

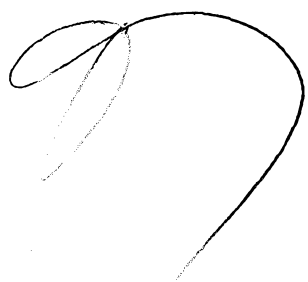
Degradálható nukleinsavpróbák, és eljárások nukleinsavak kimutatására

Kivonat

A találmány tárgyát enzimatis degradációra érzékeny nukleinsavpróbák képezik, valamint a találmány szerinti próbák alkalmazásán alapuló eljárások, célnukleinsav-szekvenciák kimutatására különböző mintákban.

Közelebbről, a találmány tárgyát olyan nukleinsavpróbák és nukleinsavpróba párok képezik, amelyek célspecifikus hibridizációs régiója vagy célszekvenciával komplementer régiója a kimutatható régióról degradációs eljárással leválasztható. A próbák megmaradó régiója egyszerűen kimutatható.

A degradálható próbák alkalmazásával a nukleinsav kimutatási eljárásokban jelentősen csökkenthető a háttér-specifikus vagy nem-specifikus jel keletkezése, és ezáltal javítható a jel-zaj viszony.



202 05 05

Degradálható nukleinsavpróbák, és eljárások nukleinsavak kimutatására

A találmány tárgyát enzimatis degradációra érzékeny nukleinsavpróbák képezik, valamint a találmány szerinti próbák alkalmazásán alapuló eljárások, célnukleinsav-szekvenciák kimutatására különböző mintákban.

Közelebbről, a találmány tárgyát olyan nukleinsavpróbák és nukleinsavpróba párok képezik, amelyek célspecifikus hibridizációs régiója vagy célszekvenciával komplementer régiója a kimutatható régióról degradációs eljárással leválasztható. A próbák megmaradó régiója egyszerűen kimutatható.

A degradálható próbák alkalmazásával a nukleinsav kimutatási eljárásokban jelentősen csökkenthető a háttérspecifikus vagy nem-specifikus jel keletkezése, és ezáltal javítható a jel-zaj viszony.

A nukleinsavak - dezoxiribonukleinsav (DNS) és ribonukleinsav (RNS) - a genetikai információ molekuláris hordozói. Végző soron, valamennyi protein a sejt nukleinsavai-



ban raktározott információ leolvasásának eredményeképp jön létre. Génnek funkcionális biológiai termék, például protein vagy RNS előállításához szükséges információt hordozó DNS-szegmenst nevezünk. A DNS szerepe biológiai információ hordozása, és mivel a sejtek tipikusan gének ezreit tartalmazzák, a DNS-molekulák mérete általában igen nagy. Az összes DNS hossza egyetlen humán sejtben körülbelül két méter, amelyet nukleotidok billiói alkotnak.

Eukarióta organizmusokban, a DNS elsősorban a sejt magjában található. De mivel a proteinszintézis a citoplazma riboszómáin megy végbe, a DNS-től eltérő molekulának kell a proteinszintézishez szükséges genetikai információt a sejtmagból a citoplazmába szállítania. RNS mind a magban, mind a citoplazmában előfordul, és a genetikai információt szállít a DNS-től a riboszómához. Többféle RNS-t különböztünk meg, amelyek más-más funkciót töltenek be. A riboszómális RNS (rRNS) a proteinek szintézisét végző riboszóma strukturális komponense. A hírvivő RNS (mRNS) az információt a génektől a riboszómához - ahol végső soron a megfelelő proteinek szintetizálódnak - szállító nukleinsav. Transzfer RNS-nek (tRNS) adapter molekulákat nevezünk, amelyek az mRNS által hordozott információt specifikus aminosav-szekvenciává fordítják le. Ezen felül, nagy számú különleges szerepet betöltő RNS ismert, amelyek további funkciókat látnak el a sejtben [Lehninger és mtsai.: Principles of Biochemistry, második kiadás, Worth Publisher, Inc. (1993)].



A kettősszálú spirált alkotó DNS-t két egymás köré csavarodott polinukleinsavszál alkotja. A polinukleotid szál minden egyes nukleotid egységét nitrogénbázis (A, T, C vagy G), dezoxiribóz cukor, és foszfát-csoport alkotja. A két polinukleotidszál orientációja antiparallel, amennyiben azok 5'-3' iránya ellentétes. A szálakat hidrogénkötések és hidrofób kölcsönhatások tartják össze. A bázispárok a DNS-ben purinbázisok, azaz adenin (A) és guanin (G), és pirimidinbázisok, azaz timin (T) és citozin (C). Az A T-vel képez párt két hidrogénkötésen keresztül, míg a G C-vel képez párt három hidrogénkötésen keresztül. Ez a bázispár-komplementaritás lényegi jellemzője a DNS-molekulának, és a bázisok méretére, alakjára és kémiai összetételére vezethető vissza. A kettős spirál geometriája olyan, hogy a purinnak mindig pirimidinnel kell párt képeznie. Ezen felül, a G mindig C-vel, az A mindig T-vel képez párt. Ez az egyszerű és elegáns struktúra felelős a kettős spirál különleges stabilitásáért.

A sejtekben uralkodó hőmérséklet és ionkoncentráció mellett, a DNS az A-T és G-C bázispárok közti hidrogénkötések révén megtartja kettősszálú struktúráját. A duplexek felbonthatók (egyes szálakra denaturálhatók) hevítéssel (tipikusan hígított sóoldatban, például 0,01 mol/l koncentrációjú NaCl-ben), vagy a pH 11 fölé történő emelésével. Amennyiben a hőmérsékletet csökkentjük és az oldat ionkoncentrációját emeljük, vagy annak pH-ját csökkentjük, a különálló szálak hibridizálódnak vagy újból összekapcsolódnak, és ismét kettősszálú struktúrák képződnek (ha azok



koncentrációja az oldatban elég nagy). Ez a tulajdonság az alapja a nukleinsav-hibridizációs technológiának. Nukleinsavak elegyében, csak komplementer szálak kapcsolódnak újra össze; a szálak újbóli összekapcsolódásának mértékét nem komplementer szálak jelenléte látszólag nem befolyásolja. A molekuláris hibridizáció létrejöhet komplementer DNS- vagy RNS-szálak között, vagy RNS-szál és DNS-szál között.

Oligonukleotid-próbák alkalmazásán alapuló hibridizációs technológiák alkalmazása a molekuláris biológiában gének (és RNS) kimutatására a technika állása szerint jól ismertek. Általánosságban, a próbákat úgy tervezik, hogy azok komplementer nukleinsav-szekvenciákat tartalmazó fragmentumokkal hibridizálódjanak. A képződő hibridek jelenlétét és méretét sugárzás (radioaktív próbák esetén), enzimatis reakció termékének (enzimmel jelölt próbák esetén), fluoreszcencia (fluoreszcens anyaggal jelölt próbák esetén) kimutatásával, és hasonló módokon mutathatjuk ki a jelölés természetétől függően. Különböző kísérleti körülményeket kell kidolgoznunk a próba és célzott nukleinsav által alkotott kettősszálú nukleinsav-komplexek stabilitásának meghatározásához és a próbák és nem célzott DNS-ek vagy RNS-ek közti nem-specifikus hibridizáció (háttér) csökkentéséhez. A számos változó miatt, amelyet figyelembe kell vennünk a hibridizációs vizsgálat kivitelezésénél, mint például az olvadási hőmérséklet vagy más denaturációs körülmények, hibridizációs hőmérséklet, sókoncentráció, pH, stb., a nukleinsavpróbák és nem célnukleinsav-szekvenciák közti nem-



specifikus kötődés lehetősége még mindig a különböző hibridizációs technológiák fő buktatója.

A molekuláris hibridizációs technológia egyik jelentős mértékben elterjedt alkalmazása az *in situ* hibridizáció. A mintában található specifikus DNS- vagy RNS-szekvenciákkal komplementer jelölt DNS-t vagy RNS-t állítunk elő. Az ilyen komplementer DNS-t vagy RNS-t oligonukleotid-próbának nevezzük. Ebben az eljárásban, specifikus célzott RNS-sel, például mRNS-sel, vagy meghatározott, a DNS-ben található natív vagy beépült génszekvenciákkal hibridizálódó oligonukleotid-próbákat tervezünk. Sejteket vagy szöveti metszeteket rövid ideig hőnek vagy savas miliónek teszünk ki, amely a sejtek tartalmát, ezen belül azok nukleinsavtartalmát üveg tárgylemezre, filterre vagy más anyagra fixálja. Ezután, a fixált sejteket vagy szöveteket a hibridizáltatáshoz jelölt, komplementer DNS- vagy RNS-próbákkal érintkeztetjük. Jelölőanyagként alkalmazhatunk radioizotópot, például ^{32}P -izotópot; fluoreszcens festéket, biotinezett nukleotid-analógokat, antigéneket, vagy bármely más szokásos jelölő technológiát. Inkubációt követően, a nem hibridizálódott jelölt DNS-t vagy RNS-t eltávolítjuk, míg a hibridizálódott komplexeket láthatóvá tesszük a specifikus RNS vagy DNS jelenlétének és/vagy lokalizációjának kimutatására az adott sejtekben vagy szöveti metszetekben. Bár ez a technológia igen elterjedt, folyamatos erőfeszítéseket kell tennünk az eljárás érzékenységének javítására és a jelölt próbák nem-specifikus kötődésének (háttér) csökkentésére



[Darnell és mtsai.: Molecular Cell Biology, második kiadás, Scientific American Books, Inc. (1990)].

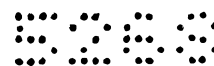
A technika állása szerint ugyancsak gyakran alkalmazott hibridizációs technológia a jelölt próbák hibridizáltatása immobilizált nukleinsavakkal. Számos eljárás áll rendelkezésre jelölt próbák szilárd hordozón, például nitrocellulóz membránokon vagy nylon membránokon immobilizált nukleinsavakhoz történő hibridizáltatására. Ezek az eljárások több vonatkozásban különböznek egymástól, például az alkalmazott oldószer vagy hőmérséklet; az oldat térfogata és a hibridizáció időtartama; a rázatás sebessége és módja; egyes reagensek, például Denhardt féle reagens vagy BLOTTO alkalmazása a próba szilárd hordozó felszínéhez történő nem-specifikus kötődésének megakadályozására; a jelölt próba koncentrációja és annak specifikus aktivitása; a nukleinsavak újbóli összekapcsolódását fokozó egyéb vegyületek, például dextranszulfát vagy polietilén-glikol alkalmazása; és a hibridizációt követő mosás sztringenciájának vonatkozásában.

A hagyományos vizsgálati eljárásokban, több különböző szert alkalmazhatunk a próba szilárd hordozó felszínéhez történő nem-specifikus kötődésének megakadályozására. Ilyen reagensek például a Denhardt féle reagens, a heparin, a zsírtalan száraz tejpor és hasonlók. Ezeket a reagenseket gyakran denaturált, fragmentált lazacspermával vagy élesztő DNS-sel, és detergenssekkel, például SDS-sel kombináljuk. Amennyiben nitrocellulóz membránokat alkalmazunk, a prehibridizációs és hibridizációs oldatok rendszerint blokkoló



ágenst is tartalmaznak. Abban az esetben, ha nylon membránokat alkalmaztunk a nukleinsavak immobilizálására, a blokkoló ágenst gyakran kihagyjuk a hibridizációs oldatból, mivel elfogadott, hogy a proteinek magas koncentrációban gátolják a próba hibridizálódását annak célpontjához. A háttérrel járó problémák minimalizálására előnyösen, a lehető legrövidebb ideig, a lehető legkisebb mennyiségű próba alkalmazásával végezzük a hibridizációt, bár nem mindig lehet a próbák nem-specifikus kötődését teljesen kiküszöbölnünk, különösen olyan körülmények mellett, amikor a kimutatható nukleinsavak mennyisége alacsony [Sambrook és mtsai.: „Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)].

A nukleinsav hibridizáció egyben az egyik legmegbízhatóbb módszer cDNS-génkönyvtárak szűrésére, keresett klónok azonosítására. A különböző eljárásokban különböző hosszúságú és specifitású próbákat alkalmaznak. Az úgy nevezett homológ próbák kivánt cDNS pontos nukleotidszekvenciájának legalább egy részét tartalmazzák. Ezek különböző módon alkalmazhatók, például, már rendelkezésre álló részleges cDNS-klónt alkalmazhatunk teljes hosszúságú klón azonosítására cDNS-génkönyvtárban. Homológ próbákat sztringens körülmények mellett hibridizáltatunk. Úgy nevezett részlegesen homológ próbákat a próbaszekvenciához hasonló, de azzal teljesen nem megegyező cDNS-klónok azonosítására alkalmazhatunk. Például, amennyiben ugyanazt a gént más fajból már klónozták, vagy ugyanabból a fajból hasonló gént klónoztak, kísérletes úton meghatározhatjuk, hogy a nukleotidszek-



vencia elegendő mértékben konzervált-e cDNS-génkönyvtár hibridizációval történő szűréséhez. Olyan körülményeket kell kidolgoznunk, amelyek lehetővé teszik, hogy a már előzőleg klónozott gént próbaként alkalmazzuk a kérdéses cDNS-sel kombinálva, a nem-specifikus szignálképződésből eredő háttér-hibridizáció túlzott gátló hatása nélkül. Hibridizációs vizsgálatokra és hibridizációs körülményekre vonatkozó részletes útmutatást találunk Sambrook és mtsai. kézikönyvében (lásd fent).

Több különböző szert alkalmazhatunk a próba szilárd hordozó felszínéhez történő nem-specifikus kötődésének megakadályozására (lásd fent). Javított eljárásokat kell azonban kidolgoznunk nukleinsavpróbák hibridizációs technológiákban történő alkalmazására, amelyek növelik a szignál-zaj arányt, és csökkentik a nem-specifikus szignál keletkezését. Találmányunkkal ezt az igényt kívántuk kielégíteni.

Az alábbiakban összefoglaljuk a találmány szerinti megoldás lényegét.

A találmány tárgyát képezik degradálható nukleinsavpróbák, valamint vizsgáló eljárások, amelyekben a próbák alkalmazásával célnukleinsav-szekvenciák jelenlétét mutatjuk ki mintákban. A degradációs eljárás célja a nem-specifikus szignál keletkezésének csökkentésére.

A találmány tárgyát képezi eljárás célnukleinsav-szekvencia kimutatására a találmány szerinti degradálható próbák alkalmazásával. Előnyösen, az eljárás oldatban végzett vagy *in situ* nukleinsav-hibridizációs eljárás, amelyben kémiai vagy enzimatis degradációra érzékeny nukleinsav-



próbákat alkalmazunk. A fenti eljárásban: (1) jelölt, degradálható nukleinsavpróbát (-próbákat) hibridizáltatunk célzott szekvenciával, miáltal a próbából (próbákból) cél-specifikus termék jön létre; (2) a célszekvencia komplementer régióját degradáljuk vagy leválasztjuk próba (próbák) jelölt régiójáról; és (3) kimutatjuk a jelölt régió jelenlétét.

A találmány egy szempontja szerint, a találmány tárgyát eljárás képezi célnukleinsav-szekvencia kimutatására mintában, amelyben legalább egy nukleinsavpróba párt hibridizáltatunk a célzott nukleinsavval. A próbák két nukleinsavrégiót hordoznak, amelyek - miután a próbák a célnukleinsav-szekvencia szomszédos régióival bázispárképzés révén kapcsolódtak -, terminális próba-próba ágat vagy szárat képeznek. A próba szárat vagy próba-próba ágat képezni képes régióit „szárrégióknak” vagy „próba-próba régióknak” is nevezzük. A próbák legalább egy keresztkötést létrehozó komponenst is tartalmaznak a próbapár legalább egyik tagjának szárrégiójában elhelyezve. A próbapár második tagjának szárrégiója reagáló anyagot tartalmaz, amely kovalens kötést képes létrehozni az első próba szárrégiójának keresztkötő komponensével. További lehetőség szerint, mindkét szárrégió tartalmazhat keresztkötést létrehozó komponenst, amely kovalens kötést képes létrehozni a két keresztkötő komponens közti reakcióval, például dimerizáció révén. A kovalens kötés a próbák és a célnukleinsav-szekvencia közti bázispárképződés követően jön létre, ezáltal a próbapár szárrégiói egymással permanens módon keresztkötéssel kap-



csolódnak. Ezen felül, a próbák legalább egyik szárrégiója kimutatható egységet vagy szignálkeltő egységet tartalmaz a szárrégió végéhez kapcsoltn.

A szignál a szárok közti keresztkötés kialakulása után keletkezik és mutatható ki, amely utóbbi viszont a próbák és a célnukleinsav-szekvencia közti bázispárképződést követően jön létre. A nukleinsavpróbákat úgy tervezzük meg, hogy a próba célspecifikus hibridizációs régiója vagy célszekvenciával komplementer régiója degradációs eljárással leválasztható legyen a kimutatható, jelölt régióról. A próbák fennmaradó régiója tehát a szárat és a szignált tartalmazza. A szétválasztás célja az, hogy a háttérspecifikus vagy nem-specifikus szignál keletkezésének csökkentésével javítsuk a szignál-zaj arányt.

A találmány egy további szempontja szerint, a találmány tárgyát képezik módosított vagy módosítatlan nukleotidrégiót magában foglaló nukleinsav-szekvenciát tartalmazó nukleinsavpróbák, ahol a nukleinsavrégiókat úgy tervezzük meg, hogy azok - miután legalább két próba bázispárképződéssel kötődött a célnukleinsav-szekvencia szomszédos régióihoz -, próba-próba ágat vagy szárat képezzenek. A próba szárat vagy próba-próba ágat képezni képes régióit „szárrégióknak” vagy „próba-próba régióknak” is nevezzük. A próbák legalább egyikének szárrégiója kimutatható egységet, például jelölő anyagot is tartalmaz a szárrégió végéhez kapcsoltn. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a próbapár egyik tagjának szárrégiója módosított vagy módosítatlan purin nukleozidokat vagy purin nukleozid származéko-



kat, például módosított vagy módosítatlan adenin nukleozidokat, és legalább egy keresztkötést létrehozó komponenst tartalmaz; míg a próbapár másik tagjának szárrégiója módosított vagy módosítatlan pirimidin nukleozidokat vagy pirimidin nukleozid származékokat tartalmaz, amelyek reagáló anyagként funkcionálnak a keresztkötést létrehozó komponens számára. Reagáló anyagként előnyösen módosított vagy módosítatlan timidin egységeket alkalmazhatunk.

A próbák a cél régió szomszédos régióival hibridizálódnak, és háromágú elágazást tartalmazó próba-próba ágat vagy szárat képeznek. Következésképp, miután a próbák a célzott nukleinsav szomszédos régióival bázispárokat képeztek, a próbapár szárrégiói keresztkötéssel kapcsolódnak, és kialakul a terminális szár vagy próba-próba ág. A kovalens keresztkötés kialakulását kiválthatjuk fénybesugárással vagy más módon. Ezután, a keresztkötéssel összekapcsolt szárat leválasztjuk a célszekvenciával komplementer régióról, majd kimutatjuk. Ebben az értelemben „keresztkötést létrehozó komponensen” nem nukleozid természetű, stabil, fotokémiai úton aktiválható komponenst értünk, amely kumarinil származékokat tartalmaz. A keresztkötést létrehozó komponensekkel reagáló anyaggal, például módosított vagy módosítatlan pirimidin nukleozidokkal vagy nukleozid származékokkal reagáló keresztkötést létrehozó komponensek lehetnek például kumarin származékok, például (1) 3-(7-kumarinil)glicerín; (2) pszoralen vagy annak származékai, mint például 8-metoxi-pszoralen vagy 5-metoxi-pszoralen; (3) cisz-benzodipiron vagy annak származékai; (4) transz-benzodipiron; vagy



(5) fuzionáltatott kumarin-cinnolin gyűrűrendszereket tartalmazó vegyületek. Valamennyi említett molekula tartalmazza a szükséges keresztkötő csoportot a megfelelő orientációban és megfelelő távolságra ahhoz, hogy keresztkötést hozzon létre egy nukleotiddal. Ezen felül, valamennyi fenti molekula kumarinszármazék, amennyiben valamennyi tartalmazza a kumaringyűrű-rendszert, amely a molekula többi részének alapjául szolgál.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a próbapár egyik tagjának szárrégiója módosított vagy módosítatlan purin és/vagy pirimidin nukleozidokat vagy nukleozid származékokat és egy első keresztkötést létrehozó komponenst tartalmaz, míg a próbapár másik tagjának szárrégiója módosított vagy módosítatlan purin és/vagy pirimidin nukleozidokat vagy nukleozid származékokat és egy második, ugyancsak keresztkötést létrehozó komponenst tartalmaz. Miután a próbák a célzott nukleinsav szomszédos régióival bázispárokat képeztek, a próbapár szárrégiói a keresztkötést létrehozó komponensek fénybesugárással kiváltott reakciója (például dimerizációja) révén keresztkötéssel kapcsolódnak, és kialakul a szár vagy próba-próba ág. Ebben a vonatkozásban, „keresztkötést létrehozó komponenseken” nem nukleozid természetű, stabil, fotokémiai úton aktiválható komponenseket értünk, amelyek aril-olefinszármazékokat tartalmaznak. Az aril-olefin kettőskötése fotokémiai úton aktiválható csoport, amely megfelelő reagáló anyaggal, például a próba-próba ág szembenálló szálában elhelyezett másik aril-olefin származékkal kovalens módon keresztkötést létesít. Ennek



megfelelően, az aril-olefin kettőskötésének megfelelő orientációban és megfelelő távolságra kell lennie ahhoz, hogy - miután a próbák a célzott nukleinsav szomszédos régióival bázispárokat képeztek - keresztkötést hozzon létre egy, a szembenálló próba-próba régióban elhelyezett nem-nukleozid természetű reagáló anyaggal.

A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja szerint, a próbák célspecifikus hibridizációs régióját vagy célszekvenciával komplementer régióját a kimutatást megelőzően degradációs reakcióval leválasztjuk a próbák kimutatható, jelölt régiójáról. Célunk az volt, hogy fenntartsuk a kovalens kapcsolódást a két próba jelölt próba-próba ágat vagy szárat képző végei közti keresztkötésen át, egyúttal eltávolítsuk a próbák részeit, elsősorban a próbák célszekvenciával komplementer régióit a keresztkötés helyéig. Közelebbről, a próbák célszekvenciával komplementer régióját degradáljuk vagy leválasztjuk (például levágjuk) a próbák szárrégiójától. A degradációt vagy lehasítást végezhetjük kémiai vagy enzimatikus úton; a kiválasztott eljárás a próbák összetételétől függ. A próbák célszekvenciával komplementer régiója tartalmazhat ribonukleotidokat, dezoxiribonukleotidokat, vagy a próbákban a nukleotid egységet (egységeket) helyettesítő, természetben elő nem forduló szubsztituenseket. A rendszert végső soron úgy tervezzük meg, hogy olyan próbákat kapjunk, amelyek szárrégiója rezisztens a próba célszekvenciával komplementer régiójának leválasztására vagy eltávolítására alkalmazni kívánt degradációs vagy hasító eljárásra. A degradációt követően, a próbák le-



választott és kimutatható régióját a szárrégió és a jelölés alkotja, amelyet ezután lemérünk (lásd az alábbiakban), és kvantitálunk (mennyiségileg meghatározunk). A célszekvenciával komplementer régió leválasztása a próba kimutatható régiójáról csökkenti a próbák nem-specifikus kötődését, ezáltal javítja a szignál-zaj arányt. A a háttér-specifikus vagy nem-specifikus szignál keletkezése tehát jelentősen csökken.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a próbák szárrégiója detektálható egységet és befogó egységet tartalmaz a szárrégiók végéhez kapcsoltn. A kimutatható egység bármely szignálriporter csoport, a befogó egység pedig bármely befogó csoport lehet. Közelebbről, a befogó csoport lehet biotin, és a szignálriporter csoport lehet fluoreszcein. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a próbák egyik vagy mindkét szárrégiója kimutatható egységet tartalmaz a szárrégió végeihez kapcsoltn. A kimutatható egységek lehetnek jelölőanyagok, például fluorforok, radioizotópok, antigének vagy enzimek. Az említetteken felül, a jelölőanyagokat megtervezhetjük úgy, hogy a két jelölőanyag közti kölcsönhatás kimutatható szignál keletkezéséhez vezessen.

A találmány egy még további előnyös megvalósítási módja szerint, az alábbi szekvenciájú próbák valamelyikét alkalmazzuk: 1. azonosítószámú szekvencia, 2. azonosítószámú szekvencia, 3. azonosítószámú szekvencia, 4. azonosítószámú szekvencia, 5. azonosítószámú szekvencia, 6. azonosítószámú



szekvencia, 7. azonosítószámú szekvencia vagy 8. azonosítószámú szekvencia.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezi eljárás a célszekvenciák, például, de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk, teljes hosszúságú gének, diagnosztikus markergének, expresszióval jelölt szekvenciák („*expressed sequence tags*”, EST-k; megfelelő pontossággal lokalizált DNS-ről átíródó mRNS-szekvencia-részleteknek megfelelő szekvenciák), egyes nukleotid polimorfizmusok (“*single nucleotide polymorphisms*”; SNP-k), genomi DNS-ek, cDNS-ek, cccDNS-ek, rekombináns gének, mRNS-ek vagy rRNS-ek kimutatására.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

a) Meghatározások és általános paraméterek

Az alábbi meghatározásokat a leírásban használt kifejezések jelentésének szemléltetésére, azok könnyebb értelmezhetősége kedvéért adjuk meg, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettekre korlátoznánk

“Polinukleotidon”, “oligonukleotidon”, “nukleinsavon” vagy “nukleinsav-szekvencián” például, de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk, a természetes nukleozidbázisokat, azaz adenint, guanint, citozint, timint és uracilt tartalmazó mRNS-t, cDNS-t, cccDNS-t, genomi DNS-t, valamint szintetikus DNS- és RNS-szekvenciákat, valamint egy vagy több módosított vagy nem módosított nukleozidot tartalmazó szekvenciákat értünk. A “nukleinsav” vagy “nukleinsav-szekvencia” kifejezés egyaránt vonatkozik polinuk-



leotidokra és oligonukleotidokra. A fenti kifejezések használata nem tartalmaz korlátozást a polinukleotidok vagy oligonukleotidok hosszára, vagy szintetikus voltára.

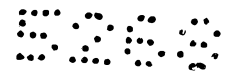
„Egy próba célspecifikus hibridizációs régióján” vagy „egy próba célszekvenciával komplementer régióján” nukleinsav próba szekvenciát értünk, amely hibridizációs körülmények mellett - azaz pufferelt (pH=7,0-7,5), vizes sóoldatban (például 1 mmol/l - 2 mol/l koncentráció-tartományba eső NaCl oldatban), szobahőmérsékleten - képes hidrogénkötéseket kialakítani egy másik nukleinsav-szekvenciával, közelebbről, egy specifikus célszekvenciával. Bár a hibridizációs körülmények függenek az adott polinukleotid hosszától, azokat tipikusan legalább egy kation, például Na⁺, K⁺, Mg²⁺ vagy Ca²⁺ jelenléte, neutrális pH, és 55°C alatti hőmérséklet jellemzi. Bár a polinukleotiddal hibridizálódó szekvenciák előnyösen körülbelül 90-100% komplementaritást mutatnak a polinukleotiddal, ha a szekvenciák elég hosszúak, magas sókoncentrációjú oldatban és/vagy alacsony hőmérsékleten, 70%-os vagy akár 50%-os komplementaritást mutató szekvenciák is hibridizálódhatnak. A hibridizálódó szekvenciák legalább 10 nukleotid hosszúságú, előnyösen körülbelül 15-30 nukleotid hosszúságú, és nem több mint körülbelül 1000 nukleotid hosszúságú, a cél polinukleotiddal komplementer szekvenciák.

Az „eljárás célnukleinsav-szekvencia kimutatására valamely mintában” kifejezésben „mintán” szövetnedveket vagy testnedvet, vagy izolált mintát értünk. A leírás szerinti értelemben „szöveten” értünk bármely biológiai anyagot,



amelyet alkothat egy sejt, több sejt, sejtek agglomerátuma vagy teljes szerv. A leírás szerinti értelemben a szövet tartalmazhat normális vagy rendellenes (például tumoros) sejtet vagy sejteket. „Testnedven” értünk bármely, valamely organizmusból vagy annak szövetéből extrahált, vagy az által exkretált vagy szekretált folyékony anyagot. A testfolyadék nem tartalmaz szükségszerűen sejteket. A leírás szerinti értelemben például, de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk, testfolyadékon értünk teljes vért, szérumot, plazmát, vizeletet, cerebrospinális folyadékot (liquort), könnyet és amnionfolyadékot. „Izolált mintáról” akkor beszélünk, ha a mintát tartalmazó anyag eredeti környezetéből (például - amennyiben az a természetben előfordul - természetes környezetéből) el lett távolítva. Például, az élő állatban vagy szöveti metszetben jelenlévő, természetben előforduló polinukleotidokat nem tekintjük izoláltaknak; a minta oligonukleotidok jelen lehetnek azonban izoláltan oldatban, azok eredeti környezetén kívül, vagy vektor vagy készítmény részeként, és ilyenkor azokat izoláltaknak tekintjük, mivel az ilyen vektor vagy készítmény nem képezi a természetes környezet részét.

„Kimutatható egységnek” szignálkeltő egységet, szignálriporter csoportot, jelölőanyagot vagy jelölést nevezünk, amely a nukleinsav-szekvenciához vagy próbához kapcsol, és amely elősegíti a célnukleinsav-szekvencia, például DNS vagy RNS jelenlétének kimutatását vagy meghatározását a mintában. A kimutatható egység lehet egy vagy több, egymagában vagy egymással kombinációban funkcionáló



nukleinsavpróbához kapcsolt. A kimutatható egység lehet közvetlenül kimutatható, például radioizotóp, fluorofor vagy közvetlen enzimes jelölés (például a próbával közvetlenül konjugált enzim); vagy lehet közvetett módon kimutatható, például antigén, amelyhez az enzim valamely szubsztrátját kimutatható terméké alakító enzim-ellenanyag konjugátumot kötünk. Az említetteken felül, alkalmazhatunk fluoreszcenciát, vagy más kimutatható egységet.

A leírás szerinti értelemben „befogó egységen” vagy „befogó csoporton” a kimutatható egységgel kombinációban működő egységet értünk, ahol a próbapárban az egyik nukleinsavpróba kimutatható egységgel van jelölve, és a próbapárban a másik próba befogó egységgel van jelölve. A befogó egység lehet antigén, receptorszubsztrát vagy biotin, és annak szerepe az, hogy a terméket ellenanyagot, receptort vagy avidint vagy streptavidint tartalmazó szilárd hordozóhoz kösse. A termék azáltal lesz befogva, hogy a befogó csoport a termékhez van kapcsolva. Az alkalmazott egységektől függően, a biotin avidinhez vagy streptavidinhez, az antigén ellenanyaghoz kötődik, vagy a receptor szubsztrát a receptorhoz kötődik. „Degradálható próbán” nukleinsav-szekvenciát vagy próbát értünk, amelyben a kimutatható régió kémiai vagy enzimatiszterikus úton különválasztható a próba célszekvenciával komplementer régiójától, ezáltal, a háttér-specifikus vagy nem-specifikus szignál keletkezésének csökkentésével javítható a szignál-zaj arány. A próbapár kimutatható és leválasztható régióját „próba-próba ág” vagy „szárnak” is nevezzük. A próba-próba ág vagy szár az egyes



próbák célszekvenciával nem komplementer részét tartalmazza, amelyet azonban úgy terveztünk, hogy egymással lépjenek kölcsönhatásba (lásd az alábbiakban). Degradálható próbákat alkalmazhatunk például nukleinsav-kimutatásra, például hibridizációs vizsgálatokban. Dezoxiribonukleotidokat lebontó vagy hasító enzimaktivitású szerekként például, de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk, alkalmazhatunk nukleázokat, például DNázI-enzimet, micrococcus nukleázt, S1-nukleázt, mung-bab nukleázt; vagy exonukleázokat, például exonukleáz III enzimet. Ribonukleotidokat lebontó vagy hasító enzimaktivitású szerekként alkalmazhatunk ribonukleázokat, például RNázA, S1, foszfodiészteráz I, foszfodiészteráz II, vagy RNáz H enzimeket. Kémiai úton különválasztó szerekként alkalmazhatunk például, de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk, RNS-t lebontó kémiai vegyületeket, például nátrium-hidroxidot; vagy DNS-t degradáló kémiai vegyületeket, például természetes antibiotikumokat (például bleomycint vagy neocarzinostatint), vagy szintetikus reagenseket (például metidiumpropil-EDTA vas (II) komplexeket).

„Keresztkötést létrehozó komponens” kifejezésen a próba nukleinsav-szekvenciájában elhelyezett kémiai komponenst értünk. A keresztkötést létrehozó komponenst adott esetben elhelyezhetjük a próbapár vagy próbakészlet egyik tagjának próba-próba régiójában vagy szárrégiójában, ahol az egyik próba keresztkötést létrehozó komponenst, a másik próba egy vagy több módosított vagy módosítatlan purin vagy pirimidin nukleozidot vagy származékot tartalmaz, amely/amelyek rea-



gáló anyagként funkcionál/funkcionálnak a keresztkötést létrehozó komponens számára. A keresztkötést létrehozó komponens úgy tervezzük meg, hogy - miután a próbák bázispárképződés révén kapcsolódtak a célnukleinsav-szekvenciával -, kovalens módon kötődjön a reagáló anyaggal. További lehetőség szerint, mindkét szárrégió tartalmazhat keresztkötést létrehozó komponens, amelyek - miután a próbák bázispárképződéssel kapcsolódtak a célnukleinsav-szekvenciával -, egymással reagálva képesek kovalens kötést létrehozni (például dimerizáció révén). A találmány szerinti megoldással összhangban alkalmazható keresztkötést létrehozó komponensek részletes ismertetését találjuk például a WO 00/27860 számú nemzetközi közzétételi iratban, vagy a 6 005 093, 5 082 934 és 4 826 967 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban.

A „próba-próba ág” vagy „szár” kifejezéseket egymással felcserélhető módon használjuk, és azok a próbapár olyan nukleinsav-régiójára vonatkoznak, amelyek között - miután a próbák a célnukleinsav-szekvencia szomszédos régióival bázispárokat képeztek - fénybesugárzással keresztkötés alakul ki, majd leválasztásra kerülnek az egyes próbák célspecifikus régiójáról. A próba szárat vagy próba-próba ágot képezni képes régióit „szárrégióknak” vagy „próba-próba régióknak” is nevezzük. A szárrégiók először nem kovalens módon, hidrogénkötésekkel, sóhidakkal és/vagy Van der Waal kölcsönhatásokkal lépnek kölcsönhatásba. A szárok közti keresztkötés azután jön létre, hogy a próbapár hibridizálódott a komplementer célszekvenciával. A keresztkötés azért



jöhet létre, mert a próbák legalább egy keresztkötést létrehozó komponenst tartalmaznak a próbapár egyik szárrégiójában elhelyezve. A próbapár másik szárrégiója reagáló anyagot tartalmaz, amely - - miután a próbák bázispárokat képeztek a célnukleinsav-szekvencia szomszédos régióival - kovalens módon kapcsolódik a szárrégió keresztkötést létrehozó komponensével. További lehetőség szerint, mindkét szárrégió tartalmazhat keresztkötést létrehozó komponenst, amelyek - miután a próbák bázispárképződéssel kapcsolódtak a célnukleinsav-szekvenciával -, fotokémiai reakció révén (például dimerizációval) képesek kovalens kötést létrehozni egymással. A próba szárrégiói nem hibridizálódott formában vannak jelen egészen addig, amíg a próba célszekvenciához kötődő régiója nem hibridizálódott a komplementer célszekvenciával. Adott próba szárrégiója tehát megkülönböztethetetlen a próba többi részétől addig, amíg a szár ki nem alakult. A próba-próba ág, szár, próba-próba régió(k) és szárrégió(k) kifejezéseket tehát anélkül használjuk, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk. A kifejezések használatával a régiók méretét vagy hosszát nem kívánjuk korlátozni. Szakember számára nyilvánvaló, hogy a fenti régiók változatai szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. Amennyiben például DNS- vagy RNS-próbákat kívánunk alkalmazni RNS kimutatására, a keletkező próba-próba ág vagy szár esetleg nem választható le úgy, hogy csak a szárrégió struktúrája maradjon vissza. Bár a célszekvenciával komplementer régió lényegében degradálódik, a célszekvencia néhány RNS-bázisa a szárral kapcsolt maradhat, ami célkitűzé-



seink elérését nem befolyásolja. Más eljárás szerint, ha DNS- vagy RNS-próbákat alkalmazunk DNS kimutatására, a keletkező próba-próba ág vagy szár esetleg szintén nem választható le úgy, hogy csak a szárrégió struktúrája maradjon vissza. Hasonlóképp a már említettekhez, a célszekvenciával komplementer régió lényegében degradálódik, de a célszekvencia néhány DNS-bázisa a szárral kapcsolt maradhat, ami célkitűzéseink elérését nem befolyásolja. Ugyanez érvényes olyan esetekre, amikor a próbák vagy célszekvenciák módosított nukleinsavakat, nukleinsav-származékokat vagy nukleinsav-analógokat tartalmaznak. A keresztkötéssel összekapcsolt próba-próba ág vagy szár leválasztható célszekvenciával komplementer régióról, majd kimutatható, tekintet nélkül a próba-próba ág vagy szár hosszára és méretére.

Az „N” rövidítés egy vagy több módosított vagy módosítatlan nukleinsavat, nukleinsav-származékot vagy nukleinsav-analógot jelöl. A találmány tárgyát képezik például módosítatlan purin és/vagy pirimidin nukleozidokat vagy nukleozid-származékokat tartalmazó próbák, ahol N a nukleozidok számát jelenti. Módosítatlan nukleozidok például a timin vagy timidin, citozin, adenin, guanin és uracil. Ugyancsak a találmány tárgyát képezik módosított purin és/vagy pirimidin nukleozidokat vagy nukleozid-származékokat tartalmazó próbák. Hasonlóképp, N értékkel megadhatjuk a módosított nukleozidok számát. Módosított nukleozidok például a dezoxitimidin, dezoxitimidin-foszfát, 5-fluorouracil és hasonló. „N” megadásával a régiók méretét vagy hosszát



nem kívánjuk korlátozni. „N(a)” vagy „N(b)” a próbában vagy célszekvenciában jelenlévő módosított vagy módosítatlan nukleinsavak, nukleinsav-származékok vagy nukleinsav-analógok számát jelenti. „A” és „b” bármely egész szám lehet, tehát bármilyen számú nukleozidot jelölhet. Amennyiben például „a” értéke 0 és 20 közti érték ($a = 0-20$), N(a) jelentése 0 és 20 közt bármely számú módosított vagy módosítatlan nukleinsav, nukleinsav-származék vagy nukleinsav-analóg. Szakember számára nyilvánvaló, hogy N(a) és N(b) a próbában vagy célszekvenciában jelenlévő elemek hozzávetőleges számát jelenti. Az N(a) és N(b) kifejezéseket tehát anélkül használjuk, hogy a szekvenciák méretét vagy hosszát túlzott mértékben korlátozni kívánnánk.

b) Hibridizációs vizsgálatok degradálható próbák alkalmazásával

A találmány tárgyát képezik oldat alapú és *in situ* nukleinsav hibridizációs vizsgálatok kémiai vagy enzimatis degradációra érzékeny nukleinsavpróbák alkalmazásával. Célul tűztük ki eljárás kidolgozását célszekvenciák kimutatására, amelyben nukleinsavpróbák szekvencia-specifikus hibridizációs tulajdonságát használjuk ki, és amelyben a próbából (próbákból) célspecifikus terméket állítunk elő, a próba (próbák) célszekvenciával komplementer régióját degradáljuk vagy leválasztjuk, és a célspecifikus termék jelenlétét kimutatjuk. A degradációs reakcióval célunk az, hogy a háttér-specifikus vagy nem-specifikus szignál keletkezésének csökkentésével javítsuk a szignál-zaj arányt.



A találmány egy szempontja szerint, a találmány tárgyát képezi eljárás célnukleinsav-szekvencia kimutatására mintában, ahol legalább egy nukleinsavpróba párt hibridizáltatunk a célnukleinsav-szekvenciával. Az eljárásban, a célnukleinsav-szekvenciát a bázispároképződés szempontjából megfelelő közegben érintkeztetjük a próbákkal vagy próbapárokkal (lásd az alábbiakban). A nukleinsav lehet egyszálú vagy kettősszálú DNS vagy RNS, vagy más molekula, amely bázispároképzésre képes pirimidin- és/vagy purinbázisokat tartalmaz.

Közelebbről, a találmány egy szempontja szerint, a találmány tárgyát képezik a degradálható próbák. A próbák próba-próba ágot vagy szárat képeznek, miután legalább két próba bázispár-képződéssel kapcsolódott a célzott nukleinsav szomszédos régióival. Előnyösen, a nukleinsavpróbák módosított vagy módosítatlan nukleinsavrégiókat hordozó nukleinsav-szekvenciákat tartalmaznak, amelyeket úgy tervezünk meg, hogy - miután legalább két próba bázispároképződéssel kapcsolódott a célzott nukleinsav szomszédos régióival -, a próba-próba ágot vagy szárat alakítsák ki. A próbapár tagjai a szárat képező régió kivételével komplementerek a célszekvenciával. Mindegyik próba tartalmaz szárrégiót, amely nem kötődik a célszekvenciával. A szárrégiók nem hibridizálódott formában vannak jelen egészen addig, amíg a próba célzott nukleinsavszekvenciához kötődő régiója nem hibridizálódott a komplementer célszekvenciával. Következésképp, adott próba szárrégiója megkülönböztethetetlen a próba többi részétől addig, amíg a szár ki nem alakult. A szárrégiók



először nem kovalens módon, hidrogénkötésekkel, sóhidakkal és/vagy Van der Waal kölcsönhatásokkal lépnek kölcsönhatásba. Miután a próba hibridizálódott a célnukleinsav szomszédos régióival, a próbapár szárrégiói közt keresztkötés jön létre, és kialakul a szárrégió. A keresztkötés azért jöhet létre, mert a próbák legalább egy keresztkötést létrehozó komponenst tartalmaznak a próbapár egyik szárrégiójában elhelyezve. A próbapár másik szárrégiója reagáló anyagot tartalmaz, amely kovalens módon kapcsolódik a szárrégió keresztkötést létrehozó komponensével. További lehetőség szerint, mindkét szárrégió tartalmaz keresztkötést létrehozó komponenst, amelyek fotokémiai reakció révén (például dimerizációval) képesek kovalens kötéssel kapcsolódni. Megfelelő ideig tartó inkubációt követően, a próbák hibridizálódnak a mintában található célzott nukleinsavval, és a keresztkötést létrehozó rendszer aktiválódik kovalens kötés kialakítását eredményezve a két próba között. A kovalens kötés tehát azután jön létre, hogy a próba bázispárképződés révén kötődött a célnukleinsav-szekvenciához, és ezáltal, a kötés a szárrégiókat permanens módon összekapcsolja egymással. Ezután, a keresztkötéssel kapcsolódó szárat leválasztjuk a célszekvenciával komplementer régióról, majd kimutatjuk.

Mindegyik próba legalább 10, előnyösen körülbelül 15-30, és előnyösen nem több mint 1000 nukleotid hosszúságú, a célszekvenciával legalább 80%-ban homológ, előnyösebben 90-100%-ban homológ szekvenciát tartalmaz. A célnukleinsav-szekvenciában jelenlévő bázispárképző régiókat tipikusan



legfeljebb körülbelül 10 nukleotid, tipikusabban legfeljebb körülbelül 5 nukleotid választja el, és előnyösen legfeljebb mintegy 1 nukleotid választja el. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a próbák mintegy 20-30 nukleotid hosszúságúak, körülbelül 95%-ban homológok a célszekvenciával, és a célnukleinsav-szekvenciában jelenlévő bázispárképző régiókat körülbelül 1 nukleotid választja el. Nyilvánvaló, hogy függetlenül attól, hogy mely próbapárt alkalmazzuk adott célszekvencia kimutatására, az egyes próbák hossza a próbapáron belül változó lehet. Mindegyik próba tartalmaz egy régiót, amely szárrégiót vagy próba-próba ágot képes kialakítani a próbapár másik tagjával. Miután a próbák kötődtek a komplementer célszekvenciához, a próbapár egyik tagjának szárrégiójában elhelyezett keresztkötést létrehozó komponens aktiválódik, és kovalens kötést hoz létre a próbapár másik tagjának szárrégiójában elhelyezett reagáló anyaggal, ezáltal permanens módon, keresztkötéssel összeköti egymással a próbapár egyes tagjainak szárrégióit. Az ismertetetteken felül, a próbapár legalább egyik tagja kimutatható egységet vagy szignálkeltő egységet is tartalmaz, adott esetben, a próba szárrégiójának 5'- vagy 3'- végéhez kapcsoltnak. A szignál a szárok közti keresztkötés létrejöttét követően mutatható ki vagy váltható ki, amely kötés viszont a próbák és a célnukleinsav-szekvencia közti bázispárképződést követően jön létre.

A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja szerint, a próbáknak a mintában található célnukleinsav-szekvenciával komplementer régiói eltávolíthatók a próbák



kimutatható régióiról. A nukleinsav-próbákat úgy tervezzük meg, hogy a próba célspecifikus hibridizációs régiója vagy célszekvenciával komplementer régiója degradációs eljárással leválasztható legyen a kimutatható vagy szignálkeltő régióról. Miután a próbák kötődtek a célnukleinsav-szekvencia szomszédos régióval, és a szárnban létrejött a keresztkötés, a próbák célszekvenciával komplementer régiója kémiai vagy enzimatisus úton, degradációs eljárással eltávolítható. A próbák fennmaradó régiója tehát a szárat és a szignált tartalmazza, amely a megfelelő mosási lépés beiktatását követően (lásd az alábbiakban) könnyen kimutatható a vizsgálatban. A szétválasztás célja az, hogy a háttérspecifikus vagy nem-specifikus szignál keletkezésének csökkentésével javítsuk a szignál-zaj arányt. Hibridizációs vizsgálatok a technika állása szerint ismertek, és azokban gyakran tapasztalt probléma a nukleinsavak nem-specifikus kötődése a felszínekhez, valamint nem-specifikus szignál keletkezése a vizsgálatban. Azzal, hogy a szignálkeltő egységeket leválasztjuk a nukleinsav hibridizációs régiójáról, a nem-specifikus szignál minimalizálható. Az egyetlen megmaradó szignál a keresztkötéssel összekapcsolt próbaszárakból és azokhoz kapcsolt egységből vagy egységekből származik, amelyek mennyisége egyenesen arányos az adott mintában jelenlévő célszekvenciáéval.

Egyik célunk az volt, hogy fenntartsuk a kovalens kapcsolódást a két próba jelölt próba-próba ágat vagy szárat képző végei közötti keresztkötésen át, egyúttal eltávolítsuk a próbák további részeit, elsősorban a próbák célszekvenci-



ával komplementer régióit a keresztkötés helyéig. Közelebb-ről, a próbák célszekvenciával komplementer régióját degradáljuk vagy leválasztjuk (például levágjuk) a próbák szár-régiójától. A degradációt vagy lehasítást végezhetjük kémi-ai vagy enzimátikus úton; a kiválasztott eljárás a próbák összetételétől függ. A próbák célszekvenciával komplementer régiója tartalmazhat ribonukleotidokat, dezoxiribonukleoti-dokat, vagy a próbákban a nukleotid egységet (egységeket) helyettesítő, természetben elő nem forduló szubsztituenseket. Következésképp, a degradációs eljárás a vizsgálatban alkalmazott próba típusától függ.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a próba célszekvenciával komplementer régióját dezoxi-ribonukleotidok tartalmazzák, amikor is, számos nukleáz alkalmazható egymagában vagy kombinációban a próba szelek-tív degradálására vagy hasítására. A keresztkötés létrejöt-tét követően, a próba célszekvenciával komplementer régió-jának degradálására alkalmazhatunk kettősszálú DNS-t hidrolizáló, endonukleáz aktivitású enzimeket, például DNÁZI enzimet vagy micrococcus nukleázt. A próba-célszek-venca duplexek hidrolizálását követően alkalmazhatunk egy-szálú DNS-t hidrolizáló, endonukleáz aktivitású enzimeket, például S1-nukleázt vagy Mung-bab nukleázt. További lehetősé-g szerint, kétirányú specifikitású exonukleázokat alkalmaz-hatunk kombinációban a próbapár próbarégióinak degradálásá-
ra. Például, az exonukleáz III enzim $3' \rightarrow 5'$ exonukleáz ak-tivitást mutat kettősszálú DNS-en, míg a lambda bakteriofág exonukleáz $5' \rightarrow 3'$ exonukleáz aktivitással rendelkezik. A



két nukleáz a mintához adható közvetlenül a keresztkötések kialakulását követően, a próbadegradációs reakció megindítására. Hasonlóképp, egyéb exonukleázok is ismertek, amelyeknek egyszálú DNS a szubsztrátjuk, és működésükhöz a minta denaturálását igénylik az enzim hozzáadását megelőzően. Adott esetben, DNS-t hasító kémiai reagenseket alkalmazhatunk dezoxiribonukleotidok degradálására. Ilyen reagensek például természetben előforduló antibiotikumok, például a bleomycin vagy neocarzinostatin, valamint szintetikus reagensek, például metidiumpropil-EDTA vas (II) komplexek.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a próba célszekvenciával komplementer régióját dezoxiribonukleotidok tartalmazzák, amikor is kémiai eljárásokat, például erősen bázikus oldatokat alkalmazhatunk a próba degradálására vagy hasítására. Tipikusan, 0,1 mol/l - 5 mol/l koncentrációjú nátrium-hidroxid oldatot érintkeztetünk a próbákkal, és a kapott oldatot szobahőmérsékleten vagy magasabb hőmérsékleten, például 30-90°C-on inkubáljuk. A bázikus oldat hasításokat („nicks”) hoz létre a próbaszálban, az RNS-bázisok pozíciójában; a reakcióhoz szükséges idő egyaránt függ a hidroxidionok koncentrációjától és az inkubációs hőmérséklettől. A próba degradációját vagy hasítását ribonukleotid pozíciókban számos különböző enzimatis reakcióval is előidézhetjük. Egyszálú RNS-t hasító enzimek például a ribonukleáz A, S1, foszfodiészteráz I és foszfodiészteráz II. Amennyiben az enzim hatását szelektív módon, egyszálú RNS-en fejti ki, az oldatot denaturáló kö-



rülményeknek kell kitennünk (például a duplex olvadási hőmérséklete fölé kell hevítenünk), hogy a keresztkötéssel összekapcsolt próba-cél duplexet leválasztjuk a célzott száltól az enzimátikus reakció megindítását megelőzően. Endonukleáz aktivitású enzimek - például RNáz A és S1 - alkalmazhatók külön-külön a próba-degradációs reakcióban a próbakészlet egyes tagjainak lebontására. Orientációfüggő exonukleáz aktivitású enzimeket előnyösen párban alkalmazunk a próba-degradációs reakcióban az egyes próbák lebontására. A foszfodiészteráz I például 5'→3' exonukleáz aktivitású, míg a foszfodiészteráz II 3'→5' aktivitású. A két enzimet előnyösen kombinációban alkalmazzuk a próbapár minkét tagjának lebontására, mivel az egyik próba 5'-véggel végződik annak célszekvenciával komplementer régiójában, míg a másik próba 3'-véggel végződik annak célszekvenciával komplementer régiójában. Az említetteken felül, RNáz H enzimet is alkalmazhatunk a próba RNS-részének szelektív degradálására. Az RNáz H RNS-hidrolizáló aktivitást mutat RNS/DNS duplexeken. Ebben az esetben, célszekvenciával komplementer régiójukban ribonukleotidokat tartalmazó próbákat alkalmazunk célzott DNS-ek kimutatására. Miután a próbákat a mintával érintkeztettük, hibridizáltattuk, és hagytuk a keresztkötéseket létrejönni, RNáz H enzimet adunk az elegyhez a próbák DNS-célponthoz hibridizálódott ribonukleotid egységeinek szelektív hidrolizálására.

A szárat úgy tervezzük meg, hogy a keresztkötés feletti struktúra ne legyen hozzáférhető vagy felismerhető az enzim vagy kémiai reagens számára, ezáltal ne hasítódjon



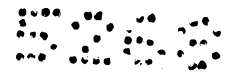
vagy degradálódjon. Ezt elérhetjük úgy, hogy módosítjuk a próba nukleinsav-szekvenciájának cukor-foszfát vázát, vagy elérhetjük a cukor-foszfát váz módosítása nélkül. A próba szárrégiója tartalmazhat ribonukleotidokat, dezoxiribonukleotidokat, ribonukleotid- vagy dezoxiribonukleotid-származékokat, vagy nem nukleinsav komponenseket. A szárrégióban alkalmazott nukleinsav vagy nem-nukleinsav egységeket a fenti csoportok bármelyikéből választhatjuk, azzal a kikötéssel, hogy azok nem érzékenyek a próba célszekvenciával komplementer régiójának degradálására alkalmazott reagensre. Amennyiben például DNS nukleázokat alkalmazunk a degradációs eljárásban, a próba szárrégiója ribonukleotidokat tartalmazhat. Ezzel szemben, ha RNS nukleázokat alkalmazunk a degradációs eljárásban, a próba szárrégiója dezoxiribonukleotidokat tartalmazhat. Egyes nukleázokról tudjuk azonban, hogy mind DNS-, mind RNS-szubsztrátokkal hibridizálódnak - ilyenek például az S1 nukleáz és a foszfodiészteráz I és II -, amely esetekben a természetes nukleotidok nukleázrezisztens származékait vagy nem nukleinsav komponenseket kell alkalmaznunk. A természetes nukleotidstruktúra számos olyan kémiai módosítása ismert, amely a módosított egységet nukleázrezisztenssé teszi. Például, egy kén atom felcserélése oxigén atommal a foszfát egységben tiofoszfát egységet eredményez, amely tipikusan feltartóztatja vagy leállítja az enzimátikus hidrolízist. Hasonlóképp, a foszfát csoport helyettesítése metil-foszfónát csoporttal rezisztenciát hoz létre az enzimátikus reakcióval szemben. A természetben elő nem forduló kötéseket az enzimek nem is-



merik fel, és azok előnyösen alkalmazhatók a próba szárrégiójának előállítására. Például, a nukleinsavstruktúra vázának egységeiként alkalmazhatunk peptidkötéseket, megtartva a bázispárképzés kialakításának képességét komplementer duplexekben, az ilyen struktúrák azonban enzimek által fel nem ismert, természetben elő nem forduló vázat tartalmaznak.

A találmány szerinti megoldással összhangban, a próbák szárrégiójában, a keresztkötést létrehozó komponens és a próba végén található jelölés között, vagy a keresztkötő hely és a próba végén található jelölés között alkalmazhatók természetben előforduló nukleinsav egységek is, tekintet nélkül az alkalmazott degradációs eljárásra. Ha a természetes bázisok száma a keresztkötést létrehozó komponens vagy keresztkötő hely és a jelölt próbavég közt kevesebb mint 10, előnyösen, kevesebb mint 3, a nukleáz aktivitása jelentősen csökken, mivel a keresztkötés és a jelölő egységek megváltoztatják az enzim felismerőhelyét.

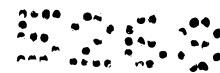
Ahhoz, hogy szár képződhessen, a szár felét tartalmazó próba szárrégiójának legalább 2 vagy 3 párképző nukleotidot kell tartalmaznia, és tipikusan nem több mint körülbelül 20 bázispárt kell tartalmaznia. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a nukleotidpárokat A és T alkotja, ahol az egy szárrégióban található nukleotidok lehetnek azonosak vagy különbözőek, azaz az egyik szárrégióban valamennyi lehet T, és a másik szárrégióban valamennyi A; vagy előfordulhat A és T vegyesen a próbapár két szárrégiójában. További lehetőség szerint, G és C alkalmazható egymagukban



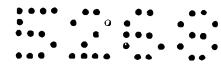
vagy A és T nukleotidokkal kombinálva. Legelőnyösebben, a szár 3 nukleotid egységet tartalmaz, ahol az egyik szárrégiót T-nukleotidok, a másik szárrégiót két A és egy keresztköti komponens alkotja; vagy az egyik szárrégiót két T-nukleotid és egy keresztköti komponens, a másik szárrégiót két A és egy keresztköti komponens alkotja. Nyilvánvaló, hogy a nukleotid megválasztása függ a kívánt affinitástól, a szintézis egyszerűségétől, a kovalens keresztkötiést létrehozó komponenssel létrejövö kölcsönhatástól, a degradációs eljárás típusától, és hasonlóktól.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a próbák szárrégiója kimutatható egységet és befogó egységet tartalmaz a szárrégiók végéhez kapcsoltan. A kimutatható egység bármely szignálriporter csoport, a befogó egység pedig bármely befogó csoport lehet. Közelebbről, a befogó csoport lehet például biotin, a szignálriporter csoport pedig lehet fluoreszcain. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a próbák mindkét szárrégiója kimutatható egységet tartalmaz a szárrégió végeihez kapcsoltan. A kimutatható egységek lehetnek jelölőanyagok, például fluorforok, radioizotópok, antigének vagy enzimek. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a próbák két szárrégiója olyan egységeket tartalmaz, amelyek egymással kölcsönhatásba lépve kimutatható szignál, például fluoreszcens rezonancia energiatranszfer párok vagy aktivátor/receptor párok keletkezéséhez vezetnek.

A találmány egy még további előnyös megvalósítási módja szerint, a próba vagy próbapár szárrégiója módosított



vagy módosítatlan purin nukleozidokat vagy származékokat, például módosított vagy módosítatlan adenzin egységeket és legalább egy keresztkötést létrehozó komponenst tartalmaz, míg a próbapár másik tagjának szárrégiója módosított vagy módosítatlan pirimidin nukleozidokat vagy származékokat tartalmaz, amelyek reagáló anyagként funkcionálnak a keresztkötést létrehozó komponens számára. Reagáló anyagként például előnyösen módosított vagy módosítatlan timidin egységeket alkalmazhatunk. A próbák a célzott nukleinsav szomszédos régióival hibridizálódnak, és háromágú elágazást tartalmazó próba-próba ágat vagy szárat képeznek. Következésképp, miután a próbák a célzott nukleinsav szomszédos régióival bázispárokat képeztek, a próbapár szárrégiói keresztkötéssel kapcsolódnak, és kialakul a szár vagy próba-próba ág. A kovalens keresztkötés kialakulását kiválthatjuk fénybesugárással vagy más módon. Ezen felül, a kovalens keresztkötés aktiválhatja a jelölést, miáltal a próba kimutatható válik. Ezután, a keresztkötéssel összekapcsolt szárat leválasztjuk a célszekvenciával komplementer régiótól, majd kimutatjuk. Ebben a vonatkozásban, „keresztkötést létrehozó komponensen” nem nukleozid természetű, stabil, fotokémiai úton aktiválható komponenst értünk, amely kumarinil származékokat tartalmaz. A kumarinil származékokat úgy állítjuk elő, hogy a kumarin molekula vagy származék fenilgyűrűjét oxo- vagy polihidroxi-szénhidrogén molekulához, például glicerol molekula egyik terminális hidroxil-csoportjához kapcsoljuk. A keletkező vegyület (poli)hidroxil-szénhidrogén egysége megfelel a nukleozid cukor egységének,



ahol a kumarin egység foglalja el a bázis helyét. Az ilyen vegyületek tehát polinukleotid régiókba illeszthetők. A kumarin gyűrű rendszer 3. és 4. pozíciója közti kettőskötés fotokémiai úton aktiválható, amely - miután a próbák a célt zott nukleinsav szomszédos régióival bázispárokat képeztek - kovalens módon keresztkötést alakít ki a szembenálló szál próba-próba régiót képző nukleozidjaival. A keresztkötést létrehozó komponensekkel reagáló anyaggal, például módosított vagy módosítatlan pirimidin nukleozidokkal vagy nukleozid származékokkal reagáló keresztkötést létrehozó komponensek lehetnek például kumarin származékok, például: (1) 3-(7-kumarinil)glicerín; (2) pszoralen vagy annak származékai, mint például 8-metoxi-pszoralen vagy 5-metoxi-pszoralen; (3) cisz-benzodipiron vagy annak származékai; (4) transz-benzodipiron; vagy (5) fuzionáltatott kumarin-cinnolin gyűrűrendszereket tartalmazó vegyületek. Valamennyi említett molekula tartalmazza a szükséges keresztkötő csoportot (egy aktivált kettőskötést) a megfelelő orientációban és megfelelő távolságra ahhoz, hogy keresztkötést hozzon létre egy nukleotiddal. Ezen felül, valamennyi fenti molekula kumarinszármazék, amennyiben valamennyi tartalmazza a kumarin (benzopiron) gyűrűrendszert, amely a molekula többi részének alapjául szolgál. Keresztkötést létrehozó komponensek részletes ismertetését találjuk például a 6 005 093 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a próbapár egyik tagjának szárrégiója módosított



vagy módosítatlan purin és/vagy pirimidin nukleozidokat vagy nukleozid származékokat és egy első keresztkötést létrehozó komponenst tartalmaz, míg a próbapár másik tagjának szárrégiója módosított vagy módosítatlan purin és/vagy pirimidin nukleozidokat vagy nukleozid származékokat és egy második, ugyancsak keresztkötést létrehozó komponenst tartalmaz. Miután a próbák a célzott nukleinsav szomszédos régióival bázispárokat képeztek, a próbapár szárrégiói közt a keresztkötést létrehozó komponensek fénybesugárzással kiváltott reakciója (például dimerizációja) révén keresztkötés jön létre, és kialakul a kovalens kötéssel összekapcsolt szár vagy próba-próba ág. Ebben az összefüggésben, keresztkötést létrehozó komponenseken nem nukleozid természetű, stabil, fotokémiai úton aktiválható komponenseket értünk, amelyek aril-olefinszármazékokat tartalmaznak. Az aril-olefin származékokat úgy állítjuk elő, hogy az aril-csoportot funkciós csoportot tartalmazó telített vagy telítetlen szénhidrogén molekulához, például glicerinhez kapcsoljuk. A kapott vegyület funkciós csoportot tartalmazó szénhidrogén egysége megfelel a nukleozid cukor egységének, míg az aril-olefin egység a bázis helyét foglalja el. Ennek megfelelően, ezek vegyületek polinukleotidokba inszertálhatók. Az aril-olefin kettőskötése fotokémiai úton aktiválható csoport, amely megfelelő reagáló anyaggal, például a próba-próba ág szembenálló szálában elhelyezett másik aril-olefin származékkal kovalens módon keresztkötést képez. Az aril-olefin kettőskötésének megfelelő orientációban és megfelelő távolságra kell lennie ahhoz, hogy - miután a próbák



a célzott nukleinsav szomszédos régióival bázispárokat képeztek - fénybesugárzás hatására keresztkötést hozzon létre egy, a szembenálló próba-próba régióban elhelyezett, nem nukleozid természetű reagáló anyaggal. Ilyen keresztkötést létrehozó komponensek részletes ismertetését találjuk például a WO 00/27 860 számú nemzetközi közzétételi iratban.

A találmány egy még további előnyös megvalósítási módja szerint, az alábbi szekvenciájú próbák valamelyikét alkalmazzuk: 1. azonosítószámú szekvencia, 2. azonosítószámú szekvencia, 3. azonosítószámú szekvencia, 4. azonosítószámú szekvencia, 5. azonosítószámú szekvencia, 6. azonosítószámú szekvencia, 7. azonosítószámú szekvencia vagy 8. azonosítószámú szekvencia.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezi eljárás célszekvenciák, például, de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk: teljes hosszúságú gének, diagnosztikus markergének, expresszióval jelölt szekvenciák („*expressed sequence tags*”, EST-k), egyes nukleotid polimorfizmusok („*single nucleotide polymorphisms*”; SNP-k), genomi DNS-ek, cDNS-ek, cccDNS-ek, rekombináns gének, mRNS-ek vagy rRNS-ek kimutatására. A célszekvencia lehet kettősszálú vagy egyszálú. Ezen felül, az lehet természetben előforduló vagy mesterséges szekvencia. A célszekvencia lehet tisztított vagy tisztítatlan formában, továbbá jelen lehet oldatban, testfolyadékban, vagy szövetben.

A találmány tárgyát képezik kémiai vagy enzimatisz degradálásra érzékeny nukleinsavpróbák, valamint eljárások, amelyekben ilyen próbákat alkalmazunk célnukleinsav-



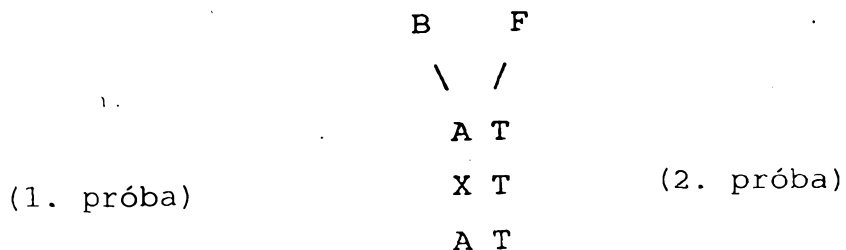
szekvenciák kimutatására. A rendszert végső soron úgy tervezük meg, hogy olyan próbákat kapjunk, amelyek szárrégiója rezisztens a próba célszekvenciával komplementer régiójának a próba jelölt régiójáról történő leválasztására vagy eltávolítására alkalmazni kívánt degradációs vagy hasító eljárásra. A degradációs reakciót követően, a próbák leválasztott és kimutatható régióját a szár és a jelölés alkotja, amelyet ezután lemérünk (lásd az alábbiakban), és kvantitálunk (mennyiségileg meghatározunk). A célszekvenciával komplementer régió leválasztása a próbák kimutatható régiójáról csökkenti a próbák nem-specifikus kötődését, ezáltal javítja a szignál-zaj arányt. Ennek eredményeképp, a háttér-specifikus vagy nem-specifikus szignál jelentősen csökken.

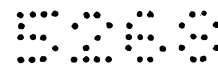
c) Eljárás

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban egy olyan példán keresztül kívánjuk szemléltetni, amelyben két DNS-próbát kapcsolunk össze egy próba-próba ágban vagy szárban, és restriktív endonukleázt alkalmazunk degradációs reagensként.

Próbák*:

1. A próbákat érintkeztetjük a (célszekvenciát tartalmazó) mintaoldatban:



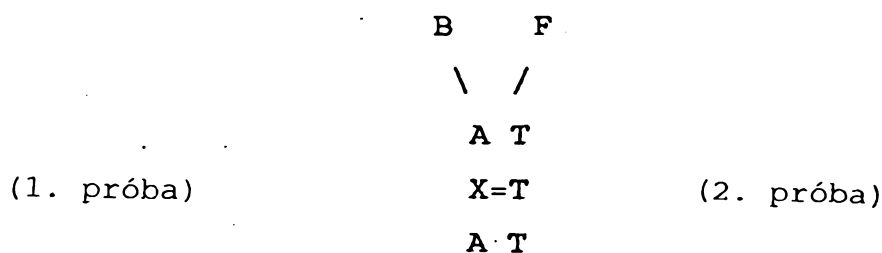


AGCGCCAAAATTCGCAGTCCCCAAC CTCCAATCACTCACCAACCTCTTGT

GATGCTATTCGCGGTTTTAAGCGTCAGGGGTTG-GAGGTTAGTGAGTGGTTGGAGAACA

célszekvencia

2. A két próbát keresztkötéssel összekapcsoljuk egymással:

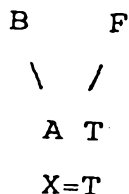


AGCGCCAAAATTCGCAGTCCCCAAC CTCCAATCACTCACCAACCTCTTGT

GATGCTATTCGCGGTTTTAAGCGTCAGGGGTTG-GAGGTTAGTGAGTGGTTGGAGAACA

célszekvencia

3. Endonukleáz restrikciós enzim alkalmazásával degradáljuk a próbát (és egyéb nukleinsavakat):





*: A kötőjel a célszekvenciában csak arra szolgál, hogy a bázispárképzés folyamatosságát megőrizzük a két számban; a kötőjel két oldalán található bázisok normális foszfodiészter kötéssel vannak összekapcsolva.

A képletekben az alábbi rövidítéseket alkalmaztuk:

B jelentése biotin;

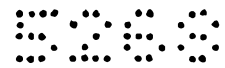
F jelentése fluoreszcein;

X keresztkötetést létesítő komponenst jelöl;

az „=” jel X és Y között kovalens keresztkötetést jelent.

A szárat úgy tervezzük meg, hogy a keresztkötés feletti struktúra ne legyen hozzáférhető vagy felismerhető az enzim számára, ezáltal ne hasítódjon az enzim által. Ezt elérhetjük a cukor-foszfát váz módosítása nélkül, vagy annak módosításával (például foszforotioát, metil-foszfónát, peptidkötés és hasonló közbeiktatása által).

A próbák visszamaradó részét a két összekapcsolt jelölőanyag alkotja, amely utóbbi a találmány fenti előnyös megvalósítási módja szerint biotin csoport, fluoreszcein csoport, vagy befogó csoport vagy szignálriporter csoport. További lehetőség szerint, mindkét jelölőanyag lehet fluorofor, amelyek egymással kölcsönhatásba lépve, fluoreszcens rezonancia energiatranszfer révén szignál keletkezését eredményezik. A továbbiakban eljárhatunk úgy, hogy a jelölt szárhoz kötött befogó csoportot szilárd hordozóra befogjuk, a nem kötődött anyagokat és próbákat (emésztett próbákat) mosással eltávolítjuk, majd a szignálriporter csoport jelenlétét kimutatjuk (a kimutatási eljárás ismer-



tetését lásd az alábbiakban). A szár visszamarad, mivel a befogó csoport, például biotin, a szárhoz van kötve. A találmány fenti előnyös megvalósítási módja szerint, a biotint avidinnel vagy streptavidinnel bevont gyöngyökhöz köthetjük.

A találmány fenti előnyös megvalósítási módjának több változatát is leírjuk (lásd fent).

RNS-próbák esetében a következőképp járhatunk el:

Enzimatis reagensként RNáz A enzimet alkalmazhatunk a próba degradálására.

Kémiai reagensként nátrium-hidroxidot alkalmazhatunk a próba degradálására.

DNS-próbák alkalmazása esetében a következőképp járhatunk el:

Enzimatis reagensként DNáz I enzimet alkalmazhatunk a próba degradálására.

Enzimatis reagensként endonukleázt (például micrococcus nukleázt) alkalmazhatunk a próba degradálására.

Az alábbi példában a találmány szerinti megoldást szemléltetjük az 1. táblázatban felsorolt próbák alkalmazásán keresztül. DNS-próba készleteket teszteltünk arra nézve, hogy mennyiben képesek adott nukleinsav-szekvenciákkal hibridizálódni, és azokat miként lehet jelölt egységükön keresztül kimutatni. Degradált és nem degradált próbákat hasonlítottunk össze.



1. táblázat

Próba szekvenciák

1. próba	5'-TCTGCCGATCCATACTGCGGAACAXAB	1. azonosítószá- mú szekvencia
2. próba	5'-FP*TTTCCTAGCMGCTTGTTTTGCTCGC	2. azonosítószá- mú szekvencia
3. próba	5'-TATATGGATGATGTGGTATTGGAXAB	3. azonosítószá- mú szekvencia
4. próba	5'-FP*TTTGGGCCAAGTCTGTACARCATC	4. azonosítószá- mú szekvencia
5. próba	5'-CATTTGTTTCAGTGGTTCGYAGGGCAXAB	5. azonosítószá- mú szekvencia
6. próba	5'- FP*TTTTTCCCCACTGTTTGGCTTTCAG	6. azonosítószá- mú szekvencia
7. próba	5'-CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACAXAB	7. azonosítószá- mú szekvencia
8. próba	5'-FP*TTTTTCTCTCAATTTCTAGGG	8. azonosítószá- mú szekvencia

* jelentése foszforotioát-diészter (normális foszfodiészter helyett);

X jelentése 3-(7-kumarinil)glicerín;

P jelentése tetraetilén-glikol;

B jelentése biotin TEG (Glen Research);

F jelentése fluoreszcein-foszforamidit (Cruachem);

M jelentése A és C; és

Y jelentése C és T.



Minták kezelése:

Mintákat lizáló oldat (119,2 μ l), próba oldat (36,4 μ l) és neutralizáló oldat (44,4 μ l) elegyítésével kaptunk 96 lyukú mikrotitráló lemezeken.

Lizáló oldatként 0,1875 mol/l koncentrációjú nátrium-hidroxidot alkalmaztunk. Két különböző lizáló oldatot készítettünk. Az egyik csak a nátrium-hidroxidot tartalmazta, a másik 24 fmol hepatitis-B vírusgenomot tartalmazó plazmidvektort is tartalmazott. Az oldatokat 30 percig forraltuk. A kapott lizátumokat 0,45 μ m pórusátmérőjű fecskendő Acrodisc filteren átszűrtük, mielőtt a lemez mélyedéseibe szétosztottuk.

A próba oldatban a keresztkötő komponenst tartalmazó próba koncentrációja (1. táblázat; 1., 3., 5. és 7. próba) 54,9 nmol/l volt, a reagáló anyagot tartalmazó próbáé pedig (1. táblázat: 2., 4., 6. és 8. próba) 137,4 nmol/l. A próba oldat 0,012% szarvasmarha szérumalbumint, 1,815 mol/l nátrium-kloridot, és pH-indikátorként 0,001% fenolvörös indikátort is tartalmazott.

Neutralizáló oldatként 0,015 mol/l citromsav, 0,31 mol/l nátrium-dihidrogén-foszfát, 1,5 mol/l nátrium-klorid, 0,42% Tween-20 és 35% formamid összetételű oldatot alkalmaztunk.

Miután a reagenseket elegyítettük, a lemezt 15 percig, 40°C-on inkubáltuk, majd az inkubációs hőmérsékletet 40°C-on tartva, 30 percig, öt darab 8 W teljesítményű izzóból álló izzókészlettel (F8T5/350BL; Sylvania), 300-370 nm hullámhosszon, 1,5 mm vastag Pyrex filteren keresztül fénnel



besugároztuk.

Streptavidinnel bevont paramágneses gyöngyöket (75 g; Dynal M280) adtunk valamennyi mélyedéshez, és a lemezeket 30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk.

A következő mosási lépésekben a mikrotitráló lemezt először mágneses lapra helyeztük, hogy a paramágneses gyöngyöket pelletben összegyűjtsük; a folyadékot leszívással eltávolítottuk; és friss oldatot adtunk a mélyedésekhez; közben, a paramágneses szemcséket felszuszpendáltuk.

Először, a mintát 100 μ l I-es mosóoldattal mostuk (50 mmol/l nátrium-hidroxid és 0,1% nátrium-dodecil-szulfát). Ezután, a mintákat egyszer 200 μ l II-es mosóoldattal mostuk (1XSSC és 0,1% Tween-20).

Ezt követően, a mintákat kétszer inkubáltuk restriktív enzim és ellenanyag-konjugátum kezelések különböző kombinációinak alkalmazása mellett. Az alkalmazott kombinációt a 2. táblázatban adtuk meg. Valamennyi esetben ugyanazt a pufferoldatot alkalmaztuk, és a restriktív enzimet, micrococcus nukleázt, ellenanyag-konjugátumot, és anti-fluoreszceint/alkalikus foszfátot kihagytuk, külön adtuk a mintákhoz, vagy együtt alkalmaztuk az inkubációk során.

Pufferoldatként 0,1 mol/l Tris (pH=7,5), 0,1125 mol/l nátrium-klorid, 0,5XSSC, 0,1 mmol/l magnézium-klorid, 1,0 mmol/l kalcium-klorid, 1,0% Tween-20 és 0,25% szarvasmarha szérumalbumin összetételű oldatot alkalmaztunk. A micrococcus nukleáz 1 egységnyi mennyiségben adtuk a mintákhoz. Az anti-fluoreszceint/alkalikus foszfátot 1/20 000 hígításban alkalmaztuk.



Az első inkubálás során a megfelelő puffer 50 µl mennyiségét adtuk a mélyedésekhez, és a lemezt 30 percen át, 37°C-on inkubáltuk. Ezután, a mintákat 220 µl II-es mosóoldattal kétszer mostuk. A második inkubáció során ismét a megfelelő puffer 50 µl mennyiségét adtuk a mélyedésekhez, és a lemezt 30 percig, 37°C-on inkubáltuk.

A mintákat 220 µl II-es mosóoldattal négyszer mostuk. Végül, a mosóoldatot 100 µl Attophos™ reagenssel helyettesítettük. A szubsztrátot 1 órán át, 37°C-on inkubáltuk, és a fluoreszcens szignált fluoreszcens lemezolvasó készülékkel (fluorométerrel; Packard Instruments) lemértük.

I. Eljárhatunk úgy, hogy az egyik próbát kimutatható egységgel jelöljük, és az alábbi kimutatási eljárást alkalmazzuk:

1. Homogén kimutatás fluoreszcens polarizációs spektroszkópiával.

2. Tömegspektroszkópia (MALDI, TOF, Electrospray, stb.).

3. A termék szétválasztása tömeg vagy töltés alapján (azaz kromatográfiával vagy elektroforézissel) történhet, majd fluoreszcencia kimutatást, tömegspektroszkópiás analízist, katalizált riporter ülepítést, stb. végzünk.

II. Eljárhatunk úgy, hogy a két próbát egymással kölcsönhatásba lépő pár tagjaival jelöljük, és az alábbi kimutatási eljárást alkalmazzuk:

1. fluoreszcens rezonancia energiatranszfer;
2. LOCI eljárás.



III. Eljárhatunk úgy, hogy az egyik próbát kimutatható egységgel jelöljük, a másik próbát befogó egységgel jelöljük, és az alábbi kimutatási eljárást alkalmazzuk:

1. A befogó egység lehet például biotin, antigén vagy receptorszubsztrát, amelyeken keresztül külön-külön hozzáköthetjük a terméket például avidint vagy streptavidint, az ellenanyagot vagy receptort tartalmazó hordozóhoz. A kimutatható egység lehet közvetlenül kimutatható - például radioizotóp, fluorofor vagy közvetlen enzimes jelölés (például a próbával közvetlenül konjugált enzim; vagy lehet közvetett módon kimutatható, például antigén, amelyhez az enzim valamely szubsztrátját kimutatható terméké alakító enzim-ellenanyag konjugátumot kötünk.

Próbapárok:

Két próba alkot egy próbapárt. Az 1. táblázatban megadott szekvenciák (lásd fent) a következő párosításokban négy próbapárt tartalmaznak: (1,2), (3,4), (5,6) és (7,8).

A próbapárokat úgy terveztük meg, hogy a két próba a célszekvencia szomszédos régióival hibridizálódjon, ezáltal háromágú elágazást tartalmazó próba-próba ágat vagy szárat képezzen. A háromágú elágazás próba-próba ágában vagy szárában, az egyik próba keresztkötést létrehozó komponenst és biotin jelölést tartalmaz; a másik próba timidin bázisokat (reagáló anyagként a keresztkötést létrehozó komponens számára), az utolsó timidin és a tetraetilén-glikol távtartó szekvencia közt foszforotioát kötést, valamint fluoreszcens egységet tartalmaz.



Mindegyik próbapárt három különböző tesztrendszerben teszteltünk, a célzott DNS jelenlétében vagy anélkül:

- (1) enzimátikus emésztés nélkül;
- (2) enzimátikus emésztéssel, az emésztést követően ellenanyag hozzákötésével;
- (3) enzimátikus emésztéssel, az emésztés során ellenanyag hozzákötésével.

Az alábbi, 2. és 3. táblázatokban adjuk meg a próbák vizsgálatára alkalmazott teszt körülményeket.

2. táblázat

Az alábbi táblázatban az egyes próbapárok vizsgálatára alkalmazott hat különböző teszt körülményt (A-F) ismertetjük

Teszt-körülmény	A	B	C	D	E	F
Célzott DNS	nincs	van	nincs	van	nincs	van
1. inkubáció	puffer	puffer	enzim	enzim	puffer	puffer
2. inkubáció	ellenanyag	ellenanyag	ellenanyag	ellenanyag	enzim/ellenanyag	enzim/ellenanyag



3. táblázat

Az alábbi táblázatban eredményeinket összegeztük

Szignál: Relatív Fluoreszcens Egység						
Próbapár r	Tesztkörülmény					
	A	B	C	D	E	F
(1,2)	108	910	33	2199	31	2026
(3,4)	69	523	29	1929	30	1535
(5,6)	124	896	38	2114	34	1708
(7,8)	42	1066	25	1546	24	1591

Mind a négy próbapár esetében hasonló eredményeket kaptunk. A negatív mintákból származó nem-specifikus szignál csökkent (vesd össze a C és E mintákat az A kontrollal), és a próbák degradálása érdekében kezelt mintáknál magasabb célspecifikus szignált észleltünk (vesd össze a D és F mintákat a B kontrollal).

A célzott DNS hiányában megfigyelt szignálokat (A, C és E tesztkörülmények) összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a restriktív endonukleázzal kezelt minták (C és E) alacsonyabb és egységesebb szignált eredményeztek (C: átlag 31,25%, %CV: 17,8; E: átlag 29,75, %CV: 141). Ezzel szemben, a kezeletlen minták esetében mért szignálok magasabbak voltak, és jelentősebb eltéréseket mutattak (átlag 85,75, %CV: 42,4). A minták enzimes emésztése alacsonyabb nem-specifikus ("háttér") szignálokat eredményezett a negatív mintákban.



A célzott DNS jelenlétében mért szignálokat (B, D és F teszt körülmények) összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a restriktív endonukleázal kezelt minták 50-300%-kal nagyobb szignált eredményeztek, mint a kezeltlen minták. A magasabb értékek feltehetően annak tudhatók be, hogy az enzimikus degradációs eljárás szignifikáns mértékben csökkentette a kimutatható termék méretét és töltését, ezáltal előnyösebb kötőpartnerek jöttek létre az ellenanyag-konjugátum számára, vagy sokkal előnyösebb körülmények jöttek létre a későbbi, kimutatható fluoreszcens szignált eredményező enzimreakció számára.

Valamennyi idézett szabadalmi leírás és közlemény teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi.

Nyilvánvaló, hogy szakember képes különböző módosítások végrehajtására anélkül, hogy a találmányi a gondolattól vagy a találmány oltalmi körétől eltérnének. A találmány szerinti megoldást annak előnyös megvalósítási módjain keresztül szemléltettük, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertettekre korlátoznánk. A találmány szerinti megoldásnak az ismertettektől eltérő, szakember számára nyilvánvaló megvalósítási módjai szintén a találmány tárgykörébe tartoznak.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás célnukleinsav-szekvencia kimutatására mintában, *azzal jellemezve, hogy:*

(i) mintát szekvencia-specifikus hibridizációt lehetővé tevő körülmények mellett próbapárral érintkeztetünk, amely próbapár

mindegyik próbában, a próba célnukleinsav-szekvenciával nem-komplementer végén, a másik próbával kölcsönhatásba lépve próba-próba ág kialakítására képes "próba-próba ágat képző" régiót;

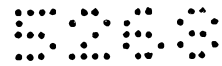
az egyik próba próba-próba ágat képző régiójában elhelyezve, legalább egy keresztkötést létrehozó komponenst - amely - miután a próbák a célnukleinsav-szekvenciával bázispárokat képeztek - kovalens módon keresztkötést képez a próbapár másik tagjának próba-próba ágat képző régiójában elhelyezett keresztkötést létrehozó komponenssel reagáló anyaggal, és

a próbák legalább egyikéhez kapcsoltan, legalább egy kimutatható egységet tartalmaz;

(ii) a mintát fényel besugározzuk, miáltal a próbapár szomszédos tagjainak próba-próba ágat képző régióit keresztkötéssel összekapcsoljuk;

(iii) a próbák keresztkötéssel összekapcsolt, próba-próba ágat képző régióját a célszekvenciával komplementer régióról leválasztjuk; és

(iv) legalább egy leválasztott, keresztkötéssel összekapcsolt próba-próba ág jelenlétét kimutatjuk, annak indi-



kátoraként, hogy a mintában a célnukleinsav-szekvencia jelen volt.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy keresztkötést létrehozó komponensként a felsorolt vegyületek bármelyikét alkalmazzuk: kumarin vagy kumarin származékok, például 3-(7-kumarinil)glicerín; pszoralen, pszoralen származékok, mint például 8-metoxi-pszoralen vagy 5-metoxi-pszoralen; cisz-benzodipiron vagy cisz-benzodipiron származékok; transz-benzodipiron, transz-benzodipiron származékok vagy fuzionáltatott kumarin-cinnolin gyűrűrendszereket tartalmazó vegyületek.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a keresztkötést létrehozó komponenssel reagáló anyagként pirimidint vagy pirimidin származékokat alkalmazunk.

4. Eljárás célnukleinsav-szekvencia kimutatására mintában, *azzal jellemezve*, hogy:

(i) mintát szekvencia-specifikus hibridizációt lehetővé tevő körülmények mellett próbapárral érintkeztetünk, amely próbapár

mindegyik próbában - a próba célnukleinsav-szekvenciával nem-komplementer végén - a másik próbával kölcsönhatásba lépve próba-próba ág kialakítására képes "próba-próba ágot képző" régiót;

a próbapár első tagjának próba-próba ágot képző régiójában elhelyezve egy első keresztkötést létrehozó komponenst, próbapár második tagjának próba-próba ágot képző régiójában elhelyezve egy második keresztkötést létrehozó



komponenst; valamint

a próbák legalább egyikéhez kapcsoltan, legalább egy kimutatható egységet tartalmaz;

(ii) a mintát fénnel besugározzuk, miáltal a próbapár szomszédos tagjainak próba-próba ágat képző régióit keresztkötéssel összekapcsoljuk;

(iii) a próbák keresztkötéssel összekapcsolt, próba-próba ágat képző régióját a célszekvenciával komplementer régióról leválasztjuk; és

(iv) legalább egy leválasztott, keresztkötéssel összekapcsolt próba-próba ág jelenlétét kimutatjuk, annak indikátoraként, hogy a mintában a célnukleinsav-szekvencia jelen volt.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy keresztkötetést létrehozó komponensként aril-olefint vagy aril-olefin származékokat alkalmazunk.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kimutatható egységként fluoreszceint, fluorofort, radioizotópot, antigént vagy enzimet alkalmazunk.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a próbapár egyes tagjainak próba-próba ágat képző régiójában legalább két, előnyösen körülbelül kettőtől nyolcig terjedő számú bázispárképző nukleotidot alkalmazunk.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a próbák keresztkötéssel összekapcsolt próba-próba ágat kémiai vagy enzimatis degradáció-



val választjuk le a célszekvenciával komplementer régióról.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a célnukleinsav-szekvenciában, a próbapár tagjaival homológ szekvenciák között nem több, mint körülbelül két nukleotid hosszúságú hézagot hagyunk.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a próbapár egyik tagjához legalább egy szignálriporter csoportot, a próbapár másik tagjához legalább egy befogó csoportot kötünk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy befogó csoportként biotint, antigént vagy receptorszubsztrátot alkalmazunk.

12. Nukleinsavpróba, amely:

(i) célszekvenciával komplementer régiót - amely bázispárokat képez a célszekvencia régiójával;

(ii) próba-próba ágat képző régiót - amely nem hibridizálódik a célszekvenciával;

(iii) egy első keresztkötést létrehozó komponenst a próba próba-próba ágat képző régióban elhelyezve, amely - miután a próbák bázispárokat képeztek a célszekvenciával -, a második próba próba-próba ágat képző régiójában elhelyezett második keresztkötést létrehozó komponenssel vagy keresztkötést létrehozó komponenssel reagáló anyaggal reagálva kovalens keresztkötést képes létrehozni;

(iv) legalább egy kimutatható egységet - a próbák legalább egyikének próba-próba ágat képező régiójához kapcsolva; és



(v) a célszekvenciával komplementer régió és próba-próba ágat képző régió között degradációs helyet tartalmaz.

13. Nukleinsavpróba pár, amely:

(i) mindegyik próbában célszekvenciával komplementer régiót - amely bázispárokat képez a célszekvencia régiójával;

(ii) mindegyik próbában próba-próba ágat képző régiót - amely nem hibridizálódik a célszekvenciával;

(iii) egy első keresztkötetést létrehozó komponens az egyik próba próba-próba ágat képző régiójában elhelyezve, amely - miután a próbák bázispárokat képeztek a célszekvenciával -, a próbapár másik tagjának próba-próba ágat képző régiójában elhelyezett második keresztkötetést létrehozó komponenssel vagy keresztkötetést létrehozó komponenssel reagáló anyaggal reagálva kovalens módon keresztkötetést képes létrehozni;

(iv) legalább egy kimutatható egységet - a próbapár legalább egyikének próba-próba ágat képező régiójához kapcsoltn; és

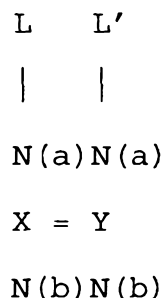
(v) a célszekvenciával komplementer régió és próba-próba ágat képző régió között degradációs helyet tartalmaz.

14. A 13. igénypont szerinti nukleinsavpróba pár, amely:

legalább egy szignálriporter csoportot tartalmaz a próbapár egyik tagjának próba-próba ágat képző régiójához kapcsoltn, és legalább egy befogó csoportot tartalmaz a próbapár másik tagjának próba-próba ágat képző régiójához kapcsoltn.



15. Nukleinsavpróba pár, amely következő képletű próba-próba ágot tartalmaz:



(i) ahol L és L' közül legalább az egyik jelen van, és jelentésük jelölőanyag;

(ii) N jelentése nukleinsav;

(iii) „a” és „b” N számát jelölő, egymástól független egész számok;

(iv) X egy első keresztkötést létrehozó komponenst jelöl;

(v) Y egy második keresztkötést létrehozó komponenst vagy keresztkötést létrehozó komponenssel reagáló anyagot jelöl;

(vi) ahol az első keresztkötést létrehozó komponens kovalens módon kötődik a második keresztkötést létrehozó komponenssel vagy keresztkötést létrehozó komponenssel reagáló anyaggal, permanens módon összekapcsolva a próba-próba ágakat.

16. A 15. igénypont szerinti nukleinsavpróba pár, ahol L jelentése szignálriporter csoport, és L' jelentése befogó csoport.

17. A 16. igénypont szerinti nukleinsavpróba pár, ahol a szignálriporter csoport fluoreszcein, fluorofor, radioi-



zotóp, antigén vagy enzim.

18. A 16. igénypont szerinti nukleinsavpróba pár, ahol a befogó csoport biotin, antigén vagy receptorszubsztrát.


19. A 15-18. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavpróba pár, ahol a próbapár egyes tagjainak szekvenciájában $a = 0-20$ és $b = 0-80$ nukleotid hosszúságú.

20. A 14-19. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavpróba pár, ahol a keresztkötést létrehozó komponens kumarin, kumarin származék, például 3-(7-kumarinil)glicerin; pszoralen, pszoralen származék, mint például 8-metoxipszoralen vagy 5-metoxipszoralen; cisz-benzodipiron vagy cisz-benzodipiron származék; transz-benzodipiron, transz-benzodipiron származék; vagy fuzionáltatott kumarin-cinnoлин gyűrűrendszereket tartalmazó vegyület; aril-olefin vagy aril-olefin származék.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.


dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő

56 + 0 a' a' a' d



2003 05 08