



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

- (21) Patentansøgning nr.: 5917/84
(22) Indleveringsdag: 11 dec 1984
(41) Alm. tilgængelig: 13 jun 1985
(44) Fremlagt: 28 jan 1991
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 12 dec 1983 US 560429 31 aug 1984 US 645850
(71) Ansøger: *MILES Inc.; 1127 Myrtle Street; Elkhart; Indiana 46514, US
(72) Opfinder: James P. *Albarella; US, Leslie H. *Anderson; US

(51) Int.Cl.⁵ G 01 N 33/53
 C 07 H 21/04
 //C 12 Q 1/68

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Fremgangsmåde til detektering af en bestemt enkeltstrenget polynucleotidsekvens i et testmedium indeholdende enkeltstrengede nucleinsyrer og reagenssystem til anvendelse ved fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammen drag:

5917-84

Ved en fremgangsmåde til detektering af en bestemt polynucleotidsekvens i et testmedium indeholdende enkeltstrengede nucleinsyrer kombineres testmediet med en nucleinsyre-sonde, der indeholder mindst én enkeltstrenget basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til den sekvens, der skal bestemmes i testmediet, under betingelser, der er favorabile for hybridisering mellem den sekvens, der skal detekteres, og den komplementære sekvens i sonden, hvorpå hybridiseret sonde bestemmes, idet der også tilsættes en nucleinsyre-indskudsforbindelse, der kan binde til dobbeltstrenget nucleinsyre i form af indskudskomplekser, og hybridiseret sonde detekteres ved tilsætning af et antistof eller et fragment deraf, der er i stand til binding med indskudskomplekser i det resulterende hybridiseringsprodukt, hvorpå det antistof eller fragment deraf, der bliver bundet til sådanne komplekser, bestemmes.

Et reagenssystem til detektering af en bestemt polynucleotidsekvens i et testmedium omfatter en nucleinsyre-sonde, der indeholder mindst én enkeltstrenget basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til den sekvens, der skal detekteres, og dette reagenssystem omfatter yderligere en nucleinsyre-indskudsforbindelse og et antistof eller et fragment deraf, der kan binde med indskudskomplekser indeholdende dobbeltstrenget nucleinsyrekompleks bundet med indskudsforbindelsen.

En fremgangsmåde til detektering af dobbeltstrenget nucleinsyre i et flydende medium omfatter følgende trin:

- (a) tilsætning til mediet af en nucleinsyre-indskudsforbindelse og af et antistof eller et fragment deraf, der kan binde med indskudskomplekser indeholdende dobbeltstrenget nucleinsyrekompleks bundet med indskudsforbindelsen og
- (b) detektering af bindingen af antistoffet eller fragmentet til komplekset.

METHOD TYPE I 5917-84

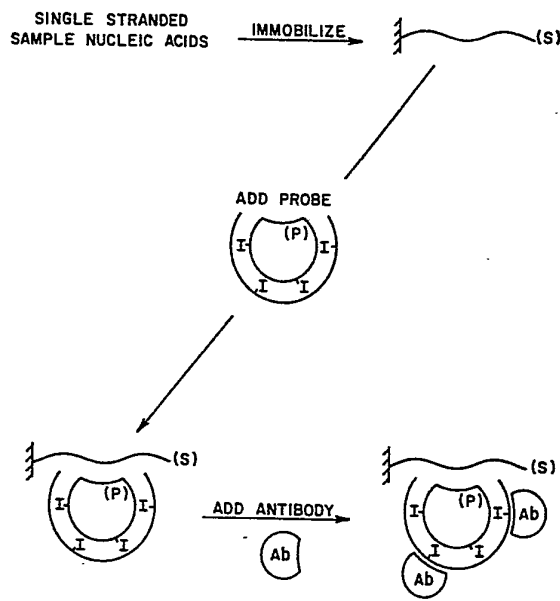


FIG. 2

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til detektering af en bestemt enkeltstrenget polynucleotid-sekvens ved hybridisering i et testmedium indeholdende enkeltstrengede nucleinsyrer samt et reagenssystem til anvendelse ved denne fremgangsmåde.

Princippet for nucleinsyre-hybridiserings-bestemmelser er blevet udviklet af forskere på rekombinant-DNA-området som et middel til bestemmelse og isolering af bestemte polynucleotid-basesekvenser, der har interesse. Det har vist sig, at enkeltstrengede nucleinsyrer, f.eks. DNA og RNA, således som de opnås ved denaturering af deres dobbeltstrengede former, vil hybridisere eller rekombinere under passende betingelser med komplementære enkeltstrengede nucleinsyrer. Ved mærkning af sådanne komplementære sonde-nucleinsyrer med en let detekterbar kemisk gruppe er det dernæst blevet gjort muligt at detektere tilstedeværelsen af enhver polynucleotidsekvens af interesse i et testmedium indeholdende prøve-nucleinsyrer på enkeltstrenget form.

Foruden på rekombinant-DNA-området kan den analytiske hybridiseringsteknik anvendes til detektering af vigtige polynucleotider inden for områderne human og veterinær medicin, landbrug og næringsmiddelvidenskab samt andre områder. I særdeleshed kan teknikken anvendes til detektering og identifikation af etiologiske midler såsom bakterier og vira, til screening af bakterier for antibiotisk resistens, til hjælp ved diagnose af genetiske sygelige tilstande, f.eks. seglcelleanæmi og thalassemia samt til detektering af cancerceller. En generel oversigt over teknikken og dens nuværende og fremtidige signifikans foreligger i Biotechnology (August 1983), side 471-478.

Teknikkens stade med hensyn til nucleinsyre-hybridiserings-bestemmelsesmetoder omfatter kemisk modifikation af enten sonde-nucleinsyren eller prøve-nucleinsyrer med det formål at mærke og detektere. Nødvendigheden af kemisk modifikation af nucleinsyrer begrænser i alvorlig

0

grad den praktiske anvendelighed af teknikken, eftersom den kræver fremstilling i stor skala af mærkede sonder, hvilket medfører komplicerede og dyre syntese- og rensningsprocedurer eller in situ-syntese af mærkede prøve-
5 -nucleinsyrer, udført af den, der anvender analysen. I særdeleshed skal det resulterende, mærkede polynucleotid beholde evnen til at hybridisere effektivt med dets komplementære prøve- eller sondesekvens. Et sådant krav begrænser alvorligt tilgængeligheden af anvendelige syntetiske metoder til mærkningsmodifikation af polynucleotider, der tænkes anvendt ved hybridiseringsbestemmelser.

De tidlige hybridiseringsmetoder involverede anvendelsen af radioaktive mærkninger såsom ^3H , ^{32}P og ^{125}I . Mærkede sonder syntetiseres enzymatisk ud fra radioaktivt
15 mærkede nucleotider og et polynucleotid ved sådanne metoder som nick-translation, ende-mærkning, syntese af anden streng, omvendt transkription og transkription. Det er således et yderligere krav til sådanne enzymatiske metoder, at de modificerede eller mærkede nucleotider skal
20 tjene som effektive substrater for de polymerase-enzymmer, der er involveret i samlingen af det mærkede polynucleotid. Direkte kemisk modifikation af polynucleotidet er også mulig, men en sådan metode er imidlertid ret ineffektiv ved inkorporering af mærkninger i polynucleotidet og
25 kan påvirke evnen hos polynucleotidet til at undergå hybridisering.

På grund af ulemperne ved håndtering og opbevaring af radioaktivt mærkede materialer er der blevet udfoldet betydelige, vedvarende beskræbelser på at udvikle anvendelige ikke-radioisotopiske mærkningsmetoder. Sådanne
30 mærkninger har omfattet lysemitterende molekyler, f.eks. fluorescerende og kemiluminescerende midler samt ligandmolekyler, der er i stand til specifikt at blive bundet af modparts-bindemidler, som igen mærkes med detekterbare
35 kemiske grupper, f.eks. fluorescerende midler og enzy-

0

mer. Eksempler på ligand-mærkninger er haptener, der specifikt bindes af antistoffer, og andre små molekyler, for hvilke der eksisterer specifikke bindingsproteiner, f.eks. biotin, som bindes af avidin.

5

I britisk patentskrift nr. 2.019.408 beskrives der polynucleotid-sonder, der er mærket med biotin gennem cytochrom C-forbindende grupper, og som dernæst er detekterbare ved hjælp af enzym-mærket avidin. En alternativ metode til mærkning af sonder med ligander med lav molekylvægt, f.eks. biotin, er beskrevet i den europæiske patentansøgning nr. 63.879. Ved denne teknik kondenseres 5-allylamin-deoxyuridin-triphosphat-derivater (dUTP) med den ønskede ligand-mærkning, og det således modificerede nucleotid inkorporeres ved hjælp af standard-enzymatiske metoder i den ønskede sonde. Anvendelsen af lysemmitterende mærkninger er foreslået i de europæiske patentansøgninger nr. 70.685 og nr. 70.687. Anden repræsentativ patentlitteratur, der vedrører hybridiseringsbestemmelser, er US patentskrift nr. 4.302.204, der vedrører anvendelsen af visse vandopløselige polysaccharider til accelerering af hybridisering på en fast fase. Endvidere angår US patentskrift nr. 4.358.535 detekteringen af patogener i kliniske prøver, og US patentskrift nr. 4.395.486 vedrører detekteringen af seglcelleanæmi-egenskaber under anvendelse af en syntetisk oligonucleotid-sonde.

25

Metoder til direkte detektering af det polynucleotid-duplex, der dannes som hybridiseringsproduktet mellem prøve- og sonde-nucleotiderne, hvorved der kan ses bort fra den kemiske mærkning af det ene eller det andet polynucleotid, har i almindelighed ikke været heldige. Forsøg på at danne antistoffer, der selektivt vil binde dobbeltstrengede DNA/DNA-hybrider over enkeltstrenget DNA, er mislykket, jfr. Parker og Halloran, "Nucleic Acids in Immunology", ed. Plescia og Braun, Springer-Verlag, NY (1969), side 18 ff. Nogen succes er blevet opnået ved frembringelse

35

0 af antistoffer, der vil binde RNA/DNA-blandede hybrider og har lav affinitet for de enkeltstrengede polynucleotider, jfr. Rudkin og Stollar, Nature, 265, 472 (1977), Stuart et al., PNAS (USA), 78, 3751 (1981), Reddy og Sofer, Biochem. 5 Biophys. Res. Commun., 103, 959 (1981) og Nakazato, Biochem., 19, 2835 (1980), men sensitiviteten af disse metoder har ikke nået de niveauer, der kræves til kliniske hybridiseringsforsøg, og man har måttet anvende RNA-sonder, om hvilke det er velkendt, at de er ret instabile.

10 Der foreligger således et fastslået behov for en teknik til detektering af hybridisering uden krav om kemisk modifikation af polynucleotider eller involvering af en mærkningsmetode med relativ enkelhed. Endvidere bør en sådan teknik kunne benyttes under anvendelse af en lang række mærkninger, især af den ikke-radioisotopiske type. Tilvejebringelsen af en nucleinsyre-hybridiserings-bestemmelsesmetode 15 og et reagenssystem, der har disse og andre fordele, er hovedformålet med den foreliggende opfindelse.

I US patentskrift nr. 4.257.774 beskrives der en metode til detektering af forskellige forbindelser, der reagerer med nucleinsyrer, navnlig forbindelser, der er mistænkt som mulige mutagener eller carcinogener, ved måling af sådanne forbindelsers evne til at inhibere bindingen af indskudsforbindelser, f.eks. acridin-orange, til nucleinsyrer. M.C. Poirier et al., (1982), PNAS, 79, 6443-6447, 25 beskriver fremstillingen af et monoklonalt antistof, der er selektivt for visse cis-platin/dobbeltstrengede DNA-komplekser i forhold til den fri cis-platinforbindelse og dobbeltstrenget DNA.

30 Det har nu vist sig, at hybridisering, der forekommer mellem prøve-nucleinsyre og sonden ved nucleinsyre-hybridiserings-bestemmelser, kan detekteres med fordel ved hjælp af et antistof eller et egnet bindingsfragment deraf, der er i stand til at bindes til indskudskomplekser, 35 der dannes i forbindelse med den hybridiserede sonde. I

det væsentlige detekteres en bestemt enkeltstrenget polynucleotidsekvens i et testmedium indeholdende enkeltstrengede nucleinsyrer ved dannelse af et hybridiseringsaggregat eller -produkt, der omfatter hybridiseret sonde og en nucleinsyre-
5 indskudsforbindelse bundet til dobbeltstrenget nucleinsyre i form af indskudskomplekser. Antistoffet eller fragmentet deraf anvendes derpå til detektering af indskudskomplekser i hybridiseringsaggregatet.

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde til detek-
10 tering af en bestemt enkeltstrenget polynucleotidsekvens i et testmedium indeholdende enkeltstrengede nucleinsyrer, omfattende kombination af testmediet med (i) mindst en nucleinsyre-sonde indeholdende i det mindste én enkeltstrenget basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til den
15 sekvens, der skal bestemmes i testmediet, under betingelser, der er favorable for hybridisering mellem den sekvens, der skal detekteres, og den komplementære sekvens i sonden, og bestemmelse af hybridiseret sonde, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der også tilsættes en nucleinsyre-
20 -indskudsforbindelse, der er i stand til binding til dobbeltstrenget nucleinsyre i form af indskudskomplekser, og den hybridiserede sonde detekteres ved tilsætning af et antistof eller et fragment deraf, der er i stand til at bindes til indskudskomplekser i det resulterende hybridise-
25 ringsprodukt, hvorpå antistoffet eller fragmentet deraf, der bliver bundet til sådanne komplekser, bestemmes.

Opfindelsen angår desuden et reagenssystem til detek-
tering af en bestemt enkeltstrenget polynucleotidsekvens i et testmedium til brug ved den ovennævnte fremgangsmåde,
30 omfattende en nucleinsyre-sonde indeholdende i det mindste én enkeltstrenget basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til den sekvens, der skal detekteres, og dette system er ejendommeligt ved, at det yderligere indeholder en nucleinsyre-indskudsforbindelse samt et antistof eller
35 et fragment deraf, der er i stand til binding med indskudskomplekser omfattende dobbeltstrenget nucleinsyre kompleks-

bundet med indskudsforbindelsen.

Anvendelsen af nucleinsyre-hybridisering som et analytisk værktøj er fundamentalt baseret på DNA's dobbeltstrengede duplex-struktur. Hydrogenbindingerne mellem purin- og pyrimidin-baserne af de respektive strenge i dobbeltstrengt DNA kan reversibelt afbrydes. De to komplementære enkeltstrenge af DNA, der er resultatet af denne sammensmeltning eller denaturering af DNA, vil forbindes (hvilket også betegnes som gendannelse eller hybridisering) til gendannelse af duplex-strukturen. Som det nu er velkendt i teknikken, vil kontakt mellem en første enkeltstrengt nucleinsyre, enten DNA eller RNA, der indeholder en basesekvens, som er tilstrækkeligt komplementær til, dvs. "homolog med", en anden enkeltstrengt nucleinsyre under passende opløsningsbetingelser, resultere i dannelsen af DNA/DNA-, RNA/DNA- eller RNA/RNA-hybrider, alt efter tilfældet.

Den foreliggende opfindelse gør det muligt at detektere dannede hybrider ved at inducere en immunogen modifikation af dobbeltstrengt nucleinsyre i området af hybridiseringen eller i flankerende områder. Det resulterende produkt kan dernæst detekteres ved konventionelle bestemmelsesmetoder, baseret på bindingen af specifikt antistof til epitoperne eller antigene determinanter, der dannes på hybridiseringsproduktet. Den fornødne immunogene modifikation af dobbeltstrengt nucleinsyre udføres i princippet ved binding af et molekyle, almindeligvis en lavmolekylær forbindelse, til duplexet. En sådan binding resulterer i dannelsen af en antigen determinant, der skelner dobbeltstrengt nucleinsyre fra både enkeltstrengt nucleinsyre og det frie, ubundne modificerende molekyle. Dette udføres ved anvendelse af en modificerende forbindelse, der i det væsentlige ikke er i stand til at blive bundet til enkeltstrengt nucleinsyre, og som danner et bindingskompleks med dobbeltstrengt nucleinsyre, der ændrer den normale spiral-relation mellem de to komplementære strenge i duplexet.

0

Et sådant modificerende molekyle som her beskrevet er en nucleinsyre-indskudsforbindelse, der fortrinsvis vil reagere med den normale nucleinsyre-spiral ved en ikke-covalent indsætning mellem basepar. Sådan indsætning bevirker, ved denne foretrukne reaktion, at den tertiære struktur af spiralen ændres ved oprulning og forlængelse langs spiralaksen. En skematisk fremstilling af denne foretrukne indskuds-reaktion er vist på tegningen i fig. 1. Det resulterende indskudskompleks er karakteriseret ved nydannede antigene determinanter, der forstås at omfatte den indskudte modificerende forbindelse de genorienterede phosphodiesterase-grundstrukturer af de respektive strenge af duplexet.

Fortrinsvis er indskudsforbindelsen et af de generelt plane, aromatiske, organiske molekyler, der vides at danne indskudskomplekser med dobbeltstrenget nucleinsyre. Sådanne forbindelser kan eksemplificeres ved acridinfarvestofferne, f.eks. acridin-orange, phenanthridinerne, f.eks. ethidium, phenazinerne, furocoumariner, phenothiaziner eller quinoliner, jfr. også den følgende nærmere beskrivelse. Det bør forstås, at selv om den foreliggende opfindelse i det følgende beskrives under særlig henvisning til sådanne indskudsforbindelser, omfatter opfindelsen også anvendelsen af ækvivalente modificerende molekyler, der som ovenfor beskrevet vil bindes til dobbeltstrenget nucleinsyre til frembringelse af en immunogen ændring i duplexet.

I overensstemmelse med den foreliggende opfindelse kan indskudsforbindelsen kombineres med testmediet og derved blive udsat for de dobbeltstrengede nucleinsyrer, der er til stede i og/eller dannes i hybridiserings-reaktionsblandingen, som en særskilt, fri forbindelse og bindes ikke-covalent til sådanne dobbeltstrengede nucleinsyrer til dannelsen af indskudskomplekser. Alternativt kan indskudsforbindelsen passende bindes ved hjælp af kemiske bindinger, fortrinsvis covalente bindinger, til sonden. I det førstnæv-

35

0

te tilfælde tilvejebringes der med den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til udførelse af en hybridiseringsbestemmelse, uden at der er behov for kemisk at modificere enten prøve- eller sonde-polynucleotidet til detektering af hybridisering. I det sidstnævnte tilfælde tilvejebringes der en enkel, syntetisk simpel metode til mærkning af polynucleotider eller hybridiserings-aggregatet gennem anvendelsen af fotoreagerbare former af indskudsforbindelsen.

10

I alle udførelsesformer tilvejebringes der med den foreliggende opfindelse en i høj grad alsidig, sensitiv og specifik metode til detektering af hybridisering, baseret på antistof-binding til indskudskomplekserne i det dannede aggregat. Naturligvis kan passende fragmenter og polyfunktionelle former af antistoffet anvendes, således som dette er beskrevet nærmere i det følgende, og det vil forstås, at når udtrykket "antistof" anvendes i den foreliggende beskrivelse, menes der hermed også antistoffets fragmenterede og polyfunktionelle former, medmindre andet er angivet. Bestemmelse af bindingen af antistof til indskudskomplekser kan udføres på en lang række konventionelle måder og omfatter fortrinsvis anvendelsen af antistof mærket med en detekterbar kemisk gruppe, f.eks. en enzymatisk aktiv gruppe, et fluorescerende stof, et luminescerende stof, en ligand, der kan bindes specifikt, eller en radioisotop.

15

20

25

Opfindelsen kan anvendes i forbindelse med alle konventionelle hybridiseringsbestemmelser, og den kan generelt anvendes i forbindelse med alle metoder, der er mulige, baseret på dannelsen af et hybridiseringsprodukt eller -aggregat indeholdende dobbeltstrenget nucleinsyre. I særdeleshed kan den enestående detekteringsmetode ifølge opfindelsen anvendes i opløsning og ved fast fase-hybridisering, derunder i det sidstnævnte tilfælde ved metoder, der omfatter immobilisering af enten prøve- eller sonde-nucleinsyrer og sandwich-produkter.

35

0

Det hybridiseringsprodukt eller -aggregat, der dannes ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, indeholder hybridiseret sonde og indskudsforbindelse bundet til dobbeltstrengt nucleinsyre i form af indskudskomplekser. Indskudskomplekserne kan omfatte dobbeltstrengede regioner dannet ved hybridisering mellem prøve- og sonde-nucleinsyrer. Alternativt kan sådanne dobbeltstrengede regioner være indeholdt i selve sonden, og i et sådant tilfælde kan de yderligere indskydes forud for anvendelsen af sonden ved bestemmelsen. De detekterbare indskudskomplekser kan således dannes in situ under bestemmelsen eller kan være eksisterende i sonde-reagenset som præsenteret til testmediet. Endvidere kan indskudskomplekserne være kemisk bundet til en eller flere af strengene af indskuds-duplexet. I almindelighed kan enhver variation følges, forudsat at hybridiseringsproduktet til slut indeholder indskudskomplekser, der kan detekteres ved hjælp af antistof-bindings-fænomenet, som er det underliggende grundlag ifølge den foreliggende opfindelse.

20

Med opfindelsen tilvejebringes der således en fordelagtig nucleinsyre-hybridiseringsmetode og et reagenssystem. Der tilvejebringes desuden et nyt antistof-reagens, der er i stand til at danne binding med indskudskomplekser.

25

Fordelene ved den foreliggende opfindelse er mange og signifikante. Opfindelsen kan anvendes i forbindelse med et meget stort antal ikke-radioaktive detekteringsmetoder. Endvidere er mærkningen af nucleinsyrer enkel, og der anvendes let syntetiserbare reagenser. Mærkning med indskudsforbindelsen kræver ikke dyre polymeraser, og mærknings-densiteten af indskudsforbindelsen kan let reguleres. Visse foretrukne udførelsesformer har andre fordele. I de udførelsesformer, hvor indskudsforbindelse-nucleinsyre-komplekset dannes in situ, kræves der ingen forudgående syntese af komplekset, og denne metode kan anvendes ved en udførelsesform, hvor en sonde immobiliseres på en fast bærer og neddyppes i en opløsning indeholdende prøven af nuclein-

35

0

syre. I den udførelsesform, hvor indskudsforbindelsen er covalent koblet til nucleinsyren, knyttes indskudsforbindelsen til sonden under fremstillingsprocessen, hvilket resulterer i et reguleret niveau af mætning. Ved denne metode nedsættes også brugerens udsættelse for et indskudsmiddel til et minimum, idet mange af disse midler kan være potentielt farlige.

På tegningen viser fig. 1 som allerede anført en skematisk fremstilling af den foretrukne interaktion mellem indskudsforbindelse og dobbeltstrengt nucleinsyre, som resulterer i et indskudskompleks, der kan detekteres ved hjælp af antistof.

På tegningen viser fig. 2-5 skematiske diagrammer for fire foretrukne hybridiseringer til anvendelse i forbindelse med opfindelsen.

Indskudsforbindelse

Som beskrevet ovenfor er indskudsforbindelsen fortrinsvis et lavmolekylært, plant, sædvanligvis aromatisk, men til tider polycyklisk molekyle, der kan bindes til dobbeltstrengede nucleinsyrer, f.eks. DNA/DNA-, DNA/RNA- eller RNA/RNA-duplexer, almindeligvis ved indsætning mellem basepar. Den primære bindingsmekanisme vil sædvanligvis være ikke-covalent, idet covalent binding forekommer som et andet trin, når indskudsforbindelsen har reaktive eller aktiverbare kemiske grupper, der vil danne covalente bindinger med nabostillede kemiske grupper på én eller begge de indskudte duplex-strengede. Resultatet af indskud er en spredning af tilstødende basepar til ca. det dobbelte af deres normale adskillelsesafstand, hvilket fører til en forøgelse i molekyllængden af duplexet. Endvidere skal der ske en afvikling af dobbeltspiralen på fra ca. 12 til ca. 36°, således at indskudsforbindelsen kan rummes. Generelle oversigter og yderligere information kan fås fra Lerman, J. Mol. Biol., 3, 18 (1961), Bloomfield et al., "Physical Chemistry of Nucleic Acids", chapter 7,

35

0 side 429-476, Harper og Rowe, NY (1974), Wering, Nature,
 219, 1320 (1968), Hartmann et al., Angew. Chem., Engl.
 Ed., 7, 693 (1968), Lippard, Accts. Chem. Res., 11, 211
 (1978), Wilson, Intercalation Chemistry (1982), 445 samt
 5 Berman et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10, 87 (1981).

Et stort antal forskellige indskudsmidler kan an-
 vendes i forbindelse med den foreliggende opfindelse. Nog-
 le klasser af disse midler og eksempler på specifikke for-
 bindelser fremgår af den følgende tabel:

| 10 | <u>Klasser af indskudsforbindelser og repræsentative forbindelser</u> | <u>Litteraturhenvisninger</u> |
|----|---|---|
| | A. Acridin-farvestoffer | Lerman, supra; Bloom- field et al., supra; |
| | proflavin, acridin-orange, quinacrin, acriflavin | Millet et al., Bio- polymers, 19, 2091 (1980) |
| 15 | B. Phenanthridiner | Bloomfield et al., supra; Miller et al., supra |
| | ethidium | |
| | coralyn | Wilson et al., J. Med. Chem., 19, 1261 (1976) |
| 20 | ellipticin, ellipticin- -kation og derivater | Festy et al., FEBS Letters 17, 321 (1971); Kohn et al., Cancer Res., 35, 71 (1976); LePecq et al., PNAS (USA) 71, 5078 (1974); Pelaprat et al., J. Med. Chem., 23, 1330 (1980) |
| 25 | C. Phenaziner | Bloomfield et al., supra |
| | 5-methylphenazin-kation | |
| | D. Phenothiaziner | ibid. |
| | chlorpromazin | |
| 30 | E. Quinoliner | ibid. |
| | chloroquin quinin | |
| | F. Aflatoxin | ibid. |

- 0
- G. Polycycliske carbonhydrider og deres oxiranderivater *ibid.*
- 3,4-benzpyren
 benzopyren-diol-
 -epoxid, 1-pyrenyl-
 5 oxiran Yang et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 82, 929 (1978)
- benzanthracen-5,6-oxid Amea et al., *Science* 176, 47 (1972)
- H. Actinomycener Bloomfield et al., *supra*
- actinomycin D
- 10 I. Anthracyclinoner *ibid.*
- β -rhodomycin A
 daunomycin
- J. Thiaxanthenoner *ibid.*
- miracil D
- K. Anthramycin *ibid.*
- 15 L. Mitomycin Ogawa et al., *Nucl. Acids Res., Spec. Publi.*, 3, 79 (1977), Akhtar et al., *Can. J. Chem.*, 53, 2891 (1975)
- M. Platinkomplekser Lippard, *supra.*
- 20 N. Polyindskudsforbindelser
- echinomycin Waring et al., *Nature*, 252, 653 (1974); Wakelin, *Biochem., J.*, 157, 721 (1976)
- 25 quinomycin Lee et al., *Biochem. J.*, 173, 115 (1978); Huang et al., *Biochem.*, 19, 5537 (1980); Viswamitra et al., *Nature* 289, 817 (1981).
- 30
- 35

- 0
- diacridiner
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- LePecq et al., PNAS (USA), 72, 2915 (1975); Carrellakis et al., Biochem. Biophys. Acta, 418, 277 (1976); Wakelin et al., Biochem, 17, 5057 (1978); Wakelin et al., FEBS Lett., 104, 261 (1979); Capelle et al., Biochem., 18, 3354 (1979); Wright et al., Biochem., 19, 5825 (1980); Bernier et al., Biochem. J., 199, 479 (1981); King et al., Biochem., 21, 4982 (1982)
- ethidium-dimer
- Gaugain et al., Biochem., 17, 5078 (1978); Kuhlman et al., Nucl. Acids Res., 5, 2629 (1978); Marlcovits et al., Anal. Biochem., 94, 259 (1979); Dervan et al., JACS, 100, 1968 (1978); ibid., 101, 3664 (1979)
- ellipticen-dimere og analoge
- Debarre et al., Compt. Rend. Ser., D 284, 81 (1977); Pelaprat et al., J. Med. Chem., 23, 1336 (1980)
- heterodimere
- Cain et al., J. Med. Chem., 21, 658 (1978); Gaugain et al., Biochem., 17, 5078 (1978)
- trimere
- Hansen et al., JCS Chem. Comm., 162 (1983); Atnell et al., JACS, 105, 2913 (1983)
- O. Norphillin A
- Loun et al., JACS, 104, 3213 (1982)

| | | |
|----|---|---|
| 0 | P. Fluorener og fluorener fluorenodiaminer | Bloomfield et al., supra. Witkowski et al., Wiss. Beitr.-Martin- Luther-Univ. Halle Wittenberg, 11 (1981) |
| 5 | Q. Furocoumariner angelicin | Venema et al., MGG, Mol. Gen. Genet., 179, 1 (1980) |
| | 4,5'-dimethylangelicin | Vedaldi et al., Chem.- Biol. Interact., 36, 275 (1981) |
| 10 | Psoralen | Marciani et al., Z. Naturforsch, B 27(2), 196 (1972) |
| | 8-methoxypsoralen | Belognzov et al., Mutat. Res., 84, 11 (1981); Scott et al., Photochem. Photobiol., 34, 63 (1981) |
| 15 | 5-aminomethyl-8- methoxypsoralen | Hansen et al., Tet. Lett., 22, 1847 (1981) |
| | 4,5,8-trimethylpsoralen | Ben-Hur et al., Biochem. Biophys. Acta, 331, 181 (1973) |
| 20 | 4'-aminomethyl-4,5,8- trimethylpsoralen | Issacs et al., Biochem., 16, 1058 (1977) |
| | xanthotoxin | Hradecma et al., Acta Virol., (Engl. Ed.), 26, 305 (1982) |
| 25 | khellin | Beaumont et al., Biochim. Biophys. Acta, 608, 1829 (1980) |
| | R. Benzodipyroner | Murx et al., J. Het. Chem., 12, 417 (1975); Horter et al., Photo- chem. Photobiol., 20, 407 (1974) |
| 30 | S. Monostral Fast Blue | Juarranz et al., Acta Histochem., 70, 130 (1982). |
| 35 | | |

Flere udførelsesformer for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse involverer den kemiske, f.eks. covalente binding af indskudsforbindelsen til den ene af eller begge de komplementære strenge af et duplex. I det væsentlige kan enhver bekvem metode anvendes til frembringelse af en sådan binding. På bekvem måde dannes bindingen ved gennemførelse af indskud med en reaktiv, fortrinsvis fotoreaktiv indskudsforbindelse, efterfulgt af bindingsreaktionen. En særlig nyttig metode omfatter anvendelsen af azido-indskudsforbindelser. De reaktive nitrener frembringes let ved ultraviolet lys med lang bølgelængde eller synligt lys, og nitrenerne af arylazider foretrækker indsætningsreaktioner i forhold til deres omlejringsprodukter, jfr. White et al., *Methods in Enzymol.*, 46, 644 (1977). Repræsentative azido-indskudsforbindelser er 3-azidoacridin, 9-azidoacridin, ethidion-monoazid, ethidium-diazid, ethidium-dimer-azid, jfr. Mitchell et al., *JACS*, 104, 265 (1982), 4-azido-7-chlorquinolin og 2-azidofluoren. Andre anvendelige foto-reagerbare indskudsforbindelser er furocoumarinerne, der danner [2+2]-cycloadditionsprodukter med pyrimidinrester. Alkylerende midler kan også anvendes, f.eks. bis-chlor-ethylaminer og epoxider eller aziridiner, f.eks. aflatoxiner, polycycliske carbonhydridepoxider, mitomycin og norphillin A.

Afhængigt af den hybridiseringsmetode, der anvendes, kan der, som det vil blive beskrevet i det følgende, anvendes kemisk bundne indskudskomplekser på en lang række forskellige måder i forbindelse med opfindelsen. De kan dannes in situ i hybridiseringsreaktionsblandingen eller i et efterfølgende fremgangsmådetrin, eller der kan være tale om et trin i syntesen af en mærket sonde- eller prøve-nucleinsyre. I det sidstnævnte tilfælde vil der, når indskud finder sted i området for komplementaritet mellem sonde- og prøve-nucleinsyrerne, dannes mono-bindinger, efterfulgt af denaturering af et sådant område til dannelse

0

af enkeltstrenget nucleinsyre med kemisk bundet indskudsforbindelse orienteret således, at den forbundne indskudsforbindelse ved hybridisering vil antage en indskudsstilling.

5

Hybridiseringsmetoder og -sonder

Sonden vil omfatte i det mindste én enkeltstrenget basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til eller homolog med den sekvens, der skal detekteres. Imidlertid behøver en sådan basesekvens ikke at være et enkelt, kontinuerligt polynucleotidsegment, men kan være sammensat af to eller flere individuelle segmenter, afbrudt af ikke-homologe sekvenser. Disse ikke-homologe sekvenser kan være lineære, eller de kan være selv-komplementære og danne hårnålespiraler. Desuden kan det homologe område af sonden ved 3'- og 5'-terminalerne være flankeret af ikke-homologe sekvenser, f.eks. de, der indeholder DNA eller RNA af en vektor, i hvilken den homologe sekvens er blevet indsat til propagering. I alle tilfældene vil sonden som præsenteret som et analytisk reagens udvise detekterbar hybridisering ved et eller flere punkter med prøve-nucleinsyrer, der har interesse. Lineære eller cirkulære, enkeltstrengede polynucleotider kan anvendes som sonde-elementet, idet væsentlige eller mindre væsentlige dele kan danne duplex med en komplementær polynucleotid-streng eller -streng, forudsat, at det kritiske homologe segment eller de kritiske homologe segmenter er på enkeltstrenget form og tilgængelige for hybridisering med prøve-DNA eller -RNA. Særligt foretrukne er lineære eller cirkulære sonder, hvori den homologe sonde-sekvens er i det væsentlige kun på enkeltstrenget form, se navnlig Hu og Messing, Gene, 17, 271-277 (1982).

Når sonden anvendes ved en hybridiseringsmetode, der kræver anvendelse af en med indskudsforbindelse mærket sonde, kan en sådan sonde, som det fremgår af det føl-

35

0 gende, have en lang række forskellige former, f.eks. et
fuldstændig enkeltstrenget polynucleotid med indskuds-
forbindelse kemisk bundet dertil, hvorved hybridiseringen
5 resulterer i dannelse af indskudskomplekser. Alternativt
kan sonden indeholde en dobbeltstrenget portion eller dob-
beltstrengede portioner, der er blevet indskudt, eventuelt
med covalent binding af indskudsforbindelsen til en eller
flere strenge i duplexet.

Med hensyn til hybridiseringsmetoder er den fore-
10 liggende opfindelse navnlig rettet på dannelsen af et
hybridiseringsaggregat indeholdende den hybridiserede son-
de og indskudsforbindelsen bundet til duplexer i form af
de antistof-detekterbare indskudskomplekser. Hybridise-
ringsbegivenheden er således forbundet med dannelsen af
15 de detekterbare indskudskomplekser. Fundamentalt kan de
resulterende indskudskomplekser i aggregatet befinde sig
i regionen for hybridisering mellem prøve- og sonde-nu-
cleinsyrerne eller kan være i en dobbeltstrenget region,
der befinder sig fjernt fra hybridiseringsregionen. I det
20 sidstnævnte tilfælde kan den indskudte region dannes un-
der bestemmelsen eller kan befinde sig i den indskudte
tilstand, når bestemmelsen foretages, f.eks. covalent bun-
det eller ikke-covalent indskudte dobbeltstrengede regio-
der, der tjener som mærkninger for sonden.

25 Den praktiske udførelse af den omhandlede analyti-
ske metode er ikke begrænset til nogen bestemt form for
hybridisering. Der kan således anvendes en vilkårlig kon-
ventionel hybridiseringsteknik. Efterhånden som der gøres
forbedringer, og der udvikles nye metoder, kan sådanne
30 let anvendes ved udførelsen af den omhandlede metode. Kon-
ventionelle hybridiseringsmetoder, der er særligt anvende-
lige, omfatter de, hvor prøve-nucleinsyrer eller polynu-
cleotid-sonden immobiliseres på en fast bærer (fast fase-
hybridisering) og de, hvor polynucleotid-arterne alle er
35 i opløsning (opløsnings-hybridisering).

0

Ved hybridisering i fast fase fikseres en af de polynucleotid-arter, der deltager i hybridiseringen, på en egnet måde i dens enkeltstrengede form på en fast bærer. Anvendelige faste bærere er velkendte i teknikken og omfatter de, der binder nucleinsyrer enten covalent eller ikke-covalent. Ikke-covalente bærere, der generelt forstås at involvere hydrofob binding, omfatter naturligt forekommende og syntetiske polymere materialer, f.eks. nitrocellulose, derivatiseret nylon og fluorerede polycarbonhydrider, i en lang række forskellige former, f.eks. som filtre eller faste ark eller plader. Bærere til covalent binding kan også anvendes og omfatter materialer, der har en kemisk reaktiv gruppe eller grupper, såsom dichlorotriazin eller diazobenzylloxymethyl, der kan aktiveres til binding til polynucleotider.

15

En typisk hybridiseringsteknik i fast fase begynder med immobilisering af prøve-nucleinsyrer på bæreren i enkeltstrengt form. Dette indledende trin hindrer i det væsentlige genforstærkning af komplementære strenge fra prøven og kan anvendes som et middel til koncentreret af prøvematerialet på bæreren til opnåelse af forøget detekterbarhed. Polynucleotid-sonden bringes dernæst i kontakt med bæreren, og hybridisering detekteres ved antistof-binding som beskrevet i denne beskrivelse. Den faste bærer udgør et bekvemt middel til adskillelse af antistof, der bindes til indskudskomplekser associeret med hybridiseret sonde, fra materiale, der ikke bindes på sådan måde.

20

25

En anden metode, der har interesse, er sandwich-hybridiseringsteknikken, ved hvilken et ud af to indbyrdes forskellige fragmenter af den homologe sekvens af sonden immobiliseres, medens det andet mærkes. Nærværelsen af den polynucleotidsekvens, der har interesse, resulterer i dobbelthybridisering til de immobiliserede og mærkede sonde-segmenter, igen med den samme endelige måling af bæreasso-cierede indskudskomplekser, jfr. Methods in Enzymology, 65,

35

0

468 (1980) samt Gene, 21, 77-85 (1983), hvori yderligere enkeltheder kan findes.

Til bedre illustration kan det nævnes, at de følgende hybridiseringsmetoder i fast fase er særligt velegnede i forbindelse med opfindelsen. Skematiske diagrammer af disse grundlæggende metoder foreligger på tegningen.

Metode af type 1

Ved denne metode, der er illustreret i fig. 2, immobiliseres først de enkeltstrengede nucleinsyrer fra det flydende testmedium på en fast bærer. Der dannes derpå en hybridiserings-reaktionsblanding ved tilvejebringelse af kontakt mellem de immobiliserede prøve-nucleinsyrer (S) med sonden (P), der i dette tilfælde ud over den komplementære, enkeltstrengede portion omfatter mindst én dobbeltstrengt portion, der er kemisk forbundet med indskudsmaterialet (I) i form af indskudskomplekser. En særlig anvendelig form for sonden er den cirkulære form, der er beskrevet af Hu og Messing, jfr. ovenfor. Det resulterende hybridiseringsaggregat omfatter det immobiliserede polynucleotid, der har interesse, hybridiseret med sonden, som har en covalent forbundet, indskudt dobbeltstrengt region. Den faste bærer, der bærer immobiliserede duplexer, adskilles dernæst præferentielt fra den resterende af reaktionsblandingen. Antistoffet (Ab) tilsættes, fortrinsvis mærket med en detekterbar gruppe, og det resulterende immobiliserede antistof bundet til indskudskomplekser i aggregatet adskilles fra resten af reaktionsblandingen. Det antistof, der er bundet til bæreren, bestemmes derpå til fuldstændiggørelse af bestemmelsen. Alternativt kan antistoffet i den fraskilte opløsning bestemmes, omend dette almindeligvis vil være mindre foretrukket, eftersom der normalt anvendes et stort overskud af antistof.

En variation af denne metode går ud på at anvende en sonde som ovenfor nævnt, men uden covalent forbundet ind-

35

0

skudsmateriale bundet til den dobbeltstrengede region. I stedet sættes indskudsmaterialet til det immobiliserede aggregat, hvilket resulterer i dannelsen af indskudskomplekser i både den dobbeltstrengede portion af sonden og duplex-regionen, der dannes ved hybridisering.

5

Metode af type 2

Dette er en sandwich-metode, der er illustreret i fig. 3. En reaktionsblanding dannes blandt testmediet indeholdende den sekvens, der har interesse (S), og den første og anden sonde, der hver omfatter respektive i det mindste én basesekvens, der er komplementær til en derfra forskellig del af den sekvens, der har interesse. Den første sonde (P_1) immobiliseres på en fast bærer, og den anden sonde (P_2) mærkes med covalent bundne indskudskomplekser som ved metoden af type 1, der er beskrevet i det foregående. Det fremkomne hybridiseringsaggregat indeholder den sekvens, der har interesse, hybridiseret til både den immobiliserede første sonde og den med indskudskompleks mærkede anden sonde. Antistoffet tilsættes, fortrinsvis på mærket form, og det resulterende immobiliserede antistof bundet til indskudskomplekser i aggregatet skilles fra resten af reaktionsblandingen. Der foretages bestemmelse af det bundne antistof, hvorefter bestemmelsen fuldstændiggøres.

25

Der findes flere nyttige variationer af denne metode. For det første, som i tilfælde af variationen af metoden af type 1, kan man anvende en sonde, der ikke indeholder covalent bundet indskudsforbindelse, idet man i stedet kan sætte fri indskudsforbindelse til det immobiliserede aggregat, hvilket resulterer i dannelse af indskudskomplekser med alle tilgængelige dobbeltstrengede regioner. Som et alternativ til anvendelse af en anden sonde med en dobbeltstrengt portion kan man også anvende en sonde af udelukkende enkeltstrengt nucleinsyre med indskudsforbindelse

35

0 kemisk forbundet dertil således, at der ved hybridisering
dannes indskudskomplekser, eller med indskudsforbindelse
tilsat således, at der forekommer indskud mellem de duplexer,
der dannes mellem de to sonder og den sekvens, der
5 skal detekteres.

Metode af type 3

Fig. 4 illustrerer en yderligere, foretrukken metode, der udføres i fast fase. Prøve-nucleinsyrerne bringes i kontakt med immobiliseret sonde, og de resulterende immobiliserede duplexer skilles fortrinsvis fra den resterende del af reaktionsblandingen. Ved denne metode befinder sonden sig på enkeltstrenget form. Det fremkomne hybridiseringsprodukt indeholder den immobiliserede sonde hybridiseret med den sekvens, der har interesse. Denne metode tillader også signifikant genforstærkning mellem komplementære regioner af prøve-nucleinsyre, der kan finde sted på det immobiliserede aggregat. Sådant genforstærkning medvirker til fordel for bestemmelsen, eftersom den tilvejebringer yderligere dobbeltstrenget nucleinsyre til påfølgende indskud. Det næste trin i bestemmelsen er tilsætning af indskudsforbindelse og antistoffet, igen fortrinsvis på en mærket form. Bestemmelsen fuldstændiggøres ved adskillelsestrin og antistof-bestemmelsestrin som ved de
10
15
20
25 tidligere omtalte metoder.

Metode af type 4

Ved denne metode, der er illustreret i fig. 5, bringes de enkeltstrengede prøve-nucleinsyrer i kontakt med immobiliseret sonde, idet i dette tilfælde en sådan sonde er kemisk forbundet, f.eks. covalent, til indskudsmaterialet, således at duplex-dannelse i regionen af forbundet indskudsforbindelse resulterer i dannelse af indskudskomplekser. Dette er en i høj grad fordelagtig metode derved, at det er den eneste kendte teknik, hvor sonden er både immobiliseret og
30
35

0

mærket, og hvor der ikke kræves noget immobiliserings- eller mærkningstrin, som skal udføres ved bestemmelsestidspunktet. Det resulterende aggregat indeholder covalent forbundne indskudskomplekser i området af hybridisering mellem prøve- og sonde-nucleinsyrer og i alle genforstærkede prøve-regioner. Der tilsættes derefter antistof, og bestemmelsen gøres færdig som ved de tidligere metoder. Denne metode tilvejebringer den fordel, at man eliminerer behovet for, at den, der foretager analysen, skal håndtere opløsninger af den frie indskudsforbindelse, der i nogle tilfælde kan være potentielt farlig. En enkel variation af denne teknik består i at immobilisere prøve-nucleinsyrer i stedet for den mærkede sonde og gå frem på normal måde. Dette er noget mindre fordelagtigt, men er en praktisk metode at gå frem på.

15

En variant af fast fase-hybridiseringsmetoder kan også anvendes i forbindelse med opfindelsen. Sådanne metoder er karakteriseret ved det træk, at hybridiseringstrinet involverer opløselige former af både prøve-nucleinsyrerne og af sonden. Dette kan resultere i signifikant hurtigere hybridiseringer, eftersom de kinetiske forhold er meget hurtigere, når begge strenge er i opløsning, sammenlignet med det tilfælde, hvor én af dem er immobiliseret. Normalt gøres de resulterende hybrider efter hybridiseringstrinet immobile af detekteringshensyn. En sådan immobilisering kan udføres på en række forskellige måder. Konventionelt er det kendt selektivt at immobilisere duplexer ved udsættelse for adsorbenter, f.eks. hydroxyapatit- og nitrocellulose-membraner.

20

25

30

En særlig anvendelig metode til immobilisering af hybrider, dannet ved en opløsningsfase-hybridisering, involverer anvendelsen af en sonde, der indeholder et bindingssted for et bindingsstof. Efter hybridiseringstrinet kan man dernæst tilsætte en immobiliseret form af bindingsstoffet, der effektivt vil binde og immobilisere hybriderne ved hjælp

35

0 af bindingsstedet på sonden. Et sådant bindingssted kan
være til stede i en enkeltstrenget hybridiserbar portion
af sonden eller kan være til stede som et resultat af en
kemisk modifikation af sonden. Eksempler på bindingsste-
5 der, der eksisterer i nucleotid-sekvensen, er dér, hvor
sonden indeholder en promotor-sekvens, f.eks. lac-promo-
tor eller trp-promotor, der kan bindes med et promotor-
-protein, f.eks. bakteriophag-promotorer eller RNA-polyme-
rase, eller indeholder en operator-sekvens, f.eks. lac-ope-
10 rator, der kan bindes ved hjælp af et repressor-protein,
f.eks. lac-repressor, eller indeholder sjældne, antigene
nucleotider eller sekvenser, f.eks. 5-brom- eller 5-iod-
-deoxyuridin, Z-DNA, der kan bindes med specifikke anti-
stoffer, jfr. også britisk patentskrift nr. 2.125.964.
15 Bindingssteder indført ved kemisk modifikation af sonden
er særligt anvendelige og involverer normalt forbindelse
af et medlem af et specifikt bindingspar til sonde-nuclein-
syren. Anvendelige bindingspar, hvorfra der kan vælges, om-
fatter biotin/avidin, haptener og antigener/antistoffer,
20 carbonhydrater/lactiner og enzymer/inhibitorer. Når bin-
dingsparret består af et proteinholdigt materiale og et
ikke-proteinholdigt materiale, foretrækkes det at forbinde
det ikke-proteinholdige materiale til sonden, eftersom det
proteinholdige materiale kan være instabilt under denature-
25 ringsbetingelserne for hybridisering af sonden. Foretrukne
systemer involverer forbindelse af sonden med biotin eller
et hapten og anvendelse af henholdsvis immobiliseret avi-
din eller anti-hapten-antistof. Fremstilling af anvende-
lige ligand-mærkede sonder er kendt fra litteraturen, jfr.
30 Langer et al., (1981), Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 6633,
Broker (1978), Nucl. Acids Res., 5, 363, Sodja et al.,
(1978), Nucl. Acids Res., 5, 385, Tchen et al. (1984),
Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 3466. Immobilisering af bin-
dingsstoffet kan ske under anvendelse af konventionelle
35 metoder.

0

Der kendes et stort antal metoder til immobilisering af proteiner på faste bærere, og disse metoder kan anvendes til immobilisering af bindingsstoffet, jfr. Methods in Enzymology, Vol. 44 (1976). Antistoffer immobiliseres f.eks. enten ved covalent kobling eller ved ikke-covalent adsorption. Ikke-covalente metoder, der hyppigt anvendes, er adsorption til polystyrenkugler eller mikropartikler og til polyvinylchlorid-overflader. Der anvendes mange covalente metoder til immobilisering af proteiner, og nogle få omfatter cyanogenbromid-aktiverede agaroser og dextraner, glutaraldehyd-aktiverede nylonstoffer og polyacrylamider samt epoxider på acryliske og andre bærere.

10

De ovenfor beskrevne, illustrerende metoder foretrakkes især, men opfindelsen er imidlertid ikke begrænset til nogen bestemt hybridiseringsmetode. Der kan anvendes enhver bestemmelsesmetode, forudsat, at der resulterer detekterbare indskudskomplekser i forbindelse med hybridisering af sonde-nucleinsyren. Eksempelvis kan man udover de ovennævnte metoder anvende en hybridiseringsmetode i opløsningsfase, hvor et fast-fase-antistof til indskudskomplekser anvendes til immobilisering af hybridiseret sonde. Der vil dannes tilstrækkeligt med indskudskomplekser i hybridiseringsproduktet mellem prøve- og sonde-nucleinsyrer, idet de sidstnævnte befinder sig i det væsentlige kun på enkeltstrenget form, således at både fast fase-antistof og mærket antistof kan bindes. Mængden af mærkning, der er associeret med den faste fase, måles dernæst og relateres til nærværelsen af den sekvens, der skal bestemmes.

20

25

30

Antistof-reagens og detekteringsmetoder

35

Et fundamentalt princip ved den foreliggende opfindelse er evnen til først at binde et antistof eller et fragment eller et andet ækvivalent deraf til hybridiseringsaggregatet omfattende hybridiseret sonde og dernæst at de-

0
tektene en sådan antistof-binding. Som anført ovenfor kan
antistof-reagenset bestå af hele antistoffer, antistof-
-fragmenter, polyfunktionelle antistof-aggregater eller i
almindelighed ethvert stof, der indeholder et eller flere
5 indskudskompleks-specifikke bindingssteder fra et antistof.
Når der er tale om en form af helt antistof, kan dette til-
høre enhver af klasserne og underklasserne af kendte immu-
noglobuliner, f.eks. IgG eller IgM. Ethvert fragment af et-
hvert sådant antistof, der bibeholder specifik bindingsaf-
10 finitet for indskudskomplekser, kan også anvendes, f.eks.
fragmenterne af IgG, der konventionelt kendes som Fab,
F(ab') og F(ab')₂. Desuden kan der, når det findes passen-
de, anvendes aggregater, polymere og konjugater af immuno-
globuliner eller deres fragmenter.

15 Immunoglobulin-kilden for antistof-reagenset kan fås
på enhver tilgængelig måde, f.eks. ved hjælp af konventio-
nelle antiserum- og monoklonale metoder. Antiserum kan fås
ved velkendt teknik, der involverer immunisering af et dyr,
f.eks. en mus, en kanin, et marsvin eller en ged, med et
20 egnet immunogen. Immunogenet vil almindeligvis indeholde et
ionisk kompleks mellem et kationisk protein eller protein-
derivat, f.eks. methyleret okseserumalbumin, og det anioni-
ske indskuds-nucleinsyre-kompleks. Ideelt set bør indskuds-
materialet være covalent koblet til den dobbeltstrengede
25 nucleinsyre. Alternativt kan indskuds-DNA-konjugatet være
covalent koblet til et bæreprøtein. Immunoglobulinerne kan
også fås ved somatiske cellehybridiseringsmetoder, idet dis-
se resulterer i, hvad der almindeligvis betegnes som mono-
klonale antistoffer. Det immunogen, der anvendes til primæ-
30 re injektioner, der fører til dannelse af hybridomer, vil
være som ovenfor beskrevet.

Antistof-reagenset vil være karakteriseret ved dets
evne til binding med et indskudskompleks dannet mellem en
udvalgt indskudsforbindelse og dobbeltstrengt nucleinsyre
35 i almindelighed under hensyn til de specifikke basesekvenser,

0 der befinder sig nær ved stedet for indskud. Det vil endvi-
dere i det væsentlige være ude af stand til binding til en-
keltstrengede nucleinsyrer eller til fri indskudsforbindel-
se. Som et resultat heraf vil antistof-binding kun forekom-
5 me ved indskudskomplekser, som ved passende udformning af
bestemmelsesmetoden vil være signifikant til stede kun i as-
sociation med hybridiseret sonde.

Bindingen af antistof-reagenset til hybridiserings-
aggregatet ved den her omhandlede metode kan detekteres ved
10 hjælp af enhver bekvem teknik. Med fordel vil antistofrea-
genset selv være mærket med en detekterbar kemisk gruppe.
En sådan detekterbar kemisk gruppe kan være ethvert mate-
riale, der har en detekterbar fysisk eller kemisk egenskab.
Sådanne materialer er veludviklede inden for området for
15 immunbestemmelser, og i almindelighed kan de fleste af så-
danne mærkninger, der kan anvendes ved disse metoder, også
anvendes i forbindelse med opfindelsen. Særligt anvendeli-
ge er enzymatisk aktive grupper, f.eks. enzymer, jfr. Clin.
Chem. (1976), 22, 1243, enzymsubstrater, jfr. britisk pa-
20 tentbeskrivelse nr. 1.548.741, coenzymer, jfr. USA-patenter-
ne nr. 4.230.797 og 4.238.565, og enzyminhibitorer, jfr.
USA-patent nr. 4.134.792, fluorescerende midler, jfr. Clin.
Chem. (1979), 25, 353, chromophorer, luminescerende stoffer,
f.eks. kemiluminescerende stoffer og bioluminescerende stof-
25 fer, jfr. Clin. Chem. (1979), 25, 512 samt ibid., 1531,
ligander, der kan bindes specifikt, proximalt med hveran-
dre reagerende par samt radioisotoper såsom ^3H , ^{35}S , ^{32}P ,
 ^{125}I og ^{14}C . Sådanne mærkninger og mærkningspar detekte-
res på basis af deres egne fysiske egenskaber, f.eks. fluor-
30 escerende midler, chromophorer og radioisotoper, eller de-
res reaktive eller bindingsegenskaber, f.eks. enzymer, sub-
strater, coenzymer og inhibitorer. Eksempelvis kan et med
cofaktor mærket antistof detekteres ved tilsætning af det
enzym, for hvilket mærkningen er en cofaktor, og et substrat
35 for enzymet. Et antistof, der er mærket med et haptent eller

0 en ligand, f.eks. biotin, kan detekteres ved tilsætning af
et antistof til haptenet eller et protein, f.eks. avidin,
der binder liganden, udstyret med et detekterbart molekyle.
5 Et sådant detekterbart molekyle kan være et molekyle
med en målelig fysisk egenskab, f.eks. fluorescens eller
absorbans, eller en deltager i en enzymreaktion, se f.eks.
den ovenstående liste. Eksempelvis kan der anvendes et en-
zym, som indvirker på et substrat til frembringelse af et
10 produkt med en målelig fysisk egenskab. Eksempler på sidst-
nævnte omfatter, men er ikke begrænset til β -galactosidase,
alkalisk phosphatase og peroxidase. Til studier af hybridis-
ering in situ er slutproduktet ideelt set vandopløseligt.
Mærkninger, der er proximalt reagerende eller forbindende,
kendes også på immunbestemmelsesområdet, jfr. Clin. Chem.,
15 27, 1797 (1981) og US patentskrifterne nr. 3.996.345 og 4.233.402,
og kan anvendes ved den her omhandlede metode ved anvendelse
af to forskellige populationer af antistoffer, den ene mær-
ket med et medlem af parret, og den anden mærket med det
andet medlem af parret. Eksempelvis mærkes en første del
20 af antistoffer til indskudskomplekser med et fluoresceren-
de middel, og en anden del mærkes med et undertrykkende mid-
del. Tilstedeværelsen af indskudskomplekser indikeres ved
undertrykkelse af fluorescens på grund af proximal binding
af antistoffer fra første og anden portion langs med det
25 indskudte nucleinsyre-duplex. Ligeledes kan der anvendes
første og anden enzym-mærkninger, når produktet af én er
et substrat for den anden. Nærværelsen af komplekser indi-
keres dernæst ved forøget udbytte af det andet enzym på
grund af en proximal enzym-kanaliseringseffekt. Andre mærk-
30 ningsmetoder vil være åbenbare for enhver fagmand på om-
rådet.

Alternativt kan antistoffet detekteres på basis af
en nativ egenskab, f.eks. dets egen antigenicitet. Et mær-
ket anti-(antistof)-antistof vil bindes til primære anti-
35 stofreagens, når mærkningen for det andet antistof er en-

0 hver konventionel mærkning som ovenfor beskrevet. Endvidere kan antistof detekteres ved komplement-fiksering eller ved anvendelse af mærket protein A, samt ved andre metoder, der kendes inden for teknikken til detektering af antistoffer.

5 Når antistoffet er mærket, hvilket er foretrukket, forbindes mærknings-delen og antistof-reagenset eller forbindes til hverandre ved direkte kemisk binding, f.eks. involverende covalente bindinger, eller ved indirekte binding, f.eks. ved inkorporering af mærkningen i en mikrokapsel eller et liposom, som igen er forbundet til antistoffet. Mærkningsmetoder er velkendte i teknikken, og enhver bekvem metode kan anvendes i forbindelse med nærværende opfindelse.

Reaktionsblanding

15 Den testprøve, der skal bestemmes, kan være ethvert medium af interesse og vil sædvanligvis være en flydende prøve af medicinsk, veterinær, miljømæssig, ernæringsmæssig eller industriel betydning. Især humane og animalske prøver og legemsvæsker kan bestemmes ved hjælp af den her omhandlede metode, herunder urin, blod (serum eller plasma), mælk, 20 cerebrospinalvæske, spyt, fækalt materiale, lungeaspirater, svælgampuner, genitampuner og -exudater, rektampuner og nasopharyngeale aspirater.

25 Som det er kendt i teknikken, kan der til bestemmelsen anvendes forskellige hybridiseringsbetingelser. Hybridisering vil typisk foregå ved svagt forhøjede temperaturer, f.eks. mellem ca. 35 og ca. 70°C og almindeligvis omkring 65°C, i en opløsning indeholdende puffer ved en pH-værdi mellem ca. 6 og ca. 8 og med passende ionstyrke, 30 f.eks. 2XSSC, hvor 1XSSC = 0,15 M natriumchlorid og 0,015 M natriumcitrat, pH = 7,0, protein såsom okseserumalbumin, Ficoll (et varemærke, der identificerer en copolymer af sucrose og epichlorhydrin, forhandlet af Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ), polyvinylpyrrolidoner, og en 35 denatureret, fremmed DNA, f.eks. fra kalvethymus eller

0

laksesperma. Graden af komplementaritet mellem prøve- og sonde-strengene, der kræves til, at hybridisering kan finde sted, afhænger af betingelsernes strengthed. Graden og specificiteten af hybridisering påvirkes af de følgende

5 principielle betingelser:

1. Renheden af nucleinsyrepræparatet.

2. Basesammensætningen af sonde-G-C-basepar vil udvise større termisk stabilitet end A-T-basepar. Hybridiseringer, der involverer højere G-C-indhold, vil således være stabile ved højere temperaturer.

10

3. Længden af homologe basesekvenser. Enhver kort sekvens af baser, f.eks. mindre end 6 baser, har en høj grad af sandsynlighed for at være til stede i mange nucleinsyrer. Der kan således opnås liden eller ringe specificitet ved hybridiseringer, der involverer sådanne korte sekvenser.

15

Den omhandlede homologe sonde-sekvens vil være mindst 10 baser, sædvanligvis 20 baser eller flere, og fortrinsvis mere end 100 baser. Set fra et praktisk synspunkt vil den homologe sonde-sekvens ofte ligge mellem 300 og 1000 nucleotider.

20

4. Ionstyrke. Graden af genforstærkning forøges, når ionstyrken af inkuberingsopløsningen forøges. Den termiske stabilitet af hybrider forøges også.

5. Inkubationstemperatur. Optimal genforstærkning sker ved en temperatur på fra ca. 25 til ca. 30°C under smeltetemperaturen (T_m) for et givet duplex. Inkubering ved temperaturer væsentligt under det optimale tillader mindre relaterede basesekvenser at hybridisere.

25

6. Nucleinsyrekoncentration og inkubationstid. Til forskydning af reaktionen i retning af hybridisering vil normalt en af de hybridiserbare prøve-nucleinsyrer eller sonde-nucleinsyrer være til stede i overskud, sædvanligvis et overskud på 100 gange eller større.

30

7. Denatureringsreagenser. Nærværelsen af midler, der opbryder hydrogenbindinger, f.eks. formamid og urinstof, forøger strengtheden af hybridisering.

35

0

8. Inkubationstid. Jo længere inkubationstiden er, desto mere fuldstændig vil hybridiseringen være.

5

9. Volumeneksklusionsmidler. Nærværelsen af disse midler, f.eks. dextran og dextransulfat, antages effektivt at forøge koncentrationen af de hybridiserende elementer, hvorved graden af resulterende hybridisering forøges.

10

Normalt er antistof-reagenset og indskudsforbindelsen i tilfælde af metoder, hvor den tilsættes som en fri forbindelse, ikke til stede i hybridiseringsopløsningen. Dette er imidlertid ikke udelukket, når det er ønskeligt, og når hybridiseringsbetingelserne er gunstige for anti-stof-binding og indskudsdannelse. I det sædvanlige tilfælde detekteres indskudskomplekser, der er associeret med hybridiseret sonde, efter adskillelse af hybridiseret sonde fra hybridiseringsopløsningen. Når indskudsforbindelsen tilsættes i form af en fri forbindelse, vil dens koncentration normalt vælges således, at den er tilstrækkelig til mætning af indskudskomplekserne, der er til stede, men ikke er så stor, at der forekommer en signifikant, f.eks. større end 10%, selv-opstabling af indskudsforbindelse. Betingelserne for indskud vil almindeligvis være milde, f.eks. ved en pH-værdi mellem ca. 6 og ca. 8, moderat ionstyrke (≤ 1), stuetemperatur, ingen nødvendig udstrakt inkubering, dvs. mindre end 15 minutter i det almindelige tilfælde.

25

30

Til detektering af indskudskompleks tilsættes antistof til komplekset i overskud og får lov at inkubere i den tid, der er nødvendig til dannelse af et detekterbart produkt, f.eks. fra 5 minutter til 24 timer, under betingelser for neutral pH-værdi, f.eks. mellem 6 og 8, moderat ionstyrke (≤ 1) og moderat temperatur (20-40°C). Overskud af (ubundet) antistof fjernes derpå ved vaskning under lignende betingelser.

35

Det kan være nødvendigt eller ønskeligt at modificere den ovennævnte procedure ved inkludering af en indskudsforbindelse i vasketrinet til opretholdelse af

0

mætning af nucleinsyre-indskuds-komplekset. Om ønsket kan også nogle eller alle i ovennævnte trin kombineres, og f.eks. kan man tilsætte indskudsmidlet og antistof samtidig.

5

Reagenssystem

Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes der som nævnt yderligere et reagenssystem, dvs. en reagenskombination eller et reagensmiddel, der omfatter alle de essentielle bestanddele, der kræves til gennemførelse af den ønskede bestemmelsesmetode. Reagenssystemet anvendes i en kommercielt pakket form, f.eks. en komposition eller blanding, når foreneligheden af reagenserne tillader det, i form af en testmaterialekonfiguration eller mere almindeligt i form af et testsæt, dvs. en pakket kombination af en eller flere beholdere, materialer eller lignende, der indeholder de nødvendige reagenser og sædvanligvis omfatter skrevne instruktioner for udførelse af bestemmelserne. Reagenssystemer ifølge opfindelsen omfatter alle konfigurationer og kompositioner til udførelse af de forskellige hybridiseringsmetoder, der her er beskrevet, især de fire metodetyper, der specielt er illustreret ovenfor og på tegningen.

I alle tilfælde vil reagenssystemet omfatte (1) en sonde, (2) en nucleinsyre-indskudsforbindelse som beskrevet i det foregående og (3) antistof-reagenset, fortrinsvis mærket med en detekterbar kemisk gruppe, der også er beskrevet i det foregående. Systemet kan yderligere omfatte en fast bærer til immobilisering af enkeltstrengede nucleinsyrer fra testmediet. Alternativt kan sonde-elementet være til stede i immobiliseret form på en sådan. Endvidere kan indskudsforbindelsen være til stede i reagenssystemet som en særskilt, fri forbindelse, i det væsentlige uden kompleksdannelse med nucleinsyrer, eller den kan være bundet til sonden enten i form af indskudskomplekser, når sonden omfatter en dobbeltstrengt region, og eventuelt covalent eller på anden måde kemisk bundet til én eller begge stren-

0

gene, eller ved kemisk binding, f.eks. covalent binding, til en enkeltstrenget sonderregion således, at duplexdannelse i en sådan region resulterer i dannelsen af indskudskomplekser. I tilfælde af sandwich-metoden inkluderes der en anden sonde som ovenfor beskrevet i systemet. En testsæt-form for systemet kan yderligere omfatte hjælpekemikalier såsom bestanddelene af hybridiseringsopløsningen og denatureringsmidler, der er i stand til at omdanne dobbeltstrengede nucleinsyrer i en testprøve til den enkeltstrengede form. Fortrinsvis inkluderes der et kemisk lyse-middel og denatureringsmiddel, f.eks. alkali, til behandling af prøven til frigørelse af enkeltstrenget nucleinsyre derfra.

10

Opfindelsen belyses nærmere i de følgende eksempler.

15

Eksempler

I. Materialer

A. Fremstilling af tufA-sonde med covalent indskudt dobbeltstrenget portion

20

Nucleinsyre-sonden er en modificeret M13mp9-vektor (Messing og Vieria (1982), Gene, 19, 269, kommercielt tilgængelig fra New England Biolabs, Beverly, MA) indeholdende en 800 bp-indsats mellem Hinc II og EcoRI-restriktionsendonuclease-stederne af RFM13mp9. 800-Base-indsatsen er et fragment af 1190 base-tufA-sekvensen fra E. coli og er den del af sonden (der omfatter vektor og indsats) som faktisk vil hybridiseres til prøve-nucleinsyren. Indsatsen vil blive refereret til som tufA-indsatsen. Den modificerede M13mp9-bakteriophag betegnes M13-10 og er tilgængelig gennem American Type Culture Collection, Rockville, MD (ATCC 39403-B1).

25

30

35

Den E. coli-basisorganisme, der anvendes til propagering af M13-10 phagen, er JM103 [(Δ lac pro), supE, thi, strA, endA, sbcB, hsdR⁻, F'trad36, proAB, lacIq, Z Δ M15], der er kommercielt tilgængelig fra Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD. E. coli JM103 transforme-

0

res med M13-10-DNA, og en kultur af JM103 inficeres derpå med den transformerede JK103. Den enkeltstrengede form af M13-10 isoleres fra de phag-partikler, der udskilles i mediet af den inficerede E. coli. Phag-partiklerne indhøstes, og den enkeltstrengede M13-10-DNA isoleres under anvendelse af standardmetoder, jfr. Messing et al. (1981), *Nucleic Acids Res.*, 9, 309.

Under anvendelse af en oligonucleotid-primer, der er komplementær til M13mp9-vektoren på 5'-terminalen af tufA-indsatsen, deoxynucleosid-triphosphater og E. coli-DNA-polymerase (Klenow-fragment), syntetiseres der en anden DNA-streng. Denne anden streng syntetiseres med begrænsende mængder af deoxynucleosid-triphosphater således, at den ikke udstrækker sig til tufA-indsatsen, fordi denne indsats skal forblive i det væsentlige enkeltstrenget med det formål, at sonden kan anvendes ved en hybridiseringsbestemmelse. Denne teknik er blevet beskrevet i litteraturen (Hu og Messing (1982), *Gene* 17, 271-277), og oligonucleotid-primern (sekvens CACAATTCACACAAC) er kommercielt tilgængelig fra New England Biolabs, Beverly, MA.

Den mængde dobbeltstrenget DNA, der er til stede i M13-10-sonden, kan anslås ved anvendelse af et radioaktivt mærket nucleotid-triphosphat ved den anden strengs syntese eller ved S_1 -nucleasedigestion, efterfulgt af en fluorescensbestemmelse med ethidiumbromid.

Den dobbeltstrengede region af M13-10-sonden, der er fremstillet som ovenfor beskrevet, indskudsbehandles og bindes covalent med ethidium ved en fotoaffinitetsreaktion under anvendelse af et fotomærket ethidiumderivat, 8-azido-ethidium. Dette fotoreaktive indskudsmateriale fremstilles og isoleres som beskrevet i litteraturen, jfr. Graves et al. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 479, 98-104. Dets binding til dobbeltstrenget DNA har vist sig at være en efterligning af binding af dets grundforbindelse, ethidiumbromid, jfr. Bolton og Kearns (1978), *Nucl. Acids Res.*, 5, 4891, Garland et al., (1980), *Biochem.*, 19, 3221, idet undersøgelser vi-

0

ser, at denne procedure giver en blanding af 3-azido- og 8-azido-ethidium-isomere. Eftersom 8-azidoethidium er foto- reaktiv, må der træffes standforholdsregler ved håndterin- gen til hindring af sønderdeling. Arbejde i mørke i nærværel- se af et rødt fotografisk sikkerhedslys har vist sig at være tilfredsstillende. Opløsninger af 8-azidoethidium kan opbe- vares frosne i mørke ved -70°C i det mindste i én måned.

5

10

15

Ved fotolyse med synligt lys omdannes azido-delen i 8-azi- doethidium til en kemisk reaktiv nitren, der hurtigt vil reagere med tilgængelige nucleofiler til dannelse af kova- lente ethidium-additionsprodukter, jfr. Knowles (1971) Acc. Chem. Res., 5, 155. Såfremt 8-azidoethidium indskydes mel- lem baseparrene af DNA, når der foregår fotolyse, foregår der en covalent kobling af ethidium til DNA med høj effek- tivitet, jfr. Bolton og Kearns (1978), Nucl. Acids Res., 5, 4891.

20

25

30

35

Ethidium kobles covalent til den dobbeltstrengede region af M13-10 ved fotolyse af en opløsning indeholdende ca. 1 mM DNA-basepar og 0,5 mM 5-azidoethidium i en egnet puffer som f.eks. 20 mM tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (tris-HCl), 200 mM natriumchlorid (NaCl) med en pH-værdi på 8,0. Fotolysen udføres med en 150 watt udendørs spot- light, idet den omrørte reaktionsblanding befinder sig i en afstand af fra 5 til 20 cm fra lyskilden. Til hindring af, at fotolysereaktionen udsættes for overophedning, og til blokering af mulig kortbølget udstråling, dvs. mindre end 300 nm, omgives fotolysereaktionsblandingen af et glas- vandbad, der er forbundet til en vandcirkulator med tempe- raturregulering. Efter en passende inkuberingsperiode, f.eks. 60 minutter, fjernes ethidiumgrupper, der ikke er covalent bundet til DNA, ved en række, f.eks. 10, successi- ve ekstraktioner med et lige så stort rumfang vandmættet n-butanol. Der tilsættes yderligere 8-azidoethidium (slut- koncentration i området omkring 0,4 mM), og fotolyse- og eks- traktionstrinene gentages. Den mængde ethidium, der er for- bundet med DNA, anslås under anvendelse af extinktionskoef-

0
ficient-værdier af $\epsilon_{490} \cong 4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for fotolyseret
ethidiumazid, relationen mellem A_{260} og A_{490} for fotolyse-
ret ethidium bundet til DNA ($A_{260} = (A_{490} \times 3,4) - 0,011$), og
5 $\epsilon_{260} \cong 1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for koncentrationen af DNA-base-
par af en given DNA, der mærkes. Fortrinsvis mættes sonden
med ethidium således, at der findes én ethidiumdel for hver
2 DNA-basepar i den dobbeltstrengede region af sonden. Foto-
lykereaktionen og ekstraktionerne gentages, indtil der op-
nås den ønskede mærknings-densitet.

10

B. Fremstilling af adenovirus-sonder til sandwich-hybridisering

Sandwich-hybridiseringer er beskrevet i litteraturen,
jfr. Dunn og Hassell (1977), *Celle* 12, 23, Dunn og Sambrook
15 (1980), *Methods in Enzymology*, 65, 468, Ranki et al., (1983),
Gene, 21, 77, Ranki et al., (1983), *Curr. Topics in Microbio-*
logy and Immunol., 104, 307-310.

Denne metode kræver to nucleinsyre-sonder, der hver er
komplementær til en unik region af den nucleinsyre, der te-
20 stes i en prøve. En af sonderne er immobiliseret på en fast
bærer, medens den anden er mærket på en eller anden måde og
oprindelig er i opløsning med prøve-nucleinsyrerne. Disse
sonder vil i det følgende blive betegnet som henholdsvis
sonden i fast fase og sonden i opløsning.

25

Sonderne i fast fase og i opløsningsfase fremstilles
ud fra restriktions-endonuclease-digestioner af DNA fra
adinovirus-type 2 (Ad2) som beskrevet af Ranki et al., (1980),
Gene, 21, 77-85. Sondens i fast fase er sammensat af BamHI-
-fragmenterne C eller D, jfr. Tooze (1980), "The Molecular
30 *Biology of Tumor Viruses*", anden udgave, del 2: DNA Tumor
viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,
NY, side 933-934, af Ad2-DNA indsat i en pBR322-vektor. Dis-
se sonder er blevet betegnet henholdsvis pkTH1201 og pkTH1202.
Sonden i opløsningsfase er sammensat af en BamHI- og BglII-
35 -restriktions-endonuclease-digestion af pkTH1201, i hvilken
fragmenter er "shotgun"-klonede i BamHI-restriktions-endo-

0

nuclease-stedet af M13mp7, jfr. Messing et al., (1981), Nuc. Acids Res., 9, 309. Den modificerede M13mp7, der som indsats indeholder et fragment af Ad2 C-fragmentet, betegnes mkTH2306.

5

Opløsnings-sonden mkTH1206 gøres delvis dobbeltstrengt som beskrevet under I-A ovenfor, og den dobbeltstrengede region mærkes med et indskudsmiddel, f.eks. ethidium, ligeledes som beskrevet under I-A ovenfor.

10

C. Fremstilling af HCMV-sonde

15

EcoRI-restriktions-endonuclease-fragmentet O fra human cytomegalovirus (HCMV) stamme AD169, jfr. Tamashiro et al., (1982), J. Virol., Maj, 547-556, Chou og Merigan (1983), New Engl. J. of Med., 308, 921, kloner ind i pBR-322-derivatet pACYC184, der anvendes til transfektion af E. coli-stamme HB101 Rec A⁻ som beskrevet af Tamashiro et al. Efter propagering og rensning ved det indsats-bærende pACYC184, fordøjes plasmidet med restriktions-endonuclease EcoRI, og 6,8 kb O-fragmentet af HCMV renses ved præparativ elektroforese i 0,8% agarosegeler under anvendelse af standardmetoder, jfr. Maniatis et al., (1982), "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

25

D. Fremstilling af indskuds-mærket HCMV-sonde

30

Det rensede, dobbeltstrengede O-fragment fra afsnit I-C ovenfor mærkes dernæst kovalent med ethidium ved anvendelse af det fotolabile ethidiumderivat, 8-azidoethidium, som beskrevet i afsnit I-A ovenfor.

35

E. Fremstilling af indskudskompleks-immunogen

Kalvethymus- eller laksesperma-DNA overskæres ved gentagen passage gennem en kanyle, behandles med S₁-nuclease til fjernelse af enkeltstrengede regioner (Maniatis (1982), "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) og skilles fra de resulterende nu-

0

cleotider ved en vilkårlig af et antal standardmetoder, f.eks. ethanol-fældning, gel-eksklusionschromatografi eller ionbytningschromatografi.

5 Den rensede, dobbeltstrengede DNA kobles derpå kovalent til det fotolabile ethidiumderivat 8-azidoethidium ved fotolyse som beskrevet i afsnit I-A ovenfor. Der fremstilles et bæreprøtein ved methylering af carboxylsyrerester, jfr. Mandell og Hershey (1960), Anal. Biochem., 1, 66, hvorpå der kombineres med den indskuds-mærkede DNA til dan-

10 nelse af et elektrostatisk associeret nucleinsyre-protein-kompleks som beskrevet af Poirier et al., (1982), PNAS, 79, 6443.

F. Fremstilling af polyklonalt antiserum til indskudskom-
15 plekset

Polyklonalt antiserum mod indskuds-DNA-komplekser fremkaldes hos kaniner ved anvendelse af immuniseringsmetoder og -skemaer som beskrevet i litteraturen, jfr. Stollar (1980), Methods in Enzymology, 70, 70. Det pågældende anti-

20 serum screenes ved en bestemmelse i fast fase, der svarer til den, som anvendes til monoklonale antistoffer, f.eks. som beskrevet af Lange et al., (1976), Clin. Exp. Immunol., 25, 191, og Pisetsky et al., (1981), J. Immun. Methods, 41, 187. Det indledende screenings-kriterium vil være bindingen til indskuds-DNA-komplekset.

25

IgG-Fraktionen af de antisera, der indeholder antistoffer, isoleres fra andre serumproteiner ved ammonium-sulfat-fældning, efterfulgt af chromatografi på DEAE-cellulose, jfr. Livingston (1974), Methods in Enzymology, 34,

30 723.

IgG-fraktionen af de pågældende antisera renses yderligere ved affinitetschromatografi på en søjle indeholdende en harpiks, hvorpå DNA-indskudskomplekset immobiliseres, jfr. Stollar (1980), Methods in Enzymology,

35 70, 70. Efter påføring af IgG-fraktionen på søjlen fjernes ikke-specifikt bundet protein ved vaskning, og de specifik-

0 ke antistoffer elueres med 2 M eddikesyre i kulden, jfr. Stollar (1980), ibid.

De rensede antistoffer screenes mere grundigt til bestemmelse af deres anvendelighed ved hybridiseringsbestemmelsen. Antistofferne skal binde indskuds-DNA-komplekset med høj affinitet (fortrinsvis $K_A \geq 10^{10} \text{ M}^{-1}$) og krydsreaktivitet med fri indskudsforbindelse eller enkeltstrenget DNA er ikke acceptabel. Afhængigt af bestemmelsesmetoden er nogen krydsreaktivitet af antistofferne med dobbeltstrenget DNA acceptable.

G. Fremstilling af monoklonale antistoffer til indskudskomplekset

15 Under anvendelse af det indskuds-DNA-immunogen, der er fremstillet som ovenfor beskrevet, fås der muse-monoklonale antistoffer til indskuds-DNA-komplekset under anvendelse af standardmetoder, jfr. Galfre og Milstein (1981), Methods in Enzymology, 73, 1. De monoklonale antistoffer screenes under anvendelse af en modifikation af de metoder, der er beskrevet i litteraturen, f.eks. Lange et al., (1976), Clin. Exp. Immunol., 25, 191 og Pitsctsky et al., (1981), J. Immun. Methods, 41, 187. For at være anvendelig ved bestemmelsen til detektering af DNA-indskudskomplekser, bør et monoklonalt antistof bindes til DNA-indskudskomplekset med høj affinitet (fortrinsvis $K_A \geq 10^{10} \text{ M}^{-1}$), men kan ikke bindes til enkeltstrenget DNA eller frit indskudsmiddel. Krydsreaktivitet med dobbeltstrenget DNA kan være acceptabel ved nogle af disse bestemmelsesmetoder.

30 Monoklonalt muse-antistof renses ved en totrinsmetode. Den rene ascitesvæske påføres en søjle af Affi-Gel Blue-harpiks (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), ækvilibreret med 10 mM tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH = 8,0, og elueres med den samme puffer. Ved dette trin fjernes albumin, som tilbageholdes på søjlen. Det afsluttende trin i rensningen er påføring på DEAE-sepharose (Pharmacia Fine Chemicals,

0

Piscataway, NJ) og eluering med en lineær gradient af 10 mM tris-HCl, pH = 8,0, til 10 mM tris-HCl, 200 mM NaCl. Dette giver et rensset monoklonalt muse-antistof, der er frit for kontaminerende serumproteiner såsom albumin og transferrin.

5

H. Fremstilling af β -galactosidase-antistof-konjugat

β -Galactosidase (30.000 enheder, kvalitet VIII, kommercielt tilgængelig fra Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) opløses i 2 ml af en pufferopløsning sammensat af 0,1 M N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsyre (HEPES), 0,09 M NaCl, pH = 7,0. Derved fås en β -galactosidaseopløsning indeholdende 37,7 mg protein (70 nmol) i 1,84 ml. En portion på 3,5 mmol (et 50 ganges molært overskud) af dithiothreitol (DTT) sættes til denne opløsning, og blandingen får lov at henstå ved stuetemperatur i 4 timer.

DTT fjernes fra enymløsningen ved chromatografering af blandingen på en 2,5 cm x 80 cm søjle af Sepharose 6B·Cl-harpiks (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ), idet der som elueringsmiddel anvendes den ovenfor beskrevne HEPES/NaCl-puffer. Proteinholdige fraktioner slås sammen, hvorved der fås et samlet rumfang på 15 ml. Under anvendelse af en $E_{280}^{1\%} = 20,9$ (Worthington Enzyme Manual (1977), Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ, side 195), bestemmes β -galactosidase-koncentrationen til at være 9,62 mg/ml. Antallet af sulfhydrylgrupper på enzymet bestemmes til 11,0 under anvendelse af Ellman's reagens, jfr. Ellman (1959), Arch. Biochem. Biophys., 82, 70. Typisk giver denne fremgangsmåde 9-15 frie sulfhydrylgrupper pr. β -galactosidasemolekyle.

30

35

Det heterobifunktionelle koblingsreagens succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC, tilgængelig fra Pierce Chemical Co., Rockford, IL) anvendes til kobling af β -galactosidase til et antistof. Dette koblingsreagens indeholder en maleimidogruppe, der selektivt reagerer med sulfhydryl-dele, og en N-hydroxysuccin-

0

imidester til kobling til aminogru^pper. Koblingsproceduren omfatter to trin: omsætning af SMCC med antistof-aminogru^pper, efterfulgt af kobling af det derivatiserede antistof til β -galactosidase ved omsætning af maleimido-delen med

5

β -galactosidase-sulfhydrylgrupper.

En portion på 5,3 mg SMCC opløses i 250 μ l vandfrit N,N-dimethylformamid (DMF). Den faktiske koncentration af reaktive maleimidgrupper i denne opløsning bestemmes ved omsætning med en kendt mængde glutathion, efterfulgt af be-

10

stemmelse af mængden af glutathion-sulfhydrylgrupper under anvendelse af Ellman's reagens jfr. ovenfor. Eksempelvis fortyndes 40 μ l af DMF-opløsningen til 3 ml med HEPES/-

15

0,015 M NaCl-puffer. Et rumfang på 25 μ l af denne vandige opløsning af SMCC-opløsning kombineres derpå med 825 μ l HEPES/NaCl-puffer og 100 μ l 1 mM glutathion. Efter hen-

20

stand ved stuetemperatur i 15 minutter bestemmes mængden af uomsat glutathion under anvendelse af Ellman's reagens jfr. ovenfor, og de pågældende standarder, dvs. uomsat glutathion og en blindprøve uden glutathion. Der foretages adskillige bestemmelser for hver SMCC-opløsning, og gennem-

25

snittet af resultaterne beregnes. Ved denne metode vises det, at DMF-opløsningen af SMCC, fremstilles som beskrevet ovenfor, er 52 mM med hensyn til reaktive maleimidgrupper.

30

En portion på 6,0 mg (40 μ mol) af et monoklonalt muse-antistof kombineres med 400 μ mol SMCC i et slutrumfang på 533 μ l HEPES/0,15 M NaCl og får lov at reagere i 1 time ved 30°C. Reaktionsblandingen påføres derpå en 1 cm x 24 cm-kolonne af Bio-Gel P-2-harpiks (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) og elueres med HEPES/0,15 M NaCl. Alle proteinholdige fraktioner slås sammen. Proteinkoncentrationen bestemmes under anvendelse af metoden ifølge Sedmack og Grossberg, jfr. Anal. Biochem., 79, 544 (1977), og antallet af maleimidgrupper bestemmes som ovenfor beskrevet. Disse bestemmelser viser en antistofkoncentration på 1,98 mg/ml med 1-2 maleimider pr. antistofmolekyle.

35

0

En portion på 28 mg af antistof-maleimid-konjugatet kombineres med 10 mg DTT-behandlet β -galactosidase (slutrumfang 2,45 μ l) og får lov at reagere i 4 timer ved stuetemperatur. Blandingen påføres derpå en 2,5 cm x 80 cm-søjle af Sepharose 6B·Cl (Pharmacia, Piscataway, NJ) og elueres med HEPES/0,15 M NaCl ved 4°C. Strømningshastigheden er 4 ml pr. time, og der opsamles fraktioner på 3 ml. Fraktionerne bestemmes med hensyn til β -galactosidase-aktivitet og kapacitet til antistofbinding. Fraktionerne nr. 39-42 har begge egenskaber og slås sammen.

5

10

J. Fremstilling af biotin-mærkede antistoffer

15

Rensede antisera behandles med N-hydroxysuccinimid-esteren af biotin (kommercielt tilgængelig fra Sigma Chemical Co., St. Louis, MO eller Biosearch, San Rafael, CA) under anvendelse af i litteraturen beskrevne metoder, jfr. Oi et al., (1982), J. Cell. Biol., 93, 981, Heitzmann et al., (1974), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3537 og Green (1975), Adv. Protein Chem., 29, 85.

20

K. Fremstilling af radioaktivt mærkede antistoffer

25

30

Renset antistof mærkes radioaktivt under anvendelse af i litteraturen angivne metoder. Radioaktiv iodering udføres ved omsætning af antistofferne med ^{125}I -mærket 3-(4-hydroxyphenyl)-propionsyre-N-hydroxysuccinimid-ester (kommercielt tilgængelig fra New England Nuclear, Boston, MA), idet der anvendes metoden ifølge Bolton og Hunter, Biochem. J., 133, 529 (1973). Alternativt kobles antistoffraktionen covalent med bifunktionelt cheleringsmiddel, jfr. Yeh et al., (1979), Anal. Biochem., 100, 152, og mærkes derpå med en passende radioaktiv metalion. Denne sidstnævnte metode har den fordel, at opbevarings-levetiden for antistoffraktionen ikke er begrænset af halveringstiden for en radioaktiv isotop.

35

0

L. Fremstilling af alkalisk phosphatase-biotin-avidin-kompleks

Et alkalisk phosphatase-biotin-avidin-kompleks fremstilles som beskrevet af Leary et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4045 (1983)). Alkalisk phosphatase fra kalveindvolde tverbindes først ved omsætning med disuccimidyl-suberat og kobles derpå med N-hydroxysuccinimidesteren af biotinyloxaminocaprønsyre. Efter rensning mærkes det alkaliske phosphatase-biotin-kompleks med avidin (der har fire biotin-bindingssteder pr. avidinmolekyle) ved kombination af det alkaliske phosphatase-biotin-kompleks med et lille molært overskud af avidin. Enten avidin eller en bakteriel analog til avidin, steptavidin, (Hofmann et al., (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4666-4668, kommercielt tilgængelig fra Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) kan anvendes i dette sidste trin.

Det detekteringssystem, der anvendes til det alkaliske phosphatase-biotin-avidin-kompleks, er sammensat af nitroblåt-tetrazolium og 5-brom-4-chlor-3-indolylphosphat som beskrevet af Leary et al., jfr. ovenfor.

II. Metoder

A. Detektering af gram-negative bakterier i urin (metode af type 1) under anvendelse af fast fase, prøve-immobiliseret hybridiseringsmetode med tufA-sonde med en covalent, indskudt dobbeltstrenget region, styret med enzymerkødet antistof, jfr. fig. 2

Eftersom dens sekvens er i høj grad bevaret, kan tufA-sekvensen fra E. coli anvendes til detektering af nærværelsen af gramnegative bakterier i urinprøver. Kliniske urinprøver klares ved centrifugering i et kort tidsrum, f.eks. 5 minutter, ved en lav centrifugalkraft, f.eks. ved 8.000 omdr./minut med en Sorvall GLC-3-centrifuge. Bakterieceller i den ovenstående væske udsættes for lyse, og bakteriegenomet denatureres ved at gøre urinprøven 0,5 M med hensyn til natriumhydroxid i 10 minutter ved en for-

35

0

højet temperatur på 65°C. Alternativt kan dette gøres ved opvarmning af urinen til 90°C og opretholdelse af denne temperatur i 10 minutter. Efter lyse og denaturering fortyndes urinprøven og neutraliseres med et lige så stort rumfang af 20XSSPE (3,6 M NaCl, 0,2 M NaPO₄, 20 mM EDTA, pH = 7,7). Urinprøven filtreres derpå øjeblikkeligt gennem en nitrocellulosemembran under mildt vakuum. Den immobiliserede bakterielle DNA fikseres dernæst til nitrocellulosemembranen ved bagning i vakuum ved 80°C i 2 timer. Filteret indeholdende den immobiliserede prøve-DNA behandles med for-hybridiseringsopløsning (0,1% efter vægt pr. rumfang af Ficoll (Pharmacia), polyvinylpyrrolidon og BSA i 5XSSPE, 100-200 µg/ml denatureret, heterolog DNA) i 1-3 timer ved 65°C. Der anvendes et rumfang på 50-100 µl af for-hybridiseringsopløsning pr. cm² filter. Efter for-hybridiseringsbehandlingen sættes den med ethidium mærkede sonde, der er fremstillet som under I-A ovenfor, til for-hybridiseringsopløsningen, og hybridisering får lov at foregå (1-72 timer). De ovennævnte metoder er alle standardmetoder, der findes i litteraturen, jfr. Maniatis et al., (1982), "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Efter hybridiseringen vaskes filteret til fjernelse af overskud af sonde-DNA. Filteret neddyppes derpå i en opløsning indeholdende β-galactosidase-mærkede antistoffer til indskuds-DNA-komplekset og inkuberes i fra 5 minutter til 12 timer. Overskud af antistof fjernes ved vaskning, og den mængde β-galactosidase, der er associeret med filteret, bestemmes ved tilsætning af et fluorogent substrat af enzymerne, f.eks. 4-methylumbelliferon-β-galactosid, og måling af fluorescens-intensiteten efter et tidsrum. Eftersom den mængde enzym, der er til stede, sandsynligvis er forholdsvis lav, tilsættes det fluorogene substrat i en koncentration, der er større end eller lig med dets Michaelis-konstant (Km) for β-galactosidase. Standarder med en defineret mængde sonde immobiliseret på filteret kan anvendes samtidig, således at hybridisering kan kvantiseres.

35

0

B. Detektering af adenovirus (metode af type 2). Sandwich-hybridiseringsbestemmelse med mærket sonde med en covalent indskudt dobbeltstrenget region, styret med enzymeret antistof, jfr. fig. 3

5

Denne metode er baseret på den sandwich-hybridiseringsbestemmelse, der er beskrevet af Ranki et al. til detektering af adenovirus-type 2 (Ad2)-DNA i kliniske prøver, jfr. Ranki et al., (1983), Gene, 21, 77, Ranki et al., (1983), Current Topics in Microbiology and Immunology, 104, Springer-Verlag, NY, side 307. Sonden i fast fase med betegnelsen pKTH1202, jfr. afsnit I-B ovenfor, denatureres, nick-behandles og immobiliseres på nitrocellulosefiltre. Efter fiksering (varmebehandling i vakuum ved 80°C i 2 timer) behandles filtrene med for-hybridiseringsopløsning i 1 time ved 65°C. DNA fra kliniske prøver og den indskuds-mærkede opløsningshybridiseringssonde mkTH1206, fremstillet som beskrevet i afsnit I-B ovenfor, sættes til for-hybridiseringsopløsningen, og hybridisering af sonderne med prøve-DNA får lov at foregå i 1-72 timer. Efter hybridisering fjernes overskud af opløsningssonde (mkTH1206) ved vaskning.

10

15

20

Graden af hybridisering kvantiseres under anvendelse af β -galactosidase-mærket antistof til indskuds-DNA-komplekset som beskrevet i afsnit II-A ovenfor.

25

C. Detektering af human cytomegalovirus i urin (metode af type 3). Fast fase, sonde-immobiliseret hybridiseringsbestemmelse, styret med biotinmærkede antistoffer og enzymeret avidin, jfr. fig. 4

30

Denne metode anvendes til detektering af human cytomegalovirus (HCMV) i kliniske urinprøver. Den rensede sonde (EcoRI O-fragment af HCMV-stamme AD169 som beskrevet i afsnit I-C ovenfor) denatureres ved opvarmning til 90°C i 10 minutter, hvorpå der hurtigt køles på is (til hindring af renaturering) og kombineres med et lige så stort rumfang

35

0 af 20XSSPE (3,6 M NaCl, 0,2 M NaPO₄, 20 mM EDTA, pH = 7,7).
Den enkeltstrengede sonde-DNA immobiliseres derpå og fikse-
res på en nitrocellulosemembran under anvendelse af stan-
dardmetoder. Membranen behandles derpå med en for-hybridise-
5 ringsopløsning, fortrinsvis en sådan, der ikke indeholder
heterolog DNA. En for-hybridiseringsopløsning, der kan an-
vendes, er den, der er beskrevet af New England Nuclear til
deres Gene Screen PlusTM-membraner. Denne opløsning er sam-
mensat af 1% SDS, 1 M NaCl og 10% dextransulfat. Til hin-
10 dring af ikke-specifik binding af antistoffet ved de af-
sluttende trin af detekteringsmetoderne, kan det være øn-
skeligt at inkludere BSA i for-hybridiseringsopløsningen.

Den kliniske urinprøve, der skal testes, fremstil-
les på en måde, der svarer til den, der er beskrevet af
15 Chou og Merigan, jfr. New Engl. J. Med., 308, 921 (1983).
Efter klaring af prøven og koncentrering af HCMV-phag-par-
tiklerne ved centrifugering, gensuspenderes de i et mini-
malt rumfang af 0,5 M NaOH og får lov at henstå i 15 minut-
ter. Efter neutralisation med et minimalt rumfang af
20 20XSSPE sættes de denaturerede kliniske prøver til filte-
ret i 1% SDS, 1 M NaCl, 10% dextransulfat og 100 µg/ml de-
natureret laksesperma-DNA. Hybridisering får lov at fore-
gå ved 65°C i 1-72 timer, hvorpå filtrene vaskes i 2XSSPE.

Filtrene neddyppes i et minimalt rumfang af en op-
25 løsnings indeholdende den udvalgte indskudsforbindelse,
f.eks. ethidiumbromid i en submillimolær koncentration.
Biotinyleret antistof til DNA-indskudskomplekset (afsnit
I-J ovenfor) tilsættes derpå og får lov at bindes (1-24
timer). Overskud af antistof fjernes ved vaskning. I nog-
30 le situationer kan det være nødvendigt at inkludere ind-
skudsmidlet i disse vasketrin for at holde den dobbeltstren-
gede DNA mættet.

Et streptavidin-biotin-alkalisk phosphatase-kom-
pleks (afsnit I-L ovenfor) tilsættes derpå og får lov at
35 binde til det biotinylerede antistof, der er associeret

0

med DNA'en, jfr. Ward et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4045 (1983). Efter bortvaskning af overskud af alkaliske phosphatase-konjugater, bestemmes nærværelsen af konjugat, der er associeret med filteret, ved tilsætning af et kolometrisk substrat for alkalisk phosphatase som beskrevet af Ward, jfr. ovenfor. Dette er et direkte mål for nærværelsen af HCMV-DNA i den kliniske urinprøve.

5

10

D. Detektering af human cytomegalovirus i urin (metode af type 4). Fast fase, indskuds-mærket sonde-immobiliseret hybridiseringsbestemmelse, styret med radioaktivt mærket andet antistof til indskudskompleks-antistof, jfr. fig. 5

15

Denne metode svarer til metoden ifølge afsnit II-C ovenfor, men med den undtagelse, at sonden allerede er mærket med indskudsmiddel, og at det afsluttende trin i detekteringsmetoden kræver et andet, isotopisk mærket antistof.

20

Sonden, ethidium-mærket Eco RI-fragment 0 af HCMV (fremstillet som beskrevet i afsnit I-D ovenfor) denatureres, immobiliseres og fikseres på en nitrocellulosebærer som beskrevet i forbindelse med metoden ifølge afsnit II-C ovenfor. Viral DNA isoleres fra urinprøver, denatureres og hybridiseres til den immobiliserede sonde, ligeledes som beskrevet i afsnit II-C ovenfor, men med den undtagelse, at tilsætning af fri indskudsforbindelse er unødvendig.

25

30

Efter vaskning af filteret med den hybridiserede DNA tilsættes der overskud af monoklonalt muse-antistof til indskuds-DNA-komplekset, jfr. afsnit I-G ovenfor, og får lov at bindes til det hybridiserede DNA-indskudskompleks (fra 30 minutter til 6 timer). Overskud af muse-antistof fjernes ved vaskning, og der tilsættes overskud af radioaktivt mærket kanin-anti-(muse IgG), jfr. afsnit I-K. Efter en inkubering på fra 30 minutter til 6 timer fjernes overskud af antistof igen ved vaskning. Hybridisering kvantiseres ved autoradiografi eller gammamatelling.

35

0 III. Påvisning af antigenicitet af indskudskomplekserA. Fremstilling af covalente ethidium-DNA-komplekser

Ca. 250 mg laksesperma-DNA (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) opløses i 40 ml 50 mM NaCl og opskæres ved 5 fem passager gennem en 23 gauge-nål. Den opskårne DNA anbringes i en 250 ml kolbe og fortyndes med yderligere 160 ml puffer. 145 μ l S_1 -nuclease, 200.000 enheder/ml (Pharmacia P-L Biochemicals, Piscataway, NJ) tilsættes, og blandingen inkuberes ved 37°C i 50 minutter.

10 Reaktionsblandingen ekstraheres derpå to gange med en blanding af phenol og chloroform og én gang med chloroform, og DNA'en udfældes to gange med ethanol, jfr. Maniatis et al., (1982), "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. Den endelige fældning 15 opløses i 70 ml 20 mM tris-hydrochlorid-puffer med en pH-værdi på 8,0.

Denne DNA omsættes med 8-azidoethidium under følgende betingelser. Reaktionsblandingen fremstilles med 33 ml af 2,7 mg DNA pr. ml, 13,5 ml af 4,95 mM 8-azidoethidium, 20 13,5 ml af 0,2 N tris-hydrochlorid-puffer med en pH-værdi på 8,0, 0,2 M NaCl og 76 ml vand. Blandingen anbringes i et 250 ml bæreglas med en vandkappe, der holdes ved 22°C. Blandingen omrøres og belyses i 60 minutter med en 150 watt spotlight i en afstand af 10 cm. Denne fotolyse gentages 25 med en identisk reaktionsblanding.

De fotolyserede reaktionsblandinger kombineres og ekstraheres ti gange med et lige stort rumfang hver gang af n-butanol mættet med 20 mM tris-hydrochlorid-puffer med en pH-værdi på 8,0 og 0,2 M NaCl. Den ekstraherede 30 DNA-opløsning kombineres med 23 ml af 4,95 mM 8-azidoethidium og 77 ml af 20 mM tris-hydrochlorid-puffer med en pH-værdi på 8,0 og 0,2 M NaCl. Denne opløsning omrøres i det med vandkappe forsynede bæreglas og fotolyseres i 90 minutter. Reaktionsprodukterne ekstraheres ti gange med 35 puffermættet butanol som ovenfor beskrevet, og DNA'en fæl-

0

des med ethanol. Fældningen opløses i 10 mM tris-hydrochlorid-puffer med en pH-værdi på 8,0 og 1 mM EDTA, og absorbansen ved 260 og 490 nm bestemmes. Beregninger foretages som beskrevet i eksempel 1A ovenfor viser, at der inkorporeres 1 ethidiumrest pr. 4,5 DNA-basepar.

5

B. Fremstilling af methyleret thyroglobulin

100 mg Oksethyroglobulin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) kombineres med 10 ml vandfri methanol og 400 µl 2,55 M HCl i methanol. Denne blanding omrøres på en roterende blander ved stuetemperatur i 5 dage. Fældningen opsamles ved centrifugering og vaskes to gange med methanol og to gange med ethanol. Fældningen tørres dernæst natten over under vakuum, og der fås ca. 82 mg af et tørt pulver.

15

C. Fremstilling af covalent ethidium-DNA-methyleret thyroglobulin-kompleks

55 mg Methyleret thyroglobulin opløses i 10 ml vand, og der tilsættes 11,3 ml af en 2,2 mg pr. ml covalent ethidium-DNA-opløsning. Der dannes øjeblikkeligt en fældning, og suspensionen fortyndes med 5,0 ml 1,5 M NaCl og 24,6 ml vand.

20

25 D. Immunisering af kaniner

2 ml Af en blanding sammensat af 2,5 ml af det covalente ethidium-DNA methylerede thyroglobulin-kompleks, 2,5 ml 0,15 M saltopløsning og 5,0 ml komplet Freund's-adjuvans injiceres på fire subcutane steder på en hvid New Zealand-kanin. 3 Uger senere indgives der en lignende immunisering med ufuldstændigt Freund's-adjuvans, efterfulgt af yderligere immuniseringer med intervaller på 4 uger. 14 Uger efter den oprindelige immunisering opsamles der blod til fremstilling af antiserum.

30

35

0

E. Titration af antistof til ethidium-DNA

5

Antistof til covalent ethidium-DNA titreres ved en enzym-mærkningsimmunosorbansbestemmelse. Polynucleotider adsorberes på væggene af polystyren-mikrotiterplader, og dernæst får kanin-antistoffet lov at bindes. Endelig de-

10

tekteres antistoffet med peroxidase-mærket gede-anti-kanin-IgG.

Lige store portioner på 50 μ l af opløsninger indeholdende 5 μ g polynucleotid pr. ml i 15 mM natriumcitrat, pH = 7,0, og 0,15 M NaCl anbringes i brønde af Immulon II-mikrotiterplader (Dynatek, Alexandria, VA) og omrystes forsigtigt ved stuetemperatur i 2 timer. Dernæst tømmes brøndene og vaskes med 10 mM natriumphosphatpuffer, pH = 7,4, 0,15 M NaCl, 0,5% oxseserumalbumin og 0,5% Tween 20 (PBS/PSA/Tween).

15

20

Kanin-antiserum fortyndes i 10 mM natriumphosphat, pH = 7,4, 0,15 M NaCl, 0,5% BSA, og aliquoter på 50 μ l sættes til brøndene og får lov at henstå i 30 minutter. Brøndene vaskes tre gange med PBS/BSA/Tween. Peroxidase, der er covalent koblet til gede-anti-kanin-IgG (Cappel Laboratories, Cochranville, PA) fortyndes 500 gange i 10 mM natriumphosphat, pH = 7,4, 0,15 M NaCl og 0,5% BSA, og aliquoter på 50 μ l sættes til hver brønd. Denne opløsning får lov at henstå i brøndene i 30 minutter ved stuetemperatur, hvorpå brøndene vaskes tre gange med PBS/BSA/Tween.

25

30

100 μ M Ethidiumbromid inkluderes i det fortyndede antiserum i brønde indeholdende ikke-covalent ethidium-DNA-kompleks og i ethidium-kontrolbrøndene. Alle vaskeopløsninger og reagenser, der er beskrevet ovenfor til behandling af disse brønde, indeholder 100 μ M ethidium.

Der fremstilles en peroxidasesubstratopløsning med følgende indhold:

20 mg o-phenylendiamin

5 ml 0,5 M NaHPO₄

12 ml 0,1 M natriumcitrat

35

0

13 ml vand

20 μ l 30%'s hydrogenperoxid.

5

75 μ l Af substratopløsningen tilsættes pr. brønd og får lov at reagere i 10 minutter ved stuetemperatur. Reaktionsblandingerne undertrykkes derpå ved tilsætning af 50 μ l 2,5 M svovlsyre. Dernæst bestemmes absorbanterne ved 488 nm med en Artek model 210-mikroliter pladefotometer (Dunatek, Alexandria, VA).

10

Normalt kaninserum anvendes som en kontrol og behandles som beskrevet for kanin-antiserum.

F. Resultater

15

Resultaterne fremgår af den følgende tabel A og viser, at antistof i kontrol-kaninserum ikke bindes i signifikante niveauer til hver af de overtrukne eller uovertrukne brønde. Det kan have en svag antistof-titer til enkeltstrenget DNA.

20

Antiserumet til den covalente ethidium-DNA har en meget høj titer til den covalente ethidium-DNA. En del af disse antistoffer bindes formentlig til ethidiumrester, der er koblet covalent til phosphatribosekæden. Denne konklusion er baseret på den iagttagelse, at titerne til det ikke-covalente ethidium-DNA-kompleks er meget lavere, jfr. tabel A.

25

Disse resultater viser, at antistoffer kan frembringes til ethidium-DNA-indskudskomplekset, hvilke antistoffer ikke krydsreagerer signifikant med nativ enkelt- eller dobbeltstrenget nucleinsyre.

30

35

Tabel A

| For-tynding | Absorbanser (488 nm) | | | | | | |
|---------------|----------------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|------------------|-------------------|--|
| | Puffer kontrol | Covalent ethidium-DNA | Dobbeltstrengt DNA | Ikke-covalent ethidium-DNA | Ethidium kontrol | Enkeltstrengt DNA | |
| Antiserum | | | | | | | |
| 50 | 0,067 | >1,2 | 0,126 | 0,825 | 0,049 | 0,283 | |
| 200 | 0,032 | >1,2 | 0,068 | 0,597 | 0,021 | 0,184 | |
| 800 | 0,022 | >1,2 | 0,067 | 0,30 | 0,016 | 0,174 | |
| Kontrol serum | | | | | | | |
| 50 | 0,038 | 0,053 | 0,091 | 0,031 | 0,023 | 0,245 | |
| 200 | 0,025 | 0,044 | 0,082 | 0,016 | 0,017 | 0,181 | |
| 800 | 0,017 | 0,034 | 0,054 | 0,015 | 0,016 | 0,190 | |

Noter:

- 1) Puffer-kontrollen indeholder ikke DNA på brøndene.
- 2) Dobbeltstrengt DNA indeholder kalvethymus-DNA på brøndene.
- 3) Ikke-covalent ethidium-DNA har kalvethymus dobbeltstrengt DNA på brøndene og 100 μM ethidium i reagens- og vaskeopløsningerne.
- 4) Ethidium-kontrol har ikke DNA på brøndene, men har 100 μM ethidium i reagens- og vaskeopløsningerne.
- 5) Den enkeltstrengede DNA har varme-denatureret kalvethymus-DNA overtrukket på brøndene.

P A T E N T K R A V .

1. Fremgangsmåde til detektering af en bestemt enkeltstrenget polynucleotidsekvens i et testmedium indeholdende enkeltstrengede nucleinsyrer, omfattende kombination af testmediet med (i) mindst en nucleinsyre-sonde indeholdende i det mindste én enkeltstrenget basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til den sekvens, der skal bestemmes i testmediet, under betingelser, der er favorable for hybridisering mellem den sekvens, der skal detekteres, og den komplementære sekvens i sonden, og bestemmelse af hybridiseret sonde, k e n d e t e g n e t ved, at der også tilsættes en nucleinsyre-indskudsforbindelse, der er i stand til binding til dobbeltstrenget nucleinsyre i form af indskudskomplekser, og den hybridiserede sonde detekteres ved tilsætning af et antistof eller et fragment deraf, der er i stand til at bindes til indskudskomplekser i det resulterende hybridiseringsprodukt, hvorpå antistoffet eller fragmentet deraf, der bliver bundet til sådanne komplekser, bestemmes.

20

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at indskudsforbindelsen kombineres med testmediet som en særskilt, fri forbindelse og ikke-covalent bindes med dobbeltstrenget nucleinsyre til dannelse af indskudskomplekser.

25

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at indskudsforbindelsen bindes kemisk til sonden i den enkeltstrengede komplementære region af sonden, hvorved der ved hybridisering dannes de nævnte indskudskomplekser i en sådan region.

30

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at antistoffet eller fragmentet deraf mærkes med en detekterbar kemisk gruppe, der fortrinsvis er en enzymatisk

35

aktiv gruppe, et fluorescerende middel, en chromophor, et luminescerende middel, en specifikt bindelig ligand eller en radioaktiv isotop.

5 5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at der anvendes en fast fase-hybridiseringstek-
nik, ved hvilken enten sonden eller den enkeltstrengede
nucleinsyre fra testmediet, der skal bestemmes, immobiliseres
på en fast bærer, og ved hvilken antistoffet, der associeres
10 med den faste bærer, bestemmes.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at der anvendes en fast fase-sandwich-hybridi-
seringsteknik, ved hvilken testmediet kombineres med første
15 og anden nucleinsyre-sonde, der hver omfatter i det mind-
ste én enkeltstrengt basesekvens, der er i det væsentlige
komplementær til en derfra forskellig del af den sekvens,
der skal detekteres, og ved hvilken en af sonderne er mærket,
og den anden er (a) enten immobiliseret på en fast bærer
20 eller (b) indeholder et bindingssted for et specifikt bin-
dingsstof, således at en sådan sonde efter hybridisering
samt det resulterende hybridiseringsprodukt kan immobiliseres
ved tilsætning af bindingsstof, der immobiliseres på en
fast bærer.

25

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at der anvendes en opløsningsfase-hybridise-
ringsteknik, ved hvilken sonden indeholder et bindings-
sted for et bindingsstof, og ved hvilken der efter hybri-
30 diseringstrinet tilsættes en immobiliseret form for et
sådan bindingsstof.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at indskudsmaterialet er valgt blandt acri-
35 dinfarvestoffer, phenanthridiner, phenaziner, furocouma-
riner, phentiaziner og quinoliner.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at testmediet indeholder en biologisk prøve,
der er blevet underkastet betingelser til frigørelse og
denaturering af nucleinsyrer, der er til stede deri.

5

10. Reagenssystem til detektering af en bestemt
enkeltstrenget polynucleotidsekvens i et testmedium til
brug ved fremgangsmåden ifølge krav 1, omfattende en nuclein-
syre-sonde indeholdende i det mindste én enkeltstrenget
10 basesekvens, der er i det væsentlige komplementær til den
sekvens, der skal detekteres, k e n d e t e g n e t ved,
at systemet yderligere indeholder en nucleinsyre-indskuds-
forbindelse samt et antistof eller et fragment deraf, der
er i stand til binding med indkudskomplekser omfattende
15 dobbeltstrenget nucleinsyre kompleksbundet med indskuds-
forbindelsen.

11. Reagenssystem ifølge krav 10, k e n d e t e g -
n e t ved, at antistoffet eller fragmentet deraf er mær-
20 ket med en detekterbar kemisk gruppe, der fortrinsvis er
en enzymatisk aktiv gruppe, et fluorescerende middel, en
chromophor, et luminescerende middel, en specifikt binde-
lig ligand eller en radioaktiv isotop.

25 12. Reagenssystem ifølge krav 10, k e n d e t e g -
n e t ved, at det yderligere omfatter en fast bærer til
immobilisering af enkeltstrengede nucleinsyrer fra test-
mediet.

30 13. Reagenssystem ifølge krav 10, k e n d e t e g -
n e t ved, at sonden er immobiliseret på en fast bærer.

35 14. Reagenssystem ifølge krav 10, k e n d e t e g -
n e t ved, at sonden indeholder et bindingssted for et
bindingsstof, og at reagenssystemet yderligere indeholder
en immobiliseret form af et sådant bindingsstof.

0

15. Reagenssystem ifølge krav 10, k e n d e t e g-
n e t ved, at indskudsforbindelsen er en særskilt, fri
forbindelse, i det væsentlige ikke-kompleksbundet med nu-
cleinsyrer.

5

16. Reagenssystem ifølge krav 10, k e n d e t e g-
n e t ved, at indskudsforbindelsen er kemisk bundet til en
enkeltstrenget region af sonden således, at duplex-dannel-
se i en sådan region resulterer i dannelsen af indskuds-
10 komplekser.

10

17. Reagenssystem ifølge krav 10 til anvendelse ved
en sandwich-hybridiseringsmetode, omfattende en anden nu-
cleinsyre-sonde, idet henholdsvis den første og den anden
15 sonde indeholder i det mindste én enkeltstrenget basese-
kvens, der er i det væsentlige komplementær til en der-
fra forskellig del af den sekvens, der skal detekteres,
og hvor enten en af sonderne er mærket med en detekterbar
kemisk gruppe, og den anden er immobiliseret, eller en af
20 sonderne er mærket med en detekterbar kemisk gruppe, og den
anden omfatter et bindingssted for et bindingsstof, idet
reagenssystemet yderligere omfatter en immobiliseret form
for et sådant bindingsstof.

20

25

18. Reagenssystem ifølge krav 10, k e n d e t e g-
n e t ved, at indskudsforbindelsen er valgt blandt acri-
dinfarvestoffer, phenanthridiner, phenaziner, furocoumari-
ner, phenthiaziner og quinoliner.

30

35

METODE TYPE I

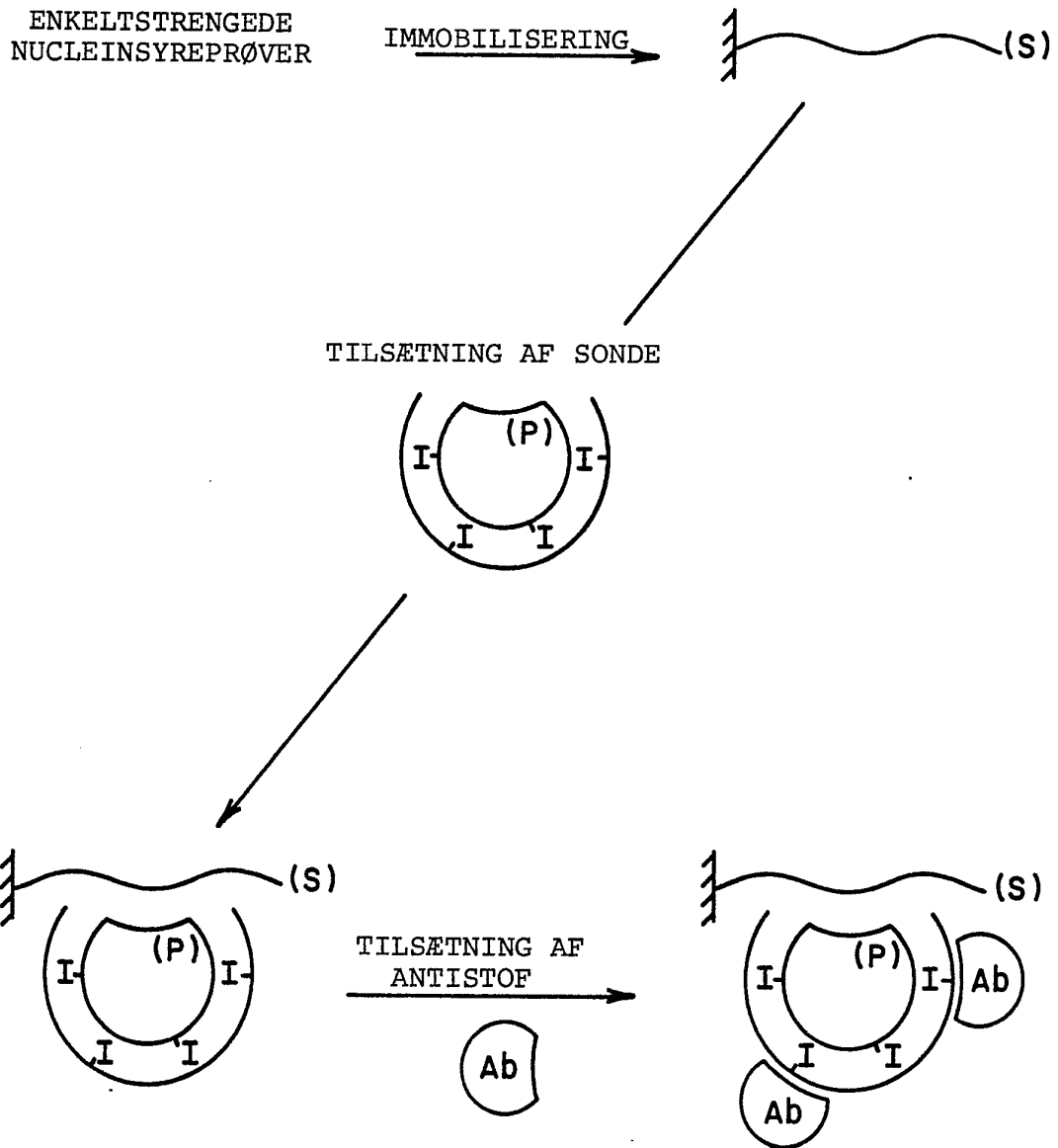
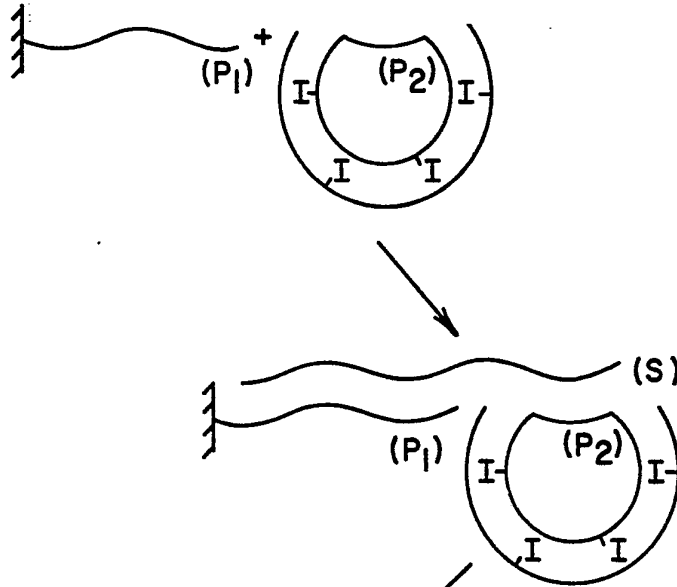


FIG. 2

METODE TYPE 2

ENKELTSTRENGET
NUCLEINSYREPRØVE

TILSÆTNING AF IMMOBILISEREDE
OG MÆRKEDE SONDER



TILSÆTNING AF ANTISTOF

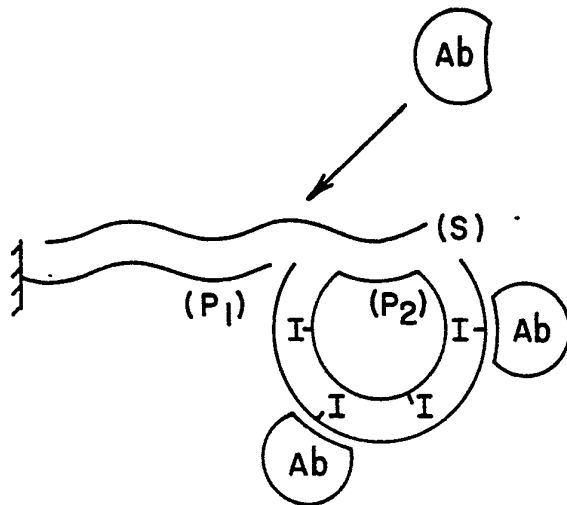


FIG. 3

METODE TYPE 3

ENKELTSTRENGEDE
NUCLEINSYREPRØVER

TILSÆTNING AF IMMOBILISERET SONDE



TILSÆTNING AF INDSKUD
OG ANTISTOF

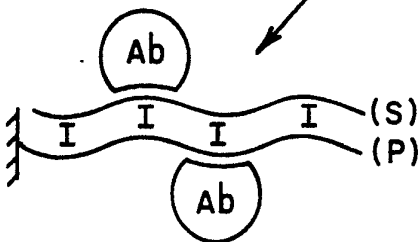
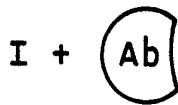
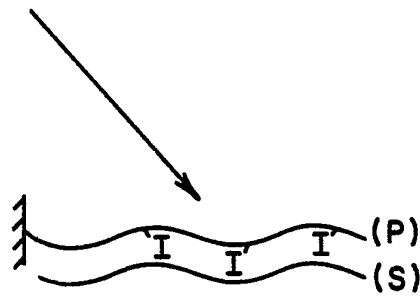


FIG. 4

METODE TYPE 4

ENKELTSTRENGEDE
NUCLEINSYREPRØVER

TILSÆTNING AF IMMOBILISERET,
MÆRKET SONDE



TILSÆTNING AF ANTISTOF

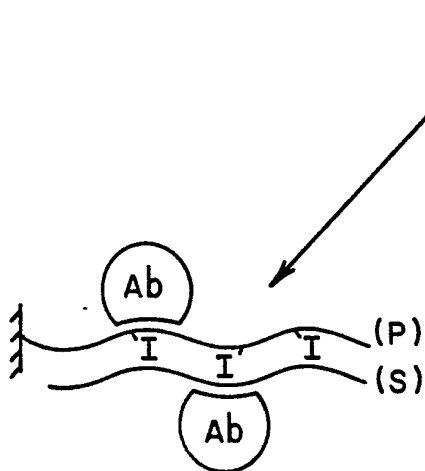


FIG. 5