(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 904657 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 904657

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification (IPC^5)
C12Q 1/68

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **21.09.1990**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **21.09.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **23.03.1991**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

22.09.1989 US 411443

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Eastman Kodak Co,** 343 State Street, Rochester, NY 14650, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Wu, Annie Liu,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Nukleiinihappojen toteamismenetelmä, jossa käytetään erisuuruisia alukepitoisuuksia polymeraasiketjureaktiossa

Bestämningsmetod för nukleinsyror vid vilken används olika stora primerkoncentrationer i polymeraskedjereaktionen

Nukleiinihappojen toteamismenetelmä, jossa käytetään erisuuruisia alukepitoisuuksia polymeraasiketjureaktiossa

Tämä keksintö koskee menetelmää nukleiinihapon osoittamiseksi polymeraasiketjureaktioissa. Sitä voidaan käyttää nukleiinihappojen osoittamiseen diagnostisissa määrityksissä tai geneettisessä tutkimuksessa, kun kiinnostuksen kohteina ovat genomi-, bakteeri- tai virus-DNA:han liittyvät nukleiinihapot.

Nukleiinihappokoetinteknologia on kehittynyt nopeasti viime vuosina tutkijoiden havaittua sen arvon sellaisten erilaisten sairauksien, organismien tai geneettisten piirteiden osoittamisessa, joita on läsnä hyvin pieninä määrinä koenäytteessä. Koetinten käyttö perustuu komplementaarisuuskäsitteeseen. DNA:ssa ovat kaksi säiettä sitoutuneet toisiinsa komplementaaristen nukleotidien (tunnetaan myös nukleotidipareina) välisten vetysidosten avulla.

DNA-kompleksi on normaalisti stabiili, mutta säikeet voidaan erottaa (eli denaturoida) sellaisten olosuhteiden avulla, jotka katkovat vetysidokset. Vapautuneet yksittäiset säikeet yhdistyvät uudelleen ainoastaan sellaisen toisen säikeen kanssa, jossa on komplementaarinen nukleotidisekvenssi. Tämä hybridisoitumisprosessi voi tapahtua liuoksessa tai kiinteän alustan pinnalla.

Kohdeorganismin tai -solun DNA:n kohdenukleiinihapposekvenssi voi olla ainoastaan pieni osa koko säikeestä, niin että on hyvin vaikeaa osoittaa sen läsnäolo useimpien tunnettujen merkittyjen DNA-koettimien avulla. On tehty paljon tutkimustyötä tämän ongelman voittamiseksi, mukaan lukien parannuksia koettimien herkkyydessä ja nukleiinihappojen synteesissä.

Merkittävä edistysaskel alalla on kuvattu US-patenttijulkaisuissa 4 683 195 ja 4 683 202. Menemättä tässä tarkkoihin yksityiskohtiin, näissä patenteissa kuvataan

monistamismenetelmä, jossa alukkeita hybridisoidaan nukleiinihappotemplaatteihin polymeroivan aineen (kuten polymeraasin) ja deoksiribonukleosiditrifosfaattien läsnä ollessa ja alukkeista muodostetaan pidennystuotteita. Nämä tuotteet denaturoidaan ja käytetään templaatteina kiertoreaktiossa, joka monistaa olemassa olevien nukleiinihappojen lukumäärän ja määrän niiden myöhemmän osoittamisen helpottamiseksi. Monistamismenetelmä voidaan suorittaa jaksoittaisesti niin monta kertaa kuin halutaan suuremman määrän todettavissa olevaa materiaalia tuottamiseksi pienestä määrästä kohdenukleiinihapposekvenssiä.

Uudemman kehitystuloksen DNA:n sekvenssointia varten ovat kuvanneet Gyllesten et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, lokakuu 1988, 7652 - 7656). Yksisäikeistä DNA:ta tuotetaan polymeraasiketjureaktiomenetelmissä käyttämällä rajoittavaa määrää toista alukeparіin kuuluvista alukkeista. Sellaista DNA:ta voidaan käyttää geenin, kuten HLA-DQα-lokuksen, suoraan sekvenssointiin ja hybridisaatiokoettimien tuottamiseen. Nukleiinihappofragmenttien löytäminen sekvenssoinnissa aikaansaadaan käyttämällä radioisotoopilla merkittyjä deoksiribonukleosiditrifosfaatteja. Radioisotoopilla merkittyjä koettimia valmistetaan samoin.

Tällä alalla on kuitenkin jätetty ottamatta huomioon erisuurten alukepitoisuuksien käyttö polymeraasiketjureaktio-osoitusmenetelmissä tai edut, jotka se voi tarjota eräissä analyyseissä.

Vaikka radioisotooppien käyttö merkkiaineina nukleiinihappojen osoittamiseksi on tunnettua ja sillä voi olla eräitä etuja, on siinä huomattavia haittoja valmistettaessa sopivia, turvallisia ja yksinkertaisia menetelmiä ja diagnostisia testitarvikkeita, joilla on pitkä varastointiaika. Radioisotooppien käyttöön liittyvät vaarat ja käsittelyongelmat ovat ilmeisiä. Niitä ei mielellään pakattaisi testitarvikepakkaukseen käytettäväksi lääkärien

vastaanottohuoneissa tai etäisillä seuduilla. Lisäksi monilla nukleiinihappokoettimissa yleisesti käytetyillä isotoopeilla on lyhyt (ts. muutaman päivän) puoliintumisaika. Niiden varastoinninkestävyys on siten rajoitettu.

Olisi edullista välttää radioisotooppien käyttöön liittyvät ongelmat. Tällaisen keinon saattaisivat tarjota merkkientsyymit, joita käytetään yleisesti erilaisissa immunologisissa analyyseissä. Monet entsyymit, mukaan lukien peroksidaasi, ovat kuitenkin lämmölle herkkiä ja deaktivoituvat korkeissa lämpötiloissa. Polymeraasiketjureaktiomenetelmät vaativat usein korkean lämpötilan olosuhteita eräitä vaiheita varten, mukaan lukien alukkeenpidennystuotteiden denaturointi ennen osoittamista. On todennäköistä, että merkkientsyymit voivat deaktivoitua denaturoinnin aikana ellei menetelmässä pidetä huolta sen välttämisestä. On siten jatkuvasti olemassa tarve löytää keino aikaansaada turvallinen, sopiva ja yksinkertainen menetelmä nukleiinihapon osoittamiseksi sellaisen diagnostisen testitarvikepakkauksen avulla, jonka varastoinninkestävyys on hyväksyttävä.

Tunnettujen menetelmien ongelmat on voitettu käyttämällä kaksi komplementaarista säiettä omaavan nukleiinihapon osoittamiseen menetelmää, joka sisältää seuraavat vaiheet:

A. saatetaan nukleiinihapon denaturoidut komplementaariset säikeet kosketuksiin:

deoksiribonukleosidi-5'-trifosfaattien,

polymeroivan aineen ja

parin sellaisia alukkeita kanssa, jotka ovat oleellisesti komplementaarisia denaturoiduille nukleiinihapposäikeille,

hybridisointiolosuhteissa, niin että muodostuu komplementaarisen nukleiinihapposäikeensä kanssa hybridisoituneita alukkeenpidennystuotteita, joita pidennystuotteita voidaan, kun ne on erotettu niiden komplementaari-

sista säikeistä, käyttää templaatteina pidennystuotteiden synteesiä varten,

jolloin alukkeita on läsnä moolisuhteessa, joka on vähintään 2:1,

B. erotetaan alukkeenpidennystuotteet templaateista, joihin ne on syntetisoitu,

C. annetaan erotettujen alukkeenpidennystuotteiden olla monistamisolosuhteissa, ja

D. denaturoimatta enää vaiheessa C muodostuneita monistettuja tuotteita, osoitetaan kolorimetrisesti tai fluorometrisesti sen alukkeenpidennystuotteen läsnäolo, jota muodostettiin käyttämällä aluketta ylimäärin, joka osoittaminen suoritetaan käyttämällä entsyymillä merkittyä reagenssia, joka sen substraatin läsnä ollessa antaa todettavissa olevan kolorimetrisen tai fluorometrisen signaalin, jolloin reagenssi on joko komplementaarinen todettavalle alukkeenpidennystuotteelle tai kykenee liittymään siihen.

Tämä keksintö tarjoaa useita etuja ja merkitsee siten edistystä nukleiinihappojen osoittamisen alalla. Se on menetelmä, joka on kätevä, yksinkertainen suorittaa, turvallinen ja herkkä pienille kohdenukleiinihapon pitoisuuksille. Se voidaan suorittaa käyttäen yksinkertaista diagnostista tarvikepakkausta, jonka varastoinninkestävyys on hyväksyttävä ja joka ei tarjoaisi tarpeettomia vaaroja lääkärin vastaanottohuoneessa tai muilla testauspaikoilla.

Nämä edut saavutetaan käyttämällä entsyymiosoittamisreagensseja, joita voidaan käyttää aikaansaamaan kolorimetrinen tai fluorometrinen signaali osoittamaan kohdenukleiinihapon läsnäolon. Vältetään radioisotoopit ja niihin liittyvät haitat. Lisäksi entsyymiosoittamisreagensseja käytetään yhdessä alukkeiden erisuuruisten määrien kanssa monistamismenetelmissä, niin että voidaan välttää denaturointi ennen ylimäärin käytetystä alukkeesta saadun

tuotteen osoittamista. Siten vältetään lämmölle herkkien merkkientsyymien deaktivoituminen.

Tämä keksintö koskee koenäytteessä yhdessä tai useammassa ennalta määrätyssä (ts. kohde-) nukleiinihaposssa läsnä olevan yhden tai useamman spesifisen nukleiinihapposekvenssin osoittamista. Sellaiset näytteet voivat sisältää solu- tai virusmateriaalia, hiusta, ruumiin nesteitä tai muita materiaaleja, jotka sisältävät bakteeri-, virus- tai genomi-DNA:ta tai -RNA:ta, joka voidaan osoittaa.

Keksintö on erityisen hyödyllinen yhdistettynä ketjureaktioon vähintään yhden ennalta määrätyn nukleiinihapposekvenssin tuottamiseksi eksponenttimäärinä suhteessa käytettyjen reaktiovaiheiden lukumäärään. Tuote on erillinen nukleiinihappokaksoiskierre, jonka päätteet vastaavat käytettyjen spesifisten alukkeiden päitä. Mitä tahansa nukleiinihapon lähdettä, puhdistettuna tai ei, voidaan käyttää lähtömateriaalina edellyttäen, että se sisältää tai sen epäillään sisältävän osoittamisen kohteena olevaa erityistä nukleiinihappoa. Voidaan haluttaessa käyttää nukleiinihappojen seosta. Monistettava sekvenssi voi olla fragmentti tai kokonainen nukleiinihappo. Lisäksi voidaan useampi kuin yksi nukleiinihapposekvenssi osoittaa samanaikaisesti käyttäen alukkeita (eli alukeparia) kutakin osoitettavaa sekvenssiä varten. Sekvenssit voivat olla samassa tai eri nukleiinihapossa.

Nukleiinihappoja voidaan saada erilaisista lähteistä mukaan lukien plasmidit tai luonnossa esiintyvä DNA, joka on peräisin mistä tahansa kasvi-, eläin- tai ihmislähteestä. Sitä voidaan eristää erilaisista kudoksista mukaan lukien veri, perifeerisen veren yksitumaiset solut, kudoksia tai muita alalla tunnettuja lähteitä. Tämä keksintö on erityisen hyödyllinen ihmisen leukosyyttiantigeeni-DNA:n tai virus-DNA:n osoittamista varten, kuten ihmisen papilloomaviruksista, RNA-viruksista ja retroviruksis-

ta (esim. HIV-I) peräisin olevan, joka on uutettu viruksen infektoimista nesteistä ja soluista, jolloin heterogeenisyys on yleistä tartunnan saaneissa yksilöissä ja heidän joukossaan.

DNA eristetään näytteessä olevista soluista käyttäen mitä tahansa sopivaa tekniikkaa, joita tunnetaan alalla monia, kunhan vain tekniikka ei hajota DNA:ta. Esimerkiksi sitä voidaan uuttaa soluista käyttäen puskuroitua proteaasi- tai proteinaasi K -koostumusta lämpötilassa ja pH-arvossa, joka tekee vähemmän todennäköiseksi DNA:n hajottumisen, kuten ovat kuvanneet esimerkiksi Kan et al., New Eng. J. Med. 297 (1977) 1080 - 1084 ja kuvattu julkaisussa Nature 251 (1974) 392 - 393. Muita uuttamistekniikoita ovat kuvanneet Maniatis et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) ja on kuvattu EP-patenttijulkaisuissa 0 145 356, 0 240 191 ja 0 245 945 ja ovat kuvanneet Nunberg et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 75(11) (1978) 5553 - 5556 ja Saiki et al., Bio/Technology 3 (1985) 1008 - 1012.

Uutettu DNA voidaan puhdistaa dialyysin, kromatografian, affiniteettisieppauksen käyttäen komplementaarisia nukleiinihappoja tai minkä tahansa muun sopivan, alan ammattimiehelle ilman muuta selvän tekniikan avulla.

Kun eristetty DNA on saatu, sille suoritetaan monistamismenetelmä, joka tuottaa eksponenttimääriä molekyyliä suhteessa käytettyjen vaiheiden lukumäärään. On selvää, että kun kiinnostuksen kohteina on useita DNA-molekyylejä, monistamismenetelmää voidaan käyttää niiden kaikkien monistamiseen. Lopputulos on suuri lukumäärä todettavissa olevia nukleiinihappoja, joille voidaan sitten suorittaa osoittamismenetelmiä.

Yleisesti käytetty monistamismenetelmä on kuvattu huomattavan yksityiskohtaisesti US-patenttijulkaisuissa 4 683 195 ja 4 683 202.

Tässä käytettynä viitattaessa alukkeisiin tai koettimiin, termi "oligonukleotidi" viittaa molekyyliin, joka on muodostunut kahdesta tai useammasta deoksiribonukleotidista tai ribonukleotidista ja edullisesti useammasta kuin kolmesta. Tarkka koko ei ole kriittinen (paitsi alla kuvatulla koettimella), mutta riippuu monista tekijöistä mukaan lukien oligonukleotidin lopullinen käyttö tai tehtävä. Oligonukleotidi voi olla saatu synteettisesti tai muiden alalla tunnettujen menetelmien avulla.

Termi "aluke" viittaa oligonukleotidiin, joko luonnossa esiintyvään tai synteettisesti tuotettuun, joka kykenee toimimaan synteesin käyntiinpanokohtana sijoitettuna olosuhteisiin, joissa nukleiinihapposäikeelle komplementaarisen alukkeenpidennystuotteen synteesi aiheutuu. Sellaisiin olosuhteisiin sisältyy nukleotidien (kuten neljän normaalin deoksiribonukleosiditrifosfaatin) ja polymeroivan aineen, kuten DNA-polymeraasin läsnäolo, sopiva lämpötila ja pH ja muita sopivia reagensseja, kuten magnesium- tai mangaani-ionien lähde. Alukkeet ovat yleensä täysin komplementaarisia kiinnostuksen kohteena olevalle nukleiinihapposekvenssille, mutta kohteen ja alukkeen kesken voi esiintyä joitakin yhteensopimattomia pareja, jotka eivät merkitsevästi haittaa alukkeenpidennystuotteiden synteesin käyntiinpanoa ja muodostumista. Tätä tarkoitetaan ilmaisulla "oleellisesti komplementaarinen".

Tämän keksinnön mukaisessa monistamisessa voidaan käyttää alukeparia, joka on spesifinen määrätylle nukleiinihapolle. Kunkin alukeparin kohdalla on kriittisen tärkeää, että alukkeiden molaariset pitoisuudet ovat erisuuret, yleensä siten, että moolisuhde on suurempi kuin 2:1. Edullisesti moolisuhde on vähintään 5:1 ja se voi halutaessa olla suurempi suhde. Aluketta, jota on läsnä suurempana määränä kunkin alukeparin tapauksessa, pidetään alukkeena, jota on läsnä ylimäärin. Sopiva moolisuhde määrättyä kohdenukleiinihappoa varten riippuisi kohdenukleii-

nihapon määrästä, käytettyjen monistamissyklien lukumäärästä ja osoittamisreagenssien herkkyydestä ja alan ammattimies määrittäisi sen helposti. On tärkeää ratkaista suhde tehokasta monistamista varten polymeraasiketjureaktiossa ja yhden alukkeenpidennystuotteen tehokasta osoittamista varten tarvitsematta denaturoida.

Sen alukkeen, jota on läsnä pienempänä määränä määrätyssä alukeparissa, määrän alan ammattimies määräisi myös helposti tunnetun kirjallisuuden ja vähäisen kokeilun perusteella. Yleensä sitä on läsnä määränä, joka on vähintään 0,001-mikromolaarinen ja määrää 0,005 - 0,5-mikromolaarinen pidetään edullisena. Yleensä määrä on tehokas kohdesäikeen riittävän monistumisen aikaansaamiseksi.

Alukkeet ovat yleensä yksisäikeisiä. Kunkin alukkeen tarkka pituus vaihtelee riippuen aiotusta käytöstä, kohdesekvenssin monimutkaisuudesta, reaktiolämpötilasta ja alukkeen lähteestä. Yleensä tässä keksinnössä käytetyissä alukkeissa on 15 - 50 nukleotidia ja edullisesti niissä on 20 - 30 nukleotidia.

Tässä käyttökelpoisia alukkeita voidaan saada monista lähteistä tai valmistaa käyttäen tunnettuja tekniikoita ja laitteita, mukaan lukien esimerkiksi ABI-DNA-syntetisoija (saatavissa toiminimeltä Applied Biosystems) tai Biosearch™ 8600-sarjan, 8700-sarjan tai 8800-sarjan syntetisoijaa (saatavissa toiminimeltä Milligen-Biosearch, Inc.) ja tunnettuja menetelmiä niiden käyttöä varten. Luonnossa esiintyvät alukkeet, jotka on eristetty biologisista lähteistä, ovat myös käyttökelpoisia (kuten restriktioendonukleaasien pilkkomistuotteet).

Kun kohde-DNA on uutettu (mikäli tarpeellista) ja denaturoitau, sen säikeet saatetaan kosketuksiin tässä kuvatun alukeparin kanssa sellaisissa olosuhteissa, että saadaan alukkeiden ja kohde-DNA-säikeiden muodostamien hybridisoituneiden tuotteiden seos. Sellaiset olosuhteet ovat monistamiseen normaalisti käytetyt olosuhteet, kuten

on kuvattu US-patenttijulkaisussa 4 683 202, lukuun ottamatta alukkeiden erisuuruisia määriä. Sitten muodostetaan alukkeenpidennystuotteita vähintään yhdestä hybridisoituneista tuotteista, mitä seuraa uusi alukkeisiin yhdistäminen ja pidennystuotteiden muodostaminen. Viimeisen monistamissyklin jälkeen tuote, joka on muodostunut ylimäärin läsnä olevan alukkeen avulla, todetaan sopivalla tavalla, ilman että tarvitaan loppukuumennus- eli denaturointivaihetta.

Tämä keksintö on myös hyödyllinen kaksi komplementaarista säiettä omaavan spesifisen nukleiinihapon osoittamiseksi. Useimmat kiinnostuksen kohteina olevat nukleiinihapposekvenssit ovat jo kaksisäikeisiä, kuten DNA:ssa esiintyvät. Yksisäikeisiä nukleiinihapposekvenssejä, kuten mRNA, voidaan kuitenkin samoin osoittaa sen jälkeen, kun ne on muutettu kaksisäikeiseksi sekvenssiksi käyttäen käänteiskopioijaentsyymiä.

Ennalta määrättyä nukleiinihapposekvenssiä monistetaan käyttäen tuon sekvenssin sisältävää nukleiinihappoa templaattina. Jos nukleiinihappo sisältää kaksi säiettä, on tarpeellista erottaa säikeet, joko erillisenä vaiheena (jos polymeraasi ei ole lämmönkestävä) tai samanaikaisesti alukkeenpidennystuotteiden muodostamisen kanssa. Mikäli tarpeellista, denaturointi voidaan suorittaa käyttäen mitä tahansa sopivaa fysikaalista, kemiallista tai entsymaattista keinoa, kuten alalla on kuvattu, kuten esimerkiksi kuumentamalla.

Kun erotetut säikeet ovat käytettävissä, lisänukleiinihapposäikeiden synteesi voidaan suorittaa käyttäen alukkeita puskuroidussa vesiliuoksessa yleensä pH-arvossa 7 - 9. Deoksiribonukleosiditrifosfaatteja dATP, dCTP, dGTP ja dTTP lisätään myös synteesiseokseen riittävinä määrinä, ja jos denaturointia tarvitaan, tulokseksi saatua liuosta kuumennetaan 90 - 100 °C:seen korkeintaan 10 minuutin ajan. Tämän kuumentamisen jälkeen liuos edullisesti jääh-

dytetään huoneenlämpötilaan ja sopivaa ainetta aiheuttamaan (eli katalysoimaan) alukkeenpidennystuotteiden muodostumista lisätään. Tämä aiheuttaja-aine tunnetaan alalla yleensä polymeroivana aineena. Reaktio näiden tuotteiden muodostamiseksi suoritetaan tunnetuissa olosuhteissa (yleensä lämpötilassa, joka on huoneenlämpötilan ja sen lämpötilan, jossa polymeroitumista ei enää tapahdu, välillä).

Polymeroiva aine voi olla mikä tahansa yhdiste tai reagenssien yhdistelmä, jonka vaikutuksesta tapahtuu alukkeenpidennystuotteiden synteesi, mukaan lukien entsyymejä (esimerkiksi E. coli -DNA-polymeraasi I, T4-DNA-polymeraasi, Klenow-polymeraasi, käänteiskopioijaentsyymi ja muita alalla tunnettuja). Erityisen hyödyllisiä entsyymejä ovat termisesti stabiilit entsyymit, kloonatut tai luonnossa esiintyvät, kuten erilaisilta Thermus-bakteerilajeilta saadut.

Edullisia termisesti stabiileja entsyymejä ovat DNA-polymeraasit, jotka on eristetty joko lajilta Thermus aquaticus tai lajilta Thermus thermophilus tai valmistettu synteettisesti niiden genomin avulla käyttäen kloonausmenetelmiä, kuten on kuvattu julkaisuissa EP-A-0 258 017 ja WO-A-89/06 691. Muita hyödyllisiä entsyymejä ovat kuvanneet Rossi et al., Syst. Appl. Microbiol. 7(2 - 3) (1986) 337 - 341. Yleensä pidennystuotteiden synteesi käynnistyy kunkin alukkeen 3'-päästä ja etenee 5' → 3' -suunnassa templaattia pitkin, kunnes synteesi päättyy.

Vasta muodostuneet alukkeenpidennystuotteet, jotka käsittävät vasta syntetisoidut säikeet ja niihin kulloinkin kuuluvan alukkeen, muodostavat alkuperäisten kohdesäikeiden kanssa kaksisäikeisiä molekyylejä, joita käytetään menetelmän seuraavissa vaiheissa. Nämä säikeet erotetaan sitten denaturoimalla, kuten yllä on kuvattu, jolloin saadaan yksisäikeisiä molekyylejä, joihin syntetisoidaan uusia nukleiinihappoja, kuten yllä on kuvattu. Voidaan tar-

vita lisää reagensseja monistamismenetelmän pitämiseksi käynnissä, minkä jälkeen useimmat pidennystuotteet koostuvat spesifisestä nukleiinihapposekvenssistä, jota rajoittavat alukkeet (ts. komplementaarisia tuotteita).

Säikeiden erottamisen ja pidennystuotteiden synteesin vaiheet voidaan toistaa niin usein kuin on tarpeellista sellaisen halutun määrän spesifistä nukleiinihappoa tuottamiseksi, joka tarvitaan käyttöä, esimerkiksi osoittamista varten. Yleensä vaihejakso (tunnetaan tavallisesti syklinä) toistetaan vähintään kerran ja edullisesti vähintään 15 - 20 kertaa. Jossakin vaiheessa monistamismenetelmässä aluke, jota on läsnä pienempänä määränä, on käytetty loppuun, kun taas monistaminen etenee toisen alukkeen avulla. Siten muodostuu toista alukkeenpidennystuotetta ylimäärin verrattuna toiseen tuotteeseen. Tämä ylimäärätuote voidaan osoittaa tämän keksinnön avulla.

Kun halutaan tuottaa useampaa kuin yhtä erityistä nukleiinihappoa ensimmäisestä nukleiinihaposta tai niiden seoksesta, käytetään tarkoituksenmukaista alukeparien lukumäärää yllä kuvatussa yleisessä menetelmässä.

Yleensä, kun haluttu määrä ylimääräalukkeenpidennystuotetta on tuotettu, se voidaan osoittaa käyttämällä entsyymillä merkittyä reagenssia, joka suoraan tai välillisesti aikaansaa kolorimetrisen tai fluorometrisen signaalin sopivan entsyymin substraatin läsnä ollessa. Hyödyllisiä entsyymejä ja substraatteja on tarkasteltu yksityiskohtaisemmin alla.

Ylimääräalukkeesta tuotetun alukkeenpidennystuotteen osoittaminen voidaan suorittaa käyttäen mitä tahansa sopivaa tekniikkaa mukaan lukien yleiset "dot blot" -menetelmät ja -laitteet.

Yhdessä suoritusmuodossa reagenssi on entsyymillä merkitty koetin, joka on komplementaarinen osoitettavan alukkeenpidennystuotteen vähintään yhdelle nukleiinihapposekvenssille. Sellaisia koettimia voidaan valmistaa käyt-

täen alalla tunnettuja menetelmiä ja kemiaa, kuten on kuvattu esimerkiksi julkaisussa WO-A-0 89/02 932, joka edustaa peroksidaasilla merkittyjen koettimien esittelyä. Sellaiset koettimet hybridisoituvat ylimäärin läsnä olevan alukkeenpidennystuotteen kanssa ja tulokseksi saatu hybridisaatiotuote voidaan todeta sen jälkeen kun se on erotettu hybridisoitumattomista aineista sopivalla tavalla, esimerkiksi käyttäen sieppausreagenssia, kuten liukenematonta reagenssia, jossa on avidiinia kiinnitettynä polymeerihelmeen. Avidiinia voidaan käyttää muodostamaan kompleksi alukkeenpidennystuotteessa olevien biotiiniosien kanssa.

Toisessa ja edullisessa suoritusmuodossa entsyymillä merkitty reagenssi käsittää entsyymin, joka on konjugoitu spesifisesti sitoutuvan osan kanssa. Tulokseksi saatu konjugaatti voidaan liittää kiinnostuksena kohteena olevaan alukkeenpidennystuotteeseen antamalla spesifisesti sitoutuvan osan muodostaa kompleksi ylimäärin läsnä olevassa alukkeenpidennystuotteessa olevan vastaavan reseptoriosan kanssa. Esimerkiksi voidaan käyttää avidiini-peroksidaasikonjugaattia kompleksin muodostamiseksi biotinyloidun ylimäärän läsnä olevan alukkeenpidennystuotteen kanssa. Voidaan samoin suunnitella ja käyttää muita spesifisesti sitoutuvia komplekseja (kuten sokerilektiini ja vasta-aine-hapteeni). Sellaisia aineita ja valmistuskeinoja tunnetaan alalla. Tulokseksi saatu kompleksituote, jonka ovat muodostaneet biotinyloitu alukkeenpidennystuote ja avidiini-peroksidaasikonjugaatti, voidaan erottaa kompleksiksi sitoutumattomista aineista käyttämällä sieppauskoetinta, joka on komplementaarinen alukkeenpidennystuotteelle. Sieppauskoettimia tunnetaan alalla ja niihin kuuluu polymeerihiukkasia, joihin on sopivasti kiinnitetty oligonukleotideja.

Yllä kuvatussa edullisessa suoritusmuodossa on kaikkein edullisinta, että ylimäärin läsnä oleva aluke on biotinyloitu, niin että tulokseksi saatu ylimäärin läsnä

oleva alukkeenpidennystuote voidaan yhdistää kompleksiksi avidiini-entsyymikonjugaatin kanssa myöhempää toteamista varten. Toisin sanoen alukkeeseen on kovalenttisesti kiinnitetty biotiiniosa. Sellaisia alukkeen ja biotiinin konjugaatteja voidaan helposti valmistaa käyttäen tunnettua teknologiaa, kuten yllä mainitussa julkaisussa WO-A-0 89/02 931.

Jos halutaan erottaa hybridisoituneet tuotteet, jotka on tehty liukenemattomiksi, voidaan käyttää mitä tahansa sopivaa erottamiskeinoa mukaan lukien sentrifugointi, suodatus ja pesu. Edullisesti käytetään mikrohuokoista suodatuskalvoa ja se toimitetaan diagnostisen testitarvikepakkauksen osana. Erityisen hyödyllisiä mikrohuokoisia suodatuskalvoja ovat polyamidikalvot, joita myy Pall Corp. Haluttaessa kalvot voidaan päällystää proteiineilla, kuten kaseiinilla, sukkinyloidulla kaseiinilla tai ionoitumattomilla pinta-aktiivisilla aineilla.

Kalvoja voidaan käyttää erillisenä alustana sopivien astioiden kanssa nesteen ja liukenevien aineiden kokoamista varten. Edullisesti ne on kuitenkin asennettu koelaitteen osaksi. Erilaisia koelaitteita tunnetaan alalla mukaan lukien ne, jotka on kuvattu US-patenttijulkaisuissa 3 825 410, 3 888 629, 3 970 429 ja 4 446 232. Erityisen hyödyllisiä laitteita on kuvattu EP-patenttijulkaisussa 0 308 231.

Saatettaessa entsyymillä merkitty reagenssi koskettuksiin alukkeenpidennystuotteen kanssa, tarjotaan sopiva substraatti ja mitä tahansa muita reagensseja, jotka tarvitaan todettavissa olevan kolorimetrisen tai fluorometrisen signaalin tuottamiseksi. Hyödyllisiä merkkientsyymejä ovat peroksidaasi, glukoosioksidaasi, ß-galaktosidaasi, ureaasi, alkalinen fosfataasi. Edullisina pidetään peroksidaasia ja alkalista fosfataasia ja edullisimpana peroksidaasia.

Hyödyllisiä substraatteja ja värin antavia reagensseja tunnetaan alalla määrättyä entsyymiä varten. Esimerkiksi ovat hyödyllisiä värin antavia reagensseja peroksidaasia varten tetrametyylibentsidiini ja sen johdannaiset ja leukoväriaineet, kuten triaryyli-imidatsolileukoväriaineet (kuten on kuvattu US-patenttijulkaisussa 4 089 747). Erityisen hyödyllisiä värin antavia koostumuksia ovat triaryyli-imidatsolileukoväriaineet käytettynä yhdessä määrättyjen stabiloimisaineiden kanssa, esimerkiksi sellaisten, joita on kuvattu EP-patenttijulkaisussa 0 308 236.

Värin läsnäolo on osoitus kohde-DNA:n läsnäolosta testatussa näytteessä. Väri voidaan usein todeta silmämääräisesti käyttämättä laitteita, mutta joissakin tapauksissa värin tiheys voi olla vähäinen tai sähkömagneettisen spektrin näkyvän alueen ulkopuolella ja vaatia siten sopivan ilmaisulaitteen (ts. spektrofotometrejä tai fluorometrejä) tyydyttävää määrittämistä varten. Menetelmiä tämän suorittamiseksi tunnetaan alalla.

Tämän keksinnön mukaista menetelmää voidaan käyttää sellaisten nukleiinihappojen monistamiseen tai osoittamiseen, jotka liittyvät tartuntatauteihin, geneettisiin häiriöihin tai soluhäiriöihin, kuten syöpiin. Erilaisia tartuntatauteja voidaan diagnosoida sen perusteella, että kliinisessä näytteessä on läsnä pieni määrä DNA:ta, joka on spesifinen jollekin organismille, kuten bakteerille, hiivalle, alkueläimelle tai virukselle.

Edullisessa suoritusmuodossa menetelmä kaksi komplementaarista säiettä omaavan nukleiinihapon osoittamiseksi käsittää seuraavat vaiheet:

A. saatetaan nukleiinihapon denaturoidut komplementaariset säikeet kosketuksiin:

deoksiribonukleosidi-5'-trifosfaattien,

DNA-polymeraasin, joka on eristetty lajilta Thermus aquaticus, lajilta Thermus thermophilus tai niiden genomista peräisin olevan kloonin avulla, ja

parin sellaisia alukkeita kanssa, jotka ovat oleellisesti komplementaarisia denaturoiduille nukleiinihapposäikeille,

hybridisointiolosuhteissa, niin että saadaan alukkeiden pidennystuotteiden ja niiden komplementaaristen nukleiinihapposäikeiden muodostamia hybridisoituneita tuotteita, jotka pidennystuotteet voivat, kun ne on erotettu niiden komplementaarisista säikeistä, toimia templaatteina pidennystuotteiden synteesiä varten,

jolloin alukkeita on läsnä moolisuhteessa, joka on vähintään 5:1,

B. erotetaan alukkeenpidennystuotteet templaateista, joihin ne on syntetisoitu,

C. annetaan erotettujen alukkeenpidennystuotteiden olla monistamisolosuhteissa vähintään 15 syklin ajan, ja

D. denaturoimatta enää vaiheessa C muodostuneita monistettuja tuotteita osoitetaan kolorimetrisesti sen alukkeenpidennystuotteen läsnäolo, jota muodostettiin käyttäen ylimäärin läsnä olevaa aluketta,

joka osoittaminen suoritetaan käyttäen:

peroksidaasille merkittyä reagenssia, joka peroksidaasille herkän leukoväriaineen ja vetyperoksidin läsnä ollessa antaa värin ja joka reagenssi kykenee yhdistymään todettavaan alukkeenpidennystuotteeseen, ja

sieppauskoetinta, joka on komplementaarinen todettavalle alukkeenpidennystuotteelle.

Seuraavat esimerkit valaisevat tämän keksinnön käytäntöä, mutta niitä ei ole tarkoitettu millään tavalla rajoittaviksi.

Esimerkit 1 ja 2

HLA:n osoittaminen käyttäen merkkientsyymiä ilman lopullista denaturointivaihetta

Nämä esimerkit esittelevät tämän keksinnön mukaisen menetelmän käyttäen entsyymillä merkittyä reagenssia, sieppauskoetinta ja kolorimetristä osoittamista ja kahta

erilaista alukkeiden suhdetta. Tässä menetelmässä ei ollut lopullista denaturointivaihetta monistamisen jälkeen.

Materiaalit

DNA-näyte eristettiin HLA-homotsygoottiselta lymfoblastisolulinjalta LBF (GM 03163 talletuspaikasta the Human Genetic Mutant Cell Depository, Camden, N.J.) proteinaasi K:n avulla pilkkomisen ja fenoli/kloroformiuuton avulla käyttäen yleisiä menetelmiä, jotka ovat kuvanneet Maniatis et al. (mainittu yllä).

Käytetyissä alukkeissa oli seuraava nukleotidisekvenssi, käyttäen standardimerkintöjä A (adeniini), G (guaniini), T (tymiini) ja C (sytosiini):

aluke 1 [komplementaarinen (-)-säikeelle]:

5'-X-GTGCTGCAGGTGTAAACTTGTACCAG-3',

aluke 2 [komplementaarinen (+)-säikeelle]:

5'-CACGGATCCGGTAGCAGCGGTAGAGTTG-3'

jossa X edustaa biotiinia, joka on kiinnitetty aminotetraeteeniglykolivälikeryhmän avulla käyttäen menetelmiä, jotka on kuvattu julkaisussa WO-A-0 89/02 931.

Sieppauskoetin koostui polymeerihiukkasesta, joka oli muodostettu poly(styreeni-co-akryylihaposta (moolisuhde 70:30, keskimääräinen halkaisija 0,7 mikrometriä) ja johon oli kovalenttisesti kiinnitetty (-)-säikeelle komplementaarinen oligonukleotidi. Oligonukleotidissa oli seuraava sekvenssi:

5'-Y-CCTCTGTTCCACAGACTTAGATTTG-3'

jossa Y edustaa aminotetraeteeniglykolivälikeryhmää, joka on valmistettu julkaisussa WO-A-0 89/02 931 (mainittu yllä) kuvattujen menetelmien avulla.

Polymeerihiukkaset valmistettiin käyttäen yleisiä emulsiopolymerointimenetelmiä ja oligonukleotidi kiinnitettiin hiukkasiin käyttäen aminotetraeteeniglykolivälikeryhmää ja standardikemiaa käyttäen karbodi-imidireagenssia, kuten 3-(dimetyyliamino)propyylietyylikarbodi-imidihydrokloridia.

Käytettiin Surecell™-kertakäyttöistä koelaitetta. Se sisälsi 1,2 mikrometrin huokoskoon omaavan Biodyne™A-mikrohuokoisen nailonkalvon, joka oli päällystetty kaseiinilla (noin 1 g/m^2).

Värin antava koostumus sisälsi 2-(4-hydroksi-3-metoksifenyyli)-4,5-bis(4-metoksifenyyli)imidatsolileukoväriainetta (0,008 paino-%), poly(vilyylipyrrolidonia) (1 paino-%), natriumfosfaattia (10 mM, pH 6,8), dietyleenitriamiinipentaetikkahappoa (10 µM), 4'-hydroksiasetanilidia (2 mM) ja vetyperoksidia (10 mM).

Koe

LBF-solulinjasta peräisin olevaa DNA:ta monistettiin 100 mikrolitran reaktioastiassa, joka sisälsi tris-(hydroksimetyyli)aminometaanihydrokloridipuskuria (5 mM, pH 8,3), magnesiumkloridia (2,5 mM), kutakin dNTP:a (kukin 175 µM), DNA-polymeraasia, joka oli eristetty lajilta Thermus aquaticus (2 kansainvälistä yksikköä), (+)-säikeelle komplementaarista aluketta (0,2 µM) ja (-)-säikeen kanssa yhteensopivaa aluketta pienempinä määrinä (joko 0,02 tai 0,04 µM).

Monistamismenetelmää suoritettiin 30 syklin ajan (kukin sykli sisälsi denaturointia 30 sekunnin ajan 95 °C:ssa, hybridisointia 30 sekunnin ajan 55 °C:ssa ja alukkeen pidentämistä 60 sekunnin ajan 70 °C:ssa) käyttäen kaupallisesti saatavissa olevaa Perkin-Elmer-lämpösyklilaitetta. Ylimäärin käytetyn alukkeen avulla tulokseksi saatua kaksisäikeistä DNA-tuotetta ei denaturoitu lopullisen kuumennusvaiheen avulla.

Suoritettiin kontrollimonistaminen käyttäen samoja reagensseja ja menetelmä, paitsi että alukkeita käytettiin yhtä suurina määrinä ja lopullista denaturointivaihetta suoritettiin 95 °C:ssa viiden minuutin ajan.

Monistettujen tuotteiden osoittaminen suoritettiin sekoittamalla yllä kuvattu polymeraasiketjureaktioseos (100 µl) sieppauskoettimen (200 µg) kanssa, joka oli

liuoksessa, joka sisälsi natriumfosfaattia (8,5 mM, pH 7,4), natriumkloridia (149 mM), etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (1 mM) ja Triton™X-100-ionoitumatonta pinta-aktiivista ainetta (0,1 paino-%) lopullisessa tilavuudessa 30 µl. Tätä seosta inkuboitiin 42 °C:ssa kymmenen minuutin ajan, jotta koetin saisi hybridisoitua ylimäärä-(-)-säikeisiin. Tulokseksi saatu suspensio lisättiin Surecell™-kertakäyttöiseen koelaitteeseen ja liukenemattomaksi saatettu tuote koottiin koelaitteen koekuopassa olevalle kalvolle. Liukenemattomaksi tehty tuote pestiin liuoksella (200 µl), jossa oli natriumfosfaattia (8,5 mM, pH 7,4), natriumkloridia (149 mM), etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (1 mM) ja natriumdodekyylisulfaattia (0,5 paino-%) ja joka oli esilämmitetty 55 °C:seen.

Piparjuuriperoksidaasi-avidiinikonjugaattia (2,3 ng) (saatavissa Kodak See-Quence™-HLA-DQα-geenikoetintarvikepakkauksessa) lisättiin sitten koelaitteeseen reagoimaan liukenemattomaksi tehdyn biotinyloidun alukkeenpidennystuotteen kanssa. Koelaitetta inkuboitiin noin 20 - 25 °C:ssa kahden minuutin ajan, mitä seurasi pesu liuoksella (200 µl), jossa oli tris(hydroksimetyyli)aminometaanihydrokloridipuskuria (50 mM, pH 8,8), natriumdodekyylisulfaattia (2,4 paino-%), natriumkloridia (0,5 M) ja 1-metyyli-2-pyrrolidonia (10 paino-%). Sitten lisättiin värin antavaa koostumusta (50 µl), mitä seurasi inkubointi 20 - 25 °C:ssa viiden minuutin ajan. Kokeiden tulokset (sekä kontrolli että keksintö) on esitetty seuraavassa taulukossa silmämääräisesti määritettynä värikelukemana käyttäen asteikkoa 0 - 5 (jossa 5 on suurin värin tiheys).

Vaikka kontrollikokeessa saatiin hyväksyttävä näkyvä signaali, oli tämä mahdollista ainoastaan, koska entsyymillä merkittyä reagenssia lisättiin kootulle tuotteelle denaturointivaiheen jälkeen. Tämä on rajoitus eräissä kokeissa. On selvää, että tämä keksintö tarjoaa keinon entsyymillä merkityn reagenssin käyttämiseksi tyy-

dyttävien analyysitulosten saamiseksi, ilman että tarvitaan lopullista denaturointia monistamisen jälkeen, joka kuumennusvaihe tuhoaisi merkkientsyymin tehokkuuden. Se tarjoaa siten enemmän joustavuutta kokeisiin käytettäessä entsyymillä merkittyjä reagensseja.

Taulukko

Koe	**Alukkeiden suhde (moolisuhde)**	**Värin tiheys**
Kontrolli	1:1	4,5
Esimerkki 1	5:1	4,5
Esimerkki 2	10:1	4,5

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä kaksi komplementaarista säiettä omaavan nukleiinihapon osoittamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää seuraavat vaiheet:

A. saatetaan nukleiinihapon denaturoidut komplementaariset säikeet kosketuksiin:

deoksiribonukleosidi-5'-trifosfaattien,

polymeroivan aineen ja

parin sellaisia alukkeita kanssa, jotka ovat oleellisesti komplementaarisia denaturoiduille nukleiinihapposäikeille,

hybridisointiolosuhteissa, niin että muodostuu komplementaarisen nukleiinihapposäikeensä kanssa hybridisoituneita alukkeenpidennystuotteita, joita pidennystuotteita voidaan, kun ne on erotettu niiden komplementaarisista säikeistä, käyttää templaatteina pidennystuotteiden synteesiä varten,

jolloin alukkeita on läsnä moolisuhteessa, joka on vähintään 2:1,

B. erotetaan alukkeenpidennystuotteet templaateista, joihin ne on syntetisoitu,

C. annetaan erotettujen alukkeenpidennystuotteiden olla monistamisolosuhteissa, ja

D. denaturoimatta enää vaiheessa C muodostuneita monistettuja tuotteita, osoitetaan kolorimetrisesti tai fluorometrisesti sen alukkeenpidennystuotteen läsnäolo, jota muodostettiin käyttämällä aluketta ylimäärin, joka osoittaminen suoritetaan käyttämällä entsyymillä merkittyä reagenssia, joka sen substraatin läsnä ollessa antaa todettavissa olevan kolorimetrisen tai fluorometrisen signaalin, jolloin reagenssi on joko komplementaarinen todettavalle alukkeenpidennystuotteelle tai kykenee liittymään siihen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että alukkeita on läsnä moolisuhteessa, joka on vähintään 5:1.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polymeroiva aine on lämmönkestävä polymeraasi.

4. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että monistetut tuotteet osoitetaan kolorimetrisesti käyttäen sellaista substraattikoostumusta entsyymillä merkittyä reagenssia varten, joka antaa värin kyseisen entsyymin läsnä ollessa.

5. Minkä tahansa patnettivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että merkkientsyymi on peroksidaasi ja substraattikoostumus sisältää leukoväriaineen, joka antaa värin peroksidaasin ja vetyperoksidin läsnä ollessa.

6. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että merkkientsyymi on alkalinen fosfataasi.

7. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymillä merkitty reagenssi on entsyymillä merkitty oligonukleotidikoetin, joka on komplementaarinen todettavalle alukkeenpidennystuotteelle.

8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että merkkientsyymi on peroksidaasi.

9. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ylimäärin läsnä olevan alukkeenpidennystuotteen osoittaminen käsittää tuotteen hybridisoinnin sieppauskoettimen kanssa.

10. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymillä merkitty reagenssi on avidiinin ja entsyymin konjugaatti, joka kykenee muodostamaan kompleksin ylimäärin läsnä olevan biotinyloidun alukkeenpidennystuotteen kanssa.