



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl.: C 12 Q 1/68 C 12 N 15/00
(21) Patentansøgning nr: PA 1989 06444
(22) Indleveringsdag: 1989-12-19
(24) Løbedag: 1988-06-17
(41) Alm. tilgængelig: 1990-02-19
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-12-27
(86) International ansøgning nr: PCT/US88/02108
(86) International indleveringsdag: 1988-06-17
(85) Videreførelsesdag: 1989-12-19
(30) Prioritet: 1987-06-19 US 064141 1988-06-06 US 202978

(73) Patenthaver: Akzo Nobel N.V., 76, Velperweg , 6824 BM Arnhem, Holland
(72) Opfinder: Thomas Raymond Gingeras, 1528 Juniper Hill Drive, Encinitas, CA 92024, USA
Ulrich Merten, 4422 Leon Street, San Diego, CA 92107, USA
Deborah Yantis Kwoh, 2404 Jacaranda Avenue, Carlsbad, CA 92009, USA

(74) Fuldmægtig: Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark
-

(54) Benævnelse: **Transkriptionsbaseret nukleinsyre-forstærknings/påvisningssystemer**

(57) Sammendrag:

RNA-transkripter, fremgangsmåde til fremstilling deraf, eventuel replikation og anvendelse, til opnåelse af ønsket forstærkning og påvisning af tilsvarende (i sekvens) målnukleinsyresekvens. Transkripterne svarer i sekvens til en målnukleinsyresekvens indeholdt i en oprindelig prøve blandt en blanding af nukleinsyrer, og derfor tilvejebringer tilstedeværelsen af transkripterne i forstærket form påvisning deraf, og således ved overensstemmelse hermed in vitro eller x-vivo påvisning af tilstedeværelsen af målnukleinsyresekvens i prøven.

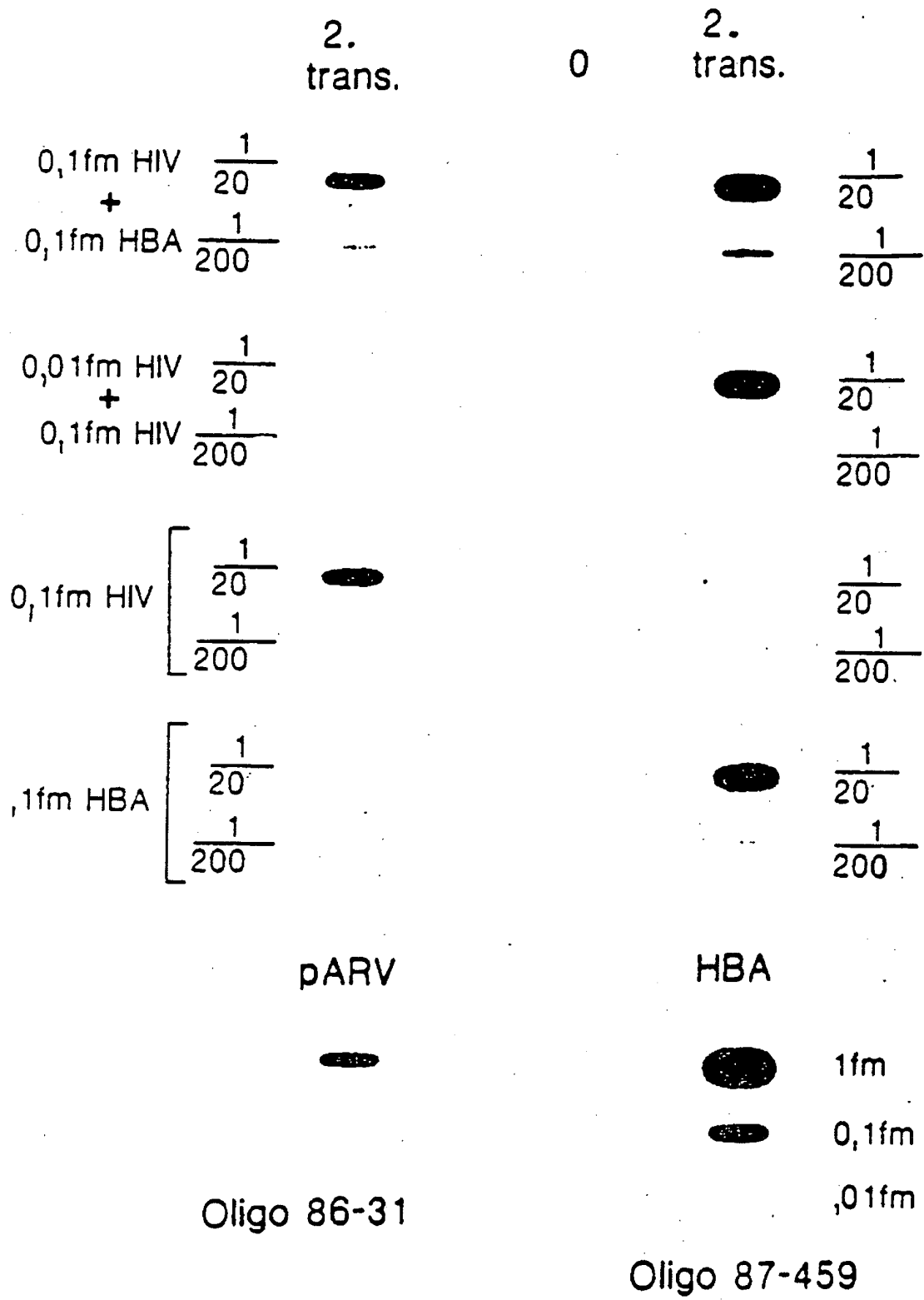


FIG. 3

Den foreliggende opfindelse angår generelt fremskridt inden for molekylbiologi og molekylgenteknologi.

5 Nærmere bestemt angår den foreliggende opfindelse hidtil ukendte fremgangsmåder indeholdende nødvendige reagenser og midler til forøgelse af in vitro eller x-vivo kopiantallet, dvs. forstærkning, af i det mindste et udvalgt segment (sekvens) af nukleinsyre eller dets komplement eller hybridiserende homologe segment i en prøve omfattende en eller flere
10 nukleinsyrer, som kan indbefatte RNA, DNA eller begge.

Blandt de anvendelser, hvor fremgangsmåderne ifølge den foreliggende opfindelse finder anvendelse er 1) ved analyser af legemsvæsker og -væv til påvisningen af specifikke
15 nukleinsyresekvenser, som er karakteristiske for en genetisk eller patogen sygdom eller tilstand ved in vitro eller x-vivo nukleinsyresondehybridiseringsanalyser, og 2) ved den selektive kloning af enkelt-kopigener eller sjældne gener eller gener, som udtrykkes i lille mængde.

20 Meget af arbejdet inden for molekylbiologi, molekylgenteknologi og anvendelser deraf, såsom f.eks. nukleinsyresondehybridiseringsanalyser for blodbårne patogener eller mangelfulde gener, involverer påvisningen eller isoleringen af en bestemt
25 nukleinsyresekvens. Et fundamentalt problem inden for dette arbejde er at påvise eller isolere og derefter kvantitetsbestemme en nukleinsyresekvens, som har interesse. Det har været et vanskeligt problem, da biologiske materialer, såsom
30 cellekulturer, vævsstoffer og blodprøver typisk er sammensat af en kompleks blanding af RNA- og DNA-entiteter, hvoraf for det meste kun en meget lille fraktion har en sekvens, som har interesse.

35 Praktiske anvendelser af nukleinsyresondehybridiseringsanalyser har faktisk været begrænset på grund af, at analysernes følsomhed, når de blev udført sammen med reagenser, som er egnede til rutinebrug, og i løbet af acceptabelt korte tidsrum

er for ringe til at påvise sekvenser, som har interesse, i de lave koncentrationer, hvorved de forekommer i virkelige prøver.

- 5 Problemet med påvisning af en nukleinsyresekvens, som har interesse ("måsegment") og som er til stede i en lav koncentration i en kompleks blanding af nukleinsyrer, er blevet angrebet på to fundamentalt forskellige måder.
- 10 Ved den første metode ændres mængden af nukleinsyre (omfattende måsegmentet) i en prøve ikke, men i stedet sættes et signalfrembringende system i forbindelse med måsegmentet og frembringer et påviseligt signal, som repræsenterer antallet af måsegmentmolekyler. F.eks. forbindes en nukleinsyresonde,
- 15 som har en sekvens, der er komplementær til sekvensen af et undersegment af måsegmentet, til et enzym, såsom alkalisk phosphatase og blandes med prøven under hybridiseringsbetingelser, som vil bevirke hybridisering mellem sonden og måsegmentet (men ikke væsentligt mellem sonde og andre nukleinsyresekvenser i prøven). Efter fjernelse af enzymforbundet sonde,
- 20 som ikke hybridiserede, tilsættes et chromogent substrat for alkalisk phosphatase under passende forhold og i princippet fremstilles et stort antal påviselige, farvede molekyler hurtigt for hvert sondemolekyle, som er hybridiseret til måsegment.
- 25 ment.

Adskillige andre systemer til påvisning af nukleinsyresekvenser uden ændring af mængden af månukleinsyre i prøven er kendt inden for området. Et andet eksempel er den almindeligt

30 anvendte mærkning af en nukleinsyresonde med radioaktive atomer, såsom ^{32}P og derefter påvisning af sonde, som er hybridiseret til mål via forstærket signal, som er initieret ved henfald af de radioaktive kerner. Endnu et andet eksempel involverer, at man til en sonde for måsegmentet binder en anden

35 nukleinsyre, som er i stand til replikation, således at den let kan påvises ved hjælp af kendte teknikker. Der kendes visse RNA'er, som er modtagelige for (autokatalytisk) replikase-

induceret replikation af en bestemt polymerase, såsom bakteriofag-RNA-afhængig RNA-polymerase, såsom Q β -replikase og replikasen fra bromemosaikvirus (BMV). I et sådant system er både en RNA-sekvens og RNA'et med komplementær sekvens skabeloner for replikation af RNA-polymerasen. Således forøges 5 mængden af replikeret RNA eksponentielt med tiden (så længe, at antallet af RNA-skabelonmolekyler ikke overstiger antallet af RNA-polymerasemolekyler i et system). Se Miele et al., J. Mol. Biol. 171, 281 (1983). Et system, hvori en sonde for et 10 målsegment er forbundet til RNA, som er i stand til at blive replikeret ved hjælp af Q β -replikase, er beskrevet af Chu et al., Nucl. Acids Res. 14, 5591 (1986), og det af BMV-replikase af March et al., Positive Strand RNA Viruses, Alan R. Liss (publr.; New York) (1987; Proceedings of UCLA Symposium, 15 1986).

Den første metode har to alvorlige ulemper. For det første er kopiantallet af målsegment i mange tilfælde i en prøve af praktisk størrelse så lav, at selv med rimeligt hurtig signal- 20 frembringende systemer, er tidsrummet, som er nødvendigt for at frembringe et påviseligt signal, dvs. signifikant over baggrund, upraktisk lang. Dernæst forekommer signalfrembringelse i alt væsentlig i den samme grad fra "baggrunds"-signalfrembringende molekyler som fra signalfrembringende molekyler, som 25 er forbundet med målet. I en hvilken som helst analyse for et målsegment er et signal, som skyldes "baggrund" ikke til at undgå. Dvs. der vil ufravigeligt være noget af signalet, som skyldes sonde, som ikke-specifikt klæber til filtre eller andre faste bærere eller hybridiserer til segmenter med se- 30 kvenser, som nøje ligner målsegmentets. Hvis målkopiantallet er for lavt, vil det tidskonstante forhold mellem signal fra mål samt baggrund (dvs. "signal") og signal fra baggrund (dvs. "støj") være for lavt til signifikant at være påviseligt over baggrund. Disse og andre ulemper har ført til, at fagfolk inden for området har forsøgt at angribe problemet med påvisning 35 af et målsegment, som er til stede i en lav mængde i en kompleks blanding af nukleinsyrer, på en anden måde.

Denne anden måde er fundamentalt anderledes og involverer forøgelse af kopiantallet af selve målsegmentet, fortrinsvis til en grad større end den af andre sekvenser i en prøve, især sådanne, som muligvis fejlagtig ville blive påvist som målsegment på grund af ligheder i sekvens. Eksempler på denne anden måde omfatter forskellige dyrkningsteknikker, hvor cellerne, som indeholder målsegmentet, fås til at forøges i antal, til tider hurtigere end antallet af andre celler, eller hvor bestemte nukleinsyrer (f.eks. plasmider, RNA'er) deri med disponeret målsegment fås til at forøges i antal.

Ulemperne ved sådanne dyrkningsteknikker er, at de er besværlige og problematiske og tidsforbrugende, og giver udslag i det uundgåelige: andre nukleinsyrer end de, som omfatter målsegment forøges samtidigt i kopiantal, og "baggrund" forøges således potentielt. En anden ulempe er den resulterende vækst af potentielt farlige organismer som et nødvendigt trin til at opnå forstærkning.

Et andet eksempel på denne anden måde er forstærkning af et DNA-målsegment ved hjælp af en såkaldt "polymerasekædereaktion" ("PCR"). Denne teknik er en lånt tilpasning af kendte naturligt forekommende processer, som sker ved replikationsprocessen af f.eks. enkelt-strengede DNA-genomer af visse virusentiteter og repræsenterer i alle tilfælde en anvendelse beslægtet med cDNA-fremstilling ala Hong, Bioscience Reports 1, 243 (1981); Cooke et al., J. Biol. Chem. 255, 6502 (1980); og Zoller et al., Methods in Enzymology 100, 468-500 (1983). Ved denne teknik forøges et bestemt segment i kopiantal eksponentielt med et antal cyklusser, som hver medfører (1) hybridisering af en DNA-primer til et 3'-terminalt undersegment af hver af målsegmentet og dets komplement (dvs. segmentet med en sekvens komplementær til sekvensen af målsegmentet), (2) forlængelse af hver af primerne med en DNA-polymerase, og (3) at gøre enkelt-strengt ved termisk denaturering af duplexerne, som er et resultat af trin (2). Denne teknik er beskrevet i Saiki et al., Science 230, 1350 (1985) og Mullis et al.,

europæisk patentansøgning med publikationsnummeret 200362 og 201184. Se ligeledes US patentskriftet nr. 4.683.195 og 4.683.202. Således kan kopiantallet af et målsegment forøges
5 med en faktor på ca. 10^5 ved anvendelse af teknikken i 20 cyklusser i løbet af ca. 3 timer. På grund af, at kun de segmenter, hvortil en specifik primer hybridiserer med en tilstrækkelig stabilitet til at initiere kædeforlængelse af polymerasen til dannelse af komplementen, og som har en komplement, hvortil en anden specifik primer hybridiserer på lignende måde til opnåelse af målsegment ved kædeforlængelse, forøges de eksponentielt i kopiantal, mens andre ikke-målsegmenter, som ikke fejlagtigt er hybridiseret med den anvendte primer, forøges, hvis overhovedet, højst lineært i kopiantal
10 som en funktion af antallet af cyklusser. Polymerasekædereaktionsteknikken kan i høj grad forøge ikke kun kopiantallet af målsegment, men også forholdet mellem mængden af målsegment og mængden af baggrundsforårsagende segmenter i en prøve.
15

Det følger selvsagt, at denne anden måde kan anvendes på en prøve i forbindelse med anvendelse af den første måde anvendt med det forstærkede målsegment til tilvejebringelse af et
20 endnu stærkere påvisningssignal.

En yderligere udvikling af den anden måde er beskrevet i EP-A-031029, der tilhører den kendte teknik i kraft af Artikel 54(3) EPC. Fremgangsmåden indbefatter frembringelse af et dobbeltstrengt DNA-mellemprodukt omfattende en promotor efterfulgt af
25 en målsekvens. Dette mellemprodukt anvendes så til at fremstille mangfoldige RNA-kopier ved brug af en RNA-polymerase.

Det er formålet med den foreliggende opfindelse at løse problemerne, som den kendte teknik har behandlet, og at overkomme de ulemper, som er specificeret i forbindelse med tidligere forskerers bestræbelser på at løse disse problemer. Det er et yderligere formål med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe en ligefrem teknik, som kan udnyttes i løbet af et acceptabelt kort tidsrum under anvendelse af hensigtsmæssigheden ved kendte reagenser og med den nødvendige præcision til at nå ensartede videnskabelige resultater. En teknik, som kan anvendes i et reproducerbart analysemiljø, og som kan tilpasses til brug i sæt til laboratorieanalyser/kliniske analyser.

Det er således et formål med den foreliggende opfindelse at forøge påviseligheden af bestemte nukleinsyresekvenser (målsegmenter) ved forstærkning af målsekvenserne i et in vitro- eller x-vivo-system, der ikke har de ulemper, som indtil nu er opstået ved bestræbelser inden for den kendte teknik.

Den foreliggende opfindelse angår en hidtil ukendt teknik til udøvelse af den anden metode til påvisning af et målsegment, som er til stede i en lav koncentration i en kompleks blanding af nukleinsyrer. Den udnytter et hidtil ukendt RNA-transkriptionstrin i forbindelse med og hidrørende fra en syntetiseret dobbelt-strengt cDNA-kopi af målsekvensen som en fuldstændig cyklus. Der kan anvendes flere cyklusser. På grund af, at transkriptionstrinnet er det dominerende nyhedsaspekt er det hensigtsmæssigt refereret til heri som et transkriptionsbaseret forstærkningssystem (TAS). Den hidtil ukendte teknik ifølge den foreliggende TAS-opfindelse resulterer i hurtig forøgelse i kopiantal af et udvalgt målsegment ved at gøre brug af to egenskaber hos DNA-afhængig RNA-polymerase: (1) væsentlig initiering af transkription udfra kun et lille antal sekvenser, som er specifikke for hver polymerase, se f.eks. Brown et al., Nucl. Acids Res. 14, 3521 (1986); og (2) hurtig fremstilling af et stort antal transkripter fra hver kopi af en promotor (typisk 10^2 - 10^4 per time) genkendt af en

RNA-polymerase. Se Milligan et al., Nucleic Acids Res. 15, 8783 (1987). Teknikken ifølge den foreliggende opfindelse kan også udnytte egenskaben hos RNA'er sammen med visse sekvenser til at blive hurtigt (autokatalytisk) replikeret ved hjælp af RNA-afhængige RNA-replikaser. Se også Miele et al., supra. Endvidere tilvejebringer den en standardiseringsteknik, som gør entydig måling af mængden af mål-DNA til stede i en prøve mulig.

10

Den foreliggende opfindelse (med mindre induceret (autokatalytisk) replikation anvendes) giver et enkelt-strengt RNA-transkript eller, når der ikke tages skridt til at forhindre dets dannelse, et RNA-DNA-duplex dannet derfra, som har et undersegment, der har målsegmentets sekvens, eller sekvensen, som er komplementær til målsegmentets sekvens, og som er til stede i stort overskud i forhold til nukleinsyre med et undersegment af komplementær sekvens. Dette overskud indledningsvis af et enkelt-strengt RNA-transkript er fordelagtigt i visse metoder til påvisning af forstærket produkt med en mærket nukleinsyresonde på grund af, at der kun er lidt segment med komplementær sekvens til stede til at konkurrere med sonde om hybridisering til det forstærkede produkt. Endvidere afstryges det enkelt-strengede RNA-transkriptprodukt heraf mere eller mindre kontinuert og giver direkte påvisning af målsegment uden nødvendigheden af besværlige fejltilbøjelige gentagende PCR-cykluser og strengadskillelse. Sådanne fordele tilvejebringes ikke ved hjælp af PCR-teknikken, som giver dobbeltstrengt DNA (hvoraf en streng omfatter målsegment, og hvoraf den anden streng omfatter komplement af målsegment), som skal adskilles før påvisning og kun efter et stort antal gentagne cykluser, som er nødvendige for at nå acceptable forstærkningsmængder.

15

20

25

30

Teknikken ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringer forstærkning af et udvalgt målsegment i en udstrækning i det
5 mindste lige så stor som ved PCR-teknikken i løbet af ca. det samme tidsrum, men på en langt simplere og mere reducerbar måde og forskellig fra naturligt forekommende processer eller anden teknik.

10 I overensstemmelse med den foreliggende opfindelse er der specielt anvist en fremgangsmåde til forstærkning (dvs. mangfoldiggørelse eller amplifikation) af en målnukleinsyresekvens i en prøve indeholdende nukleinsyre, omfattende:

- 15 1) hybridisering af en første enkeltstrenget DNA-primer med nævnte målnukleinsyresekvens, hvor nævnte primer omfatter en promotorsekvens, som med en sekvens af 0 til 100 nukleotider er bundet til en sekvens af nukleotider, der er komplementære med 3'-enden af nævnte målsekvens, idet nævnte komplementære sekvens i det mindste har en længde på 10 nukleotider,
- 20 2) forlængelse af nævnte første primer, som er hybridiseret i overensstemmelse med trin (1), ved en reaktion, der er katalyseret med en DNA-polymerase, til dannelse af en første komplementær DNA-sekvens,
- 25 3) adskillelse af duplexen dannet i trin (2) i enkeltstreng,
- 4) hybridisering af en anden enkeltstrenget DNA-primer, som har en sekvens med i det mindste 10 nukleotider svarende til 5'-enden af nævnte målsekvens og eventuelt en yderligere DNA-sekvens af op til 100 nukleotider, med nævnte første komplementære DNA-sekvens,

5) forlængelse af nævnte anden primer, der er hybridiseret i overensstemmelse med trin (4), ved en reaktion, som er katalyseret med en DNA-polymerase, til dannelse af en anden komplementær DNA-sekvens og

5

6) anvendelse af det dobbeltstrengede DNA-produkt fra trin (5) til fremstilling af en mængde RNA-transkripter, der er komplementære med nævnte målsekvens, ved en reaktion, som er katalyseret med en DNA-afhængig RNA-polymerase med specificitet for promotoren, som er indbefattet i nævnte første primer.

10

Den foreliggende opfindelses opfindere har fundet frem til, hvorledes DNA-afhængig bakteriofag-RNA-polymerase kan anvendes til hurtigt at forstærke (dvs. forøge kopiantallet af) en udvalgt målnukleinsyresekvens (målsekvens eller segment), som er til stede i en prøve af nukleinsyrer. De har endvidere fundet ud af, hvorledes DNA-afhængig bakteriofag-RNA-polymerase kan anvendes sammen med RNA-afhængig bakteriofag-RNA-polymerase til opnåelse af det samme resultat. Det har ikke tidligere været erkendt, at sådan bakteriofag-RNA-polymerase kunne anvendes til dette formål.

15
20

Den foreliggende opfindelse omfatter fremgangsmåder, som er baseret på disse opdagelser.

25

Disse fremgangsmåder er særligt anvendelige, når de anvendes i forbindelse med nukleinsyresondehybridiseringsanalyser for en nukleinsyre, som omfatter et målsegment, der er forstærket ifølge den foreliggende opfindelse. Den foreliggende opfindelse omfatter således fremgangsmåder til påvisning af tilstedeværelsen eller fraværet af et segment i en prøve af en nukleinsyre, som omfatter et bestemt segment, ved hjælp af en sonde hybridiseret til segmentet efter forstærkning ifølge den foreliggende opfindelse.

Til grund for den foreliggende opfindelse er hidtil ukendte visse RNA-transkripter, fremstilling deraf, eventuel replikation og brug til opnåelse af ønsket forstærkning og påvisning af tilsvarende (i sekvens) målnukleinsyresekvens. Opfindelsen udøves i et in vitro- eller x-vivo-miljø og anvendes i forbindelse med syntesen af en dobbelt-strengt cDNA-kopi af målsekvensen for at fremstille en dobbelt-strengt nukleinsyreskabelon, som på sin side anvendes til produktion af RNA-transkripterne. Denne fremgangsmåde med dobbelt-strengt cDNA-syntese og RNA-transkription udgør en enkelt cyklus af det foreliggende transkriptions-baserede forstærkningssystem (TAS). Om ønsket kan denne cyklus gentages for at opnå endnu højere forstærkningsniveauer. I kraft af fremgangsmåden, ved hvilke de fremstilles (og reproduceres) svarer transkripterne (identiske eller komplementære) i sekvens til en målnukleinsyresekvens indeholdt i en oprindelig prøve blandt en blanding af nukleinsyrer og derfor giver tilstedeværelsen af transkripterne i forstærket form påvisning deraf og således ved overensstemmelse dermed in vitro- eller x-vivo-påvisningen af tilstedeværelsen af målnukleinsyresekvensen i prøven.

Den foreliggende opfindelse involverer således in vitro- eller x-vivo-påvisning af i det mindste en specifik nukleinsyresekvens (målsekvens eller segment) i en prøve indeholdende nu-

kleinsyre. Den foreliggende opfindelse omfatter en fremgangs-
måde, som omfatter, at man fremstiller en dobbelt-strengt
nukleinsyre indeholdende en sekvens, som svarer til en mål-
sekvens operabelt forbundet til en promotor derfor, anvender
5 den dobbelt-strengede nukleinsyre som en dobbelt-strengt
nukleinsyreskabelon til fremstillingen af en række RNA-tran-
skripter derfra, som hver har en RNA-sekvens, som svarer til
målsekvensen, og påviser tilstedeværelsen af RNA-sekvensen og
ved analogi tilstedeværelsen af målsekvens.

10

Den foreliggende opfindelse er rettet mod alle fremgangsmåder
og midler, som er forbundet med fremstillingen og brug af så-
danne RNA-transkripter. Den foreliggende opfindelse er således
rettet mod den eventuelt repetitive fremgangsmåde til frem-
15 stilling af nævnte dobbelt-strengede nukleinsyreskabelon, som
defineret ovenfor, hvilken fremgangsmåde omfatter, at man til-
vejebringer en første nukleinsyreprimer indeholdende en promo-
torsekvens, som er operabel forbundet til en sekvens svarende
til et segment af en målsekvens, som ovenfor defineret, under
20 passende betingelser hybridiserer den første nukleinsyreprimer
med målsekvens i en prøve indeholdende nukleinsyre, forlænger
den hybridiserede nævnte første nukleinsyreprimer i en poly-
meraseforlængelsesreaktion komplementært til målsekvensen til
dannelse af en tilsvarende duplexnukleinsyre, adskiller du-
25 plexens strenge, hybridiserer til den fraskilte promotorhol-
dige sekvensstreng under passende betingelser en anden nu-
kleinsyreprimer ved enden modsat promotorsekvensen og for-
længer den hybridiserede nævnte anden nukleinsyreprimer i en
polymeraseforlængelsesreaktion komplementært til den promotor-
30 holdige sekvens.

35

Den foreliggende opfindelse er endvidere rettet mod yderligere
og alternative fremgangsmåder og midler til fremstilling af
den dobbelt-strengede nukleinsyreskabelon (supra), f.eks. en i
alt væsentligt enkelt-beholderreaktion, som omfatter, at man
tilvejebringer en første nukleinsyreprimer indeholdende en
promotorsekvens, som er operabel forbundet til en sekvens kom-

plementær til et segment af en målsekvens, og en anden nukleinsyreprimer med en sekvens, som er identisk med et segment af en målsekvens, idet primerne svarer til forskellige regioner i nævnte målsekvens, men ikke eller ikke i alt væsentligt overlapper i deres overensstemmelse med målet, og vælges således, at et forlængelsesprodukt af en, når adskilt fra dens komplement, kan tjene som en skabelon for et forlængelsesprodukt af den anden, bringer en prøve indeholdende nukleinsyre omfattende målsekvens i kontakt med primerne under sekventiel hybridiserings- og strengseparationsbetingelser for at fremstille skiftevis forlængelsesprodukter af primerne.

Den foreliggende opfindelse er yderligere rettet mod fremgangsmåder og midler under anvendelse af den dobbelt-strengede nukleinsyre supra som en skabelon ved fremstillingen af en række RNA-transkripter derfra i en reaktion, som er katalyseret af en DNA-afhængig RNA-polymerase, som genkender promotoren deraf og påvisning og måling af tilstedeværelsen af nævnte RNA-transkripter.

Den foreliggende opfindelse er yderligere rettet mod fremgangsmåder og midler til standardisering af mængden af påvist målsekvens (svarende til mængden af påvist RNA-transkript) ved yderligere korrelation med tilstedeværelsen af kendt nukleinsyre anvendt som en indre standard. Kopiantallet af standarden er bestemt i forvejen, standarden skal udsættes for de samme betingelser således forudbestemt under udøvelse af opfindelsen som målsekvensen, og den skal derfor tjene som en bedømmelsesmetode til bestemmelse af relative mængder transkripter, som er fremstillet parallelt af den og af målsekvens.

Den foreliggende opfindelse er endvidere rettet mod yderligere replikation af opnåede RNA-transkripter, som defineret ovenfor, via tilstedeværelsen deri af replikasegenkendelsessteder. Dette opnås hensigtsmæssigt ved tilvejebringelse den første nukleinsyreprimer som defineret ovenfor yderligere bærende en

replikasegenkendelsesstedsekvens, fortrinsvis mellem promotor-
sekvensen og sekvens som svarer til målsekvens og/eller yder-
ligere indeholdende et replikasegenkendelsessted på den anden
nukleinsyreprimer defineret ovenfor. Ved efterfølgende tran-
5 skription indeholder de deraf følgende transkripter replikase-
genkendelsesstedet eller -stederne, således at tilstedeværel-
sen af en replikase (i reaktionsområdet eller sættet f.eks.)
(autokatalytisk) inducerer replikation af transkripterne,
hvilket frembringer yderligere kopier til yderligere at lette
10 påvisning.

Fig. 1A, 1B og 1C illustrerer en fremgangsmåde ifølge den fo-
religgende opfindelse til forstærkning af et målsegment af en
nukleinsyre (nukleinsyre A), som er en DNA eller RNA, hvor der
15 fremstilles mange kopier af en første RNA (RNA I) med et seg-
ment med en sekvens komplementær til sekvensen af målsegment.

Fig. 2A, 2B og 2C illustrerer den yderligere forstærkning
ifølge den foreliggende opfindelse af et segment af et RNA I,
20 som er fremstillet, som illustreret i figurerne 1A, 1B og 1C
til fremstilling af mange kopier af et andet RNA (RNA II) med
et segment med en sekvens, som er den samme som sekvensen af
et undersegment af målsegmentet, som blev forstærket til frem-
stilling af RNA I.

25 Fig. 3 viser autoradiogrammer, der viser forskellige koncen-
trationer af HIV-RNA forstærket ved hjælp af TAS samtidig med
en fastsat koncentration af humant β -globinnukleinsyre.

30 Fig. 4 viser en general strategi, hvorved RNA fremstillet ved
hjælp af en DNA-afhængig RNA-polymerase giver et RNA-molekyle,

som kan tjene som en skabelon for en RNA-afhængig replikase.

Der henvises til standardbøger inden for molekylbiologi, som indeholder definitioner og fremgangsmåder og midler til ud-
5 øvelse af grundlæggende teknikker ifølge den foreliggende opfindelse, såsom: DNA-sondefremstilling eller primerfremstilling omfattende DNA-syntese; hybridiseringsmetodologi omfattende variationer inden for styrke af betingelser til frembringelse af mere eller mindre hybridiseringsikkerhed afhængig af graden af homologi mellem primeren og en mål-DNA-sekvens; identifikation, isolering eller fremstilling af promotorer eller nærmere bestemt promotorer eller steder genkendt af DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase og RNA-afhængige bakteriefag-RNA-polymerase, eller ved anvendelsen af eukaryote systemer, virale DNA- og RNA-afhængige RNA-polymeraser, f.eks. adenovirusindkodet RNA-polymerase og bromemosaikvirus-RNA-polymerase; betingelser, som fører til fremstilling af RNA-transkripter omfattende såkaldte transkriptionsforøgersekvenser; mekanismen og metodologien for (induceret) replikation; polymerasekædereaktionsmetoder omfattende de heri anvendte reagenser, osv. Se f.eks. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982) og de forskellige referencer nævnt deri; US patentskrift nr. 4.683.195; US patentskrift nr. 4.683.202; Hong, *Bioscience Reports* 1, 243 (1981); Cooke et al., *J. Biol. Chem.* 255 6502 (1980); og Zoller et al., *Methods in Enzymology* 100, 468-500 (1983); Crea et al., *Nucleic Acids Res.* 8, 2331 (1980); Narang et al., *Meth. Enzym.* 68, 90 (1979); Beaucage et al., *Tetrahedron Letters* 22, 1859 (1981); Brown et al., *Meth. Enzym.* 68, 109 (1979); Caruthers et al., *Meth. Enzym.* 154, 287 (1985); Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255, 2073 (1980); Lee et al., *Science* 239, 1288 (1988); Milligan et al., *Nucleic Acids Res.* 15, 8783 (1987); Miller et al., *Virology* 125, 236 (1983), Ahlquist et al., *J. Mol. Biol.* 153, 23 (1981); Miller et al., *Nature* 313, 68 (1985); Ahlquist et al., *J. Mol. Biol.* 172, 369 (1984); Ahlquist et al., *Plant Mol. Biol.* 3, 37 (1984); Ou et al., *PNAS* 79, 5235 (1982); Chu et al., *Nucl.*

Acids Res. 14, 5591 (1986); europæisk patentansøgning med publikationsnr. (EPA) 194.809; Marsh et al., Positive Strand RNA Viruses, side 327-336, Alan R. Liss (publ.; New York) (1987; Proceedings of UCLA Symposium, 1986); Miller et al., J. Mol. Biol. 187, 537 (1986); Stoflet et al., Science 239, 491 (1988); og Murakawa et al., DNA 7, 287 (1988).

Alle de førnævnte publikationer er ved denne henvisning herved inkorporeret ved henvisning heri.

10

Ved udtrykket "promotor" menes en nukleinsyresekvens (naturligt forekommende eller syntetisk fremstillet eller et produkt af restriktionsfordøjelse), som specifikt genkendes af en RNA-polymerase, som binder til en genkendt sekvens og indleder transkriptionsprocessen, hvorved der fremstilles et RNA-transkript. Den kan eventuelt indeholde nukleotidbaser, som strækker sig ud over det faktiske genkendelsessted, som tænkes at bibringe yderligere stabilitet over for nedbrydningsprocesser. I princippet kan en hvilken som helst promotorsekvens anvendes, for hvilken der er en kendt og tilgængelig polymerase, som er i stand til at genkende begyndelsessekvensen. Typisk er kendte og egnede promotorer sådanne, som genkendes af visse bakteriofagpolymerase, såsom bakteriofag-T3, -T7 eller -SP6. Se Siebenlist et al., Cell 20, 269 (1980). Disse er kun eksempler på sådanne polymeraser, som kan anvendes ved udøvelsen af den foreliggende opfindelse sammen med deres forbundne promotorsekvenser.

15

20

25

30

"RNA-transkriptet" heraf er den ribonukleinsyresekvens, som fremstilles efter transkriptionsinitiering efter RNA-polymerasegenkendelse af promotorsekvensen (se supra). Fremstillingen af sådanne transkripter er mere eller mindre kontinuert delvis afhængig af mængden af tilstedeværende polymerase.

35

Ved udtrykket "primer" menes i den foreliggende sammenhæng en nukleinsyresekvens (naturligt forekommende eller syntetisk fremstillet eller et produkt af restriktionsfordøjelse), som

har tilstrækkelig homologi med målsekvensen, således at den under egnede hybridiseringsbetingelser er i stand til hybridisering, dvs. binding til målsekvensen. En typisk primer er mindst ca. 10 nukleotider i længde og mest foretrukket med en
5 længde på ca. 35 eller flere nukleotidbaser og er i dens mest foretrukne udførelsesformer identisk eller er meget homolog med målsekvensen. Se f.eks. EPA 128042 (publiceret 12. december 1984).

10 Udtrykket "operabelt forbundet" især i forbindelse med bindingen af en promotorsekvens inden i en primersekvens refererer til funktionsdygtigheden af den endelige "dobbelt-strengede nukleinsyreskabelon" ifølge den foreliggende opfindelse, således at den, skabelonen, er i stand til at fremstille tilsvarende RNA-transkripter, når promotoren genkendes af den passende polymerase - se ovenfor.
15

Primerforlængelsesreaktionen til fremstilling af en duplex er kendt per se. Se referencer ovenfor. Polymeraser, som er egnede til dette formål, omfatter E. coli-DNA-polymerase I, Klenow-fragment af E. coli-DNA-polymerase I, T4-DNA-polymerase, omvendt transkriptase, osv.
20

Teknikken til dannelse af et påvisningssignal, såsom via radioaktiv mærkning eller farvedannelsesmidler under anvendelse af et farvefølsomt enzym, er også velkendt og dokumenteret inden for området. Se diskussionen ovenfor.
25

Anvendelsen af en "replikase" til (autokatalytisk) replikationsinduktion af RNA-transkripterne ifølge den foreliggende opfindelse er generelt kendt inden for området. Egnede eksempler på sådanne replikaser, som er anvendelige ifølge den foreliggende opfindelse, omfatter den såkaldte Q β -virusreplikase, som genkender visse nukleinsyresekvenssteder ved både 3'- og
30 5'-enderne af det givne RNA-transkript, og den såkaldte bromemosaikvirus (BMV) såvel som α -virusreplikaser, som menes at genkende nukleinsyresekvenssteder ved 3'-enden af et givent
35

RNA-transkript. Disse replikaser tjener til at replikere, dvs. reproducere RNA-transkripterne og komplementer for at mangfoldiggøre kopier deraf. Når et sådant enzym er til stede i reaktionsstedet under transkriptionsprocessen, kan det forudses, at de mange transkripter, som fremstilles under transkription selv kan undergå replikation for således eksponentielt at forøge mængden af RNA-transkriptprodukt.

Indre standardisering er defineret som en fremgangsmåde, som anvendes til: a) at sikre, at TAS-forstærkningsprocessen ikke har slået fejl på grund af en fremgangsmådefejl, og b) måle mængderne af målnukleinsyre i forhold til en i forvejen bestemt mængde nukleinsyre, som altid er forbundet med prøven, som har interesse. En sådan indre standardisering forekommer ved co-forstærkning af en del af målsekvensen såvel som en endogen sekvens ved den samme reaktion. Ved f.eks. at kende det tilstedeværende celleantal i den biologiske prøve, kunne et enkelt-kopigen (f.eks. β -globin) anvendes som en indre standard, og da det ikke udtrykkes i form af RNA, er dets begyndelseskopiantal lig med to gange det samlede antal celler i prøven. Ved at co-forstærke dele af β -globinet og målsekvenser, som har interesse, kan forholdene mellem de forstærkede signaler sammenlignes for at størrelsesbestemme mængderne af målsekvens, som har interesse. Da hver celle har to kopier (i diploide celler) af denne indre standard, uanset hvorvidt den biologiske prøve indeholder separate målsekvenser (f.eks. HIV), forventes hver prøve at fremstille et positivt forstærkningssignal som et resultat af den indre standard. Se Groudine et al., *Nucleic Acids Research* 12, 1427 (1984) og McKnight, *Cell* 31, 355 (1982). Se også britisk patentansøgning med publikationsnummeret 2187283 A (publiceret 3. september 1987).

Et aspekt ifølge den foreliggende opfindelse er en fremgangsmåde til forstærkning af et målnukleinsyresegment med formlen

3'-(første undersegment)_t-(andet undersegment)_t-(tredje undersegment)_t-5'

I

5 hvor (første undersegment)_t er et nukleinsyresegment med kendt sekvens på i det mindste 10 nukleotider, som støder op til 3'-enden af (andet undersegment)_t, (andet undersegment)_t er et nukleinsyresegment med 0 eller flere nukleotider, og (tredje undersegment)_t er et nukleinsyresegment med kendt sekvens på i
10 det mindste 10 nukleotider, som støder op til 5'-enden af (andet undersegment)_t, hvilken fremgangsmåde omfatter, at man:

(1) til (første undersegment)_t af målsegmentet hybridiserer en første primer, som er et enkeltstrenget DNA, som omfatter et
15 3'-terminalt undersegment med formlen II

5'-(promotor)₁-(variabelt undersegment)₁-
(3'-primer-undersegment)₁-3'

II

20 hvor (promotor)₁ er et enkelt-strenget DNA-segment med sekvensen af plus-strengen af en DNA-afhængig RNA-polymerasespecifik bakteriofagpromotor, (variabelt undersegment)₁ er et enkelt-strenget DNA-segment med 0 til 100 nukleotider, som støder op
25 til det 3'-terminale nukleotid i (promotor)₁ og det 5'-terminale nukleotid af (3'-primer-undersegment)₁ og (3'-primer-undersegment)₁ er et enkelt-strenget DNA-segment med i det mindste 10 nukleotider med en sekvens, som er komplementær til sekvensen af et undersegment af (første undersegment)_t, som
30 afsluttes med det 3'-terminale nukleotid af (første undersegment)_t, idet nævnte (promotor)₁ støder op til 5'-enden af nævnte (3'-primer-undersegment)₁, hvis nævnte (variabelt undersegment)₁ har 0 nukleotider;

35 (2) forlænger den første primer, som er hybridiseret i overensstemmelse med trin (1), i en reaktion, som er katalyseret af en første DNA-polymerase til fremstilling af et første kom-

plementært DNA-segment, som omfatter et undersegment med form-
len III

5'-(promotor)₁-(variabelt undersegment)₁-
5 (første undersegment)_{tc}-(andet undersegment)_{tc}-
(tredje undersegment)_{tc}-3',

III

10 hvor (første undersegment)_{tc} er DNA-segmentet med sekvensen
komplementær til sekvensen af (første undersegment)_t, (andet
undersegment)_{tc} er DNA-segmentet med sekvensen komplementær
til sekvensen af (andet undersegment)_t, og (tredje underseg-
ment)_{tc} er DNA-segmentet med sekvensen komplementær til se-
kvensen af (tredje undersegment)_t, forudsat at, hvis målseg-
15 mentet er et RNA-segment, er nævnte første DNA-polymerase en
omvendt transkriptase;

(3) gør den ved reaktionen i trin (2) dannede duplex enkelt-
strenget;

20

(4) til (tredje undersegment)_{tc} af det første komplementære
DNA med formlen (III) hybridiserer en anden primer, som er et
enkelt-strengt DNA med i det mindste 10 nukleotider med form-
len (IV)

25

3'-(5'-primer-undersegment)₂-(variabelt undersegment)₂-5',

IV

30 hvor (5'-primer-undersegment)₂ har sekvensen af et underseg-
ment af (tredje undersegment)_t, som afsluttes med det 5'-ter-
minale nukleotid af (tredje undersegment)_t, og hvor (variabelt
undersegment)₂ er et segment med 0 til 100 nukleotider, som
støder op til 5'-enden af (5'-primer-undersegment)₂;

35 (5) forlænger det andet primersegment, som er hybridiseret i
overensstemmelse med trin (4) ved en reaktion, som katalyseres
af en anden DNA-polymerase til dannelse af et andet komplemen-
tært DNA-segment, som omfatter et undersegment med formlen (V)

5'-(variabelt undersegment)₂-(tredje undersegment)_t-(andet undersegment)_t-(første undersegment)_t-(variabelt undersegment)_{1c}-(promotor)_{1c}-3',

V

5

hvor (variabelt undersegment)_{1c} er DNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af (variabelt undersegment)₁ og (promotor)_{1c} er DNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af (promotor)₁, forudsat at den anden DNA-polymerase er den samme som eller forskellig fra den første DNA-polymerase, og

10

(6) anvender det dobbelt-strengede produkt fra trin (5) som skabelonen ved en reaktion, som katalyseres af en første DNA-afhængig bakteriofag-RNA-polymerase, som genkender promotoren, hvoraf en streng er (promotor)₁ til fremstillingen af et første RNA-produkt med formlen (VI)

15

5'-(variabelt undersegment)_{1r}-(første undersegment)_{tcr}-(andet undersegment)_{tcr}-(tredje undersegment)_{tcr}-(variabelt undersegment)_{2cr}-3'

20

VI

hvor (variabelt undersegment)_{1r} er RNA-segmentet med sekvensen af (variabelt undersegment)₁, (første undersegment)_{tcr} er RNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af (første undersegment)_t, (andet undersegment)_{tcr} er RNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af (andet undersegment)_t, (tredje undersegment)_{tcr} er RNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af (tredje undersegment)_t og (variabelt undersegment)_{2cr} er RNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af (variabelt undersegment)₂.

30

Ifølge et andet af den foreliggende opfindelses aspekter omfatter den en fremgangsmåde, hvor (første undersegment)_t har en længde på i det mindste 10 nukleotider og har formlen (XIII)

35

3'-(første undersegment)_{t2}-(første undersegment)_{t1}-5',

XIII

5 hvor (første undersegment)_{t2} har 0 eller flere nukleotider og hvis flere end 0 støder op til 3'-enden af (første undersegment)_{t1} og (første undersegment)_{t1} har en længde på i det mindste 10 nukleotider, hvor (tredje undersegment)_t har form-
len XIV

10 3'-(tredje undersegment)_{t1}-(tredje undersegment)_{t2}-5,

XIV

15 hvor (tredje undersegment)_{t2} har 0 eller flere nukleotider, og hvis flere end 0 støder op til 5'-enden af (tredje undersegment)_{t1}, og (tredje undersegment)_{t1} har en længde på i det mindste 10 nukleotider, hvor (3'-primer-undersegment)₁ har se-
kvensen komplementær til sekvensen af et undersegment af mål-
segment, som består af hele (første undersegment)_{t2} og 0 eller
20 flere nukleotider af (første undersegment)_{t1}, hvor (5'-primer-
undersegment)₂ er et undersegment, som består af hele (tredje
undersegment)_{t2} og 0 eller flere nukleotider af (tredje under-
segment)_{t1}, og hvorefter trin (1) til (6) supra, RNA-segmentet
med formlen VII

25 5'-(første undersegment)_{t1cr}-(andet undersegment)_{tcr}-
(tredje undersegment)_{t1cr}-3'

VII

30 hvor (første undersegment)_{t1cr} er RNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af (første undersegment)_{t1} og (tredje undersegment)_{t1cr} er RNA-segmentet med sekvensen kom-
plementær til sekvensen af (tredje undersegment)_{t1}, yderligere
forstærkes ved hjælp af en fremgangsmåde, som omfatter, at
man:

35

(7) til det første RNA-produkt med formlen (VI) hybridiserer en tredje primer, som er et enkelt-strengt DNA, som omfatter et 3'-terminalt undersegment med formlen VIII

5'-(promotor)₃-(variabelt undersegment)₃-
 (3'-primer-undersegment)₃-3',

VIII

5 hvor (promotor)₃ er et enkelt-strengt DNA-segment med sekvensen af plus-strengen af en DNA-afhængig RNA-polymerasespecifik bakteriofagpromotor, idet sekvensen af (promotor)₃ er den samme som eller forskellig fra sekvensen af (promotor)₁, (variabelt undersegment)₃ er et enkelt-strengt DNA-segment med 0
 10 til 100 nukleotider, som støder op til det 3'-terminale nukleotid i (promotor)₃ og det 5'-terminale nukleotid i (3'-primer-undersegment)₃, og (3'-primer-undersegment)₃ er et enkelt-strengt DNA-segment, som har den samme sekvens som (tredje undersegment)_{t1}, og støder op til det 3'-terminale nukleotid
 15 i (promotor)₃, hvis (variabelt undersegment)₃ har 0 nukleotider;

(8) forlænger den tredje primer hybridiseret i overensstemmelse med trin (7) ved en reaktion katalyseret af en tredje
 20 DNA-polymerase, som er en omvendt transkriptase og er den samme som eller forskellig fra den første og anden DNA-polymerase, til fremstilling af et tredje komplementært DNA-segment, som omfatter et 3'-terminalt undersegment med formlen IX

25 5'-(promotor)₃-(variabelt undersegment)₃-
 (tredje undersegment)_{t1}-(andet undersegment)_t-
 (første undersegment)_{t1}-(første undersegment)_{t2}-
 (variabelt undersegment)_{1c}-3'

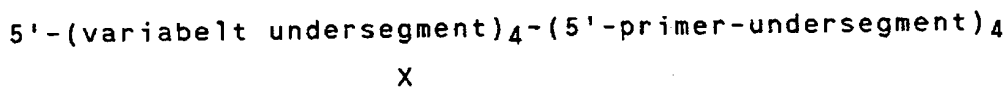
IX

30 hvor (variabelt undersegment)_{1c} er det DNA med sekvensen komplementær til sekvensen af (variabelt undersegment)₁;

(9) gør den ved reaktionen i trin (8) dannede duplex enkelt-
 35 strengt;

(10) til det tredje komplementære DNA, som er fremstillet ved reaktionen i trin (8), hybridiserer en fjerde primer med form-

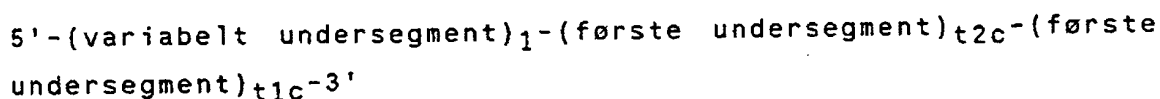
len X



5

hvor $(\text{variabelt undersegment})_4$ er et segment med 0 til 100 nukleotider og $(5'\text{-primer-undersegment})_4$ er et undersegment med kendt sekvens, som støder op til $3'$ -nukleotidet i $(\text{variabelt undersegment})_4$, hvis $(\text{variabelt undersegment})_4$ har flere end 0 nukleotider, og som omfatter i det mindste 10 nukleotider af segmentet med formlen XX

10



15

XX

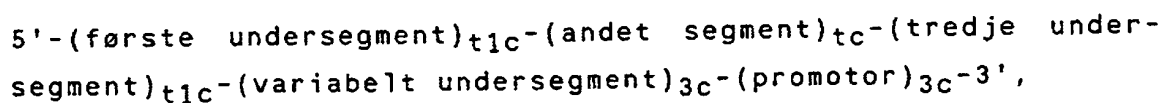
hvor $(\text{første undersegment})_{t2c}$ er DNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af $(\text{første undersegment})_{t2}$ og $(\text{første undersegment})_{t1c}$ er DNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af $(\text{første undersegment})_{t1}$, forudsat at i det mindste en af nævnte i det mindste 10 nukleotider er ved eller $5'$ fra det $5'$ -terminale nukleotid i $(\text{første undersegment})_{t1c}$,

20

25

(11) forlænger den fjerde primer, som er hybridiseret i overensstemmelse med trin (10), ved en reaktion katalyseret af en fjerde DNA-polymerase, som er den samme som eller forskellig fra den første, anden og tredje DNA-polymerase til dannelse af et fjerde komplementært DNA, som omfatter et segment med formlen XI

30



XI

35

hvor $(\text{andet undersegment})_{tc}$ er DNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af $(\text{andet undersegment})_t$, $(\text{tredje}$

undersegment) t_{1c} er DNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af (tredje undersegment) t_1 , (variabelt undersegment) 3_c er DNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af (variabelt segment) 3 , og (promotor) 3_c er DNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen (promotor) 3 ,
 5 og

(12) anvender det dobbelt-strengede produkt fra trin (11), som skabelonen i en reaktion katalyseret af en anden DNA-afhængig bakteriofag-RNA-polymerase, som er den samme som eller forskellig fra den første DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase, og som genkender promotoren, hvoraf en streng er (promotor) 3 til fremstilling af et andet RNA-produkt med et 5'-terminalt undersegment med formlen XII
 10

15
 5'-(variabelt undersegment) 3_r -(tredje undersegment) t_{1r} -(andet undersegment) t_r -(første undersegment) t_{1r} -X $_{12}$ -(variabelt undersegment) 4_{cr} -3',

XII

20
 hvor (variabelt undersegment) 3_r er RNA-segmentet med sekvensen af (variabelt undersegment) 3 , (tredje undersegment) t_{1r} er RNA-segmentet med sekvensen af (tredje undersegment) t_1 , (andet undersegment) t_r er RNA-segmentet med sekvensen af (andet undersegment) t , (første undersegment) t_{1r} er RNA-segmentet med sekvensen af (første undersegment) t_1 , (variabelt undersegment) 4_{cr} er RNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af (variabelt undersegment) 4 , og X $_{12}$ er RNA-segmentet med sekvensen komplementær til sekvensen af undersegmentet af
 25
 30 (5'-primer-undersegment) 4 , som er 5' fra 5'-enden af (første undersegment) t_{1c} .

Som beskrevet ovenfor omfatter opfindelsen også sæt til udøvelse af forstærkningsfremgangsmåderne ifølge opfindelsen. I
 35 tilfældet med fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som omfatter, at man fremstiller et første RNA-produkt, ville et sæt ifølge opfindelsen omfatte de to primere, den tilsvarende DNA-afhæn-

gige bakteriofag-RNA-polymerase og DNA-polymerasen. Et sæt til udøvelse af en fremgangsmåde ifølge opfindelsen, som omfatter, at man fremstiller både et første og et andet RNA-produkt vil-
le omfatte fire hensigtsmæssige primere (to sæt af to) med de
5 tilsvarende nødvendige polymeraser.

Fremgangsmåder og sæt ifølge den foreliggende opfindelse til udøvelse af nukleinsyrehybridiseringssondeanalyser, som omfatter forstærkning af et målsegment ifølge opfindelsen opfindelsen
10 sen omfatter udover trinnene og bestanddelene i henholdsvis fremgangsmåderne og sættene til forstærkning, trin og bestanddele, som er nødvendige til påvisning af RNA-produktet, som er et resultat af forstærkning ifølge opfindelsen. Fagmanden inden for området forstår de forskellige yderligere henholdsvis
15 trin og bestanddele, som er nødvendige til at påvise RNA fra en forstærkningsfremgangsmåde ved hjælp af en hvilken som helst af de adskillige nukleinsyresondehybridiseringsanalysemetoder, som er kendt inden for området. En foretrukken nukleinsyresondehybridiseringsanalysemetode, som involverer perle-indfangning af mærket RNA-forstærkning, er illustreret i
20 følgende eksempel 2.

Det foretrækkes at (3'-primer-undersegment)₁, (5'-primer-undersegment)₂, (3'-primer-undersegment)₃ og (5'-primer-undersegment)₄ har mellem 20 og 40 nukleotider, og mere foretrukket ca. 30 nukleotider for at forøge den specificitet, med hvilken de forskellige primere binder til enderne af målsegmenterne, som ønskes forstærket.

30 Det foretrækkes også, at målsegmentet af en nukleinsyre, som har interesse, og som er udvalgt til forstærkning (i kraft af udvælgelse af (første undersegment)_t og (tredje undersegment)_t vælges således, at (andet undersegment)_tr har i det mindste 30 og mere foretrukket i det mindste ca. 50 nukleotider. Dette
35 muliggør brug af (andet undersegment)_tcr eller (andet undersegment)_tr i det forstærkede RNA-produkt til at være mål for nukleinsyresonder, som ikke har sekvenser, der overlapper de hos nogen af primerundersegmenterne.

Selvom DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerasen kan anvende skabeloner, som er længere end 100 bp, formindskes deres transkriptionseffektivitet i takt med, at skabelonen bliver længere. Således foretrækkes målsegmenter mindre end 1000 baser lange.

5
10
15
20
25
30
35

Det foretrækkes at anvende det identiske sæt primere anvendt ved syntesen af RNA til fremstilling af RNA i en anden TASCYKLUS. Som nævnt i den del, som beskriver fremstilling af RNA, bør primer-parret ikke lappe over hinanden. Ved udøvelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvori fremstillingen af RNA ønskes, er det muligt at undersegmentet af målsegment med sekvens, som er komplementær til sekvens af (5'-primer-undersegment)₄ er i 5'-retningen fra og ikke overlapper undersegmentet af målsegment med sekvens, som er komplementær med sekvens af (3'-primer-undersegment)₁. På lignende måde foretrakkes det, at undersegmentet af målsegment med sekvens, som er den samme som sekvensen af (3'-primer-undersegment)₃ er i 3'-retningen fra og ikke overlapper undersegmentet af målsegment med sekvens, som er den samme som sekvens af (5'-primer-undersegment)₂. Denne strategi kan være foretrukket, fordi den reducerer konkurrencen mellem de forskellige primere for de samme steder og kan derved i udpræget grad forøge effektiviteten af forstærkning ifølge opfindelsen. I det tilfælde hvor der er nogen overlappning mellem sæt af sammensatte primere foretrækkes det at fjerne eventuelt ikke-brugt første sæt af primere før det andet sæt anvendes.

Der sættes ifølge den foreliggende opfindelse fokus på DNA-afhængig bakteriofag-RNA-polymerase på grund af deres høje specificitet over for bestemte promotorer. Anden polymerase, som har lignende høj specificitet over for bestemte promotorer kunne anvendes ifølge den foreliggende opfindelse i stedet for bakteriofag-polymerasen, og opfindelsen er ment ligeledes at omfatte sådan anden polymerase.

De foretrukne blandt de DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymeraser er sådanne fra T7, T3 og SP6. Foretrukne promotorer til

brug sammen med disse polymeraser er beskrevet i eksemplerne og kravene, men adskillige andre promotorer for disse polymeraser er kendte inden for området og kan ligeledes anvendes.

- 5 Endvidere kan polymeraser fra andre bakteriofager end de foretrukne tre og promotorer, som genkendes af sådanne andre polymeraser, anvendes ifølge den foreliggende opfindelse.

10 Det foretrækkes som DNA-polymerase i fremgangsmåderne ifølge opfindelsen at anvende omvendte transkriptaser og DNA-polymerase, som mangler 5' til 3'-exonukleaseaktivitet. Det er mest foretrukket at en enkelt DNA-polymerase anvendes ved alle trinnene i fremgangsmåderne. Mest foretrukne blandt DNA-polymeraserne er AMV-omvendt-transkriptase og rekombineret MMLV-
15 omvendt-transkriptase. Andre polymeraser er imidlertid også acceptable, såsom den varmestabile DNA-polymerase fra *Thermus aquaticus* (se Chien et al. J. Bacteriol. 127, 1550 (1976)), Sequenase rekombineret T7-DNA-polymerase fra U.S. Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio, U.S.A., og det velkendte Klenow-fragment af *E. coli*-DNA-polymerase I og kalvethymuskirtel-DNA-
20 polymerase- α .

De "variable undersegmenter", som eventuelt er indbefattet i de forskellige primere, tjener tre funktioner. Faktisk burde
25 de mere rammende betegnes "multiformål-undersegmenter". For det første for den første og tredje primer, som omfatter promotorer, omfatter promotorundersegmenterne fortrinsvis transkriptionsinitieringssekvenser, som foretrækkes af RNA-polymerasen svarende til promotoren. Dernæst for alle primere kan
30 et variabelt undersegment eventuelt indeholde et bestemt segment, hvorved RNA-produktet fra forstærkningen kan påvises i en nukleinsyresondehybridiseringsanalyse. Faktisk kan forstærkning (og analyse) foregå for flere forskellige målsegmenter samtidigt ved anvendelse af sæt af primere, som er forskellige med hensyn til deres genkendelsessegmenter (f.eks.
35 (3'-primer-undersegment)₁), men omfatter et alment variabelt undersegment. Det variable undersegment kan også indeholde en

polykoblesekvens, som hensigtsmæssigt indeholder en række restriktionssteder for at lette efterfølgende kloning. Endelig kan de variable undersegmenter anvendes til at inkorporere ind i RNA-produktet fra forstærkning, sekvenser som er nødvendige for at gøre det muligt for RNA-produktet at blive (autokatalytisk) replikeret ved hjælp af en RNA-specifik bakteriofag-RNA-polymerase, såsom Q β -replikasen, se Miele et al., supra, og BMV-sekvenser fra RNA-3-kromosomet hos plantevirusen, som fremmer syntesen af kappe-mRNA. Se Ahlquist et al., J. Mol. Biol. 172, 369 (1984); Ahlquist et al., Plant Mol. Biol. 3, 37 (1984); Ahlquist et al., J. Mol. Biol. 153, 23 (1981); Miller et al., Nature 313, 68 (1985); Miller et al., Virology 125, 236 (1983); og Ou et al., PNAS 79, 5235 (1982).

I tilfældet med Q β -replikasen, som er kendt inden for området, udføres dette fortrinsvis ved at indbefatte sekvensen 5'-CGCGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGGCGCGACCTTCGTGC-3' i (variabelt undersegment)₂ og sekvensen 5'-TGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3' i (variabelt undersegment)₁, og derefter (autokatalytisk) replikere det første RNA-produkt (dvs. RNA I i fig. 1; se også fig. 4), eller ved at indbefatte sekvensen 5'-CGCGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGGCGCGACCTTCGTGC-3' i (variabelt undersegment)₄ og sekvensen 5'-TGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3' i (variabelt undersegment)₃, og derefter (autokatalytisk) replikere det andet RNA-produkt (dvs. RNA II i fig. 1; se også fig. 4).

I tilfældet med ligeledes kendt BMV-replikase-anvendelse, udføres dette fortrinsvis ved at indbefatte den følgende sekvens for BMV i variabel sekvens 2 (baser 1-25) (ved den specifikke anvendelse i HIV-eksemplet nedenfor):

BMV-promotor

TCS = 87-29 (HIV-specifik)

5' - AAGATCTATGTCCTAATTCAGCGTA | ACAGCATATGTATGTTTCAGGGAAAGCTA - 3'
 (54 baser),

10 som en kernesekvens, yderligere AU-rigelig sekvens 5'- deraf kan anvendes til at fremme replikaseaktiviteten fra BMV. Dette oligo skal anvendes som den anden primer. Den første primer anvendt sammen med denne anden primer er en T7-baseret HIV-specifik primer.

T7-promotor

TCS = 87-34

15

TAATACGACTCACTATA | GGGGA | CACCTAGGGCTAACTATGTGTCCTAATAAGG
 (52 baser).

I de følgende eksempler er der anført yderligere ikke-begrænsende detaljer for at bidrage til forståelsen af opfindelsen:

25

EKSEMPEL I

10 ml blod fra en patient, som mistænkes for at være inficeret med en human immunodefekt virus-type 1 (HIV-1) fraktioneres med et Sepracell-apparat (Sepratech Corp., Oklahoma City, Oklahoma, U.S.A.), eller alternativt med en Ficoll-gradient for at isolere lymfocytter. Lymfocytterne lyseres derefter og nukleinsyre fra dem isoleres med et ekstraktionsapparat (Molecular Biosystems, Inc., San Diego, Californien, U.S.A.), eller alternativt lyseres lymfocytterne ved standardnatriumdodecylsulfat (SDS)-enzymbehandling, og nukleinsyren isoleres ved hjælp af kromatografi til omvendt fase over DEAE-cellulose. Dette udføres på følgende måde:

Bundfæld celler ved rotation: 5 k o/m i 4' fra 1 ml Tris-pufferet saltopløsning (TBS), pH-værdi 7,5.

Fjern supernatant.

5

Gensuspender pellet i:

	500 µl 0,3 M NaCl/20 mM Tris, pH-værdi 7,5	Bland godt,
	100 µl 2% SDS	før tilsæt-
10	200 µl 5 mg/ml proteinase K	ning til
	200 µl 0,25 M EDTA	pellet.

Hvirvl kraftigt og inkuber ved 50°C i 45', hvirvl i 10 til 15 sekunder hver 10'.

15

Fyld på drænet ekstraktionssøjle og lad den komme i.

Vask søjle 1x 4 ml 0,3 M NaCl/20 mM Tris, pH-værdi 7,5.

20

Eluer DNA/RNA med 4 ml 0,5 M NaCl/20 mM Tris, pH-værdi 7,5.

Sæt til eluatet: 5 µl glycogen

400 µl 3 M NaOAc

9,0 ml is-kold EtOH

25

blandt godt

Præcipiter ved -20°C natten over. Et tørt is/ethanolbad i en time kan anvendes.

30

Bundfæld ved rotation DNA/RNA i 15' ved 10.000 o/m i en svingende beholderrotor; hæld EtOH af og dræn tørt på en "kimwipes"-2'.

Lyofiliser i 10'.

35

Gensuspender pellet i 170 µl TE.

Inkuber ved 37°C i 5'.

Påfyld en 1 ml roteringssøjle på følgende måde:

5 Tilstop en 1 ml sprøjte med en lille mængde glasuld (autoklaveret).

Fyld sprøjte med TE (tris-EDTA) behandlet med diethylpyrocarbonat (DEPC).

Tilsæt hurtigt fin sephadex G-50 (i TE; autoklaveret).

10 Forsæt med at tilsætte, indtil den faste matriks strømmer over sprøjtens top.

Roter 30 sekunder ved 1000 o/m i en IEC-bordcentrifuge.

15 Vask med 100 µl TE, roter i 1' ved middelhastighed (ca. 1000 o/m). Kasser vaskevand.

Fyld ekstrakten på søjlen, Roter igen i 1'.

20 Skyl med 150 µl TE, roter ved 1000 o/m i 1'. Sammenhæld skyllevand og den første fraktion. Prøver kan opdeles til flere reaktioner på dette trin.

Tilsæt 1/10 volumen 8 M LiCl. Bland med 2,5 x vol. 100% EtOH. Hvirvl godt. ppt. tørre/EtOH i 30 minutter.

25

Bundfæld ved rotation i 15' ved højeste hastighed i en mikrofuge ved 4°C.

Tør pellet.

30

Efter isoleringen opløses total nukleinsyre fra prøven i 100 µl TE-puffer (10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA, pH-værdi 8). 10 µl af 100 µl af den totale nukleinsyre opløses til et slutvolumen på 100 µl indeholdende:

35

40 mM Tris.Cl, pH-værdi 8

25 mM NaCl

10 mM MgCl₂
 10 mM dithiothreitol (DTT)
 2 mM spermidin
 100 µg/ml bovint serumalbumin
 5 400 mM hver af dATP, dCTP, dGTP og TTP

30 nM af det 101 baseholdige enkeltstrengede DNA med
 sekvens 5'-GAACGCGGCT ACAATTAATA CATAACCTTA TGTATCATAC
 ACATACGATT TAGGTGACAC TATA GAATAC TTTCGTAACA CTAGGCAAAG
 GTGGCTTTAT C -3' primer A tilsættes. 30 nM af det 29 basehol-
 10 dige DNA med sekvens 5'-ACACCATATG TATGTTTCAG GGAAAGCTA-3',
 primer B tilsættes. Primer B, som er den anden primer, har
 basesequensen 5151-5179 i SOR-genet fra HIV-1. Et alternativt
 segment for den anden primer svarende til baser 5357-5387 i
 SOR-genet fra HIV-1 har sekvensen 5'-GCACACAAGT AGACCCTGAA
 15 CTAGCAGHACC A-3', og er, hvis anvendt, også til stede ved 30
 nM. Primer A er den første primer. Dens 64 5'nukleotider dan-
 ner plus-strengen af en promotor for den SP6 DNA-afhængige
 RNA-polymerase. Dens segment med sekvens 5'-GAATAC-3' er (al-
 ternativt undersegment)₁, som omfatter transkriptionsstart-
 20 stedet (5'-G) og andre baser, som tilsyneladende foretrækkes
 af SP6 RNA-polymerasen ved 5'-enden af sekvenser, som tran-
 skriberes af den. Til slut danner de 31 3'-terminale nukleoti-
 der (primer undersegment)₁ og har en sekvens, som er komple-
 mentær til sekvensen af baser 5577-5547 i SOR-genet fra et
 25 HIV-1-isolat. (Se Ratner et al., Nature 313, 277 (1985) for
 fuldstændig sekvens). (HIV-isolatet refereres der til i disse
 eksempler som "HIV-1").

Bemærk at alle oligonukleotider, som anvendes i disse eksemp-
 30 ler, fremstilles ved fast-fasesyntese på et automatiseret syn-
 teseapparat (Model nr. 380A) fra Applied Biosystems INC.
 (Foster City, Californien, U.S.A.) og oprenses kromatografisk
 i alt væsentligt til homogenitet ved hjælp af HPLC under an-
 vendelse af en C8-søjle med omvendt fase. Alternativt kunne
 35 andre kommercielt tilgængelige synteseapparater og standard-
 oprensningfremgangsmåder anvendes til at fremstille oligo-
 nukleotiderne.

100 µl af opløsningen opvarmes ved 65°C i 2 minutter og afkøles derefter til 42°C i løbet af 1 minut. Denne opvarmning og derefter henstand ved 42°C eller over i kombination med opløsningens sammensætning giver tilstrækkeligt strenge betingelser til tilvejebringelse af hybridisering af (3'-primer-undersegment)₁, med tilstrækkelig stabilitet til at primere DNA-syntese, med høj specificitet over for sekvensen, som er komplementær til sekvensen af (3'-primer-undersegment)₁.

10 Derefter tilsættes 10 enheder aviær myoblastosis-virus-omvendt-transkriptase (AMV) eller 500 enheder rekombineret murin Moloney-leukæmi-virus-omvendt-transkriptase (MMLV), som leveret fra Life Sciences, Inc., St. Petersburg, Florida, U.S.A., til opløsningen, og opløsningen inkuberes i 10 minutter ved 15 42°C (En enhed inkorporerer 1 nmol af TTP til syre-præcipiterbar form i løbet af 10 minutter ved 37°C under anvendelse af poly(A).oligo(T)₁₂₋₁₈ som skabelon-primer som defineret af Houts et al., J. Virol. 29, 517 (1979)). Efter de 10 minutters inkubering anbringes opløsningen i et kogende vandbad i 1 minut. Denne opvarmning forårsager strengadskillelse af det ved 20 hjælp af omvendt transkriptase dannede duplex.

Derefter afkøles opløsningen til 42°C i løbet af 1 minut. I løbet af denne afkøling hybridiserer den anden primer til det 25 3'-terminale segment af komplementen af målsegment dannet ved reaktionen katalyseret af den omvendte transkriptase. Igen er hybridiseringsbetingelserne tilstrækkeligt strenge til tilstrækkelig specifik hybridisering mellem den anden primer og sekvens komplementær til sekvensen af anden primer.

30 Efter afkølingen tilsættes 10 yderligere enheder AMV-omvendt-transkriptase eller 500 yderligere enheder klonet MMLV-omvendt-transkriptase, og der inkuberes yderligere i 10 minutter ved 42°C.

35 Derefter tilsættes ribonukleaseinhibitor med handelsnavnet RNasin fra Promega Biotec, Madison, Wisconsin, U.S.A. (even-

tuelt) i en koncentration på 1 enhed per ml. (1 enhed er den mængde inhibitor, som er nødvendig til at inhibere aktiviteten af 5 ng ribonuklease A med 50% A. Roth, Meth. Cancer Res. 3, 151 (1976)). Endvidere tilsættes hver af ribonukleosid-5'-triphosphaterne ATP, GTP, CTP og UTP til 400 mM. Til sidst tilsættes mellem 10 og 20 enheder DNA-afhængig SP6-RNA-polymerase, som leveres af Promega Biotech, og den opnåede opløsning inkuberes ved 42°C i 30 til 60 minutter. (1 enhed er den mængde af RNA-polymerasen, som er nødvendig til at katalysere inkorporering af 1 nmol ribonukleosidtriphosphat til syreopløseligt produkt i 60 minutter ved 37°C under standard reaktionsbetingelser (40 mM Tris.Cl, pH-værdi 7,9, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 mM spermidin, 0,5 mM af hver af ATP, GTP, CTP og UTP, 0,5 Ci af ³H-CTP, 1 g SP6-DNA og enzymet i et samlet volumen på 50 µl)).

Derefter tilsættes hver af de følgende oligonukleotider for at bringe dets koncentration til 30 nM:

20 tredje primer:

5'-GAACGCGGCT ACAATTAATA CATAACCTTA TGTATCATAC ACATACGATT
TAGGTGACAC TATA GAATAC ACTAATTCAT CTGTATTACT TTGACTGTTT TTC-3'

fjerde primer:

25 5'-TTTTTTGGTG TTATTAATGC TGCTAGTGCC-3'

I den tredje primer som i den første er de 5'-terminale 64 baser promotorsegmentet og de næste 6 baser er det variable segment. Det variable segment er de første seks baser transkriberet fra promotoren af SP6 RNA-polymerasen, og disse baser udvælges til at forøge niveauet af en sådan transkription. Endelig er (3'-primerundersegment)₃-delen af den tredje primer de 3'-terminale 33 baser, i den samme sekvens som baser 5388-5420 i det korte åbne læserammen (SOR) fra HIV-1. Den fjerde primer har den sekvens, som er komplementær til sekvensen af baser 5546-5517 i SOR-genet fra HIV-1.

Efter tilsætning af den tredje og fjerde primer inkuberes opløsningen ved 42°C i 1 minut. I løbet af dette tidsrum foregår hybridisering mellem (3'-primerundersegment)₃ fra tredje primer og det første RNA, som er dannet ved reaktionen, katalyseret af SP6-RNA-polymerasen. På grund af hybridiseringsbetingelsernes strengthed hybridiserer (3'-primerundersegment)₃, med en stabilitet, som er tilstrækkelig til priming af DNA-syntese, med høj specificitet til segmentet med komplementær sekvens i det første RNA.

5

Efter inkubering tilsættes 10 enheder AMV-omvendt-transkriptase eller 500 enheder klonet MMLV-omvendt-transkriptase, og opløsningen inkuberes i 10 minutter ved 42°C til dannelse af det tredje komplementære DNA.

10

Opløsningen suspenderes derefter i et kogende vandbad i 1 minut og afkøles til 42°C i løbet af 1 minut for først at gøre duplexen mellem tredje komplementære DNA og første RNA enkeltstrenget og dernæst for at muliggøre hybridisering mellem fjerde primer og tredje komplementære DNA. Som for de andre hybridiseringer er betingelserne tilstrækkelig strenge til hybridisering af fjerde primer, med stabilitet tilstrækkelig til at prime DNA-syntese, forekommer med høj specificitet til segmentet af tredje komplementære DNA med sekvens komplementær til sekvens af fjerde primer.

15

20

25

Derefter tilsættes igen 10 enheder AMV-omvendt-transkriptase eller 500 enheder klonet MMLV-omvendt-transkriptase og opløsningen inkuberes i 10 minutter ved 42°C.

30

Derefter tilsættes ribonukleaseinhibitor med navnet RNasin (eventuelt) til 1 enhed per ml efterfulgt af 10-20 enheder SP6-RNA-polymerase og derefter inkuberes opløsningen i 30 minutter i 1 time ved 42°C.

35

Det opnåede andet RNA kan derefter påvises ved hjælp af nukleinsyresondehybridiseringsteknik.

EKSEMPEL II

Den i eksempel I beskrevne fremgangsmåde følges med den nedenfor bemærkede modificering for tre prøver: (A) en prøve på 10 ml menneskeblod, som vides at være fri for HIV, (B) en prøve af 10 ml kultur, som vides at have ca. 10^3 HIV-1 inficerede celler per ml, og (C) en prøve på 10 ml blod fra en person, som mistænkes for at være inficeret med HIV-1. Modifikationen af fremgangsmåden er, at der indbefattes et α - ^{32}P -mærket ribonukleosid triphosphat, som et substrat ved reaktionen, som katalyseres af SP6 RNA-polymerase for at fremstille det andet RNA. Det andet RNA er som følge heraf ^{32}P -mærket.

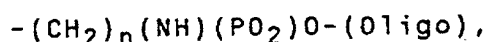
Makroporøse Sephacryl-S500®-perler derivatiseres med en carboxylgruppe-afsluttet kobler (med formlen $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2-$) og derefter med et 5'-(6-aminohexylphosphoramidat)-derivatiseret oligonukleotid med sekvensen 5'-TGGTCTGCTA GTTCAGGGTC TACTTGTGTG C-3', som er sekvensen, som er komplementær til sekvensen af baser 5357-5387 i SOR-genet fra HIV-1. (Sekvensen af baser 4901-4932 i SOR-genet forekommer i et hvilket som helst andet RNA, som er fremstillet under forstærkning af nukleinsyre fra en prøve). Fremstilling af perlerne foregik efter fremgangsmåderne beskrevet i ansøgerens US patentansøgning med serienr. 895.756, indleveret 11. august 1986, og inkorporeret heri ved henvisning. Kort beskrevet er bærermaterialerne porøst silikatglas eller makroporøst tværbundet dextran derivatiseret med en amino-afsluttet kobler, idet i alt væsentligt alle aminogruupperne, som ikke er kovalent forbundet gennem en phosphoramidatgruppe til det terminale nukleosid af indfangningssonden, er blokeret fra at reagere ikke-specifikt med nukleinsyre med en alifatisk acylgruppe; makroporøst tværbundet dextran aktiveret med cyanogenbromid, som reagerer med aminer til binding til aminoalkylphosphoramidatderivatiserede oligonukleotider og porøst silikatglas, makroporøst tværbundet dextran eller divinylbenzen-tværbundet polystyren derivatiseret med en carboxyl-afsluttet eller succinimidester-afsluttet kobler med en fraktion af car-

boxylgrupperne forbundet i en amidbinding til en aminogruppe i en diaminoalkan, hvor den anden aminogruppe er del af et phosphoramidat, som på sin side er bundet direkte til det terminale nukleotid i indfangningssonden. Foretrukne bærerematerialer er langkædede alkylamin-derivatiserede og carboxyl-derivatiserede kontrollerede poreglas, som sælges af Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, U.S.A. under produktnumrene henholdsvis 24875 og 23735 i form af perler med nominal porediameter på 500 Ångstrøm og partikeldiameter mellem ca. 125 og 177 mikron, og "Sephacryl"® S-500, som sælges af Pharmacia Inc., Piscataway, New Jersey, U.S.A., under kodenr. 17-0475-01 i form af perler med en våddiameter på ca. 40 til 105 mikron og et udelukkelsesvolumen for dextraner med molekylvægt over ca. 2×10^7 dalton, idet nævnte "Sephacryl" skal derivatiseres med cyanogenbromid eller med en amino-afsluttet eller carboxyl-afsluttet kobler. I et aspekt er den faste bærer en blanda:

(A) porøs silikatglas derivatiseret ved siliciumatomer med

20

(1) grupper med formlen

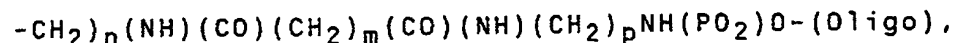
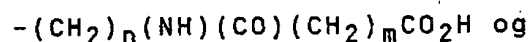


25

med i alt væsentligt intet siliciumatom derivatiseret med en gruppe afsluttet med en aminogruppe, hvor c er 0 til 5, n er 2 til 8, -O-(Oligo) er oligonukleotidsonden, og oxygenatomet bundet til (Oligo) er oligonukleotidsonden, og oxygenatomet bundet til (Oligo) er 5'-oxygenet af 5'-nukleosidet eller 3'-oxygenet af 3'-nukleosidet i sonden, eller

30

(2) grupper med formlen



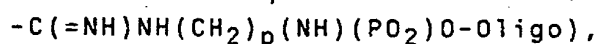
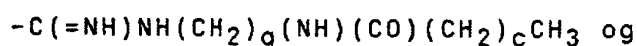
35

hvor m, n og p er ens eller forskellige, og hver er 2 til 8, eller

(B) et tværbundet makroporøst dextranmateriale, som er derivatiseret ved hydroxyloxygenatomer, som er på carbonatomer i sukkerdelene, som har i det mindste et nabocarbonatom med en ikke-derivatiseret hydroxylgruppe, med

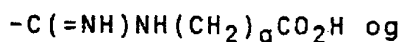
5

(1) grupper med formlen



10 med i alt væsentligt intet hydroxyloxygen derivatiseret med en gruppe afsluttet med en aminogruppe, eller

(2) grupper med formlen

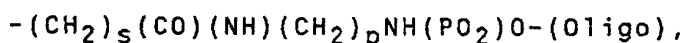
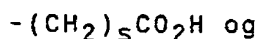


15 $-C(=NH)NH(CH_2)_q(CO)(NH)(CH_2)_pNH(PO_2)O-(Oligo),$

hvor c, q og p er ens eller forskellige, og q er 2 til 10, og

(C) divinylbenzen-tværbundet polystyren derivatiseret ved phenylgrupper med grupper med formlen

20



25 hvor s og p er ens eller forskellige, og s er 2 til 10. Se Ghosh et al., Nucleic Acids Research 15, 5353 (1987).

Hver af tre portioner på 50 mg "Sephacryl"-perler, som er derivatiseret som ovenfor beskrevet, iblødsættes i 15 minutter ved 37°C i 250 µl af en forhybridiseringsopløsning indeholdende 0,1% SDS, 10% dextransulfat, 1 mg/ml laksesperme-DNA og 5x SSPE (0,75 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH-værdi 7,4 og 5 mM EDTA). Efter iblødsætningen pelletteres perlematerialet ved centrifugering og forhybridiseringsopløsningen fjernes ved sugning.

35

Nukleinsyren fra forstærkningsproceduren på hver af de tre prøver isoleres ved ethanolpræcipitation og opløses derefter

til 250 µl i en opløsning, som er den samme som for-hybridiseringsopløsningen men mangler laksesperm-DNA. Hver af de opnåede nukleinsyreopløsninger forenes derefter med en portion forhybridiserede oligonukleotid-derivatiserede "Sephacryl"-perler, og den opnåede blanding inkuberes ved svag omrøring ved 42°C i 90 minutter.

"Sephacryl"-perlerne pelletteres derefter ved centrifugering, hybridiseringsopløsningen fjernes ved sugning, og perlerne vaskes derefter tre gange 10 minutter hver gang ved 37°C i 1 ml af en opløsning af 2x SSC (0,30 M NaCl, 0,03 M Na.citrat, pHværdi 7,0). Efter hver vask pelletteres perlerne ved centrifugering, og opløsningen fjernes ved sugning.

Øjeblikkelig efter den tredje vask underkastes perlerne Cerenkov-optælling.

Perlerne med forstærket nukleinsyre fra prøve A giver en lav optællingsmængde knapt over baggrundsoptællinger fra scintillationsvæske alene. Perlerne med forstærket nukleinsyre fra prøve B giver optællinger i et meget højere niveau end det, der blev iagttaget med perler forbundet med prøve A. Perlerne med forstærket nukleinsyre fra prøve C viser, hvis de giver et optællingsniveau signifikant over det niveau, som nås med perler forbundet med prøve A, at den person, hvis blod blev brugt i prøve C, er inficeret med HIV-1.

EKSEMPEL III

De i eksempel I og II beskrevne fremgangsmåder udføres med T7-RNA-polymerase (Promega Biotech) i stedet for SP6-RNA-polymerase med hver af undersegmentet 5'-(promotor)₁-(variabelt undersegment)₁-3' af første primer og undersegmentet 5'-(promotor)₃-(variabelt undersegment)₃-3' af tredje primer, som har sekvensen 5'-TAATACGACT CACTATA GGGA-3', hvor de 17 5'-terminale baser er promotorundersegmentet, og de fire 3'-baser er det variable undersegment. Det variable segment svarer til de

4 5'-terminale baser af transkriptet fra promotoren. Ribonukleaseinhibitor anvendes ikke i noget trin ved denne fremgangsmåde, i det mindste med polymerasepræparatet fra Promega Biotech.

5

EKSEMPEL IV

De i eksemplerne I og II beskrevne fremgangsmåder udføres med T3-RNA-polymerase (fra Stratagene, San Diego, Californien) i stedet for SP6-RNA-polymerasen og med det følgende segment anvendt som (promotor)₁-(variabelt undersegment)₁-undersegmentet af første primer og (promotor)₃-(variabelt undersegment)₃-undersegmentet af tredje primer: 5'-TATTAACCCT CACTAAA GGGA-3', hvor de 17 5'-terminale baser er promotorsegmentet, 15 og de 4 3'-terminale baser det variable segment, indbefattende de 5'-terminale 4 baser i transkripter fra promotoren.

EKSEMPEL V

20 Under anvendelse af T7-RNA-polymerasen som i eksempel III forstærkes målsegment i HIV-genomet fra menneskeblodprøver under anvendelse af de følgende primere i stedet for de i eksempel I anførte primere:

25 Første primer: 5'-TAATACGACT CACTATA GGGA TCTAATTACT ACCTCTTCTT CTGCTAGACT-3', hvor de 30 3'-terminale baser er komplementære i sekvens til baser 7076-7047 i ENV-genet fra HIV-1.

30 Anden primer: 5'-ACAAGTTGTA ACACCTCAGT CATTACACAG-3' med basesekvensen 6838-6866 i ENV-genet fra HIV-1.

Tredje primer: Samme 21 5'-terminale baser som første primer i dette eksempel forbundet til de følgende 27 3'-terminale baser: 5'-AAAGGTATCC TTTGAGCCAA TTCCCATA-3', som har basesekvensen 6875-6902 i ENV-genet fra HIV-1.

35

Fjerde primer: 5'-AGTTGATACTACTGGCCTAATT-3', med den sekvens, som er komplementær til basesekvensen 7033-7007 i ENV-genet fra HIV-1.

5

EKSEMPEL VI

Under anvendelse af T7-RNA-polymerasen som i eksempel III forstærkes målsegment i HIV-genomet fra menneskeblodprøver under anvendelse af de følgende primere i stedet for de i eksempel I anførte primere:

10

Første primer: Samme 21 5'-terminale nukleotider som den første og tredje primer fra eksempel V forbundet til de følgende 31 3'-terminale nukleotider: 5'-CACCTAGGGC TAACTATGTG TCCTAATAAG G-3', som har sekvensen, som er komplementær til basesekvensen 5471-5441 i SOR-genet fra HIV-1.

15

Anden primer: 5'-ACACCATATG TATGTTTCAG GGAAAGCTA-3', som har den samme sekvens som baser 5151-5179 i SOR-genet fra HIV-1.

20

Tredje primer: Samme 21 5'-terminale nukleotider som den første og tredje primer fra eksempel V forbundet til de følgende 31 3'-terminale nukleotider:

25

5'-AAGAATAAGTTCAGAAGTACACATCCCACT-3', som har den samme sekvens som baser 5220-5249 i SOR-genet fra HIV.

Fjerde primer: 5'-TGGTCTGCTAGTTCAGGGTCTACTTGTGTC-3', som har den sekvens, som er komplementær til basesekvensen 5387-5357 i SOR-genet fra HIV-1.

30

EKSEMPEL VII

Den i eksempel I beskrevne fremgangsmåde følges for isoleringen af nukleinsyre fra: 1) en prøve indeholdende 10^3 HIV-inficerede CEM-celler blandet med 10^6 ikke-inficerede CEM-celler (Cancer Center Research Foundation; CCRF-CEM; ATCC nr. CCL 119) og 2) en prøve indeholdende 10^6 ikke-inficerede CEM-cel-

35

ler. Disse prøver gensuspenderes i 100 μ l 10 mM Tris-HCl, pH-værdi 7,4, 1 mM EDTA (TE) efter ethanolpræcipitationstrinnet for at koncentrere prøven, som er opnået fra Extractor-søjlen (MBI). De gensuspenderede prøver fraktioneres på en Sephadex 5 G-50 fin roterings søjle (Maniatis supra), idet der blev elueret med TE. De eluerede prøver koncentreredes ved ethanolpræcipitation (i 0,8 M LiCl, 3 volumer ethanol, i tøris/ethanolbad i 15 minutter). Den præcipiterede prøve pelletteres ved centrifugering. Pelleten drænes, tørres og gensuspenderes derefter i 100 μ l indeholdende 40 mM Tris-HCl, pH-værdi 8,1, 8 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 2 mM spermidin, 5 mM dithiothreitol, 100 μ M af hver dATP, dGTP, dCTP og dTTP, 1 mM af hver rATP, rCTP, rGTP og rUTP, 100 μ g/ml BSA (nuklease-fri) og 250 nM af hver af DNA-oligonukleotidprimer A (5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGACACCTAGGGCTAACTATGTCCTAATAAGG-3') og primer (5'-ACACCATATGTATGTTTCAGGGGAAAGCTA-3').

Som kontrolprøver blev dobbeltprøver af oprenset HIV-RNA i en koncentration på 0,01 fm gensuspenderet i 100 μ l af den ovenfor beskrevne puffer. Til sidst blev en 10 fm β -globinsekvens indeholdt i plasmid H β 19A [Wallace et al., Nucl. Acids Res. 9, 3647 (1981)], som var blevet lineariseret ved hjælp af HindIII gensuspenderet i 100 μ l af den ovenfor beskrevne puffer, dog uden oligonukleotidprimerne. Oligonukleotidprimer D (5'-ACATTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCA-') og oligonukleotidprimer C (5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAAAGGACTCAAA-3'), som er specifikke for β -globinsekvens, blev sat til β -globinreaktionen ved 250 nm hver.

Bortset fra β -globinprøven opvarmes reaktionsblandingerne til 65°C i 1'. β -globinprøven koges i 1'. Alle prøver afkøles til 42°C i 1 minut. Derefter tilsættes 10 enheder AMV-omvendt-transkriptase. Reaktionsblandingerne inkuberes i 15 minutter ved 42°C, koges i 1 minut og afkøles derefter ved 42°C i 1 minut. 10 yderligere enheder AMV-omvendt-transkriptase tilsættes, idet der blev inkuberet ved 42°C i 15 minutter. 100 enheder T7-RNA-polymerase sættes til reaktionsblandingerne, og reaktionsblandingerne inkuberes ved 37°C i 30 minutter.

Prøverne koges i 1 minut og afkøles ved 42°C i 1 minut efterfulgt af tilsætningen af 10 enheder AMV-omvendt-transkriptase. Reaktionsblandingerne inkuberes ved 42°C i 15 minutter, koges i 1 minut og afkøles til 42°C i 1 minut. Yderligere 10 enheder omvendt-transkriptase tilsættes efterfulgt af inkubering ved 42°C i 15 minutter. Hundrede enheder T7-RNA-polymerase tilsættes med en 30 minutters inkubering ved 37°C. Denne cyklus gentages to yderligere gange.

10 Det forstærkede mål påvises derefter under anvendelse af OligoBeads som beskrevet nedenfor.

"Sephacryl"-perler indeholdende HIV-1-specifikke oligonukleotider blev fremstillet som beskrevet og lagret i TE ved 4°C ved en koncentration, således at 250 µl af suspensionen indeholder 50 mg "Sephacryl"-perler. Oligonukleotider blev syntetiseret, og HPLC oprenset som beskrevet.

De til både forbindelse til perlerne og påvisning anvendte oligonukleotider er homologe med SOR-regionen i HIV-1-genomet. De ved disse undersøgelser anvendte oligonukleotider var 86-31 (påvisningsoligonukleotid)

(5'-GCACACAAGTAGACCCTGAACTAGCAGACCA-3') og 87-83 (indfangningsoligonukleotid på perlen:

25 5'-ATGCTAGATTGGTAATAACAACATATT-3'), som er homologe med nonsens-strengen i SOR-regionen og adskilt af ca. 100 nukleotider. Til påvisning blev oligonukleotiderne slutmærket med ³²P efter en standardprotokol. Det ikke-inkorporerede mærke blev fjernet ved gelfiltrering på en fin Sephadex G-50-søjle, og oligonukleotidet blev lagret ved -20°C.

I et typisk perlebaseret sandwichhybridiseringsforsøg (BBSHS) denatureres målet og ³²P-mærket påvisningsoligonukleotid i 10 µl TE indeholdende 0,2% SDS ved 65°C i 5 minutter i et Eppendorf-rør. Til dette sættes 10 µl 2x opløsningshybridiseringsblanding (10x SSPE/10% dextransulfat). Opløsningen blandes, centrifugeres 2 sekunder og inkuberes ved 42°C i 1 time.

I løbet af dette tidsrum forhybridiseres "Sephacryl"-perlerne. Råsusensionen af perler blandes godt, og 250 µl portioner (50 mg perler) overføres til Eppendorf-rør med blanding mellem hver fjernelse for at sikre en ensartet suspension. Portionerne centrifugeres i 10 sekunder og TE fjernes ved hjælp af en udtrukket Pasteur-pipette. Efter at 250 µl hybridiseringsopløsning (5x SSPE [0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH-værdi 7,4, 1 mM EDTA] 10% dextransulfat/0,1% SDS) er tilsat, suspenderes perlerne ved forsigtig rystning og inkuberes ved 37°C i 30-60 minutter med lejlighedsvis blanding. Umiddelbart før indfangningstrinnet centrifugeres perlerne i 10 sekunder, forhybridiseringsopløsningen fjernes, 80 µl hybridiseringsopløsning ved 37°C tilsættes, og perlene bringes tilbage til 37°C.

15 Opløsningshybridiseringen centrifugeres i 2 sekunder og overføres til perlerne og hybridiseringsopløsning. Perlerne suspenderes og inkuberes ved 37°C i 1 time med hyppig blanding for at bevare suspensionen.

20 Efter indfangningen centrifugeres perlerne i 10 sekunder, og hybridiseringsopløsningen indeholdende ikke-indfangede mål og påvisningsoligonukleotid overføres til en scintillationstællerflaske. Perlerne vaskes derefter 5 gange med 2x SSC ved 37°C. De første tre vask er hurtige, 1 ml vaskevand tilsættes, 25 perlerne blandes godt og centrifugeres 10 sekunder, og vaskevandet overføres til en optællingsflaske. Til de 2 slutvask tilsættes 1 ml vaskevand, og perlerne blandes og inkuberes ved 37°C i 5 minutter før de centrifugeres. Hvert vaskevand optæles separat for at overvåge proceduren.

30 Cerenkov-optællinger af hybridiseringsopløsningen, 5 vaskevand, og perler måles i 5-10 minutter. Baggrundsoptællingen trækkes fra alle prøver. Det påviste fm-mål beregnes på følgende måde:

35

(CPM på perler/samlet CPM) X fm oligonukleotid

Hvor hvor samlet CPM er summen af CPM for hybridiseringsopløsningen, 5 vaskevand, og perler.

PAVISNING AF FORSTÆRKEDE MÅL VED BBSHS

5	MÅL	μl ANVENDT	(FM) PAVIST 10 ⁻¹⁵ MOL
	10 ³ HIV-inficerede celler	0,33	0,06
	10 ⁶ CEM ikke-inficerede celler	0,66	0,13
	10 ⁶ ikke-inficerede CEM-celler	0,07	0,01
10		0,14	0,015
		0,7	0,01
		10	0,008
	0,01 fm HIV-RNA	0,007	0,14
		0,014	0,29
15	10 fm β-globin DNA	10	0,014

EKSEMPEL VIII

Der følges den i eksempel I beskrevne fremgangsmåde til isolering af nukleinsyrer fra to prøver: a) 10³ HIV-inficerede CEM-celler med 10⁶ ikke-inficerede CEM-celler, og b) 10⁶ ikke-inficerede dyrkede CEM-celler, hvortil 0,01 fmol oprenset HIV er tilsat efter ekstraktion. Fremgangsmåden modificeres derefter ved yderligere oprensning gennem en Sephadex G-50 (fin) rotationssøjle (Maniatis supra), idet der elueres med TE efter Extractor-søjletrinnet. Dette efterfølges af en ethanolpræcipitation af nukleinsyren (i 0,8 M LiCl og 2,5 volumen EtOH). Nukleinsyren gensuspenderes derefter i 100 μl indeholdende:

- 30 40 mM Tris-HCl, pH-værdi 8,1
 8 mM MgCl₂
 25 mM NaCl
 2 mM spermidin
 5 mM DTT (dithiothreitol)
- 35 100 μM dATP, dTTP, dCTP, dGTP (hver)
 1 μM rATP, rCTP, rGTP, rUTP
 100 μg/ml' BSA nukleasefri

250 nM 29 bp DNA-oligonukleotid med sekvensen
5'ACACCATATGTATGTTTCAGGGAAAGCTA-3' (Primer B)

250 nM 56 bp DNA-oligonukleotid med sekvensen
5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGACACCTAGGGCTAACTATGTGTCCTAA
5 TAAGG-3') (Primer A)

100 µl af opløsningen opvarmes til 65°C i 1 minut og afkøles
til 42°C i løbet af 1 minut. Denne opvarmning og derefter op-
hold ved 42°C eller over i kombination med sammensætningen af
10 opløsningen giver tilstrækkelig strenge forbindelser for hy-
bridisering af (3'-primerundersegment)₁, (se fig. 1) med til-
strækkelig stabilitet til sekvensen, som er komplementær til
sekvensen af (3'-primerundersegment)₁ i mål-HIV-RNA med høj
specificitet.

15

Derefter tilsættes 10 enheder aviær myoblastosisvirus-omvendt-
transkriptase (AMV) (Life Sciences, Inc.) til opløsningen, og
opløsningen inkuberes i 10 minutter ved 42°C. [En enhed inkor-
porerer 1 nmol TTP i syrepræcipiterbar form i 10 minutter ved
20 37°C under anvendelse af poly(A)-oligo (T)₁₂₋₁₈ som skabelon-
primer, som defineret af Houts et al., J. Virol. 29, 517
(1979)]. Efter en 10 minutters inkubering anbringes opløsnin-
gen i et kogende vandbad i 1 minut. Denne opvarmning forårsag-
er strengadskillelse af duplexet, som er dannet ved hjælp af
25 omvendt-transkriptase og inaktivering af det omvendte-tran-
skriptase.

Derefter afkøles opløsningen til 42°C i løbet af 1 minut. I
løbet af denne afkøling hybridiserer den anden primer, primer
30 B, til den 3'-terminale ende (tredje undersegment)_{t2c}, se fig.
1, af målkomplementen af DNA-streng, som er dannet ved reak-
tionen katalyseret af den omvendte transkriptase i det fore-
gående trin. Igen er hybridiseringsbetingelserne tilstrækkelig
strenge til specifik hybridisering mellem den anden primer og
35 sekvensen, som er komplementær til sekvensen af den anden pri-
mer.

Efter afkøling tilsættes 10 yderligere enheder AMV-omvendt-transkriptase og yderligere inkubering udføres i 10 minutter ved 42°C.

5 100 enheder T7-polymerase sættes til reaktionsblandingen. Reaktionsblandingen inkuberes derefter ved 37°C i 30 minutter. Der syntetiseres et RNA-transkript, som er komplementært til det oprindelige mål-HIV-RNA startende fra T7-promotoren til stede ved 5'-enden af duplex-DNA-skabelonen, som lige er syntetiseret af den omvendte-transkriptase. Transkriptet har sekvensen 5'-GGGA, derefter fortsættes med sekvensen, som er komplementær til det andet undersegment af målsegmentet (dvs. andet undersegment)_{tcr}, se fig. 1). Da den omvendte-transkriptase ikke er blevet inaktiveret før dette trin, og da primer B er til stede såvel som deoxynukleotidtriphosphaterne, foregår der en sekundær syntese ved dette trin. Primer B hybridiserer til 3'-regionen af det nyligt syntetiserede RNA-transkript (tredje undersegment)_{t2cr}, se fig. 1, som er komplementær til B-primer. Den omvendte-transkriptase, som er blevet tilsat i det foregående trin, syntetiserer en DNA-streng under anvendelse af det nyligt syntetiserede RNA-transkript (fremstillet af T7-polymerase) som en skabelon og under anvendelse af oligonukleotid B som primeren ved 5'-enden.

25 Reaktionsblandingen koges derefter i 1 minut for at denaturere RNA:DNA-duplexen. Reaktionsblandingen afkøles derefter til 42°C i løbet af et minut. I løbet af dette afkølingstrin hybridiserer det målkomplementære segment af primer A til DNA-strengen, som er syntetiseret i løbet af det foregående trin. På samme tidspunkt hybridiserer primer B til dens komplementære sekvens på RNA-transkriptet, som er syntetiseret i det foregående trin.

35 Efter afkøling tilsættes 10 yderligere enheder AMV-omvendt-transkriptase, og der foretages yderligere inkubering i 10 minutter ved 42°C. Omvendt-transkriptase syntetiserer DNA komplementær til HIV-målet under anvendelse af oligonukleotid

5 A som en primer ved 5'-enden og DNA fremstillet i det tidligere trin som en skabelon. En anden DNA-streng syntetiseres under anvendelse af oligonukleotid B som en primer og det i det tidligere trin fremstillede RNA-transkript som en skabelon.

10 Reaktionsblandingen koges i 1 minut for at denaturere DNA-duplexen og RNA:DNA-duplexen. Reaktionsblandingen afkøles til 42°C i løbet af et minut. Primer A hybridiserer til cDNA, som er fremstillet under anvendelse af RNA-transkriptet som skabelon i det foregående trin (hvis 3'-enden af skabelon-strengen også anvendes som en omvendt-transkriptaseprimer fremstilles et produkt identisk med slutproduktet fra den næste reaktion).
15 Primer B hybridiserer til DNA-strengen, som er komplementær til mål-HIV-RNA. Denne anden syntese frembringer et produkt, som er en duplex-DNA indeholdende en T7-promotorsekvens ved dens 5'-ende såvel som et 4 bp "variabelt" segment 5'-GGGA-3'.

20 100 enheder T7-polymerase sættes til reaktionsblandingen. Reaktionsblandingen inkuberes i 30 minutter til 37°C. T7-RNA-polymerasen anvender den dobbeltstrengede duplex-DNA indeholdende en duplex-T7-promotor som en skabelon til at transkribere RNA, som er komplementær til det andet målundersegment indeholdende den yderligere sekvens 5'-GGGA-3' ved dens
25 5'-ende.

30 Denne cyklus (koge 1', 1' ved 42°C, omvendt-transkriptase 10' ved 42°C, omvendt transkriptase 10' ved 42°C, T7-polymerase 37°C 30') kan gentages så mange gange, som det er nødvendigt for at opnå den ønskede forstærkning af målsekvens. Det opnåede produkt kan derefter påvises ved hjælp af nukleinsyre-sondehybridiseringsteknik.

EKSEMPEL IX

35

Oprensset HIV-RNA i en koncentration på 1 fmol blev gensuspenderet i:

- 40 mM Tris-HCl, pH-værdi 8,1
8 mM MgCl₂
25 mM NaCl
2 mM spermidin
5 5 mM dithiothreitol
100 µM dATP, dTTP, dCTP, dGTP (hver)
1 µM hver rATP, rCTP, rGTP, rUTP
100 µg/ml BSA nukleasefri
250 nM 29 bp DNA-oligonukleotid med sekvensen
10 5'-ACACCATATGTATGTTTCAGGGAAAGCTA-3' (Primer B)
250 nM 56 bp DNA-oligonukleotid med sekvensen
5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGACACCTAGGGCTAACTATGTGTCCTAA
TAAGG-3') (Primer A)

15 De 100 µl opløsning opvarmes til 65°C i 1 minut og afkøles til
42°C i løbet af 1 minut. Dette opvarmningstrin og afkølings-
trin i kombination med sammensætningen af opløsningen giver
tilstrækkelig strenge betingelser for hybridiseringen af pri-
mer A med tilstrækkelig stabilitet til sekvensen komplementær
20 til sekvensen af primer A-regionen i mål-HIV-RNA [(første
undersegment)_{t2} i fig. 1] med høj specificitet.

Derefter tilsættes 10 enheder aviær myoblastosisvirus-omvendt-
transkriptase (AMV) (Life Science, Inc.) til opløsningen, og
25 opløsningen inkuberes i 10 minutter ved 42°C. Efter en 10 mi-
nutters inkubering anbringes opløsningen i et kogende vandbad
i 1 minut. Denne opvarmning forårsager strengadskillelse af
duplexen dannet af omvendt-transkriptase og inaktivering af
omvendt-transkriptase.

30 Opløsningen afkøles til 42°C i løbet af 1 minut. I løbet af
denne afkøling hybridiserer den anden primer B til 3'-enden af
den nyligt syntetiserede mål-komplementære streng [eller
(tredje undersegment)_{t2c} i fig. 1]. Igen er hybridiserings-
35 betingelserne tilstrækkelig strenge til specifik hybridisering
mellem den anden primer og sekvensen, som er komplementær til
sekvensen af den anden primer.

Efter afkøling tilsættes 10 yderligere enheder AMV-omvendt-transkriptase, og der foretages yderligere inkubering i 10 minutter ved 42°C.

5 100 enheder T7-RNA-polymerase (New England Biolabs) sættes til reaktionsblandingen. Reaktionsblandingen inkuberes derefter ved 37°C i 30 minutter. Der syntetiseres et RNA-transkript, som er komplementær til det oprindelige mål-HIV-RNA startende fra T7-promotoren, som er til stede ved 5'-enden af duplex-DNA-skabelonen, som er syntetiseret af omvendt-transkriptase.
10 RNA-transkriptet har sekvensen 5'-GGGA, derefter fortsættes med sekvensen, som er komplementær til det andet undersegment af målsekvensen (dvs. andet undersegment_{t_{CR}}, fig. 1). Da den omvendte transkriptase ikke er blevet inaktiveret før dette
15 trin, og da primer B er til stede såvel som deoxynukleotid-triphosphaterne, foregår en anden syntese på dette trin. Primer B hybridiserer til 3'-regionen af det nyligt syntetiserede RNA-transkript [(tredje undersegment)_{t_{2CR}}, se fig. 1], som er komplementær til primer B. Den omvendte transkriptase (som var
20 blevet tilsat i det forudgående trin) syntetiserer en DNA-streng under anvendelse af det nye syntetiserede RNA-transkript (fremstillet af T7-RNA-polymerasen) som en skabelon og oligonukleotid B som en primer ved 5'-enden.

25 Reaktionsblandingen koges derefter i 1 minut for at denaturere RNA:DNA-duplexen. Reaktionsblandingen afkøles derefter til 42°C i løbet af et minut. I løbet af dette afkølingstrin hybridiserer det mål-komplementære segment af primer A til DNA-strengen, som er syntetiseret i det forudgående trin. På det
30 samme tidspunkt hybridiserer primer B til dens komplementære sekvens på RNA-transkriptet, som er syntetiseret i det forudgående trin.

Efter afkøling tilsættes 10 enheder AMV-omvendt-transkriptase,
35 og der inkuberes yderligere i 10 minutter ved 42°C. Omvendt-transkriptase syntetiserer DNA komplementær til HIV-målet under anvendelse af oligonukleotid A som en primer ved 5'-enden

og DNA fremstillet i det forudgående trin som en skabelon. 3'-enden af skabelonstrengen anvendes som en primer til fremstilling af et slut-duplex-DNA med et dobbeltstrenget T7-promotorsted ved dets 5'-ende. En anden DNA-streng syntetiseres under anvendelse af oligonukleotid B som en primer, og RNA-transkriptet, som er fremstillet i det foregående trin som en skabelon.

100 enheder T7-polymerase sættes til reaktionsblandingen. Reaktionsblandingen inkuberes i 30 minutter ved 37°C. T7-RNA-polymerasen syntetiserer et RNA-transkript under anvendelse af duplex-DNA indeholdende polymerasebindingsstedet (T7-promotor) ved dets 5'-ende som en skabelon. RNA-transkriptet er komplementær til mål-andet undersegment, se fig. 1, indeholdende den yderligere sekvens 5'-GGGA-3' ved dens 5'-ende. Der kan foretages yderligere cykler til forøgelse af forstærkningen. De opnåede produkter kan påvises ved hjælp af en nukleinsyrehybridiseringsprotokol.

20

EKSEMPEL X

Protokol for sidste-rundemærkning af et TAS-forstærket produkt.

25

A. Søjle til fjernelse af ikke-inkorporerede kolde nukleotider

30

1. TAS-reaktionsblandingen (100 μ l) tages efter cDNA-syntesen i slutcyklusen af TAS. Tilsæt 400 μ l reagens A (0,1 M Tris-HCl, pH-værdi 7,7, 10 mM triethylamin, 1 mM dinatrium-EDTA) til reaktionsblandingen.

35

2. Ækvilibrer en NENSORB₂₀ (Dupont)-forpakket søjle ved befugtning af søjlematerialet i 100% methanol (HPLC-kvalitet), derefter ækvilibrering med 2 ml reagens A.

35

3. Påfyld prøve på søjle.

4. Vask søjlen 3 gange med 1 ml reagens A.
5. Vask søjlen 3 gange med 1 ml vand.
- 5 6. Eluer nukleinsyrerne med 50% methanol, opsamlende 250-300 μ l fraktioner i op til 1 ml samlet volumen. (De første to fraktioner vil indeholde størstedelen af nukleinsyren).
7. Tør fraktionerne i "speed-vac" eller lyofiliseringsapparat.
- 10 B. Protokol til mærkning af det forstærkede produkt.
 1. Gensuspender fraktionerne fra NENSORB₂₀-søjlen (de første to fraktioner kan forenes) i 40 mM Tris-HCl, pH-værdi 8,1,
15 8 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 2 mM spermidin-(HCl)₃, 5 mM dithiothreitol, 400 μ M af hver rATP, rCTP og rGTP, 12 μ M rUTP og 25 μ Ci α -³²P-rUTP (800 Ci/mmol).
 2. Tilsæt 50 enheder T7-RNA-polymerase (New England Biolabs)
20 for hver 50 μ l prøve. Inkuber ved 37°C i 30 minutter.
 3. Det ikke-inkorporerede mærke kan fjernes ved hjælp af en G-50-roteringsøjle (Maniatis supra).
 - 25 4. Den mærkede prøve kan køres på en sekvensbestemmelsespolyacrylamidgel for at fastlægge størrelsen af det forstærkede produkt. Det mærkede produkt kan også påvises under anvendelse af Oligo-Beads®.

30

EKSEMPEL XI

Anvendelse af en indre standard under TAS-forstærkning

Der blev fremstillet prøver med: 1) 0,1 fm HIV-RNA- og 0,1 fm β -globin-DNA-sekvenser (H β 19A kløvet med PstI), 2) 0,01 fm HIV-RNA og 0,1 fm β -globin-DNA (H β 19A kløvet med PstI), 3) 0,1 fm HIV-RNA, eller 4) 0,1 fm β -globin-DNA (H β 19A kløvet med PstI i 100 μ l indeholdende 40 mM Tris-HCl, pH-værdi 8,1, 8 mM

35

MgCl₂, 25 mM NaCl, 2 mM spermidin-(HCl)₃, 5 mM dithiothreitol, 100 µl af hver dATP, dTTP, dCTP og dGTP, 1 mM af hver rATP, rUTP, rCTP og rGTP, 100 µg/ml BSA (nuklease-fri) og 250 nM primer A

5 (5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGACACCTAGGGCTAACTATGTGTCCTAATAAGG-3'), 250 nM primer B (5'-ACACCATATGTATGTTTCAGGGAAAGCTA-3'), 250 nM primer C (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAACTAAAGGCACCGAGCACTTTCTTGCC-3'), og 250 nM primer D (5'-ACATTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCA-3'). En prøve med 1/20 udgangsnukleinsyrer blev anbragt i denatureringsopløsningen 7,4% formaldehyd, 10x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat, pH-værdi 7,4) for multidspunktprøverne.

15 Prøverne blev kogt i 1 minut og afkølet ved 42°C i 1 minut efterfulgt af tilsætningen af 10 enheder AMV-omvendt-transkriptase. Reaktionsblandingerne inkuberes ved 42°C i 15 minutter, koges i 1 minut og afkøles ved 42°C i 1 minut. Yderligere 10 enheder AMV-omvendt-transkriptase tilsættes efterfulgt af inkubering ved 42°C i 15 minutter. 100 enheder T7-RNA-polymerase 20 tilsættes efterfulgt af inkubering ved 37°C i 30 minutter. Denne cyklus gentages endnu engang. (Der kan udføres flere cykler afhængig af den nødvendige forstærkning). To prøver indeholdende 1/20 af udgangsmålnukleinsyrer blev anbragt i denatureringsopløsning for den anden transkriptions-tidspunktprøver. 25

Alle prøver blev opvarmet til 55°C i 30 minutter før filtrering på to nitrocellulosemembraner. Nukleinsyrerne blev fikseret til membranen ved bestråling med 254 nm UV-lys i 4 minutter. Som kontrolprøver blev 1, 0,1 og 0,01 fm plasmid pARV7/2 [Luciw et al., Nature 312, 760 (1984)], som indeholder hele HIV-genom-cDNA'et såvel som plasmid Hβ19A [Wallace et al., Nucl. Acids Res. 9, 3647 (1981)], denatureret i 0,2 N NaOH, neutraliseret med et lige så stort volumen 2 M ammoniumacetat og derefter filtreret på nitrocellulosemembranen. En membran blev hybridiseret med ³²P-mærket oligonukleotid 86-31¹, som er 35 specifik for det forstærkede produkt af HIV. Den anden membran

blev hybridiseret til ^{32}P -mærket oligonukleotid 87-459², som vil hybridisere til det forstærkede β -globinprodukt såvel som til mål- β -globinplasmidet.

5 Hybridiseringerne blev foretaget i 1% SDS, 0,9 M NaCl, 50 nM NaH_2PO_4 (pH-værdi 7,4), 5 mM EDTA (pH-værdi 7,4) og 10^6 cpm/m. ^{32}P -mærket oligonukleotid i 1 time ved 55°C . Membranerne blev vasket 3 gange i 1% SDS, 0,18 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 (pH-værdi 7,4) og 1 mM EDTA ved stuetemperatur efterfulgt af 1 vask i
10 den samme puffer ved 55°C .

Membranerne blev derefter autoradiograferet i 16 timer på Kodak XAR-film ved -70°C med en forstærkningskærm.

15 Bemærkninger

1. 86-31: 5'-GCACACAAGTAGACCCTGAACTAGCAGACCA-3'
2. 87-459: 5'-AGGTTTAAGGAGACCAATAGAACT-3'

20 Autoradiografiet i fig. 3 viser mængden af HIV- og β -globin-sekvenser påvist efter to TAS-cykler udført samtidig på HIV og β -globinnukleinsyre. Udgangsmængden af β -globin blev holdt konstant, mens mængden af HIV-mål blev varieret.

25 Selvom opfindelsen er blevet beskrevet med nogen specificitet i den foreliggende beskrivelse, vil fagmanden inden for det foreliggende område kunne se variationer og modifikationer af opfindelsen som beskrevet, som er inden for den foreliggende opfindelses omfang. Sådanne variationer og modifikationer er også inden for den foreliggende opfindelse som beskrevet og
30 gjort til genstand for krav heri.

Opfindelsen har yderligere træk:

35 I. Fremgangsmåden beskrevet i følgende krav 21 er karakteriseret ved at (1) den DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er T7-RNA-polymerase, (promotor)₁ er 5'-TAATACGACTCACTATA-3' og (variabelt undersegment)₁ har et dinukleotid med sekvensen

5'-GG-3' ved dets 5'-ende, eller (2) den DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er T3-RNA-polymerase, (promotor)₁ er 5'-TATTAACCCTCACTAAA-3' og (variabelt undersegment)₁ har et tetranukleotid med sekvensen 5'-GGGA-3' ved dets 5'-ende, eller (3) den DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er SP6-RNA-polymerase, (promotor)₁ er

5'-GAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACACTATA-3', og (variabelt undersegment)₁ har et hexanukleotid med sekvensen 5'-GAATAC-3' ved dets 5'-ende.

10

II. Fremgangsmåden ifølge I er karakteriseret ved at 5'-enden af den første primer er 5'-nukleotidet af (promotor)₁.

III. Fremgangsmåden ifølge II er karakteriseret ved, at hvis den DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er T7- eller T3-RNA-polymerasen, har (variabelt undersegment)₁ sekvensen 5'-GGGATGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3' og, hvis den DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er SP6-RNA-polymerasen, har (variabelt undersegment)₁ sekvensen

20

5'-GAATACTGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3'.

IV. Fremgangsmåden ifølge krav 32, 33, 34, 35, 36 eller 37 er karakteriseret ved, at (A) (i) hvis den første DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er T7- eller T3-RNA-polymerase, har (variabelt undersegment)₁ sekvensen

25

5'-GGGATGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3', og anden primer (variabelt undersegment)₂ har sekvensen

5'-CGCGCTCTCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGCGCGACCTTCGTGC-3'; eller (ii) hvis den første DNA-afhængige bakteriofag-DNA-RNA-polymerase er SP6-RNA-polymerase, har (variabelt undersegment)₁ sekvensen

30

5'-GAATACTGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3' og anden primer (variabelt undersegment)₂ har sekvensen

5'-CGCGCTCTCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGCGCGACCTTCGTGC-3',

(B) (i) hvis den anden DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er T7- eller T3-RNA-polymerase, har (variabelt undersegment)₃ sekvensen

35

5'-GGGATGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3'; (ii) hvis den

anden DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er SP6-RNA-polymerase, har (variabelt undersegment)₃ sekvensen

5'-GAATACGGGATGGGGAACCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3', og den fjerde primer har som 5'-enden 40 nukleotider

5'-CGCGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGCGCGACCTTCGTGC-3'; og (C) efter trin (12) replikeres det andet RNA autokatalytisk med Q β -replikase.

V. Fremgangsmåden ifølge krav 41 er karakteriseret ved, at 5'-enden af den første primer er 5'-nukleotidet af (promotor)₁, at hvis den DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er

T7-RNA-polymerase, har undersegmentet (promotor)₁-(variabelt undersegment)₁ af den første primer sekvensen 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACGCGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGCGCGACCTTCGTGC-3'; at

hvis den DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er T3-RNA-polymerase, har undersegmentet (promotor)₁-(variabelt undersegment)₁ af den første primer sekvensen 5'-TATTAACCCTCACTAAAGGGACGCGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGCGCGACCTTCGTGC-3'; at

hvis den DNA-afhængige bakteriofag-RNA-polymerase er SP6RNA-polymerase, har undersegmentet (promotor)₁-(variabelt undersegment)₁ af den første primer sekvensen 5'-GAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACACTATAGAATACCGCGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGCGCGACCTTCGTGC-3'; at (variabelt undersegment)₂ har sekvensen

5'-TGGGGAACCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3'; og at, efter trin (6), replikeres det første RNA autokatalytisk med Q β -replikase.

30

35

PATENTKRAV

-
1. Fremgangsmåde til amplifikation af en målnukleinsyresekvens i en prøve in-
5 deholdende nukleinsyre, omfattende:
- 1) hybridisering af en første enkeltstrenget DNA-primer med nævnte målnukleinsy-
resekvens, hvor nævnte primer omfatter en promotorsekvens, som med en se-
kvens af 0 til 100 nukleotider er bundet til en sekvens af nukleotider, der er kom-
10 plementære med 3'-enden af nævnte målsekvens, idet nævnte komplementære se-
kvens i det mindste har en længde på 10 nukleotider,
 - 2) forlængelse af nævnte første primer, som er hybridiseret i overensstemmelse med
trin (1), ved en reaktion, der er katalyseret med en DNA-polymerase, til dannelse
15 af en første komplementær DNA-sekvens,
 - 3) adskillelse af duplexen dannet i trin (2) i enkeltstreng,
 - 4) hybridisering af en anden enkeltstrenget DNA-primer, som har en sekvens med i
20 det mindste 10 nukleotider svarende til 5'-enden af nævnte målsekvens og even-
tuelt en yderligere DNA-sekvens af op til 100 nukleotider, med nævnte første
komplementære DNA-sekvens,
 - 5) forlængelse af nævnte anden primer, der er hybridiseret i overensstemmelse med
25 trin (4), ved en reaktion, som er katalyseret med en DNA-polymerase, til dannelse
af en anden komplementær DNA-sekvens og
 - 6) anvendelse af det dobbeltstrengede DNA-produkt fra trin (5) til fremstilling af en
mængde RNA-transkripter, der er komplementære med nævnte målsekvens, ved
30 en reaktion, som er katalyseret med en DNA-afhængig RNA-polymerase med
specificitet for promotoren, som er indbefattet i nævnte første primer.

2. Fremgangsmåde til amplificering af en målnukleinsyresekvens ifølge krav 1, hvor nævnte målsekvens yderligere amplificeres ved
- (7) hybridisering af en tredje enkeltstrengt DNA-primer med RNA-transkripterne fremstillet i trin (6), hvor nævnte primer omfatter en promotorsekvens, der med en sekvens af 0 til 100 nukleotider er bundet til en sekvens af nukleotider, som er komplementære med 3'-enden af nævnte målsekvens, idet nævnte komplementære sekvens i det mindste har en længde på 10 nukleotider og eventuelt ikke eller ikke væsentligt overlapper med sekvensen af i det mindste 10 nukleotider, som svarer til 5'-enden af nævnte målsekvens i nævnte anden primer, idet nævnte promotorsekvens er den samme som eller forskellig fra promotorsekvensen i nævnte første DNA-primer;
- (8) forlængelse af nævnte tredje primer ved en reaktion katalyseret med en DNA-polymerase til dannelse af en tredje komplementær DNA-sekvens;
- (9) adskillelse af nukleinsyreduplexen dannet i trin (8) i enkeltstrengte;
- (10) hybridisering af en fjerde enkeltstrengt DNA-primer med nævnte tredje komplementære DNA-sekvens, hvilken primer har en sekvens med i det mindste 10 nukleotider svarende til 5'-enden af RNA-transkripterne fremstillet i trin (6) og eventuelt en yderligere DNA-sekvens med op til 100 nukleotider, idet nævnte tilsvarende sekvens eventuelt ikke eller ikke væsentligt overlapper med sekvensen med i det mindste 10 nukleotider, der er komplementære med 3'-enden af nævnte målsekvens i nævnte første primer;
- (11) forlængelse af nævnte fjerde primer ved en reaktion katalyseret med en DNA-polymerase til dannelse af et fjerde komplementært DNA og
- (12) anvendelse af det dobbeltstrengede DNA-produkt fra trin (5) til fremstilling af en mængde transkripter svarende til nævnte målsekvens ved en reaktion kataly-

lyseret med en DNA-afhængig RNA-polymerase med specificitet for promotoren, der er indbefattet i nævnte tredje primer.

3. Fremgangsmåde, der er nyttig til påvisning af i det mindste én specifik nukleinsyresekvens i en prøve indeholdende nukleinsyre, omfattende fremstilling, ifølge krav 1 eller 2, af RNA-transkripter, der indeholder en sekvens, som er komplementær med eller svarer til nævnte målsekvens, og påvisning af tilstedeværelsen af nævnte RNA-sekvens.
- 10 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, hvor nævnte transkripter indeholder et replikasegenkendelsessted for replikation af nævnte transkripter ved replikaseinduktion.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 3 eller krav 4, hvor den påviste RNA-sekvens af nævnte RNA-transkripter måles på en standardiseret måde for at måle mængden af 15 målsekvens indeholdt i en prøve af nukleinsyre, som anvendes til fremstilling af det dobbeltstrengede nukleinsyretemplat.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, hvor den påviste RNA-sekvens i nævnte RNA-transkripter måles på en måde, der er internt standardiseret med tilstedeværelsen af et 20 kendt kopiantal af nukleinsyre, der ligeledes indgår i nævnte prøve.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 3, hvor nævnte nukleinsyresekvens er et segment af et humant immundefektvirus.
- 25 8. Fremgangsmåde ifølge krav 1-4, hvor promotoren svarende til promotorsekvensen i den første primer, er en bakteriofag-T7-promotor, og RNA-transkripterne frembringes under anvendelse af T7-RNA-polymerase.
9. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, hvor promotoren 30 svarende til promotorsekvensen i den første primer er en bakteriofag-SP6-promotor, og RNA-transkripterne frembringes under anvendelse af SP6-RNA-polymerase.

10. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, hvor målsekvensen er en DNA-sekvens, og polymeraseforlængelsesreaktionen katalyseres med E. coli DNA-polymerase I.
- 5 11. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, hvor målsekvensen er en DNA-sekvens, og polymeraseforlængelsesreaktionen katalyseres med Klenow-fragmentet af E. coli DNA-polymerase I.
12. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, hvor målsekvensen
10 er en DNA-sekvens, og polymeraseforlængelsesreaktionen katalyseres med T4-DNA-polymerase.
13. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, hvor alle polymeraseforlængelsesreaktionerne katalyseres med en revers transkriptase.
15
14. Fremgangsmåde ifølge krav 3, hvor nævnte RNA-transkripter er mærket før påvisning.
15. Fremgangsmåde ifølge krav 14, hvor nævnte RNA-transkripter er radiomærket.
20
16. Fremgangsmåde ifølge krav 14, hvor nævnte RNA-transkripter er chromofor-mærket.
- 25 17. Fremgangsmåde ifølge krav 13, hvor den reverse transkriptase er valgt fra gruppen bestående af AMV-revers transkriptase og MMLV-revers transkriptase.
18. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-17, hvor strengene adskilles ved termisk denaturering.

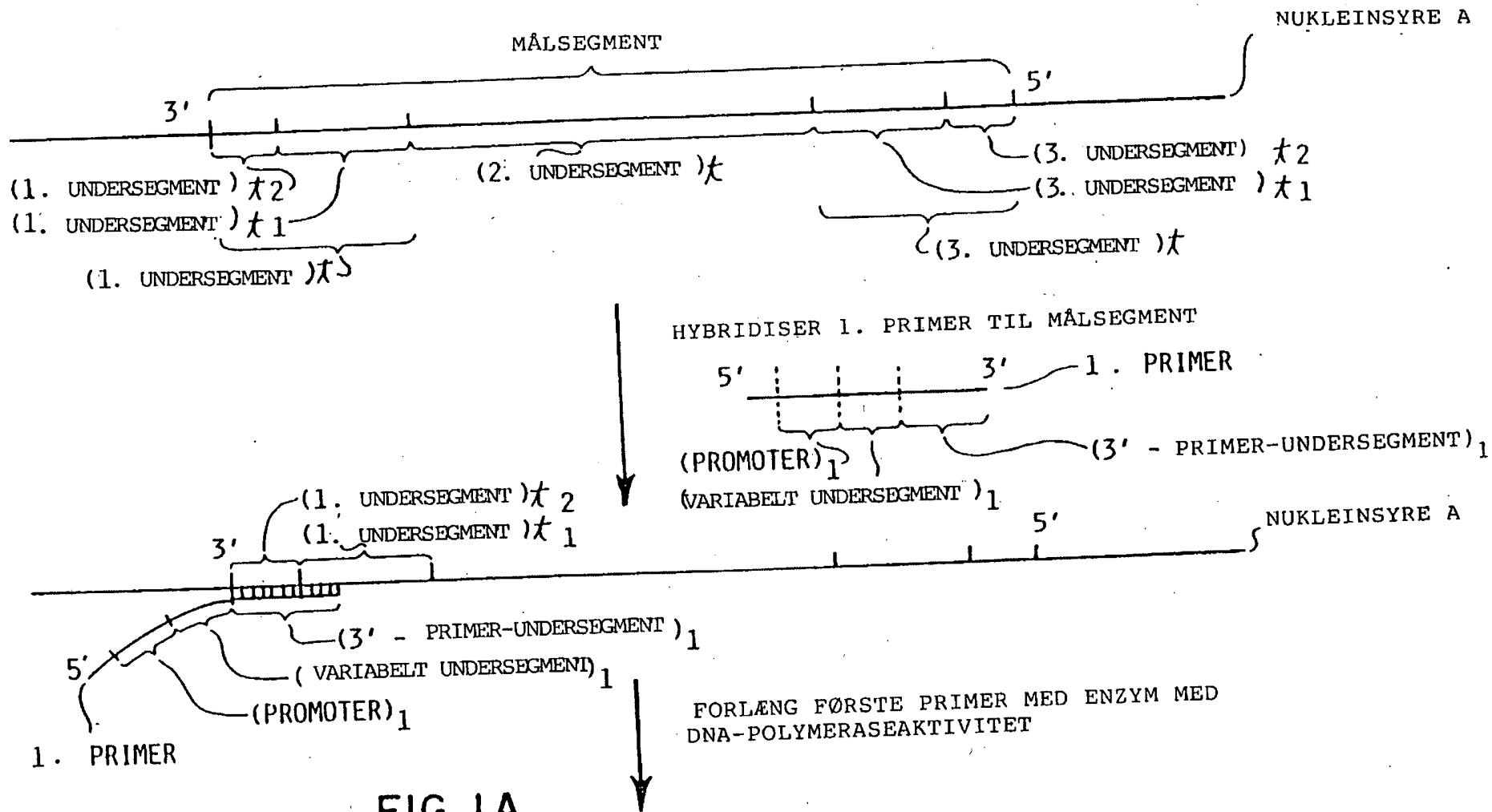


FIG. 1A

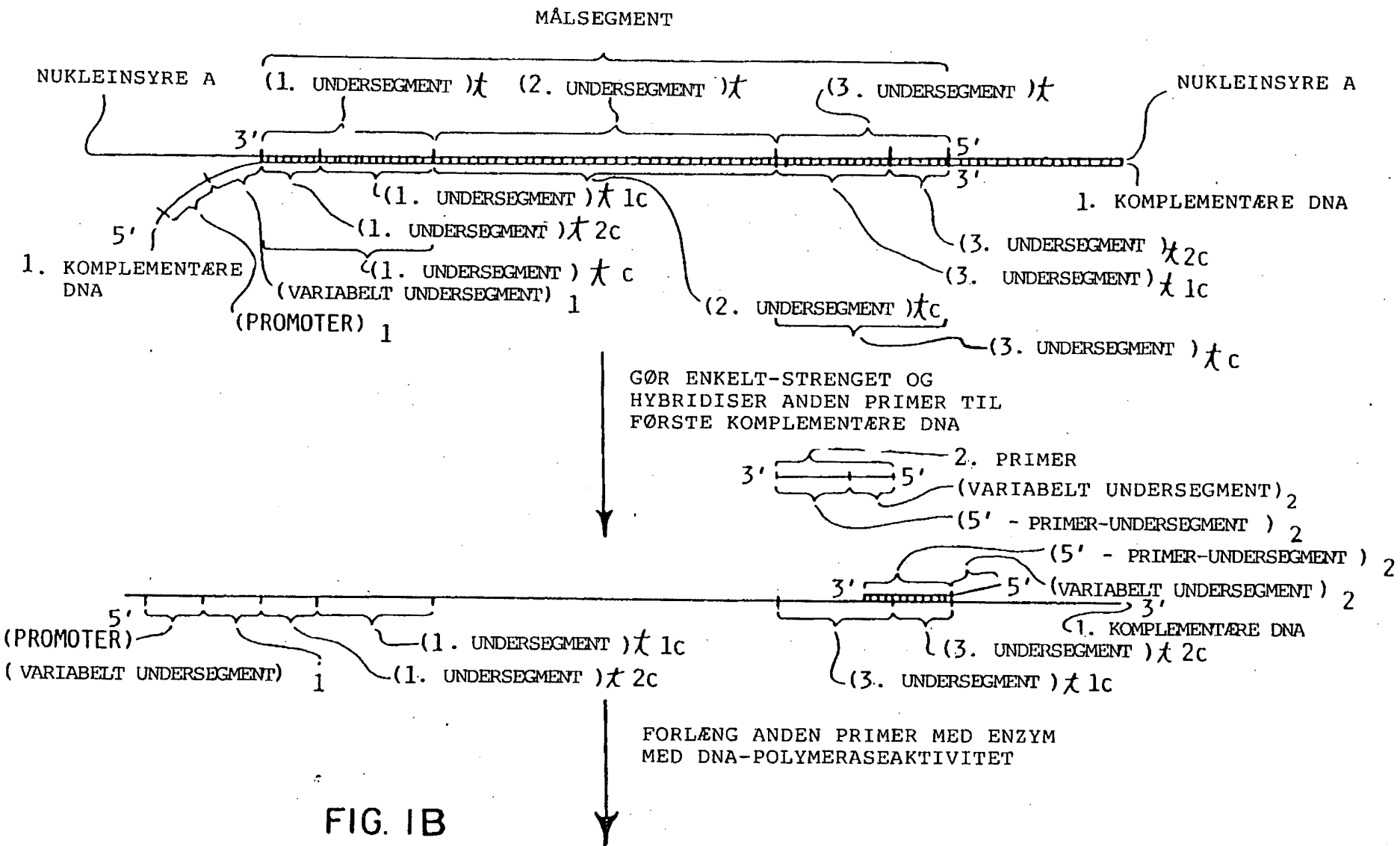
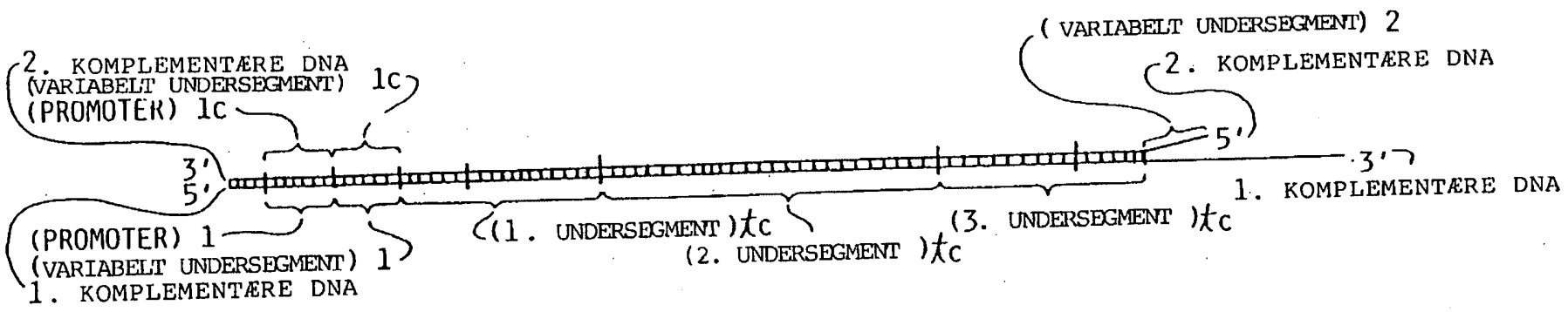


FIG. 1B



TRANSKRIBER MED DNA-AFHÆNGIG BAKTERIOFAG-
 RNA-POLYMERASE, SOM GENKENDER (PROMOTØR) 1

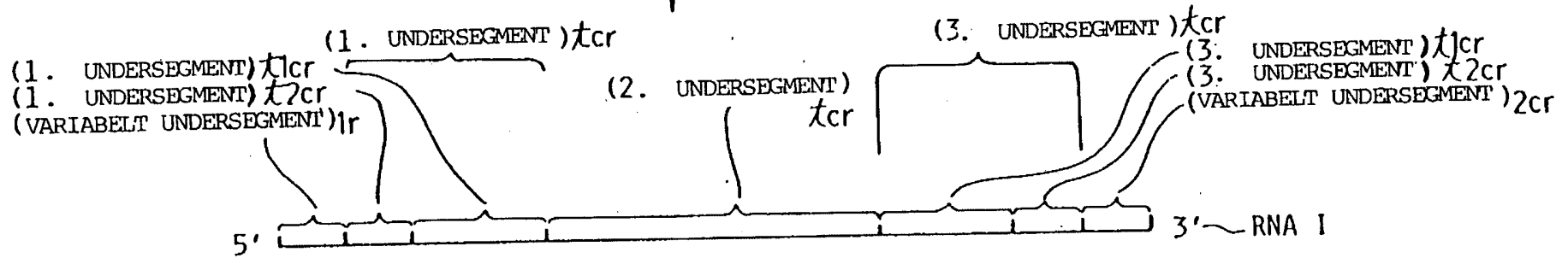


FIG. 1C

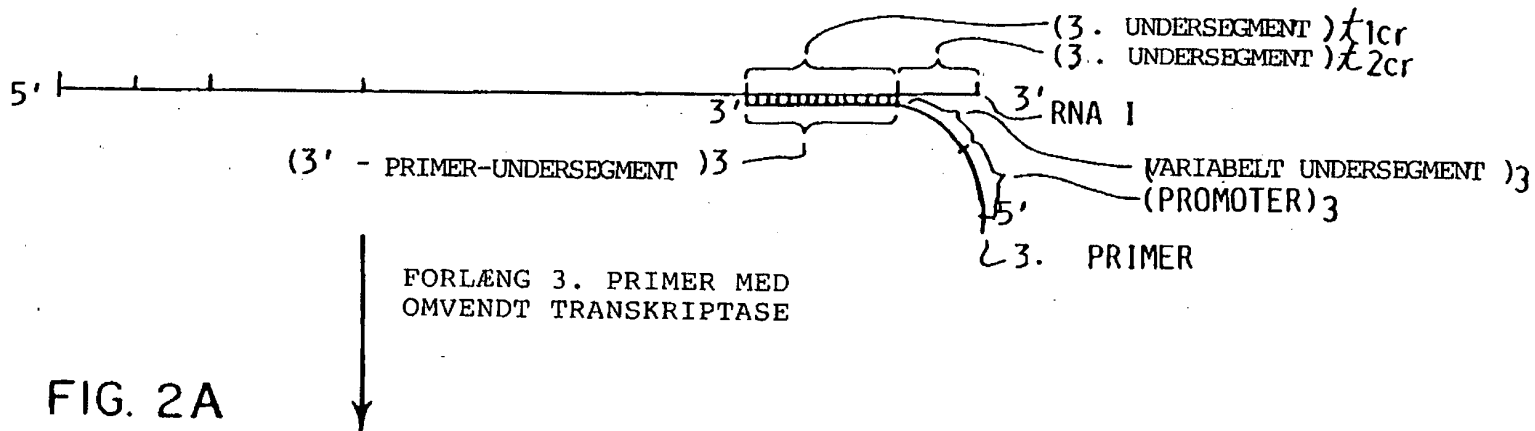
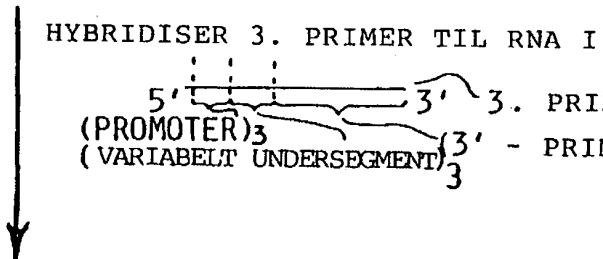
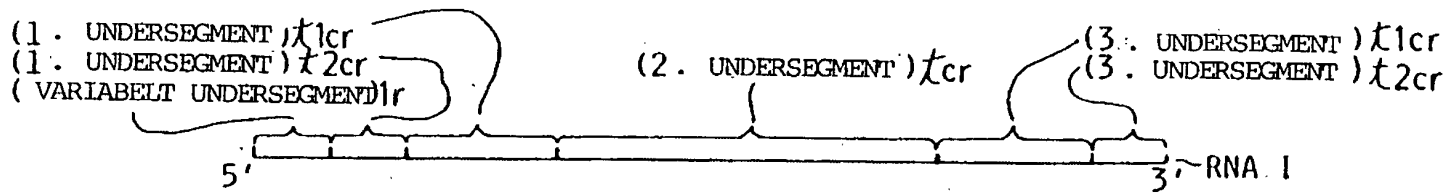


FIG. 2A

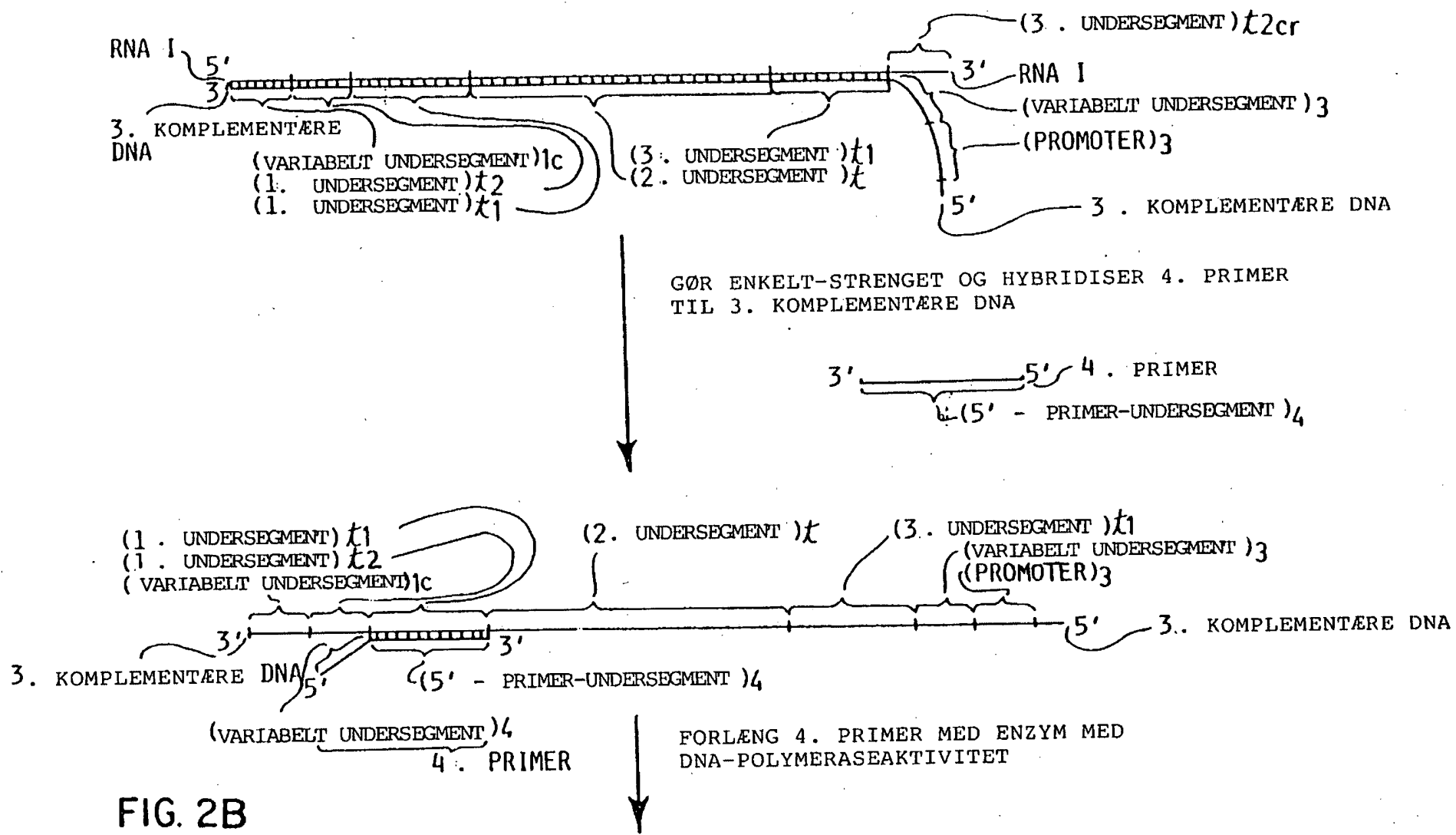
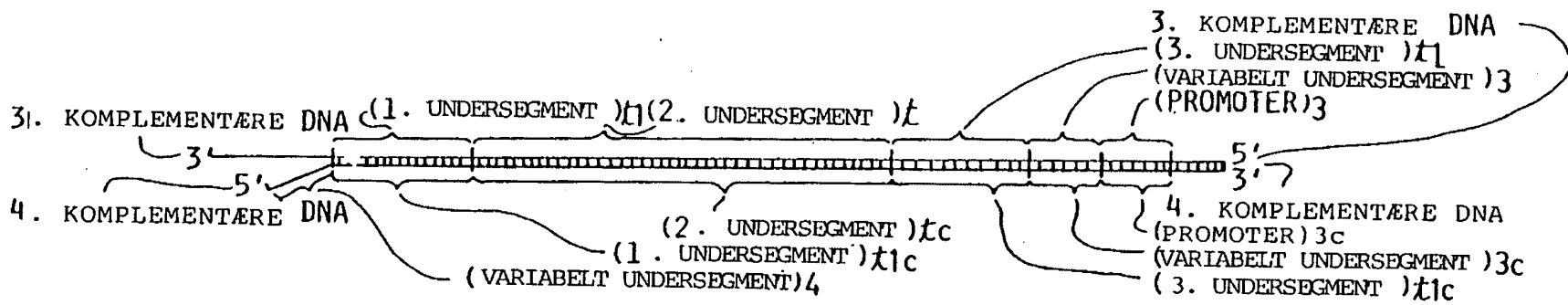


FIG. 2B



TRANSKRIBER MED DNA-AFHÆNGIG
 BAKTERIOFAG-RNA-POLYMERASE,
 SOM GENKENDER (PROMOTER) t_3

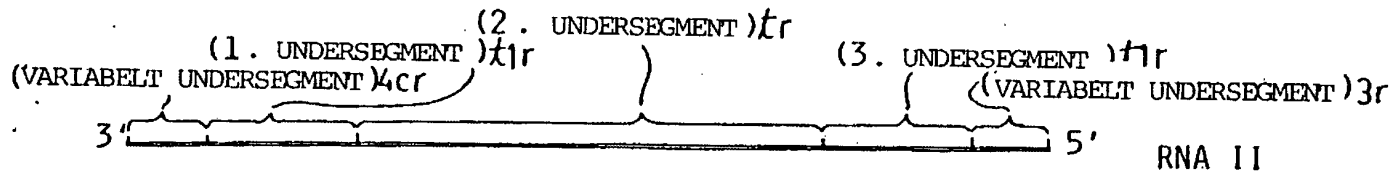


FIG. 2C

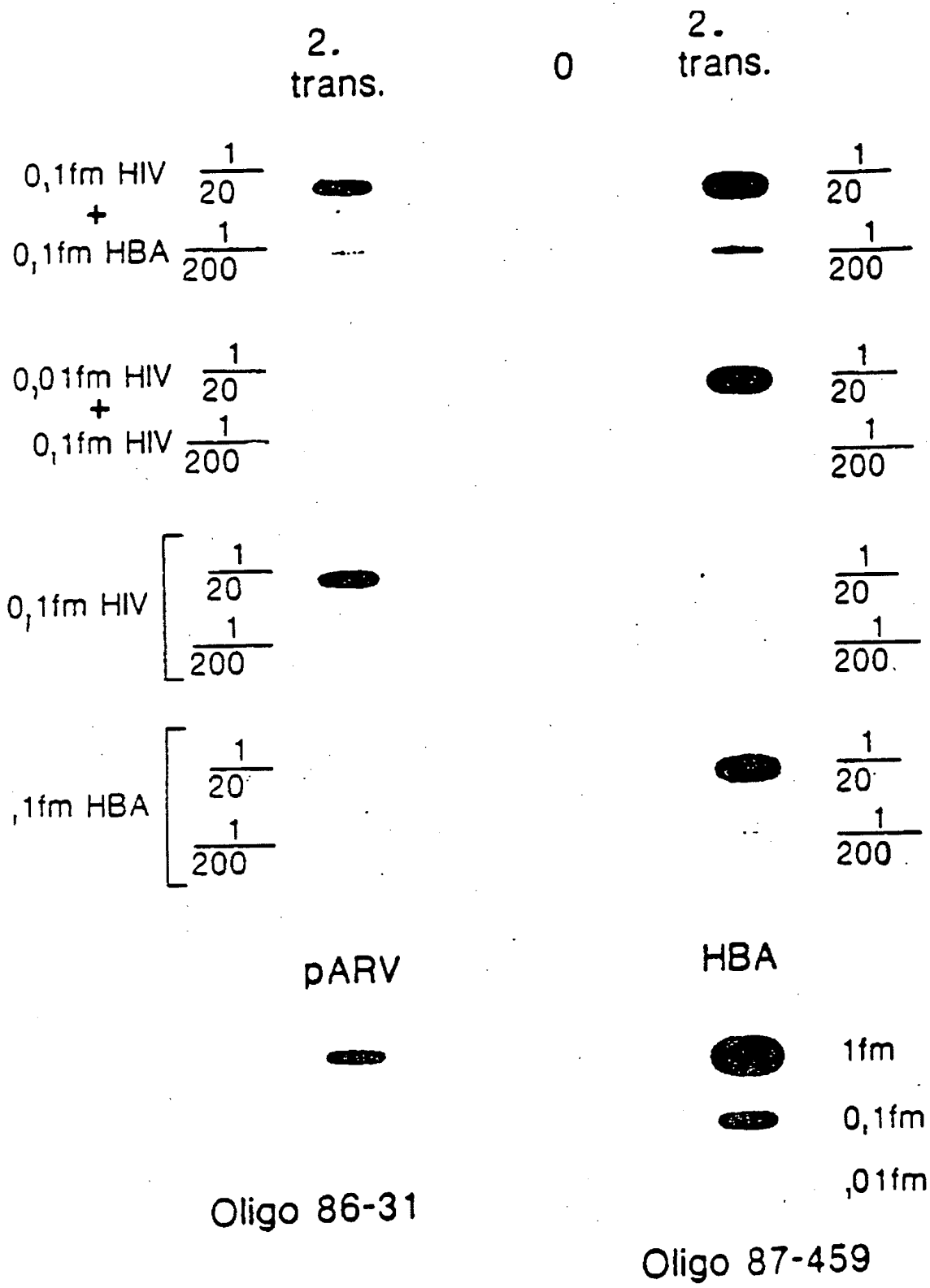


FIG. 3

FIG. 4

