



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **301776**

(13) B1

(51) Int Cl<sup>6</sup> C 12 Q 1/68

## Patentstyret

---

(21) Søknadsnr	895130	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	20.04.89, PCT/US89/01673
(22) Inng. dag	19.12.89	(85) Videreføringsdag	19.12.89
(24) Løpedag	20.04.89	(30) Prioritet	20.04.88, US, 183838
(41) Alm. tilgj.	08.02.90		
(45) Meddelt dato	08.12.97		

(73) Patenthaver	The Trustees of Columbia University in the City of New York, 116th Street and Broadway, New York, NY 10027, US
(72) Oppfinner	Fred R. Kramer, New York, NY, US Paul M. Lizardi, Cuernavaca, MX
(74) Fullmektig	Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo

---

(54) **Benevnelse**                    **Replikerbare, hybridiserbare rekombinante RNA-probemolekyler og fremgangsmåter for å bestemme tilstedeværelse eller konsentrasjon av oligo- eller polynukleotid i en prøve**

(56) **Anførte publikasjoner**    US 4786600, US 4563417, US 4683195, WO 87/06270  
P.M. Lizardi et al; Bio/Technology, vol. 6, 1197-1202, okt. 1988  
E.A. Miele et al; J. Mol. Biol., vol. 171, 281-295, 1983

(57) **Sammendrag**                    Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et replikerbart og hybridiserbart rekombinant enkelt-trådet RNA-probemolekyl som omfatter en gjenkjenningssekvens for binding av en RNA-rettet RNA-polymerase; en sekvens nødvendig for initiering av produkt-trådsyntese ved polymerasen og en heterolog RNA-sekvens skutt inn i et spesifikt sete i den indre regionen av det rekombinante molekylet og komplementær med et oligo- eller polynukleotid av interesse. Fremgangsmåter for bestemming av tilstedeværelse eller konsentrasjon av et oligo- eller polynukleotid av interesse i en prøve og for samtidig bestemming av tilstedeværelse eller konsentrasjon av flere forskjellige oligo- eller polynukleotider av prøver er også beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører replikerbare og hybridiserbare rekombinante enkelt-trådede RNA probemolekyler og en fremgangsmåte for å bestemme tilstedeværelse eller konsentrasjon av oligo- eller polynukleotid av interesse i en prøve. I foreliggende søknad er det blitt referert forskjellige publikasjoner og sitater for disse. Disse publikasjonene er i sin helhet inkorporert heri som referanse for å beskrive mer fullstendig teknikkens stand.

I foreliggende søknad er det blitt referert forskjellige publikasjoner og sitater for disse. Disse publikasjonene er i sin helhet inkorporert heri som referanse for å beskrive mer fullstendig teknikkens stand.

Det er kjent at alle levende organismer inkludert infeksjøs midler, f.eks. virus, inneholder DNA eller noen ganger RNA, molekyler som inneholder genetisk informasjon i form av en nukleotidsekvenskode. Mens det er visse segmenter av denne koden som er felles for mange organismer, eksisterer det andre segmenter som inneholder nukleotidsekvenser som er unike for en bestemt organisme. Disse sekvensene sies å være arts-spesifikke, og tilveiebringer et hensiktsmessig merke eller avtrykk som kan anvendes for identifikasjon av den organismen. Nukleinsyrehybridisasjonsteknikken (1) har et stort potensiale for hurtig påvisning og typebestemmelse av infeksjøs midler. Eksisterende hybridisasjonsanalyser har derimot enda ikke oppnådd følsomheten og hurtigheten som er nødvendig for praktisk diagnostisk anvendelse. Det er nylig blitt foreslått at følsomheten og hastigheten til bioanalyser kunne bli forbedret ved kobling av et replikerbart RNA til en hybridisasjonsprobe (2). Etter hybridisasjon ville replikerbart RNA bli amplifisert ved inkubasjon med RNA-ledet RNA polymerase, Q $\beta$ -replikase (3). Det enorme antall RNA-kopier som ville bli syntetisert, ville virke som et signal på at hybridisasjon var oppstått. Syntese av nye nukleinsyrehybridisasjonsprober er rapportert i foreliggende opp-

finnelse, som kombinerer i et enkelt RNA-molekyl dobbelt-funksjonene til probe og amplifiserbar reporter.

Et fremtredende trekk ved RNA-syntese ved Q $\beta$ -replikase er at et lite antall templat-tråder kan initiere syntesen av et stort antall produkt-tråder (4). Millioner ganger økning i mengden av RNA oppstår rutinemessig in vitro (5) som et resultat av en autokatalytisk reaksjonsmekanisme (6,7): enkelt-trådet RNA virker som templater for syntese av komplementære enkelt-trådede produkter; etter endt produkt-trådforlenging blir både produktet og templatet frigjort fra replikasjonskomplekset (8); og begge trådene er frie til å virke som templater i den neste synteserunden. Dermed vil antallet RNA-tråder øke eksponensielt dersom det er et overskudd av replikase. Når antallet RNA-tråder er lik antallet aktive replikasemolekyler, fortsetter RNA-syntese lineært. Det eksisterer et antall fordeler ved anvendelse av amplifikasjon av RNA ved Q $\beta$ -replikase som basis for et signaldannende system: Q $\beta$ -replikase er meget spesifikt for egne templat-RNA (9); så lite som et molekyltemplat RNA kan i prinsippet initiere replikasjon (10); og mengden av RNA syntetisert, vanligvis 200 ng i 50  $\mu$ l i løpet av 15 minutter) er så stort at det kan bli målt ved hjelp av enkle kolorimetrisk teknikk.

To oppdagelser førte til foreliggende søknad: 1) oppdagelsen av at heterologe RNA-segmenter kan bli satt inn i sekvensen til et lite, naturlig forekommende templat for Q $\beta$ -replikase MDV-1 RNA (11), uten påvirkning av dets replikerbarhet (12); og 2) konstruksjonen av et plasmid som virker som et templat for syntese av MDV-1 (+) RNA når plasmidet blir inkubert in vitro med bakteriofase T7 RNA polymerase (13).

Dette plasmidet er blitt modifisert i foreliggende oppfinnelse ved innsetting av en polylinker innenfor MDV-1 cDNA-sekvensen, og deretter ved innsetting av syntetiske hybridisasjonsprobesequenser innenfor polylinkeren. De resulterende

plasmidene virker som templatere for syntesen av "rekombinant RNA", som består av en probesekvens innbefattet innenfor sekvensen til MDV-1 (+) RNA. Probesekvensen anvendt i foreliggende oppfinnelse og som vil bli ytterligere beskrevet i den eksperimentelle detaljseksjonen som følger, er kjent for å hybridisere spesifikt til repiterende DNA til *Plasmodium falciparum* (14-16), en av protozoner som forårsaker malaria. I foreliggende oppfinnelse vil det bli vist at disse rekombinante RNA-molekylene er bifunksjonelle fordi de kan hybridisere spesifikt til komplementære DNA-mål, og de kan også virke som templatere for eksponensiell amplifikasjon ved Q $\beta$ -replikase.

I Kramer et al., US-patent nr. 4.786.600, utstedt 22. november 1988, er replikerbare rekombinante enkelt-trådede RNA-molekyler beskrevet. Disse omfatter en gjenkjenningssekvens for binding av en RNA-rettet RNA-polymerase, en sekvens for initiering av produkt-trådsyntese ved polymerasen og en heterolog sekvens av interesse avledet fra et annet RNA-molekyl satt inn i et spesifikt sete i den indre regionen til det rekombinante molekylet. Kramer et al. hverken lærer eller foreslår at de resulterende molekylene kan bli replikert etter hybridisasjon for å produsere multiple kopier for påvisning dersom den innsatte sekvensen er en hybridisasjonsprobesekvens.

I Chu et al., US-søknad nr. 852.692, inngitt 16. april 1986, er metoder beskrevet for påvisning av tilstedeværelse av mål, dvs. analytter, ved binding av et replikerbart RNA, som virker som en reportergruppe til en probe, f.eks. et oligonukleotid, et antistoff eller lektin. Chu et al. beskriver også at en RNA-rettet RNA-polymerase deretter kan bli anvendt for å produsere multiple kopier av replikerbart RNA for påvisning etter at hybridisasjonen har oppstått. Chu et al. beskriver derimot ikke en metode hvori forskjellige rekombinante RNA-"prober"-sekvenser kan bli anvendt samtidig i samme analyse.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig et replikerbart og hybridiserbart rekombinant enkelt-trådet RNA-probemolekyl, kjennetegnet ved at det omfatter:

- a) en gjenkjenningssekvens for binding av en RNA-rettet RNA-polymerase;
- b) en sekvens nødvendig for initiering av produkt-trådsyntesen til polymerasen og
- c) en heterolog RNA-sekvens skutt inn ved et spesifikt sete i den indre regionen av det rekombinante molekylet og komplementær med et oligo- eller polynukleotid av interesse som tilsvarer en spesifikk gensekvens eller del derav, i det den innskutte heterologe RNA sekvensen er tilstrekkelig enkelt-trådet for hybridisering med den spesifikke gensekvensen og med tilstrekkelig stabil sekundær struktur for effektiv replikasjon.

Det er også beskrevet et replikerbart og hybridiserbart rekombinant enkelt-trådet RNA-probemolekyl, kjennetegnet ved at det omfatter:

- (a) en gjenkjenningssekvens for binding av en RNA-rettet RNA polymerase;
- (b) en sekvens nødvendig for initiering av produkt-trådsyntesen til polymereasen; og
- (c) en heterolog RNA sekvens skutt inn ved et spesifikt sete i den indre regionen til det rekombinante molekylet og komplementær med et oligo- eller polynukleotid av interesse som tilsvarer en spesifikk nukleinsyresekvens til et infeksiosøst middel, i det den innskutte heterologe RNA sekvensen er til-

strekkelig enkelt-trådet for hybridisering med den spesifikke nukleinsyresekvensen og med tilstrekkelig stabil sekundær struktur for effektiv replikasjon.

Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for å bestemme tilstedeværelse eller konsentrasjon av oligo- eller polynukleotid av interesse i en prøve, kjennetegnet ved følgende trinn:

- (a) dannelse av et spesifikt kompleks mellom det rekombinante-RNA probemolekylet ifølge krav 1 eller 2 og oligo- og polynukleotid av interesse, ved inkubering av prøven med det rekombinante-RNA probemolekylet under egnede betingelser og i tilstrekkelig tidsperiode for å muliggjør at komplementære nukleotidsekvenser hybridiserer;
- (b) fjerning av uhybridisert rekombinante-RNA probemolekyler fra reaksjonsblandingen
- (c) inkubering av reaksjonsblandingen med en RNA-rettet RNA polymerase med evne til å syntetisere ytterligere kopier av de rekombinante-RNA probemolekylene som blir hybridisert til oligo- eller polynukleotidet av interesse og
- (d) detektering av rekombinat-RNA probemolekyler syntetisert i trinn (c) for derved å bestemme tilstedeværelse eller konsentrasjon av oligo- eller polynukleotidet av interesse.

#### Kort beskrivelse av figurene

Figur 1. Struktur av plasmid pT7-MDV-poly. Den tykke svarte linjen representerer MDV-1 cDNA. Når dette plasmidet blir spaltet med endonuklease Sma I og inkubert in vitro med

T7 RNA-polymerase, er de resulterende transkriptene replikerbare RNA.

Figur 2. Nukleotidsekvenser av de rekombinante transkriptene foldet i de sekundære strukturene antatt å være mest stabilt av et dataprogram (41). MDV-fal-un (+) RNA (A) inneholder et 58-nukleotidinskudd (vist mellom pilene) i steden for 3-nukleotidsegmentet AGU, som oppstår i naturlig MDV-1 (+) RNA (42). De sekundære strukturene som dataprogrammet bestemmer i regionen av rekombinanten utenfor innskuddet er identiske med de sekundære strukturene som ble eksperimentelt identifisert i MDV-1 RNA (36, 37) og som foreslår at probesequensen ville ha liten innvirkning på topologien til MDV-1 domenen. Uthevede bokstaver viser nukleotidene som er komplementære til *P. falciparum* DNA. Figurene 2(B) og (C) viser den sannsynlige sekundære strukturen til innskuddene tilstede i MDV-fal-st (+) RNA (B) og MDV-poly (+) RNA (C).

Figur 3. Replikasjon av rekombinante RNA. (A) Polyakrylamid gelelektroforese viser den relative mobiliteten til forskjellige transkripter: MDV-1 (a), MDV-poly (b), MDV-fal-un (c) og MDV-fal-st (d). Tallene på utsiden av panelet angir lengden på hvert transkript (i nukleotidene). (B) Q $\beta$ -replikasereaksjoner ble initiert med 200 fg av hvert transkript. Kinetiske analyser viste at omtrent 100.000 kopier av hvert transkript ble syntetisert i løpet av 20 minutter. (C) Elektroforetiske analyser av RNA tilstede etter 45 minutter viste at produktene var replikater av transkriptene. Produktene var sannsynligvis en nukleotid lenger enn transkriptene på grunn av at et uessensielt, 3'-terminalt adenosin vanligvis blir tilsatt i løpet av replikasjonen (21).

Figur 4. Effekten av opprinnelig RNA-konsentrasjon på tidsforløpet av rekombinant RNA-syntesen. En serie 25- $\mu$ l Q $\beta$ -replikasereaksjoner ble påbegynt medfølgende mengder MDV-fal-un-RNA: 140 pg, 1,4 pg, 14 fg, 0,14 fg og 0 fg, som

korresponderer med  $10^9$ ,  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$  og 0 molekyler tilsatt templat. Prøver av hver reaksjon ble tatt ut hvert 5 minutt for å bestemme mengden av RNA som var blitt syntetisert. Resultatene demonstrerer at tiden som forbrukes i den eksponensielle fasen av syntesen blir øket når det opprinnelige antallet av templatmolekyler blir redusert (5). Hver 100-ganger reduksjon i antallet rekombinante molekyler anvendt som templat, resulterte i en 3,59 minutters utsetting når det gjelder oppnåelse av metting (dette tyder på at RNA-populasjonen blir fordoblet hver 32,4 sekunder). Den elektroforetiske mobiliteten til RNA tilstede i hver reaksjon etter 25 minutter (se innskudd), sammenlignet med mobiliteten til rekombinant RNA (278-nukleotider langt) og MDV-1 RNA (223-nukleotider lang) markører (m), bekreftet at produktet fra rekasjonene initiert med rekombinant RNA var rekombinant RNA.

Figur 5. Hybridisasjonen av rekombinante RNA. 28 ng MDV-poly RNA (a), 75 ng MDV-fal-strRNA (b) og 75 ng MDV-fal-un RNA (c) ble hybridisert ved dot-blots (34) inneholdende enten 0,5 µg pPFR6 DNA (et plasmid inneholdende 45 kopier *P. falciparum* målsekvens) eller 0,5 µg pUC13 DNA (plasmidvektor anvendt for å konstruere pPFR6). Rekombinant RNA hybridiserte spesifikt til plasmider inneholdende målsekvenser. Når mengden av både MDV-fal-un RNA og DNA var doblet (d), ble en markert økning oppdaget i mengden av RNA som ble bundet til mål-DNA.

Figur 6. Lineært forhold mellom logaritmen av det opprinnelige antallet RNA-molekyler satt til en Q $\beta$ -replikasereaksjon og mengden av produkt-RNA syntetisert. Mengden av RNA syntetisert i løpet av 25 minutter i løpet av reaksjonene vist i figur 4, ble plottet mot logaritmen av antallet rekombinante molekyler som var blitt opprinnelig tilsatt til hver reaksjon. Disse resultatene illstrerer hvordan bioanalyser som anvender replikerbare prober kan

forklares: mengden av produkt-RNA vil være proporsjonal med logaritmen av antall prober bundet til målene.

Figur 7. Autoradiogram av hybridisasjonsreaksjonene som viser mengde RNA tilstede ved hvert tidspunkt.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et replikerbart og hybridiserbart rekombinant enkelt-trådet RNA-probemolekyl omfattende en gjenkjenningssekvens for binding av en RNA-rettet RNA-polymerase; en sekvens nødvendig for påbegynnning av produkt-trådsyntese ved polymerase; og en heterolog RNA-sekvens satt inn i et spesifikt sete i den indre regionen av det rekombinante molekylet og komplementær med et oligo- eller polynukleotid av interesse.

I en utførelsesform er gjenkjenningssekvensen for binding av en RNA-rettet RNA-polymerase i en indre region av det rekombinante RNA-probemolekylet.

I et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse er innsettingssetet for den heterologe RNA-sekvensen ikke i nærheten av en sekvens som er nødvendig for binding av RNA-polymerasen eller for initiering av produkt-trådsyntesen. I et ytterligere aspekt har et slikt innskudd en minimal effekt på replikerbarheten til molekylet. I et ytterligere annet aspekt av foreliggende oppfinnelse har innskuddet i det rekombinante RNA-probemolekylet en minimal effekt på den sekundære og tertiære strukturen til molekylet. Ved utførelse av denne oppfinnelsen er det spesifikke innsettingssetet av det rekombinante RNA-probemolekylet ved et spesifikt nukleotid. Ved utførelse av foreliggende oppfinnelse blir den heterologe sekvensen av interesse satt inn mellom nukleotidene 63 og 64.

Sekvensen i de rekombinante RNA-probemolekylene ifølge foreliggende oppfinnelse som er nødvendig for begynnning av produktrådsyntese, er en cytidinrik 3'-terminal sekvens.

En RNA-rettet RNA-polymerase nyttig ved utførelse av foreliggende oppfinnelse er Q $\beta$ -replikase.

Nyttig i foreliggende oppfinnelse er et rekombinant-RNA-probemolekyl hvori molekylet er et variant-RNA-templat for Q $\beta$ -replikase eller en mutant derav. I et ytterligere aspekt er et varian-RNA-templat MDV-1 RNA eller en mutant derav. I en utførelsesform er MDV-1 RNA MDV-1 (+) RNA. I et annet er MDV-1 RNA MDV-1 (-) RNA.

Transkripter avledet fra et rekombinant plasmid ved inkubasjon med en DNA-rettet RNA-polymerase er spesielt nyttig ved utførelse av oppfinnelsen for å tilveiebringe rekombinant RNA-probemolekyler. Ved utførelse av oppfinnelsen er rekombinant RNA-probemolekylet et variant-RNA-templat for Q $\beta$ -replikase eller en mutant derav. I en foretrukket utførelsesform er variant-RNA-templatet MDV-1 RNA eller en mutant derav. I ytterligere utførelsesformer er MDV-1 RNA MDV-1 (+) RNA eller MDV-1 (-) RNA.

Et trekk ifølge oppfinnelsen heri er å tilveiebringe et rekombinant RNA-probemolekyl hvori den heterologe sekvensen blir satt inn mellom nukleotidene 63 og 64.

Et viktig trekk blir tilveiebragt i foreliggende oppfinnelse når den innsatte heterologe sekvensen til det rekombinante RNA-probemolekylet er komplementær til en spesifikk nukleinsyresekvens til et infektiøst middel. Et slikt infektiøst middel kan være et virus, et viroid eller virusoid, en prokaryot, en bakterie, en eukaryot eller en parasittisk protozoan, så som den parasittiske protozoanen som forårsaker malaria.

I et ytterligere aspekt kan den innskutte heterologiske sekvens til det rekombinante RNA-probemolekylet være komplementær med en spesifikk gensekvens eller del derav,

eller med en allel til den spesifikke gensekvensen eller delen derav.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for bestemming av tilstedeværelse eller konsentrasjon av et oligo- eller polynukleotid av interesse i en prøve, som omfatter at man utfører følgende trinn: (a) danner et spesifikt kompleks mellom de rekombinante RNA-probemolekylene som beskrevet ovenfor, og oligo- eller polynukleotidet av interesse ved at man inkuberer prøven med rekombinant RNA-brobemolekylene under egnede betingelser og i tilstrekkelig tid for å muliggjøre at komplementære nukleotidsekvenser hybridiserer; (b) fjerner uhybridiserte rekombinante RNA-probemolekyler fra reaksjonsblandingen; (c) inkuberer reaksjonsblandingen med en RNA-rettet RNA-polymerase som kan syntetisere ytterligere kopier av de rekombinante RNA-probemolekylene som blir hybridisert til oligo- eller polynukleotid av interesse; og (d) påviser de rekombinante RNA-probemolekylene syntetisert i trinn (c) og bestemmer dermed tilstedeværelsen eller konsentrasjonen av oligo- eller polynukleotidet av interesse.

Fremgangsmåten beskrevet ovenfor kan bli anvendt for å danne sterkt amplifiserte signaler i en nukleinsyrehybridisasjonsanalyse. I teorien kan metoden danne et signal fra et enkelt hybridisert molekyl og kan derfor bli anvendt for å konstruere DNA (eller RNA) påvisningsanalyse med ultrahøy følsomhet. Fremgangsmåten er basert på anvendelse av Q $\beta$  RNA rekombinante konstruksjoner og Q $\beta$ -replikase.

I en slik fremgangsmåte kan oligo- eller polynukleotidet i prøven bli bundet til en fast bærer. I slike tilfeller kan den faste bæreren være en nitrocellulose eller nylonmembran.

Ved utførelse av ovennevnte fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse og danning av et spesifikt kompleks mellom rekombinante RNA-probemolekyler og oligo- eller polynukleo-

tid av interesse, dvs. trinn (a) kan oligo- eller polynukleotidet av interesse og rekombinant-RNA-probemolekylet være i oppløsning.

De uhybridiserte rekombinante RNA-molekylene kan bli separert fra de som er hybridisert til oligo- eller polynukleotider av interesse av teknikker og evner som er velkjente innenfor dette fagområdet. I det vanlige tilfellet hvor rekombinant RNA-molekyl hybridiserer til oligo- eller polynukleotid av interesse, som igjen er bundet til en fast bærer, blir en slik separasjon lett tilveiebragt ved enkel vasking som ikke i betraktelig grad ødelegger bindingen til den faste bæreren. I tillegg kan en teknikk, kjent som sandwich-hybridisasjonsmetode, også bli anvendt for å tilveiebringe separasjon av hybridiserte fra uhybridiserte rekombinante RNA-molekyler. Kromatografiske og elektroforetiske teknikker kan også bli anvendt. I et ytterligere aspekt av fremgangsmåten beskrevet ovenfor blir de uhybridiserte rekombinante RNA-probemolekylene fjernet fra reaksjonsblandingen i trinn (b) ved separering av hybridiserte rekombinante RNA-probemolekyler fra uhybridiserte probemolekyler ved fanging av oligo- eller polynukleotid på en fast bærer.

Ved påvisning av rekombinante RNA-probemolekyler som er blitt syntetisert eller replikert i trinn (c) ovenfor, kan metoder som er velkjente innenfor fagområder bli anvendt. For eksempel kan påvisningen være ved ultraviolet absorpsjon av replikert RNA som for eksempel ved metoden kontaktfotoprinting (54).

I en utførelsesform blir påvisningen utført ved inkorporering av radioaktivt merkede ribonukleosid 5'-trifosfatforløpere inn i rekombinante RNA-produktene. I en annen utførelsesform blir påvisningen utført ved inkorporering av kjemisk modifiserte ribonukleosid 5'-trifosfatforløpere inn i rekombinante RNA-produkter.

Biotin eller iminobiotin kan bli inkorporert i replikert RNA som deretter kan bli påvist ved kjente teknikker med et enzymavidin eller enzymstreptavidinaddukt, som blir bundet til RNA-bundet biotin og katalyserer produksjon av et kromogen som påvises hensiktsmessig. Se Matthews (55); Leary et al. (45). Inkorporering av biotin eller iminobiotin inn i replikert RNA kan bli tilveiebragt ved anvendelse av UTP som er biotinyllert gjennom en spacer til karbon-5 til uracildelen som et substrat for replikatet i replikasjonsreaksjonen. Slike UTP'er er kjente forbindelser. Det er videre kjent at slike UTP'er er substrater for Q $\beta$ -replikase, og at RNA som omfatter urasiler biotinyllert gjennom spacer-grupper koblet til karbon-5-posisjonen forårsaket avanvendelse av slike UTP'er ved deres syntese, er templer for Q $\beta$ -replikasekatalysert replikasjon.

RNA som er et resultat fra replikasjonsprosessen kan også bli biotinyllert ved anvendelse av fotobiotinacetat ifølge fremgangsmåten til Forster et al., (56), og deretter påvist med et avidinenzym addukt-kromogen-forbindelsessystem som replikert RNA syntetisert med biotinyllert UTP i replikasjonsreaksjonen. I et ytterligere aspekt kan kjemisk modifiserte ribonukleosid 5'-trifosfatforløpere bli biotinyllert, eller de kjemisk modifisert ribonukleotid 5'-trifosfatløperne kan være fluorescerende. Et ytterligere trekk ifølge denne fremgangsmåten blir tilveiebragt når påvisningen blir utført ved binding av RNA-spesifikke kromogene eller fluorogene farvestoffer til de rekombinante RNA-produktene. RNA som er et resultat av replikasjonsprosessen kan gjøres fluorescerende ved anvendelse av en T4 RNA-ligasekatalysert reaksjon for å tilføye nukleotider modifisert slik at de er fluorescerende til 3'-enden av replikativt RNA. Se Cosstick et al., Nucl. Acis Res. 12, 1791-1810 (57). Fluorescensen til det resulterende RNA kan bli anvendt for å påvise RNA ved hjelp av hvilke som helst av de mange standardteknikkene.

Blant andre fremgangsmåter som kan bli anvendt for å påvise replikert RNA, er de hvori en reporterforbindelse som spesifikt blir bundet til nukleinsyre blir satt til systemet hvor replikasjonen har foregått, eller til mediet, så som en positivt ladet bærer så som ECTEOLA-papir, hvorpå replikert RNA er blitt isolert, og signalet fra reporterforbindelsen kan bli målt. Slike forbindelser omfatter: kromogene farvestoffer, så som "farver alt" (Dahlberg et al., (58); metylenblå (Dingman og Peacock, (59), og sølvfarve (Sammons et al., 32); Igloie, (60)); fluorogene forbindelser som blir bundet til RNA, for eksempel etidiumbromid (Sharp et al., (61); Baily og Davidson, (62) og fluorogene forbindelser som spesifikt blir bundet til RNA som er templatere for replikasjon ved Q $\beta$ -replikase, for eksempel et fycobiliprotein (Oi et al., (63); Stryer et al., US-patent nr. 4.520.110) konjugert til den virale subenheten til Q $\beta$ -replikase.

Påvisningen kan også bli utført ved fysiske metoder så som absorpsjon av ultraviolet lys og bestemming av massen ved veiing.

Ved inkubering av reaksjonsblandingen tilveiebragt i trinn (b) blir en RNA-rettet RNA-polymerase anvendt. Et eksempel på en slik polymerase som er nyttig ved utførelse av foreliggende utfinnelse er Q $\beta$  replikase.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også rekombiant RNA-probemolekyler produsert ved ovennevnte metode og spesielt rekombinant RNA-probemolekyler produsert ved en metode hvor reaksjonsblandingen blir inkubert med Q $\beta$  replikase for å syntetisere ytterligere kopier av de rekombinante RNA-probemolekylene som blir hybridisert tiloligo. eller polynukleotidet av interesse.

Et annet aspekt av metoden tilveiebragt i foreliggende oppfinnelse blir oppnådd når inkubasjonstiden i trinn (c) er tilstrekkelig kort, slik at antallet rekombinante RNA-

produkttråder ikke overskrider antallet polymerasemolekyler, meddetresultat at antallet rekombinant RNA produktmolekyler er lineært proporsjonalt med antallet rekombinant-RNA-probemolekyler opprinnelig hybridisert.

Frengangsmåten beskrevet heri tilveiebringer et annet viktig trekk hvor inkubasjonstiden i trinn (c) er tilstrekkelig lang, slik at antallet rekombinante RNA-produkttråder overskrider antallet polymerasemolekyler og dette fører til at antallet rekombinant RNA-produktmolekyler er proporsjonal med logaritmen til antallet rekombinant RNA-probemolekyler opprinnelig hybridisert.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for samtidig bestemmelse av tilstedeværelse eller konsentrasjon av flere forskjellige oligo- eller polynukleotider av interesse i en prøve og denne omfatter at man utfører følgende trinn: (a) danner spesifikke komplekser mellom en blanding av forskjellige typer rekombinante RNA-probemolekyler ifølge krav 1, idet hver type har en annen innsatt sekvens og oligo- eller polynukleotidene av interesse, ved å inkubere prøven med blandingen av de rekombinante RNA-probemolekylene under egnede betingelser og i en tilstrekkelig tidsperiode som tillater komplementære nukleotidsekvenser å hybridisere; (b) fjerner uhybridiserte rekombinante RNA-probemolekyler fra reaksjonsblandingen; (c) inkuberer reaksjonsblandingen med en RNA-rettet RNA-polymerase som kan syntetisere ytterligere kopier av de rekombinante RNA-probemolekylene som er hybridisert til oligo- eller polynukleotidene av interesse; (d) separerer blandingen av de syntetiserte rekombinante RNA ved hybridisering av disse til en bestemt rekke polynukleotider bundet til en membran hvor hver av polynukleotidene er komplementære til en type syntetisert rekombinant RNA; og (e) påviser de rekombinante RNA-probemolekylene produsert i trinn (d) og bestemmer derved tilstedeværelsen eller konsentrasjonen av hvert oligo- eller polynukleotid av interesse.

En god klinisk analyse krever hurtighet, spesifisitet og følsomhet. For eksempel mangler eksisterende analyser for påvisning av patogene midler som forårsaker akutt bakteriell meningitis tilstrekkelig hurtighet og følsomhet. Et antall forskjellige organismer er nyttet til meningitis, omfattende *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumonia*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pneumoniae*. Pasienten er vanligvis et lite barn. Effektiv behandling krever påvisning av det etiologiske midlet i en cerebrospinalvæskeprøve, og det er viktig at antibiotisk behandling begynner så raskt som mulig. Eksisterende laboratorieteknikker krever minst 18 timer for å identifisere midlet. Prøvevolumet er videre vanligvis bare på 50  $\mu$ l, og inneholder ofte mindre enn 50 individuelle mikroorganismer som er godt under grensene hvorpå pålitelige direkte påvisningsanalyser for tiden kan bli utført (64). Det kliniske bildet er videre komplisert av en markert økning i mengden av bakterier som har antibiotiske resistensgener på plasmidene (65, 66).

En serie replikerbare rekombinante RNA-probemolekyler kan bli preparert hvor hver av dem er spesifikke for en annen organisme som kan forårsake meningitis. I tillegg kan en serie rekombinante RNA-probemolekyler bli preparert, hvor hver av dem er spesifikke for forskjellige antibiotiske resistensgener som kan være tilstede i det infeksiose midlet.

Ved anvendelse av en slik serie rekombinante RNA-probemolekyler blir en blanding av for eksempel 15 forskjellige replikerbare rekombinante RNA-prober inkubert med denaturert DNA tilveiebragt fra en spinalvæskeprøve. Bare noen få typer rekombinante RNA-probemolekylarter vil finne målområder (for eksempel en bakteriell probe og tre resistensgenprober). Etter fjerning av de ikke-bundende probemolekylene blir Q $\beta$ -replikase anvendt for å amplifisere de gjenværende probene. Etter amplifikasjon blir blandingen av produkt-RNA plassert i

kontakt med en membran inneholdende nummererte dot-blots hvor hver inneholder denaturert DNA komplementær til en av de opprinnelige probesekvensene. På denne måten blir blandingen av produkt-RNA sortert ut for påfølgende kvantifisering. Disse analysene muliggjør hurtig og samtidig diagnose av både det patogene midlet og dets spekter for antibiotisk resistens.

På en lignende måte kan en blanding av prober bli anvendt samtidig for å påvise humanimmunsviktvirus som forårsaker ervervet immunsviktsyndrom (AIDS) og konsentrasjonen av et helt panel av opportunistiske midler som infiserer pasienten med immunsvikt.

Foreliggende oppfinnelse blir illustrert i seksjonene for de eksperimentelle detaljene og den eksperimentelle diskusjonen som følger. Disse seksjonene er beskrevet for å være hjelpelige med forståelsen av oppfinnelsen.

### Eksperimentelle detaljer

#### Materiale og metoder

##### Enzymer

Restriksjonsendonukleaser, T4 polynukleotidkinase og T7 RNA-polymerase ble forhandlet fra New England Biolabs. Kalvetarm-alkalinfosfatase, T4 DNA-ligase, Klenow-fragmentet fra *Escherichia coli* DNA-polymerase I, og bovint bukspyttkjertel-deoksyribonuklease I ble forhandlet fra Boehringer Mannheim. Q $\beta$ -replikase ble isolert fra bakteriofag Q $\beta$ -infisert *E. coli* Q13 ved fremgangsmåten til Eoyang og August (17), hvor hydroksylapatitt-trinnet ble utelatt.

Oligonukleotider

Enkelt-trådede DNA-fragmenter ble preparert ved anvendelse av B-cyanoetylfosforamidittkjemil (18) i en Microsyn-1450A syntesemaskin (Systec). Etter deblokkering og frigjøring fra harpikset, ble oligonukleotidene isolert ved preparativ gelelektroforese (19) eluert fra gelen, filtrert gjennom nitrocellulose og rensert ved kromatografi (20) på SEP-PAK C18 anordninger (Waters Associates).

Plasmid for syntetisering av MDV-1 (+) RNA ved transkripsjon  
pT7-MDV inneholder en promoter for T7 RNA-polymerase rettet mot full-lengde cDNA preparert fra MDV-1 RNA (13). Dette plasmidet er blitt konstruert slik at transkripsjonen fra T7 promoteren begynner med det første nukleotidet til MDV-1 (+) RNA. Et Sma I restriksjonssete er blitt introdusert i den andre enden av MDV-1 cDNA-sekvensens slik at når dette plasmidet blir lineærisert ved spaltning med endonuklease Sma I og deretter inkubert med T7 RNA-polymerase, terminerer transkripsjonen to nukleotider før enden av MDV-1 (+) RNA. De resulterende transkriptene, til tross for at de mangler det naturlige 3'-terminaldinukleotidet, CpA-OH, virker som gode templer for eksponensiell replikasjon ved Q $\beta$ -replikase. En fullstendig beskrivelse av konstruksjonen og anvendelsen av dette plasmidet vil bli publisert andre steder (13).

Plasmid inneholdende en polylinker innenfor MDV-1 cDNA-sekvensen

PpuM I-BstE II-fragmentet til MDV-1 cDNA-sekvensen i pT7-MDV DNA, ble erstattet med det korresponderende PpuM I-BstE II-fragmentet til et modifisert MDV-1 cDNA som inneholdt en unik Xba I gjenkjenningssekvens i stedet for bare Hinf I gjenkjenningsfrekvensen i MDV-1 cDNA (21). Et syntetisk DNA-fragment (preparert ved sammensmeltning av dCTAGATCTCGAGGCCTG til dCTAGCAGGCCTCGAGAT) ble deretter klonet inn i dette Xba I-setet, som omdanner dette til en polylinker med unike restriksjonsseter for Xba I, Bgl II, Xho I og Stu I. Dette plasmidet betegnet pT7-MDV-poly, er angitt i figur 1. RNA

syntetisert fra dette plasmidet blir betegnet MDV-poly. Rekombinant RNA kan bli dannet ved innsetting av en hvilken som helst heterolog DNA-sekvens inn i et av de unike restriksjonssetene i polylinkeren til pT7-MDV-poly, og deretter anvende det resulterende plasmidet som et templat for transkripsjon ved T7 RNA-polymerase.

#### Plasmider for syntetisering av rekombinante prober ved transkripsjon

pT7-MDV-fal-un ble konstruert ved innsetting av en syntetisk probesekvens (preparert ved sammensmeltning av dTCGAGAC-TAACATAGGTCTTAACTTGACTAACA til dTCGATGTTAGTCAAGTTAAGAC-CTATGTTAGTC) inn i Xho I-setet til polylinkersekvensen i pT7-MDV-poly. pT7-MDV-fal-st ble konstruert ved innsetting av den relaterte syntetiske probesekvensen (preparert ved sammensmeltning av dTCGAGACTAACATAGGTCTTAACTTGTTAGTCA til dTCGATGACTAACAAAGTTAAGACCTATGTTAGTC) inn i setet i pT7-MDV-poly. Begge probesekvenser var komplementære til de unike 21-baseparsekvensmotivene som blir gjentatt over 1.000 ganger i P.falciparum DNA (14-16). Den spesifikke sekvensen anvendt heri ble bestemt ved sekvensering av klonet gjentakende DNA fra stamme FCR-3/Gambia.

#### Nukleotidsekvensanalyse

Nukleotidsekvensen i den rekombinante regionen av hvert plasmid ble bestemt ved kjedetermineringsprosedyren (22) ved anvendelse av 7-deaza-deoksyguanosin 5'-trifosfat (Boehringer Mannheim) i steden for deoksyguanosin 5'-trifosfat (23) og [<sup>35</sup>S]deoksytytidin 5'( $\alpha$ -tio)trifosfat (New England Nuclear) som markør (24). Sekvenseringsreaksjoner ble utført på totalt plasmid-DNA (25) ved anvendelse av en 20-nukleotidprimer (Pharmacia) som var komplementær til T7 promotersekvensen (26).

#### Transkripsjon

Plasmider ble isolert fra bakterier ved anvendelse av metoden til Holmes og Quigley (27) og rensset ved gelfiltreringskro-

matografi (28) på Sephacryl S-1000 (Pharmacia). Plasmid-DNA ble deretter spaltet med Sma I eller Stu I. Transkripsjon ble utført ifølge en modifikasjon av beskrivelsen til Axelrod og Kramer (29): 1  $\mu\text{g}$  linearisert DNA ble inkubert med 80 enheter T7 RNA polymerase i 3 t ved  $37^\circ\text{C}$  i 40  $\mu\text{l}$  400  $\mu\text{M}$  ATP, 400  $\mu\text{M}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] CTP, 400  $\mu\text{M}$  GTP, 400  $\mu\text{M}$  UTP, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 12 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM ditiotreititol (laget friskt), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bovint serumalbumin, 4 mM spermidin og 1 enhet/ $\mu\text{l}$  ribonukleasehemmer, RNasin (Promega Biotec). [ $^{32}\text{P}$ ] transkriptene ble inkubert med 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ribonukleasefri deoksyribonuklease I (30) for å ødelegge templat-DNA, og deretter rensset ved fenol/kloroform/isoamylalkoholekstraksjon, etterfulgt av presipitasjon med etanol. Konsentrasjonen til hvert RNA ble bestemt fra dets spesifikke radioaktivitet. Størrelsen og homogeniteten til RNA ble bestemt ved elektroforese gjennom 6% polyakrylamid-slabgeler i nærvær av 7 M urea (31). RNA-båndene ble visualisert ved sølvfarving (32).

### Replikasjon

Mellom  $1,4 \times 10^{-18}\text{g}$  og  $1,4 \times 10^{-10}\text{g}$  transkripter (avhengig av reaksjon) ble inkubert med  $2,4 \times 10^{-6}\text{g}$  Q $\beta$ -replikase ved  $37^\circ\text{C}$  i 25  $\mu\text{l}$  400  $\mu\text{M}$  ATP, 400  $\mu\text{M}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]CTP, 400  $\mu\text{M}$  GTP, 400  $\mu\text{M}$  UTP, 14 mM  $\text{MgCl}_2$  og 90 mM Tris-HCl (pH 7,5). I hver reaksjon ble en prøve tatt ut hvert 5 min. Mengden av RNA i hver 2- $\mu\text{l}$ -prøve ble bestemt ved binding av [ $^{32}\text{P}$ ]RNA til DE81 celluloseskiver (Whatman), som beskrevet av Maxwell og hans medarbeidere (33) og ved måling av radioaktiviteten på hver skive med en scintillasjonsteller. Størrelsen og homogeniteten til RNA i utvalgte prøver ble bestemt ved polyakrylamid-gelelektroforese. [ $^{32}\text{P}$ ]RNA-båndene ble påvist ved autoradiografi.

### Hybridisasjon

To forskjellige plasmider ble anvendt som mål. Det første, pPFR6, ble konstruert ved innsetting av et DNA-fragment inneholdende 45 tandemkopier av 21 basepar-repiterende sekvenser til *P. falciparum* DNA (stamme FCR-3/Bambia) inn i

BamH I-sete til pUC13 DNA (Boehringer Mannheim). Femten av de 45 gjentatte sekvensene var identiske med den innsatte sekvensen i de rekombinante probene. De andre gjentatte sekvensene inneholdt mikroheterogeniteter. Det andre plasmidet, pUC13, virket som en negativ kontroll for hybridisasjon av de rekombinante RNA-probene. Hvert plasmid ble lineærisert ved spaltning med BamH I, denaturert ved inkubasjon i 0,4n NaOH i 60 sek. ved 42°C og 0,5- $\mu$ g eller 1,0- $\mu$ g aliquoter ble bundet til en BA83 nitrocellulosemembran (Schleicher og Schuell), ifølge dot-prosedyren til Kafatos og hans medarbeidere (34). Membranen ble kuttet i seksjoner som hver inneholdt et dobbelt par pPFR6 og pUC13 dot-blots. Hver membranseksjon ble prehybridisert i 3 t ved 37°C i 5X SSPE (5X SSPE er 900 mM NaCl, 50 mM natriumfosfat (pH 7,4) og 5 mM EDTA), 2 mg/ml natriumdodecylsulfat, 500  $\mu$ g/ml heparin (Sigma) og 20% formamid. Hver membranseksjon ble deretter inkubert i 4 t ved 25°C med mellom 23 ng og 150 ng [<sup>32</sup>P]RNA som skulle bli testet og 10  $\mu$ g umerket E. coli tRNA-bærer (Boehringer Mannheim) løst opp i 2ml prehybridiseringsbuffer. Følgende RNA ble testet: MDV-poly, MDV-fal-un, MDV-fal-st og forkortede versjoner av hver (transkribert fra plasmider spaltet ved Stu I-sete). Etter hybridisasjon ble membranene vasket tre ganger (15 min./vask) ved 25°C med en oppløsning inneholdende 4X SSPE, 2 mg/ml natriumdodecylsulfat og 400  $\mu$ g/ml heparin, etterfulgt av 10-min. vasker ved 25°C i 1X SSPE og en 12-min. vask ved 37°C i 1X SSPE. Hybridisert RNA ble påvist ved autoradiografi.

#### Replikasjon av rekombinant RNA etter hybridisasjon

For å studere replikerbarheten til bundet RNA, ble MDV-fal-un RNA hybridisert til dot-blots eluert ved koking i 200  $\mu$ l vann i 60 sek. Integriteten til eluert RNA ble analysert ved polyakrylamid-gelelektroforese. Replikerbarheten til eluert RNA ble bestemt ved initiering av en Q $\beta$ -replikasereaksjon med 0,1  $\mu$ l elueringsmiddel. Denne reaksjonen ble fulgt kinetisk, og identiteten til produkt-RNA ble bestemt ved polyakrylamid-gelelektroforese. I tillegg ble individuelle hybridiserte

dot-blots tilsatt direkte til Q $\beta$ -replikasereaksjoner for å se om bundet RNA kan virke som et templat. Disse reaksjonene inneholdt 100  $\mu\text{g/ml}$  bovint serumalbumin for å utelukke muligheten av at Q $\beta$ -replikase ville bli bundet til nitrocelulosemembranen.

#### Preparering av hybridisasjonsreaksjoner

Åtte forskjellige 70- $\mu\text{l}$  hybridisasjonsreaksjoner ble preparert inneholdende følgende antall molekyler av et transkript av HIV-1 pol regionen:  $2,5 \times 10^8$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^3$ ,  $2,5 \times 10^2$  og  $0,5 \times 10^8$  molekyler av et rekombinant RNA (vist i fig. 2A) inneholdende en probesekvens som er komplementær med en konservert seksjon av pol-regionen til HIV-1 mRNA, ble satt til hver av de åtte reaksjonene og hybridisert til målmolekylene i nærvær av 2,5 M guanidintiocyanat. De resulterende probemålehybridene ble isolert ved tre cykluser av reversibel mål oppfangning og magnetiske kuler som beskrevet på side 36. De rekombinante RNA-probene ble deretter frigjort fra de isolerte hybridene ved inkubasjon i 50  $\mu\text{l}$  av en saltfri buffer ved 37°C. 40  $\mu\text{l}$  av hver av disse åtte oppløsningene ble anvendt for å initiere åtte korresponderende 120- $\mu\text{l}$  Q $\beta$ -replikaseamplifikasjonsreaksjoner. Disse reaksjonene ble inkubert parallelt. 5  $\mu\text{l}$  prøver av hver av de åtte reaksjonene ble tatt ut ved intervaller på to minutter mellom 6 og 8 minutter. Konsentrasjonen av magnesium i disse reaksjonene (7 mM) var halvparten av det som vanligvis blir anvendt, på grunn av at det nylig ble oppdaget at ved lavere magnesiumkonsentrasjoner ble replikasjonshastigheten av forurensende MDV-1 RNA undertrykt sammenlignet med replikasjonshastigheten til rekombinant RNA. En del av RNA innbefattet i hver av de 96 prøvene ble analysert ved akrylamid-gelelektroforese og vist å bare inneholde rekombinant RNA som bekrefter anvendeligheten av å anvende lavere magnesiumkonsentrasjon. Til slutt ble en del av RNA innbefattet i hver av de 96 prøvene (korresponderende til en 1  $\mu\text{l}$  aliquot av amplifikasjonsreaksjonen) presipitert

i 3,5% fosforsyre og bundet til en nylonmembran i et 96-posisjon dot-blot-format.

### Eksperimentelle resultater

#### Konstruksjon av replikerbare prober

Ett av målene ifølge foreliggende oppfinnelse var å konstruere RNA som kunne virke både som en spesifikk probe for *P. falciparum* DNA og som et templat for eksponensiell amplifikasjon ved  $Q\beta$ -replikase. MDV-1 RNA ble valgt som foreldremolekylet på grunn av at modifisert MDV-1 RNA kan bli syntetisert ved transkripsjon fra rekombinante plasmider (13). MDV-1 RNA inneholder mange stabile sekundære strukturer (35-37), og disse sekundære strukturer er nødvendige for replikasjon (38-40). Setet som ble valgt for innsetting av probesekvenser inn i MDV-1 RNA var beliggende på utsiden av molekylet (12) hvor innskuddet i minst mulig grad ville forstyrre strukturen og derfor ikke interferer med replikasjon. Ved valg av sekvensen til proben måtte to hovedsaker bli vurdert: 1) den innsatte sekvensen må kanskje være i en enkelt-trådet konformasjon for at den hybridiserer til målsekvensen; og 2) den innsatte sekvensen må kanskje danne sekundære strukturer, ellers kan produktet og templatet danne en ødeleggende duplex i løpet av replikasjonen (40). På grunn av at disse to hovedsakene tilveiebragte motstridende begrensninger på konstruksjonen av den innsatte sekvensen, ble to rekombinante RNA preparert som hver inneholder en forskjellig probesekvens. Den første rekombinanten, MDV-fal-un RNA, ble ifølge en data-analyse av sekvensen derav (41) bestemt å sannsynligvis ha en proberegion, i henhold til en computeranalyse av dens sekvens (41). Den andre rekombinanten, MDV-fal-st RNA, var forskjellig fra MDV-fal-un RNA i en 5-nukleotidregion. Som en konsekvens var det sannsynlig at den dannet en mer stabil sekundær struktur i regionen inneholdende proben. Figur 2 viser nukleotidsekvensen og

sannsynlig sekundær struktur (41) til MDV-fal-un RNA, MDV-fal-st RNA og MDV-poly RNA.

#### Replikasjon av rekombinante RNA

Fire forskjellige RNA ble preparert ved transkripsjon in vitro: MDV-1, MDV-poly, MDV-fal-un og MDV-fal-st. Elektroforetisk analyse av disse transkriptene, som illustrert i fig. 3 (A), demonstrerte at rekombinantene som inneholdt probesekvenser lett kunne skjeldnes fra de andre transkriptene ved deres relative mobilitet. Transkriptene ble deretter isolert fra reaksjonsblandingen og anvendt som templer for syntesen av ytterligere RNA ved Q $\beta$ -replikase. Kinetisk analyse av mengden av RNA syntetisert i Q $\beta$ -replikasereaksjoner, som vist i fig. 3 (B), demonstrerte at både strukturerte og ustrukturerte rekombinante RNA var gode templer for eksponensiell replikasjon. Videre, som vist i fig. 3 (C), viste elektroforetisk analyse av RNA syntetisert i hver Q $\beta$ -replikasereaksjon at produktene var homogene replikater av de opprinnelige transkriptene.

For å sammenligne replikasjonshastigheten til rekombinant RNA med replikasjonshastigheten til MDV-1 RNA, ble Q $\beta$ -replikasereaksjoner initiert med blandinger av MDV-fal-st (+) RNA og MDV-1 (+) RNA. Reaksjonene ble inkubert i 20 minutter med syntese av omtrent 10 mill. kopier av hvert RNA. RNA-produktene fra reaksjonene ble analysert ved polyakrylamidgelelektroforese. Resultatene er vist i tabell 1, og viser at til tross for at rekombinant RNA er 55 nukleotider lenger enn MDV-1 RNA som de er avledet fra, blir de amplifisert ved vesentlig samme hastighet med Q $\beta$ -replikase.

TABELL 1

Replikasjon av blandinger av MDV-1 RNA og  
rekombinant RNA

Opprinnelig RNA (fg)		Produkt-RNA (ng)	
MDV-1	MDV-fal-st	MDV-1	MDV-fal-st
1	1	42	54
10	1	115	13
1	10	17	149

Eksponeensiell amplifikasjon etter seriefortynning

På grunn av at følsomheten til bioanalyser som anvender replikerbare prober vil avhenge av hvor mange rekombinante molekyler som kan virke som templat for syntesen av en lett påvisbar mengde produkt-RNA, ble en serie Q $\beta$ -replikasereaksjoner initiert med reduserende mengder MDV-fal-un RNA. Resultatene av disse reaksjonsseriene er vist i fig. 4 og demonstrerer at en reaksjon initiert med så få som 1000 molekyler rekombinant RNA (0,14 fg) produserte 129 nanogram rekombinant RNA-produkt etter syntese i 30 minutter, som er en billion ganger amplifikasjon. Omtrent identiske kinetiske resultater ble tilveiebragt i en parallell reaksjonsserie initiert med MDV-fal-st RNA, som viser at den relative mangel på sekundær struktur i proberegionen til MDV-fal-un RNA ikke hadde noen merkbar effekt på replikasjonen.

Elektroforetisk analyse viste at reaksjonsproduktet hvor det ikke var blitt tilsatt eksogent templat, var MDV-1 RNA. Denne analysen er illustrert i fig. 4. Dette var ventet på grunn av at fremgangsmåten som ble anvendt for isolering av Q $\beta$ -repliase (17) ikke eliminerer hele mengden av kontaminerende MDV-1 RNA-molekyler (5). Basert på tiden det tok for at denne reaksjonen skulle oppnå metning (når antallet RNA-

molekyler er lik antallet aktive replikasemolekyler ), er det beregnet at bare 40 molekyler MDV 1 RNA opprinnelig var tilstede. Dette ble bekreftet ved følgende resultater: Når en reaksjon var initiert med 100 molekyler MDV-fal-un RNA, inneholdt 25-minutt-produktet 30% MDV-1 RNA, og en reaksjon initiert med bare 10 molekyler MDV-fal-un RNA inneholdt for det meste MDV-1RNA. Dersom Q $\beta$ -replikase uten kontaminerende RNA (43) var blitt anvendt i stedet for, vil det ha vært ventet at bare rekombinant RNA ville blitt syntetisert.

#### Hybridisasjon av rekombinant RNA

Hvert av de rekombinante RNA ble vist å bli bundet spesifikt til denaturerte plasmider inneholdende en kjent mengde *P. falciparum* målsekvenser (fig. 5). Ingen rekombinant RNA ble bundet til kontrollplasmider som manglet *P. falciparum*-sekvenser. MDV-poly RNA som ikke inneholder en probesekvens ble heller ikke bundet til plasmidene. Disse resultatene demonstrerer at begge rekombinante RNA blir spesifikt bundet til deres målmolekyler og at under de anvendte betingelsene for hybridisasjon hadde tilstedeværelse av strukturen i proberegionen liten innvirkning på hybridisasjonen.

I et annet eksperiment ble forkortede versjoner av hver rekombinant probe preparert ved transkripsjon fra plasmider som var blitt lineærisert ved spaltning med Stu I, i stedet for Sma I. Disse transkriptene hadde en lengde på 111-nukleotider og inneholdt 63 nukleotider fra 5'-enden av MDV-1 (+) RNA og 48 nukleotider fra den innsatte regionen, inkludert hele probesekvensen. Under betingelsene anvendt ved hybridisasjon kunne det ikke bli observert noen forskjell mellom hybridisasjon av forkortet RNA og hybridisasjon av full-lengde RNA. Dette resultatet demonstrerer at den hemmede topologien til MDV-1 domenen (44) som omgir proberegionen i hel-lengdemolekylet har liten innvirkning på evnen som proben har til å hybridisere til målmolekylene.

### Replikasjon av rekombinant RNA etter hybridisasjon

Ytterligere eksperimenter ble utført for å bestemme om hybridiserte rekombinante RNA beholdt evnen til å virke som templat for Q $\beta$ -replikase etter alle manipulasjoner som oppstår i løpet av filterhybridisasjonen. MDV-fal-un RNA som var blitt hybridisert til plasmider inneholdende P. falciparum-sekvenser ble eluert fra dot-blot ved et kort oppvarminstrinn. Elektroforetisk analyse av dette RNA viste at intakte rekombinante molekyler var blitt frigjort. En del av eluert RNA ble deretter testet for å undersøke om det ville virke som et templat for Q $\beta$ -replikase. En ti-million-ganger amplifikasjon oppstod i løpet av 20 minutter. Elektroforetisk analyse av produktet av denne reaksjonen viste at det var rent MDV-fal-un RNA. Fra resultatene fra disse eksperimentene ble det beregnet at minst 10% eluert RNA hadde beholdt dets biologiske aktivitet.

Et annet eksperiment ble utført for å undersøke om rekombinante prober kunne virke som templat for Q $\beta$ -replikase mens de enda var bundet til dot-blots. Membranfragmenter inneholdende hybridisert MDV-fal-un RNA ble inkubert direkte med Q $\beta$ -replikase. Reaksjoner inneholdende membraner med RNA hybridisert til målsekvensene syntetiserte mere rekombinant RNA enn reaksjoner inneholdende membraner som manglet målsekvenser. Disse preliminare resultatene foreslår at et spesielt frigjøringsstrinn ikke behøver å være nødvendig for å initiere replikasjon av hybridiserte rekombinante RNA.

### Resultater av hybridisasjonsreaksjonene

Resultatene er vist i fig. 7.

### Eksperimentell diskusjon

De fleste bioanalysene som anvender molekylære prober er mengden av probe bundet proporsjonalt med antallet mål-molekyler (targets). Amplifikasjonsveier, så som slike som anvender enzymatiske reportergrupper (45) eller polymerase-kjedereaksjoner (46-48), muliggjør at et lite antall

målmolekyler blir påvist. Forholdet mellom størrelsen på det amplifiserte signalet og antall målmolekyler er enda lineær. De unike kinetikk-karakteristika til  $\Phi\beta$ -replikasereaksjonene bør muliggjøre konstruksjon av bioanalyser hvori størrelsen på det amplifiserte signalet er lineær proporsjonal med logaritmen til antall målmolekyler. Fig. 6 anvender data fra eksperimentet vist i fig. 4 for å illustrere dette forholdet: Det logaritmiske antallet rekombinante RNA-molekyler opprinnelig tilstede i hver reaksjon, ble plottet mot mengden RNA syntetisert i løpet av 25 minutter (hvorpå hver reaksjon hadde fullført den eksponensielle fasen av syntesen). Mengden av rekombinant RNA opprinnelig tilsatt til disse reaksjonene kan ansees å representere mengden av proben som ville ha vært bundet til målmolekylene dersom dette hadde vært en virkelig analyse, og mengden av amplifisert RNA etter 25 minutter stimulerer signalet som ville ha blitt påvist. Resultatene viser at størrelsen til det amplifiserte signalet ville være innenfor området på 100 nanogram dersom antallet målmolekyler var så lite som ett tusen eller så stort som 1 mill. Bioanalyser som anvender amplifikasjon ved  $\Phi\beta$ -replikase skal kunne påvise målmolekyler over et område på minst 6 størrelsesordener.

Teoretisk bør analyser som anvender  $\Phi\beta$ -replikase være ekstremt følsomme på grunn av at slike reaksjoner kan bli initiert med så lite som ett molekyltemplat-RNA (10). I praksis vil følsomheten til analysene være begrenset av grad av vedvaring av uspesifikt bundede prober. I eksperimentene beskrevet ovenfor ble det funnet at 600.000 molekyler MDV-fal-un RNA var blitt bundet uspesifikt til nitrocellulose-dot--blots som inneholdt 1,5  $\mu\text{g}$  pUC13 DNA. Det er innlysende at en annen hybridisasjonsteknikk vil være nødvendig for å teste følsomhetsgrensene til analyser som anvender replikerbare prober. Det er et antall lovende metoder som bør resultere i en betraktelig redusert bakgrunn, inkludert de hvor hybridisasjonen oppstår i oppløsning (49-51) og de som anvender sandwich-hybridisasjonsteknikker (52, 53). Ved

kombinering av en teknikk med effektiv bakgrunnsreduksjon med den enorme amplifikasjonen som er innebygget ved anvendelse av replikerbare prober, bør det være mulig å utvikle analyser som kan påvise noen hundre målmolekyler. Dette ville tillate påvisning av relativt sjeldne RNA- eller DNA-molekyler i en undersøkelsesprøve og påvisning av bare et enkelt infeksiosøst middel i en klinisk prøve.

Replikerbare rekombinante RNA inneholdende forskjellige innsatte sekvenser er nylig blitt konstruert. Dette fører til antagelsen om at man ved valg av hensiktsmessige innskudd kan preparere rekombinante RNA-prober som vil kunne påvise nukleinsyren til et hvilket som helst virus, bakterie eller eukaryot parasitt.

Amplifiserte rekombinante RNA inneholder en sekvens (proben) som identifiserer hvilket målmolekyl som ble påvist. Det bør derfor være mulig å konstruere diagnostiske analyser som anvender en blanding av rekombinante RNA som hver inneholder en probesekvens spesifikk for genomet til et annet infektiosøst middel. Etter amplifikasjon med Q $\beta$ -replikase, vil RNA-populasjonen inneholde replikater av bare de probene som var blitt bundet til målmolekylene derav. Påfølgende hybridisasjon av disse amplifiserte RNA til en membraninneholdende en bestemt rekke av DNA-dot-blots komplementære med hver av probene, ville tillate samtidig identifikasjon av flere forskjellige organismer i samme prøve.

Størrelsen på hver flekk i figur 7 viser mengden av RNA som er tilstede ved hvert tidspunkt. Til tross for at RNA ikke kan sees i løpet av de tidlige tidspunktene i hver reaksjon, er dette perioden hvor RNA-populasjonen øker eksponensielt. RNA blir synlig på samme tid som antallet RNA-molekyler er lik antallet aktive replikasemolekyler ("metningspunktet"). Mengden av RNA i de synlige tidspunktene øker lineært. Resultatene viser at tidspunktet hvorpå metningspunktet oppstår i hver amplifikasjonsreaksjon er en funksjon av

antallet målmolekyler som opprinnelig var tilstede i den korresponderende hybridisasjonsreaksjon. Desto mindre målmolekyler som var tilstede, desto mindre er antallet prober som var bundet til målmolekylene og dermed desto mindre er antallet prober som var tilgjengelige for å initiere amplifikasjonsreaksjonen. Dette resultatet demonstrerer at en automatisert analyse kan bli utviklet, hvori en påvisningsanordning (basert for eksempel på fluorescens eller en RNA-ligand, så som etidiumbromid) kan bli brukt for å bestemme tidspunkt for metning. Antall prober opprinnelig tilstede i amplifikasjonsreaksjonen (som vil være proporsjonal med antall målmolekyler i prøven) kan deretter bli beregnet fra tidspunktet det tok for å oppnå metning. Resultatene demonstrerer også en alternativ vei for å bestemme antall målmolekyler tilstede i prøven. Mengden av RNA tilstede ved et spesielt tidspunkt etter at alle reaksjoner har oppnådd metning (f.eks. etter 24 min.) er lineært proporsjonal med logaritmen av antall prober opprinnelig tilstede i hver amplifikasjonsreaksjon (se også fig. 6).

Resultatene av denne forbedrede analysen viser at grensen for følsomheten nå er mellom 2500 og 25000 målmolekyler. Reaksjoner injisert med prober frigjort fra hybridisasjonsreaksjonene som inneholdt et lite antall målmolekyler ga omtrent ikke skjeldnbare resultater. På grunn av at RNA som fremkom fra disse reaksjonene var rekombinant RNA, bestod frigjort RNA hovedsakelig av ikke-spesifikt hybridiserte prober som ikke ble fjernet i løpet av den hybride isolasjonsprosedyren.

Referanser

1. Gillespie, D. and Spiegelman, S. (1965) J. Mol. Biol. 12, 829-842.
2. Chu, B.C.F., Kramer, F.R. and Orgel, L.E. (1986) Nucleic Acids Res. 14, 5591-5603.
3. Haruna, I. and Spiegelman, S. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 579-587.
4. Haruna, I. and Spiegelman, S. (1965) Science 150, 884-886.
5. Kramer, F.R., Mills, D.R., Cole, P.E., Nishihara, T. and Spiegleman, S. (1974) J. Mol. Biol. 89, 719-736.
6. Weissmann, C., Felix, G. and Slor, H. (1986) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 83-100.
7. Spiegelman, S., Pace, N.R., Mills, D.R., Levisohn, R., Eikhom, T.S., Taylor, M.M., Peterson, R.L. and Bishop, D.H.L. (1968) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 101-124.
8. Dobkin, C., Mills, D.R., Kramer, F.R. and Spiegelman, S. (1979) Biochemistry 18, 2038-2044.
9. Haruna, I. and Spiegelman, S. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1189-1193.
10. Levisohn, R. and Spiegelman, S. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 866-872.

- 5
11. Kacian, D.L., Mills, D.R., Kramer, F.R. and Spiegelman, S. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3038-3042.
12. Miele, E.A., Mills, D.R. and Kramer, F.R. (1983) J. Mol. Biol. 171, 281-295.
- 10
13. Mills, D.R., Axelrod, V.D., Tussie-Luna, I., Lizardi, P.M. and Kramer, F.R. (1988) manuscript in preparation.
- 15
14. Franzen, L., Westin, G., Shabo, R., Aslund, L., Perlmann, H., Persson, T., Wigzell, H. and Pettersson, U. (1984) Lancet 1, 525-528.
- 20
15. Aslund, L., Franzen, L., Westin, G., Persson, T., Wigzell, H. and Pettersson, U. (1985) J. Mol. Biol. 185, 509-516.
16. Zolg, J.W., Andrade, L.E. and Scott, E.D. (1987) Mol. Biochem. Parasitol. 22, 145-151.
- 25
17. Eoyang, L. and August, J.T. (1971) in Cantoni, G.L. and Davis, D.R. (eds) Procedures in Nucleic Acid Research, Harper and Row, New York, Vol. 2, pp. 829-839.
- 30
18. Gait, M.J. (1984) Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford.
- 35
19. Matthes, H.W.D., Zenke, W.M. Grundstrom, T., Staub, A., Wintzerith, M. and Chambon, P. (1984) EMBO J. 3, 801-805.

- 5
20. Lo, K-M., Jones, S.S., Hackett, N.R. and Khorana, H.G. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 2285-2289.
21. Bausch, J.N. Kramer, F.R., Miele, E. A., Dobkin, C. and Mills, D.R. (1983) J. Biol. Chem. 258, 1978-1984.
- 10
22. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
23. Mizusawa, S., Nishimura, S. and Seela, F. (1986) Nucleic Acids Res. 14, 1319-1324.
- 15
24. Biggin, M.D., Gibson, T.J. and Hong, G.F. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965.
- 20
25. Wallace, R.B., Johnson, M.J. Suggs, S.V., Miyoshi, K., Bhatt, R, and Itakura, K. (1981) Gene 16, 21-26.
26. Osterman, H.L and Coleman, J. E. (1981) Biochemistry 20, 4885-4892.
- 25
27. Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981) Anal Biochem. 114, 193-197.
- 30
28. Bywater, M., Bywater, R. and Hellman, L. (1983) Anal. Biochem. 132, 219-224.
29. Axelrod, V.D. and Kramer, F.R. (1985) Biochemistry 24, 5716-5723.
- 35
30. Tullis, R.H. and Rubin, H. (1980) Anal. Biochem. 107, 260-264.

31. Maniatis, T., Jeffrey, A. and van deSande, H.  
(1975) *Biochemistry* 14, 3787-3794.
- 5 32. Sammons, D.W., Adams, L.D. and Nishizawa, E.E.  
(1981) *Electrophoresis* 2, 135-141.
33. Maxwell, I.H., Van Ness, J. and Hahn, W.E. (1978)  
*Nucleic Acids Res.* 5, 2033-2038.
- 10 34. Kafatos, F.C. Jones, C.W. and Efstratiadis, A.,  
(1979) *Nucleic Acids Res.* 7, 1541-1552.
35. Klotz, G., Kramer, F.R., and Kleinschmidt, A.K.  
15 (1980) *Electron Microscopy* 2, 530-531.
36. Mills, D.R., Kramer, F.R., Dobkin, C., Nishihara,  
T. and Cole, P.E. (1980) *Biochemistry* 19, 228-  
236.
- 20 37. Kramer, F.R. and Mills, D.R. (1981) *Nucleic Acids/  
Res.* 19, 5109-5124.
38. Mills, D.R., Dobkin, C. and Kramer, F.R. (1978)  
25 *Cell* 15, 541-550.
39. Nishihara, T., Mills, D.R. and Kramer, F.R.  
(1983) *J. Biochem.* 93, 669-674.
- 30 40. Priano, C., Kramer, F.R. and Mills, D.R. (1987)  
*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52, 321-  
330.
41. Zuker, M. and Stiegler, P. (1981) *Nucleic Acids  
35 Res.* 9, 133-148.

42. Mills, D.R., Kramer, F.R. and Spiegelman, S.  
(1973) Science 180, 916-927.
- 5
43. Hill, D. and Blumenthal, T. (1983) Nature 301,  
350-352.
44. Biebricher, C.K., Diekmann, S. and Luce, R.  
10 (1982) J. Mol. Biol. 154, 629-648.
45. Leary, J.J., Brigati, D.J. and Ward, D.C. (1983)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4045-4049.
- 15
46. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis,  
K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.  
(1985) Science 230, 1350-1354.
47. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf,  
20 S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and  
Erlich, H.A. (1988) Science 239, 487-491.
48. Erlich, H.A., Gelfand, D.H. and Saiki, R.K.  
(1988) Nature 331, 461-462.
- 25
49. Kohne, D.E., Levison, S.A. and Byers, M.J. (1977)  
Biochemistry 16, 5329-5341.
50. Pellegrino, M.G., Lewin, M., Meyer, III, W.A.  
30 Lanciotti, R.S., Bhaduri-Hauck, L., Volsky, D.J.,  
Sakai, K., Folks, T.M. and Gillespie, D., (1987)  
BioTechniques 5, 452-459.
51. Urdea, M.S., Running, J.A. Horn, T., Clyne, J.,  
35 Ku, L. and Warner, B. D. (1987) Gene 61, 253-264.

52. Palva, A. and Ranki, M. (1985) Clin. Lab./Med. 5, 475-490.
- 5 53. Syvanen, A.-C., Laaksonen, M. and Soderlund, H. (1986) Nucleic Acids Res. 14, 5037-5048.
54. Kutateladze, T.V., Axelrod, V.D. Gorbulve, V.G., Belzhelarskaya, S.N. and Vartikyan, R.M. (1979) 10 Anal. Biochem. 100, 129-135.
55. Matthews, J.A., Batki, A., Hynds, C. and Kricka, L.J. (1985) Anal. Biochem. 151, 205-209.
- 15 56. Forster, A.C., Melnnes, J.L. Skingle, D.C. Symons, R.H. (1985), Nucleic Acids Res. 13(3), 745-761.
- 20 57. Cosstick, R., McLaughlin, L.W. and Eckstein, F. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 1791-1810.
58. Dahlberg, A.E., Dingman, C. W. and Peacock, A.C, (1969) J. Mol. Biol. 41, 139-147.
- 25 59. Dingman, C.W. and Peacock, A.C., (1968) Biochemistry, 7, 2038-2044.
60. Igloi, G.L. (1983) Anal. Biochem. 134, 184-188.
- 30 61. Sharop, P.A., Sugden, B. and Sambrook, J. (1973) Biochemistry 12, 3055-3063.
62. Bailey, J.M. and Davidson, N. (1976) Anal. Biochem. 70. 75-85.

63. Oi, V. T., Glazer, A.N. and Stryer, L. (1982) J. Cell. Biol. 93, 981-986.

5

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

Replikerbart og hybridiserbart rekombinant enkelt-trådet RNA-probemolekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e t omfatter:

- a) en gjenkjenningssékvens for binding av en RNA-rettet RNA-polymerase;
- b) en sékvens nødvendig for initiering av produkt-trådsyntesen til polymerasen og
- c) en heterolog RNA-sékvens skutt inn ved et spesifikt sete i den indre regionen av det rekombinante molekylet og komplementær med et oligo- eller polynukleotid av interesse som tilsvarer en spesifikk gensekvens eller del derav, i det den innskutte heterologe RNA sékvensen er tilstrekkelig enkelt-trådet for hybridisering med den spesifikke gensekvensen og med tilstrekkelig stabil sekundær struktur for effektiv replikasjon.

2.

Replikerbart og hybridiserbart rekombinant enkelt-trådet RNA-probemolekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e t omfatter:

- (a) en gjenkjennings-sékvens for binding av en RNA-rettet RNA polymerase;
- (b) en sékvens nødvendig for initiering av produkt-trådsyntesen til polymereasen; og
- (c) en heterolog RNA sékvens skutt inn ved et spesifikt sete i den indre regionen til det rekombinante molekylet og komplementær med et oligo- eller

polynukleotid av interesse som tilsvarer en spesifikk nukleinsyresekvens til et infeksiosøst middel, i det den innskutte heterologe RNA sekvensen er tilstrekkelig enkelt-trådet for hybridisering med den spesifikke nukleinsyresekvensen og med tilstrekkelig stabil sekundær struktur for effektiv replikasjon.

3.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at gjenkjenningssekvensen for binding av en RNA-rettet RNA polymerase er i en indre region av molekylet.

4.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at innskuddssetet ikke er nær noen sekvens nødvendig for binding av RNA polymerasen eller for initiering av produkttråd syntesen.

5.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at innskuddet har en minimal virkning på replikerbarheten til molekylet.

6.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 4, karakterisert ved at innskuddet har en minimal virkning på den sekundære og tertiære strukturen til molekylet.

7.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at sekvensen nødvendig for initiering av produkttråd syntesen er en cytidin-rik 3'-terminal sekvens.

8.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at den RNA-rettede RNA-polymerasen er Q $\beta$ -replikase.

9.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at det spesifikke innskuddssetet er ved et spesifikt nukleotid.

10.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at molekylet er en variant-RNA-templat for Q $\beta$ -replikase eller en mutant derav.

11.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at variant RNA-templatet er MDV-1 RNA eller en mutant derav.

12.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at MDV-1 RNA er MDV-1 (+) RNA.

13.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at MDV-1 RNA er MDV-1 (-) RNA.

14.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at den heterologe sekvensen av interesse blir skutt inn mellom nukleotidene 63 og 64.

15.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at molekylet er et

transkript avledet fra et rekombinant plasmid ved inkubasjon med en DNA-rettet RNA-polymerase.

16.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 15, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at molekylet er et variant-RNA-  
templat for Q $\beta$ -replikase eller en mutant derav.

17.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 16, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at molekylet er MDV-1 RNA eller en  
mutant derav.

18.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 17, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at MDV-1 RNA er MDV-1 (+) RNA.

19.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 17, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at MDV-1 RNA er MDV-1 (-) RNA.

20.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 18, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at den heterologiske sekvensen blir  
skutt inn mellom nukleotidene 63 og 64.

21.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 1, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at den spesifikke gensekvensen er  
et allel eller en del derav.

22.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 2, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at det infeksiøse midlet er et  
virus.

23.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 2, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at det infeksiøse midlet er et  
viroid eller virusoid.

24.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 2, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at det infeksiøse midlet er en  
prokaryot.

25.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 24, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at prokaryoten er en bakterie.

26.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 2, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at det infeksiøse midlet er en  
eukaryot.

27.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 26, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at eukaryoten er en parasittisk  
protozo.

28.

Rekombinant-RNA probemolekyl ifølge krav 27, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at den parasittiske protozoen  
forårsaker malaria.

29.

Fremgangsmåte for å bestemme tilstedeværelse eller konsentra-  
sjon av oligo- eller polynukleotid av interesse i en prøve,  
k a r a k t e r i s e r t v e d følgende trinn:

(a) dannelsen av et spesifikt kompleks mellom det  
rekombinante-RNA probemolekylet ifølge krav 1 eller 2  
og oligo- og polynukleotid av interesse, ved

inkubering av prøven med det rekombinante-RNA probemolekylet under egnede betingelser og i tilstrekkelig tidsperiode for å muliggjør at komplementære nukleotidsekvenser hybridiserer;

- (b) fjerning av uhybridisert rekombinante-RNA probemolekyler fra reaksjonsblandingen
- (c) inkubering av reaksjonsblandingen med en RNA-rettet RNA polymerase med evne til å syntetisere ytterligere kopier av de rekombinante-RNA probemolekylene som blir hybridisert til oligo- eller polynukleotidet av interesse og
- (d) detektering av rekombinat-RNA probemolekyler syntetisert i trinn (c) for derved å bestemme tilstedeværelse eller konsentrasjon av oligo- eller polynukleotidet av interesse.

30.

Fremgangsmåte ifølge krav 29, karakterisert ved at oligo- eller polynukleotidet i prøven er bundet til en fast bærer.

31.

Fremgangsmåte ifølge krav 30, karakterisert ved at den faste bæreren er en nitrocellulose eller nylonmembran.

32.

Fremgangsmåte ifølge krav 29, karakterisert ved at i trinn (a) er oligo- eller polynukleotidet av interesse og det rekombinante-RNA probemolekylet i oppløsning.

33.

Fremgangsmåte ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at i trinn (b) blir de hybridiserte rekombinant-RNA probemolekylene separert fra uhybridiserte probemolekyler gjennom oppfangning av oligo- eller polynukleotidet på en fast bærer.

34.

Fremgangsmåte ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at detekteringen blir utført ved inkorporering av radioaktivt merkede ribonukleosid 5'-trifosfatforløpere inn i rekombinante RNA-produkter.

35.

Fremgangsmåte ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at detekteringen blir utført ved inkorporering av kjemiske modifiserte ribonukleosid 5'-trifosfatforløpere til rekombinante-RNA produkter.

36.

Fremgangsmåte ifølge krav 35, k a r a k t e r i s e r t v e d at de kjemiske modifiserte ribonukleosid 5'-trifosfatforløpere er biotinylerte.

37.

Fremgangsmåte ifølge krav 35, k a r a k t e r i s e r t v e d at de kjemisk modifiserte ribonukleosid 5'-trifosfatforløperne er fluorescerende.

38.

Fremgangsmåte ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at detekteringen utføres ved binding av RNA-spesifikke kromogene eller fluorogene farvestoffer til rekombinante-RNA produkter.

39.

Fremgangsmåte ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at detekteringen utføres ved hjelp av fysiske metoder.

40.

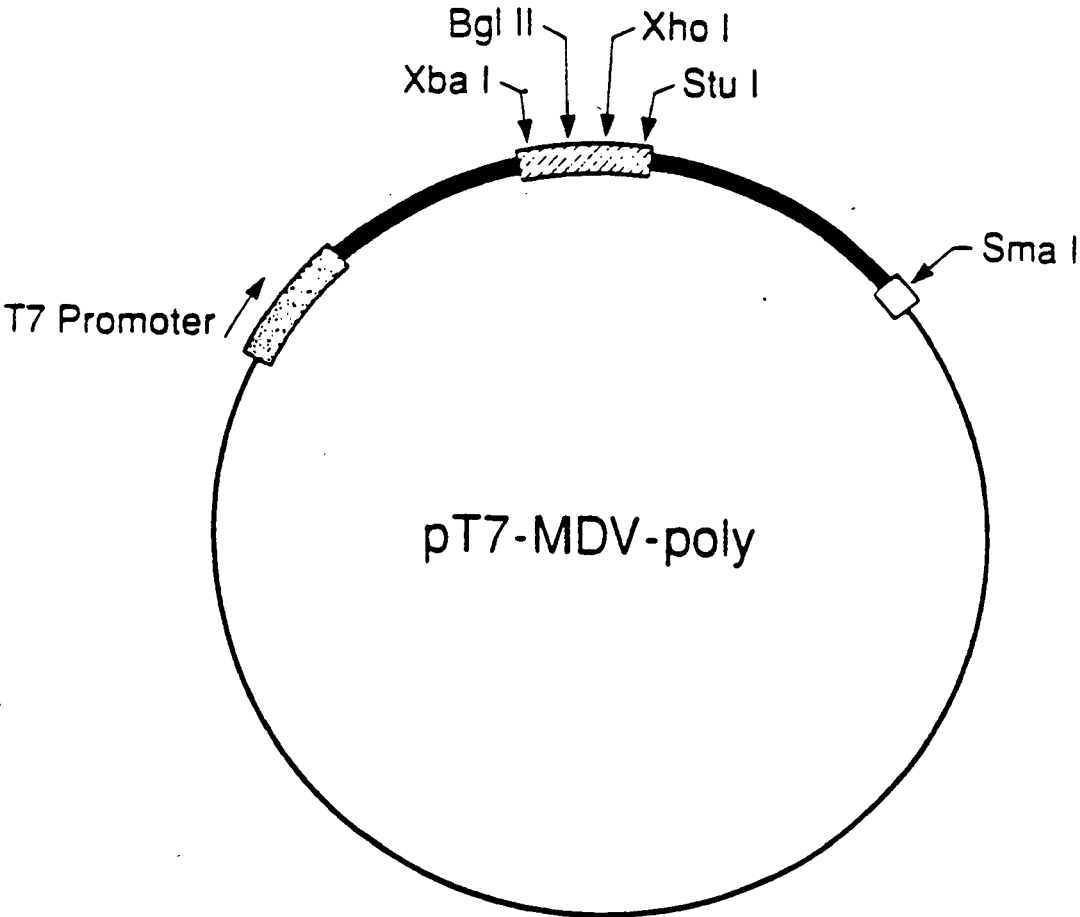
Fremgangsmåte ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at i trinn (c) er RNA-rettet RNA-polymerase Q $\beta$ -replikase.

41.

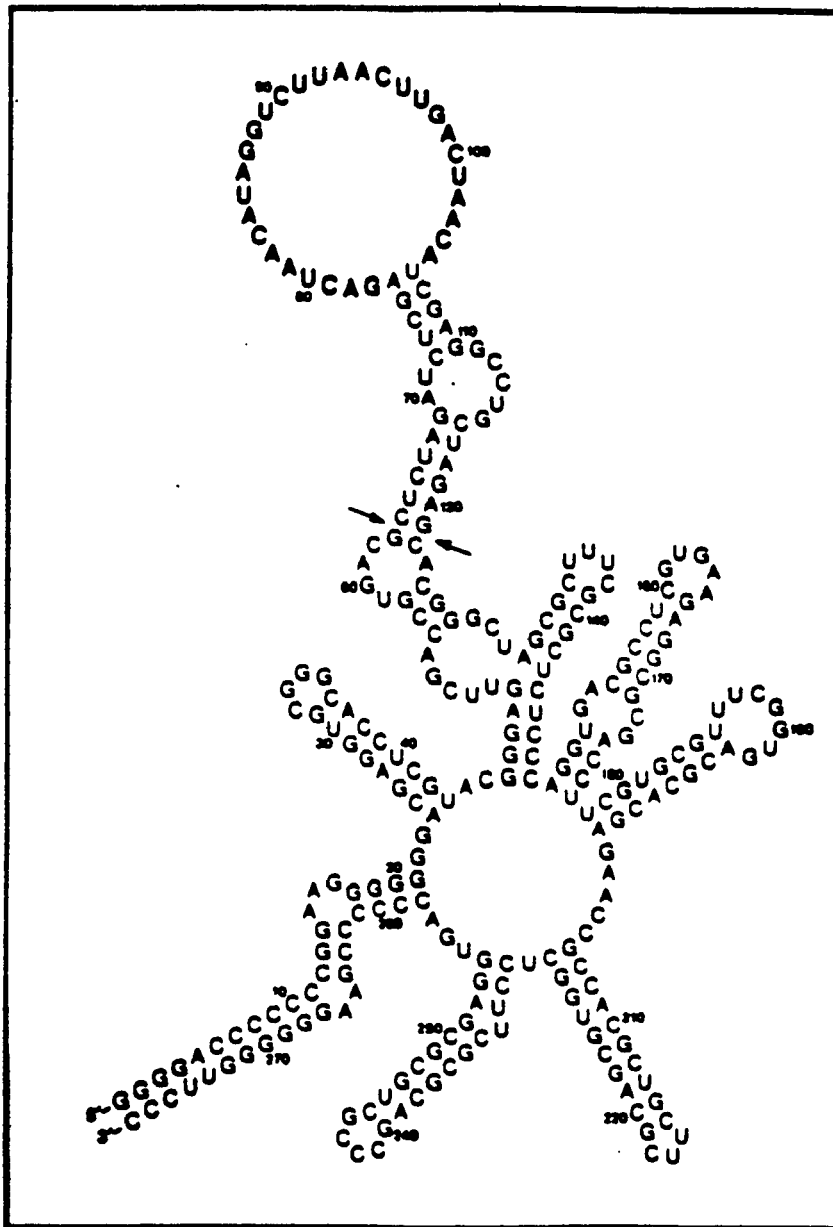
Fremgangsmåte ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at inkubasjonstiden i trinn (c) er tilstrekkelig kort slik at antallet rekombinant-RNA produkttråder ikke overskrider antall polymerasemolekyler, med det resultatet at antallet rekombinant-RNA produktmolekyler er lineært proporsjonalt med antallet rekombinant-RNA probemolekyler som opprinnelig hybridiserte.

42.

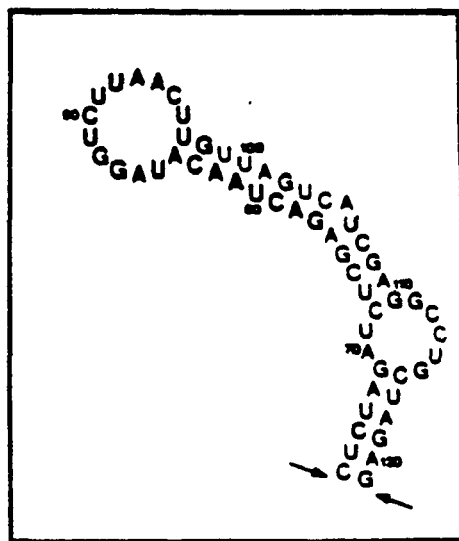
Fremgangsmåte ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at inkubasjonstiden i trinn (c) er tilstrekkelig lang slik at antallet rekombinant-RNA produkt-tråder overskrider antallet polymerasemolekyler, med det resultatet at antallet rekombinant-RNA produktmolekyler er proporsjonal med logaritmen til antallet rekombinant-RNA probemolekyler som opprinnelig hybridiserte.



Figur 1

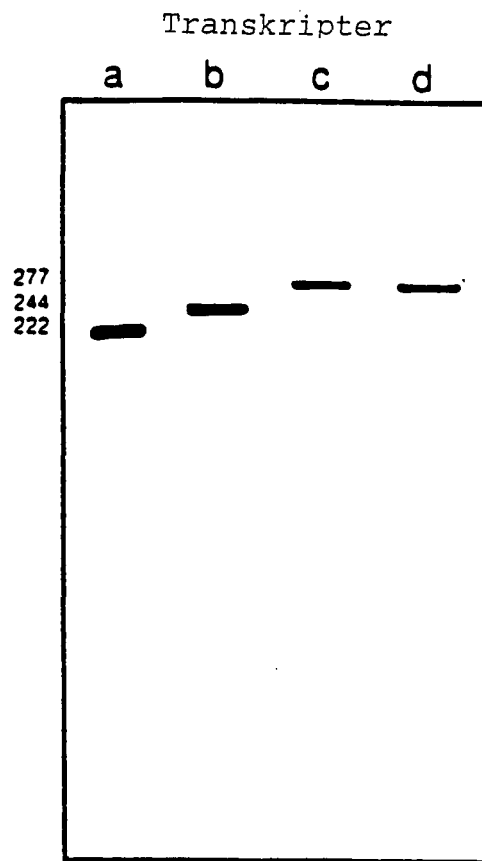


Figur 2(A)

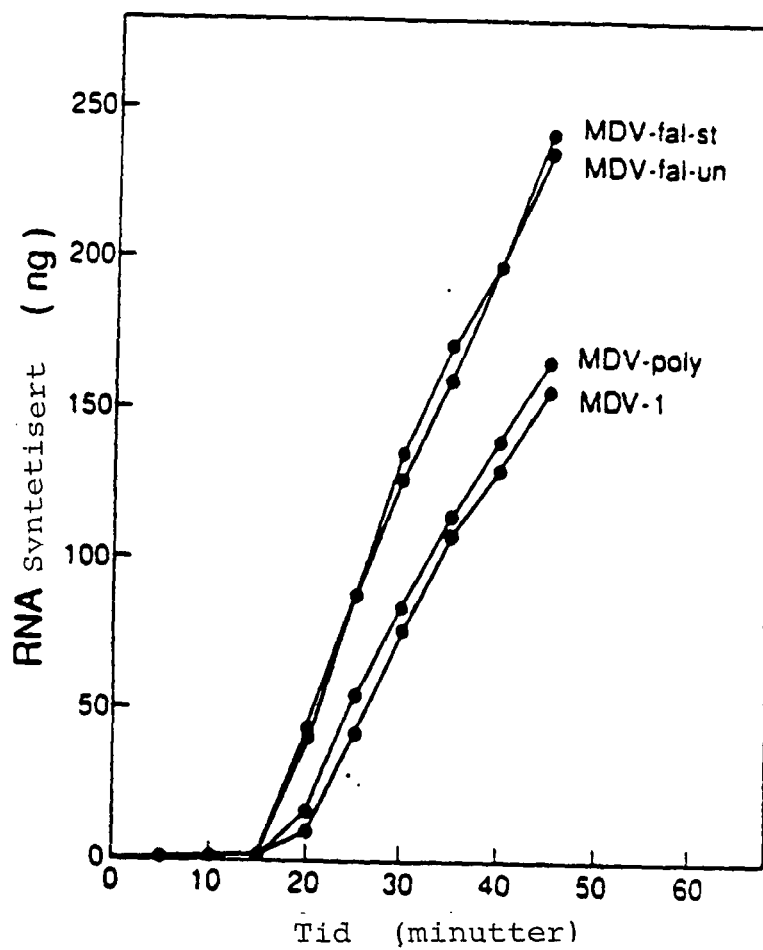


Figur 2(B)

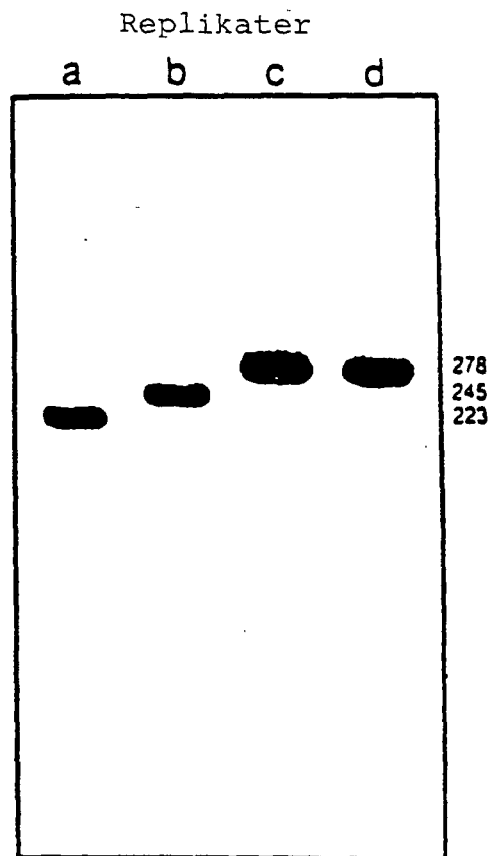




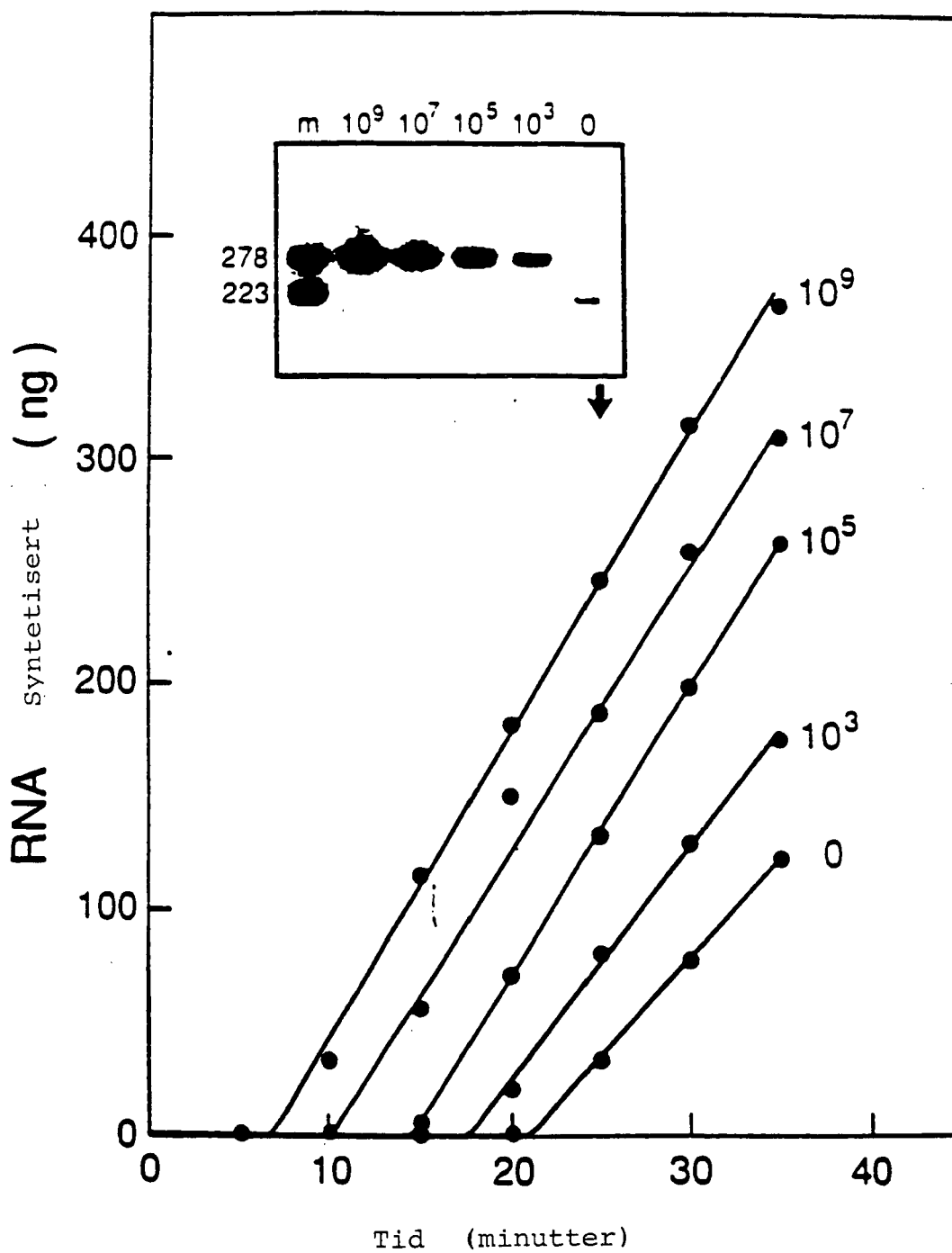
Figur 3(A)



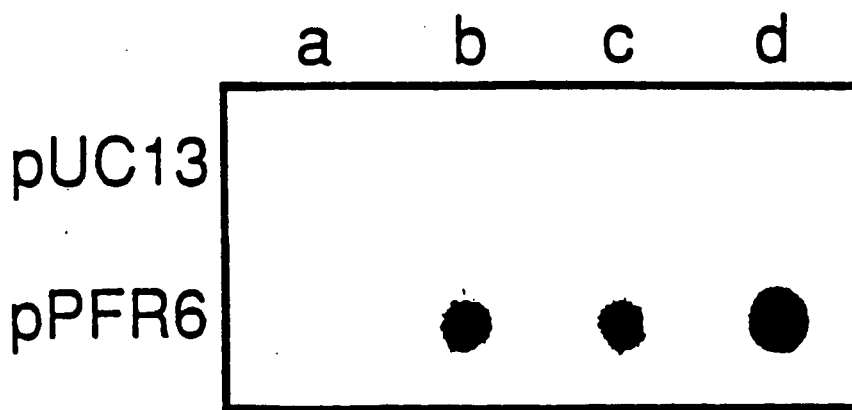
Figur 3(B)



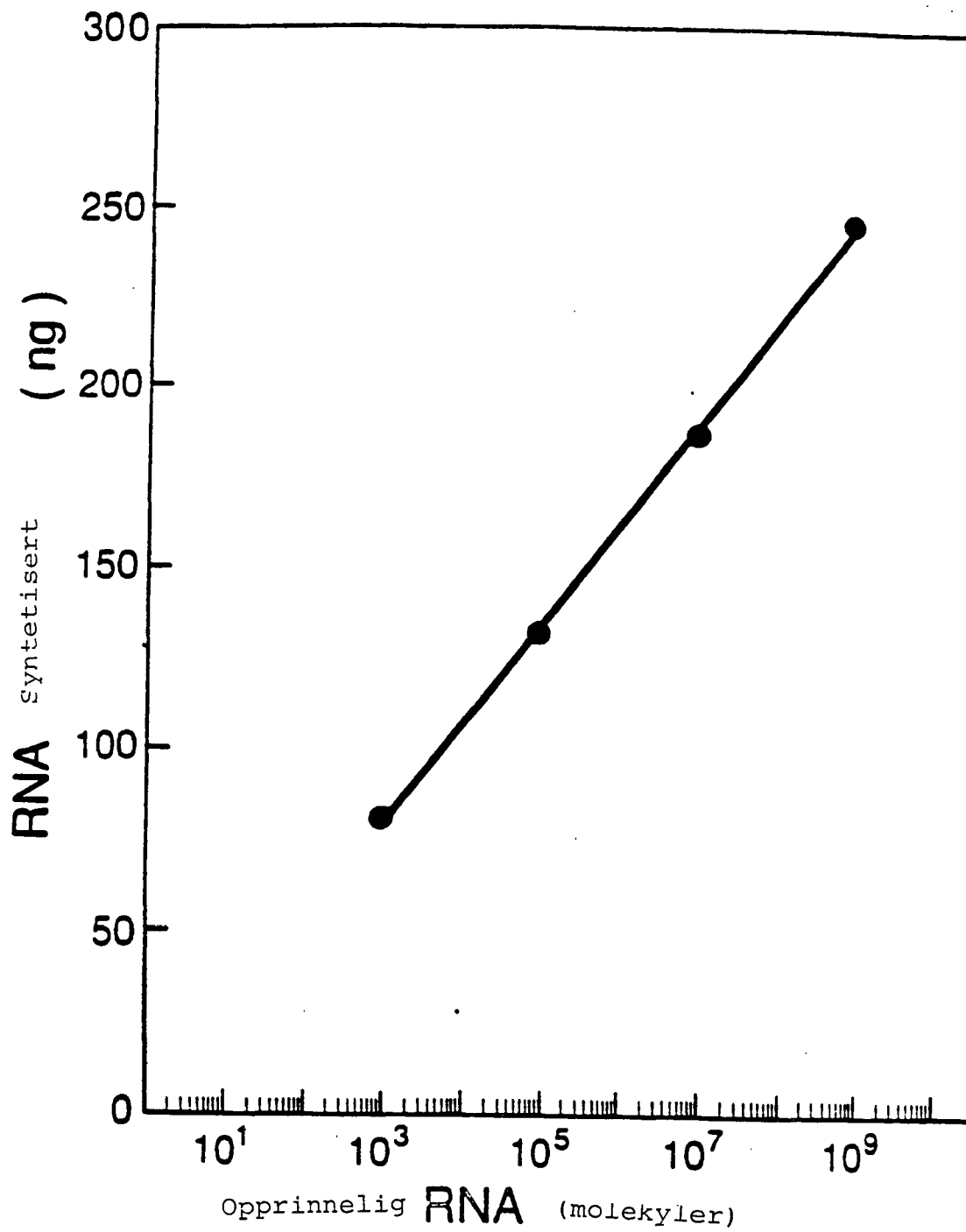
Figur 3(C)



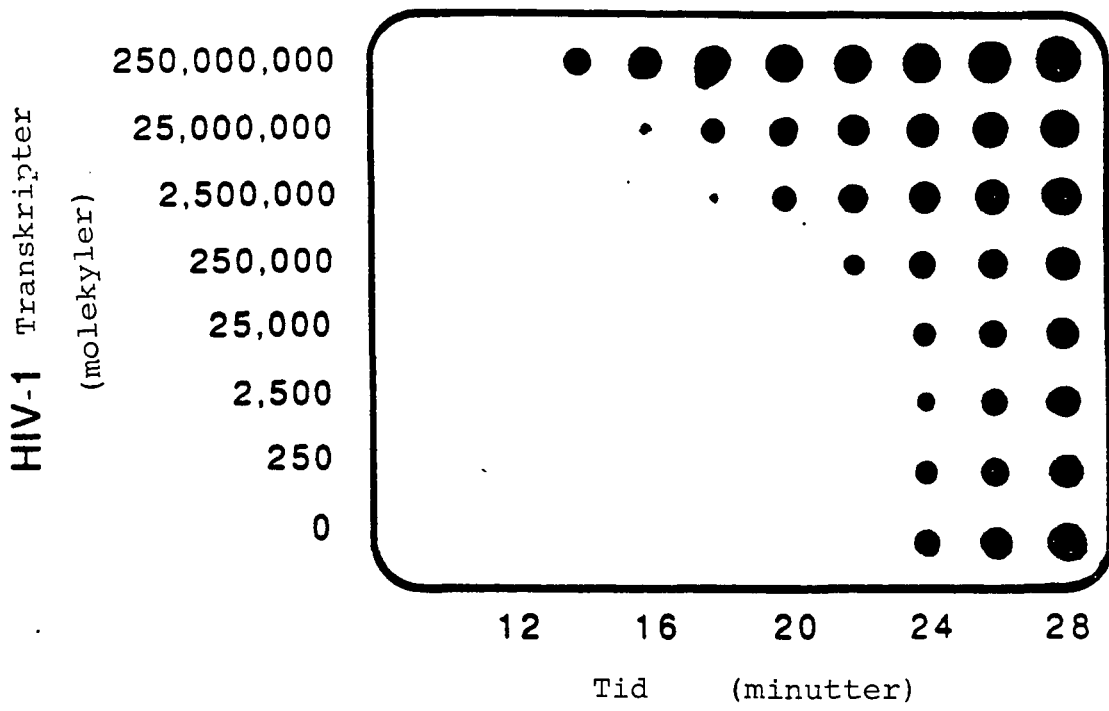
Figur 4



Figur 5



Figur 6



Figur 7