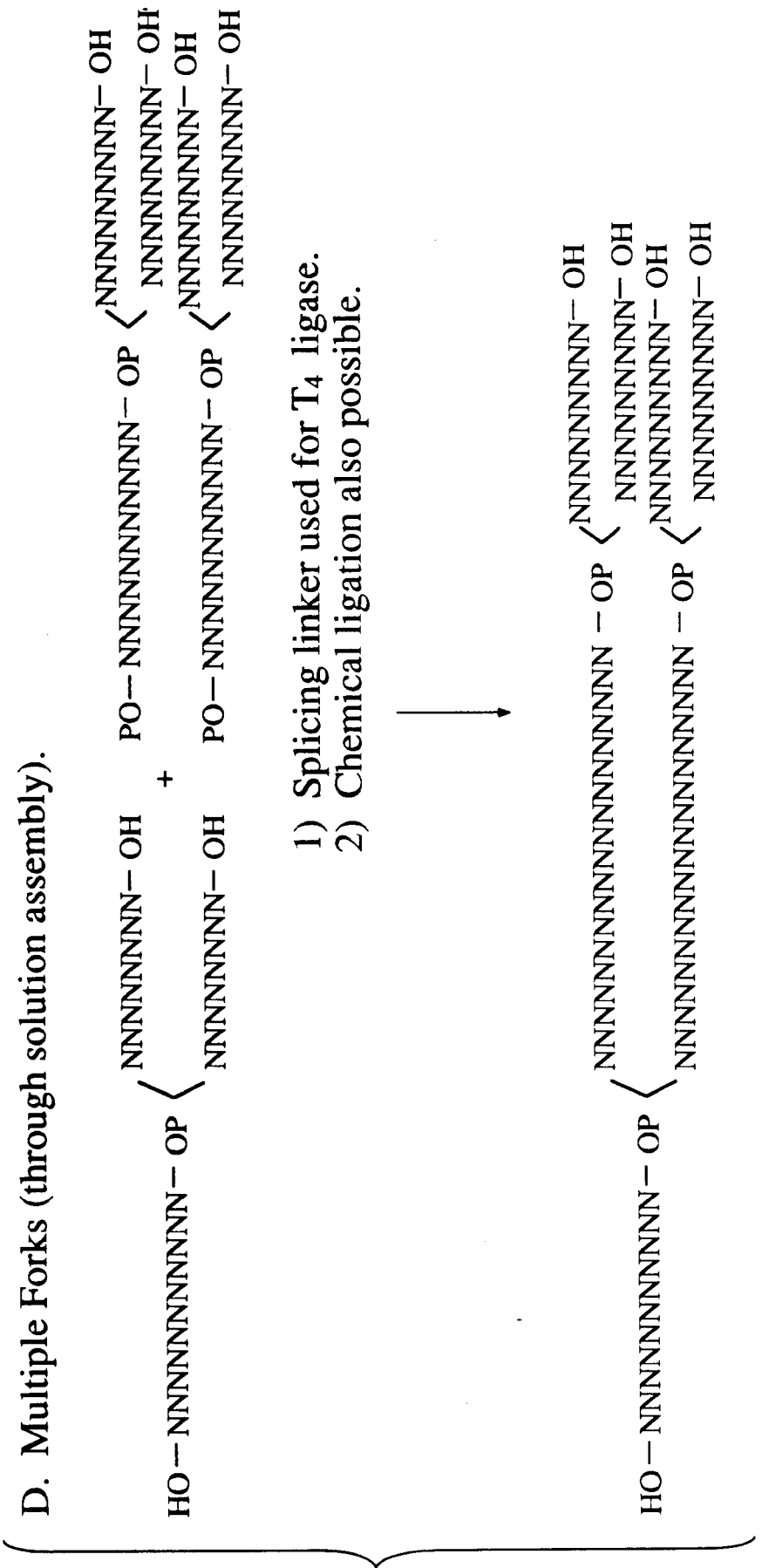
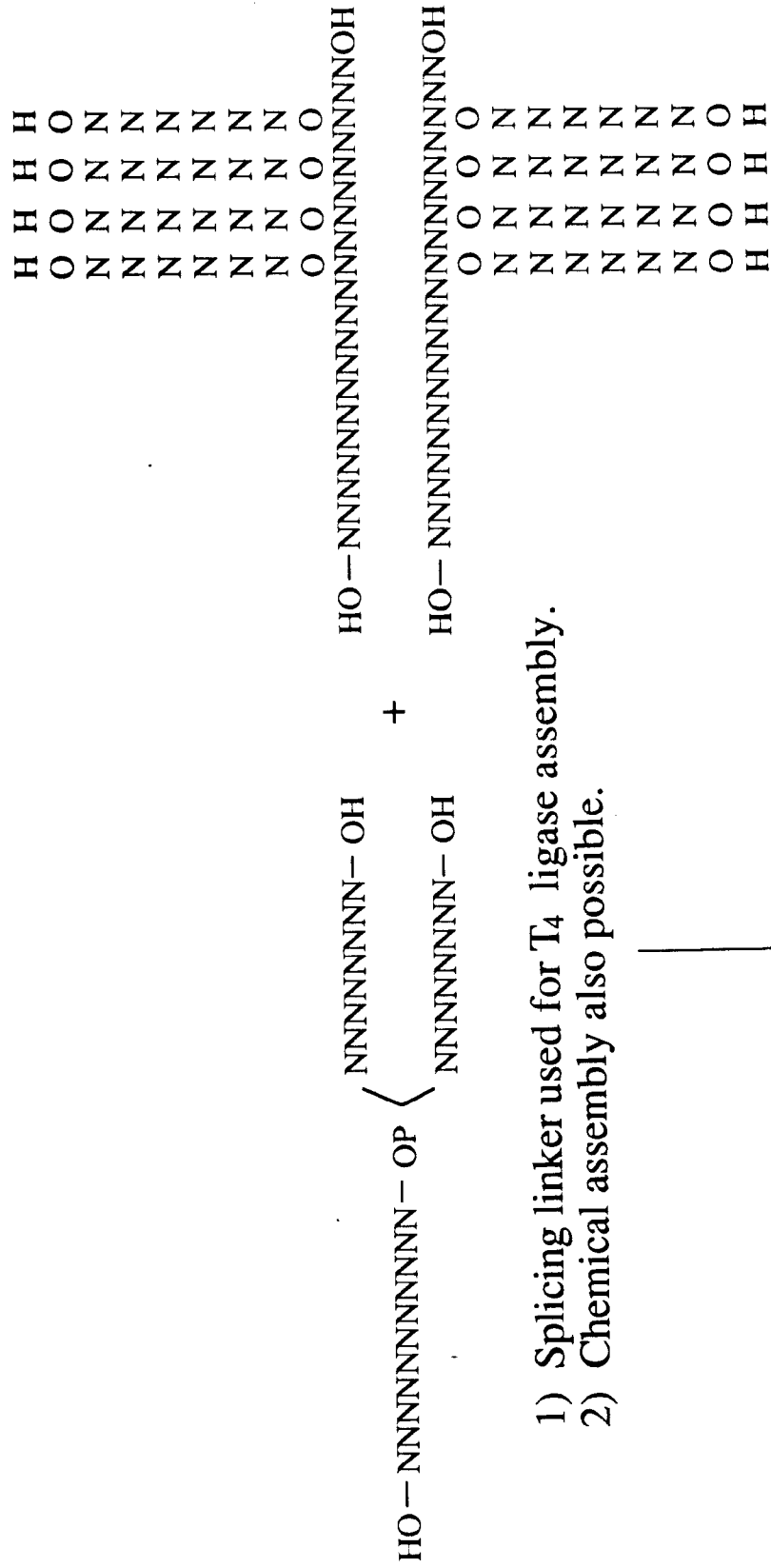


Figure 4d

E. Forked comb structures.



- 1) Splicing linker used for T₄ ligase assembly.
- 2) Chemical assembly also possible.

Figure 4e

HO — NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN — OH
O N N N N N N N N N N O X
O N N N N N N N N N N O X

Figure 4h