



(12) PATENT

(11) 343803

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

C12Q 1/48 (2006.01)

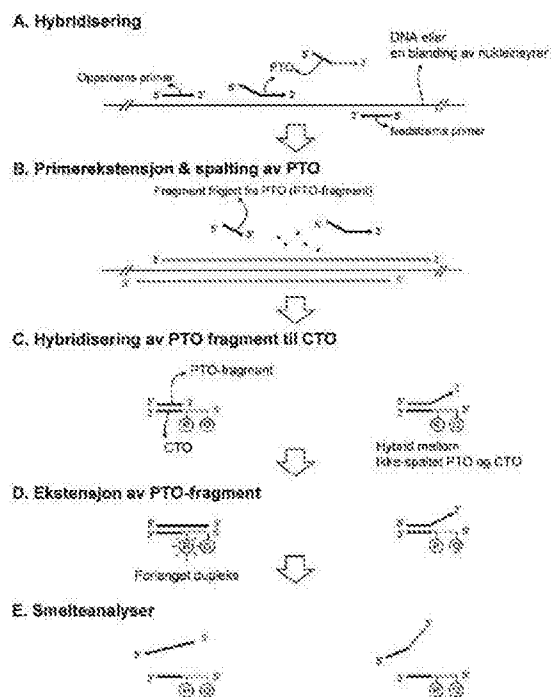
C12Q 1/68 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20121065	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2012.01.11 PCT/KR2012/000287
(22)	Inng.dag	2012.09.19	(85)	Videreføringsdag	2012.09.19
(24)	Løpedag	2012.01.11	(30)	Prioritet	2011.01.11, KR, 10-2011-0002840 2011.03.16, KR, 10-2011-0023465 2012.06.17, PC, 10-2011-0023465
(41)	Alm.tilgj	2012.12.18			
(45)	Meddelt	2019.06.11			
(73)	Innehaver	Seegene Inc, 8FL, 9FL, Taewon Building, 65-5, Bangi-dong, 138-050 SONGPA-GU, SEOUL, Sør-Korea Jong-Yoon Chun, 101-3702 Jamsil The Sharp Star Park 7-14 Sincheon-dong, 138-794 SONGPA-GU, SEOUL, Sør-Korea Young Jo Lee, 112-3501 Parkrio Apt. 17 Sincheon-dong, 138-240 SONGPA-GU, SEOUL, Sør-Korea ACAPO AS, Postboks 1880 Nordnes, 5817 BERGEN, Norge			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig				
(54)	Benevnelse	Deteksjon av mål-nukleinsyresekvenser med PTO-spaltning og ekstensjonsanalyse			
(56)	Anførte publikasjoner	LYAMICHEV V. ET AL. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. Nat Biotechnol. 1999, vol. 17, no. 3, side 292-296. OLIVIER M. The Invader assay for SNP genotyping. Mutat Res. 2005, vol. 573, no. 1-2, side 103-110. Review. ROUX P. ET AL. Direct measurement of multiple mRNAs in nerve growth factor-induced PC12 cells using electrophoretic tags to monitor biomarkers of neuronal differentiation in 96-well format. Assay Drug Dev Technol. 2004, vol. 2, no. 6, side 637-646. ALLAWI HT. ET AL. Quantitation of microRNAs using a modified Invader assay. RNA. 2004, vol. 10, no. 7, side 1153-11561.			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives deteksjon av en målnukleinsyresekvens med PTOCE PTO (PTO spaltning og ekstensjon) analyse. En målnukleinsyresekvens hvor PTOen (probe- og fangeoligonukleotid) som er hybridisert med målnukleinsyresekvensen spaltes og frigjør et fragment, og frag-5 mentet hybridiseres med CTOen (fange og templat oligonukleotid) og danner en forlenget dupleks, etterfulgt av deteksjon av den forlengede dupleks. Den forlengede dupleks tilveiebringer signaler (generering, økning, utsløkking eller redusering av signaler) fra markørene som indikerer nærvær av den forlengede dupleks og har justerbar Tm-verdi, som er godt tilpasset for deteksjon av nærvær av målnukleinsyresekvensen.



BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

OMRÅDE FOR OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for å detektere en

- 5 målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en blanding av nukleinsyrer med en PTOCE (PTO spalting og ekstensjon) analyse, og anvendelse av et kitt for å detektere en målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en blanding av nukleinsyrer med en PTOCE analyse, for anvendelse i utførelse av nevnte fremgangsmåte.

10 BESKRIVELSE AV TEKNIKKENS STAND

DNA-hybridisering er en fundamental fremgangsmåte innen molekylær biologi og påvirkes av ionestyrke, basesammensetning, lengde på fragment hvortil nukleinsyren har blitt redusert, grad av mismatch, og nærvær av denaturerende midler. DNA-hybridiseringsbaserte teknologier vil være svært nyttige redskaper i spesifikk nukleinsyresekvens-

15 bestemmelse og er klart verdifulle innen klinisk diagnose, genforskning, og rettslaboratorieanalyser.

- Imidlertid, de konvensjonelle fremgangsmåter og prosesser som for det meste avhenger av hybridisering produserer svært sannsynlig falske positive resultater på grunn av ikke-
- 20 spesifikk hybridisering mellom prober og ikke-målsekvenser. Derfor, der er problemer som må løses for å bedre deres pålitelighet.

I tillegg til probehybridiseringsprosesser, har flere løsninger som anvender ytterligere enzymatiske reaksjoner, for eksempel TaqManTM-probe metoden, blitt foreslått.

25

I TaqManTM-probe metoden, hybridiserer den merkete probe med en målnukleinsyresekvens spaltet med en 5'-nukleaseaktivitet av en oppstrøms primer-avhengig DNA-polymerase, som genererer et signal som indikerer nærvær av en målsekvens (U.S. patent nr. 5,210,015, 5,538,848 og 6,326,145). TaqManTM-probe metoden antyder to løsninger for

30 signalgenerering: polymeriseringsavhengig spalting og polymeriseringsuavhengig spalting. I polymeriseringsavhengig spalting må ekstensjon av oppstrøms primer forekomme før en nukleinsyre polymerase treffer 5'-enden av den merkete probe. I det ekstensjonsreaksjonen fortsetter, spalter polymerasen progressivt 5'-enden av den merkete probe. I polymeriseringsuavhengig spalting, hybridiseres oppstrøms primer og den merkete probe med en mål-

nukleinsyresekvens i nærhet slik at binding av nukleinsyre polymerasen til 3'-enden av den oppstrøms primer setter denne i kontakt med 5'-enden av den merkete probe for å frigjøre markøren. I tillegg, TaqMan™ – probe metoden beskriver at den merkete probe ved dets 5'-ende har en 5'-haleregion som ikke er hybridiserbar med en målsekvens som også spaltes for å danne et fragment omfattende 5'-haleregionen.

Der har også blitt rapportert noen metoder hvor en probe som har en 5'-haleregion som er ikke komplementær til en målsekvens spaltes med 5'-nuklease for å frigjøre et fragment som omfatter 5'-haleregionen.

For eksempel, U.S. patent 5,691,142 beskriver en spaltingsstruktur som kan oppkuttet med en 5'-nukleaseaktivitet av DNA polymerase. Spaltingsstrukturen er eksemplifisert hvor en oligonukleotid omfattende en 5'-porsjon som er ikke-komplementær til, og en 3' -porsjon komplementær til et templat hybridiseres med templatet og et oppstrøms oligonukleotid hybridiseres med templatet i nær nærhet. Spaltingsstrukturen spaltes med DNA-polymerase som har 5'-nukleaseaktivitet eller modifisert DNA-polymerase med redusert synteseaktivitet for å frigjøre 5'-porsjonen som er ikke-komplementær til templatet. Den frigjorte 5'-porsjon hybridiseres deretter med et oligonukleotid som har en hårnålsstruktur for å danne en spaltingsstruktur, og induserer dermed progressive spaltingsreaksjoner for å detektere en målsekvens.

U.S. patent nummer 7,381,532 beskriver en fremgangsmåte hvor spaltingsstrukturen som har oppstrøms oligonukleotid med blokkert 3'-ende spaltes med DNA-polymerase som har 5'-nukleaseaktivitet eller FEN nuklease for å frigjøre ikke-komplementær 5'-flap-region, og den frigjorte 5'-flap region detekteres med størrelsesanalyse eller interaktiv dobbel-markering. U.S: patent nummer 6,893, 819 beskriver at de detekterbare frigjorte flap produseres med en nukleinsyresyntese-avhengig, flap-mediert sekvensvis amplifiserings-metode. I denne fremgangsmåte spaltes en frigjort flap fra en første spaltingsstruktur, i en nukleinsyresynteseavhengig måte, en andre spaltingsstruktur frigjør en flap fra den andre spaltingsstruktur og de frigjorte flap detekteres.

Med hybridisering av fluorescensmerkete prober i en væskefase, kan et flertall målnukleinsyresekvenser samtidig detekteres ved anvendelse av en enkel type fluoriserende markør med smeltekurveanalyser. Imidlertid, de konvensjonelle teknikker for å detektere målsekvensen med 5'-nukleasemediert spalting av interaktive-dobbeltmerkete prober krever

forskjellige typer fluorescerte markører for forskjellige målsekvenser i multipleks deteksjon, som begrenser antallet målsekvenser som kan detekteres på grunn av begrensning av antallet typer fluorescerende markører.

- 5 U.S. patent søknad publiseringsnummer 2008-0241838 beskriver en måldeteksjonsmetode som anvender spalting av en probe som har en 5'-porsjon som er ikke-komplementær til en målnukleinsyresekvens og hybridisering av en fangeprobe. En markør posisjoneres på den ikke-komplementære 5'-posisjon, den merkete probe som er hybridisert med målsekvensen spaltes for å frigjøre et fragment, hvorefter fragmentet deretter igjen hybridiseres med fange-
10 proben for å detektere nærvær av målsekvensen. I denne fremgangsmåte er det nødvendig at et ikke-spaltet/intakt probe ikke hybridiseres med fangeproben. Derfor må fangeproben som har en kortere lengde immobiliseres på et faststoffs substrat. En slik begrensning resulterer imidlertid i lavere effektivitet med hensyn til hybridisering på et faststoffs substrat og vanskeliggjør også optimalisering av reaksjonsbetingelsene.
- 15 Lyamichev et al, Nature Biotechnology, Vol 17, Mars 1999, beskriver en metode for nukleotidsekvensdeteksjon for identifisering av polymorfisme eller kvantitativ deteksjon av DNA.
- 20 Oliver, M, et al, Mutations Research, 573 (2005) 103-110 beskriver forskjellige deteksjonsmetoder der flap-endonukleaser diskuteres.
- Roux P og kollegaer, Assay and Drug Development Technologies, Vol. 2, Nr. 6, 2004 antyder anvendelse av elektroforetiske markører (eTags) molekyler i deteksjon av spaltet 5
25 prime flap.
- Allawi og kollegaer, RNA, 20014, 10:1153-1161 beskriver hårnålstrukturer i probe- eller invasive oligonukleotider.
- 30 Derfor, der er et stort behov innen fagfeltet for å utvikle nye løsninger for deteksjon av en målsekvens, fortrinnsvis flere målsekvenser, i en væskefase og på en faststoffase, men ikke kun hybridisering men også enzymatiske reaksjoner så som 5'-nukleolytisk reaksjon på en mer hensiktsmessig, pålitelig og reproducerbar måte.

Videre, en ny måldeteksjonsmetode som ikke er begrenset med antallet typer prober (spesielt fluorescerende markører) er også nødvendig innen fagfeltet.

5 Gjennom denne søknad, refereres det til forskjellige patenter og publikasjoner og anførsler i parentes.

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

10 Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse har utført utstrakt forskning for å utvikle nye tilnærminger for å detektere målsekvenser med mer forbedret nøyaktighet og hensiktsmessighet, *inter alia*, på en multipleks måte. Som et resultat, har det blitt etablert nye protokoller for deteksjon av målsekvenser, hvor måldeteksjonen utføres med probe-hybridisering, enzymatisk probespaltning, ekstensjon og deteksjon av en forlenget dupleks. De foreliggende protokoller er godt tilpasset væskefasereaksjoner og likeledes fastfase-reaksjoner, og sikrer deteksjon av flere målsekvenser med mer forbedret nøyaktighet og
15 hensiktsmessighet.

Det er således et formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for deteksjon av en målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en blanding av nukleinsyrer med
20 en PTOCE (PTO spalting og ekstensjon) analyse.

Det er et ytterligere formål med foreliggende oppfinnelse og tilveiebringe et kitt for deteksjon av en målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en blanding av nukleinsyrer med PTOCE (PTO-spalting og ekstensjon) analyse.
25

Andre formål og fordeler med foreliggende oppfinnelse vil bli åpenbare fra den detaljerte beskrivelse som følger lest sammen med de påfølgende patentkrav og figurer.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

30 Fig 1 viser skjematisk strukturer av PTO (probing og tagging oligonukleotid) og CTO (fanging og templat oligonukleotid) anvendt i PTO-spalting og -ekstensjons analyse (PTOCE-analyse). Fortrinnsvis, 3'-endene av PTO og CTO blokkeres for å hindre deres ekstensjon.

Fig 2 representerer skjematisk PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser. CTO har et reportertermolekyl og et stoppermolekyl i sine templatporsjoner.

5 Fig 3 representerer skjematisk PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser. CTO har et reportertermolekyl ved sin templatporsjon. Reportertermolekylet er nødvendig for å vise forskjellig signalintensitet avhengig av dets nærvær på en enkelttrådet form eller en dobbelttrådet form.

10 Fig 4 representerer skjematisk PTOC-analyser omfattende smelteanalyser. CTO har en iso-dC-enhet og et reportertermolekyl ved sin templatporsjon. Stopper iso-dGTP er inkorporert i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjon.

15 Fig 5 representerer skjematisk PTOCE-analyse omfattende smelteanalyse. PTO har et reportertermolekyl ved sin 5'-taggingporsjon og CTO har en iso-dC-enhet ved sin templatporsjon. Stopper-iso-dGTP er inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen.

Fig 6 representerer skjematisk PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser. PTO har et reportertermolekyl og et stoppermolekyl ved sin 5'-taggingporsjon.

20 Fig 7 representerer skjematisk PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser. PTO har et reportertermolekyl ved sin 5'-taggingporsjon. Reportertermolekylet er nødvendig for å vise forskjellig signalintensitet avhengig av dets nærvær på en enkelttrådet form eller en dobbelttrådet form.

25 Fig 8 representerer skjematisk PTOCE-analyser omfattende smelteanalyser. PTO har et stoppermolekyl ved sin 5'-taggingporsjon og CTO har et reportertermolekyl ved sin fangeporsjon.

30 Fig 9 representerer skjematisk PTOCE-analyser omfattende deteksjon ved en forutbestemt temperatur. CTO har et reportertermolekyl og et stoppermolekyl ved sin templatporsjon. CTO immobiliseres på et faststoffs substrat gjennom sin 3'-ende.

35 Fig 10 representerer skjematisk PTOCE-analyser omfattende deteksjon ved en forutbestemt temperatur. En reportermarkør dATP inkorporeres inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen. CTO immobiliseres på et faststoffs substrat gjennom dets 3'-ende.

Fig 11 representerer skjematisk PTOCE-analyse omfattende deteksjon ved en forutbestemt temperatur. CTO har en iso-dC-enhet ved sin templatporsjon og en reporter iso-dGTP er inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen. CTO immobiliseres på et faststoffs substrat gjennom dets 3'-ende.

Fig 12 representerer skjematisk PTOC-analyse omfattende deteksjon ved en forutbestemt temperatur. PTO har et reportermolekyl ved sin 5'-taggingporsjon. CTO immobiliseres på et faststoffs substrat gjennom dets 5'-ende.

Fig 13 representerer skjematisk PTOCE-analyse omfattende deteksjon ved en forutbestemt temperatur med et interkalerende fargestoff. CTO immobiliseres på et faststoffs substrat gjennom dets 5'-ende.

Fig 14 viser resultatene av deteksjon av *Neisseria gonorrhoeae* gen med PTOCE-analyse omfattende smelteanalyse. CTO har et reportermolekyl og et stoppermolekyl ved sin templatporsjon.

Fig 15 viser resultatene av deteksjon av *Neisseria gonorrhoeae* gen med PTOCE-analyser omfattende smelteanalyse. PTO har et stoppermolekyl ved sin 5'-ende og CTO har et reportermolekyl ved sin 3'-ende.

Fig 16 viser resultatene at T_m -verdier av forlengete duplekser justeres med CTO-sekvensene.

Fig 17 viser resultatene av deteksjon av *Neisseria gonorrhoeae* gen med PTOCE-analyser med PCR-mangfoldiggjøring. CTO har et reportermolekyl og et stoppermolekyl ved sin templatporsjon. Fig 17A viser resultatene av PTOCE-analyse omfattende sanntids PCR-deteksjon og fig 17B viser resultatene av PTOCE-analyser omfattende post-PCR-smelteanalyser.

Fig 18 viser resultatene av deteksjon av *Neisseria gonorrhoeae* gen ved PTOCE-analyser med PCR-mangfoldiggjøring. CTO har en iso-dC-rest og et reportermolekyl ved sin 5'-ende. Quencher-iso-dGTP inkorporeres inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen.

Fig 18A viser resultatene av PTOCE-analyse omfattende sanntids PCR-deteksjon og fig 18B viser resultatene av PTOCE-analyse omfattende post-PCR-smelteanalyse.

Fig 19 viser resultatene av deteksjon av *Neisseria gonorrhoeae* gen med PTOCE-analyse med PCR-mangfoldiggjøring. PTO har et stoppermolekyl ved sin 5'-ende og CTO har et reportermolekyl ved sin 3'-ende. Fig 19A viser resultatene av PTOCE-analyser omfattende sanntids PCR-deteksjon og fig 19B viser resultatene av PTOCE-analyser omfattende post-PCA-smelteanalyser.

Fig 20 viser resultatene av samtidig deteksjon av *Neisseria gonorrhoeae* (NG) gen og *Staphylococcus aureus* (SA) gen med PTOCE-analyse omfattende post-PCR-spalteanalyser. CTO har et reportermolekyl og et stoppermolekyl ved sin templatporsjon.

Fig 21 viser resultatene av deteksjon av *Neisseria gonorrhoeae* gen med PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser på mikroarray. CTO immobiliseres gjennom sin 5'-ende. PTO har et reportermolekyl ved sin 5'-taggingporsjon.

Fig 22 viser resultatene av deteksjon av *Neisseria gonorrhoeae* gen ved PTOCE-analyse omfattende sanntidsdeteksjon ved en forutbestemt temperatur på mikroarray. CTO immobiliseres gjennom sin 5'-ende. PTO har et reportermolekyl ved sin 5'-taggingporsjon.

Fig 23 viser resultatene av deteksjon av *Neisseria gonorrhoeae* gen med PTOCE-analyser omfattende sanntidsdeteksjon ved en forutbestemt temperatur på mikroarray. CTO immobiliseres gjennom sin 3'-ende og har et reportermolekyl og et stoppermolekyl ved sin templatporsjon.

Fig 24 viser resultatene av enkelt eller multippel måldeteksjon med PTOCE-analyse omfattende endepunkt deteksjon ved en forutbestemt temperatur på mikroarray. CTO immobiliseres gjennom sin 5'-ende. PTO har et reportermolekyl ved sin 5'-taggingporsjon. *Neisseria gonorrhoeae* (NG) gen og *Staphylococcus aureus* (SA) gen ble anvendt som målnukleinsyresekvens.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en ny fremgangsmåte for å detektere en målnukleinsyresekvens med en PTOCE (PTO-spalting og-ekstensjon) analyse og et kitt for å detektere en målnukleinsyresekvens med en PTOCE-analyse.

Den foreliggende oppfinnelse involverer ikke kun hybridiseringsreaksjoner men også enzymatiske reaksjoner som forekommer avhengig av nærvær av en målnukleinsyresekvens.

I. MÅLDETEKSJONSPROSESS MED PTOCE OMFATTENDE SMELTEANALYSER.

I et aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å detektere en målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en blanding av nukleinsyrer med en PTOCE (PTO spalting og ekstensjon) analyse, omfattende:

(a) hybridisere målnukleinsyresekvensen med en oppstrøms oligonukleotid og en PTO (probing og tagging oligonukleotid); hvor oppstrøms oligonukleotiden omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens komplementær til målnukleinsyresekvensen; PTO omfatter (i) en 3'-målrettet porsjon omfattende en hybridiserende nukleotidsekvens komplementær til målnukleinsyresekvensen og (ii) en 5'-taggingporsjon omfattende en nukleinsyresekvens ikke-komplementær til målnukleinsyresekvensen; hvor 3'-målrettet porsjon reduseres med målnukleotidsyresekvensen og 5'-taggingporsjon ikke-hybridiseres med målnukleinsyresekvensen; oppstrøms oligonukleotid er lokalisert oppstrøms for PTOen;

(b) å sette resultatet fra trinn (a) i forbindelse med et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet under betingelser for spalting av PTOen; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid eller dets forlengete tråd induserer spalting av PTOen med enzymet som har 5'-nukleaseaktivitet slik at spaltingen frigjør et fragment omfattende 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen;

(c) å hybridisere fragmentet som er frigjort fra PTOen med CTO (fange og templat oligonukleotid); og CTOen omfatter i en 3'-til 5'-retning (i) en fangeporsjon omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen og (ii) en templatporsjon omfattende en nukleotidsekvens ikke-komplementær til 5'-taggingporsjonen og 3'-målrettet porsjon av

PTOen; hvor fragmentet som frigjøres fra PTO hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen;

(d) å utføre en ekstensjonsreaksjon ved anvendelse av resultatet fra trinn c, og en templatavhengig nukleinsyre polymerase; hvor fragmentet hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen forlenges og en forlenget dupleks dannes; hvor den forlengete dupleks har en T_m -verdi som er justerbar med (i) en sekvens og/eller lengde av frekvensen, (ii) en sekvens og/eller lengde av CTOen eller (iii) sekvensen og/eller lengden av fragmentet og sekvensen og/eller lengden av CTOen;

(e) smelte den forlengete dupleks over temperaturområdet for å gi et målsignal som indikerer nærvær av den forlengete dupleks; hvor målsignalet tilveiebringes med (i) minst en markør koplet til fragmenter og/eller CTOen, (ii) en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen, (iii) en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen og en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, eller (iv) et interkalerende markør; og

(f) å detektere den forlengete dupleks ved å måle målsignalet; hvorved nærvær av den forlengete dupleks indikerer nærvær av målnukleinsyresekvensen.

Ytterligere utførelser er angitt i underkravene 2-27 og 36.

I et andre aspekt vedrører foreliggende oppfinnelsen anvendelse av et kitt for å detektere en målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en blanding av nukleinsyrer med en PTOCE (PTO Cleavage and Extension) analyse, for anvendelse i utførelse av fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 1-27, omfattende:

(a) et oppstrøms oligonukleotid omfattende en hybridiserende nukleotidsekvens komplementær til målnukleinsyresekvensen;

(b) en PTO (Probing and Tagging Oligonukleotid) omfattende (i) en 3' målporsjon omfattende en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen og (ii) en 5' taggingporsjon omfattende en nukleotidsekvens ikke-komplementær til målnukleinsyresekvensen, hvor 3'-målporsjonen hybridiseres med målnukleinsyresekvensen og 5'-taggingporsjonen ikke-hybridiseres med målnukleinsyresekvensen; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid er lokalisert oppstrøms for PTOen; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid eller dets forlengete tråd induserer spalting av PTOen av et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet slik at spaltingen frigjør et fragment omfattende 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen; og

(c) en CTO (Capturing and Templating Oligonukleotid) omfattende i en 3' til 5' retning (i) en fangeporsjon omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen og (ii) en templatporsjon omfattende en nukleotidsekvens ikke-komplementær til 5'-taggingporsjonen og 3'-målporjonen av PTOen; hvor fragmentet frigjort fra PTOen hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen; og fragmentet hybridisert med fangeporsjonen av CTOen forlenges av en templatavhengig nukleinsyre polymerase for å danne en forlenget dupleks.

10 Ytterligere utførelser av dette aspekt er angitt i underkravene 29-35.

Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse har utført utstrakt forskning for å utvikle nye tilnærminger for å detektere målsekvenser med forbedret nøyaktighet og hensiktsmessighet,

15 *inter alia*, i en multipleks måte. Som et resultat, har det blitt etablert nye protokoller for deteksjon av målsekvenser, hvor måldeteksjon utføres med probehybridisering, enzymatisk probespalting, ekstensjon og deteksjon av en forlenget dupleks. De foreliggende protokoller er godt adoptert til væskefasereaksjoner og likeledes faststoffasereaksjoner, og sikrer deteksjon av multiple målsekvenser med mer nøyaktighet og hensiktsmessighet.

20 I foreliggende oppfinnelse benyttes suksessive hendelser etterfulgt av probehybridisering; spalting av PTO (probing og tagging oligonukleotid og ekstensjon); dannelse av en målavhengig forlenget dupleks; og deteksjon av den forlengete dupleks. Derfor, har den fått navnet som en PTOCE (PTO spalting og ekstensjon) analyse.

25 I foreliggende oppfinnelse er den forlengete dupleks karakterisert til å ha en markør (markører) som tilveiebringer et signal som indikerer nærvær av den forlengete dupleks med smelteanalyser eller med deteksjon ved en forutbestemt temperatur. Videre, den forlengete dupleks er karakterisert til å ha en justerbar T_m -verdi, som har en avgjørende funksjon i multippel måldeteksjon eller diskriminering fra ikke-målsignal.

30

Idet den forlengete dupleks kun produseres dersom målnukleinsyren eksisterer, vil nærvær av den forlengete dupleks indikere nærvær av målnukleinsyren.

PTOCE-analysen omfattende smelteanalyse vil bli beskrevet i mer detalj som følger:

35

Trinn (a): hybridisering av en oppstrøms oligonukleotid og en PTO med en målnukleinsyresekvens.

- 5 I samsvar med foreliggende oppfinnelse, en målnukleinsyresekvens hybridiseres først med en oppstrøms oligonukleotid og en PTO (probing og tagging oligonukleotid).

Termene som anvendes heri; «målnukleinsyre», «målnukleinsyresekvens» eller «mål-sekvens» refererer til en nukleinsyresekvens av interesse for deteksjon, som «anneales» til
10 eller hybridiseres med en probe eller primer under hybridisering, annealings eller mangfoldiggjøringsbetingelser.

Termen anvendt heri «probe» refererer til enkelttrådet nukleinsyremolekyl omfattende en porsjon eller porsjoner som i hovedsak er komplementære til en målnukleinsyresekvens.
15

Termen «primer» som anvendt heri refererer til et oligonukleotid, som er i stand til å virke som et initieringspunkt for syntese idet det plasseres under betingelser hvor syntese av primer ekstensjonsprodukt som er komplementært til en nukleinsyretråd (templat) induseres, det vil si i nærvær av nukleotider og et middel for polymerisering, så som DNA-polymerase,
20 og ved en egnet temperatur og pH.

Fortrinnsvis, proben og primeren er enkelttrådet deoksyribonukleotidmolekyler. Probene eller primerne som anvendes ifølge oppfinnelsen kan utgjøres av naturlig forekommende dNMPer (det vil si dAMP, dGM, dCMP og dTMP). Modifisert nukleotid, eller et ikke-naturlig nukleotid.
25 Probene eller primerne kan også inkludere ribonukleotider.

Primeren må være tilstrekkelig lang til å prime syntese av ekstensjonsprodukter i nærvær av midler for polymerisering. Den eksakte lengde av primerne vil avhenge av mange faktorer, inkluderende temperatur, applikasjon og kilder for primer. Termen «annealing» eller
30 «priming» som anvendt heri referer til tilføyelse av en oligodeoksynukleotid eller nukleinsyre til en templatnukleinsyre, hvor tillegget muliggjør at polymerasen kan polymerisere nukleotider til et nukleinsyremolekyl som er komplementær til templatnukleinsyren eller en porsjon derav.

Termen «hybridisering» som anvendes heri refererer til dannelsen av en dobbelttrådet nukleinsyre med komplementær enkelttrådet nukleinsyre. Hybridisering kan foregå mellom to nukleinsyretråder som er perfekt matchet eller i hovedsak godt matchet med noe mismatch. Komplementariteten for hybridisering kan avhenge av hybridiseringsbetingelser, spesielt temperatur.

Hybridisering av en målnukleinsyresekvens med oppstrøms oligonukleotid og PTOen kan utføres under egnede hybridiseringsbetingelser som rutinemessig bestemmes med optimaliseringsprosedyrer. Betingelser så som temperatur, konsentrasjon av komponenter, hybridisering og vasketider, bufferkomponenter, og deres pH og ionestyrke kan varieres avhengig av forskjellige faktorer, inkluderende lengden og GC-innhold av oligonukleotid (oppstrøms oligonukleotid og PTO) og målnukleotidsekvens. For eksempel, dersom en relativt kort oligonukleotid anvendes er det foretrukket at lave stringentbetingelser benyttes. De detaljerte betingelser for hybridisering kan finnes i Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); og M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999).

Der er ingen tiltenkt forskjell mellom termene «annealing» og «hybridisering», og disse termen vil benyttes om hverandre.

Den oppstrøms oligonukleotid og PTO har hybridiserende nukleotidsekvenser som er komplementære til målnukleinsyresekvensen. Termen «komplementær» anvendes heri for å angi primere eller prober som er tilstrekkelig komplementære til å hybridisere selektivt til en målnukleinsyresekvens under de angitte annealingsbetingelser eller stringente betingelser, omfattende termene «i hovedsak komplementær» og «perfekt komplementær», fortrinnsvis perfekt komplementær.

5'-taggingporsjonen av PTOen har en nukleotidsekvens som er ikke-komplementær til målnukleinsyresekvensen. Templatporsjonen av CTO (Fange (Capturing) and Templating Oligonukleotid) har en nukleotidsekvens som er ikke-komplementær til 5'-taggingporsjonen og 3'-mål-porsjonen av PTOen. Termen «ikke-komplementær» anvendes heri for å angi at primere eller prober er tilstrekkelig ikke-komplementære til ikke å hybridisere selektivt til en målnukleinsyresekvens under de angitte annealing betingelser eller stringente betingelser,

omfattende termene «i hovedsak ikke-komplementær» og «perfekt ikke-komplementær» fortrinnsvis perfekt ikke-komplementær.

Termen som anvendes heri «PTO» (probing og tagging oligonukleotid) betyr et oligonukleotid omfattende (i) en 3'-målrettet porsjon som fungerer som en probe og (ii) en 5'-målrettet porsjon med en nukleotidsekvens som er ikke-komplementær til målnukleinsyresekvensen, som nukleolytisk frigjøres fra PTOen etter hybridisering med målnukleinsyresekvensen. 5'-taggingporsjonen og 3'-målporsjonen i PTOen må posisjoneres i en 5'-til 3'-rekkefølgen. PTOen er skjematisk illustrert i fig 1.

Fortrinnsvis, hybridiseringen i trinn (a) utføres under stringente betingelser slik at 3'-målporsjonen hybridiseres med målnukleinsyresekvensen og 5'-målporsjonen ikke hybridiseres med målnukleinsyresekvensen.

PTOen trenger ikke å være av noen spesifikke lengder. For eksempel, lengder av PTOen kan være 15-150 nukleotider, 15.-100 nukleotider, 15.-80 nukleotider, 15-60 nukleotider, 15-40 nukleotider, 20 -150 nukleotider, 20-100 nukleotider, 20 – 80 nukleotider, 20 – 60 nukleotider, 20-50 nukleotider, 30-150 nukleotider, 30-100 nukleotider, 30-80 nukleotider, 30-60 nukleotider, 30-50 nukleotider, 35-100 nukleotider, 35-80 nukleotider, 35-60 nukleotider eller 35-50 nukleotider. 3'-målporsjonen av PTOen kan være i enhver lengde så lenge den er spesifikk hybridisert med målnukleinsyresekvensene. For eksempel, 3'-målporsjonen av PTOen kan være 10-100 nukleotider, 10-80 nukleotider, 10 – 50 nukleotider, 10-40 nukleotider, 10-30 nukleotider, 15-100 nukleotider, 15-80 nukleotider, 15-50 nukleotider, 15-40 nukleotider, 15-30 nukleotider, 20-100 nukleotider, 20.-80 nukleotider, 20-50 nukleotider, 20-40 nukleotider eller 20-30 nukleotider i lengde. 5'-taggingporsjonen kan være i enhver lengde så lenge den spesifikt hybridiseres med templatporsjonen CTOen og deretter forlenges. For eksempel, 5'-taggingporsjonen av PTOen kan være 5-50 nukleotider, 5-40 nukleotider, 5-30 nukleotider, 5-20 nukleotider, 10-50 nukleotider, 10-40 nukleotider, 10 -30 nukleotider, 10-20 nukleotider, 15-50 nukleotider, 15-40 nukleotider, 15-30 nukleotider eller 15-20 nukleotider i lengde.

3'-enden av PTOen kan ha en 3'-OH-terminal. Fortrinnsvis, 3'-enden av PTO «blokkes» for å hindre dets forlengelse.

- Blokkeringen kan oppnås i samsvar med konvensjonelle metoder. For eksempel, blokkeringen kan utføres ved å tilsette til 3'-hydroksylgruppen av den siste nukleotid i en kjemisk enhet så som biotin, markører, en fosfatgruppe, alkylgruppe, ikke-nukleotid-linker, tiofosfat eller alkandiol. Alternativt, kan blokkeringen utføres ved å fjerne 3'-hydroksylgruppen av den siste nukleotid eller anvende en nukleotid med ingen 3'-hydroksylgruppe så som dideoksy-nukleotid.

Alternativt, PTOen kan konstrueres til å ha en hårnålsstruktur.

- 10 Ikke-hybridiseringen mellom 5'-taggingporsjon av PTOen og målnukleinsyresekvensen refererer til ikke-dannelse av en stabil dobbeltråd mellom dem under visse hybridiseringsbetingelser. I samsvar med den foretrukne utførelse, 5'-taggingporsjonen av PTOen som ikke er involvert i hybridisering med målnukleinsyresekvensen danner en enkeltråd.
- 15 Oppstrøms oligonukleotider er lokalisert oppstrøms for PTOen.

I tillegg, oppstrøms oligonukleotider eller dets forlengete tråd hybridisert med målnukleinsyresekvensen induserer spalting av PTOen med et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet.

- 20 Induksjon av PTO-spalting med oppstrøms oligonukleotid kan utføres på to måter: (i) oppstrøms oligonukleotid ekstensjonsuavhengig spaltingsinduksjon; og (ii) oppstrøms oligonukleotid ekstensjon-avhengig spaltingsinduksjon.

- Idet oppstrøms oligonukleotidet er posisjonert tilgrensende til PTOen tilstrekkelig til å
- 25 indusere PTO-spalting med et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet, så vil enzymet som er bundet til oppstrøms oligonukleotidet oppkutte PTOen uten noen ekstensjonsreaksjon. I motsetning, idet oppstrøms oligonukleotidet er posisjonert i avstand fra PTOen, vil et enzym som har en polymeraseaktivitet (for eksempel templatavhengig polymerase) katalysere ekstensjon av oppstrøms oligonukleotider (for eksempel oppstrøms primer) og et enzym
- 30 som har en 5'-nukleaseaktivitet bundet til det forlengete produkt oppkutter PTOen.

Derfor, nevnte oppstrøms oligonukleotid kan være lokalisert relativt til PTOen på to måter. Oppstrøms oligonukleotid kan være lokalisert tilgrensende til PTOen tilstrekkelig til å indusere PTO-spalting via en ekstensjonsuavhengig måte. Alternativt, oppstrøms oligo-

nukleotiden kan være lokalisert i avstand til PTOen tilstrekkelig til å indusere PTO-spalting i en ekstensjonsavhengig måte.

- 5 Termen «tilgrensende» anvendt heri med referanse til posisjonering eller lokaliseringsmåter så som at oppstrøms oligonukleotid er lokalisert tilgrensende til 3'-målporsjonen av PTOen for å danne et «Nick». Videre, termen betyr at oppstrøms oligonukleotidet er lokalisert 1-30 nukleotider, 1-20 nukleotider eller 1-15 nukleotider fra 3'-målporsjonen av PTOen.

- 10 Termen «i avstand» som anvendes heri med referanse til posisjoner eller lokaliseringer inkluderer enhver posisjon eller lokalisasjon tilstrekkelig til å sikre ekstensjonsreaksjoner.

I samsvar med en foretrukket utførelse, oppstrøms oligonukleotid er lokalisert i avstand til PTOen tilstrekkelig til å indusere PTO-spalting på en ekstensjonsavhengig måte.

- 15 I samsvar med en foretrukket utførelse, oppstrøms oligonukleotidet er en oppstrøms primer eller en oppstrøms probe. Oppstrømsprimerne er egnet på en ekstensjonsuavhengig spaltingsinduksjon eller en ekstensjonsavhengig spalting, og nevnte oppstrøms probe er egnet til en ekstensjonsuavhengig spaltingsinduksjon.
- 20 Alternativt, oppstrøms oligonukleotid kan ha en partiell overlappende sekvens med 5'-delen av 3'-målporsjonen av PTOen. Fortrinnsvis, den overlappende sekvens er 1-10 nukleotider, mer fortrinnsvis 1-5 nukleotider, enda mer foretrukket 1-3 nukleotider i lengde. Der hvor oppstrøms oligonukleotider har en partiell overlappingssekvens med 5'-delen av 3'-målporsjonen av PTOen, så oppkuttet delvis den 3'-målporsjon sammen med 5'-taggingporsjonen i
- 25 spaltingsreaksjonen i trinn (b), i tillegg, den overlappende sekvens muliggjør å spalte et ønsket sete i den 3'-målporsjon.

- I samsvar med en foretrukket utførelse, oppstrøms primer induseres gjennom dets forlengete tråd spaltingen av PTOen med enzymet som har 5'-nukleaseaktivitet.

30

- De konvensjonelle teknikker for spaltingsreaksjoner ved oppstrøms oligonukleotider kan anvendes med foreliggende oppfinnelse, så lenge den oppstrøms oligonukleotid induserer spalting av PTOen som er hybridisert med målnukleinsyresekvensen for å frigjøre et fragment som omfatter 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen. For
- 35 eksempel kan U.S. patenter 5,210,015, 5,487,972, 5,691,142, 5,994,069 og 7,381,532 og

U.S patentsøknad med publiseringsnummer 2008-0241838 anvendes med foreliggende oppfinnelse.

5 I samsvar med en foretrukket utførelse utføres fremgangsmåten i nærvær av en nedstrøms primer. Nedstrømsprimeren genererer ytterligere en målnukleinsyresekvens som kan hybridiseres med PTOen, og øket sensitivitet med hensyn til måldeteksjon.

10 I samsvar med en foretrukket utførelse, idet oppstrøms primeren og nedstrøms primeren anvendes, så benyttes i tillegg en templatavhengig nukleinsyre polymerase for ekstensjon av primerne.

15 I samsvar med en foretrukket utførelse, nevnte oppstrøms oligonukleotid (oppstrøms primer eller oppstrøms probe), nedstrøms primer og/eller 5'-taggingporsjon av PTOen har en dobbel priming oligonukleotid (DPO) struktur utviklet av foreliggende oppfinnere. Oligonukleotidene som har DPO-strukturen viser signifikant forbedret målspesifisitet sammenlignet med konvensjonelle primere og prober (se WO 2006/095981; Chun et al., Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, *Nucleic Acid Research*, 35:6e40(2007)).

20 I samsvar med en foretrukket utførelse, 3'-målporsjonen av PTOen har en modifisert dobbel spesifisitets oligonukleotid (mDSO)-struktur utviklet av foreliggende oppfinnere. Den modifiserte dobbelt spesifisitets oligonukleotid (mDSO) struktur viser signifikant forbedret målspesifisitet sammenlignet med konvensjonelle prober (se WO 2011/028041).

25 **Trinn (b): Frigjøring av et fragment fra PTOen.**

Deretter settes resultatet fra trinn (a) i forbindelse med et enzym so har en 5'-nuklease-aktivitet under betingelser for spalting av PTOen. PTOen hybridisert med målnukleinsyresekvensen oppkuttet av et enzym som har 5'-nukleaseaktivitet for å frigjøre et fragment som omfatter 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen.

30

Termen anvendt heri «betingelser for spalting av PTOen» angir betingelser som er tilstrekkelig til å oppkutte PTOen hybridisert med målnukleinsyresekvensen med enzymet som har 5'-nukleaseaktivitet, så som temperatur, pH, ionestyrke, buffer, lengde og sekvens av oligonukleotider og enzymer. For eksempel, idet *Taq* DNA polymerase anvendes som

enzymet som har 5'-nukleaseaktivitet, så er betingelsene for spalting av PTOen Tris-HCl buffer, KCl, MgCl₂ og temperatur.

Idet PTOen er hybridisert med målnukleinsyresekvensen, er dets 3'-målporsjon involvert i

- 5 hybridiseringen og 5'-taggingporsjonen danner en enkelttråd uten noe hybridisering med målnukleinsekvensen. Således, et oligonukleotid som omfatter både enkelttrådet og dobbelttrådede strukturer kan oppkuttet ved anvendelse av et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet med en rekke teknikker kjent for den fagkyndige innen feltet.
- 10 Spaltingssetene av PTOen varierer avhengig av type oppstrøms oligonukleotider (oppstrøms probe eller oppstrøms primer), hybridiseringsseter av oppstrøms oligonukleotider og spaltingsbetingelser. (se U.S. Pat. Nr. 5,210,015, 5,487,972, 5,691,142, 5,994,069 og 7,381,532 og U.S. søknad med publisering nummer. 2008-0241838).
- 15 En rekke konvensjonelle teknikker kan benyttes for spaltingsreaksjonen av PTOen, som frigjør et fragment omfattende 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen. Kort forklart, der kan være tre seter for spalting i trinn (b). først, spaltingssetet er et forbindelses-sete mellom en hybridiseringsporsjon av PTOen (3'-målporsjon) og en ikke-hybridiseringsporsjon (5'-taggingporsjon). Det andre spaltingssetet er et sete lokalisert flere nukleotider i
- 20 en 3'-retning fra 3'-enden av 5'-taggingporsjonen av PTOen. Det andre spaltingssetet er lokalisert ved 5'-endedelen av 3'-målporsjonen av PTOen. Det tredje spaltingssetet er et sete lokalisert flere nukleotider i 5'-retning fra 3'-enden av 5'-taggingporsjonen av PTOen.
- I samsvar med en foretrukket utførelse er det innledende setet for spaltingen av PTOen med
- 25 en templatavhengig polymerase som har en 5'-nukleaseaktivitet ved ekstensjon av oppstrøms primer et utgangspunkt for dobbelttråden mellom PTOen og målnukleinsyresekvensen eller et sete 1-3 nukleotider fra startpunktet.
- På denne måte, termen som anvendes heri «et fragment omfattende 5'-taggingporsjonen
- 30 eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen» i forbindelse med spalting av PTOen med enzymet som har 5'-nukleaseaktivitet anvendes for å omfatte (i) 5'-taggingporsjonen, (ii) 5'-taggingporsjonen og 5'-endedelen av 3'-målporsjonen og (iii) en del av 5'-taggingporsjonen. I denne søknad omfatter termen «et fragment omfattende 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen» også beskrives som «PTO-fragment».

Termen «en del» anvendt i forbindelse med PTO eller CTO så som del av 5'-tagging-porsjonen av PTOen, 5'-endedelen av 3'-målporsjonen av PTOen og 5'-endedelen av fangeporsjonen av CTOen refererer til en nukleotidsekvens som er sammensatt av 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10 eller 1-5 nukleotider, fortrinnsvis 1, 2, 3 eller 4 nukleotider.

5

I samsvar med en foretrukket utførelse, enzymet som har 5' nukleaseaktivitet er DNA polymerase som har 5' nukleaseaktivitet eller FEN nuklease, med fortrinnsvis en termostabil DNA polymerase som har 5' nukleaseaktivitet eller FEN nuklease.

- 10 En egnet DNA polymerase som har en 5' nukleaseaktivitet ifølge oppfinnelsen er en termostabil DNA polymerase oppnådd fra en rekke bakteriearter, inkluderende *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*,
 15 *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*,
 20 *Aquifex pyrophilus* og *Aquifex aeolicus*. Mer fortrinnsvis, den termostabile DNA polymerase er Taq-polymerase.

Alternativt, foreliggende oppfinnelse kan benytte DNA polymeraser som har en 5' nukleaseaktivitet modifisert til å ha mindre polymeraseaktiviteter.

25

FEN (flap endonuklease) nuklease anvendt er en 5' flap spesifikk nuklease.

- FEN-nukleasen egnet ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter FEN-nuklease oppnådd fra en rekke bakterieformer, inkludert *Sulfolobus solfataricus*, *Pyrobaculum aerophilum*,
 30 *Thermococcus litoralis*, *Archaeoglobus veneficus*, *Archaeoglobus profundus*, *Acidianus brierlyi*, *Acidianus ambivalens*, *Desulfurococcus amylolyticus*, *Desulfurococcus mobilis*, *Pyrodictium brockii*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermococcus zilligii*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanococcus igneus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix* og *Archaeoglobus veneficus*.

35

Idet oppstrøms primer anvendes i trinn (a), er det foretrukket at betingelsene for spalting av PTOen omfatter ekstensjonsreaksjon av oppstrøms primerne.

- 5 I samsvar med en foretrukket utførelse, oppstrøms primeren anvendes i trinn (a), en templatavhengig polymerase anvendes for ekstensjon av oppstrøms primeren og templatavhengig polymerase identisk til enzymet som har en 5' nukleaseaktivitet.

- 10 Valgfritt, oppstrøms primer anvendes i trinn (a) en templatavhengig polymerase anvendes for ekstensjon av oppstrøms primer og den templatavhengige polymerase er forskjellig fra enzymet som har 5' nukleaseaktivitet.

Trinn (c): Hybridisering av fragmenter frigjort fra PTOen med CTO.

- 15 Fragmentet frigjort fra PTOen hybridiseres med en CTO (fange og templat oligonukleotid).

CTOen omfatter i en 3'- til 5'-retning (i) en fangeporsjon omfattende en nukleotidsekvens komplementær til 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen og (ii) en templatporsjon omfattende en nukleotidsekvens ikke-komplementær til 5'-taggingporsjonen og 3'-målporsjonen av PTOen.

- 20 CTOen fungerer som et templat for ekstensjon av fragmentet frigjort fra PTOen. Fragmentet som fungerer som en primer hybridiseres med CTOen og forlenges for å danne en forlenget dupleks.

- 25 Templatporsjonen kan omfatte enhver sekvens så lenge den er ikke-komplementær til 5'-taggingporsjonen og 3'-målporsjonen av PTOen. Videre, templatporsjonen kan omfatte enhver sekvens så lenge den kan fungere som et templat for ekstensjon av fragmentet frigjort fra PTOen.

- 30 Som beskrevet over, idet fragmentet har 5'-taggingporsjonen så frigjøres PTO, er det foretrukket at fangeporsjonen av CTOen er konstruert for å omfatte en nukleotidsekvens komplementær til 5'-taggingporsjonen. Idet fragmentet som har 5'-taggingporsjonen og en 5'-endedel av 3' taggingporsjonen frigjøres, er det foretrukket at fangeporsjonen av CTOen er konstruert til å omfatte en nukleotidsekvens komplementær til 5'-taggingporsjonen og 5'-endedelen av 3' målporsjonen. Idet fragmentet har en del av 5'-taggingporsjonen av PTO
- 35

frigjort, er det foretrukket at fangeporsjonen av CTOen er konstruert til å omfatte en nukleotidsekvens komplementær til den del av 5'-taggingporsjonen.

Videre, det er mulig å konstruere fangeporsjonen av CTOen med forventede spaltings seter av PTOen. For eksempel, idet fangeporsjonen av CTOen er konstruert til å omfatte en nukleotidsekvens komplementær til 5'-taggingporsjonen, kan enten fragmentet som har en del av 5'-taggingporsjonen eller fragmentet som har 5'-taggingporsjonen hybridiseres med fangeporsjonen og deretter forlenges. Idet fragmentet omfatter 5'-taggingporsjonen og en 5'-endedel av 3'-målporsjonen frigjøres, kan den hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen konstruert til å omfatte en nukleotidsekvens komplementær til 5'-taggingporsjonen og deretter suksessfullt forlenges gjennom mismatch nukleotider foreliggende ved 3'-endeporsjonen av fragmentet. Dette fordi primerne kan forlenges avhengig av reaksjonsbetingelser selv om dets 3'-ende inneholder noen mismatch-nukleotider (for eksempel 1-3 mismatch nukleotider).

Idet fragmentet omfatter 5'-taggingporsjonen og en 5'-endedel av 3'-målporsjonen frigjøres, kan 5'-endedelen av fangeporsjonen av CTOen konstrueres til å ha en nukleotidsekvens komplementær til den spaltede 5'-endedel av 3'-målporsjonen, og overvinner derved problemene assosiert med mismatch nukleotider (se fig 1).

Fortrinnsvis, nukleotidsekvensen av 5'-endedelen av fangeporsjonen av CTOen komplementær til den spaltede 5'-endedel av 3'-målporsjonen kan selekteres avhengig av forventede spaltings seter på 3'-målporsjonen av PTOen. Det er foretrukket at nukleotidsekvensen av 5'-endedelen av fangeporsjonen av CTOen komplementær til spaltet 5'-endedel av 3'-målporsjon er 1-10 nukleotider, mer foretrukket 1-5 nukleotider, enda mer foretrukket 1-3 nukleotider.

3'-endedelen av CTOen kan omfatte ytterligere nukleotider ikke involvert i hybridisering med fragmentet. Videre, fangeporsjonen av CTOen kan omfatte en nukleotidsekvens komplementær kun til en del av fragmentet (for eksempel en del av fragmentet inneholdende dets 3'-endedel) så lenge den stabilt hybridiserer med fragmentet.

Termen «fangeporsjon omfatter en nukleotidsekvens komplementær til 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen» er beskrevet heri til å omfatte forskjellige konstruksjoner og sammensetninger av fangeporsjonen av CTOen som beskrevet over.

CTOen kan konstrueres til å ha en hårnålsstruktur.

- Lengden av CTOen kan variere bredt. For eksempel CTOen er 7-1000 nukleotider, 7-500 nukleotider, 7-300 nukleotider, 7-100 nukleotider, 7-80 nukleotider, 7-60 nukleotider, 7-40 nukleotider, 15-1000 nukleotider, 15-500 nukleotider, 15-300 nukleotider, 15-100 nukleotider, 15-80 nukleotider, 15-60 nukleotider, 15-40 nukleotider, 20-1000 nukleotider, 20-500 nukleotider, 20-300 nukleotider, 20-100 nukleotider, 20-80 nukleotider, 20-60 nukleotider, 20-40 nukleotider, 30-1000 nukleotider, 30-500 nukleotider, 30-300 nukleotider, 30-100 nukleotider, 30-80 nukleotider, 30-60 nukleotider eller 30-40 nukleotider i lengde. Fangeporsjonen av CTOen kan ha enhver lengde så lenge den er spesifikt hybridisert med fragmentet frigjort fra PTOen. For eksempel, fangeporsjonen av CTOen er 5-100 nukleotider, 5-60 nukleotider, 5-40 nukleotider, 5-30 nukleotider, 5-20 nukleotider, 10-100 nukleotider, 10-60 nukleotider, 10-40 nukleotider, 10-30 nukleotider, 10-20 nukleotider, 15-100 nukleotider, 15-60 nukleotider, 15-40 nukleotider, 15-30 nukleotider eller 15-20 nukleotider i lengde. Templatporsjonen av CTOen kan ha enhver lengde så lenge den kan fungere som et templat i forlengelse av fragmentet frigjort fra PTOen. For eksempel, templatporsjonen av CTOen er 2-900 nukleotider, 2-400 nukleotider, 2-300 nukleotider, 2-100 nukleotider, 2-80 nukleotider, 2-60 nukleotider, 2-40 nukleotider, 2-20 nukleotider, 5-900 nukleotider, 5-400 nukleotider, 5-300 nukleotider, 5-100 nukleotider, 5-80 nukleotider, 5-60 nukleotider, 5-40 nukleotider, 5-30 nukleotider, 10-900 nukleotider, 10-400 nukleotider, 10-300 nukleotider, 15-900 nukleotider, 15-100 nukleotider, 15-80 nukleotider, 15-60 nukleotider, 15-40 nukleotider eller 15-20 nukleotider i lengde.
- 3'-enden av CTOen kan ha en 3'-OH-terminal. Fortrinnsvis, 3'-enden av CTOen blokkeres for å hindre dets forlengelse. Den ikke-forlengbare blokkering av CTOen kan oppnås i samsvar med konvensjonelle metoder. For eksempel, blokkeringen kan utføres ved å tilsette til 3'-hydroksylgruppen av den siste nukleotid av CTOen en kjemisk enhet så som biotin, markører, en fosfatgruppe, alkylgruppe, ikke-nukleotidlinker, tiofosfat eller alkandiol.
- Alternativt, kan blokkeringen utføres ved å fjerne 3'-hydroksylgruppen av det siste nukleotid eller ved å anvende en nukleotid med ingen 3'-hydroksylgrupper så som dideoksynukleotid.

Fragmentet frigjort fra PTOen hybridiseres med CTOen, og tilveiebringer en form egnet i ekstensjon av fragmentet. Selv om en uoppkuttet PTO også hybridiseres med fange-

porsjonen av CTOen gjennom dets 5'-taggingporsjon, så vil dets 3'-målporsjon ikke hybridiseres til CTOen som hindrer dannelse av et forlenget dupleks.

Hybridiseringen i trinn (c) kan beskrives i detalj med referanser til beskrivelsene i trinn (a).

5

Trinn (d): Ekstensjon av fragmentet.

Ekstensjonsreaksjonen utføres ved anvendelse av resultatet fra trinn (c) og en templat-avhengig nukleinsyre polymerase. Fragmentet som er hybridisert med fangeporsjonen av CTOen forlenges til å danne en forlenget dupleks. I motsetning, ikke-spaltet PTO som er hybridisert med fangeporsjonen av CTOen forlenges ikke slik at ingen forlenget dupleks dannes.

Termen anvendt heri «forlenget dupleks» betyr en dupleks dannet med ekstensjonsreaksjon hvor fragmentet hybridisert med fangeporsjonen av CTOen forlenges ved anvendelse av templatporsjonen av CTOen som et templat og templatavhengig nukleinsyre polymerase.

Den forlengede dupleks har forskjellig T_m -verdi fra den for hybridet mellom uspaltet PTO og CTOen.

20

Fortrinnsvis, den forlengede dupleks har høyere T_m -verdi enn hybridet mellom uspaltet PTO og CTOen-

T_m -verdien av den forlengede dupleks kan justeres med (i) en sekvens og/eller lengde av fragmentet, (ii) en sekvens og/eller lengde av CTOen, eller (iii) sekvensen og/eller lengden av fragmentet og sekvensen og/eller lengden av CTOen.

Det er en påfallende egenskap med foreliggende oppfinnelse at den justerbare T_m -verdi av den forlengede dupleks benyttes for å gi et målsignal som indikerer nærvær av den forlengede dupleks ved smelting av den forlengede dupleks i trinn (e).

30

Termen anvendt heri « T_m » refererer til en smeltetemperatur hvorved halvparten av populasjonen av de dobbelttrådede nukleinsyremolekyler er dissosiert til enkelttrådede molekyler. T_m -verdien bestemmes med lengde og G/C-innhold av nukleotidene som er hybridisert. T_m -verdien kan beregnes ved konvensjonelle metoder så som ifølge Wallace regel (R.B.

35

Wallace, et al., *Nucleic Acids Research*, 6:3543-3547(1979)) and nearest-neighbor method (SantaLucia J. Jr., et al., *Biochemistry*, 35:3555–3562(1996)); Sugimoto N., et al., *Nucleic Acids Res.*, 24:4501-4505(1996)).

- 5 I samsvar med en foretrukket utførelse, T_m -verdien refererer til aktuelle T_m -verdier under reaksjonsbetingelser som faktisk praktiseres.

Den templat-avhengige nukleinsyre polymerase som anvendes i trinn (d) kan inkludere enhver nukleinsyre polymerase, for eksempel Klenow-fragment av *E. coli* DNA polymerase I,
 10 en termostabil DNA polymerase og bakteriofag T7 DNA polymerase. Fortrinnsvis, polymerasen er en termostabil DNA-polymerase som kan oppnås fra en rekke bakterielle arter, inkluderende *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*,
 15 *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus*
 20 og *Aquifex aeolicus*. Mest foretrukket, den templatavhengige nukleinsyre polymerase er Taq polymerase.

I samsvar med en foretrukket utførelse, enzymet som har 5'-nukleaseaktivitet anvendt i trinn
 25 (b) er identisk til den templatavhengige nukleinsyre polymerase anvendt i trinn (d). mer foretrukket, enzymet som har 5'-nukleaseaktivitet anvendt i trinn (b), templatavhengig nukleinsyre polymerase anvendt for ekstensjon av oppstrøms primer og templatavhengig nukleinsyre polymerase anvendt i trinn (d) er identiske til hverandre.

30 Den forlengede dupleks har en markør som stammer fra (i) minst en markør koplet til PTO-fragmentet og/eller CTOen, (ii) en markør inkorporert inn i den forlengede dupleks under ekstensjonsreaksjonen, (iii) en markør inkorporert inn i den forlengede dupleks under ekstensjonsreaksjonen og en markør koplet til PTO-fragmentet og/eller CTOen eller (iv) et interkalerende markør.

Nærvær av den forlengede dupleks kan indikere nærvær av målnukleinsyresekvensen på grunn av at den forlengede dupleks er dannet idet målnukleinsyresekvensen foreligger. For deteksjon av nærvær av den forlengede dupleks på en direkte måte, dannes en forlenget dupleks som har en markør som tilveiebringer et detekterbart signal i trinn (d). Markøren som anvendes på den forlengede dupleks tilveiebringer en signalforandring avhengig av om den forlengede dupleks er i en dobbeltråd eller enkelttråd, og gir til slutt målsignalet som indikerer nærvær av den forlengede dupleks med smelting av den forlengede dupleks.

Trinn (e): Smelting av den forlengede dupleks.

Etter ekstensjonsreaksjonen smeltes den forlengede dupleks over en rekke temperaturer for å gi et målsignal som indikerer nærvær av den forlengede dupleks.

Målsignalet er tilveiebrakt av (i) minst en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, (ii) en markør inkorporert inn i den forlengede dupleks under ekstensjonsreaksjonen, (iii) en markør inkorporert inn i den forlengede dupleks under ekstensjonsreaksjonen og en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, eller (iv) en interkalerende markør.

Termen anvendt heri «målsignal. For eksempel, målsignalet indikerer et signal fra markører (signalgenerering eller utslukking), en signalforandring fra markører (signaløking eller nedgang), en smeltekurve, et smeltemønster og en smeltetemperatur (eller T_m -verdi).

I samsvar med en foretrukket utførelse, målsignalene er en signalforandring fra markøren på den forlengede dupleks i smeltetrinnet. Signalforandringen kan oppnås ved målsignaler på ikke mindre enn to forskjellige temperaturer. Alternativt, målsignalet er en smeltekurve, et smeltemønster og en smeltetemperatur (eller T_m -verdi) oppnådd med målsignaler fra markøren på den forlengede dupleks over et område av temperaturer. Fortrinnsvis, område av temperaturer er et område av temperaturer for en smeltekurveanalyse eller temperaturer rundt T_m -verdien for den forlengede dupleks.

Den forlengede dupleks har høyere T_m -verdi enn hybridet mellom uspaltet PTO og CTOen. Derfor, den forlengede dupleks og hybridet oppviser forskjellige smeltemønstre fra hverandre. Slike forskjellige smeltemønstre muliggjør å diskriminere et målsignal fra ikke-målsignaler. Det forskjellige smeltemønster eller smeltetemperatur genererer målsignaler sammen med et egnet markørsystem.

Smeltingen kan utføres med konvensjonelle teknologier, inkluderende men ikke begrenset til oppvarming, alkali, formamid, urea og glykoksal behandling, enzymatiske metoder (for eksempel helikase virkning), og bindingsproteiner. For eksempel, smeltingen kan oppnås ved oppvarming ved temperaturer i området fra 80 °C til 105 °C. Generelle metoder for å utføre denne behandling er gitt i Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001).

Egne merkesystemer anvendt ifølge oppfinnelsen er forskjellige termer til deres typer, lokalisasjoner og signalgenereringsmønster.

Merkesystemer nyttige i oppfinnelsen vil bli beskrevet i detalj som følger:

(i) markør koplet til fragmentet og/eller CTOen.

I samsvar med en foretrukket utførelse er målsignalet tilveiebrakt med minst en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen. Idet den forlengede dupleks dannes mellom PTO-fragmentet og CTOen, så gir enten markøren på PTO-fragmentet eller på CTOen foreliggende på den forlengede dupleks, målsignalet i smeltetrinnet.

Markøren inkluderer en interaktiv dobbelmarkør og en enkelmarkør.

(i-1) interaktiv dobbelmarkør.

Det interaktive markørsystem er et signalgenererende system hvor energien plasseres ikke-radioaktivt mellom et donormolekyl og et akseptormolekyl. Som et eksempel på det interaktive markørsystem, inkluderer FRET (fluorescens resonans energioverføring) markørsystemet en fluorescerende reportermolekyl (donormolekyl) og en quencher molekyl (akseptormolekyl). I FRET er energidonoren fluorescent, men energiakseptoren kan være fluorescent eller ikke-fluorescent. I en annen form av interaktive markørsystemer er energidonoren ikke-fluorescent, for eksempel en kromofor, og energiakseptoren er fluorescent. I en ytterligere form for interaktive markørsystemer er energidonoren luminescent, for eksempel bioluminiscient, kjemiluminiscient, elektrokjemiluminiscient og akseptoren er fluorescent. Donormolekylet og akseptormolekylet kan være beskrevet som et reportermolekyl og et stoppermolekyl ifølge foreliggende oppfinnelse, respektivt.

Fortrinnsvis, signalet som indikerer nærvær av den forlengede dupleks (det vil si nærvær av målnukleinsyresekvensen) genereres med interaktive markørsystemer, mer fortrinnsvis FRET-markørsystemet (det vil si interaktivt dobbelt markørsystem).

5

Første utførelse (intra-tråd interaktiv dobbelmarkør).

I en første utførelse av et interaktivt dobbeltmarkørsystem har fragmentet eller CTOen en interaktiv dobbelmarkør omfattende et reportermolekyl og et quencher molekyl; hvor smeltingen av den forlengede dupleks i trinnet (e) induserer forandring i et signal fra den interaktive dobbelmarkør for å gi målsignalet i trinn (e). Den første utførelse av det interaktive dobbeltmarkørsystem er illustrert i figurer 2, 6 og 9. Den første utførelse har blitt gitt navnet «intra-tråd interaktiv dobbelmarkør».

15 Første utførelse i fig 2 (intra-tråd interaktiv dobbelmarkør).

Den eksemplifiserte utførelse beskrives med henvisning til fig 2. Templatporsjonen av CTOen har et reportermolekyl og et quencher molekyl. PTOen hybridiserer med målnukleinsyresekvensen oppkuttet for å frigjøre fragmentet og fragmentet hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen og forlenges for å danne den forlengede dupleks.

20

Idet den forlengede dupleks dannes i trinn (d), separeres reportermolekylet og quencher molekylet på CTOen konformasjonsmessig for å muliggjøre at quencher molekylet utslukker signalet fra reportermolekylet; hvor idet den forlengede dupleks smeltes i trinn (e), reportermolekylet og quencher molekylet er konformasjonsmessig tilgrenset til hverandre for å muliggjøre at quencher molekylet kan stoppe signalet fra reportermolekylet, slik at målsignalet som gid indikerer nærvær av den forlengede dupleks i trinn (e).

25

Uttrykket som anvendes heri «reportermolekylet» og quencher molekylet er konformasjonsmessig tilgrensende» betyr at reportermolekylet og quencher molekylet er tredimensjonalt tilgrensende til hverandre med en konformasjonsstruktur av fragmentet eller CTO så som en vilkårlig kveil og hårnålsstruktur.

30

Uttrykket anvendt heri «reportermolekylet og quencher molekylet er konformasjonsmessig separert» betyr at reportermolekylet og quencher molekylet er tredimensjonalt separert med

forandring av en konformasjonsstruktur av fragmentet eller CTO ved dannelse av en dobbelttråd.

- 5 Fortrinnsvis, målsignalet gitt i trinn (e) inkluderer smeltekurven, et smeltemønster eller en T_m -verdi som oppnås ved å måle forandring av fluorescent signalet generelt i trinn (d).

I samsvar med en foretrukket utførelse, reportermolekylet og quencher molekylet kan være lokalisert ved ethvert sete på CTOen, så lenge signalet fra reportermolekylet stoppes og ikke-stoppes avhengig av smelting av den forlengede dupleks.

10

I samsvar med en foretrukket utførelse, reportermolekylet og quencher molekylet er begge koplet til templatporsjonen eller til fangeporsjonen av CTOen.

- 15 I samsvar med en foretrukket utførelse, reportermolekylet og quencher molekylet er posisjonert ved 5'-enden og 3'-enden av CTO.

- 20 I samsvar med en foretrukket utførelse, en av reportermolekylene og quencher molekylet på CTOen er lokalisert ved dets 5'-ende eller ved 1-5 nukleotider fra dets 5'-ende og den andre er lokalisert for å stoppe og ikke-stoppe signaler fra reportermolekylet avhengig av konformasjon av CTO.

- 25 I samsvar med den foretrukne utførelse, et av reportermolekylene og quencher molekylet på CTOen er lokalisert ved dets 3'-ende eller ved 1-5 nukleotider fra dets 5'-ende og den andre er lokalisert for å stoppe og ikke-stoppe signaler fra reportermolekylet avhengig av konformasjon av CTO.

- 30 I samsvar med en foretrukket utførelse, reportermolekylet og quencher molekylet er posisjonert ikke mer enn 80 nukleotider, fortrinnsvis ikke mer enn 60 nukleotider, enda mer foretrukket ikke mer enn 30 nukleotider, enda mer foretrukket ikke mer enn 25 nukleotider fra hverandre. I samsvar med en foretrukket utførelse, reportermolekylet og quencher molekylerne er separert med minst 4 nukleotider, mer fortrinnsvis minst 6 nukleotider, enda mer fortrinnsvis minst 10 nukleotider, enda mer foretrukket minst 15 nukleotider.

- 35 I foreliggende oppfinnelse kan et hybrid mellom ikke-spaltet PTO og CTOen dannes.

Idet templatporsjonen av CTOen er merket med et interaktivt dobbelmarkør som vist i fig 2, er en signalförändring fra markøren på hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen ikke induisert. Derfor, hybridet tilveiebringer ikke noe ikke-målsignal.

- 5 Idet fangeporsjonen av CTOen er merket med en interaktiv dobbelmarkør, tilveiebringer hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen et ikke-målsignal i spaltetrinnet. I dette tilfellet, muliggjør forskjellen i T_m -verdier av den forlengete dupleks og hybridet å diskriminere mål-signalene av den forlengete dupleks fra ikke-målsignal av hybridet.

10 Første utførelse i fig 6 (intra-tråd interaktiv dobbelmarkør).

Den eksemplifiserte utførelse er beskrevet med henvisning til fig 6. 5'-taggingporsjonen av PTOen har et reportermolekyl og et quencher molekyl. PTOen som hybridiserer med mål-nukleinsyresekvensen oppkuttet for å frigjøre fragmentet omfattende 5' taggingporsjonen med reportermolekylene og quencher molekylene. Fragmentet hybridiseres med fange-

15 porsjonen av CTOen.

Idet den forlengete dupleks dannes i trinn (d), er reportermolekylet og quencher molekylet på fragmentet konformasjonsmessig separert for å muliggjøre at quencher molekylet ikke-quencher signalet på reportermolekylet; hvor idet den forlengete dupleks er smeltet i trinn

20 (e), reportermolekylet og quencher molekylet er konformasjonsmessig tilgrenset til hverandre for å muliggjøre at quencher molekylet quencher signalet fra reportermolekylet, slik at målsignalene gis for å indikere nærvær av den forlengete dupleks i trinn (e).

I samsvar med en foretrukket utførelse, reportermolekylet og quencher molekylet kan være

25 lokalisert ved ethvert sete for fragmenter, så lenge signalet fra reportermolekylet quenches og ikke-quenches avhengig av smelting av den forlengete dupleks.

I samsvar med en foretrukket utførelse, en av reportermolekylene og quencher molekylet på fragmentet er lokalisert ved dets 5'-ende eller ved 1-5 nukleotider fra dets 5'-ende og den

30 andre er lokalisert for å stoppe og ikke-stoppe signalene fra reportermolekylet avhengig av konformasjonen av fragmentet.

I samsvar med en foretrukket utførelse, reportermolekylet og quencher molekylet er posisjonert ikke mer enn 50 nukleotider, er fortrinnsvis ikke mer enn 40 nukleotider, enda

35 mer foretrukket ikke mer enn 30 nukleotider, enda mer foretrukket ikke mer enn 20 nukle-

otider fra hverandre. I samsvar med en foretrukket utførelse, reportermolekylet og quencher molekylet er separert med minst 4 nukleotider, mer fortrinnsvis minst 6 nukleotider, enda mer foretrukket minst 10 nukleotider, og enda mer foretrukket minst 15 nukleotider.

- 5 Som representert i fig 6, hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen tilveiebringer et ikke-målsignal i smeltetrinnet. I dette tilfellet, forskjellen i T_m -verdier av den forlengete dupleks og hybridet muliggjør å diskriminere målsignalene av den forlengete dupleks fra ikke-målsignalene av hybridet.

10 Andre utførelser (inter-tråd interaktiv dobbelmarkør).

I en andre utførelse av den interaktive markørsystem har fragmentet en av en interaktiv dobbelmarkør omfattende et reportermolekyl og et quencher molekyl og CTOen har den andre av den interaktive dobbelmarkør; hvor smelting av den forlengete dupleks i trinn (e) induserer forandring av et signal fra den interaktive dobbeltmarkør til å gi målsignalet i trinn (e).

Den eksemplifiserte utførelse er beskrevet med henvisning til fig 8.

- 20 I det den forlengete dupleks dannes i trinn (d), stoppes signalet fra reportermolekylet koplet til CTOen med quencher molekylet koplet til PTOen. Idet den forlengete dupleks smeltes i trinn (e), separeres reportermolekylet og quencher molekylet for å muliggjøre at quencher molekylet ikke-quencher signalene fra reportermolekylet, slik at målsignalet gis for å indikere nærvær av den forlengete dupleks i trinn (e).

- 25 Fortrinnsvis, målsignalet gitt i trinn (e) inkluderer en smeltekurve, et smeltemønster eller en T_m -verdi som oppnås ved å måle forandring av fluoriserende signal fra den interaktive dobbelmarkør.

- 30 Reportermolekylet og quencher molekylet kan være lokalisert ved samme sete av PTO-fragmentet og CTOen, så lenge signalet for reportermolekylet stoppes av quencher molekylet i den forlengete dupleks.

I samsvar med en foretrukket utførelse, reportermolekylet eller quencher molekylet på PTO-fragmentet er lokalisert ved 5'-enden av 5'-taggingporsjonen.

I samsvar med en foretrukket utførelse, reportermolekylet eller quencher molekylet på CTOen er lokalisert ved dets 3'-ende.

Som representert i fig 8, hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen tilveiebringer et ikke-målsignal i smeltetrinnet. I dette tilfellet, forskjellen i T_m -verdier av den forlengete dupleks og hybridet muliggjør å diskriminere målsignalene av den forlengete dupleks fra ikke-mål-signalet av hybridet.

Reportermolekyl og quencher molekyl som er nyttige ifølge foreliggende oppfinnelse kan inkludere enhver av molekylerne kjent innen fagfeltet. Eksempler på disse er: Cy2™ (506), YO-PRO™-1 (509), YOYO™-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorX™ (519), Alexa™ (520), Rhodamine 110 (520), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), RiboGreen™ (525), Rhodamine Green™ (527), Rhodamine 123 (529), Magnesium Green™ (531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), Dil (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange™ (575), Phycoerythrin R&B (575), Rhodamine Phalloidin (575), Calcium Orange™ (576), Pyronin Y (580), Rhodamine B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), Texas Red (615), Nile Red (628), YO-PRO™-3 (631), YOYO™-3 (631), R-phycoerythrin (642), C-Phycocyanin (648), TO-PRO™-3 (660), TOTO3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5™ (670), Thiadicarbocyanine (671), Cy5.5 (694), HEX (556), TET (536), Biosearch Blue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610 (610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), Fluorescein (520), Fluorescein-C3 (520), Pulsar 650 (566), Quasar 570 (667), Quasar 670 (705) og Quasar 705 (610). Numrene i parentes er en maksimums emisjonsbølgelengde i nanometer. Fortrinnsvis, reportermolekylene og quencher molekylerne inkluderer JOE, FAM, TAMRA, ROX og fluorescein basert markør.

Egnete par av reporter-quencher er beskrevet i en rekke publikasjoner som følger:

Pesce et al., editors, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, Color AND Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes,

Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Edition (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996) U.S. Pat. Nos 3,996,345 og 4,351,760.

5

Det skal bemerkes at et ikke-fluorescerende svart quencher molekyl i stand til å quenche en fluorescens av et bredt spekter av bølgelengder eller en spesifikk bølgelengde kan anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse. Eksempler på slike er BHQ og DABCYL.

- 10 I FRET-markøren tilpasset til CTOen, omfatter reporteren en donor av FRET og quencheren omfatter den andre parten (akseptor) av FRET. For eksempel, et fluorescerende fargestoff anvendes som reporter og en rodamin fargestoff som quencher.

(i-2) enkel markør

- 15 Den foreliggende oppfinnelse kan også utmerkes utøves ved anvendelse av enkelt markørsystemer for å tilveiebringe signaler som ikke er nærvær av målnukleinsyresekvenser.

- I samsvar med en foretrukket utførelse, fragmentet eller CTOen har en enkelt markør, og
20 smelting av den forlengete dupleks i trinn (e) induserer forandring av et signal fra enkeltmarkøren for p gi målsignalet i trinn (e).

Første utførelse i fig 3 (enkeltmarkørsystem).

- Den eksemplifiserte utførelse beskrevet med henvisning til fig 3. Templatporsjonen av
25 CTOen har en enkelt fluorescerende markør. PTOen hybridisert med målnukleinsyresekvensen oppkuttet til å frigjøre fragmenter. Fragmentet hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen og forlenges for å danne den forlengete dupleks. Ved dannelse av den forlengete dupleks, øker fluorescens intensiteten fra den enkeltfluorescerende markør. Idet den forlengete dupleks smeltes i trinn (e), reduseres fluorescens intensiteten fra enkeltfluorescerende markør, slik at målsignalene gis for å indikere nærvær av den forlengete dupleks i
30 trinn (e).

- I samsvar med en foretrukket utførelse, enkeltmarkøren kan være lokalisert med ethvert sete av CTOen, så lenge signalnivået fra enkeltmarkøren forandres avhengig av smelting av den
35 forlengete dupleks.

I samsvar med en foretrukket utførelse, enkeltmarkøren er koplet til templatporsjonen eller til fangeporsjonen av CTOen.

- 5 Idet templatporsjonen av CTOen merkes med en enkeltmarkør som vist i fig 3, så vil en signalforandring fra markøren på hybridet mellom den ikke-spaltede PTO og CTOen ikke induseres. Derfor, hybridet tilveiebringer ikke et ikke-målsignal.

- 10 Idet fangeporsjonen av CTOen er merket med en enkeltmarkør, tilveiebringer hybridet mellom den ikke-spaltede PTO og CTOen et ikke-markørsignal i smeltetrinnet. I dette tilfellet vil forskjellen i T_m -verdier av den forlengete dupleks og hybridet muliggjøre diskriminering av målsignalet av den forlengete dupleks fra ikke-målsignal av hybridet.

15 Andre utførelser i fig 7 (enkel markørsystem)

- Den eksemplifiserte utførelse er beskrevet med henvisning til fig 7. 5'-taggingporsjonen av PTOen har et enkelt fluorescerende markør. PTOen som er hybridisert med målnukleinsyresekvensen oppkuttet for å frigjøre fragmentet omfattende 5' taggingporsjonen med enkelt fluorescerende markør. Ved hybridisering økes signalintensiteten fra enkelt
20 fluorescerende markøren på 5'-taggingporsjonen. Idet den forlengete dupleks smeltes i trinn (e), så blir signalintensiteten fra enkelt fluorescerende markøren redusert, slik at målsignalet gis for å indikere nærvær av den forlenete dupleks i trinn (e).

- I samsvar med en foretrukket utførelse, enkeltmarkøren kan være lokalisert ved ethvert sete
25 på PTO-fragmentet, så lenge signalnivået fra enkeltmarkøren forandres avhengig av smelting av den forlengete dupleks.

- Som representert i fig 7, hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTO tilveiebringer et ikke-målsignal i smeltetrinnet. I dette tilfellet, forskjellen i T_m -verdier av den forlengete dupleks på
30 hybridet muliggjør å diskriminere målsignalet av den forlengete dupleks fra ikke-målsignalet av hybridet.

- Enkeltmarkøren anvendt heri må være i stand til å tilveiebringe et forskjellig signal avhengig av dets nærvær på en dobbelttråd eller enkelttråd. Enkeltmarkøren inkluderer en
35 fluorescerende markør, et luminescerende markør, en kjemiluminescerende markør, en

elektrokjemisk markør og en metallmarkør. Fortrinnsvis, enkeltmarkøren inkluderer en fluorescerende markør.

5 Typer og foretrukne lignings seter for enkeltfluorescerende markører anvendt ifølge oppfinnelsen er beskrevet i US patenter 7,537,886 og 7,348,141, hvis beskrivelser inkorporeres heri med referanse i sin helhet. Fortrinnsvis, enkelt fluorescerende markør inkluderer JOE, FAM, TAMRA, ROX og fluoresceinbasert markør. Den merkede nukleotidenhet er fortrinnsvis posisjonert ved indre nukleotidenheter med oligonukleotider i stedet for 5'-enden eller ved 3'-enden.

10 Den enkelt fluorescerende markør som er nyttig ifølge foreliggende oppfinnelse kan beskrives med henvisning til beskrivelser for reporter og quencher molekyler som angitt over.

15 Fortrinnsvis, hvis foreliggende oppfinnelse, en faststoffase utføres ved anvendelse av en enkeltmarkør kan den utnytte en generell fluorescerende markør og krever ikke en spesifikk fluorescerende markør i stand til å tilveiebringe et fluorescerende signal med forskjellige intensiteter avhengig av nærvær av dobbeltråd eller enkelttråd. Målsignalet tilveiebrakt på faststoff substratet måles. Utførelsen av enkeltmarkørsystem med immobilisert CTO er
20 illustrert i fig 12.

I det det anvendes CTO immobilisert på et faststoff substrat, kan kjemiske markører (for eksempel biotin) eller enzymatiske markører (for eksempel alkalisk fosfatase, peroksidase, β -galaktosidase og β -glukosidase) anvendes.

25 I markørsystemet som benytter «markør koplet til fragmentet og/eller CTOen», kan markørene være posisjonert i en slik grad at idet et hybrid mellom en ikke-spaltet PTO og CTO dannes, så gir hybridet ikke et ikke-målsignal i trinn (e). Alternativt, markørene kan være posisjonert i den grad at i det et hybrid mellom en ikke-spaltet PTO og CTOen dannes, gir
30 hybridet et ikke-målsignal i trinn (e); hvor T_m -verdien av den forlengete dupleks er høyere enn av hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen.

Fortrinnsvis, hvor markøren er posisjonert i en slik grad at et hybrid mellom en ikke-spaltet PTO og CTOen ikke gir et ikke-målsignal, vil området inkluderende T_m -verdien av hybridet

utnyttes for å selektere T_m -verdien av den forlengete dupleks for å detektere en målnukleinsyresekvens.

(ii) Markør inkorporert inn i den forlengete dupleks.

- 5 Den foreliggende oppfinnelse kan benytte en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen for å tilveiebringe målsignaler som indikerer nærvær av den forlengete dupleks.

10 Selv om PTO-fragmentet eller CTO ikke har noen markør, så kan en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen med suksess anvendes for å muliggjøre markering av den forlengete dupleks. Figurer 10 og 11 illustrerer en utførelse hvor et enkeltmerket nukleotid inkorporeres inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen (se C og D av figurene 10 og 11). Denne utførelse er også appliserbar til andre utførelser som anvender en smelteanalyse.

- 15 I samsvar med en foretrukket utførelse, målsignalet tilveiebringes med en enkeltmarkør inkorporeres inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen; hvor den inkorporerte enkeltmarkør er koplet til et nukleotid inkorporert under ekstensjonsreaksjonen; hvor smelting av den forlengete dupleks i trinn (e) induserer forandring av et signal fra
20 enkeltmarkøren for å gi målsignalet i trinn (e).

- Den eksemplifiserte utførelse er beskrevet med henvisning til fig 10. PTOen hybridisert med målnukleinsyresekvensen oppkuttet for å frigjøre fragmentet. Fragmentet hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen immobilisert på et faststoffs substrat og forlenget i nærvær av
25 nukleotider merket med enkeltfluorescerende markør for å danne den forlengete dupleks. Fluorescens signalet fra den forlengete dupleks kan detekteres på spott av faststoffs substrat med immobilisert CTO. Idet den forlengete dupleks smeltes, frigjøres en tråd som har en fluorescerende markør og fluorescens signalet detekteres ikke lenger på flekken (ikke vist i fig 10). Derfor, en signalforandring kan tilveiebringes på flekken ved smelting av den for-
30 lengete dupleks. På denne måte, målsignalene gis for å indikere nærvær av den forlengete dupleks i trinn (e).

- Målsignalet gitt i trinn (e) inkluderer en smeltekurve, et smeltemønster eller en T_m -verdi som kan oppnås ved å måle forandring av fluorescens intensiteten, CTO-immobilisert spot.

I samsvar med en foretrukket utførelse, et nukleotid inkorporert under ekstensjonsreaksjonen har en første ikke-naturlig base og CTOen har en nukleotid som har en andre ikke-naturlig base med en spesifikk bindingsaffinitet til den første ikke-naturlige base, som illustrert i fig 11. Nukleotidet som har den andre ikke-naturlige base er fortrinnsvis lokalisert ved ethvert sete på templatporsjonen av CTOen.

Termen anvendt heri «ikke-naturlig base» refererer til derivater av naturlige baser så som adenin (a) guanin (g), tumin (t), cytocin (c) og urasil (u) som er i stand til å danne hydrogenbindende basepar. Termen anvendt heri «ikke-naturlig base» inkluderer baser som har forskjellige baseparingsmønstre fra naturlige baser som morforbindelser, som beskrevet, for eksempel i US patenter nr 5,432,272, 5,965,364, 6,001,983 og 6,037,120. Baseparingen mellom ikke-naturlige baser involverer to eller tre hydrogenbindinger som naturlige baser. Baseparingen mellom ikke-naturlige baser utføres på en spesifikk måte.

Spesifikke eksempler på ikke-naturlige baser inkluderer følgende baser i basepar kombinasjoner: iso-C/iso-G, iso-dC/iso-dG, K/X, H/J, and M/N (se U.S. Pat. No. 7,422,850).

Den eksemplifiserte utførelse er beskrevet med henvisning til fig 11. Fragmentet hybridisert med CTOen med en nukleotid som har en andre ikke-naturlig base (for eksempel iso-dC) med en spesifikk bindingsaffinitet til et første ikke-naturlig base (for eksempel iso-dG). Ekstensjonen utføres i nærvær av en nukleotid som har den første ikke-naturlige base merket med en enkelt fluorescerende markør, som danner den forlengete dupleks. I ekstensjonsreaksjonen, inkorporeres nukleotidet som har den første ikke-naturlige base med en motsatt side til nukleotidet som har den andre ikke-naturlige base.

Fluorescens signalene fra den forlengete dupleks kan detekteres på spot av et faststoff substrat med immobilisert CTO. I det den forlengete dupleks smeltes, frigjøres en tråd som har et fluorescerende markør og det fluorescerende markør detekteres ikke lenger for spottet (ikke vist i fig 11). Derfor, en signalförändring kan tilveiebringes på spottet og ved smelting av den forlengete dupleks. På denne måte gis målsignalet for å indikere nærvær av den forlengete dupleks i trinn (a).

I det markøren inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen benyttes, så inkorporeres ikke markøren inn i hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTO på grunn av at hybridet ikke er forlenget. Derfor, hybridet tilveiebringer ikke noe ikke-målsignal.

Typen og karakteristikk for enkeltmarkører anvendt kan beskrives med referanse til beskrivelser for merkesystemet som benytter «markør koplet til fragmenter og/eller CTOen» som angitt ovenfor.

5

(iii) Markør inkorporert inn i den forlengete dupleks og markør koplet til fragmentet eller CTOen.

Foreliggende oppfinnelse kan benytte et markeringssystem som anvender en samvirke av en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen og en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, som illustrert i figurer 4 og 5.

10

I samsvar med en foretrukket utførelse, målsignalet tilveiebringes med en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen og en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, og den inkorporerte markør er koplet til et nukleotid inkorporert under ekstensjonsreaksjonen; hvor de to markører er interaktive dobbelmarkører av et reporter-molekyl og et quencher molekyl; hvor smelting av den forlengete dupleks i trinn (e) induserer forandring av et signal fra den interaktive dobbelmarkør for å gi målsignalet i trinn (e).

15

Mer fortrinnsvis, nukleotidet inkorporert under ekstensjonsreaksjonen har en første ikke-naturlig base og CTOen har et nukleotid som har en andre ikke-naturlige base med en spesifikk bindingsaktivitet til den første ikke-naturlige.

20

Den eksemplifiserte utførelse er beskrevet med henvisning til fig 4. Fragmentet hybridisert med CTOen omfatter et reporter- eller quencher-molekyl og et nukleotid som har en andre ikke-naturlige base (for eksempel iso-dC) som er en spesifikk bindingsaktivitet til en første ikke-naturlige base (for eksempel iso-dG). Ekstensjonen utføres i nærvær av et nukleotid som har den første ikke-naturlige base merket med en quencher eller reporter-molekyl, som danner den forlengete dupleks hvor signalet fra reporter-molekylet stoppes av quencher-molekylet. I ekstensjonsreaksjonen, så inkorporeres nukleotidet som har den første ikke-naturlige base ved en motsatt side til nukleotidet som har den andre ikke-naturlige base.

25

30

Idet den forlengete dupleks smeltes i trinn (e) separeres reporter-molekylet og quencher-molekylet for å muliggjøre at quencher-molekylet unquencher signalet fra reporter-molekylet, slik at målsignalet gis for å indikere nærvær av den forlengete dupleks i trinn (e).

35

Fortrinnsvis, målsignalet gitt i trinn (e) inkluderer en smeltekurve, et smeltemønster eller en T_m -verdi som oppnås ved å måle forandring av signalet fra den interaktive dobbeltmarkør.

- 5 Stedet for markøren på CTOen og inkorporeringssetet av markøren inkorporert bestemmes i den grad de to markører fungerer som en interaktiv dobbeltmarkør for å indusere signalforandring i smeltetrinnet.

- 10 Enda mer foretrukket, templatporsjonen av CTOen har en reporter eller quencher molekyl og et nukleotid som har en andre ikke-naturlig base. Ekstensjonsreaksjonen i trinn (d) utføres i nærvær av et nukleotid som har en quencher eller reportermolekyl og en første ikke-naturlig base med en spesifikk bindingsaffinitet til den andre ikke-naturlige base i CTOen. De to ikke-naturlige baser i den forlengete dupleks i trinn (e) danner et basepar for å quenche et signal fra reportermolekylet med quencher molekylet og å indusere forandring av et signal, hvorved målsignalet tilveiebringes. Alternativt, fragmentet har en reporter eller quencher molekyl og
- 15 templatporsjonen av CTOen har en nukleotid som har en andre ikke-naturlig base.

- Ekstensjonsreaksjonen i trinn (d) utføres i nærvær av et nukleotid som har en quencher eller reportermolekyl og en første ikke-naturlig base med en spesifikk bindingsaffinitet til den andre ikke-naturlige base i CTOen. De to ikke-naturlige baser i den forlengete dupleks i trinn
- 20 (d) danner et basepar som induserer forandring av et signal fra reporter molekylet med quenching, hvorved målsignalet tilveiebringes. En annen eksemplifisert utførelse beskrevet med referanse til fig 5. I denne utførelse hybridiseres fragmentet som har en reporter eller quencher molekyl med CTOen omfattende et nukleotid som har en andre ikke-naturlig base (for eksempel iso-dC) som er en spesifikk bindingsaffinitet til en første ikke-naturlig base (for eksempel iso-dG). Ekstensjonen utføres i nærvær av et nukleotid som har den første ikke-
- 25 naturlige base markert med en quencher eller reporter molekyl, som danner den forlengete dupleks hvor signalet fra reportermolekylet quenches av quencher molekylet. I ekstensjonsreaksjonen, nukleotidet som har den første ikke-naturlige base inkorporeres ved et motsatt sete til nukleotidet som har den andre ikke-naturlige base.

- 30 Idet den forlengete dupleks dannes i trinn (d), separeres konformasjonsmessig reporter-molekylet og quencher molekylet for å muliggjøre at quencher molekylet unquencher signalet fra reportermolekylet; hvor idet den forlengete dupleks i trinn (e), reporter molekylet og quencher molekylet er konformasjonsmessig tilgrensende til hverandre for å muliggjøre at

quencher molekylet quencher signalet fra reportermolekylet, slik at målsignalet gis for å indikere nærvær av den forlengete dupleks i trinn (e).

- 5 Fortrinnsvis, målsignalet gitt i trinn (e) inkluderer en smeltekurve, et smeltemønster eller en T_m -verdi som kan oppnås med å måle forandring av signalene fra den interaktive dobbelt-markør.

- 10 Stedet for markøren på PTOen og inkorporeringssetet av markøren inkorporert bestemmes i den grad at de to markører fungerer som en interaktiv dobbeltmarkør for å indusere signalforandring i smeltetrinnet.

- 15 Idet markøren inkorporert i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen benyttes, så inkorporeres ikke markøren inn i hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen på grunn av at hybridet ikke er forlenget. Derfor, hybridet tilveiebringer ikke et ikke-målsignal i smeltetrinnet.

(iv) Interkalerende markør

- 20 Den foreliggende oppfinnelse kan benyttes som en interkalerende markør for å tilveiebringe målsignalet som gir indikasjon for nærvær av den forlengete dupleks. Den interkalerende markør er mer nyttig på en fastfase reaksjon som benytter immobiliserte CTOer på grunn av at de dobbelttrådede nukleinsmolekyler som er tilstede i prøvene kan generere signaler.

- 25 Eksemplifiserte interkalerende fargestoff nyttige for denne oppfinnelse inkluderer: SYBRTM Green I, PO-PROTM-1, BO-PROTM-1, SYTOTM43, SYTOTM44, SYTOTM45, SYTOXTMBlue, POPOTM-1, POPOTM-3, BOBOTM-1, BOBOTM-3, LO-PROTM-1, JO-PROTM-1, YO-PROTM1, TO-PROTM1, SYTOTM11, SYTOTM13, SYTOTM15, SYTOTM16, SYTOTM20, SYTOTM23, TOTOTM-3, YOYOTM3, GelStarTM og tiazoloransje. De interkalerende fargestoff interkalerer spesifikt i dobbelttrådede nukleinsyremolekyler for å generere signaler.

- 30 Fig 13 illustrerer en utførelse hvor interkalerende fargestoff interkalerer mellom basepar av den forlengete dupleks (c og d i fig 13). Utførelsen kan også anvendes for andre utførelser som benytter en smelteanalyse.

Den eksemplifiserte utførelse er beskrevet med referanse til fig 13. Fragmentet hybridiseres med en fangeporsjon av CTOen immobilisert på et faststoff substrat. Ekstensjonen utføres i nærvær av et interkalerende fargestoff (for eksempel SYBR™ Green) og produserer den forlengete dupleks med interkalerende fargestoff. Det fluoriserende signal fra den forlengete dupleks på flekker av faststoff substratet med immobilisert CTO kan detekteres ved anvendelse av interkalerende fluoriserende fargestoff. Idet den forlengete dupleks smeltes, frigjøres interkalerende fluoriserende fargestoff og det fluoriserende signal detekteres ikke lenger på flekken (ikke vist i fig 13). På denne måte, målsignalet gis for å indikere nærvær av den forlengete dupleks i trinn (e).

Hybrider mellom ikke-spaltet PTO og CTO tilveiebringer et ikke-målsignal i smeltetrinnet. I dette tilfellet, forskjellen i T_m -verdier av den forlengete dupleks og hybridet muliggjør å diskriminere målsignalet av den forlengete dupleks fra ikke-målsignalet av hybridet (ikke vist i fig 13).

Fortrinnsvis, målsignalet gitt i trinn (e) inkluderer en smeltekurve, et smeltemønster eller en T_m -verdi som oppnås ved å måle forandring av det fluoriserende signal generert i trinn (d).

Trinn (f): Deteksjon av målsignal

Til slutt, den forlengete dupleks detekteres ved å måle målsignalet gitt i trinn (e), hvorved nærvær av den forlengete dupleks indikerer nærvær av målnukleinsyresekvensen.

Deteksjonen kan utføres på forskjellige måter avhengig av typene målsignal.

I samsvar med en foretrukket utførelse, deteksjon av målsignalet utføres med en smelteanalyse.

Termen anvendt heri «smelteanalyser» betyr en fremgangsmåte hvor et målsignal som er indikerende for nærvær av den forlengete dupleks oppnås med å smelte den forlengete dupleks, inkluderende en fremgangsmåte for å måle signaler ved to forskjellige temperaturer, smeltekurveanalyser, smeltemønsteranalyser og smeltetoppanalyse. Fortrinnsvis, smelteanalyser er en smeltekurveanalyse.

I samsvar med en foretrukket utførelse, smelting av trinn (e) etterfølges av hybridisering for å gi målsignalet som indikerer nærvær av den forlengete dupleks. I dette tilfellet, nærvær av den forlengete dupleks detekteres ved hybridiseringskurveanalyse.

- 5 Smeltekurven eller hybridiseringskurven kan oppnås ved konvensjonelle teknologier, for eksempel som beskrevet i US patent nr 6,174,670 og 5,789,167, Drobyshev et al, *Gene* 188: 45(1997); Kochinsky and Mirzabekov *Human Mutation* 19:343(2002); Livehits et al *J. Biomol. Structure Dynam.* 11:783(1994); and Howell et al *Nature Biotechnology* 17:87 (1999). For eksempel, en smeltekurve eller hybridiseringskurve kan bestå av et grafisk plott
10 eller fremvisning av variasjonen av utgangssignalet med parametere for hybridiserings stringens. Utgangssignalet kan plottes direkte mot hybridiseringsparametere. Typisk, en smeltekurve eller en hybridiseringskurve vil ha utgangssignalet, for eksempel fluorescens, som indikerer grad av dupleks struktur (det vil si grad av hybridisering), plottet på Y-aksen og hybridiseringsparametere på X-aksen.

- 15 PTOen og CTOen kan utgjøres av naturlige forekommende dNMPer. Alternativt, PTOen og CTOen kan utgjøres av modifisert nukleotid eller ikke-naturlig nukleotid så som PNA (peptid nukleinsyre, se PCT publikasjon nr WO 92/20702) og LNA (låst nukleinsyre, se PCT-publika-
20 sjon nr. WO 98/22489, WO 98/39352 og WO 99/14226). PTOen og CTOen kan omfatte universelle baser så som deoksyinosin, inosin, 1-(2'-deoksy-beta-D-ribofuranosyl)-3-nitro-
pyrrol og 5-nitroindol. Termen «universalbase» refererer til en som er i stand til å danne basepar med hver av de naturlige DNA/RNA-baser med liten diskriminering mellom disse.

- Som beskrevet ovenfor, PTOen kan spaltes ved et sete lokalisert i 3'-retningen bort fra 3'-
25 enden av 5'-taggingporsjonen av PTOen. Spaltingssetet kan være lokalisert ved 5'-ende- delen av 3'-målporsjonen av PTOen. I det PTO-fragmentet omfatter 5'-endedelen av 3'- målporsjonen av PTOen, kan et sete av CTOen hybridisert med 5'-endedelen av 3'-mål-
porsjonen omfatte en universell base, degenererende sekvens eller kombinasjonen av disse. For eksempel, dersom PTOen spaltes ved et sete lokalisert 1 nukleotid i en 3'-retning fra 3'-
30 enden av 5'-taggingporsjonen av PTOen, er det fordelaktig at 5'-endelelen av fangepor- sjonen av CTOen utgjøres av en universell base for hybridisering med nukleotidet. Dersom PTOen spaltes ved et sete lokalisert 2 nukleotider i en 3'-retning fra 3'-enden av 5' tagging-
porsjonen av PTOen, er det fordelaktig at 5'-enden av fangeporsjonen av CTOen omfatter en degenererende sekvens og dets 3' retningstilgrensende nukleotid omfatter en universal
35 base. Som sådan, idet spalting av PTOen forekommer ved forskjellige seter av 5'-endedelen

av 3' målporsjonen, er anvendelse av universelle baser og degenererende sekvenser i CTOen nyttige. I tillegg, idet PTOene har den samme 5' taggingporsjon anvendes for-
 skrivning av multiple målnukleinsyresekvenser under oppstrøms primer ekstensjons-
 avhengig spaltingsinduksjon, kan PTO-fragmenter som har forskjellige 5' endedeler av 3'
 5 målporsjonen genereres. I slike tilfeller er universelle baser og degenererende sekvenser
 hensiktsmessig benyttet i CTOen. Strategiene som benytter universelle baser og degene-
 rerende sekvenser i CTOen sikrer anvendelse av en type eller minimale typer av CTOen for
 screening av multiple målnukleinsyresekvenser.

10 I samsvar med en foretrukket utførelse, fremgangsmåten omfatter ytterligere repetering av
 trinnene a-b, a-d eller a-f med denaturering mellom repeterende sykluser er foretrukket, med
 en nedstrøms-primer. Denne repetering muliggjør forsterking av målnukleinsyresekvensen
 og/eller målsignalet.

15 I samsvar med en foretrukket utførelse, trinnene a-f utføres i et reaksjonskar eller i separate
 reaksjonskar. For eksempel, trinnene a-b, c-d eller e-f kan utføres i separate reaksjonskar.

I samsvar med en foretrukket utførelse, trinnene a-b og c-f kan utføres samtidig eller separat
 selv i et reaksjonskar avhengig av reaksjonsbetingelser (fortrinnsvis temperatur).

20 Den foreliggende oppfinnelse krever ikke at målnukleinsyresekvensene som skal detekteres
 og/eller mangfoldiggjøres har noen bestemt sekvens eller lengde, inkluderende enhver DNA
 (gDNA og cDNA) og RNA-molekyler.

25 Idet en mRNA benyttes som utgangsmateriale, er et revers transkripsjonstrinn nødvendig før
 man utfører annealingstrinnet, og detaljer på dette kan finnes i Joseph Sambrook, et al.,
 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring
 Harbor, N.Y.(2001); and Noonan, K. F. et al., Nucleic Acids Res. 16:10366 (1988). For
 revers transkripsjon kan en vilkårlig heksamere eller en oligonukleotid dT primer som kan
 30 hybridiseres til mRNA benyttes.

Målnukleinsyresekvensen som kan detekteres og/eller mangfoldiggjøres inkluderer enhver
 naturlig forekommende prokaryot, eukaryot (for eksempel protozoer og parasitter, sopp,
 gjær, høyere planter, lavere og høyere dyr, inkluderende pattedyr og mennesker) eller virale

(for eksempel herpesvirus, HIV, influensavirus, Epstein-Barr virus, hepatittvirus, poliovirus, etc) eller viroide nukleinsyrer.

Foreliggende oppfinnelse er også nyttig ved deteksjon av en nukleotid variasjon. Fortrinnsvis, målnukleinsyresekvensen omfatter en nukleotid variasjon. Termen «nukleotid variasjon» anvendt heri refererer til enhver enkelt eller multipl nukleotidsubstitusjon, deletering eller innskudd i en DNA-sekvens ved en bestemt lokalisering blant kontigøse DNA-segmenter som ellers er like i sekvens. Slike kontigøse DNA-sekvenser inkluderer et gen eller enhver annen porsjon av et kromosom. Disse nukleotidvariasjoner kan være mutante eller polymorfe allele variasjoner. For eksempel, nukleotidvariasjonen detektert med foreliggende oppfinnelse inkluderer SNP (enkel nukleotid polymorfisme), mutasjon, delesjon, innskudd, substitusjon og translokalisasjon. Eksemplifiserte nukleotidvariasjoner inkluderer et antall variasjoner i et humant genom (for eksempel variasjoner i MTHFR (metylentetrahydrofolat reductase) gen), variasjoner involvert i medikamentresistens av patogener og tumorgenese forårsakende variasjoner.

Ved foreliggende oppfinnelse for deteksjon av en nukleotidvariasjon i en målnukleinsyresekvens, hvor primere eller prober anvendes som har en komplementær sekvens til nukleotidvariasjonen i målnukleinsyresekvensen, beskrives målnukleinsyresekvensen inneholdende nukleotidvariasjonen heri som et matchende templat. Idet primere eller prober som anvendes har en ikke-komplementær sekvens til nukleotidvariasjonen i målnukleinsyresekvensen, beskrives målnukleinsyresekvensen som inneholder nukleotidvariasjonen heri som en mismatching templat.

For deteksjon av nukleotidvariasjoner, 3'-enden fra oppstrøms primer kan konstrueres til å være motsatt til et sete av en nukleotidvariasjon i målnukleinsyresekvensen. I samsvar med en foretrukket utførelse, 3'-enden av oppstrøms primeren har en komplementær sekvens til nukleotidvariasjonen i målnukleinsyresekvensen. 3'-enden av oppstrøms primeren har en komplementær sekvens til nukleotidvariasjonen i målnukleinsyresekvensen annealet til det matchende templat og forlenget for å indusere spalting av PTOen. Den resulterende PTO-fragment hybridiseres med CTOen for å tilveiebringe målsignalet. I motsetning, idet 3' enden av oppstrøms primeren er mismatchet til en nukleotidvariasjon i mismatching templatet, så forlenges den ikke under betingelser som annealer 3'-enden av primeren som er essensiell for ekstensjon selv der hvor oppstrøms primeren er hybridisert med mismatching templatet, og resulterer derved ikke i noen generering av målsignalet.

Alternativt, det er mulig å anvende PTO-spalting avhengig av hybridisering av PTO som har en komplementær sekvens til en nukleotidvariasjon i målnukleinsyresekvensen. For eksempel, under kontrollerte betingelser, en PTO som har en komplementær sekvens til nukleotid-
 5 variasjonen i målnukleinsyresekvensen hybridiseres med det matchende templat og spaltes deretter. Det resulterende PTO-fragment hybridiseres med CTOen for å tilveiebringe målsignalet. Således, under de kontrollerte betingelser, PTOen hybridiseres ikke med et mismatchende templat som er ikke-komplementær sekvens i nukleotidvariasjonsposisjonen og spaltes ikke. Fortrinnsvis, i dette tilfellet, den komplementære sekvens til nukleotid-
 10 variasjonen PTOen er posisjonert i midten av 3' målporsjonen av PTOen.

Alternativt, det er foretrukket at 5'-endedelen av 3' målporsjonen av PTOen er posisjonert til en nukleotidvariasjon i en målnukleinsyresekvens for deteksjon av nukleotidvariasjonen og 5'-endedelen av 3' målporsjonen av PTOen har en komplementær sekvens til nukleotid-
 15 variasjonen i målnukleinsyresekvensen.

I en utførelse for deteksjon av en enkelt nukleotidvariasjon, har 5'-enden av 3' målporsjonen av PTOen en komplementær sekvens til en enkel nukleotidvariasjon i en målnukleinsyresekvens.

20

Som beskrevet over, spalting av PTOen hybridisert med et mismatchende templat kan induseres ved at setet umiddelbart tilgrensende i en 3'-retning til 5'-enden av 3'-målporsjonen av PTOen, for eksempel, under oppstrøms primerekstensjonsavhengig spaltingsinduksjon. 3'-enden av PTO-fragmentet har det komplementære nukleotid til enkelt nukleotid-
 25 variasjonen. PTO-fragmentet hybridiseres med en CTO som har en fangeporsjon omfattende en sekvens korresponderende til nukleotidvariasjonen og deretter forlenget for å danne den forlengete dupleks, som tilveiebringer målsignalet. Dersom den samme PTO hybridiseres med et mismatchende templat som har den identiske sekvens til matchende templat med unntak av enkelt nukleotidvariasjonen, vil spalting av PTOen forekomme ved et
 30 sete 2 nukleotider i avstand i en 3'-retning fra 5'-enden av 3'-målporsjonen av PTOen. 3'-enden av PTO-fragmentet har det ytterligere spaltete nukleotid enn det komplementære nukleotid til enkelt nukleotidvariasjonen. Idet setet for CTOen som er hybridisert med det ytterligere spaltete nukleotid er konstruert til å ha en ikke-komplementær sekvens til det ytterligere spaltete nukleotid, så vil 3'-enden av PTO-fragmentet ikke hybridiseres med
 35 CTOen, noe som resulterer i ingen forlenging av PTO-fragmentet på en kontrollert måte.

Selv om PTO-fragmentet forlenges for å danne den forlengete dupleks, har duplekse en forskjellig T_m -verdi fra duplekse avledet fra hybridisering mellom PTOen og mis matchende templat.

- 5 I samsvar med en foretrukket utførelse, et spaltingssete av PTOen som har en komplementær sekvens til nukleotidvariasjonen ved dets 5' endedel av 3' målporsjonen er forskjellig avhengig av hybridisering med et matchende templat eller med et mismatchende templat, slik at PTO-fragmentet frigjort fra disse hybridiseringsanalyser har forskjellige sekvenser, fortrinnsvis, i dets 3' endeporsjon, mer fortrinnsvis i dets 3'-ende.
- 10 I samsvar med en foretrukket utførelse, seleksjon av nukleotidsekvensen fra CTO under vurdering av forskjellen i 3'-endedelene av PTO-fragmentene muliggjør å diskriminere matching templat fra mismatching templat.
- 15 I samsvar med en foretrukket utførelse, målnukleinsyresekvensen anvendt med foreliggende oppfinnelse er en pre amplifisert nukleinsyresekvens. Anvendelse av pre amplifiserte nukleinsyresekvenser muliggjør og signifikant øker sensitiviteten og spesifisiteten av måldeteksjon ifølge foreliggende oppfinnelse.
- 20 I samsvar med en foretrukket utførelse, fremgangsmåten utføres i nærvær av en nedstrøms primer.

Fordelene ved foreliggende oppfinnelse kan understrekes med samtidig (multipleks deteksjon av minst to målnukleinsyresekvenser).
- 25 I samsvar med en foretrukket utførelse, fremgangsmåten utføres for å detektere minst to typer (mer fortrinnsvis minst 3 typer enda mer foretrukket minst 5 typer) målnukleinsyresekvenser.
- 30 I samsvar med en foretrukket utførelse, fremgangsmåten utføres for å detektere minst 2 typer (mer fortrinnsvis minst tre typer, enda mer foretrukket minst fem typer) målnukleinsyresekvenser; hvor oppstrøms oligonukleotid omfatter minst to typer (mer fortrinnsvis minst tre typer, enda mer foretrukket minst fem typer) oligonukleotider, PTOen omfatter minst to typer (mer fortrinnsvis minst tre typer, enda mer foretrukket minst fem typer) av PTOene og
- 35 CTOen omfatter minst en type (fortrinnsvis minst to typer, mer foretrukket minst tre typer,

enda mer foretrukket minst 5 typer) av CTOen; hvor, idet minst to typer av målnukleinsyresekvensene foreligger, så tilveiebringer fremgangsmåten minst to typer av målsignaler korresponderende til de minst to typer målnukleinsyresekvensene.

- 5 5'-taggingporsjonen av de i det minste to PTOer kan ha en identisk sekvens til hverandre. For eksempel, idet foreliggende oppfinnelse utføres for å screene målnukleinsyresekvenser, kan 5'-taggingporsjonene av PTOene har identisk sekvens.

- 10 Videre, en enkelt type CTO kan anvendes for deteksjon av et flertall målnukleinsyresekvenser. For eksempel, idet PTOene har en identisk sekvens i deres 5' taggingporsjoner benyttes for å screene målnukleinsyresekvenser, kan en type CTO anvendes.

- 15 I samsvar med en foretrukket utførelse, de forlengete duplekser korresponderende til de i det minste to typer målnukleinsyresekvenser har forskjellige T_m -verdier fra hverandre.

- I samsvar med en foretrukket utførelse, de i det minste to typer målsignaler korresponderende til de i det minste to typer målnukleinsyresekvenser tilveiebringes for forskjellige typer markører fra hverandre.

- 20 I samsvar med en foretrukket utførelse, de i det minste to typer målsignaler korresponderende til de i det minste to typer målnukleinsyresekvenser tilveiebringes for den samme type markører.

- 25 I samsvar med en foretrukket utførelse, de i det minste to typer målsignaler korresponderende til de i det minste to typer målnukleinsyresekvenser tilveiebringes fra den samme type markører; hvor de forlengete duplekser korresponderende til de i det minste to typer målnukleinsyresekvenser har forskjellige T_m -verdier fra hverandre.

- 30 Termen anvendt heri «forskjellige typer markører» refererer til markører med forskjellige karakteregenskaper for detekterbare signaler. For eksempel, FAM og TAMRA som fluoriserende reportermarkører vurderes som forskjellige typer markører på grunn av at deres eksitasjon og emisjonsbølgelengde er forskjellige fra hverandre.

- 35 Idet foreliggende oppfinnelse utføres for å samtidig detektere minst to typer målnukleinsyresekvenser med smeltekurveanalyser og de forlengete duplekser korresponderende til de

i det minste to typer målnukleinsyresekvenser har forskjellige T_m -verdier fra hverandre, er det mulig å detektere minst to typer målnukleinsyresekvenser selv ved anvendelse av en enkelt type markør (for eksempel FAM).

5 Måldeteksjon ved anvendelse av immobilisert CTO på en faststoffase.

Den dominerende fordel med foreliggende oppfinnelse er å være effektiv i deteksjon av målnukleinsyresekvenser selv på en faststoffase så som et mikroarray.

10 I samsvar med en foretrukket utførelse, foreliggende oppfinnelse utføres på faststoffase og CTOen immobiliseres gjennom dets 5'-ende eller 3'-ende på et faststoffs substrat. I faststoffase, måles målsignalet som tilveiebringes på faststoffs substratet.

Idet den immobiliserte CTO anvendes, så benytter smelteanalysene merkesystemer som beskrevet over for anvendelse i fastfasereaksjonen ifølge foreliggende oppfinnelse.

15 I samsvar med en foretrukket utførelse, målsignalet tilveiebringes av en enkelt markør koplet til fragmentet eller med en enkelt markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen. Spesielt, idet foreliggende oppfinnelse på en faststoffase utføres ved anvendelse av en enkelt markør kan den benytte en generell fluorescerende markør og
20 krever ikke en spesifikk fluorescerende markør i stand til å tilveiebringe et fluorescerende signal med forskjellige intensiteter avhengig av et nærvær på dobbeltråd eller enkeltråd.

Idet CTOen immobilisert på et faststoffs substrat anvendes, kan kjemiske markører (for eksempel biotin) eller enzymatiske markører (for eksempel alkalisk fosfatase, peroksidase,
25 β -galaktosidase eller β glukosidase) benyttes.

For faststoffasereaksjonen, CTOen immobiliseres direkte eller indirekte, fortrinnsvis indirekte gjennom dets 5'-ende eller 3' ende (fortrinnsvis 3'-enden) på overflaten av faststoffs substratet. Videre, CTOen kan immobiliseres på overflaten av faststoffs substratet på en kovalent
30 eller ikke-kovalent måte. Idet de immobiliserte CTOer immobiliseres indirekte på overflaten av faststoffs substratet, kan egnede linkere benyttes. Linkere som er nyttige ifølge oppfinnelsen kan inkludere enhver linker som benyttes for probeimmobilisering på overflaten av faststoffs substratet. For eksempel, alkyl- eller arylforbindelser med aminfunksjonalitet, eller alkyl- eller arylforbindelser med tiolfunksjonalitet fungerer som linkere for CTO-immobilisering. I tillegg, poly T-hale eller poly A-hale kan fungere som linkere.
35

I samsvar med en foretrukket utførelse, faststoffs substratet anvendt i foreliggende oppfinnelse er et mikroarray. Nevnte mikroarray kan tilveiebringe et reaksjonsmiljø ifølge oppfinnelsen og kan inkludere de som er kjent for den fagkyndige. Alle prosesser ifølge foreliggende oppfinnelse, det vil si hybridisering til målnukleinsyresekvenser, spalting, ekstensjon, smelting og fluorescens deteksjon, utføres på nevnte mikroarray. De mobiliserte CTOer på mikroarrayet fungerer som hybridiseringsarray elementer. Faststoffs substratet for fremstilling av mikroarrayet inkluderer, men er ikke begrenset til, metaller (for eksempel gull, legeringer av gull og kobber, aluminium), metalloksid, glass, keramiske materialer, kvarts, silisium, semikonduktor materialer, Si/SiO₂, wafer, germanium, gallium arsenid, karbon, karbon nanotub, polymerer (for eksempel polystyren, polyetylen, polypropylen og polyakrylamid), sefrose, agarose og kolloider. Et flertall immobiliserte CTOer ifølge oppfinnelsen kan immobiliseres på en adresserbar region eller to eller flere adresserbare regioner på et faststoffs substrat som kan omfatte 2-1000000 adresserbare regioner. Immobiliserte CTOer kan fremstilles for å produsere array eller flere array for en gitt applikasjon med konvensjonelle fremstillingsteknologier så som fotolitografi, ink-jetting, mekanisk mikrosplotting og derivater av dette.

Den foreliggende oppfinnelse utført på faststoffase kan detekteres samtidig et flertall av målnukleinsyresekvenser selv om det benyttes en enkelt type av en markør på grunn av at markørene på CTOene er immobilisert fysisk separert fra hverandre. På denne måte, antallet målnukleinsyresekvenser som kan detekteres med foreliggende oppfinnelse på faststoffasen er ikke begrenset.

25 **Foretrukne utførelser med mangfoldiggjøring av en målnukleinsyresekvens.**

Fortrinnsvis, foreliggende oppfinnelse utføres samtidig med mangfoldiggjøring av en målnukleinsyresekvens ved anvendelse av et primerpar sammensatt av en oppstrøms primer og en nedstrøms primer i stand til å syntetisere målnukleinsyresekvensen.

30 I et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en fremgangsmåte for å detektere en målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en blanding av nukleinsyrer med en PTOCE (PTO spalting og ekstensjon) analyse, omfattende:

(a) hybridisere målnukleinsyresekvensene med et primerpar omfattende en oppstrøms primer og en nedstrøms primer og en PTO (Probing og Tagging Oligonukleotid); hvor hver av nevnte oppstrøms primer og nedstrøms primer omfatter en

hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; PTOen omfatter (i) en 3'-målporsjon omfattende en hybridiserende nukleotidsekvens komplementær til målnukleinsyresekvensen og (ii) en 5'-taggingporsjon omfattende en nukleotidsekvens ikke-komplementær til målnukleinsyresekvensen, hvor 3'-målporsjonen hybridiseres med målnukleinsyresekvensen og 5'-målporsjonen ikke-hybridiseres med målnukleinsyresekvensen; PTOen er lokalisert mellom oppstrøms primer og nedstrøms primer; hvor PTOen er blokkert ved dets 3'-ende for å hindre dets forlengelse;

(b) sette resultatet fra trinn (a) i forbindelse med en templatavhengig nukleinsyre polymerase som har en 5' nukleaseaktivitet under betingelser for ekstensjon av primere og for spalting av PTOen; hvor, idet PTOen er hybridisert med målnukleinsyresekvensene, så forlenges oppstrøms primer og den forlengete tråd induserer spalting av PTOen med den templatavhengige nukleinsyre polymerase som har 5' nukleaseaktivitet slik at spaltingen frigjør et fragment omfattende 5'-taggingporsjonen eller en del av 5' taggingporsjonen av PTOen;

(c) hybridisere fragmentet frigjort fra PTOen med en CTO (Capturing and Templating Olegonucleotide); hvor CTOen omfatter i en 3' til 5' retning (i) en fangeporsjon omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til 5' taggingporsjonen eller en del av 5' taggingporsjonen av PTOen og (ii) en templatporsjon omfattende en nukleotidsekvens som er ikke-komplementær til 5'-taggingporsjonen og 3'-taggingporsjonen; hvor fragmentet frigjort fra PTOen hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen;

(d) utføre en ekstensjonsreaksjon ved anvendelse av resultatet fra trinn (c) og den templatavhengige nukleinsyre polymerase; hvor fragmentet hybridisert med fangeporsjonen av CTOen forlenges og en forlenget dupleks dannes; hvor den forlengete dupleks har en T_m -verdi som kan justeres med (i) en sekvens og/eller lengde av fragmentet, (ii) en sekvens og/eller lengde av CTOen eller (iii) sekvensen og/eller lengden av fragmenter og sekvensen og/eller lengden av CTOen.

(e) smelte den forlengete dupleks over et område av temperaturer for å gi et målsignal som indikerer nærvær av den forlengete dupleks; hvor målsignalet tilveiebringes med (i) minst en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, (ii) en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen, (iii) en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen og en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, eller (iv) interkalerende markør; og

(f) detektere den forlengete dupleks ved å måle målsignalet; hvorved nærvær av den forlengete dupleks indikerer nærvær av målnukleinsyresekvensen.

Siden den foretrukne utførelse av foreliggende oppfinnelse følger trinnene i foreliggende fremgangsmåte beskrevet over, så utelates felles beskrivelse av disse for å unngå unødvendig gjentakelse som fører til kompleksitet i beskrivelsen.

5

I samsvar med en foretrukket utførelse, fremgangsmåten omfatter videre repetering av trinnene a til b, a til d eller a til f med denaturering mellom de repeterende sykluser.

Reaksjonsrepeteringen utføres med mangfoldiggjøring av målnukleinsyresekvensen.

Fortrinnsvis, mangfoldiggjøringen utføres i samsvar med PCR (polymerase kjedereaksjon)

10 som er beskrevet i US patenter nr. 4,683,195, 4,683,202 og 4,800,159.

I samsvar med en foretrukket utførelse, fremgangsmåten utføres for å detektere minst to typer målnukleinsyresekvenser.

15 I samsvar med en foretrukket utførelse, de minst to typer målsignaler korresponderer til de minst to typer målnukleinsyresekvenser tilveiebrakt fra den samme type markører; hvor de forlengete duplekser korresponderer til de minst to typer målnukleinsyresekvenser som har forskjellige T_m -verdier fra hverandre.

20 **III. Måldeteksjonsprosess for PTOCE omfattende deteksjon ved en forutbestemt temperatur.**

Den foreliggende oppfinnelse kan modifiseres til å anvende et målsignal generert i forbindelse med dannelsen av den forlengete syklus.

25

Videre beskrives en fremgangsmåte for å detektere en målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en blanding av nukleinsyrer med en PTOCE (PTO spalting og ekstensjon) analyse, omfattende:

(a) hybridisere målnukleinsyresekvensen med en oppstrøms oligonukleotid og en

30 PTO (Probing and Tagging Oligonukleotid); hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid

- omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; PTOen omfatter (i) en 3'-målporsjon omfattende en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen og (ii) en 5'-taggingporsjon omfattende en nukleotidsekvens som er ikke-komplementær til målnukleinsyresekvensen; hvor 3'-målporsjonen hybridiseres med målnukleinsyresekvensen og 5'-taggingporsjonen ikke hybridiseres med målnukleinsyresekvensen; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid er lokalisert oppstrøms for PTOen;
- (b) sette resultatet fra trinn (a) i forbindelse med et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet under betingelser for spalting av PTOen; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid eller dets forlengete tråd induserer spalting av PTOen med et enzym som har 5'-nukleaseaktivitet slik at denne spalting frigjør et fragment som omfatter 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen;
- (c) hybridisere fragmentet frigjort fra PTOen med en CTO (Capturing and Templating Oligonukleotid); hvor CTOen omfatter en 3' til 5'-retning (i) en fangeporsjon omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til 5' taggingporsjonen eller en del av 5' taggingporsjonen av PTOen og (ii) en templatporsjon omfattende en nukleotidsekvens som er ikke-komplementær til 5'-taggingporsjonen og 3'-taggingporsjonen av PTOen; hvor fragmentet frigjort fra PTOen hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen;
- (d) utføre en ekstensjonsreaksjon ved anvendelse av resultatet fra trinn (c) og en templatavhengig nukleinsyrepolymerase; hvor fragmentet hybridisert med fangeporsjonen av CTOen forlenges for å danne en forlenget dupleks; hvor den forlengete dupleks har en T_m -verdi som kan justeres med (i) en sekvens og/eller lengde av fragmentet, (ii) en sekvens og/eller lengde av CTOen eller (iii) sekvensen og/eller lengden av fragmentet og sekvensen og/eller lengden av CTOen; hvor den forlengete dupleks tilveiebringer et målsignal med (i) minst en markør koplet til fragmentet og/eller CTO, (ii) en markør inkorporert i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen, (iii) minst en markør koplet til fragmentet og/eller CTO og en

markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen eller
(iv) interkalerende markør; og

(e) detektere den forlengete dupleks ved å måle målsignalet med en forutbestemt
temperatur som den forlengete dupleks opprettholder sin dobbelttrådete form,

5 hvorved nærvær av den forlengete dupleks indikerer nærvær av
målnukleinsyresekvensen.

Siden beskrivelsen følger trinnene av foreliggende fremgangsmåte beskrevet overfor med
unntak av smeltetrinnet så vil felles beskrivelse av disse utelates for å unngå unødvendig

10 overflødighet som fører til kompleksiteten av beskrivelsen.

Den foreliggende beskrivelse anvender en smelteanalyse beskrevet heri ovenfor og krever
deteksjon av signaler fra markører på ikke mindre enn to forskjellige temperaturer på grunn
av at målsignalet gis ved å måle signalforandring som tilveiebringes ved smelting av den

15 forlengete dupleks.

Det er lite trolig at den forlengete dupleks *per se* gir signal i stand til å diskriminere dannelse
fra ikke-dannelse av den forlengete dupleks og signalet detekteres ved en forutbestemt
temperatur som den forlengete dupleks opprettholder sin dobbelttrådete form, hvorved

20 nærvær av en målnukleinsyresekvens bestemmes.

Den foreliggende beskrivelse har som formål å måle et målsignal i forbindelse med dannelse
av den forlengete dupleks, for deteksjon av nærvær av målnukleinsyresekvensen.

25 I foreliggende beskrivelse, den forlengete dupleks har en markør slik at den forlengete
dupleks tilveiebringer et målsignal.

Fortrinnsvis, målsignalet inkluderer et signal (signalgenerering eller signalutslukking) fra
markøren på den forlengete dupleks ved en forutbestemt temperatur.

Markøren i foreliggende beskrivelse kan aktiveres på samme måte som for fremgangsmåten ved anvendelse av en smelteanalyse som beskrevet over. Figurer 2-13 kan illustrere dette aspekt ifølge foreliggende beskrivelse med en liten modifikasjon for deteksjon ved en

5 forutbestemt temperatur.

Prinsippet som ligger til grunn for et målsignal fra den forlengete dupleks er som følger:

- (i) ekstensjon av fragmentet induserer forandring av et signal fra en markør for å gi målsignalene; eller
- 10 (ii) hybridisering av fragmenter og CTOen induserer forandring av et signal fra en markør for å gi målsignalet og den forlengete dupleks opprettholder målsignalet.

Den eksemplifiserte beskrivelse av arbeidsprinsippet (i) kan beskrives ved å referere til fig 9. Idet immobiliserte CTOer anvendes, så detekterer foreliggende oppfinnelse et flertall mål-

15 nukleinsyresekvenser på en langt mer effektiv måte. Templatporsjonen av den immobiliserte CTO har et reportermolekyl og et quencher molekyl. Reportermolekylet og quencher molekylet er konformasjonsmessig tilgrensende til hverandre for å muliggjøre at quencher molekylet stopper et signal fra reportermolekylet. I det fragmentet hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen, så stopper quencher molekylet signalet fra reportermolekylet. Ved

20 dannelsen av den forlengete dupleks, så blir reportermolekylet og quencher molekylet konformasjonsmessig separert og muliggjør at quencher molekylet ikke stopper signalet fra reportermolekylet. Målsignalet gis i ekstensjonstrinn (c og d i fig 9).

I fig 9, hybridet mellom uspaltet PTO og CTO danner ikke en forlenget dupleks, derfor,

25 quencher molekylet tillates å fremdeles stoppe et signal fra reportermolekylet. Hybridet tilveiebringer ikke noe ikke-målsignal.

Den eksemplifiserte beskrivelse for arbeidsprinsipp (ii) kan beskrives med referanse til figur 6. Figuren illustrerer foreliggende aspekt og likeledes fremgangsmåten som anvender

smelteanalyse. 5'-taggingporsjonen av PTOen har et reportermolekyl og et quencher molekyl. Reportermolekylet og quencher molekylet er konformasjonsmessig tilgrensende til hverandre for å muliggjøre at quencher molekylet stopper et signal fra reportermolekylet. PTOen hybridisert med målnukleinsyresekvensen oppkuttet for å frigjøre fragmentet som
5 omfatter 5'-målporsjonen med reportermolekylene og quencher molekylene, og fragmentet hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen. Ved hybridisering separeres konformasjonsmessig reportermolekylet og quencher molekylet slik at quencher molekylet ikke stopper signalet fra reportermolekylet. Målsignalet er gitt i fragment hybridiseringstrinnet og den forlengete dupleks opprettholder målsignaler (c og d i fig 6).

10

I fig 6 tilveiebringer hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTO ikke-målsignaler (c og d i fig 6) og det er ikke nødvendig å dissosiere hybridet for å fjerne ikke-målsignalene. Derfor, temperaturen for måling av målsignalene bestemmes for å dissosiere hybrider. Temperaturen bestemmes videre i forbindelse med hybridenes T_m -verdi.

15

Den forlengete dupleks kan detekteres ved temperaturer der hybridet er partielt dissosiert.

Den forutbestemte temperatur er høyere enn hybridenes T_m -verdi – 10 °C, fortrinnsvis høyere enn hybridenes T_m -verdi – 5 °C, mer foretrukket høyere enn hybridenes T_m -verdi og
20 enda mer foretrukket høyere enn hybridenes T_m -verdi + 5 °C.

Målsignalet tilveiebrakt av den forlengete dupleks gis under ekstensjonen av trinn (d); hvor et hybrid mellom en ikke spaltet PTO og CTOen ikke tilveiebringer et ikke-målsignal, som representert i figurer 2-4 og 9-11.

25

Målsignalet tilveiebrakt av den forlengete dupleks er gitt med hybridiseringen av fragmentet og CTOen i trinnet (c) og dannelse av den forlengete dupleks opprettholder målsignalet i trinn (d); hvor et hybrid mellom ikke-spaltet PTO og CTOen tilveiebringer et ikke-målsignal;

hvor den forutbestemte temperatur er høyere enn hybridenes T_m -verdi, som representert i figurer 5-8 og 12-13.

5 Idet hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTO tilveiebringer ikke-målsignal (panel d i fig 6), er det nødvendig å dissosiere hybridet for å fjerne ikke-målsignaler. Derfor, temperaturen for måling av målsignalene bestemmes til å dissosiere hybridene.

Merkesystemer nyttige ifølge beskrivelsen vil bli beskrevet som følger:

10 (i) Markør koplet til fragmentet og/eller CTOen

(i-1) Interaktiv dobbeltmarkør.

I en beskrivelse av en utførelse av et interaktivt dobbeltmarkørsystem, har CTOen en interaktiv dobbeltmarkør omfattende et reportermolekyl og et quencher molekyl; hvor ekstensjonen av fragmentet i trinn (d) induserer forandringer av et signal fra den interaktive
15 dobbeltmarkør for å gi målsignalet. Den første utførelse av det interaktive dobbeltmarkørsystem er illustrert i fig 2. Målsignalet er gitt med ekstensjon-synkronisert signalgenerering.

Reportermolekylene og quencher molekylerne kan være lokalisert ved templatporsjonen av
20 CTOen.

Et av reportermolekylet og quenchemolekylet på CTOen er lokalisert ved dets 5'-ende eller ved 1-5 nukleotider fra dets 5'-ende og den andre er lokalisert for å stoppe eller ikke-stoppe signalet fra reportermolekylet avhengig av konformasjon av CTO.

25 I en beskrivelse av en utførelse av et interaktivt dobbeltmarkørsystem, har CTOen en interaktiv dobbeltmarkør omfattende et reportermolekyl og et quencher molekyl; hvor hybridiseringen av fragmentet og CTOen i trinn (c) induserer forandring av et signal fra den interaktive dobbeltmarkør for å gi målsignalet og den forlengete dupleks opprettholder
30 målsignalet.

Reportermolekylet og quencher molekylet kan være lokalisert ved fangeporsjonen av CTOen.

Et av reportermolekylene og quencher molekylet på CTOen er lokalisert ved dets 3'-ende eller ved 1-5 nukleotider fra dets 3'-ende og den andre er lokalisert for å stoppe og ikke-stoppe signaler fra reportermolekylene avhengig av konformasjon av CTO.

- 5 I denne beskrivelse, hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen tilveiebringer ikke målsignal; hvor temperaturen for måling av målsignalet bestemmes med vurdering av T_m -verdien av hybridet.

- 10 I en beskrivelse av et interaktivt dobbeltmarkørsystem har fragmentet en interaktiv dobbeltmarkør omfattende et reportermolekyl og et quencher molekyl; hvor hybridiseringen av fragmentet og CTOen i trinn (c) induserer forandring av et signal fra den interaktive dobbeltmarkør for å gi målsignalet og den forlengete dupleks opprettholder målsignalet. Den første utførelse av det interaktive dobbeltmarkørsystem er illustrert i fig 6.

- 15 Et av reportermolekylene og quencher molekylet på fragmentet er lokalisert ved dets 5'-ende eller ved 1-5 nukleotider fra 5'-enden av fragmentet og den andre er lokalisert til å stoppe signaler fra reportermolekylet avhengig av konformasjonen av fragmentet.

- 20 I denne beskrivelsen, hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen tilveiebringer ikke-målsignal; hvor temperaturen for måling av målsignaler bestemmes ved vurdering av T_m -verdien av hybridet.

- 25 I en beskrivelse av det interaktive markørsystem, hvor fragmentet har en av den interaktive dobbeltmarkør omfattende et reportermolekyl og et quencher molekyl og CTOen har den andre av den interaktive dobbeltmarkør; hvor hybridiseringen av fragmentet og CTOen i trinn (c) induserer forandring av et signal fra den interaktive dobbeltmarkør for å gi målsignalet og den forlengete dupleks opprettholder målsignalet. Utførelsen av det interaktive dobbeltmarkørsystem er illustrert i fig 8.

- 30 Reportermolekylet og quencher molekylet kan være lokalisert ved ethvert sted på PTO-fragmentet og CTOen, så lenge signalet fra reportermolekylet quenches av quencher molekylet.

- 35 I samsvar med beskrivelsen, reportermolekylet eller quencher molekylet på PTO-fragmentet er lokalisert, fortrinnsvis, ved dets 5'-ende.

I samsvar med beskrivelsen, reportermolekylet eller quencher molekylet på CTOen er lokalisert, fortrinnsvis ved dets 5'-ende.

- 5 I denne beskrivelse, hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen tilveiebringer ikke målsignal; hvor temperaturen for måling av målsignalet bestemmes med vurdering av T_m -verdien på hybridet.

10 **(i-2) Enkel markør**

I en beskrivelse av en utførelse av et enkeltmarkørsystem, har CTOen en enkeltmarkør og ekstensjonen av fragmentet i trinn (d) induserer forandring av et signal fra enkeltmarkøren for å gi målsignalet. Utførelsen av enkeltmarkørsystemet er illustrert i fig 3. Målsignalet er gitt med ekstensjonssynkronisert signalgenerering.

15

I samsvar med beskrivelsen, templatporsjonen av CTOen er merket med den enkle markør.

I en beskrivelse av et enkeltmarkørsystem har CTOen en enkeltmarkør og hybridiseringen av fragmentet og CTOen i trinn (c) induisert forandring av et signal fra den interaktive
20 dobbeltmarkør for å gi målsignalet og den forlengete dupleks opprettholder målsignalet.

I samsvar med beskrivelsen, fangeporsjonen av CTOen er merket med enkeltmarkøren.

- 25 I denne beskrivelse, hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen tilveiebringer ikke-målsignalet; hvor temperaturen for måling av målsignalet bestemmes med vurdering av T_m -verdien av hybridet.

- 30 I en beskrivelse av et enkeltmarkørsystem har fragmentet en enkeltmarkør og hybridiseringen av fragmentet og CTOen i trinn (c) induserer forandring av et signal fra den interaktive dobbeltmarkør for å gi målsignalet og den forlengete dupleks opprettholder målsignalet. Utførelsen av enkeltmarkørsystemet er illustrert i fig 12.

- 35 I denne beskrivelsen, hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen tilveiebringer ikke målsignalet; hvor temperaturen for måling av målsignalene bestemmes ved vurdering av T_m -verdien for hybridet.

Enkeltmarkøren anvendt heri må være i stand til å tilveiebringe et forskjellig signal avhengig av dets nærvær på dobbeltråd eller enkelttråd. Enkeltmarkøren induserer en fluoriserende markør, en luminescerende markør, en kjemiluminiserende markør, en elektrokjemisk markør og en metallmarkør. Fortrinnsvis, enkeltmarkøren inkluderer en fluoriserende markør. Typer og foretrukne bindingsseter for enkeltfluoriserende markører anvendt i denne oppfinnelse er beskrevet i US patenter nr. 7,537,886 og 7,348,141, og hvis beskrivelse inkorporeres heri i sine helheter. Fortrinnsvis, enkelt fluorescent markøren inkluderer JOE, FAM, TAMRA, ROX og fluorescein basert markør. Den merkete nukleotidrest er fortrinnsvis posisjonert som en indre nukleotidrest innen oligonukleotidet i stedet for ved dets 5'-ende eller dets 3'-ende.

Enkelt fluorescens markøren nyttig i foreliggende beskrivelse kan beskrives med referanse til beskrivelse for reporter- og quencher molekyler som angitt over.

Spesielt, i det foreliggende beskrivelse på en faststoffase utføres ved anvendelse av en enkeltmarkør, kan det benyttes en generell fluoriserende markør og det kreves ikke en spesifikk fluoriserende markør i stand til å tilveiebringe et fluoriserende signal med forskjellige intensiteter avhengig av dets nærvær på dobbeltråd eller enkelttråd.

I det CTOen immobilisert på et faststoffsubstrat anvendes, kan kjemiske markører (for eksempel biotin) eller enzymatiske markører (for eksempel alkalisk fosfatase, peroksidase, β -galaktosidase og β -glukosidase) anvendes.

Markørene koplet til fragmentet og/eller CTOen kan posisjoneres i en slik grad at i det et hybrid mellom en ikke-spaltet PTO og CTOen dannes, så gir hybridet ikke et ikke-målsignal i trinn (d), som representert i figurene 2-3, og 9.

Alternativt, markørene kan posisjoneres i en slik grad at i det et hybrid mellom en ikke-spaltet PTO og CTOen dannes, så gir hybridet en ikke-målsignal i trinn (d); hvor T_m -verdien av den forlengete dupleks er høyere enn for hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen som representert i figurene 6-8 og 12.

(ii) Markør inkorporert inn i den forlengete dupleks.

Spesielt i det den foreliggende beskrivelse utføres i en faststoffase ved anvendelse av en immobilisert CTO, så blir dette markørsystem mer nyttig for å tilveiebringe målsignalet som vil bli illustrert i figurer 10 og 11.

5

Målsignalet tilveiebringes av en enkeltmarkør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen; hvor den inkorporerte enkeltmarkør er koplet til et nukleotid inkorporert under ekstensjonsreaksjonen; hvor ekstensjonen av fragmentet i trinn (d) induserer forandring av et signal fra enkeltmarkøren for å gi målsignalet i trinn (d).

10

Nukleotidet inkorporert under ekstensjonsreaksjonen kan ha en første ikke-naturlig base og CTOen kan ha et nukleotid som har en andre ikke-naturlig base med en spesifikk bindingsaffinitet til den første ikke-naturlige base, som illustrert i fig 11. Nukleotidet som har den andre ikke-naturlige base er fortrinnsvis lokalisert ved ethvert sete på templatporsjonen av CTOen.

15

I det markøren inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen benyttes, så er markøren ikke inkorporert inn i hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen på grunn av at hybridet ikke er forlenget. Derfor, hybridet tilveiebringer ikke noe ikke-målsignal.

20

(iii) Markør inkorporert inn i den forlengete dupleks og markør koplet til fragmentet eller CTOen.

Den foreliggende beskrivelse kan benytte et markørsystem som benytter et samarbeid av en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen og en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, som illustrert i figurer 4 og 5.

25

Målsignalet er tilveiebrakt av en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen og en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen; hvor markøren som er inkorporert er koplet til et nukleotid inkorporert under ekstensjonsreaksjonen; hvor de to markører er en interaktiv dobbeltmarkør av et reportermolekyl og et quencher molekyl; hvor ekstensjonen av fragmentet i trinn (d) induserer forandring av et signal fra den interaktive dobbeltmarkør for å gi målsignalet.

30

Mer foretrukket, nukleotidet inkorporert under ekstensjonsreaksjonen har en første ikke-naturlig base og CTOen har et nukleotid som har en andre ikke-naturlig base med en spesifikk bindingsaffinitet til den første ikke-naturlige.

- 5 Fortrinnsvis, målsignalet gitt i trinn (e) er et signal fra den interaktive dobbeltmarkør i trinn (d).

I det markøren inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen benyttes, så inkorporeres markøren ikke inn i hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen på grunn av at hybridet ikke er forlenget. Derfor, hybridet tilveiebringer ikke et ikke-målsignal.

(iv) Interkalerende markør.

Foreliggende beskrivelse kan benytte en interkalerende markør for å tilveiebringe målsignalet som indikerer nærvær av den forlengete dupleks. Den interkalerende markør er mer nyttig på en faststoffasereaksjon som benytter immobiliserte CTOer på grunn av at dobbeltrådede nukleinsyremolekyler som er tilstede i prøvene kan generere signaler.

Den eksemplifiserte beskrivelse er beskrevet med henvisning til figur 13. PTOen hybridisert med målnukleinsyresekvensen oppkuttet for å frigjøre fragmentet. Fragmentet hybridiseres med CTOen. Ekstensjonen utføres i nærvær av et interkalerende fargestoff (for eksempel SYBRTM Green) og danner den forlengete dupleks med interkalerende fargestoff.

I figur 13 tilveiebringer hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen ikke-målsignal (C og D i fig 13) og det er nødvendig å dissosiere hybridet for å fjerne ikke-målsignalet. Derfor, temperaturen for måling av målsignalet bestemmes med vurdering av T_m -verdien av hybridet.

Fortrinnsvis, målsignalet gitt i trinn (e) er et signal fra det interkalerende fargestoff.

30 I samsvar med beskrivelse, PTOen og/eller CTOen blokkeres ved dets 3'-ende for å hindre dets forlengelse.

I samsvar med en beskrivelse, nevnte oppstrøms oligonukleotid er en oppstrøms primer eller en oppstrøms probe.

I samsvar med en beskrivelse, nevnte oppstrøms oligonukleotid er lokalisert tilgrensende til PTOen i den grad at nevnte oppstrøms oligonukleotid induserer spalting av PTOen av enzymet som har 5'-nukleaseaktivitet.

- 5 I samsvar med en beskrivelse, nevnte oppstrøms primer induserer gjennom dets forlengete tråd spalting av PTOen med enzymene som har 5' nukleaseaktivitet.

I samsvar med en beskrivelse, fremgangsmåten omfatter ytterligere å repetere trinnene a-b, a-d eller a-e med denaturering mellom repeterende sykluser.

10

I samsvar med en beskrivelse, trinnene 1-b og c-e utføres i et reaksjonskar eller i separate reaksjonskar.

- 15 I samsvar med en beskrivelse, fremgangsmåten utføres for å detektere minst to typer målnukleinsyresekvenser; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid omfatter minst to typer oligonukleotider, PTOen omfatter minst to typer PTOer, og CTOen omfatter minst en type av CTOene; hvor, i det minst to typer målnukleinsyresekvenser er foreliggende, så tilveiebringer fremgangsmåten minst to typer av målsignaler korresponderende til de minst to typer av målsyrenukleinsyresekvenser.

20

I samsvar med en beskrivelse, nevnte oppstrøms oligonukleotid er en oppstrøms primer og trinnet (b) anvender en templatavhengig nukleinsyre polymerase for ekstensjon av nevnte oppstrøms primer.

- 25 I samsvar med en beskrivelse, CTOen immobiliseres gjennom dets 5'-ende eller 3'-ende på et faststoffs substrat og målsignalet tilveiebrakt på faststoffs substratet måles.

I samsvar med en beskrivelse, målsignalet tilveiebringes av en enkeltmarkør koplet til fragmentet eller med en enkeltmarkør inkorporert inn i den forlengete dupleks under

- 30 ekstensjonsreaksjonen.

I samsvar med en beskrivelse, fremgangsmåten utføres i nærvær av en nedstrøms primer.

- 35 Deteksjon av trinn (e) kan utføres på forskjellige måter; i sann tid, slutt punkt eller et forutbestemt tidsintervall. I det foreliggende oppfinnelse ytterligere omfatter repetering av trin-

nene a-b, a-d eller a-e, er det foretrukket at signaldeteksjonen utføres for hver repetisjons-syklus ved en forutbestemt temperatur (det vil si sanntids type), ved slutten av repetisjonen ved en forutbestemt temperatur (det vil si slutt punkt type) eller ved hver av forutbestemte tidsintervaller under repetisjon ved en forutbestemt temperatur. Fortrinnsvis, deteksjonen kan utføres for hver syklus av repetisjon på sanntids måte for å forbedre deteksjons-nøyaktigheten og kvantifiseringen.

10 iv. Kitt for måldeteksjon.

I et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse tilveiebringes et kitt for deteksjon av målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en blanding av nukleinsyrer med en PTOCE (PTO spalting og ekstensjon) analyse, omfattende:

- 15 (a) en oppstrøms oligonukleotid omfattende en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen;
- (b) en PTO (Probing and Tagging Oligonukleotid) omfattende (i) en 3'-målporsjon omfattende en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen og (ii) en 5'-taggingporsjon omfattende en nukleotidsekvens som er ikke-komplementær til målnukleinsyresekvensen, hvor 3'-målporsjonen hybridiseres med målnukleinsyresekvensen og 5'-målporsjonen ikke hybridiseres med målnukleinsyresekvensen; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid er lokalisert oppstrøms for PTOen; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid eller dets forlengete tråd induserer spalting av PTOen av et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet slik at
- 20 spaltingen frigjør et fragment omfattende 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen; og
- (c) en CTO (Capturing and Templating Oligonukleotid) omfattende i en 3'-til 5' retning (i) en fangeporsjon omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen og (ii) en templatporsjon omfattende en nukleotidsekvens ikke-komplementær til 5'-taggingporsjonen og 3'-målporsjonen av PTOen; hvor fragmentet frigjort fra PTOen hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen; og fragmentet hybridisert med fangeporsjonen av CTOen forlenges med en templatavhengig nukleinsyre polymerase for å danne den forlengete dupleks.

Siden kittet ifølge oppfinnelsen er konstruert for å utføre deteksjonsmetoden ifølge foreliggende oppfinnelse beskrevet over, så utelates felles beskrivelse av disse for å unngå unødvendig overflødighet som fører til økt kompleksitet av beskrivelsen.

- 5 I samsvar med en foretrukket utførelse, kittet omfatter videre et enzym som har 5'-nuklease-aktivitet.

I samsvar med en foretrukket utførelse, kittet omfatter ytterligere en templatavhengig nukleinsyre polymerase.

10

I samsvar med en foretrukket utførelse, PTOen og/eller CTOen har minst en markør.

I samsvar med en foretrukket utførelse, kittet omfatter videre en markør som kan inkorporeres inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen.

15

I samsvar med en foretrukket utførelse, kittet omfatter en markør som inkorporeres inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen og PTOen og/eller CTOen har minst en markør.

- 20 I samsvar med en foretrukket utførelse, kittet omfatter videre en interkalerende markør.

I samsvar med en foretrukket utførelse, markøren er en enkeltmarkør eller interaktiv dobbeltmarkør.

- 25 I samsvar med en foretrukket utførelse, kittet anvendes for deteksjon av minst to typer nukleinsyresekvenser, hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid omfatter minst to typer oligonukleotider, PTOen omfatter minst to typer av PTOen og CTOen omfatter minst to typer av CTOen.

- 30 I samsvar med en foretrukket utførelse, CTOen immobiliseres gjennom dets 5'-ende eller 3'-ende på et faststoffs substrat.

I samsvar med en foretrukket utførelse, kittet omfatter videre en nedstrøms primer.

Alle foreliggende kitt beskrevet heri over kan valgfritt inkludere reagensene som er nødvendig for å utføre målmangfoldiggjørings reaksjoner (for eksempel PCR reaksjoner) så som buffere, DNA polymerase kofaktorer og deoksyribonukleotid-5-trifosfater. Valgfritt, kittene kan også inkludere forskjellige polynukleotidmolekyler og deoksyribonukleotid-5-trifosfater.

- 5 Valgfritt, kittene kan også inkludere forskjellige polynukleotidmolekyler, revers transkriptase, forskjellige buffere og reagenser, og antistoff som inhiberer DNA polymeraseaktivitet. Kittene kan også inkludere reagenser som er nødvendige for å utføre positive og negative kontroll-reaksjoner. Optimale mengder av reagensene som skal anvendes i en gitt reaksjon kan enkelt bestemmes av den fagkyndige med henvisning til foreliggende beskrivelse. Kittene, typisk, er tilpasset for å inneholde bestanddelene beskrevet ovenfor i separate pakninger eller kompartments.

Trekkene og formålene med foreliggende oppfinnelse kan summeres som følger:

- 15 (a) foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en mål-avhengig forlenget dupleks hvor PTO (Probing and Tagging Oligonukleotid) hybridisert med en målnukleinsyresekvens spaltes for å frigjøre et fragment og hvor fragmentet hybridiseres med CTO (Capturing and Templating Oligonukleotid) for å danne en forlenget dupleks. Den forlengete dupleks tilveiebringer et signal (signalgenerering eller utslukking) av en signalforandring (signaløkning eller -nedgang); som indikerer nærvær av en målnukleinsyresekvens.

- (b) nærvær av den forlengete dupleks bestemmes med en rekke metoder eller prosesser så som smeltekurveanalyser og deteksjon ved en forutbestemt temperatur (for eksempel på formene sanntid og sluttunkt).

- 25 (c) foreliggende oppfinnelse muliggjør å samtidig detektere minst to typer målnukleinsyresekvenser ved smeltekurveanalyser selv ved anvendelse av en enkelt type av en markør (for eksempel FAM). I motsetning, den konvensjonelle multipleks sanntidsmetode utført i en væskefase lider seriøst av begrensninger assosiert med antallet detekterbare fluoriserende markører. Foreliggende oppfinnelse muliggjør med suksess å overvinne disse ulemper og utvide applikasjonen av multipleks sanntids deteksjon.

- (d) foreliggende oppfinnelse kan utføres ved anvendelse av en rekke markeringssystemer. For eksempel, markører koplet til ethvert sted på PTOen og/eller CTOen kan benyttes for å tilveiebringe målsignalet som indikerer den forlengete dupleks. Videre, markører inkorporert

inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen kan anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse. I tillegg til kitt, kan en kombinasjon av slike markører anvendes. De allsidige markørsystemer som kan benyttes ifølge foreliggende oppfinnelse muliggjør å velge et egnet markørsystem avhengig av eksperimentbetingelser eller formål.

5

(e) foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et målavhengig forlenget dupleks som har en forutbestemt T_m -verdi som kan justeres med (i) en sekvens og/eller lengde av fragmentet, (ii) en sekvens og/eller lengde av CTOen, (iii) sekvensen og/eller lengden av fragmentet og sekvensen og/eller lengden av CTOen.

10

(f) konvensjonell smeltekurveanalyse som anvender et mangfoldiggjort produkt avhenger av sekvensen av det mangfoldiggjorte produkt slik at det er vanskelig å oppnå en ønsket T_m -verdi av mangfoldiggjort produkt. I motsetning, foreliggende oppfinnelse er avhengig av sekvensen av en forlenget dupleks og ikke sekvensen av et mangfoldiggjort produkt, noe som muliggjør å selektere en ønsket T_m -verdi av forlenget dupleks. Derfor, foreliggende oppfinnelse kan enkelt adopteres for deteksjon av multiple målsekvenser.

15

(g) konvensjonelle smeltekurveanalyser anvender en direkte hybridisering mellom markørprober og målnukleinsyresekvenser vil svært enkelt generere falske positive signaler på grunn av ikke-spesifikk hybridisering av prober. I motsetning, foreliggende oppfinnelse benytter ikke kun PTO-hybridisering men også enzymatisk spalting og ekstensjon, som fullstendig unngår problemene med falske positive signaler.

20

(h) T_m -verdien av konvensjonelle smeltekurveanalyser påvirkes av en sekvensvariasjon på målnukleinsyresekvensene. Imidlertid, en forlenget dupleks ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en konstant T_m -verdi uavhengig av en sekvensvariasjon på målnukleinsyresekvensene, noe som muliggjør å sikre utmerket nøyaktighet i smeltekurvedanalysene.

25

(i) det skal bemerkes at sekvensen av 5'-taggingporsjonen av PTO og sekvensen av CTOen kan selekteres uten vurdering av målnukleinsyresekvensene. Dette gjør det mulig å pre-designe en samling av sekvenser på 5'-taggingporsjonen av PTO og CTO. Selv om 3'-mål-porsjonen av PTOen må fremstilles med vurdering av målnukleinsyresekvensene, kan CTOen fremstilles på en «klar til bruk» måte uten vurdering eller kunnskap av målnukleinsyresekvensene. Slike egenskaper tilveiebringer store fordeler ved multippel måldeteksjon,

30

inter alia, på et mikroarray analyse ved anvendelse av CTOer immobilisert på et faststoff-substrat.

Foreliggende oppfinnelse vil nå bli beskrevet i ytterligere detalj med eksempler. Det vil være åpenbart for de fagkyndige innen feltet at disse eksempler er tiltenkt å være mer konkrete illustrerende eksempler og at rammen av foreliggende oppfinnelse som angitt i de medfølgende krav ikke begrenses til disse eksempler.

EKSEMPLER

EKSEMPEL 1: Evaluering av probing og tagging oligonukleotid smelting og ekstensjon (PTOCE) analyse.

En ny analyse, Probing and Tagging Oligonucleotide Cleavage & Extension (PTOCE) analyse, ble evaluert for å undersøke om en forlenget dupleks kan tilveiebringe et målsignal for deteksjon av en målnukleinsyresekvens.

For denne evaluering ble PTOCE-analyse for å detektere nærvær av en forlenget dupleks med smelteanalyser utført (PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser). Vi anvendte Taq DNA polymerase som har en 5' nukleaseaktivitet for ekstensjon av oppstrøms primer, spalting av PTOen og ekstensjon av PTO-fragmentet.

Den forlengete dupleks dannet under analysen ble konstruert til å ha en interaktiv dobbelt-markør. Den interaktive dobbeltmarkør i den forlengete dupleks ble tilveiebrakt med (i) CTO merket med et reportermolekyl og et quencher molekyl (dobbelmerket CTO) eller (ii) PTO som har et quencher molekyl og CTO som har et reportermolekyl en quencher merket PTO og en reportermarket CTO. PTO og CTO blokkeres med en karbonspacer ved deres 3'-ende. Det syntetiske oligonukleotid for *Neisseria gonorrhoeae* (NG)-genet ble anvendt som et måltemplat.

1-1. PTOCE-analyse ved anvendelse av dobbelmerket CTO.

PTO har ingen markør. CTO har et quencher molekyl (BHQ-1) og et fluoriserende reporter-molekyl (FAM) i sin templatporsjon. Sekvensene av syntetisk templat, oppstrøms primer, PTO og CTO anvendt i dette eksempel er:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTTCCTTGCTCGGCAG

AGCGAGTGATACCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

5 NG-PTO-1 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO: 3)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-

1]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[C3 Spacer]-3' (SEQ ID NO: 4)

10 (Understrekede bokstaver indikerer 5'-taggingporsjonen av PTO)

Reaksjonen ble utført i et finalt volum av 20 µl inneholdende 2 pmol av syntetisk templat (SEQ ID NO:1) for NG-gen, 10 pmol av oppstrøms primer (SEQ ID NO:2), 5 pmol PTO (SEQ ID NO:3), 2 pmol CTO (SEQ ID NO:4) og 10 µl 2X Master Mix inneholdende 2,5 mM MgCl₂,
 15 200 µM dNTPer og 1,6 enheter av H-*Taq* DNA polymerase (Solgent, Korea); og røret som inneholdt reaksjonsblandingen ble plassert i en sanntids termocycler (CFX96, Bio-Rad); reaksjonsblandingen ble denaturert i 15 min ved 95 °C og underlagt 30 sykluser av 30 sek ved 95 °C, 60 sek ved 60 °C. Etter reaksjonen ble smeltekurve oppnådd ved å avkjøle reaksjonsblandingen til 35 °C, holde den ved 35 °C i 30 sek, og oppvarme langsomt ved 35
 20 °C til 90 °C. Fluorescens ble målt kontinuerlig under temperaturøkningen for å monitorere dissosiering av dobbeltrådet DNAer. Smeltetopper ble avledet fra smeltekurvedataene.

Som det fremgår av fig 14, en topp ved 76,5 °C korresponderende til den forventede T_m-verdi av den forlengete dupleks ble detektert i nærvær av templatet. Ingen topp ble detektert
 25 i fravær av templatet. Siden hybridet av ikke-spaltet PTO og CTO ikke gir noe signal i denne merkemetoden, så var det ingen topp korresponderende til hybridet av ikke-spaltet PTO og CTO. I tilfellet for ikke noe PTO eller ikke noe CTO, ble ingen topper observert.

1-2. PTOCE ved anvendelse av e quencher-merket PTO og en reporter-merket CTO

PTO er merket med et quencher molekyl (BHQ-1) ved dets 5'-ende. CTO er merket med et fluoriserende reportermolekyl (FAM) ved dets 3'-ende.

Sekvensene for syntetisk templat, oppstrøms primer, PTO og CTO anvendt i dette eksempel er:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTCTTGCTCGGCAG
AGCGAGTGATACCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

10 NG-PTO-2 5'-[BHQ-1]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[C3
spacer]-3'
(SEQ ID NO: 5)

NG-CTO-2 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[FAM]-3'
(SEQ ID NO: 6)

15 (Understrekte bokstaver indikerer 5'-taggingporsjonen av PTO)

Reaksjonen ble utført i finalt volum på 20 µl inneholdende 2 pmol syntetisk templat (SEQ ID NO: 1) for NG gen, 10 pmol oppstrøms primer (SEQ ID NO: 2), 5 pmol PTO (SEQ ID NO: 5), 2 pmol CTO (SEQ ID NO: 6) og 10 µl 2X Master Mix inneholdende 2,5 mm MgCl₂, 200 µm dNTPer og 1,6 enheter H-*Taq* DNA polymerase (Solgent, Korea); hvor røret inneholdende
20 reaksjonsblandingen ble plassert i en sanntids termocycler (CFX96, Bio-Rad); reaksjons-
blandingen ble denaturert i 15 min ved 95 °C og underlagt 30 sykluser av 30 sek ved 95 °C,
60 sek ved 60 °C, 30 sek ved 72 °C. Etter reaksjonen ble smeltekurven oppnådd ved å
25 avkjøle reaksjonsblandingen til 35 °C, holde denne ved 35 °C i 30 sek, og langsomt opp-
varming ved 35 °C til 90 °C. Fluorescens ble målt kontinuerlig under temperaturøkningen for
å monitorere dissosiering av dobbelttrådede DNAer. Smeltetopp ble avledet fra smelte-
kurvedata.

Som vist i figur 19, en topp ved 77,0 °C korresponderende til den forventede T_m-verdi av den
30 forlengete dupleks ble detektert i nærvær av templatet. Siden hybridet av ikke-spaltet PTO
og CTO ikke gir et ikke-målsignal i denne merkemetode, så var der en topp ved 64,0 °C ~
64,5 °C korresponderende til en forventet T_m-verdi av hybridet av ikke-spaltet PTO og CTO. I
tilfellet ikke noe PTO eller ikke noe CTO, ble ingen topper observert.

Disse resultater indikerer at en mål-avhengig forlenget dupleks produseres og at den forlengete dupleks tilveiebringer målsignalet som indikerer nærvær av målnukleinsyresekvensen.

5 EKSEMPEL 2: Justerbarhet av T_m -Verdi av en forlenget dupleks.

Vi undersøkte videre om T_m -verdien av en forlenget dupleks kan justeres med sekvensen av CTO i PTO-analysen.

10 For undersøkelsen ble det anvendt tre typer CTOer som har forskjellige sekvenser ved deres templatporsjoner. PTO har ingen markør. De tre typer CTOer har et quencher molekyl (BHQ-1) og et fluoriserende reportermolekyl (FAM) i deres templatporsjoner. PTO og CTO blokkeres med en karbonspacer ved deres 3'-ender.

15 PTOCE-analysen omfattende smelteanalyser ble utført med hver av de tre typer CTOer.

Sekvensene for syntetisk templat, oppstrøms primer, PTO og CTOer anvendt i dette eksempel er:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAG

20 AGCGAGTGATACCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO: 7)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-

25 1]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[C3 Spacer]-3 (SEQ ID NO: 4)

NG-CTO-3 5'-[BHQ-1]TTTTTTTTTTCCTCCTCCAG[T(FAM)]AAAGCCAAGCCGTCGT[C3 Spacer]-3' (SEQ ID NO: 8)

30 NG-CTO-4 5'-[BHQ-1]TTTTTTTTTTTTTTTTTTAG[T(FAM)]AAAGCCAAGCCGTCGT[C3 Spacer]-3' (SEQ ID NO: 9)

(Understreket bokstaver indikerer 5'-taggingporsjonen av PTO)

Reaksjonen ble utført i finalt volum av 20 µl inneholdende 2 pmol syntetisk templat (SEQ ID NO: 1) for NG gen, 10 pmol oppstrøms primer (SEQ ID NO: 2), 5 pmol PTO (SEQ ID NO: 7), 2 pmol CTO (SEQ ID NO: 4, 8 eller 9), og 10 µl 2X Master Mix inneholdende 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPer og 1,6 enheter H-*Taq* DNA polymerase (Solgent, Korea); hvor røret

5 inneholdende reaksjonsblandingen ble plassert i sanntids termocycler (CFX96, Bio-Rad); reaksjonsblandingen ble denaturert i 15 min ved 95 °C og underlagt 30 sykluser av 30 sek ved 95 °C, 60 sek ved 60 °C. Etter reaksjonen ble smeltekurven oppnådd ved å avkjøle reaksjonsblandingen til 35 °C, holde denne ved 35 °C i 30 sek, og oppvarme langsomt ved 35 °C til 90 °C. Fluorescens ble målt kontinuerlig under temperaturøkningen for å monitorere

10 dissosiering av dobbelttrådede DNAer. Smeltetopp ble avledet fra smeltekurvedata.

Som vist i figur 16, en topp ble detektert ved 76,0 °C, 69,0 °C eller 64,5 °C i nærvær av templat. Hver topp korresponderer til forventet T_m av de forlengete duplekser generert fra den undersøkte CTO. Ingen topp ble detektert i fravær av templat.

15 Disse resultater indikerer at T_m -verdien av den forlengete dupleks kan justeres av sekvensen av CTO.

EKSEMPEL 3: Deteksjon av en målnukleinsyresekvens ved anvendelse av PTOCE-analyse omfattende en sanntidsdeteksjon eller smelteanalyser.

20

Vi undersøkte videre om PTOCE-analysen kan detektere en målnukleinsyresekvens i sanntid PCR (i) eller post PCR smelteanalyse (ii): (i) spalting av PTO og ekstensjon av PTO-fragment ble ledsaget av mangfoldiggjøring av en målnukleinsyre med PCR-prosessen og

25 nærvær av forlenget dupleks ble detektert ved en forutbestemt temperatur i hver syklus (PTOCE-analyse omfattende sanntidsdeteksjon ved en forutbestemt temperatur) eller; (ii) spalting av PTO og ekstensjon av PTO-fragment ble ledsaget av mangfoldiggjøring av en målnukleinsyre med PCR-prosess og nærvær av forlenget dupleks ble detektert med post PCR smelteanalyser (PTOCE-analyse omfattende smelteanalyse).

30 Oppstrømsprimer er involvert i PTO-spalting med et enzymet som har en 5' nukleaseaktivitet og også involvert i mangfoldiggjøring av målsyresekvensen med nedstrøms primer med PCR-prosess. *Taq* DNA polymerase som har en 5'-nukleaseaktivitet ble anvendt på ekstensjon av oppstrøms primer og nedstrøms primer, spaltingen av PTO og ekstensjon av

35 PTO-fragment.

Den forlengete dupleks ble konstruert til å ha en interaktiv dobbeltmarkør. Den interaktive dobbeltmarkør i den forlengete dupleks ble tilveiebrakt av (i) CTO merket med et reporter-molekyl og et quencher molekyl, (ii) en quencher iso-dGTP inkorporert under ekstensjons-reaksjonen og CTO som har et reportermolekyl og en iso-dC-rest eller (iii) PTO som har et quencher molekyl og CTO som har et reportermolekyl. PTO og CTO blokkeres med en karbonspacer ved deres 3'-ender.

Genomisk DNA av *Neisseria gonorrhoeae* (NG) ble anvendt som en målnukleinsyre.

3-1. PTOCE –analyse ved anvendelse av en dobbeltmerket CTO

PTO har ingen markør og CTO er merket med et quencher molekyl (BHQ-1) og et fluorescerende reportermolekyl (FAM) i sin templatporsjon.

Sekvensene til oppstrøms primer, nedstrøms primer og PTO og CTO anvendt i dette eksempel er:

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer] -3' (SEQ ID NO: 7)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[C3 Spacer] -3' (SEQ ID NO: 4)

(Understreket bokstaver indikerer 5'-taggingporsjonen av PTO)

3-1-1. PTOCE –analyse omfattende sanntidsdeteksjon ved en forutbestemt temperatur.

Reaksjonen ble utført i finalt volum av 20 µl inneholdende 100 pg genomisk DNA av NG, 10 pmol nedstrøms primer (SEQ ID NO: 10), 10 pmol oppstrøms primer (SEQ ID NO: 2), 5 pmol PTO (SEQ ID NO: 7), 2 pmol CTO (SEQ ID NO: 4), og 10 µl 2X Master Mix inneholdende 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPer og 1,6 enheter H-*Taq* DNA polymerase (Solgent, Korea); hvor røret inneholdende reaksjonsblandingen ble plassert i en sanntids termocycler (CFX96, Bio-Rad); hvor reaksjonsblandingen ble denaturert i 15 min ved 95 °C og underlagt 16 sykluser av 30 sek ved 90 °C, 60 sek ved 60 °C, 30 sek ved 72 °C. Deteksjon av signalene ble utført ved 60 °C av hver syklus. Deteksjonstemperaturen ble bestemt i en slik grad at den forlengete dupleks opprettholder en dobbelttrådet form.

Som vist i figur 17A, målsignalene (Ct 31.36) ble detektert i nærvær av templatet. Intet signal ble detektert i fravær av templatet.

5 3-1-2. PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser.

Etter reaksjonen i eksempel 3-1-1, ble smeltekurve oppnådd ved å avkjøle reaksjonsblandingen til 35 °C, holde denne ved 35 °C i 30 sek, og oppvarme langsomt ved 35 °C til 90 °C. Fluorescensen ble målt kontinuerlig under temperaturøkningen for å monitorere dissosiering av dobbelttrådede DNAer. Smeltetopp ble avledet fra smeltekurvedata.

10

Som vist i figur 17B, en topp ved 76,0 °C korresponderende til den forventete T_m-verdi av den forlengete dupleks ble detektert i nærvær av templatet. Ingen topp ble detektert i fravær av templatet. Siden hybridet av ikke-spaltet PTO og CTO ikke gir noe signal i denne merke-metode, så var der ingen topp korresponderende til hybridet av ikke-spaltet PTO og CTO.

15

3-2. PTOCE-analyse ved anvendelse av en quencher-iso-dGTP og et reportermerket CTO som har en iso-dC-enhet.

PTO har ingen markør. CTO har et reporter-molekyl (FAM) og en iso-dC-enhet ved dets 5'-ene. Under ekstensjonsreaksjonen av PTO-fragmentet, inkorporeres et iso-dGTP merket med et quencher molekyl (dabcyl) ved posisjonen som er komplementær til iso-dC-enheten.

20

Sekvensene for oppstrøms primer, nedstrøms primer, PTO og CTO anvendt i dette eksempel er:

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)

25 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-1 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO: 3)

NG-CTO-5 5'-[FAM][Iso-dC]CTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO: 11)

30 (Understrekete bokstaver indikerer 5'-taggingporsjonen av PTO)

3-2-1. PTOCE-analyse omfattende sanntidsdeteksjon ved en forutbestemt temperatur.

Reaksjonen ble utført i finalt volum av 20 µl inneholdende 100 pg genomisk DNA av NG, 10 pmol nedstrøms primer (SEQ ID NO: 10), 10 pmol oppstrøms primer (SEQ ID NO: 2), 5 pmol PTO (SEQ ID NO: 3), 2 pmol CTO (SEQ ID NO: 11) og 10 µl 2X Plexor® Master Mix

35

(Cat. No. A4100, Promega, USA); hvor røret inneholdende reaksjonsblandingen ble plassert i en sanntids termocycler (CFX96, Bio-Rad); reaksjonsblandingen ble denaturert i 15 min ved 95 °C og underlagt 60 sykluser ved 30 sek ved 95 °C, 60 sek ved 60 °C, 30 sek ved 72 °C og 5 sykluser på 30 sek ved 72 °C, 30 sek ved 55 °C. Deteksjon av signalet ble utført ved 60 °C av hver syklus. Deteksjonstemperaturen ble bestemt i en slik grad at den forlengete dupleks opprettholdt en dobbeltrådet form.

DNA-polymerase som har 5' nuklease i Plexor® Master Mix ble anvendt for ekstensjon av oppstrøms primer og nedstrøms primer, og spalting av PTO og ekstensjon av PTO-fragmentet.

Som vist i figur 18A, målsignalet (Ct 33.03) ble detektert i nærvær av templatet. Intet signal ble detektert i fravær av templatet.

3-2-2. PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser.

Etter reaksjonen i eksempel 3-2-1, ble smeltekurve oppnådd ved å avkjøle reaksjonsblandingen til 35 °C, holde denne ved 35 °C i 30 sek, og oppvarme langsomt ved 35 °C til 90 °C. Fluorescens ble målt kontinuerlig under temperaturøkningen for å monitorere dissosiering av dobbeltrådet DNAer. Smeltetopp ble avledet fra smeltekurvedata.

Som vist i figur 18B, en topp ved 70,0 °C korresponderende til den forventede T_m-Verdi av den forlengete dupleks ble detektert i nærvær av templatet. Ingen topp ble detektert i fravær av templatet. Siden hybridet av ikke-spaltet PTO og CTO ikke gir noe signal i denne merke-metode, så var der ingen topp korresponderende til hybridet av ikke-spaltet PTO og CTO.

3-3. PTOCE-analyse ved anvendelse av et quencher merket PTO og et reportermerket CTO.

PTO merkes med et quencher molekyl (BHQ-1) ved sin 5'-ende. CTO merkes med et fluorescerende reportermerket molekyl (FAM) ved sin 3'-ende.

Sekvensene for oppstrøms primer, nedstrøms primer, PTO og CTO anvendt i dette eksempel er:

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-4 5'-[BHQ-1]ACGACGGCTTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[C3 spacer]-3'
(SEQ ID NO: 12)

NG-CTO-2 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[FAM]-3'
(SEQ ID NO: 6)

5 (Understrekte bokstaver indikerer 5'-taggingporsjonen PTO)

3-3-1. PTOCE-analyse omfattende sanntidsdeteksjon ved en forutbestemt temperatur.

Reaksjonen ble utført i finalt volum på 20 µl inneholdende 100 pg NG genomisk DNA, 10 pmol nedstrøms primer (SEQ ID NO: 10), 10 pmol oppstrøms primer (SEQ ID NO: 2), 5
10 pmol PTO (SEQ ID NO: 12), 2 pmol CTO (SEQ ID NO: 6) og 10 µl 2X Master Mix inneholdende 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs og 1,6 enheter H-*Taq* DNA polymerase (Solgent, Korea); hvor røret inneholdende reaksjonsblandingen ble plassert i en sanntids termocycler (CFX96, Bio-Rad); hvor reaksjonsblandingen ble denaturert i 15 min ved 95 °C og underlagt 60 sykluser 30 sek ved 95 °C, 60 sek ved 60 °C, 30 sek ved 72 °C. Deteksjon av signalet ble
15 utført ved 60 °C av hver syklus. Deteksjonstemperaturen ble bestemt i en slik grad at den forlengete dupleks opprettholder en dobbeltrådet form og temperaturen er høyere enn T_m-verdien av et hybrid mellom ikke-spaltet PTO og CTO.

Som vist i figur 19A, målsignalet (Ct 29.79) ble detektert i nærvær av templatet. Intet signal
20 ble detektert i fravær av templatet.

3-3-2. PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser.

Etter reaksjonen i eksempel 3-3-1 ble smeltekurver oppnådd ved å avkjøle reaksjonsblandingen til 35 °C, holde ved 35 °C i 30 sek, og oppvarme langsomt ved 35 °C til 90 °C.
25 Fluorescens ble målt kontinuerlig under temperaturøkningen for å monitorere dissosiering av dobbeltrådet DNAer. Smeltetopp ble avledet fra smeltekurvedata.

Som vist i figur 19B, en topp ved 76,5 °C korresponderende til den forventete T_M-verdi av den forlengete dupleks ble detektert i nærvær av templat. Siden hybridet av ikke-spaltet PTO
30 og CTO ikke gir et ikke-målsignal i denne merkemetode, ble toppen korresponderende til T_m-verdien av hybridet i ikke-spaltet PTO og CTO detektert ved 48,0 °C i fravær av templat.

Disse resultater indikerer at en målnukleinsyressekvens kan detekteres med PTOCE-analysen omfattende sanntidsdeteksjon og smelteanalyser.

EKSEMPEL 4: Deteksjon av multiple målnukleinsyresekvenser med PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser.

Vi har også undersøkt om PTOCE-analysen omfattende smelteanalyser kan detektere multiple målnukleinsyresekvenser ved anvendelse av same type av reportermolekyl.

Spalting av PTOer og ekstensjon av PTO-fragmenter ble utført med mangfoldiggjøring av målnukleinsyresekvenser med PCR-prosess og nærvær av de forlengete duplekser ble detektert med post PCR-smelteanalyser (PTOCE-analyser omfattende smelteanalyser).

De forlengete duplekser dannet under analysen ble konstruert til å ha interaktive dobbelt-markører. Den interaktive dobbeltmarkør i forlenget dupleks ble tilveiebrakt med CTO-markør med et reportermolekyl og et quencher molekyl i sin templatporsjon. CTOene har samme type av fluoriserende reportermolekyl (FAM) men har forskjellige sekvenser for å generere de forskjellige T_m -verdiene av de forlengete duplekser. PTO og CTO blokkeres med en karbon spacer ved deres 3'-ender.

Genomisk DNAs av *Neisseria gonorrhoeae* (NG) og *Staphylococcus aureus* (SA) ble anvendt som målnukleinsyrer.

Sekvensene til oppstrøms primer, nedstrøms primer, PTOer og CTOer anvendt i dette eksempel er:

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer] -3' (SEQ ID NO: 7)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[C3 Spacer] -3' (SEQ ID NO: 4)

SA-F 5'-TGTTAGAATTTGAACAAGGATTTAATC-3' (SEQ ID NO: 13)

SA-R 5'-GATAAGTTTAAAGCTTGACCGTCTG-3' (SEQ ID NO: 14)

SA-PTO-1 5'-AATCCGACCACGCATTCCGTGGTCAATCATTCCGGTTTACG[C3 spacer] -3' (SEQ ID NO: 15)

SA-CTO-1 5'-[BHQ-1]TTTTTTTTTTTTTTTTTGGCA[T(FAM)]AGCGTGGTCGGATT[C3 spacer] -3'

(SEQ ID NO: 16)

(Understrekete bokstaver indikerer 5'-taggingporsjonen av PTO)

Reaksjonen ble utført i finalt volum av 20 µl inneholdende 100 pg genomisk DNA av NG,
 5 100 pg genomisk DNA av SA, 10 pmol av hver nedstrøms primer (SEQ ID NOer: 10 og 13),
 10 pmol av hver oppstrøms primer (SEQ ID NOer: 2 og 14), 5 pmol av hver PTO (SEQ ID
 NOer: 7 og 15), 2 pmol av hver CTO (SEQ ID NOer: 4 og 16) og 10 µl av 2X Master Mix
 inneholdende 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPer og 1,6 enheter av H-*Taq* DNA polymerase
 (Solgent, Korea); hvor røret inneholdende reaksjonsblandingen ble plassert i en sanntids
 10 termocycler (CFX96, Bio-Rad); hvor reaksjonsblandingen ble denaturert i 15 min ved 95 °C
 og underlagt 60 sykluser av 30 sek ved 95 °C, 60 sek ved 60 °C, 30 sek ved 72 °C. Etter
 reaksjonen ble smeltekurve opptatt ved avkjøling av reaksjonsblandingen til 35 °C, holde
 den ved 35 °C i 30 sek og langsom oppvarming ved 35 °C til 90 °. Fluorescens ble målt
 kontinuerlig under temperaturøkningen for å monitorere dissosiering av dobbeltrådet
 15 DNAer. Smeltetopp ble avledet fra smeltekurvedata.

Som vist i figur 20, multiple målsignaler (NG's T_m: 75,5 °C og SA's T_m: 63,5 °C) ble
 detektert i nærvær av templatene. Ingen signal ble detektert i fravær av templatene.

20 Disse resultater indikerer at PTOCE-analysen omfattende smelteanalyser muliggjør detek-
 sjon av multiple målnukleinsyrer ved anvendelse av samme type reportertermolekyl (for
 eksempel FAM) i betingelser hvor de forlengete duplekser korresponderende til målnuklein-
 syrene har forskjellige T_m-verdier.

25 **EKSEMPEL 5: Evaluering av PTOCE-analyse omfattende smelteanalyser på mikroarray.**

Vi undersøkte videre PTOCE-analyser omfattende smelteanalyser på mikroarray. PTO-
 spalting ble utført i et separat kar og en alikvot av resultatet ble tatt over på et mikroarray
 hvor CTO var immobilisert. Etter ekstensionsreaksjonen ble nærvær av den forlengete
 30 dupleks detektert med smelteanalyser.

Taq DNA polymerase som har 5'-nukleaseaktivitet ble anvendt for ekstensjon av oppstrøms
 primer, spalting av PTO og ekstensjon av PTO-fragment. Den forlengete dupleks som ble
 dannet under analysen ble konstruert til å ha en enkel markør. Den enkle markør i den for-
 35 lengete dupleks ble tilveiebrakt av PTO merket med Quasar570 som et fluorescerende

reportermolekyl ved dets 5'-ende. PTO og CTO blokkeres med en karbonspacer ved deres 3'-ender. CTOen har poly(T)₅ som en linkerarm og ble immobilisert på overflaten av et preparatglass ved anvendelse av en aminogruppe (AminnoC7) ved dets 5'-ende. En markør-probe som har et fluoriserende reportermolekyl (Quasar570) ved dets 5'-ende ble immobilisert på overflaten av preparatglasset ved anvendelse av en aminogruppe ved dets 3'-ende.

Sekvensene av syntetisk templat, oppstrøms primer, PTO, CRO og markør anvendt i dette eksempel er:

- 10 NG-T 5'-
AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAG
AGCGAGTGATACCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)
NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-5 5'-
- 15 [Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3'
(SEQ ID NO: 17)
NG-CTO-S1 5'-
[AminoC7]TTTTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[C3
Spacer]-3'
(SEQ ID NO: 18)
- 20 Marker 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)
(Understreket bokstaver indikerer 5'-taggingporsjon av PTO)

- 25 NSB9 NHS preparatglass (NSBPOSTECH, Korea) ble anvendt for fremstilling av CTO og markør (SEQ ID NOer: 18 og 19). CTO og markør oppløst i NSB spotting buffer ved den finale konsentrasjon av 10 µM ble printet på NSB9 NHS preparatglass med Personal-Arrayer™ 16 Microarray Spotter (CapitalBio, China). CTOen og markør ble spottet side ved side i et 2x1 format (duplikate spot), og det resulterende mikroarray ble inkubert i et kammer opprettholdt ved ~85 % fuktighet natten over. Preparatene ble deretter vasket i en buffer-
- 30 løsning inneholdende 2xSSPE (0,3 M natrium klorid, 0,02 M natrium hydrogen fosfat og 2,0 mM EDTA), pH 7,4 og 7,0 mM SDS ved 37 °C i 30 min for å fjerne ikke-spesifikk bundet CTO og markør, og skylt med destillert vann. Deretter ble DNA-funksjonaliserte preparater tørket ved anvendelse av en preparatsentrifuge og lagret i mørke ved 4 °C inntil bruk.

Spaltungsreaksjonen ble utført i det finale volum av 50 µl inneholdende 2 pmol syntetisk templat (SEQ ID NO: 1) for NG gen, 10 pmol oppstrøms primer (SEQ ID NO: 2), 1 pmol PTO (SEQ ID NO: 17) og 25 µl 2X Master Mix inneholdende 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPer, og 4 enheter H-*Taq* DNA polymerase (Solgent, Korea); og røret som inneholder reaksjonsblandingen ble plassert i en sanntids termocycler (CFX96, Bio-Rad); og reaksjonsblandingen ble denaturert i 15 min ved 95 °C og underlagt 30 sykluser av 30 sek ved 95 °C, 60 sek ved 63 °C.

30 µl av den resulterende blanding ble applisert til et kammer satt sammen på overflaten av NSB-preparatglasset hvorpå CTOen (SEQ ID NO: 18) ble kryssbundet. Preparatglasset ble plassert på *in situ* blokk i en termocycler (GenePro B4I, China). Seks like preparater ble preparert på smelteanalyse. Ekstensjonsreaksjonen ble tillatt i 20 min ved 55 °C. Deretter, de resulterende preparater ble inkubert i 1 min ved romtemperatur. Til slutt ble hvert preparat vasket i destillert vann i 1 min ved 44 °C, 52 °C, 60 °C, 68 °C, 76 °C eller 84 °C. Bildeopptak ble utført ved anvendelse av Confocal Laser Scanner, Axon GenePix4100A (Molecular Device, US) med skanning ved 5 µm piksel oppløsning. Fluorescens intensitet ble analysert ved anvendelse av kvantitativ mikroarray analyseprogramvare, GenePix pro6.0 software (Molecular Device, US). Fluorescens intensitet ble uttrykt som spot-medialer etter lokal subtrahering av bakgrunn. Hvert spot ble duplikert for test av reproduserbarhet. Fluorescens intensitet indikerer gjennomsnittsverdier av duplikat spot.

Som vist i figur 21A og 21B, smeltekurven ble oppnådd ved å male fluorescens intensitet fra spottene fremstilt med forskjellige vasketemperaturer. Nærvær av den forlengete dupleks ble bestemt fra smeltekurvedata.

EKSEMPEL 6: Evaluering av PTOCE-analyse omfattende sanntidsdeteksjon for mikroarray.

Vi undersøkte videre PTOCE-analyse omfattende sanntidsdeteksjon ved en forutbestemt temperatur på mikroarray.

Spalting av PTO og ekstensjon av PT-fragment ble repetert på et mikroarray hvor CTO var immobilisert. Nærvær av den forlengete dupleks ble detektert ved en forutbestemt temperatur i flere bestemte sykluser.

Taq DNA polymerase med 5' nuklease aktivitet ble anvendt for ekstensjon av oppstrøms primer, spalting av PTO og ekstensjon av PTO-fragment.

- 5 Den forlengete dupleks som ble dannet under analysen ble konstruert til å ha en enkelt markør eller en interaktiv dobbeltmarkør. Den enkle markør i den forlengete dupleks ble tilveiebrakt med PTO merket med et reportertermolekyl (reportermerket PTO). Den interaktive dobbeltmarkør i den forlengete dupleks ble tilveiebrakt med CTO merket med et reporter-molekyl og et quencher molekyl (dobbeltmerket CTO). PTO og CTO er blokkert med en
- 10 karbonspacer ved deres 3'-ender.

- CTOen har poly(T) som en linkerarm. CTOen ble immobilisert på et preparatglass ved anvendelse av en aminogruppe (AminnoC7) ved dets 5'-ende eller dets 3'-ende. En markør-probe som har et fluoriserende reportertermolekyl (Quasar570) ved dets 5'-ende ble immobili-
- 15 sert på preparatglasset ved anvendelse av en aminogruppe ved dets 3'-ende. Fluorescens intensitet på preparatglasset ble målt ved en forutbestemt temperatur. Deteksjonstemperatur ble bestemt i en slik grad at den forlengete dupleks opprettholder dobbeltrådet form. Syntetisk oligonukleotid for *Neisseria gonorrhoeae* (NG) ble anvendt som templat.

20 6-1. PTOCE-analyse ved anvendelse av en reportermerket PTO.

PTO hars Quasar570 som et fluorescerende reportertermolekyl ved dets 5'-ende. CTOen ble immobilisert gjennom dets 5'-ende. I denne merkemetode var deteksjonstemperaturen bestemt i en slik grad at den forlengete dupleks opprettholder en dobbeltrådet form og temperaturen er høyere enn T_m-verdien av et hybrid mellom ikke-spaltet PTO og CTO.

- 25 Sekvensene for syntetisk templat, oppstrøms primer, PTO, CTO og markør anvendt i dette eksempel er:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTTCCTTGCTCGGCAG

- 30 AGCGAGTGATACCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-5 5'-

[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO: 17)

NG-CTO-S1 5'-

[AminoC7]TTTTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[C3

Spacer]-3'

(SEQ ID NO: 18)

5 Marker 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)

(Understreket bokstaver indikerer 5'-taggingporsjonen av PTO)

Preparatene ble utført med samme protokoll som anvendt i eksempel 5.

- 10 PTOCE-reaksjonen ble utført i finalt volum på 30 µl inneholdende 2 pmol syntetisk templat (SEQ ID NO: 1) for NG gen, 10 pmol oppstrøms primer (SEQ ID NO: 2), 1 pmol PTO (SEQ ID NO: 17) og 15 µl 2X Master Mix inneholdende 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPer, og 2,4 enheter H-*Taq* DNA polymerase (Solgent, Korea); hvor hele blandingen ble applisert til et kammer tilordnet på overflaten av NSB-preparatglasset hvorpå CTOen CTO (SEQ ID NO: 18) var kryssbundet. Preparatet ble plassert på *in situ* blokk i en termocycler (GenePro B4I, China). Fem like preparater ble fremstilt for sykleringsanalyse. PTOCE-reaksjonen ble utført som følger: 15 min denaturering ved 95 °C og 0, 5, 10, 20 eller 30 sykluser ved 30 sek ved 95 °C, 60 sek ved 60 °C, 60 sek ved 55 °C. Etter at reaksjonen av det korresponderende syklusnummer ble preparatene vasket i destillert vann ved 64 °C i 1 min. Bildeopptak ble 20 utført etter hver vasking ved anvendelse av Confocal Laser Scanner, Axon GenePix4100A (Molecular Device, US) med skanning ved 5-µm pikseloppløsning. Fluorescens intensitet ble analysert ved anvendelse av kvantitativ mikroarray analyse programvare, GenePix pro6.0 software (Molecular Device, US). Fluorescens intensitet ble uttrykt som spot medianer etter subtrahering av lokal bakgrunn. Hver spot ble duplisert for test av reproducerbarhet. 25 Fluorescens intensiteten indikerer gjennomsnittsverdi for dupliserte spotter.

Som vist i figur 22A og 22B, fluorescens intensitet for målnukleinsyresekvensen økte avhengig av syklusnummer (0 cycle_RFU: 1,304±0.7; 5 cycles_RFU: 18,939±1,342.1; 10 cycles_RFU: 30,619±285.0; 20 cycles_RFU: 56,248±2,208.3; and 30 cycles_RFU:

- 30 64,645±1,110.2) I nærvær av templatet. Det var ingen forandring av fluorescens intensiteten avhengig av syklusnummer i fravær av templatet.

6-2. PTOCE-analyse ved anvendelse av en dobbeltmerket PTO.

CTOen ble immobilisert gjennom dets 3'-ende og har et quencher molekyl (BHQ-2) og et

- 35 fluoriserende reportertermolekyl (Quasar570) i sin templatporsjon.

Sekvensene for syntetisk templat, oppstrøms primer, PTO, CTO og markør anvendt i dette eksempel er:

NG-T 5'-

5 AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTTCCTTGCTCGGCAG
AGCGAGTGATACCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-6 5'-ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3'
(SEQ ID NO: 20)

10 NG-CTO-S2 5'-[BHQ-
2]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(Quasar570)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGTTTTTTT
TTTT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 21)

Marker 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)

(Understrekete bokstaver indikerer 5'-taggingporsjonen av PTO)

15

Fremstilling av preparat ble utført med same protokoll som anvendt i eksempel 5.

PTOCE-reaksjonen ble utført i et finalt volum av 30 µl inneholdende 2 pmol syntetisk templat (SEQ ID NO: 1) for NG gen, 10 pmol oppstrøms primer (SEQ ID NO: 2), 1 pmol PTO (SEQ
20 ID NO: 20), og 15 µl 2X Master Mix inneholdende 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPer, og 2,4 enheter H-*Taq* DNA polymerase (Solgent, Korea); og hele blandingen ble applisert til et kammer anordnet på overflaten av NSB-preparatglasset hvorpå CTO var kryssbundet (SEQ ID NO: 21). Preparatet ble plassert på *in situ* blokk i en termocycler (GenePro B4I, China). Fem like preparater ble fremstilt for sykleringsanalyser. PTOCE-reaksjonen ble utført som
25 følger: 15 min denaturering ved 95 °C og 0, 5, 10, 20 eller 30 sykluser av 30 sek ved 95 °C, 60 sek ved 60 °C, 60 sek ved 50 °C. Etter reaksjonen av det korresponderende syklusnummer, ble bildeopptak utført ved anvendelse av Confocal Laser Scanner, Axon Gene-Pix4100A (Molecular Device, US) med skanning med 5 µm pikseloppløsning. Fluorescens intensitet ble analysert ved anvendelse av kvantitativ mikroarray analyseprogramvare,
30 GenePix pro6.0 software (Molecular Device, US). Fluorescens intensitet ble uttrykt som spot-medianer etter subtrahering av lokal bakgrunn. Hver spot ble duplisert for test av reproduserbarhet. Fluorescens intensitet indikerer gjennomsnittsverdi av de duplikerte spot.

Som vist i figur 23A og 23B, fluorescens intensitet for målnukleinsyresekvensen økte
35 avhengig av syklusnummer (0 cycle_RFU: 28,078±460.3; 5 cycles_RFU: og 30 cycles_RFU:

65,426±2.8) i nærvær av templatet. Der var ingen forandring av fluorescens intensiteten avhengig av syklusnummer i fravær av templatet.

EKSEMPEL 7: Deteksjon av multiple målnukleinsyresekvenser med PTOCE-analyse

5 omfattende endepunktdeteksjon ved en forutbestemt temperatur på mikroarray.

Vi undersøkte videre multippel måldeteksjon med PTOCE-analyser omfattende endepunkt-deteksjon ved en forutbestemt temperatur på mikroarray.

- 10 PTO-spalting ble utført i flere kar med PCR-prosess og en alikvot av resultatet ble tatt opp i et mikroarray hvor CTO var immobilisert. Etter ekstensjonsreaksjonen ble nærvær av den forlengete dupleks detektert med endepunktdeteksjon ved en forutbestemt temperatur.

- 15 Taq DNA polymerase med 5' nukleaseaktivitet ble anvendt for ekstensjon av oppstrøms primer og nedstrøms primer, spalting av PTO og ekstensjon av PTO-fragment.

- 20 Den forlengete dupleks formet under analysen ble konstruert til å ha en enkelt markør. Den enkle markør i den forlengete dupleks ble tilveiebrakt av PTO merket med Quasar570 som et fluorescerende reportermolekyl ved 5'-enden av PTOen. PTO og CTO blokkeres med en karbon spacer ved deres 3'-ender.

- 25 CTO har poly(T)₅ som en linkerarm og ble immobilisert på preparatglasset ved anvendelse av en aminogruppe (AminnoC7) ved dets 5'-ende. En markørprobe med et fluoriserende reportermolekyl (Quasar570) ved dets 5'-ende ble immobilisert på glasspreparatet ved anvendelse av en aminogruppe ved dets 3'-ende.

- 30 En fluorescens intensitet på preparatet ble målt ved en forutbestemt temperatur. Deteksjons-temperaturen ble bestemt i en slik grad at den forlengete dupleks opprettholder en dobbelt-trådet form og temperaturen er høyere enn T_m -verdien av et hybrid mellom ikke-spaltet PTO og CTO. Genomiske DNAer av *Staphylococcus aureus* (SA) og *Neisseria gonorrhoeae* (NG) ble anvendt.

Sekvensene for oppstrøms primer, nedstrøms primer, PTO, CTO og markør anvendt i dette eksempel er:

- 35 NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-5 5'-

[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3'
(SEQ ID NO: 17)

5 NG-CTO-S1 5'-

[AminoC7]TTTTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[C3
Spacer]-3'
(SEQ ID NO: 18)

SA-F 5'-TGTTAGAATTTGAACAAGGATTTAATC-3' (SEQ ID NO: 13)

10 SA-R2 5'-TTAGCTCCTGCTCCTAAACCA-3' (SEQ ID NO: 22)

SA-PTO-2 5'-[Quasar570]

AATCCGACCACGCTATGCTCATTCCGTGGTCAATCATTGGTTTACG[C3 spacer]-
3' (SEQ ID NO: 23)

SA_CTO-S1 5'-

15 [AminoC7]TTTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCCCCAGCATAGCGTGGTCCGATT
[C3 Spacer]-3' (SEQ ID NO: 24)

Marker 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)

(Understrekte bokstaver indikerer 5'-taggingporsjonen av PTO)

20 Fremstilling av preparat ble utført med samme protokoll som anvendt i eksempel 5.

Spaltingsreaksjonen ble utført i finalt volum på 50 µl inneholdende hver 100 pg genomisk DNA av SA og/eller NG, hver 10 pmol av nedstrøms primer (SEQ ID NOer: 10 og/eller 13), hver 10 pmol av oppstrøms primer (SEQ ID NOer: 2 og/eller 22), hver 1 pmol PTO (SEQ ID NOs: 17 og/eller 23), og 25 µl 2X Master Mix inneholdende 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPer, og 4 enheter av H-*Taq* DNA polymerase (Solgent, Korea); hvor røret inneholdende reaksjonsblandingen ble plassert i en sanntids termocycler (CFX96, Bio-Rad); hvor reaksjonsblandingen ble denaturert i 15 min ved 95 °C og underlagt 60 sykluser av 30 sek ved 95 °C, 60 sek ved 60 °C. 30 µl av den resulterende blanding ble applisert til et kammer tilordnet på overflaten av NSB-preparatglass hvorpå CTOen (SEQ ID NOer: 18 og 24) ble kryssbundet. Preparatet ble plassert på *in situ* i en termocycler (GenePro B4I, China). Ekstensjonsreaksjonen ble kjørt i 20 min ved 55 °C. Deretter ble preparatene vasket i destillert vann ved 64 °C i 1 min. Bildeopptak ble utført etter hver vasking ved anvendelse av Confocal Laser Scanner, Axon GenePix4100A (Molecular Device, US) med skanning ved 10 µm piksel oppløsning. Fluorescens intensitet ble analysert ved anvendelse av kvantitativ mikroarray

analyse programvare GenePix pro6.0 software (Molecular Device, US). Fluorescens intensitet ble uttrykt som spot medianer etter fratrekk av lokal bakgrunn. Hver spot ble duplisert for test av reproduserbarhet. Fluorescens intensitet indikerer gjennomsnittsverdi av de dupliserte spot.

5

Som vist i figur 24, målsignalet for SA (RFU: $65,192 \pm 198.7$) ble detektert i nærvær av SA-templat. Målsignalet for NG (RFU: $65,332 \pm 1.4$) ble detektert i nærvær av NG-templat. Både målsignal for SA (RFU: $65,302 \pm 0.7$) og NG (RFU $65,302 \pm 0.7$) ble detektert i nærvær av begge templater.

10

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for å detektere en målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en
 5 blanding av nukleinsyrer med en PTOCE (PTO Cleavage and Extension) analyse, omfattende:

(a) hybridisere målnukleinsyresekvensen med en oppstrøms oligonukleotid og en
 PTO (Probing and Tagging Oligonukleotid); hvor oppstrøms oligonukleotid omfatter
 en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyre-
 10 sekvensen; PTOen omfatter (i) en 3' målporsjon omfattende en hybridiserende
 nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen og (ii) en 5'
 taggingporsjon omfattende en nukleotidsekvens som ikke er komplementær til
 målnukleinsyresekvensen; hvor 3'-målporsjonen hybridiseres med målnukleinsyre-
 sekvensen og 5' taggingporsjonen ikke hybridiseres med målnukleinsyresekvensen;
 15 hvor oppstrøms oligonukleotid er lokalisert oppstrøms for PTOen;

(b) sette resultatet fra trinn (a) i forbindelse med et enzym som har en 5' nuklease-
 aktivitet under betingelser for spalting av PTOen; hvor oppstrøms oligonukleotid eller
 dets forlengete tråd induserer spalting av PTOen med enzymet som har 5'-nuklease-
 aktivitet slik at spaltingen frigjør et fragment som omfatter 5'-taggingporsjonen eller
 20 en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen;

(c) hybridisere fragmentet frigjort fra PTOen med en CTO (Capturing and Templating
 Oligonukleotid); hvor CTOen omfatter i en 3' til 5' retning (i) en fangeporsjon omfat-
 tendende en nukleotidsekvens komplementær til 5' taggingporsjonen eller en del av 5'
 taggingporsjonen av PTOen og (ii) en templatporsjon omfattende en nukleotid-
 25 sekvens ikke komplementær til 5' taggingporsjonen og 3' målporsjonen av PTOen;
 hvor fragmentet frigjort fra PTOen hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen;

(d) utføre en ekstensionsreaksjon ved anvendelse av resultatet fra trinn (c) og en
 templatavhengig nukleinsyre polymerase; hvor fragmentet hybridisert med
 fangeporsjonen av CTOen forlenges og en forlenget dupleks dannes; hvor den
 30 forlengete dupleks har en T_m -verdi som kan justeres med (i) en sekvens og/eller
 lengde av fragmentet, (ii) en sekvens og/eller lengde av CTOen eller (iii) sekvensen
 og/eller lengden av fragmentet og sekvensen og/eller lengden av CTOen;

(e) smelte den forlengete dupleks over et område av temperaturer for å gi et mål-
 signal som indikerer nærvær av den forlengete dupleks, hvor målsignalet tilveie-
 35 bringes med (i) minst én markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, (ii) en markør

- inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen, (iii) en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen og en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, eller (iv) en interkalerende markør; og
(f) detektere den forlengete dupleks ved å måle målsignalet; hvorved nærvær av den
5 forlengete dupleks indikerer nærvær av målnukleinsyresekvensen.
2. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor nærvær av den forlengete dupleks detekteres med smelteanalyser.
- 10 3. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor smelting av trinn (e) etterfølges av hybridisering for å gi målsignalet som indikerer nærvær av den forlengete dupleks.
4. Fremgangsmåte i samsvar med krav 3, hvor nærvær av den forlengete dupleks detekteres ved hybridiseringsanalyser.
- 15 5. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor målsignalet tilveiebringes med minst én markør koplet til fragmentet og/eller CTOen.
6. Fremgangsmåte i samsvar med krav 5, hvor fragmentet eller CTOen har en interaktiv
20 dobbeltmarkør omfattende et reportertermolekyl og et quencher molekyl; hvor smelting av den forlengete dupleks i trinn (e) induserer forandring av et signal fra den interaktive dobbeltmarkør for å gi målsignalet i trinn (e).
7. Fremgangsmåte i samsvar med krav 5, hvor fragmentet har én av en interaktiv
25 dobbeltmarkør omfattende et reportertermolekyl og et quencher molekyl og CTOen har den andre av den interaktive dobbeltmarkør; hvor smelting av den forlengete dupleks i trinn (e) induserer forandring av et signal fra den interaktive dobbeltmarkør for å gi målsignalet i trinn (e).
- 30 8. Fremgangsmåte i samsvar med krav 5, hvor fragmentet eller CTOen har en enkelt markør, og smelting av den forlengete dupleks i trinn (e) induserer forandring av et signal fra enkeltmarkøren for å gi målsignalet i trinn (e).

9. Fremgangsmåte i samsvar med krav 5, hvor markørene er posisjonert i en slik grad at idet et hybrid mellom en ikke-spaltet PTO og CTOen dannes, så gir hybridet ikke et ikke-målsignal i trinn (e).
- 5 10. Fremgangsmåte i samsvar med krav 5, hvor markørene er posisjonert i en slik grad at idet et hybrid mellom en ikke-spaltet PTO og CTOen dannes, så gir hybridet et ikke-målsignal i trinn (e); hvor T_m -verdien av den forlengete dupleks er høyere enn for hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTOen.
- 10 11. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor målsignalene er tilveiebrakt av en enkelt markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen; hvor den inkorporerte enkle markør er koplet til et nukleotid inkorporert under ekstensjonsreaksjonen; hvor smelting av den forlengete dupleks i trinn (e) induserer forandring av et signal fra enkeltmarkøren til å gi målsignalet i trinn (e).
- 15 12. Fremgangsmåte i samsvar med krav 11, hvor nukleotidet inkorporert under ekstensjonsreaksjonen har en første ikke-naturlig base og CTOen har en nukleotid som har en andre ikke-naturlig base med en spesifikk bindingsaffinitet til den første ikke-naturlige base.
- 20 13. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor målsignalet tilveiebringes av en markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen og en markør koplet til fragmentet og/eller CTOen, og hvor den inkorporerte markør er koplet til et nukleotid inkorporert under ekstensjonsreaksjonen; hvor de to markører er en interaktiv dobbeltmarkør på et reportermolekyl og et quencher molekyl; hvor smelting av den forlengete dupleks i trinn (e) induserer forandring av et signal fra den interaktive dobbeltmarkør for å gi målsignalet i trinn (e).
- 25 14. Fremgangsmåte i samsvar med krav 13, hvor nukleotidet inkorporert under ekstensjonsreaksjonen har en første ikke-naturlig base og CTOen har et nukleotid som har en andre ikke-naturlig base med en spesifikk bindingsaffinitet til den første ikke-naturlige.
- 30 15. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor oppstrøms oligonukleotid er en oppstrøms primer eller en oppstrøms probe.
- 35

16. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor oppstrøms oligonukleotid har en partielt overlappende sekvens med 3'-målporsjonen av PTOen.
- 5 17. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor fangeporsjonen omfatter ved dets 5'-endedel en nukleotidsekvens som er komplementær til en 5'-endedel av 3'-målporsjonen av PTOen.
- 10 18. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor metoden ytterligere omfatter repetering av trinnene (a)-(b), (a)-(d) eller (a)-(f) med denaturering mellom repetering av sykluser.
- 15 19. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor fremgangsmåten utføres for å detektere minst to typer målnukleinsyresekvenser; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid omfatter minst to typer oligonukleotider, PTOen omfatter minst to typer PTOer og CTOen omfatter minst én type CTOer.
- 20 20. Fremgangsmåte i samsvar med krav 19, hvor de forlengete duplekser korresponderer til de minst to typer målnukleinsyresekvenser som har forskjellige T_m -verdier fra hverandre.
21. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor nevnte enzym som har 5'-nukleaseaktivitet er en termostabil DNA-polymerase som har 5'-nukleaseaktivitet eller FEN-nuklease.
- 25 22. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor målnukleinsyresekvensen omfatter en nukleotidvariasjon.
- 30 23. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, hvor CTOen immobiliseres gjennom dets 5'-ende eller dets 3'-ende på et faststoffs substrat.
- 35 24. Fremgangsmåte i samsvar med krav 23, hvor målsignalet tilveiebringes av en enkelt markør koplet til fragmentet eller med en enkelt markør inkorporert inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen.
25. Fremgangsmåte i samsvar med et av kravene 1-24, hvor fremgangsmåten utføres i nærvær av en nedstrøms primer.

26. Fremgangsmåte i samsvar med krav 25, hvor oppstrøms oligonukleotid er en oppstrøms primer, nedstrøms primer omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens komplementær til målnukleinsyresekvensen; PTOen er lokalisert mellom oppstrøms primer og nedstrøms primer; hvor PTOen er blokkert ved dets 3'-ende for å hindre dets forlengelse og enzymet som har en 5'-nukleaseaktivitet er en templatavhengig nukleinsyrepolymerase.

27. Fremgangsmåte i samsvar med krav 26, hvor fremgangsmåten ytterligere omfatter å repetere trinnene (a)-(b), (a)-(d) eller (a)-(f) med denaturering mellom repeterende sykluser.

28. Anvendelse av et kitt for å detektere en målnukleinsyresekvens fra en DNA eller en blanding av nukleinsyrer med en PTOCE (PTO Cleavage and Extension) analyse, for anvendelse i utførelse av fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 1-27, omfattende:

(a) et oppstrøms oligonukleotid omfattende en hybridiserende nukleotidsekvens komplementær til målnukleinsyresekvensen;

(b) en PTO (Probing and Tagging Oligonukleotid) omfattende (i) en 3' målporsjon omfattende en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen og (ii) en 5' taggingporsjon omfattende en nukleotidsekvens ikke-komplementær til målnukleinsyresekvensen, hvor 3'-målporsjonen hybridiseres med målnukleinsyresekvensen og 5'-taggingporsjonen ikke-hybridiseres med målnukleinsyresekvensen; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid er lokalisert oppstrøms for PTOen; hvor nevnte oppstrøms oligonukleotid eller dets forlengete tråd induserer spalting av PTOen av et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet slik at spaltingen frigjør et fragment omfattende 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen; og

(c) en CTO (Capturing and Templating Oligonukleotid) omfattende i en 3' til 5' retning (i) en fangeporsjon omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til 5'-taggingporsjonen eller en del av 5'-taggingporsjonen av PTOen og (ii) en templatporsjon omfattende en nukleotidsekvens ikke-komplementær til 5'-taggingporsjonen og 3'-målporsjonen av PTOen; hvor fragmentet frigjort fra PTOen hybridiseres med fangeporsjonen av CTOen; og fragmentet hybridisert med fangeporsjonen av CTOen forlenges av en templatavhengig nukleinsyre polymerase for å danne en forlenget dupleks.

29. Anvendelse av et kitt i samsvar med krav 28, hvor kittet ytterligere omfatter et enzym som har 5'-nukleaseaktivitet.
30. Anvendelse av et kitt i samsvar med krav 28, hvor nevnte PTO og/eller CTO har
5 minst én markør.
31. Anvendelse av et kitt i samsvar med krav 28, hvor nevnte kitt ytterligere omfatter en markør som skal inkorporeres inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen.
- 10 32. Anvendelse av et kitt i samsvar med krav 28, hvor kittet ytterligere omfatter en markør som skal inkorporeres inn i den forlengete dupleks under ekstensjonsreaksjonen og PTOen og/eller CTOen har minst én markør.
- 15 33. Anvendelse av et kitt i samsvar med krav 28, hvor kittet ytterligere omfatter en interkalerende markør.
34. Anvendelse av et kitt i samsvar med krav 28, hvor CTOen er immobilisert gjennom dets 5'-ende eller 3'-ende til et faststoffs substrat.
- 20 35. Anvendelse av et kitt i samsvar med et av kravene 28-34, hvor kittet ytterligere omfatter en nedstrøms primer.
36. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1, karakterisert ved at trinnene (a)-(f) utføres i et reaksjonskar eller i separate reaksjonskar.
- 25

<110> Seegene, Inc.
 <120> DETECTION OF TARGET NUCLEIC ACID SEQUENCES BY PTO CLEAVAGE AND
 EXTENSION ASSAY
 <130> PP110142
 <150> 10-2011-0002840
 <151> 2011-01-11
 <150> 10-2011-0023465
 <151> 2011-03-16
 <150> PCT/KR2011/004452
 <151> 2011-06-17
 <160> 24
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> NG-T
 <400> 1
 aaatatgcga aacacgccaa tgaggggcat gatgctttct ttttgttctt gctcggcaga 60
 gcgagtgata ccgatccatt gaaaaa 86
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> NG-R
 <400> 2
 caatggatcg gtatcactcg c 21
 <210> 3
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> NG-PTO-1
 <400> 3
 acgacggctt ggctgcccct cattggcgtg tttcg 35
 <210> 4
 <211> 42

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-CTO-1

<400> 4
 cctcctcctc ctctcctcc tccagtaaag ccaagccgtc gt 42

<210> 5
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-PTO-2

<400> 5
 acgacggctt ggctttactg cccctcattg gcgtgtttcg 40

<210> 6
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-CTO-2

<400> 6
 cctcctcctc ctctcctcc tccagtaaag ccaagccgtc gt 42

<210> 7
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-PTO-3

<400> 7
 acgacggctt ggccctcat tggcgtgttt cg 32

<210> 8
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-CTO-3

<400> 8
 tttttttttt cctcctccag taaagccaag ccgtcgt 37

<210> 9

<211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-CTO-4

<400> 9
 tttttttttt ttttttttag taaagccaag ccgtcgt 37

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-F

<400> 10
 tacgcctgct actttcacgc t 21

<210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-CTO-5

<400> 11
 cctcctccag taaagccaag ccgtcgt 27

<210> 12
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-PTO-4

<400> 12
 acgacggctt gccctcatt ggcgtgtttc g 31

<210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SA-F

<400> 13
 tgttagaatt tgaacaagga tttaatc 27

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SA-R

<400> 14
 gataagttta aagcttgacc gtctg 25

<210> 15
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SA-PTO-1

<400> 15
 aatccgacca cgcattccgt ggtcaatcat tcggtttacg 40

<210> 16
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SA-CTO-1

<400> 16
 tttttttttt tttttttgca tagcgtggtc ggatt 35

<210> 17
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-PTO-5

<400> 17
 acgacggctt ggctttactg cccctcattg gcgtgtttcg 40

<210> 18
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NG-CTO-S1

<400> 18
 tttttcctcc tcctcctcct cctcctccag taaagccaag ccgtcgt 47

<210>	19	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Marker	
<400>	19	
atatatatat		10
<210>	20	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	NG-PTO-6	
<400>	20	
acgacggcctt ggctttactg cccctcattg gcgtgtttcg		40
<210>	21	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	NG-CTO-S2	
<400>	21	
cctcctcctc ctctcctcc tccagtaaag ccaagccgtc gttttttttt tt		52
<210>	22	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	SA-R2	
<400>	22	
ttagctcctg ctctaaacc a		21
<210>	23	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	SA-PTO-2	
<400>	23	
aatccgacca cgctatgctc attccgtggc caatcattcg gtttacg		47

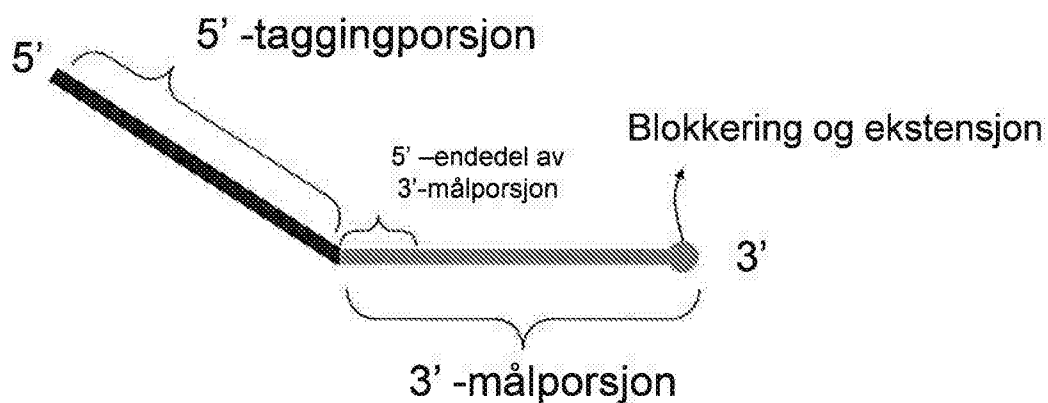
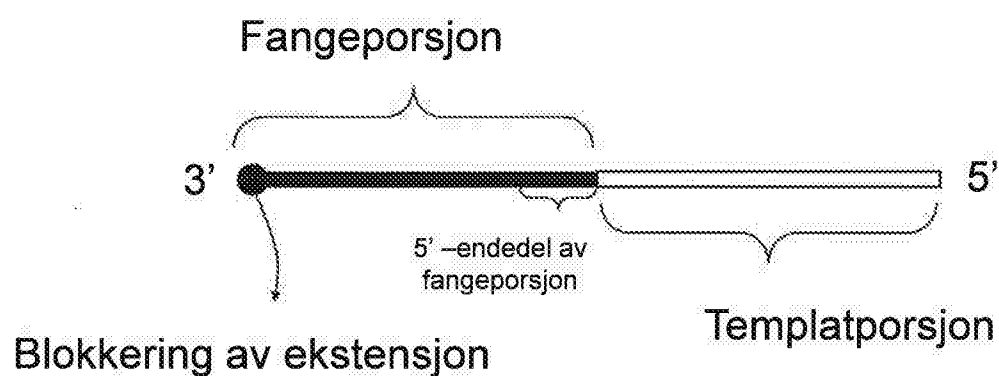
<210> 24
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SA_CTO-S1

<400> 24
ttttttcttct tttttttctt cttttttcttc ccccagcata gcgtggtcgg att

53

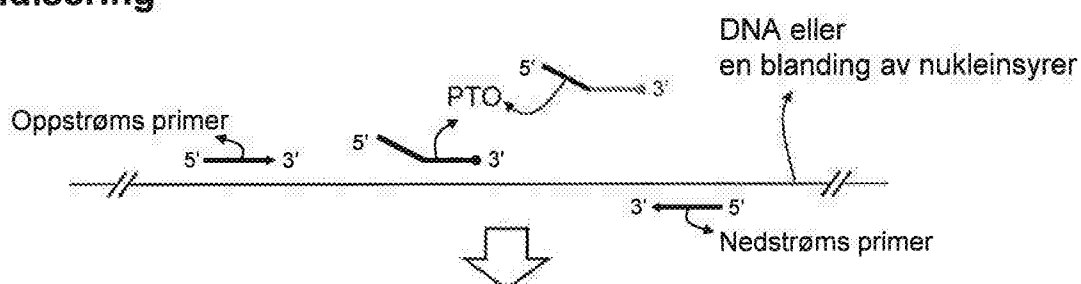
1/30

Fig. 1**A. Probe- og tagging oligonukleotid (PTO)****B. Fange- og templat oligonukleotid (CTO)**

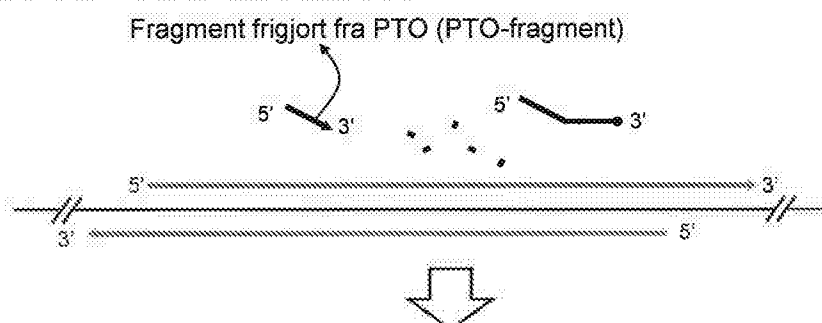
2/30

Fig. 2

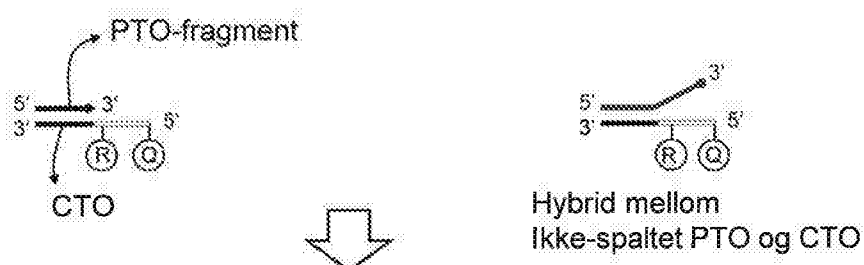
A. Hybridisering



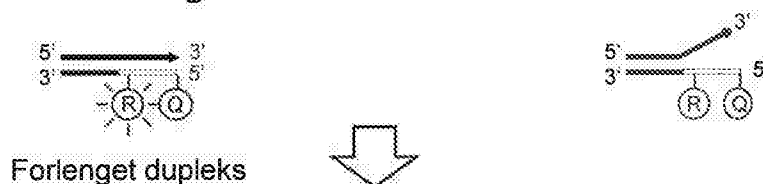
B. Primerekstensjon & spalting av PTO



C. Hybridisering av PTO fragment til CTO



D. Ekstensjon av PTO-fragment



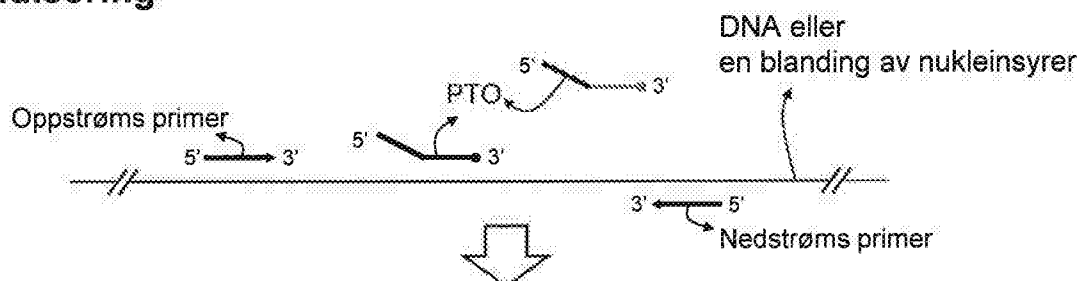
E. Smelteanalyser



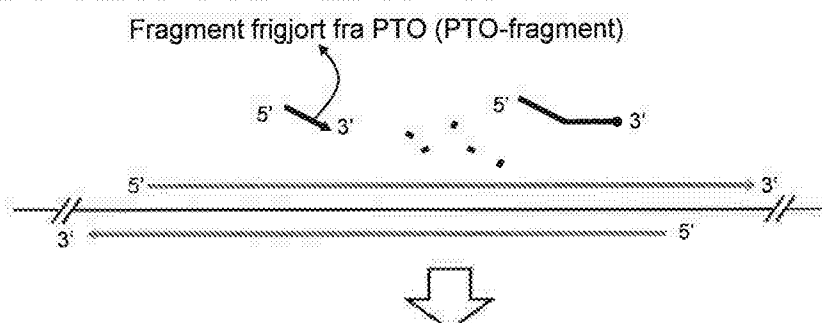
3/30

Fig. 3

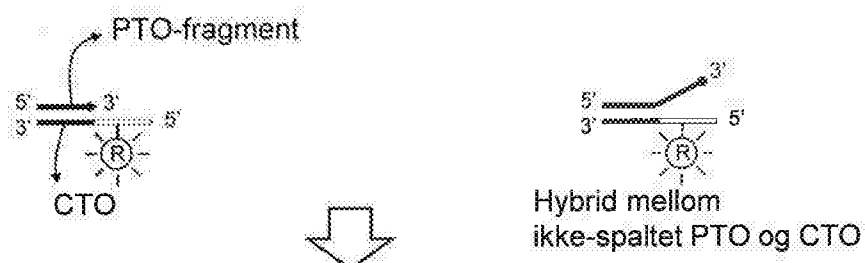
A. Hybridisering



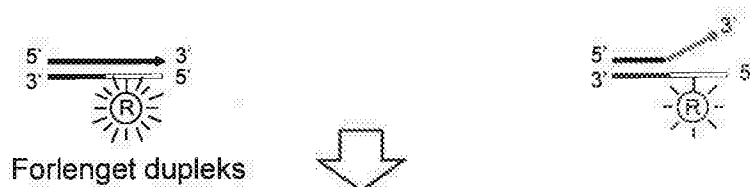
B. Primerekstensjon & spalting av PTO



C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO



D. Ekstensjon av PTO-fragment



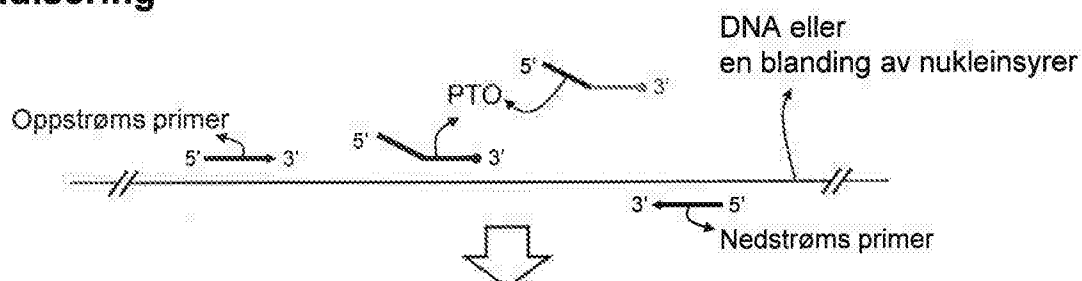
E. Smelteanalyser



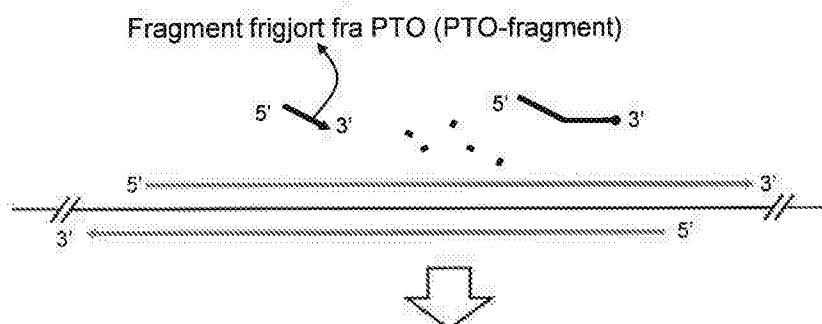
4/30

Fig. 4

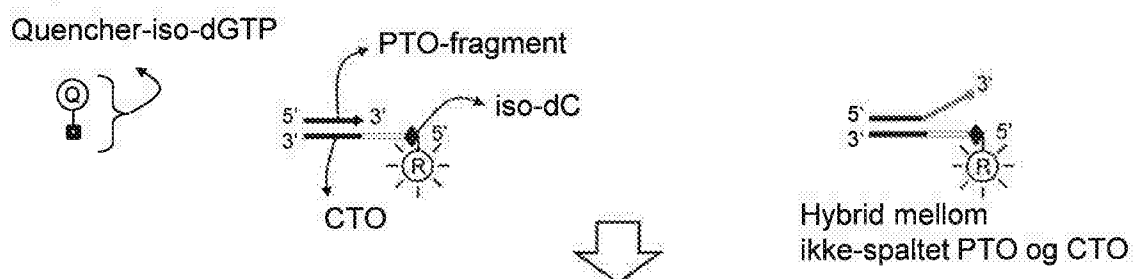
A. Hybridisering



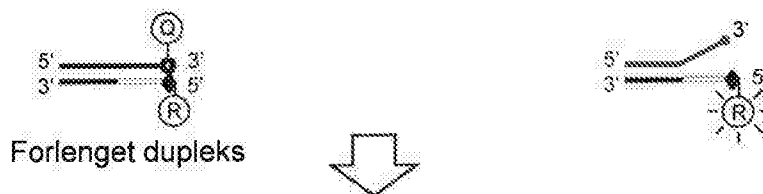
B. Primerekstensjon & spalting av PTO



C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO



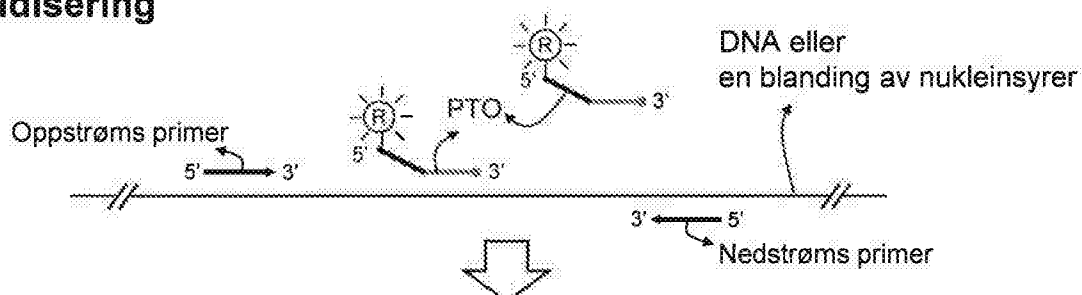
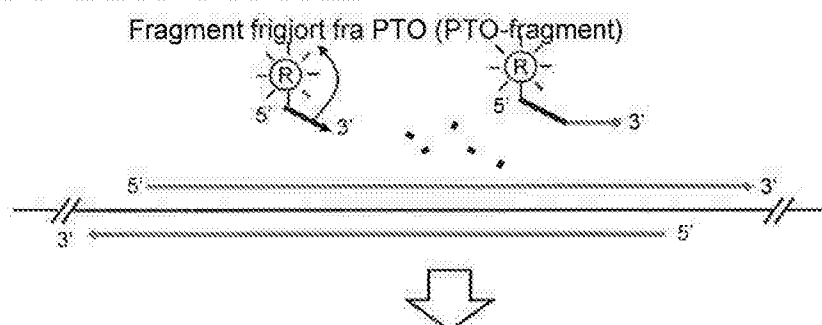
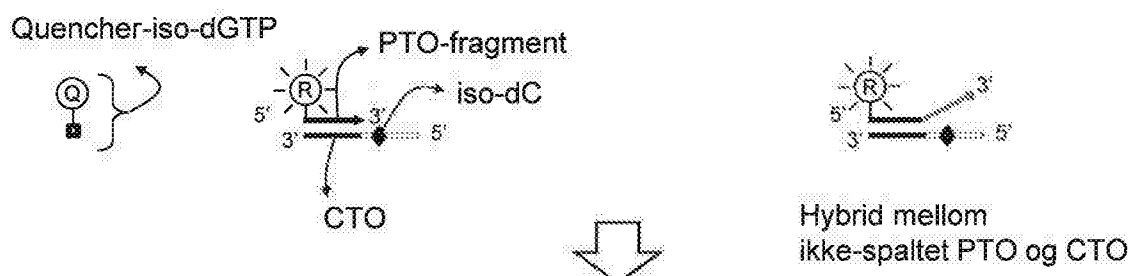
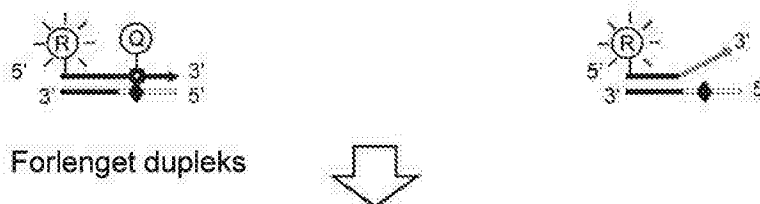
D. Ekstensjon av PTO-fragment



E. Smelteanalyser



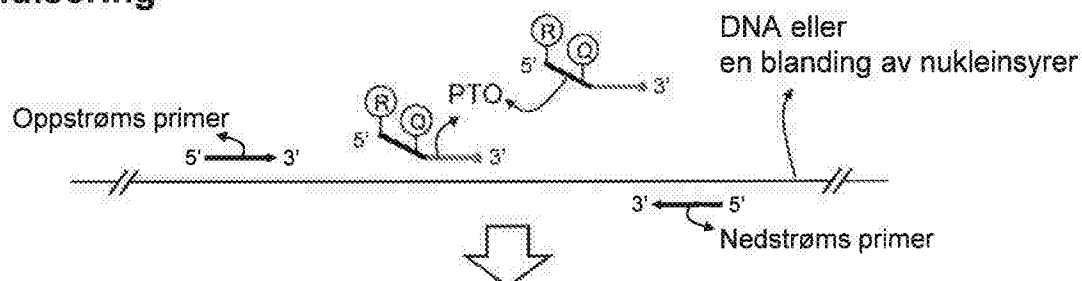
5/30

Fig. 5**A. Hybridisering****B. Primerekstensjon & spalting av PTO****C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO****D. Ekstensjon av PTO-fragment****E. Smelteanalyser**

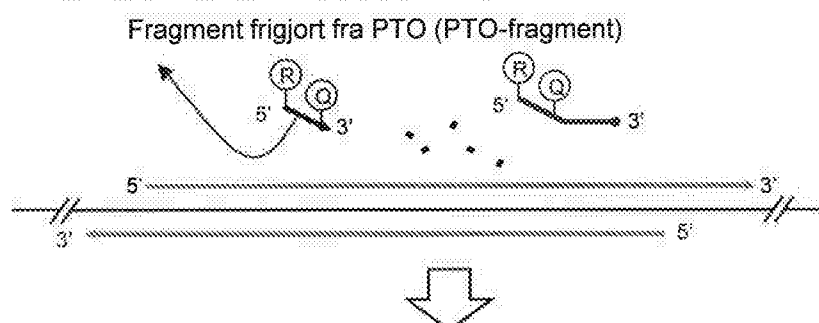
6/30

Fig. 6

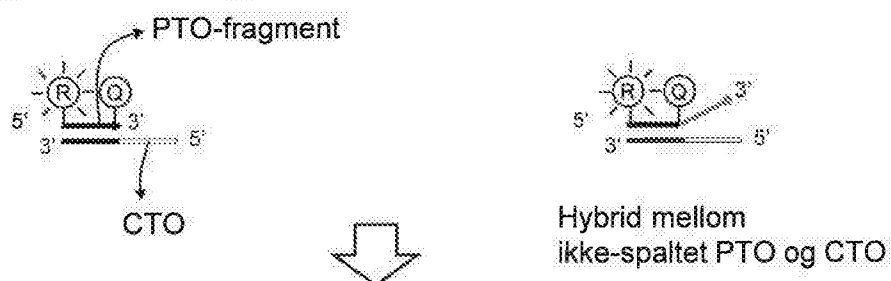
A. Hybridisering



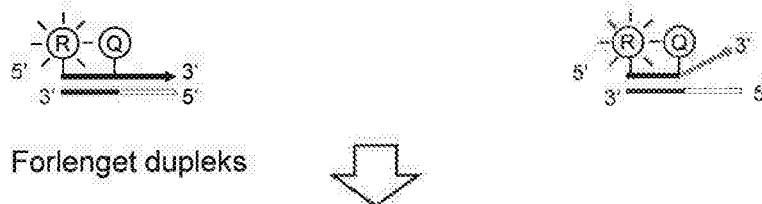
B. Primerekstensjon & spalting av PTO



C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO



D. Ekstensjon av PTO-fragment



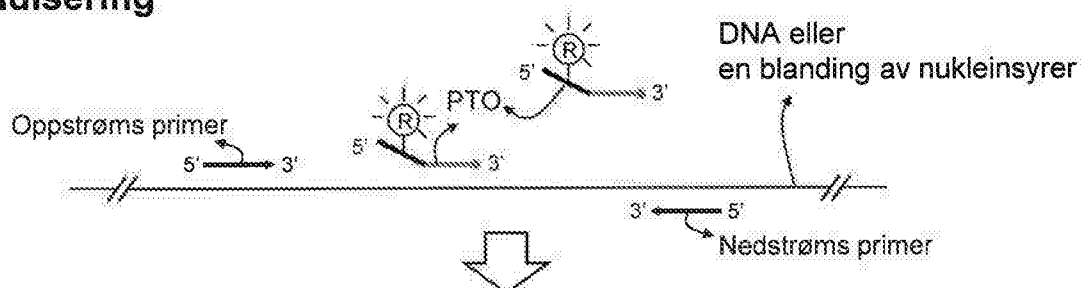
E. Smelteanalyser



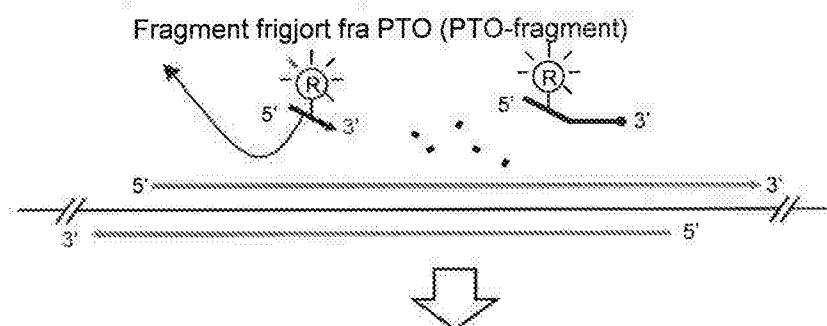
7/30

Fig. 7

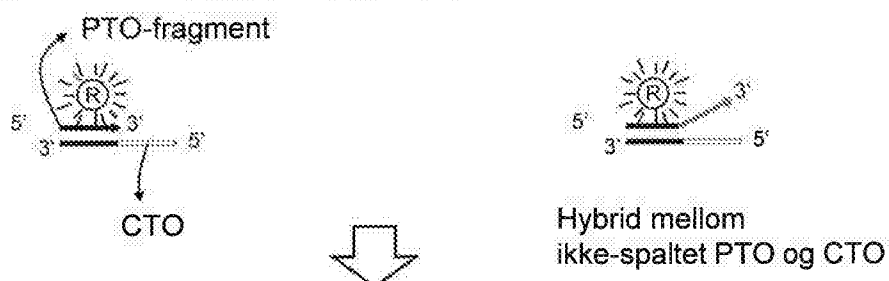
A. Hybridisering



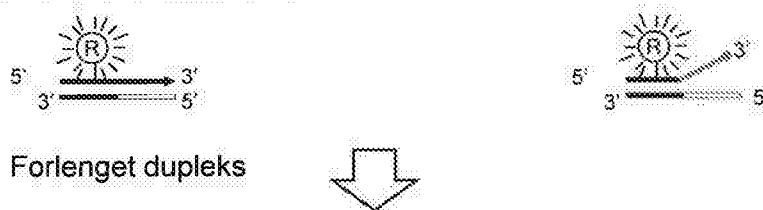
B. Primerekstensjon & spalting av PTO



C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO



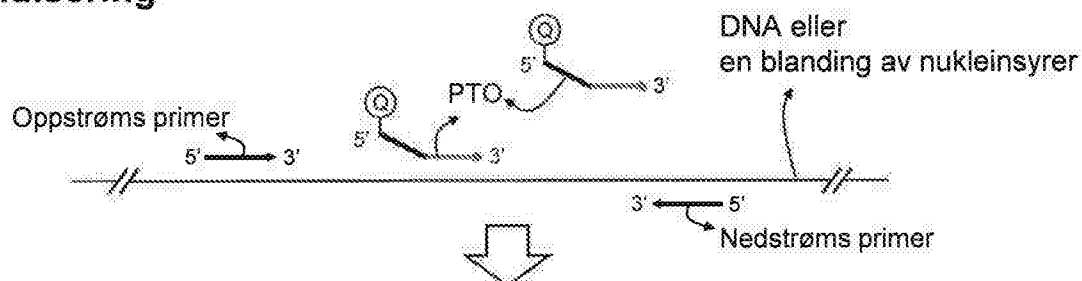
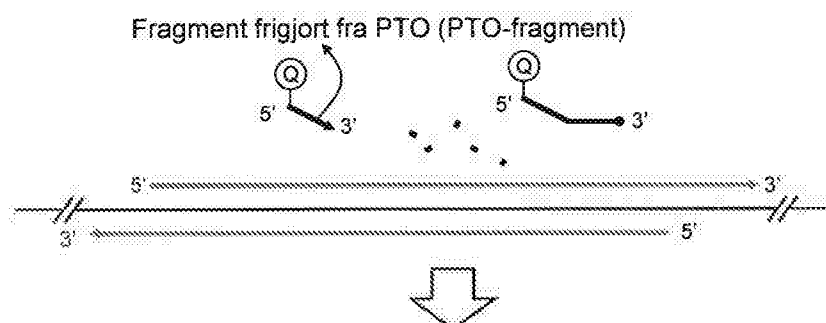
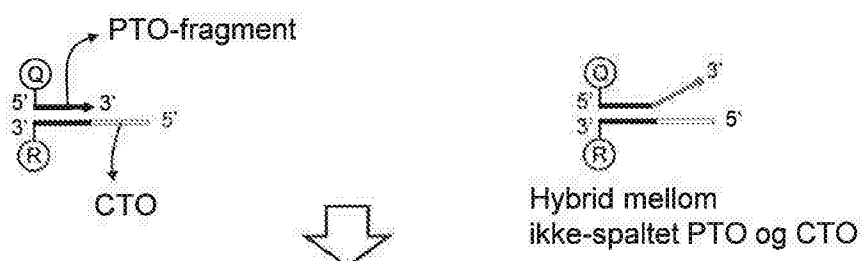
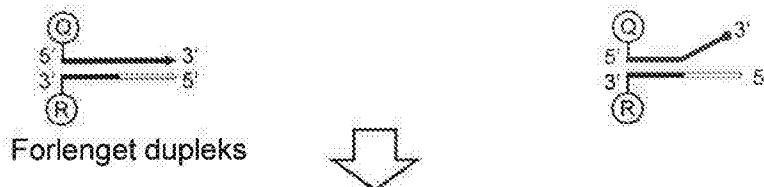
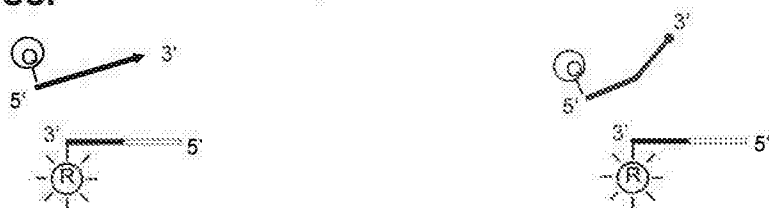
D. Ekstensjon av PTO-fragment



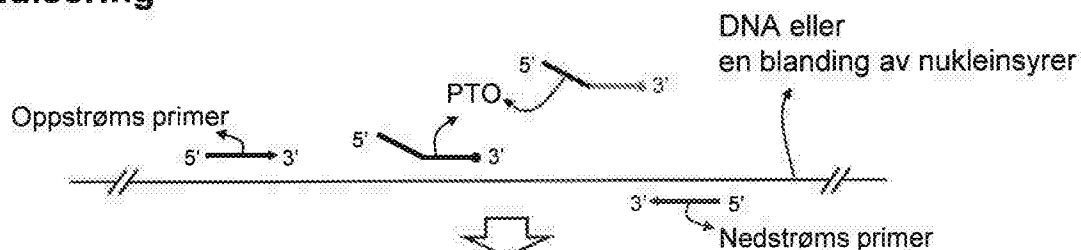
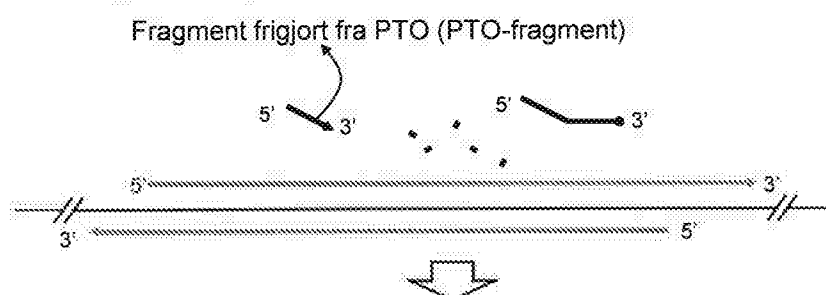
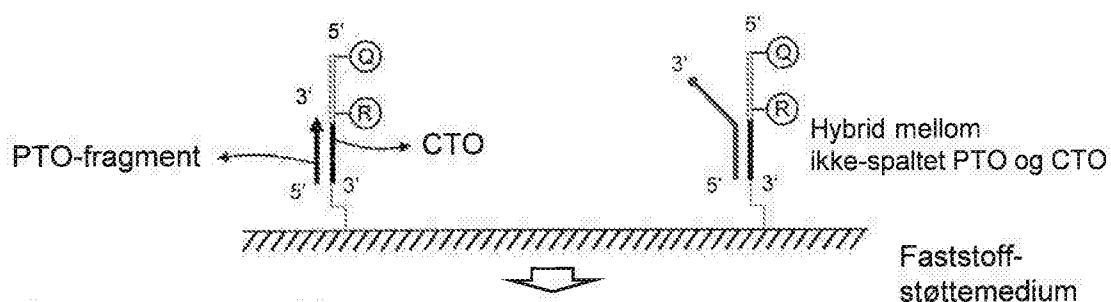
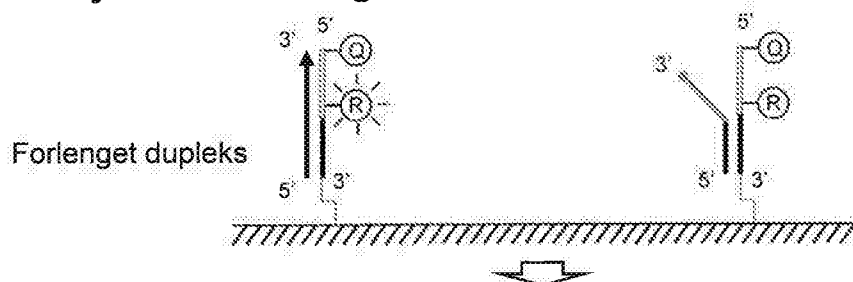
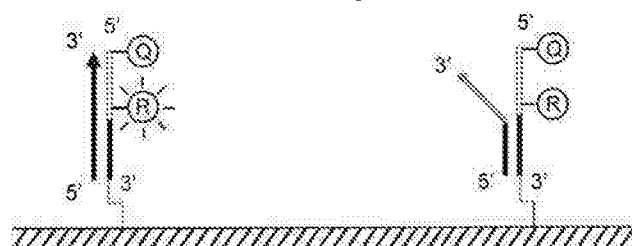
E. Smelteanalyser



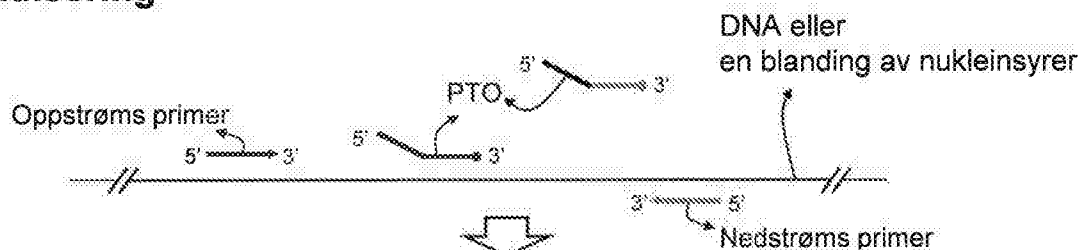
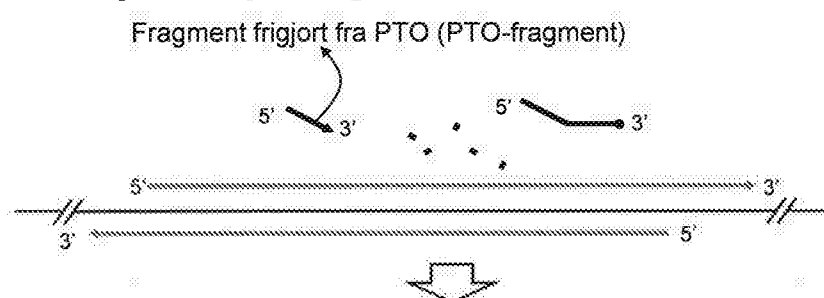
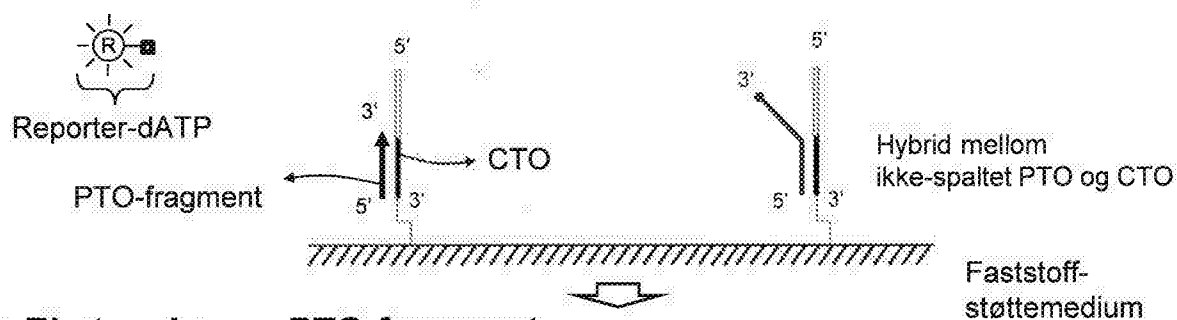
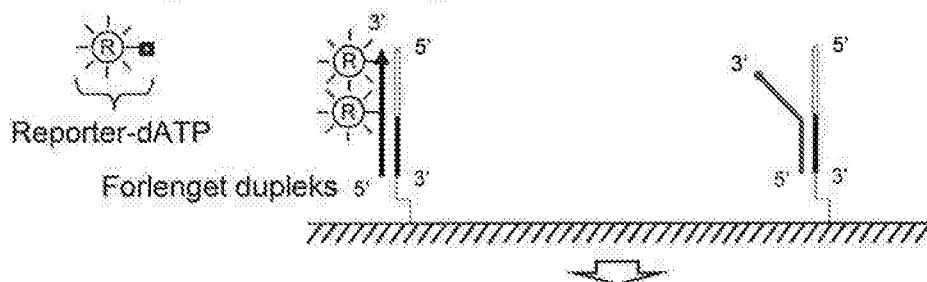
8/30

Fig. 8**A. Hybridisering****B. Primerekstensjon & spalting av PTO****C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO****D. Ekstensjon av PTO-fragment****E. Smelteanalyser**

9/30

Fig. 9**A. Hybridisering****B. Primerekstensjon & spalting av PTO****C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO****D. Ekstensjon av PTO-fragment****E. Deteksjon ved en forutbestemt temperatur**

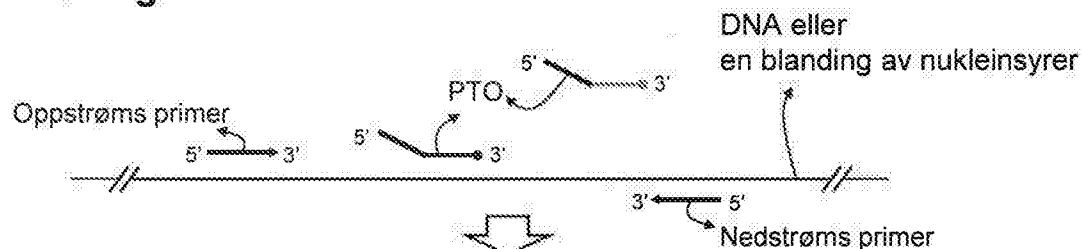
10/30

Fig. 10**A. Hybridisering****B. Primerekstensjon & spalting av PTO****C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO****D. Ekstensjon av PTO-fragment****E. Deteksjon ved en forutbestemt temperatur**

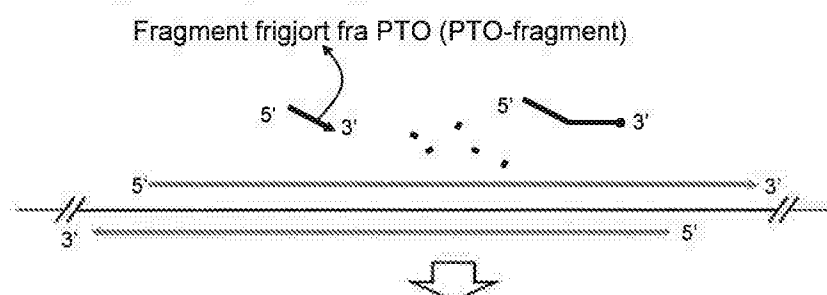
11/30

Fig. 11

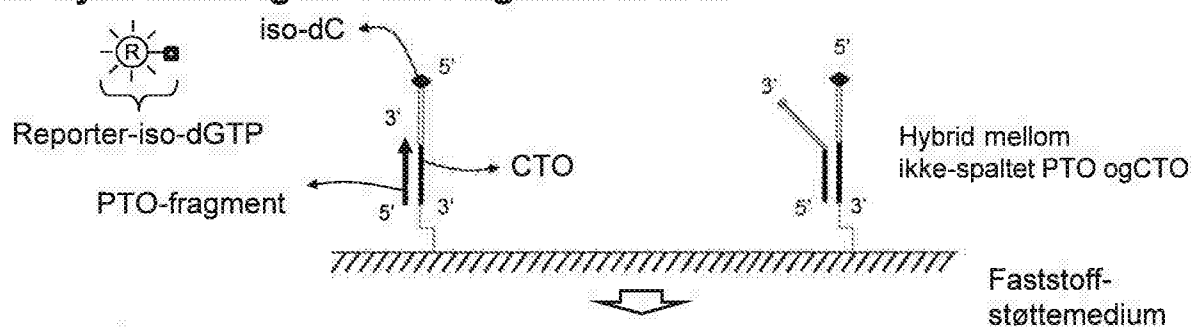
A. Hybridisering



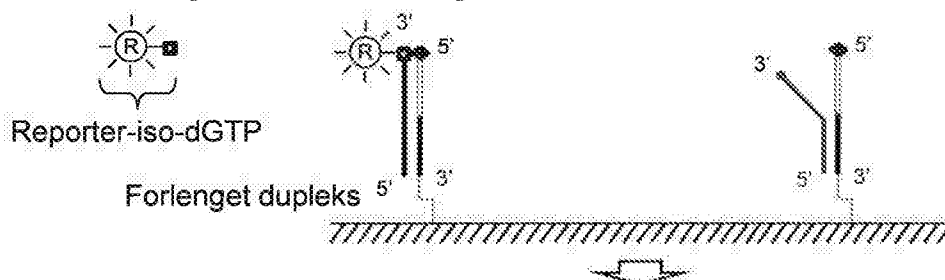
B. Primerekstensjon & spalting av PTO



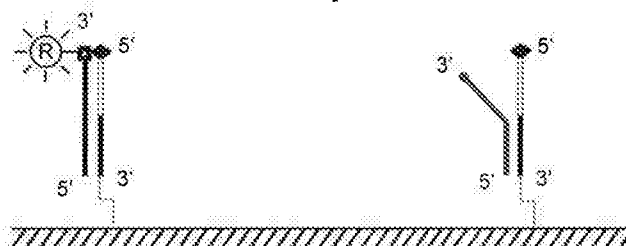
C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO



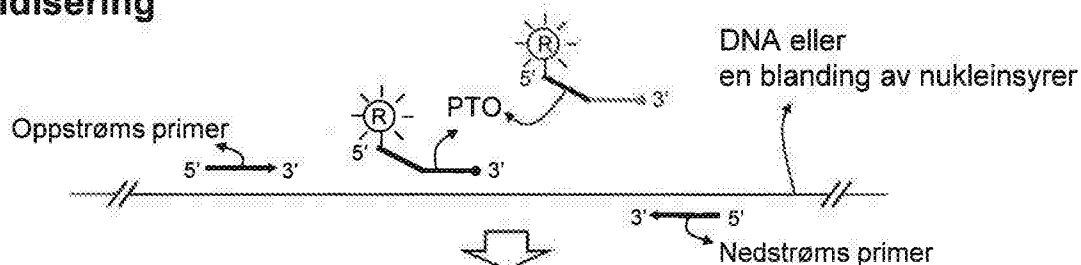
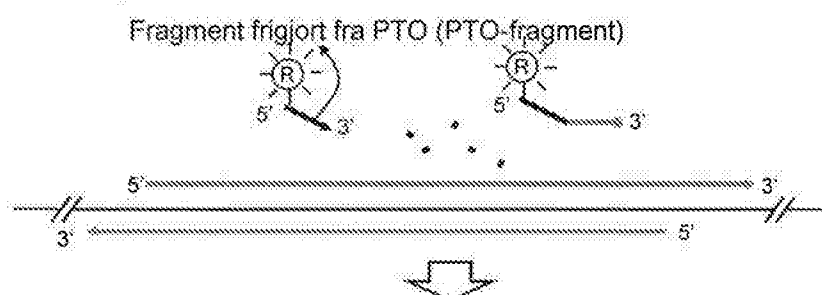
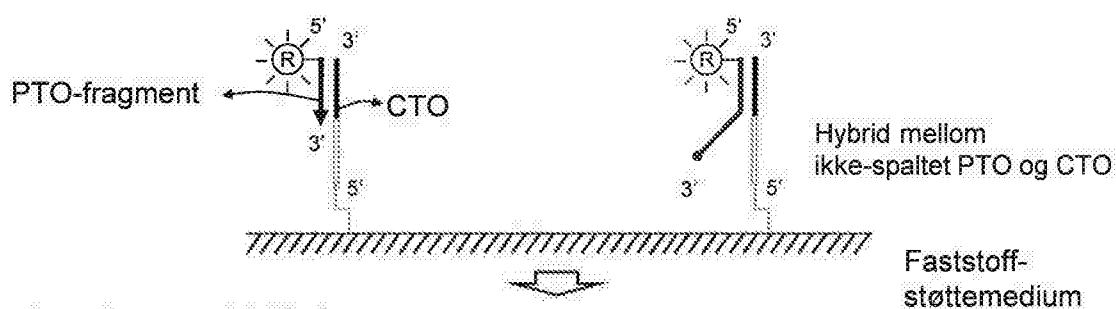
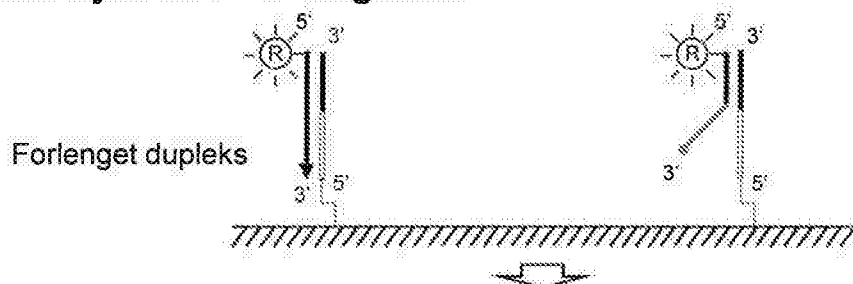
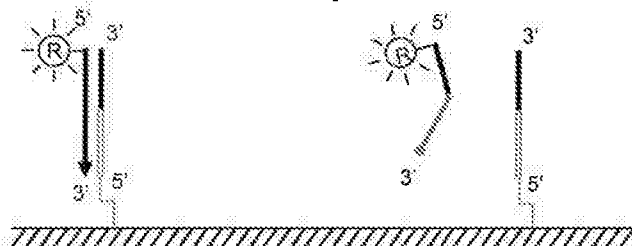
D. Ekstension av PTO-fragment



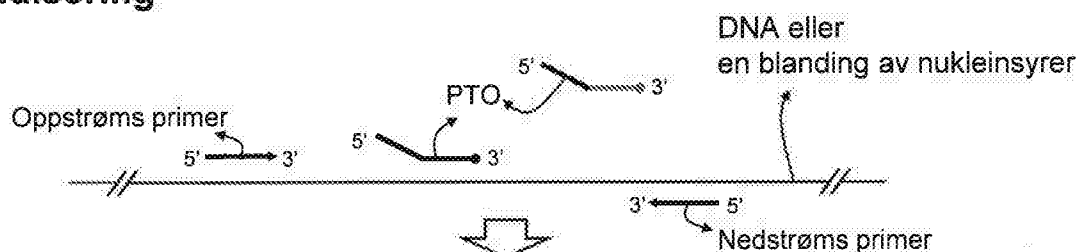
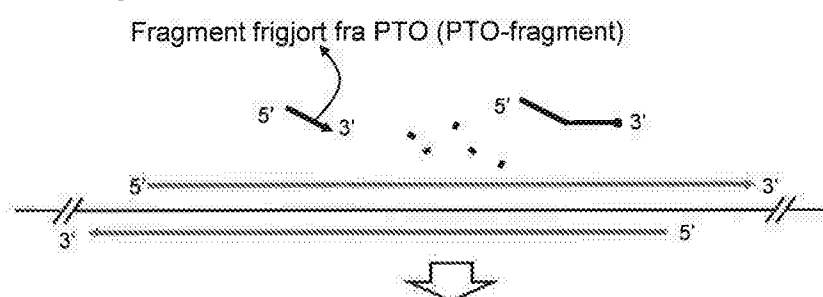
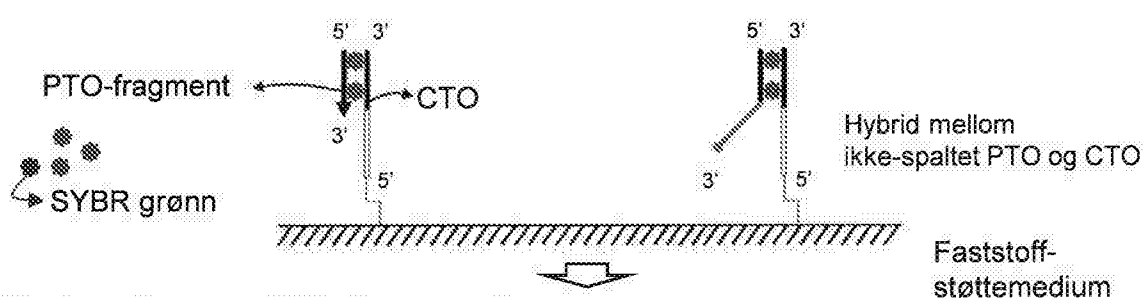
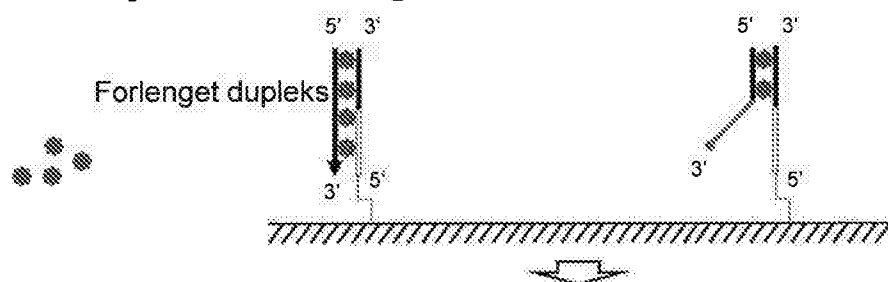
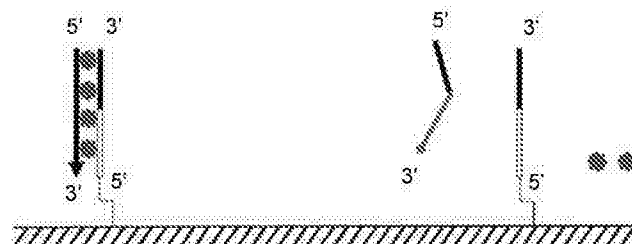
E. Deteksjon av en forutbestemt temperatur



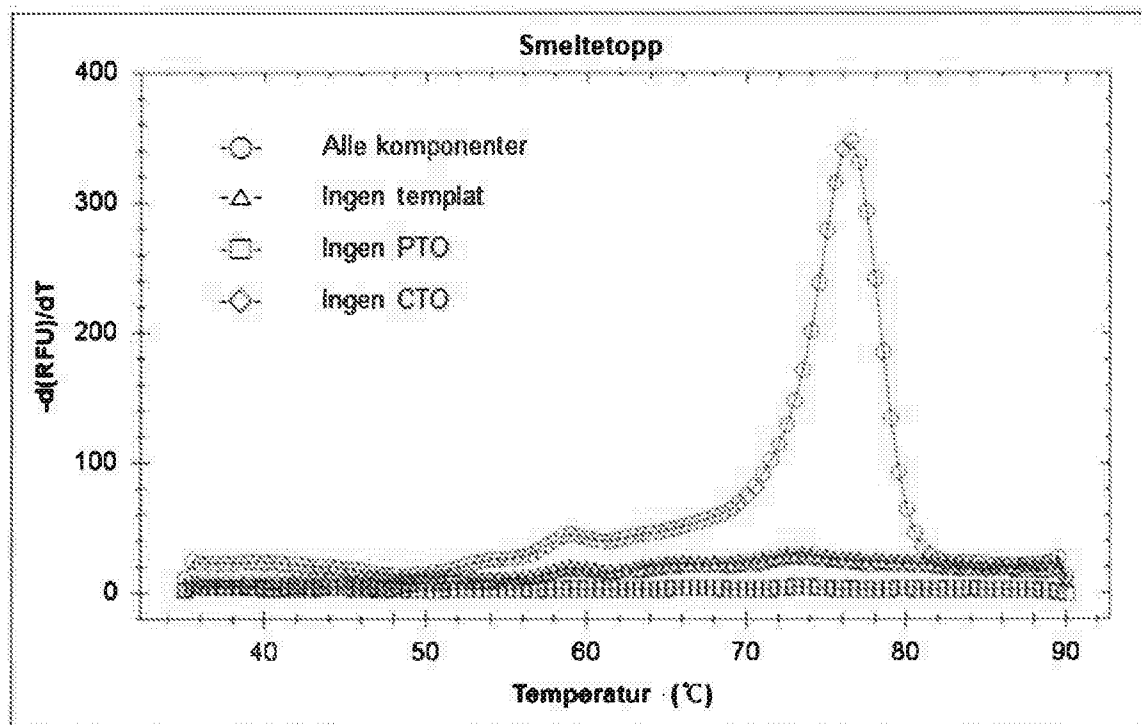
12/30

Fig. 12**A. Hybridisering****B. Primerekstensjon & spalting av PTO****C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO****D. Ekstensjon av PTO-fragment****E. Deteksjon av en forutbestemt temperatur**

13/30

Fig. 13**A. Hybridisering****B. Primerekstensjon & spalting av PTO****C. Hybridisering av PTO-fragment til CTO****D. Ekstensjon av PTO-fragment****E. Deteksjon ved en forutbestemt temperatur**

14/30

Fig. 14

Templat ¹⁾	Oppstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C)	
				Mål ⁴⁾	Ikke-mål ⁵⁾
+	+	+	+	76,5	-
-	+	+	+	-	-
+	+	-	+	-	-
+	+	+	-	-	-

¹⁾ Templat er et syntetisk oligonukleotid for *Neisseria gonorrhoeae* gen.

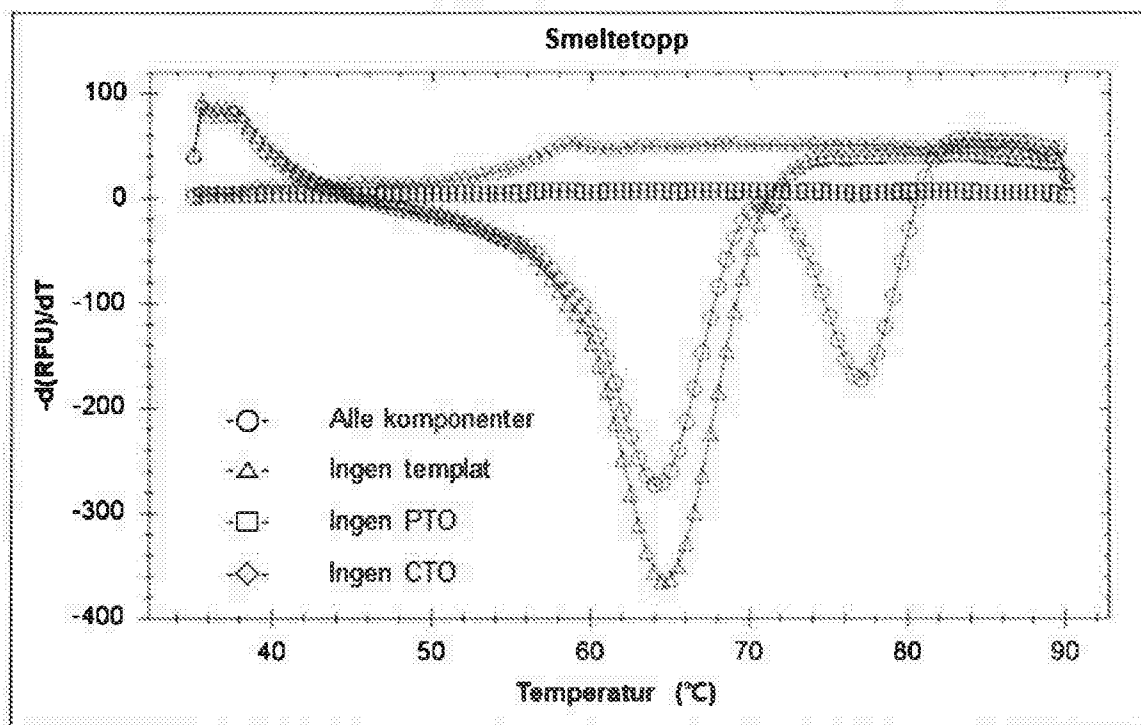
²⁾ PTO har ingen markør.

³⁾ CTO har en quencher og en fluorescens reportermolekyl i templatporsjonen.

⁴⁾ Mål representerer et målsignal som er T_m av den forlengete dupleks.

⁵⁾ Ikke-mål representerer en ikke-målsignal som er T_m av hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTO.

15/30

Fig. 15

Templat ¹⁾	Oppstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C)	
				Mål ⁴⁾	Ikke-mål ⁵⁾
+	+	+	+	77,0	64,0
-	+	+	+	-	64,5
+	+	-	+	-	-
+	+	+	-	-	-

¹⁾ Templat er et syntetisk oligonukleotid for *Neisseria gonorrhoeae* gene.

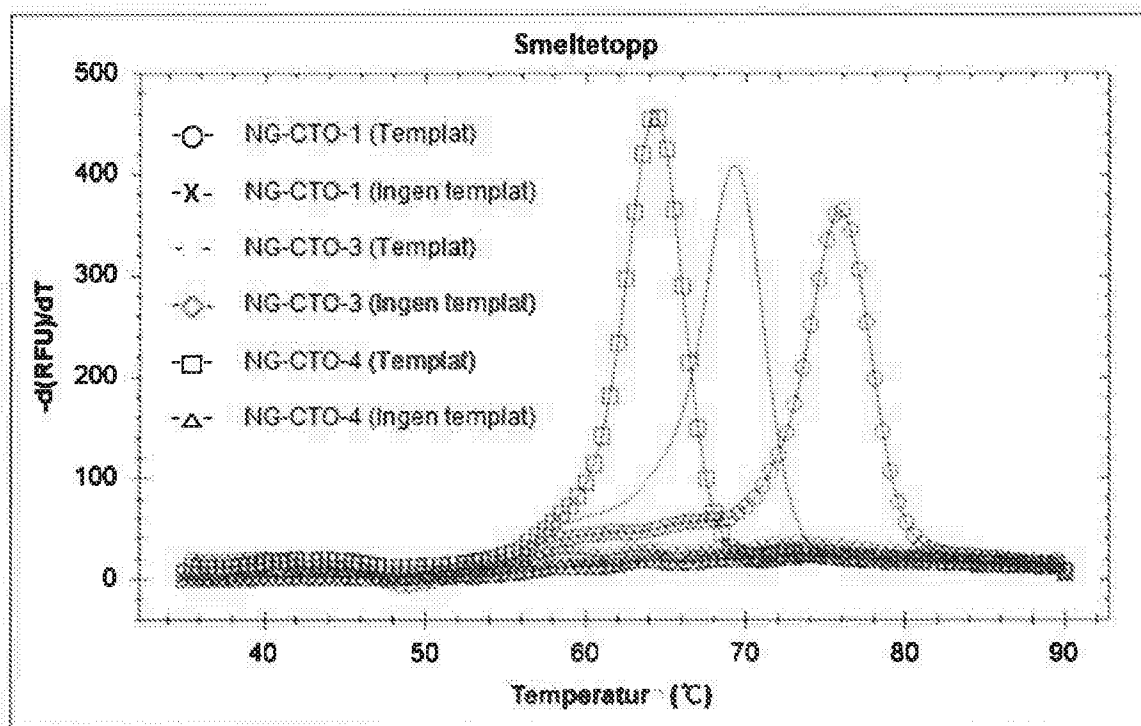
²⁾ PTO har en quencher-molekyl ved sin 5'-ende.

³⁾ CTO har en fluorescens reporter-molekyl ved sin 3'-ende.

⁴⁾ Mål representerer et målsignal som er T_m av den forlengete dupleks.

⁵⁾ Ikke-mål representerer en ikke-målsignal som er T_m av hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTO.

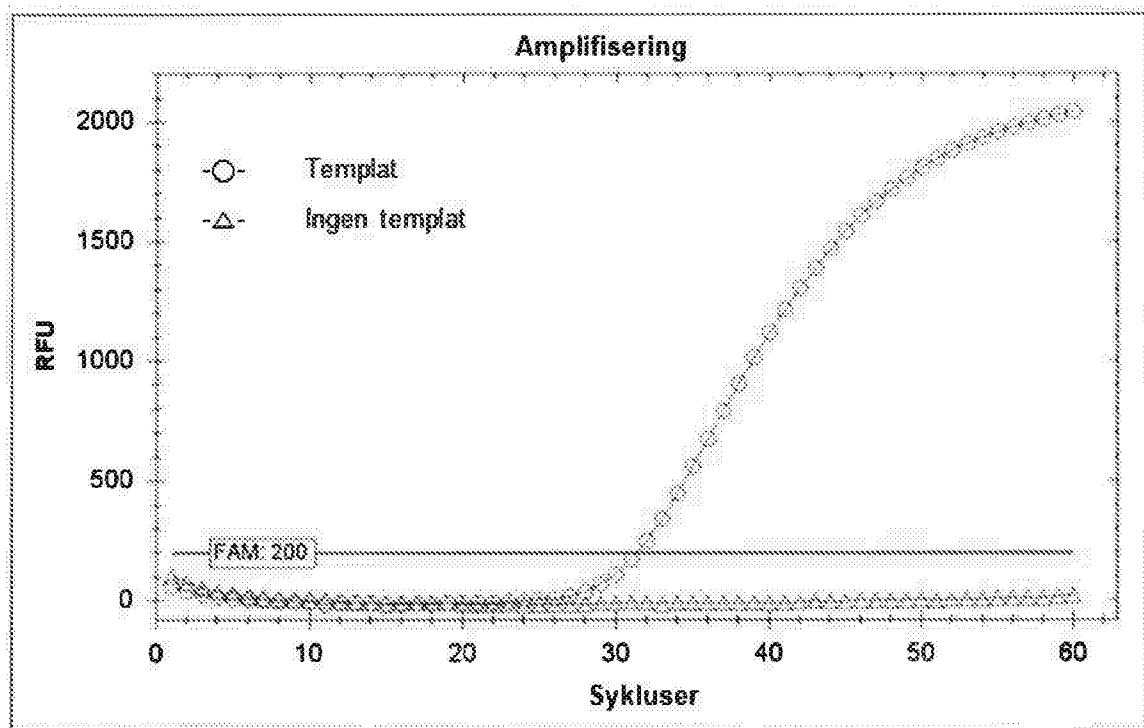
16/30

Fig. 16

Templat ¹⁾	Oppstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C) ⁴⁾
+	+	+	NG-CTO-1	76,0
-	+	+	NG-CTO-1	-
+	+	+	NG-CTO-3	69,0
-	+	+	NG-CTO-3	-
+	+	+	NG-CTO-4	64,5
-	+	+	NG-CTO-4	-

- 1) Templat er et syntetisk oligonukleotid for *Neisseria gonorrhoeae* gene.
- 2) PTO har ingen markør.
- 3) CTO har en quencher og en fluorescens reportermolekyl i templatporsjonen. Tre CTOer har tre forskjellige sekvenser i sine templatporsjoner.
- 4) T_m representerer smeltetemperatur av den forlengete dupleks.

17/30

Fig. 17A

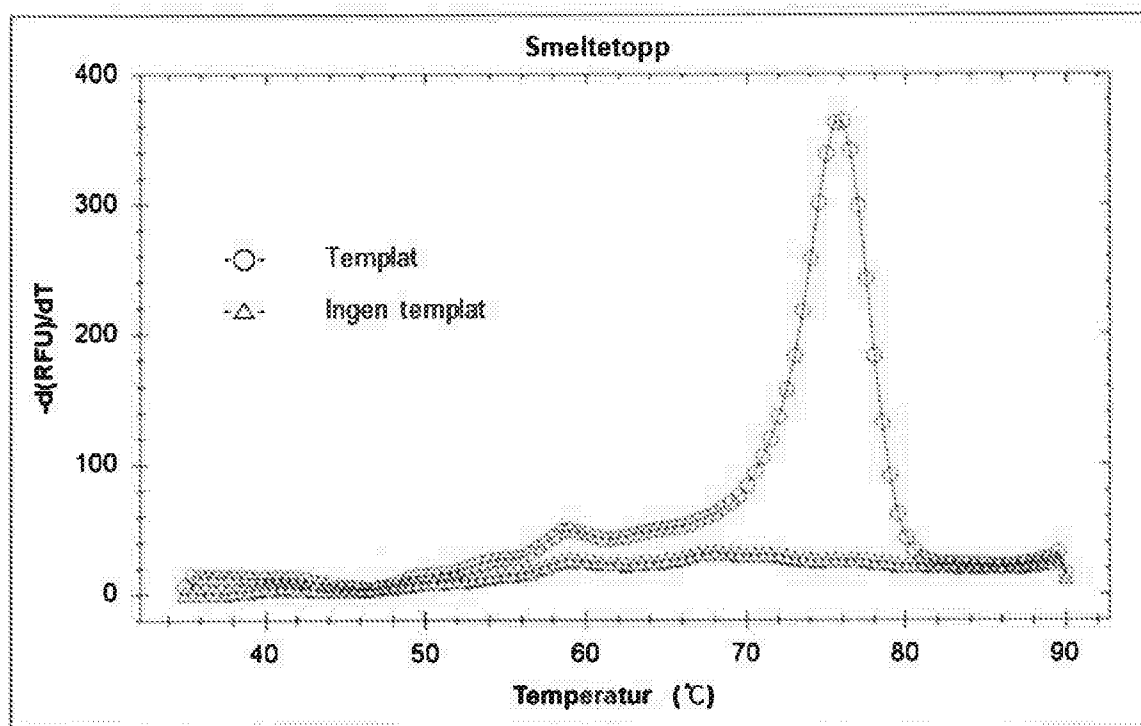
Templat ¹⁾	Oppstrøms primer	Nedstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	31,36
-	+	+	+	+	-

¹⁾ Template er en genomisk DNA fra *Neisseria gonorrhoeae*.

²⁾ PTO har ingen markør.

³⁾ CTO har en quencher og en fluorescens reportermolekyl i templatporsjonen.

18/30

Fig. 17B

Templat ¹⁾	Oppstrøms primer	Nedstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C) ⁴⁾
+	+	+	+	+	76,0
-	+	+	+	+	-

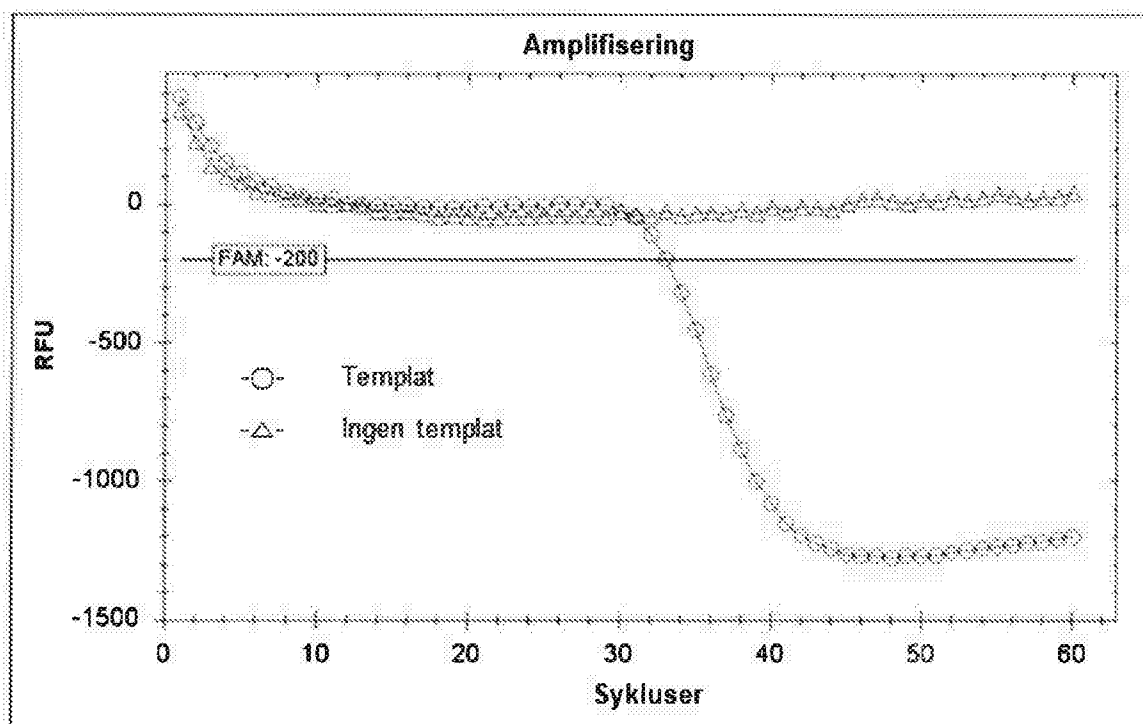
¹⁾ Templat er en genomisk DNA av *Neisseria gonorrhoeae*.

²⁾ PTO har ingen markør.

³⁾ CTO har en quencher og en fluorescens reportermolekyl i templatporsjonen.

⁴⁾ T_m representerer smeltetemperatur av den forlengete dupleks.

19/30

Fig. 18A

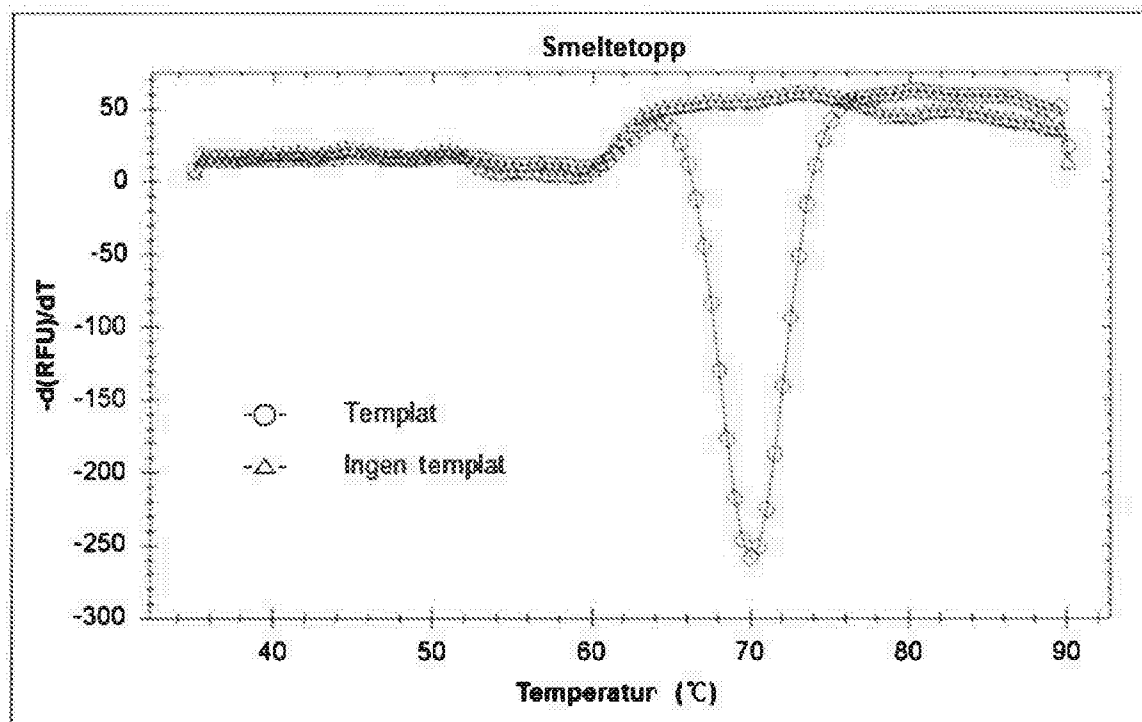
Templat ¹⁾	Oppstrøms Primer	Nedstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	33,03
-	+	+	+	+	-

¹⁾ Templat er en genomisk DNA av *Neisseria gonorrhoeae*.

²⁾ PTO har ingen markør.

³⁾ CTO har en ikke-naturlig nukleotid (iso-dC) merket med et fluorescens reportermolekyl ved sin 5'-ende.

20/30

Fig. 18B

Templat ¹⁾	Oppstrøms Primer	Nedstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm(°C) ⁴⁾
+	+	+	+	+	70,0
-	+	+	+	+	-

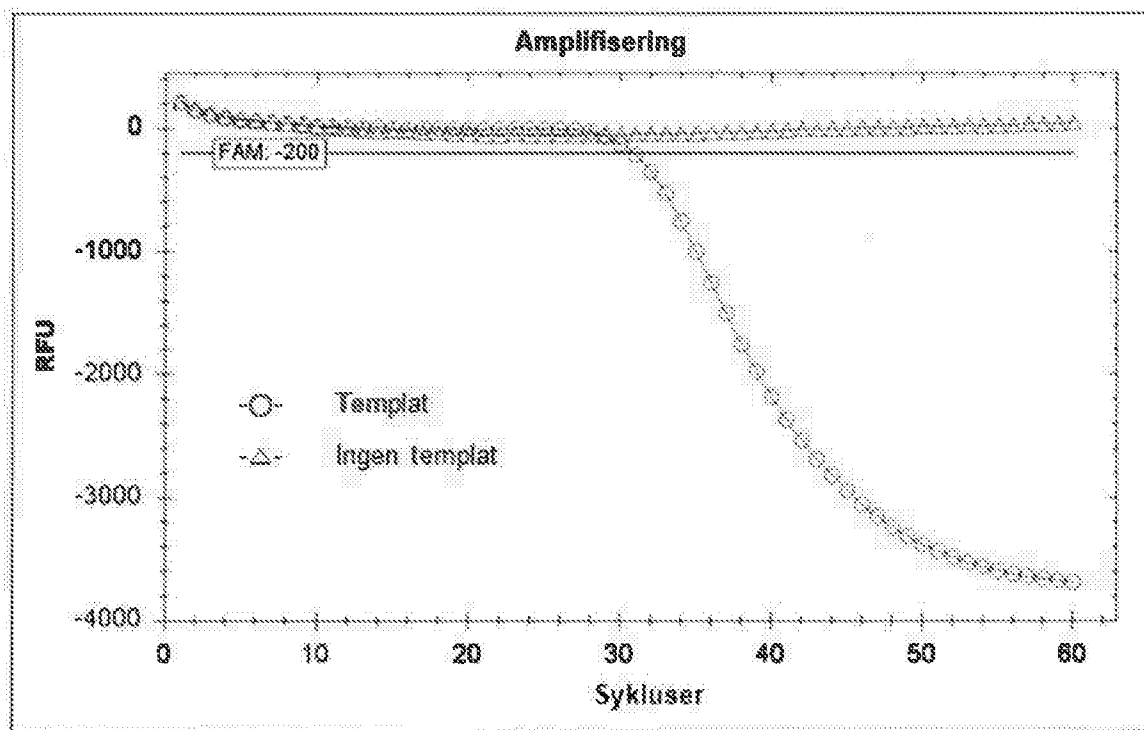
¹⁾ Template er en genomisk DNA av *Neisseria gonorrhoeae*.

²⁾ PTO har ingen markør.

³⁾ CTO har en ikke-naturlig nukleotid (iso-dC) og en fluorescens reportermolekyl ved sin 5'-ende.

⁴⁾ Tm representerer smeltetemperatur av den forlengete dupleks.

21/30

Fig. 19A

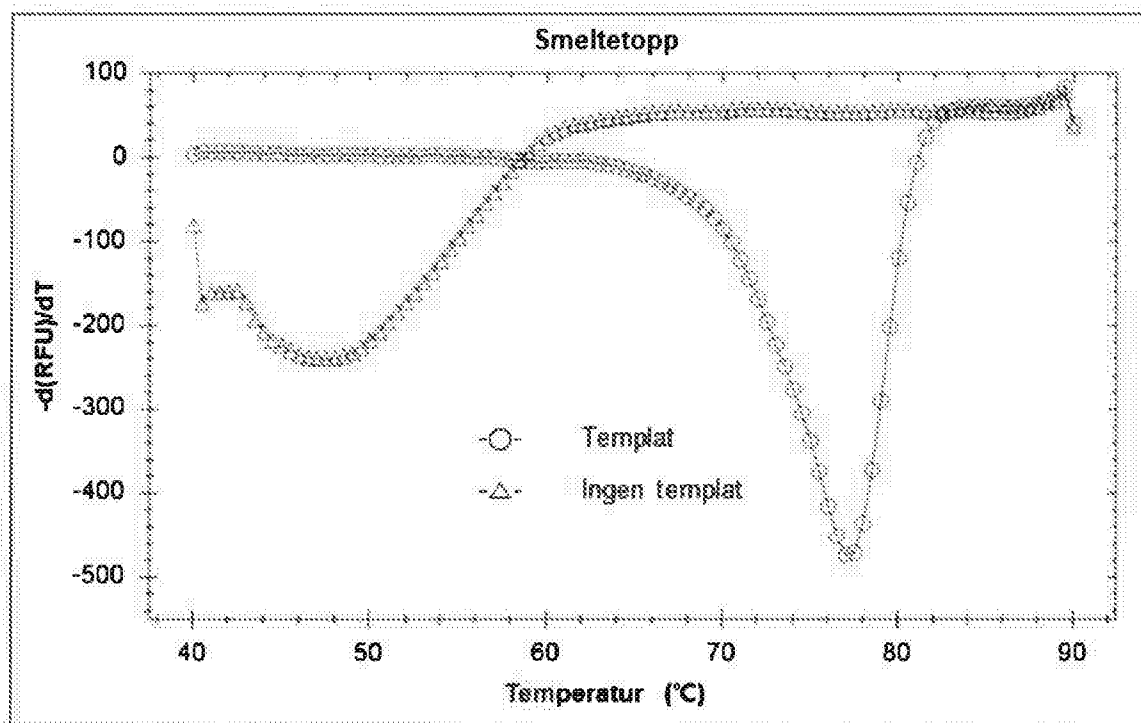
Templat ¹⁾	Oppstrøms primer	Nedstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	29,79
-	+	+	+	+	-

¹⁾ Templat er en genomisk DNA fra *Neisseria gonorrhoeae*.

²⁾ PTO har en quencher molekyl ved sin 5'-ende.

³⁾ CTO har en fluorescens reporter molekyl ved sin 3'-ende.

22/30

Fig. 19B

Templat ¹⁾	Oppstrøms primer	Nedstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C)	
					Mål ⁴⁾	Ikke-mål ⁵⁾
+	+	+	+	+	76,5	-
-	+	+	+	+	-	48,0

1) Templat er en genomisk DNA fra *Neisseria gonorrhoeae*.

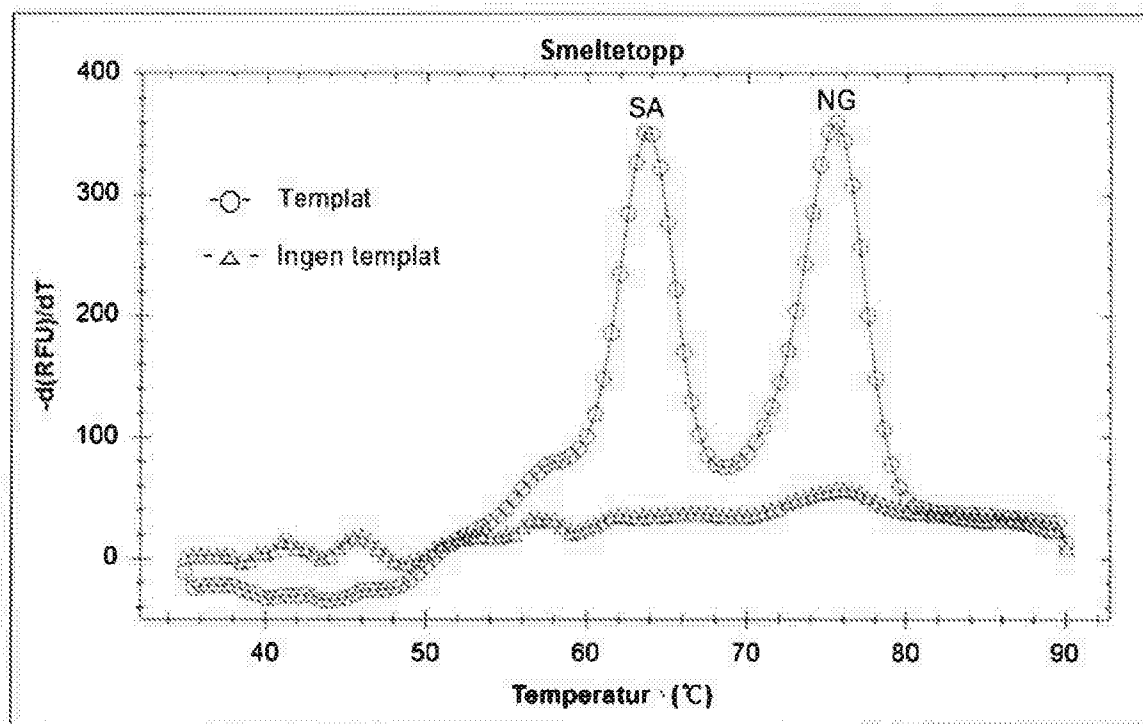
2) PTO har en quencher-molekyl ved 5'-ende.

3) CTO har en fluorescens reporter-molekyl ved sin 3'-ende.

4) Mål representerer et målsignal som er T_m av den forlengete dupleks.

5) Ikke-mål representerer et ikke-mål signal som er T_m av hybridet mellom ikke-spaltet PTO og CTO.

23/30

Fig. 20

Templater ¹⁾	primer	Nedstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C) ⁴⁾
NG and SA	+	+	+	+	75,5 and 63,5
-	+	+	+	+	-

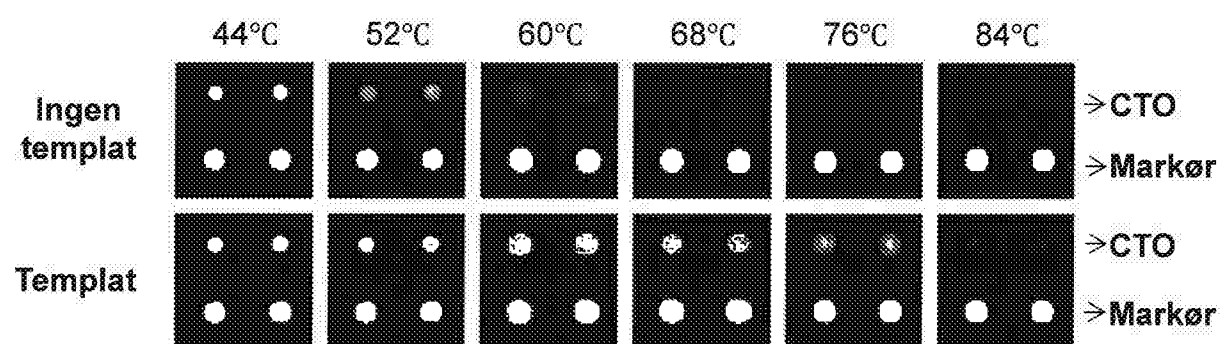
¹⁾ Templater er genomisk DNA fra *Neisseria gonorrhoeae* (NG) og *Staphylococcus aureus* (SA).

²⁾ PTO har ingen markør.

³⁾ CTO har en quencher molekyl og en fluorescens reportermolekyl i templatporsjonen. CTOer for NG og SA har samme type fluorescens reportermolekyl (FAM).

⁴⁾ Tm representerer smeltetemperatur av den forlengete dupleks.

24/30

Fig. 21A**Fluorescensbilde avhengig av temperaturen på mikroarray**

25/30

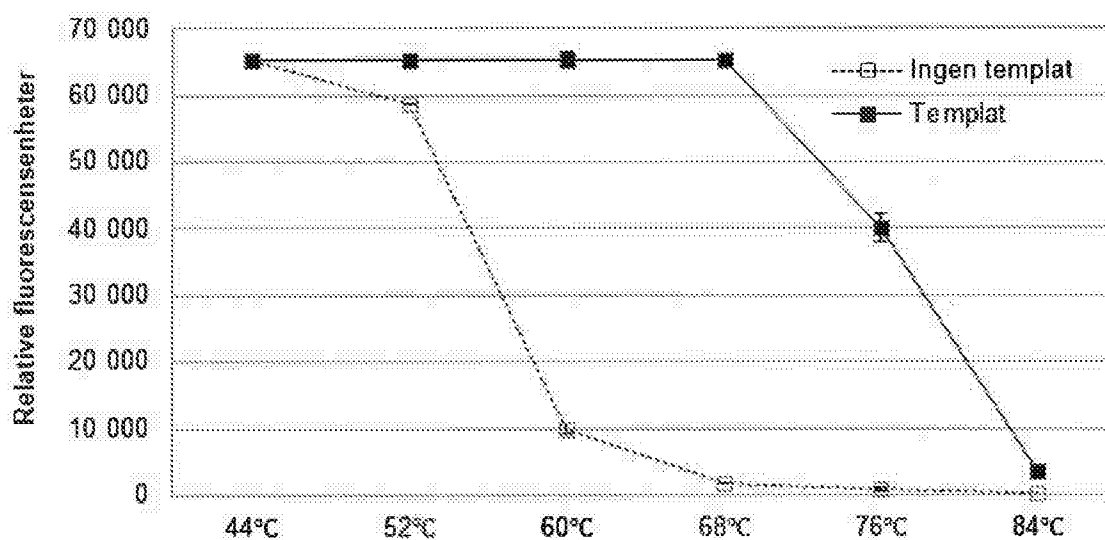
Fig. 21B**Fluorescensintensitet avhengig av temperaturen på mikroarray**

Templat ¹⁾	Oppstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Relative fluorescensenheter					
				44°C	52°C	60°C	68°C	76°C	84°C
-	+	+	+	65.438 (±1,4)	58.761 (±2.249,3)	9.989 (±473,1)	1.728 (±188,1)	862 (±184,6)	303 (±82,7)
+	+	+	+	65.434 (±3,5)	65.424 (±11,3)	65.397 (±9,9)	65.393 (±12,7)	40.184 (±3.297,9)	3.490 (±246,8)

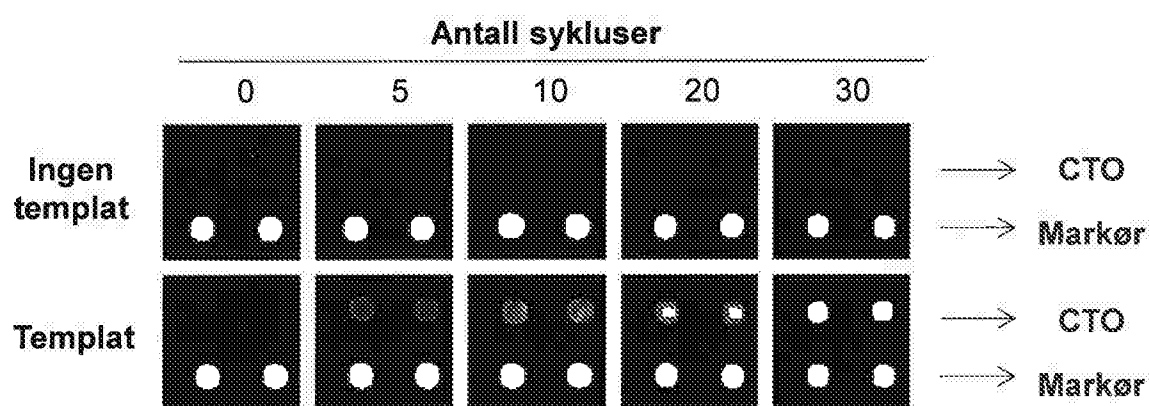
1) Templat er syntetisk oligonukleotid for *Neisseria gonorrhoeae* gen.

2) PTO har en fluorescens reportermolekyl ved sin 5'-ende.

3) CTO er immobilisert på overflaten av faststoffs substratet med anvendelse av en aminogruppe ved dets 5'-ende.



26/30

Fig. 22A**Fluorescensbilde avhengig av syklusnummer på mikroarray**

27/30

Fig. 22B

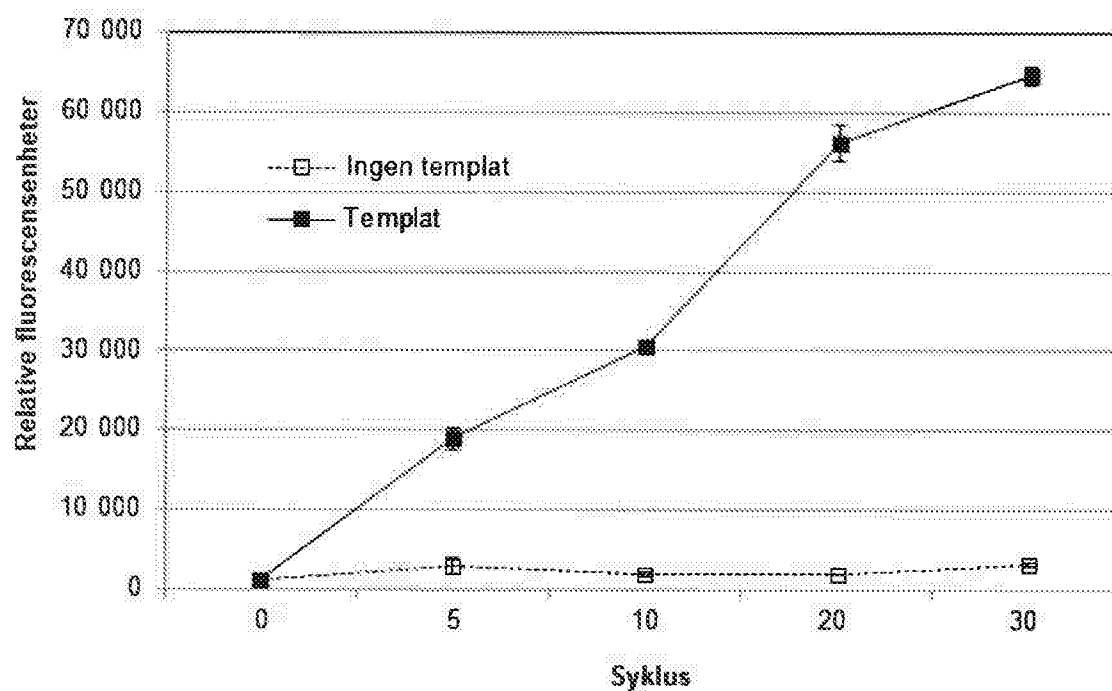
Forandring av fluorescensintensitet avhengig av syklusnummer på mikroarray

Templat ¹⁾	Oppstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Relative fluorescensenheter					
				Antall sykluser	0	5	10	20	30
-	+	+	+		1.216 (±86,3)	3.012 (±929,1)	1.988 (±276,5)	1.961 (±25,5)	3.261 (±279,3)
+	+	+	+		1.304 (±0,7)	18.939 (±1.342,1)	30.619 (±285,0)	56.248 (±2.208,3)	64.645 (±1.110,2)

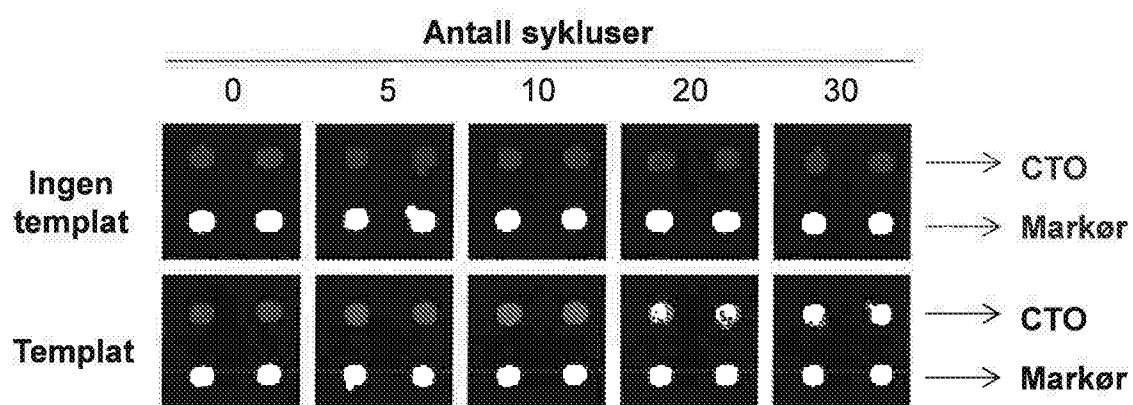
1) Templat er en syntetisk oligonukleotid for *Neisseria gonorrhoeae* gen.

2) PTO har en fluorescens reportermolekyl ved sin 5'-ende.

3) CTO er immobilisert på overflaten av faststoffs substratet med anvendelse av en aminogruppe ved dets 5'-ende.



28/30

Fig. 23A**Fluorescensbilde avhengig av syklusnummer på mikroarray**

29/30

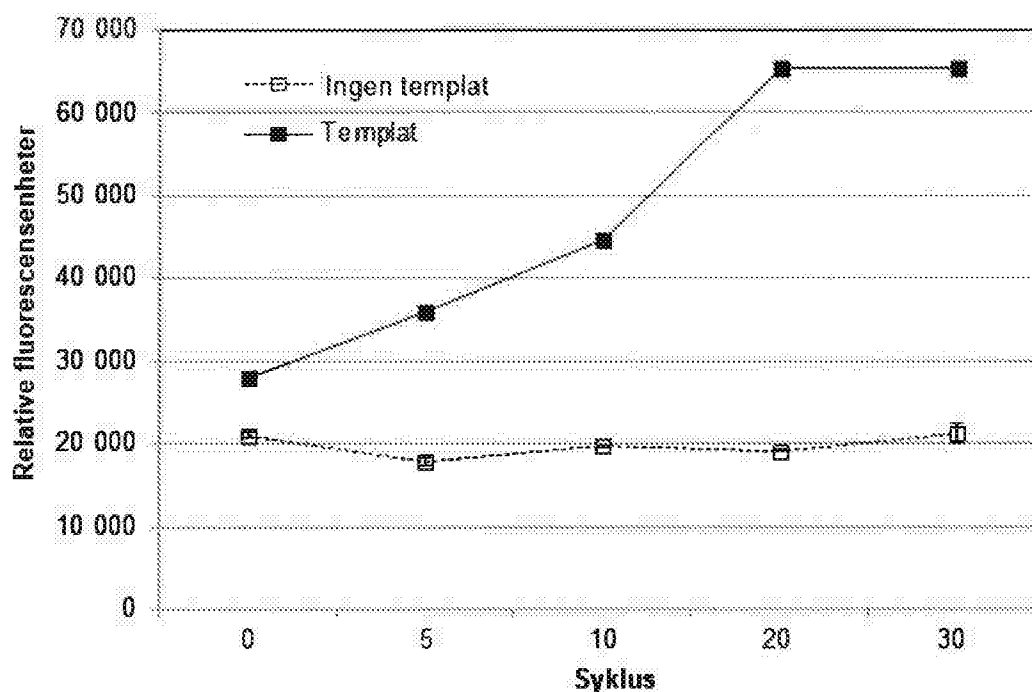
Fig. 23B**Forandring av fluorescensintensitet avhengig av syklusnummer på mikroarray**

Templat ¹⁾	Oppstrøms primer	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Relative fluorescensenheter					
				No. of cycles :	0	5	10	20	30
-	+	+	+		21.047 (±334,5)	17.867 (±478,7)	19.739 (±82,0)	19.144 (±176,8)	21.259 (±1.130,7)
+	+	+	+		28.078 (±460,3)	35.967 (±555,1)	44.674 (±186,0)	65.423 (±2,1)	65.426 (±2,8)

1) Templat er et syntetisk oligonukleotid for *Neisseria gonorrhoeae* gen.

2) PTO har ingen markør.

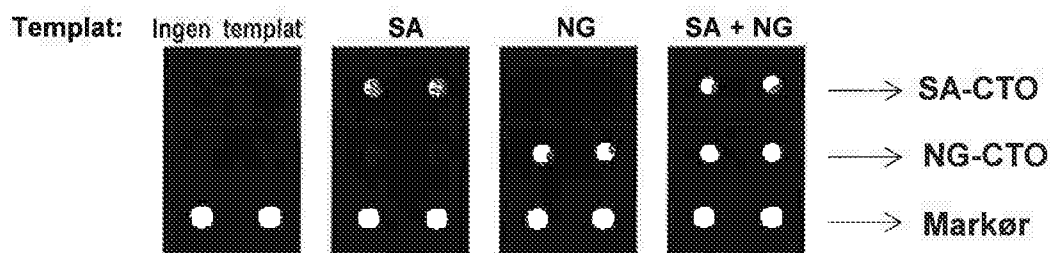
3) CTO har en quencher-molekyl og en fluorescens reporter-molekyl i templat-porsjonen. CTO er immobilisert på overflaten av faststoffsubstratet med anvendelse av en aminogruppe ved dets 3'-ende.



30/30

Fig. 24

Fluorescensbilde på mikroarray



Fluorescensintensitet på mikroarray

Templat ¹⁾	Primere ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	Relative fluorescensenheter	
				SA	NG
-	+	+	+	448 (±29,7)	2.522 (±116,0)
SA	+	+	+	65.192 (±198,7)	4.183 (±323,9)
NG	+	+	+	603 (±36,8)	65.332 (±1,4)
SA og NG	+	+	+	65.302 (±0,7)	65.302 (±0,7)

¹⁾ Templat er en genomisk DNA fra *Staphylococcus aureus* (SA) og/eller en genomisk DNA fra *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

²⁾ Primere er en oppstrøms og en nedstrøms primer for PCR.

³⁾ PTO har en fluorescens reportermolekyl ved dets 5'-ende.

⁴⁾ CTO er immobilisert på overflaten av faststoffs substratet med anvendelse av en aminogruppe ved dets 5'-ende.