



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **328070**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/25 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20021585	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.10.05 PCT/US00/27453
(22)	Inng.dag	2002.04.04	(85)	Videreføringsdag	2002.04.04
(24)	Løpedag	2000.10.05	(30)	Prioritet	1999.10.05, US, 410960
(41)	Alm.tilgj	2002.06.04			
(45)	Meddelt	2009.11.23			
(73)	Innehaver	Aventis Pharmaceuticals Inc, P O Box 6800, NJ08807-0800 BRIDGEWATER, US			
(72)	Oppfinner	Litao Zang, 456 Shakespear Drive, Collegeville, PA 19426, US Richard K Harrison, 5 Ashlea Drive, Glenmoore, PA 19343, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			
(54)	Benevnelse	ECL-analyse for deteksjon av helikaseaktivitet, fremgangsmåte for å identifisere et middel som modulerer helikaseaktivitet samt kit for ECL-deteksjon av helikaseaktivitet.			
(56)	Anførte publikasjoner	Kyono K., et al. Detection of Hepatitis C virus helicase activity using the Scintillaion proximity assay system, Anal. Biochem., 1998 Mar., Vol. 257(2), s. 120-6, Blackburn, G. F. et al. Electrochemiluminescence detection for development of immunoassay and DNA probe assays for clinical diagnostics, Clin. Chem., 1991 Sep., Vol. 37(9), s. 1534-9, Kenten, J. H., et al. Improved electrochemiluminescent label for DNA probe assays: Rapid quantitative assays of HIV-1 polymerase chain reaction products., Clin. Chem., 1992 Jun., Vol. 38(6), s. 873-9, WO9312245, WO9508644			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelse relaterer seg til elektrokjemiluminescensanalyser for å detektere helikaseaktivitet. Oppfinnelsen tilveiebringer en helikaseanalyse som er rask, sensitiv og passende for høy "throughput"-screening for helikasehemmere. Helikasehemmere representerer en klasse av farmakologiske midler som er nyttige for behandlingen av sykdom.

OPPFINNELSENS FELT

Den foreliggende oppfinnelsen relaterer seg til analyser som bruker elektrokjemiluminescens for å påvise helikaseaktivitet. Derfor bidrar oppfinnelsen med
 5 en helikaseanalyse som er rask, sensitiv og passende for høy kapasitet screening for helikaseaktivitet generelt, og spesielt for potensielle helikasehemmere. Helikasehemmere representerer en klasse med farmakologiske virkemidler som er nyttige for behandlingen av sykdom.

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

DNA-helikaser

DNA-helikaser er enzymer som er involvert i alle aspekter av nukleinsyremetabolismen (Lohman og Bjørnson, *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, 65, 169-
 15 214; Matson, S. W., *Progress in Nuclear Acid research and Molecular Biology*, 1991, 40, 289-326). Den stabile formen av de fleste DNA *in vivo* er dobbelttrådet heliks-DNA. Enkeltrådet DNA er nødvendige for DNA replikering, reparasjon, rekombinasjon og konjugasjon. For å danne enkelttrådet DNA fra en dobbelttråd, må DNA-dupleksen være minst delvis opptvunnet og separert. Opptvinning av stabile
 20 dupleks-DNA er katalysert av DNA-helikaser ved å bruke energien som er derivert fra hydrolysen av nukleosid 5' trifosfater (NTP). Helikaseenzymene translokerer langs DNA for å opptvinne (få trådene til ikke å hybridisere) dupleksen med en hastighet som kan være så rask som 500-1000 basepar pr. sekund.

DNA-helikaser er blitt identifisert i forskjellige prokaryoter, eukaryoter,
 25 bakteriofager og virus. De fleste organismer koder for flere helikaser. For eksempel koder *E. coli* for minst 12 forskjellige helikaser (Matson, et al., *BioEssays*, 1994, 16, 13-22 og *S. cerevisiae* koder for minst seks helikaseformer (Li, et al., *Chromosoma*, 1992, 102, s. 93-99). Selv om disse DNA-helikaser har mange forskjellige funksjoner i DNA-metabolisme er det nå klart at helikaseaktiviteten er funksjonen som tilskrives
 30 opptvinningen av DNA-dupleksen. På grunn av den essensielle funksjonen helikasene har i den cellulære metabolisme, representerer disse enzymene viktige mål for å utvikle terapeutiske virkemidler.

Helikaseanalyser

Flere typer analyser er utviklet for å måle opptvinningen av duplekse nukleinsyrer ved helikaser. En slik analyse måler sensitiviseringen av merket dupleks-DNA til enkelttrådet-spesifikke nukleaser, slik som S1 eller eksonnuklease I, som resulterer i produksjon av ssDNA under opptvinningen (Palas et al., *J. Biol. Chem.*, 1990, 265:3447). Elektronmikroskopi har også blitt anvendt for å visualisere direkte regioner i DNA som opptvinnes av proteiner, slik som recBCD-enzym, rep protein, *E. coli* helikaser I og II, og SV40-T-antigen (Runyon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, 87:6383).

Den mest vanlige analysen for å bestemme helikaseaktiviteten *in vitro* bruker elektroforese (Venkatesan et al., *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 12426; Matson, et al., *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 14017). Helikaseenzymet opptvinner dupleks DNA og enkelttrådet DNA. Produktene av denne reaksjonen blir separert på en polyakrylamid eller agarosegel. En radioaktiv merking innen DNAet tillater direkte visualisering og kvantifisering av resultatene.

En kontinuerlig spektrofotometrisk analyse som er utviklet for å studere recBCD-enzymhelikaseaktiviteten bruker et ssDNA bindende protein, enten *E. coli* SSB-protein (enkeltrådet DNA-bindende protein) eller fag T4-gen 32-protein, som rapportørmolekyl (Romane et al., *Biochemistry*, 1989, 28:2863). Når dsDNA er opptvunnet, binder SSB-proteinet seg til ssDNA som dannes, og resulterer i quenching av dets indre fluorescens. Tilleggshelikaseanalyser er beskrevet i US patenter 4 568 649, 5 705 344 og 5 747 247.

Fremgangsmåte for påvisning av Hepatitt C virus helikase aktivitet ved anvendelse av "Scintillation Proximity Assay System" er kjent fra *Anal Biochem.*, (1998), vol. 257(2), side 120-126.

Hver av disse analysene som er beskrevet over har visse begrensninger relatert til sensitivitet, antall trinn som kreves for å utføre analysen, og/eller begrenset antall av prøver som kan testes. Det er derfor klart at slike fremgangsmåter ikke er lett adapterbare for høyt sensitive, høy kapasitets medikament screeningsformater. Derfor er det nødvendig innen feltet å få en enkel, men sensitiv helikaseanalyse som kan utføres i høy kapasitets. Den foreliggende oppfinnelse overvinner disse hindringer og bidrar med en helikaseanalyse som er rask, sensitiv og passende for en høy kapasitets screening for potensielle helikasehemmere.

Elektroluminescensanalyser

Elektrokjemiluminescens er lys som lages når en lav volt brukes på en elektrode, og dermed trigger en syklisk oksidasjon- og reduksjonsreaksjon av rutheniummetallion

bundet i en "chelate" av tris-(bipyridin). Denne teknologi har en vid anvendelighet for deteksjon av mikrobiologiske, biokjemiske og kjemiske analyser (Bruno et al., 1997, *Rec. Res. Devel. In Micro.* 1:25).

Elektrokjemiluminescensmerkinger for DNA er blitt utviklet (Kenten et al., 1991, *Clin. Chem.* 37:1626; Kenten et al., 1992, *Clin. Chem.* 38:873, "Origen" label, "Origen" Phosphoramidite og TAG Phosphoramidite tilgjengelige fra IGEN Inc., Rockville, MD), og brukt for deteksjon av polymerasekjedereaksjonsprodukter (Schutzbank et al., 1995, *J. Clin. Microbiol.*, 33:2023). Disse analyser er vist å være raske og effektive for deteksjon av amplifiserte PCR-produkter.

Anvendelse av elektrokjemiluminescens (ECL) merking i immunoassay og DNA-probe assay i klinisk diagnostikk er kjent fra *Clin Chem.*, (1991), Vol.37(9), side 1534-1539.

Metode for eksponensiell anrikning av nukleinsyre ved en enkel "uparret" primer er kjent fra WO9312245. ECL merkede primere anvendes for å kvantifisere anriking av PCR produktene.

WO9508644 vedrører metode for å detektere og kvantifisere nukleinsyremolekyler. Det ønskede nukleinsyremolekyl fremstilles ved å anvende ECL-merkede enkelt nukleotider. Det ECL-merkede nukleinsyremolekyl kan så kvantifiseres ved måling av ECL-inkorporering.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelse bidrar til en helikaseanalyse som er rask, sensitiv og passende for høy kapasitets screening for potensielle helikaseinhibitorer. Helikaseinhibitorer representerer en klasse med farmakologiske midler som er nyttige for behandling av sykdom.

Et første aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører en elektrokjemiluminescensanalysefremgangsmåte for å detektere helikaseaktivitet i en prøve, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter

- (a) å kombinere prøven med en første nukleinsyre som omfatter en elektrokjemiluminescensmarkør og hybridisert til en komplementær annen nukleinsyre;
- (b) å inkubere prøven og hybridiserte nukleinsyrer fra trinn (a) under betingelser hvor helikase som er til stede i prøven kan dehybridisere første og andre nukleinsyrer;
- (c) å fange dehybridiserte første nukleinsyre; og

(d) å måle elektrokjemiluminescens fra den fangede første nukleinsyre.

Helikasen kan være en human eller patogen helikase. Helst er helikasen en fungal, viral, bakteriell eller parasitthelekase.

Enhver fremgangsmåte for å fange ikke-hybridisert første nukleinsyre eller
 5 nukleinsyremolekyl kan brukes. I en foretrukket serie med trinn, mellom trinnene (b) og (c) over, blir de ikke hybridiserte nukleinsyrene inkubert med en tredje nukleinsyre komplementær til den første nukleinsyren og som omfatter en kapringsligand, under betingelser hvor de første og tredje nukleinsyrene kan hybridisere. Deretter kan de hybridiserte første og tredje nukleinsyrene fanges med en kapringsreseptor som binder
 10 den fangede liganden. Kapringsreseptoren kan være på overflaten av magnetiske kuler. I en ønsket utførelseform, er kapringsliganden biotin og kapringsreseptoren avidin. Den foretrukne elektrokjemiluminescensmerkingen er et rutheniumchelat.

Et andre aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for å detektere i en prøve et middel som modulerer helikaseaktiviteten i en prøve,
 15 kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter

- (a) å kombinere prøven, en helikase og et første nukleinsyre som omfatter en elektrokjemiluminescensmarkør og hybridisert til en komplementær andre nukleinsyre, og dermed danne en blanding;
- (b) å inkubere blandingen fra trinn (a) under betingelser hvor helikasen kan
 20 dehybridisere de første og andre nukleinsyrene i fravær av prøven;
- (c) å fange dehybridiserte første nukleinsyre; og
- (d) å måle elektrokjemiluminescens fra den fangede første nukleinsyren.

I en foretrukket utførelseform, er middelet en hemmer av helikaseaktiviteten. Helikasen kan være en human eller patogen helikase. Helst er helikasen fungal, viral,
 25 bakteriell eller parasitthelikase

Enhver metode for å fange dehybridiserte første nukleinsyre kan brukes. I en foretrukket serie med trinn, mellom trinnene (b) og (c) over, blir de dehybridiserte nukleinsyrene inkubert med en tredje nukleinsyre komplementært til den første nukleinsyre og som omfatter en kapringsligand, under betingelser hvor de første og
 30 tredje nukleinsyrene kan hybridisere. Deretter kan de hybridiserte første og tredje nukleinsyrene fanges med en kapringsreseptor som binder kapringsliganden. Kapringsreseptoren kan være på overflaten av magnetiske kuler. I en foretrukket utførelseform, er kapringsliganden biotin og kapringsreseptoren avidin. Den foretrukne kjemiluminescensmerkingen er et rutheniumchelat.

Et tredje aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører et kitt for
 35 elektrokjemiluminescensdeteksjon av helikaseaktivitet, kjennetegnet ved at den omfatter (a) en første nukleinsyre som omfatter en elektrokjemiluminescensmarkør;

- (b) en andre nukleinsyre komplementær til første nukleinsyre;
- (c) en helikase.

I et aspekt, er første nukleinsyren allerede hybridisert til andre nukleinsyre. Kittene ifølge oppfinnelsen, kan videre omfatte en tredje nukleinsyre komplementær til første nukleinsyre og som omfatter en kapringsligand. Under slike omstendigheter, vil kettet generelt, inkludere en kapringsreseptor som er i stand til å binde kapringsliganden. I en foretrukket utførelsesform, er kapringsreseptoren på overflaten av magnetiske kuler. I den mest foretrukne utførelsesform, er kapringsliganden biotin og kapringsreseptoren avidin.

10

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1: Radiometrisk kvantitering av *E. coli*. DnaB-helikaseaktivitet. Et 60 basepar oligonukleotid ble merket med ^{32}P i en 3' enden. Deretter ble et komplementær 60 basepar oligonukleotid hybridisert med det merkede nukleotidet. Forskjellige mengder DnaB-helikase som indikert ble tilsatt, og reaksjonsblandingen ble inkubert ved 37°C i 30 minutter. EDTA ble tilsatt for å stoppe reaksjonen, og prøvene ble separert på en PAGE-gel og detektert med autoradiografi. Spor 8 inneholder en kokt prøve for å vise separasjonen av ssDNA og dsDNA. Spor 9 inneholder bare merket ssDNA.

20

Figur 2: Skjema av scintillasjonen proksimitetsanalyse (SPA) for kvantitering av helikaseaktivitet ved å bruke ^3H -radioaktivt merkede oligonukleotider og M13 ssDNA.

Figur 3: Opptvinning av ^3H -substrater ved å bruke forskjellige mengder av DnaB-helikase. Telling per minutt(cpm) er plottet som funksjon av mengde DnaB-helikase i hver reaksjon.

Figur 4: Stolpediagram av DnaB-helikaseaktivitet ved å bruke SPA-analyse.

Figur 5: Skjema av "Time Resolved Fluorescence Quenching" analyse for kvantitering av helikaseaktivitet ved å bruke Eu-radiomerkede oligonukleotider og rodahim-merkede komplementære oligonukleotider.

Figur 6: Opptvinning av hybridiserte substrater ved å bruke forskjellige mengder av DnaB-helikase. Mengde fluorescens frigjort fra opptvinning av dsDNA er plottet som funksjon av mengde DnaB-helikase tilsatt i hver reaksjon.

35

Figur 7: Skjema for elektrokjemiluminescenc (ECL)-analyse for kvantitering av helikaseaktiviteten ved å bruke ruthenium-merkede oligonukleotider og M13 ssDNA.

Figur 8: Elektrokjemiluminescenssignal generert ved å opptvinne dobbeltrådet substrater ved å bruke forskjellige mengder DnaB-helikase. ECL-signalet er plottet som funksjon helikase tilsatt til reaksjonen.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fordelaktig en elektrokjemiluminescensanalysefremgangsmåte for å detektere helikaseaktivitet, og en fremgangsmåte for å identifisere modulatorer av helikaseaktiviteten. Derfor tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en rask og sensitiv analyse for potensielle helikasehemmere som er passende for høy kapasitets screening. Oppfinnelsen tilveiebringer også kitt for bruk til å identifisere helikaseaktivitet, og screening for potensielle modulatorer av helikaseaktiviteten. Slike kitt inkluderer forhånds målte mengder av komponentene som brukes i de utarbeidede fremgangsmåtene.

Fordi helikaser er nødvendig for en rekke forskjellige cellulære funksjoner inkludert vekst, er målsykdommer begrenset bare i at sykdom eller sykdomsprogresjon er utsatt for hemming ved modulering av aktiviteten av en eller flere spesifikke helikaser. Målsykdommer inkluderer virale, bakterielle eller fungale infeksjoner, metabolsk sykdom, genetisk sykdom, cellevekst og regulatoriske forstyrrelser, slik som neoplasma, inflammasjon, hypersensitivitet osv. Målsykdommene kan være lidelser hos planter, spesielt jordbruksavlinger, eller dyr, spesielt budskap, husdyr og mennesker.

De forskjellige aspektene av oppfinnelsen vil bli forklart i mer detalj i de følgende seksjonene. Denne organiseringen i forskjellige seksjoner har til hensikt å lette forståelsen av oppfinnelsen.

Definisjoner

De følgende definerte uttrykkene er brukt gjennom den foreliggende spesifisering, og skulle være en hjelp i å forstå målet og anvendelsen av den foreliggende oppfinnelsen.

I en spesifikk utførelsesform, betyr uttrykket "ca." eller "tilnærmet" innen 20%, helst innen 10%, og mer ønskelig innen 5% av en gitt verdi eller område.

Som brukt her, betyr artiklene "en" og "ett" en eller flere; følgelig er "en helikase" ment å inkludere analyser som involverer en eller flere helikaser, slik som samtidig screeninger for hemmere av flere helikaser.

En "nukleinsyre" er en polymer forbindelse som omfatter kovalente koblete subenheter som kalles nukleotider. Nukleinsyre inkluderer polyribonukleinsyre (RNA) og polydeoksyribonukleinsyre (DNA), som begge kan være enkelttrådet eller dobbelttrådet. DNA inkluderer cDNA, genomisk DNA, syntetisk DNA, og halvsyntetisk DNA.

Et "nukleinsyremolekyl" referer seg til fosfater polymerformen til ribonukleosider (adenosin, guanosin, uridin eller cytidin; "RNA-molekyler") eller deoksyribonukleosider (deoksyadenosin, deoksyguanosin, deoksytymin eller deoksytydin; "DNA-molekyler"), eller enhver fosforester analoger derav, slik som fosforotioater og tioester, i enten enkelttrådig form eller en dobbelttrådet heliks. Dobbelttrådet DNA-DNA, DNA-RNA og RNA-RNA helikser er mulige. Utrykket nukleinsyremolekyl, og spesielt DNA- eller RNA-molekyl, refererer seg bare til primær- og sekundærstrukturen av molekylet, og begrenser det ikke til noen spesielle tertiære former. Således inkluderer dette uttrykket dobbelttrådet DNA funnet, *inter alia*, i lineære eller sirkulære DNA-molekyler (for eksempel restriksjonsfragmenter), plasmider, og kromosomer. Når strukturen av spesielle dobbelttrådet DNA-molekyler diskuteres, kan sekvenser bli beskrevet heri ifølge normale konvensjoner ved å gi sekvensen bare i 5' til 3' retning langs den ikke transkriberte tråden av DNA (for eksempel tråden som har en sekvens homolog til mRNA). Et "rekombinant DNA-molekyl" er et DNA-molekyl som har gjennomgått en molekylær biologisk manipulering.

Et nukleinsyremolekyl er "i stand til å hybridisere" til et annet nukleinsyremolekyl, slik som et oligonukleotid, et cDNA, genomisk DNA, eller RNA, når en enkelttrådet form av nukleotinsyremolekylet kan middelet til det andre nukleinsyremolekylet under passende betingelser med hensyn til temperatur og ionestyrken i løsningen. Betingelsene for temperatur og ionestyrke bestemmer "stringensen" til hybridiseringen. Lave stringenshybridiseringsbetingelser korresponderer til en T_m på 55°, for eksempel, 5x SSC, 0,1% SDS, 0,25% melk, og ingen formamid; eller 30% formamid, 5x SSC, 0,5% SDA). Moderate stringente hybridiseringsbetingelser korresponderer til en høyere T_m , for eksempel, 40% formamid, med 5x eller 6x SCC. Høy stringenshybridiseringsbetingelser responderer til den høyeste T_m , for eksempel, 50% formamid, 5x eller 6x SCC. Hybridisering krever at de to nukleinsyrene inneholder komplementære sekvenser, selv om, avhengig av stringensen på hybridiseringen, det er mulig med mismatches mellom basene. Den

- passende stringensen for hybridisering av nukleinsyrer avhenger av lengden av nukleinsyrene og graden av komplementering, variabler som er velkjent i fagfeltet. Jo større graden av likhet eller homologi mellom to nukleotidsekvenser, jo større er T_m -verdien for nukleinsyrehybridene som har de sekvensene. Den relative stabilitet (som
- 5 korresponderer til høyere T_m) til nukleinsyrehybridiseringer minker i følgende rekkefølge: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. For hybrider som har mer enn 100 nukleotider i lengde, er det utledet likninger for å kalkulere T_m (se Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, annen utgave (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 9.50-0.51). For
- 10 hybridiseringer med kortere nukleinsyrer, for eksempel, oligonukleotider, blir posisjonene for mismatchene mer viktig, og oligonukleotidets lengde bestemmer dets spesifisitet (se Sambrook et al., 11.7-11.8). Helst er minimumslengden for en nukleinsyre som er i stand til å hybridisere minst ca. 10 nukleotider; helst er den minst ca. 15 nukleotider; og mest ønskelig er lengden minst ca. 20 nukleotider.
- 15 Som brukt her refererer uttrykket "oligonukleotid" seg til en nukleinsyre, generelt med minst 18 nukleotider, som er i stand til å hybridisere til en komplementær nukleinsyre. Oligonukleotider kan merkes, for eksempel med ^{32}P -nukleotider eller nukleotider som en merking, slik som biotin eller rutheiumchelate, er blitt kovalent konjugert til. Generelt lages oligonukleotider syntetisk, mest ønskelig på en
- 20 nukleinsyres syntesemaskin. følgelig kan oligonukleotider lages med ikke naturlig forekommende fosfoester analogbindinger, slik som tioesterbindinger osv. "Avidin" er men å inkludere ethvert protein eller polypeptid som er i stand til med høy affinitet å bindes til biotin. Streptavidin er et eksempel på avidin.
- En "helikase" er ethvert protein eller polypeptid som har evnen til å opptvinne
- 25 (dehybridisere) en dupleks med komplementære nukleinsyrer eller nukleinsyremolekyler.

Helikaseanalyser

- Fremgangsmåtene som er definert ved den foreliggende oppfinnelse involverer å
- 30 danne en blanding av en første nukleinsyre som omfatter en elektrokjemiluminescensmarkør og hybridisert til en komplementær annen nukleinsyre. De hybridiserte første og andre nukleinsyrene kan være RNA eller DNA, lineært eller sirkulært, avhengig av spesifisiteten til den gjeldende helikasen. I tillegg, kan andre nukleinsyrer eller nukleinsyremolekyler eller strukturelle analoger være substituert så
- 35 lenge de tilveiebringer et aktivt substrat for den gjeldende helikaseaktiviteten. Nukleinsyrene eller nukleinsyremolekylene kan være av enhver lengde som er medgjør for analysebetingelsene og kravene. For eksempel, for å sikre

helikasesubstratspesifisitet og for å minimalisere ikke spesifikk renaturering trengs en minimal region med komplementaritet mellom den første og andre av nukleinsyrene, typisk minst ca. 12, mer typisk minst ca. 18 og helst minst ca. 24 kontinuerlige basepar. Størrelsene blir valgt for å fasilitere analysen og tilveiebringe statistisk signifikante analyseresultater; ofte vil størrelsene være forskjellige med minst en eller to styrkeordner. Generelt er de optimale lengdene lette å bestemme empirisk.

Nukleinsyrene kan være av enhver sekvens som tilveiebringer et passende substrat for de gjeldende helikasene. Nukleinsyrene kan være komplementære over hele lengden av minst en av nukleinsyrene eller det kan være regioner av ikke-komplementaritet 5' og/eller 3' for den komplementære region. Å introdusere disse 5' og/eller 3' ikke-komplementære regionene tilveiebringer molekylære gafler om vil gi bedre substrater for noen helikaser. Generelt tilveiebringer passende replikerte vektorer for eksempel fag, eller restriksjonsfragmenter av dem, en billig kilde til nukleinsyrer. Analysene er generelt kompatible med nærværet av DNA-bindende protein, slik som histoner. Det er ofte en fordel å inkludere en rekke potensielle substrater, for eksempel dobbelttrådede nukleinsyrer av forskjellig størrelse, sekvens, proteinkompleksitet, osv. for å øke sannsynligheten for å detektere substratsensitive helikaser.

Den første nukleinsyren omfatter en detekterbar elektrokjemiluniescensmerking. Elektrokjemiluniescens er lys som lages når lav volt brukes på en elektrode, dermed trigges en syklisk oksidasjon og reduksjonsreaksjon av merkingen. Enhver elektroschemiluniescensmerking som er i stand til en slik syklisk oksidasjon/reduksjon og lysgenerering kan brukes ifølge den foreliggende oppfinnelse. Den foretrukne merkingen er rutheniummetallion bundet i en "chelate" av tris-(bipyridin). Spesifikke elektrokjemiluniescensmerkinger for DNA er blitt utviklet (Kenten et al., 1991, *Clin. Chem.* 37:1626; Kenten et al., 1992, *Clin. Chem.* 38:873; "Origen" label, "Origen" fosforamidit og TAG-fosforamidit, IGEN Inc., Rockville, MD) og er de mest foretrukne for den foreliggende oppfinnelse.

Enhver patogen helikase (for eksempel enhver helikase som er i stand til å opptre skadelig til en vertscelle eller organisme) kan analyseres ifølge den foreliggende oppfinnelse. Hurtigvoksende celler (for eksempel i neoplasia) kan være mål for hemmere av humane helikaser, spesielt replikative helikaser. I tillegg blir patogene selektive eller spesifikke helikaser brukt for å identifisere farmakologiske terapeutika for behandling av infeksjons sykdom. Fungale, virale, bakterielle og parasitthelikaser spesielt, tilveiebringer medisinske presterende mål for å identifisere hemmere med foreliggende fremgangsmåter. Alternativt, kan et flertall av helikaser eller panel som omfatter et preselektert område av forskjellige helikaser brukes for å maksimere målet av analysen.

Foretrukne patogene helikaser er derivert fra medisinske signifikante infeksijøse fungi, slik som aspergillus-, candidaarter; bakterier slik som staphylococci (for eksempel aureus), streptococci (for eksempel pneumoniae), clostridia (for eksempel perfringens), neisseria (for eksempel gonorrhoeae), enterobacteriaceae (for eksempel coli), helicobacter (for eksempel pylori), vibrio (f.eks cholerae), campylobacter (for eksempel jejuni), pseudomonas (for eksempel aeruginosa), haemophilus (for eksempel influenzae), bordetella (for eksempel pertussis), mycoplasma (for eksempel pneumoniae), ureaplasma (for eksempel urealyticum), legionella (for eksempel pneumophila), spirochetes (for eksempel treponema, leptospira og borrelia), mucobacteria (for eksempel tuberculosis, smegmatis), actinomycies (for eksempel israelii), nocardia (for eksempel asteroider), chlamydia (for eksempel trachomatis), rickettsia, coxiella, ehrlichia, rickettsia, brucella, yersinia, Francisella, og Pasteurella; protozoa slik som sporozoa (for eksempel plasmodia), rhizopods (for eksempel entamoeba) og flagellater (trypanosoma, leishmania, trichomonas giardia, etc.); og virus slik som (+) RNA-virus (eksemplere inkluderer picornavirus, for eksempel polio; togaviruses, for eksempel rubella; flaviviruses, for eksempel HCV; og coronavirus), (-)RNA-virus (eksemplere inkluderer rabdovirus, for eksempel VSV; paramyxovirer, for eksempel RSV; ortomyxovirer, for eksempel influenza; bunyavirus og arenavirus). dsDNA-virus (reovirus, for eksempel), RNA- til DNA-virus, for eksempel retrovirus, for eksempel HIV, og visse DNA- til RNA-virus slik som hepatitt-B-virus.

Helikasen kan renses fra en naturlig kilde eller kan være rekombinant, helikasen er vanligvis tilveiebrakt i minst en delvis rensert form. Bare den del av helikasen som er tilstrekkelig for helikaseaktivitet kan brukes i den foreliggende analysen. Deler som er i stand til å gi den nødvendige bindingsspesifisiteten og affiniteten er lette å identifisere og produsere av fagfolk ved å bruke generelle molekylære og biokjemiske metoder, se for eksempel Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2. utgave red., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor), Current Protocols in Molecular Biology (red. Ausubel, Brent, Kingston, More, Seidman, Smith and Stuhl, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY, N.Y., 1992) eller det som ellers er kjent i fagfeltet.

Fremgangsmetodene i den foreliggende oppfinnelse krever å få tak i dehybridiserte første nukleinsyre som produseres av helikaseaktiviteten som er til stede i analysen. Enhver metode for å få tak i dehybridiserte første nukleinsyre kan brukes. I en foretrukket serie av trinn blir dehybridisert første og andre nukleinsyrer inkubert med en tredje nukleinsyre, komplementær til første nukleinsyre og omfatter en kapringsligand, under betingelser hvor første og tredje nukleinsyre kan hybridisere. Deretter kan de hybridiserte første og tredje nukleinsyrene fanges med en kapringsreseptor som bindes

til kapringsliganden. Kapringsreseptoren kan være på overflaten av magnetiske kuler for å direkte fasilitere elektrokjemiluminescensdeteksjon.

Analyseprosessen i den foreliggende oppfinnelse kan brukes sammen med enhver fangen ligandreseptorkombinasjon eller system som spesifikt fanger den første nukleinsyre uten å affisere elektrokjemiluminescensdeteksjonen. Eksempler på passende ligandreseptorkombinasjoner inkluderer antistoffer og deres korresponderende antigener. Et annet ligandreseptorsystem kan komponeres av protein A og immunoglobuliner, eller en Fc-del av de. Tilleggsfangingsystemer med som den foreliggende oppfinnelse kan brukes inkluderer: (1) lektinroligosakkarider eller glykoproteiner; (2) biotinavidin; (3) hormonreseptorhormon; (4) enzymsubstrat eller kofaktor; (5) RNA-DNA; og (6) DNA-DNA. Det må forstås at i den foreliggende oppfinnelse kan det ene eller andre element tjene som ligand eller reseptor. I en foretrukket utførelsesform, er fangingsliganden biotin og fangingsreseptoren avidin. Tillagingen av biotynylerte oligonukleotider og av avidinbelagte magnetiske kuler er beskrevet i Kenten et al., 1991 (*Clin. Chem.* 37:1626 og Kenten et al., 1992 (*Clin. Chem.* 38:873).

Den foreliggende oppfinnelse er spesielt passende for å screene kandidatmidler for evnen de har til å modulere helikaseaktiviteten, spesielt hemmende aktivitet. Oppfinnelsen er passende for høy-"throughput" medikamenscreening av et bibliotek med kandidatmidler. Bibliotekderiverte kandidatmidler omfatter flere kjemiske klasser, selv om de typisk er organiske forbindelser. Bibliotekene kan omfatte syntetiske og/eller naturlig deriverte forbindelser. For eksempel er flere måter tilgjengelige for tilfeldig og direkte syntese av en rekke forskjellige organiske forbindelser og biomolekyler, inkludert ekspresjon av randomiserte oligonukleotider. Alternativt er biblioteker av naturlige forbindelser i form av bakterielle-, fungale-, plante- og dyreekstrakter tilgjengelige eller kan lett produseres. I tillegg kan naturlige og syntetisk produserte biblioteker og forbindelser lett modifiseres gjennom konvensjonelle kjemiske, fysikalske og biokjemiske måter. I tillegg, kan kjente farmakologiske midler utsettes for direkte eller tilfeldige modifikasjoner, slik som acylering, alkylering, esterifisering, amidifisering, osv., for å produsere strukturelle analoger. Middelet blir tilveiebrakt i standard seriefortynninger eller i en mengde som er bestemt ved analogi til kjente modulatorer.

Typisk inkluderer de foreliggende analyser vanligvis tilleggsreagenser, slik som salter, buffere, osv., for å fasilitere eller maksimere helikaseaktivitet. Reagenser som reduserer ikke spesifikk eller bakgrunnsdenaturering eller på annen måte øker effektiviteten av analysen, slik som proteaseinhibitorer, nukleaseinhibitorer, antimikrobielle midler, enkelttrådet DNA-bindende protein, osv. kan også brukes.

Den foreliggende oppfinnelse kan bedre forstås ved referanse til de følgende eksemplene, som er tilveiebrakt for å eksemplifisere oppfinnelsen.

EKSEMPLER

5

Generelle molekylære biologiske teknikker

Fremgangsmetoder som tradisjonelt brukes i molekylærbiologi, slik som preparative ekstraksjoner av plasmid DNA, sentrifugering av plasmid DNA i cesiumkloridgradient, agarose- eller acrylamidgeelektroforeser, rensing av DNA-
 10 fragmenter ved elektroeluering, proteinekstraksjon med fenol eller fenol/kloroform, etanol eller isopropanolpresipitering av DNA i et saltmedium, transformering i *Escherichia coli* og liknende, er velkjente for en person som er trenet i fagfeltet og som er utførlig beskrevet i litteraturen [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor., 1982 (2nd utgave 1989);
 15 Ausubel F.M. et al. (red), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Konvensjonelle kloningsverktøy inkluderer pBR322 og pUC type plasmider og fag i serien M13. Disse kan skaffes til veie kommersielt (Bethesda Research Laboratories eller New England Biolabs).

20 For ligering, kan DNA-fragmentene separeres ifølge deres størrelse ved agarose- eller acrylamidgelelektroforese, ekstrahert med fenol eller med en fenol/kloroformblanding, presipitert med etanol og så inkubert i nærvær av fag T4 DNA-ligase (Biolabs) ifølge produsentens anbefalinger.

Innfylling av de 5' utstikkende enene kan utføres med Klenow-fragmentet fra *E. coli* DNA-polymerase I (Biolabs) ifølge produsentens spesifikasjoner. Ødeleggelse av 3' utstikkende ender blir utført i nærvær av fag T4 DNA-polymerase (Biolabs) brukt ifølge produsentens anbefalinger. Ødeleggelse av 5' utstikkende ender utføres med en kontrollert behandling med S1-nuklease.

30 Mutagenese utført *in vitro* ved syntetiske oligodeoksynukleotider kan utføres ifølge fremgangsmåten utviklet av Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] ved å bruket kittet som distribueres av Amersham.

Den enzymatiske amplifikasjonen av DNA-fragmentene ved PCR [Polymerasecatalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. and Faloona F.A., Meth Enzym 155 (1987) 335-350] teknikken kan utføres
 35 ved å bruke en "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) ifølge produsentens spesifikasjoner.

Verifisering av nukleotidsekvensene kan utføres etter fremgangsmåten utviklet av Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] ved å bruke kittet som distribueres av Amersham.

Plasmid-DNA kan renses med qiagen plasmidrensingssystem utført ifølge
5 produsentens instruksjoner.

Eksempel 1: tradisjonell helikaseanalyse

Et 60 basepar oligonukleotid (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
TTT GTT AAA GGC CGC TTT TGC GGG ATC GTC ACC-3'; SEQ ID NO:1) blir
10 merket med ^{32}P ved å bruke T4-polynukleotidkinase og så hybridisert til et
komplimentært umerket 60 basepar oligonukleotid. Det hybridiserte substrat og
forskjellige mengder av DnaB-helikase [Reha-Krantz et al. *J. Biol. Chem.* 253 (1978)
4043-4050; LeBowitz et al. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 4738-4748] ble blandet i
analysebuffer (400 mM Hepes pH 7,4, 5mM DTT, 2 mg/ml BSA, 12,5 mM MgCl_2 og
15 6,25 mM ATP) og inkubert ved 37°C i 30 minutter. Reaksjonen ble stoppet ved å sette
til 0,5M EDTA, og så ble 2,5 mg med proteinase K tilsatt til hver reaksjon for å frigjøre
ethvert gjenværende oligonukleotid som er bundet til DnaB helikase. Prøvene ble så
kjørt på en 15% TBE-gel. De enkle og doble trådene av DNA ble skilt ved
autoradiografi.

20 Ved å bruke den tradisjonelle helikaseanalysen, ble *E. coli* DnaB i stand til å
dehybridisere duplekssubstratene for å gi enkle tråder av DNA (figur 1). For å observere
enkeltrådet DNA frigjort fra dupleks DNA etter denne fremgangsmåten, trengs
imidlertid minst 0,75 μg av DnaB for å fullstendig opptvinne 175 fmol av dupleks
DNA-substratene. Derfor er denne tilnærmingens måten tidskrevende og sensitiviteten er
25 lav.

Eksempel 2: helikase [^3H] skintillasjonsproksimitetsanalyse) enzymanalyse

Skintillasjonsproksimitetsanalyse (SPA) er beskrevet i figur 2. Denne analysen
gjør bruk av et ^3H -oligonukleotid som er annealt til et enkeltrådet M13 DNA
30 (M13ssDNA). Som et resultat av helikaseaktivitet, blir ^3H -oligonukleotidet
dehybridisert fra M13ssDNA. Det frigjorte oligonukleotidet kan så anneale til et
biotinylert annet oligonukleotid. Dette komplekset blir fanget av streptavidinbelagte
SPA-kuler. På grunn av sin tette nærhet til SPA-kulene, er komplekset i stand til å
stimulere frigjøring av lysglimt innen kulene kommer noe som resulterer i et øket
35 signal. De merkede oligonukleotidene som forblir bundet til M13ssDNA frie løsning
stimulerer ikke frigjøring av lysglimt.

Et SPA-helikaseanalysekit ble kjøpt fra Amersham Life Science. Analysen ble utført ifølge de tilveiebrakte instruksjonene med små modifikasjoner som beskrevet under. Et [³H]-merket oligonukleotid blir annelet med et M13 enkelttrådet DNA (M13ssDNA) templat for å danne partielle duplekssubstrater. DnaB-helikasen og duplekssubstratene ble blandet i analysebufferen og inkubert ved 37°C i 45 minutter. Reaksjonen ble stoppet ved å tilsette EDTA. Et biotinyllert komplementært oligonukleotid blir så annelet til det radioaktivt merkede oligonukleotidet som frigjøres fra M13ssDNA. Komplekset fanges av streptavidinbelagte SPA-kuler ved å inkubere i romtemperatur i 15 minutter, og det radioaktive signalet blir talt.

Titring av DnaB-helikase (figur 3) indikerer at optimal aktivitet kan fås ved å bruke 0,16 µg av DnaB-helikase. Helikaseaktiviteten minker når mindre enn 0,16 µg med DnaB blir brukt, noe som tyder på at det ikke er nok helikase til å opptvinne de duplekse DNA. Når mer enn 0,16 µg av DnaB-helikase blir brukt blir hver reaksjon, minker imidlertid også helikaseaktiviteten. Dette kan være et resultat fra ikke-spesifikk binding av overskuddhelikase til enkelttrådet DNA som frigjøres fra dupleks DNA-substratene, og dermed hindres de komplementære, biotinyllerte oligonukleotidene fra å binde disse enkelttrådet DNA-produktene. Under optimale analysebetingelser, er det beste signalet til støy i denne analysen ca. 10 ganger (se figur 4). DnaB-helikaseaktiviteten er 95% av den maksimalt mulige aktiviteten, bestemt ved signalet som lages fra produktene som frigjøres fra kokte, denaturerte dupleks DNA-substrater. Mens denne fremgangsmåten er rask og tilbyr muligheten for å måle et stort antall prøver, er den ikke fordelaktig på grunn av høye kostnader og at det lages signifikant radioaktivt avfall.

25 Eksempel 3: fluorescerende guenchinghelikaseanalyse

En fluorescerende guenchinganalyse er studert (figur 5). I denne analysen er europium- og rhodaminmerkede prober til stede som en fluorescerende guenched dupleks. Ved å tilsette en helikase, dehybridiserer dupleks DNA-substratene for å gi to enkelttråder av DNA. Oligonukleotidene som er merket med Lance Europium frigjøres fra dupleks substratene gir opphav til tidsoppløste fluorescerende signaler.

Et 60 basepar oligonukleotid (5'-GT GAC GAT CCC GCA AAA GCG GCC TTT AAC TCC CTG CAA GCC TCA GCG ACC GAA TAT ATC G-3': SEQ ID NO:2) ble merket med Lance-Europium ved sin 5' ende. Et oligonukleotid (5'-T TTT TTT TTT TTT TTT TTT GTT AAA GGC CGC TTT TGC GGG ATC GTC CA.-3'; SEQ ID NO: 3) som har en region komplementær med SEQ ID NO:2 ble merket med rhodamin ved sin 5' ende. Disse Eu-merkede og Rh-merkede probene ble

blandet i et forhold på 1:2 og hybridisert for å danne Y-formede substrater. Forskjellige mengder DnaB-helikase og 50 fmol av de fluorescensmerkede substratene ble blandet i analysebuffer og inkubert ved 37°C i 45 minutter. Reaksjonen ble stoppet ved å tilsette EDTA. De fluorescerende signalene som ble laget av Eu-oligonukleotidene frigjort fra
 5 dupleks DNA-substratene ble så nedtegnet.

Titring av DnaB-helikase (figur 6) indikerer at maksimal aktivitet trenger minst 1,25 µg av DnaB-helikase, og signalet til støy er ca. 4 ganger. Sammen viser disse resultatene at sensitiviteten av denne tilnærmingsmåten er lav.

10 **Eksempel 4: Elektrokjemiluminescenshelikaseanalyse**

En elektrokjemiluminescens (ECL)-helikaseanalyse er vist i figur 7. Korte oligonukleotider blir merket med et rutheniummetallchelat og annealt med M13 enkelttrådet DNA. Når det tilsettes helikase, blir de merkede oligonukleotidene opptvunnet fra dupleks DNA, og tilgjengelige for å anneale til et annet komplementært
 15 oligonukleotid merket med biotin. De resulterende kompleksene blir formet med streptavidinbelagte størrelseskuler. Kule/komplekset blir ført gjennom en flowcelle og fanget ved en elektrode av et magnetisk felt. Volt blir brukt på elektroden og ECL-signalene som kommer fra rutheniummerkingen blir målt ved å bruke en elektrokjemiluminescensdetektor, slik som en Origen Analyzer (IGEN Inc., Rockville,
 20 MD).

Et 60 baseparoligonukleotid (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GTT AAA GGC CGC TTT TGC GGG ATC GTC ACC-3' SEQ ID NO: 4 eller et 30 baseparoligonukleotid (5'-GTT AAA GGC CGC TTT TGC GGG ATC GTC ACC-3' SEQ ID NO:5) blir merket med ruthenium i den 5'-enden (Kenten et al., *Clin. Chem.* 38 (1992) 873-879) og resuspendert i TE-buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH=7,4) til en sluttstokk-konsentrasjon på 25 pmol/µL. M13 mp18ssDNA blir løst i TE ved en konsentrasjon på 0,183 pmol/mL. Like konsentrasjoner av M13mp18ssDNA og oligonukleotider blir blandet i hybridiseringsbuffer (10 mM Tris HCl, 0,3 M NaCl, 30mM Na sitrat, pH 8,5). Løsningen blir så inkubert ved 100°C i 2 minutter, og så
 30 nedkjølt til romtemperatur. Tjuefem fmol av duplekssubstratene (M13 ssDNA annealt med 30 eller 60 oligonukleotidis) ble blandet med 25ng av *E. coli* DnaB helikasebuffer (40 mM Hepes pH 7,4, 0,5 mM DTT, 0,2 mg/ml BSA, 8 mM MgCl₂, 5 mM ATP). Reaksjonsblandingen blir inkubert ved 37°C i 45 minutter. Til denne reaksjonen blir det tilsatt 125 fmol av et biotinyleret oligonukleotid (5'-GGT GAC GAT CCC GCA AAA GCG GCC TTT AAC AGC-3'; SEQ ID NO:6) komplementært til SEQ ID NO:4 og 5 i
 35 0,5M EDTA, og reaksjonen blir inkubert ved 37°C i 15 minutter. Biotynilering blir utført ved å bruke "Biotin-ON" fosforamidatkit fra Clontech (PT1402-1) ved å bruke

prosedyren tilveiebrakt med kittet. Adeninet i posisjon 31 innen SEQ ID NO:6 mottok biotinmerkingen. Til slutt blir 20 µg av streptavidinmagnetiske kuler i et totalvolum på 0,25 ml TE-buffer tilsatt, og løsningen blir inkubert i 15 minutter med vortexing. ECL-signalene blir nedtegnet ved å bruke en Origen Analyser (IGJEN In., Rockville, MD)

5 ved å bruke betingelser som er foreslått av produsenten.

Dataene fra titreringen av DnaB helikase indikerer at bare 25ng av enzymet trengs for Dehybridisering av 22 fmol duplekssubstrater, og at signalet til støy er ca. 30-ganger (se figur 8). Tilleggseksperimenter viser at, generelt så er signalet til støy minst 30-ganger, og så høyt som 40-ganger. Denne fremgangsmåte for deteksjon viser
10 signifikant sensitivitet og reproduktivitet sammenliknet til alle de tidligere beskrevne fremgangsmåtene (se tabell 1).

Tabell 1: Oppsummering av SPA, fluorescerende quenching og ECL-analyser

Analyse	Deteksjon	(S/N)	<u>Nødvendige reagenser</u>		Nedsatt Sensitivitet
			Substrat (fmol)	Helikase (µg)	
SPA	Radioaktivitet	~10	50	0,16	~19
Quenching	Fluorescens	~4	50	1,25	~375
ECL	Luminescens	~30	25	0,025	-

15 ^aRelativt til ECL. Beregnet ved å multiplisere øket sensitivitet (S/N) med den nedsatte mengde nødvendig helikase.

Sensitiviteten til elektrokjemiluminescensanalysen er minst 7-ganger større enn den fluorescerende quenchinganalysen og 3 ganger over SPA-analysen. Totalt er
20 sensitiviteten ca. 18-ganger høyere enn SPA-analysen, og enda større når det sammenliknes med fluorescensanalysen. Mengdeenzym som trengs for elektrokjemiluniescensdeteksjon minker 6-ganger over WPA-analysen og 50-ganger over quenchinganalysen. Substratene som brukes i elektrokjemiluminescensanalysen er redusert 2-ganger sammenliknet med både SPA og quenchinganalysene.

25 Elektrokjemiluniescensanalysen gir en hurtig og sensitiv deteksjon av helikaseaktiviteten, og kan lett formateres for høy kapasitets-screening. Tilnærmingsmåten er generisk, og er passende for ethvert enzym som har helikaseaktivitet.

P a t e n t k r a v

1.

- Elektrokjemiluminescensanalysefremgangsmåte for å detektere helikaseaktivitet i en
 5 prøve, karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter
- (a) å kombinere prøven med en første nukleinsyre som omfatter en
 elektrokjemiluminescensmarkør og hybridisert til en komplementær annen
 nukleinsyre;
 - (b) å inkubere prøven og hybridiserte nukleinsyrer fra trinn (a) under betingelser hvor
 10 helikase som er til stede i prøven kan dehybridisere første og andre nukleinsyrer;
 - (c) å fange dehybridiserte første nukleinsyre; og
 - (d) å måle elektrokjemiluminescens fra den fangede første nukleinsyren.

2.

- 15 Elektrokjemiluminescensanalysen ifølge krav 1, karakterisert ved at
 helikasen er en human eller patogen helikase.

3.

- 20 Elektrokjemiluminescensanalysen ifølge krav 2, karakterisert ved at den
 patogene helikasen er en fungal, viral, bakteriell eller parasitthelikase.

4.

- Elektrokjemiluminescensanalysen ifølge krav 1, karakterisert ved at den
 omfatter mellom trinnene (b) og (c),
- 25 (i) å inkubere de dehybridiserte nukleinsyrer med en tredje nukleinsyre komplementært
 til den første nukleinsyren og som omfatter en kapringsligand, under betingelser hvor de
 første og tredje nukleinsyrene kan hybridisere; og
- (ii) å inkubere de hybridiserte første og tredje nukleinsyrene fra trinn (i) med en
 30 kapringsreseptor som binder seg til kapringsliganden.

5.

- Elektrokjemiluminescensanalysen ifølge krav 4, karakterisert ved at
 kapringsliganden er biotin og kapringsreseptoren er avidin.

6.

Elektrokjemiluminescensanalysen ifølge krav 4, karakterisert ved at kapringsreseptoren er på overflaten av magnetiske kuler.

5 7.

Elektrokjemiluminescensanalysen ifølge krav 6, karakterisert ved at kapringsliganden er biotin og karpringsreseptoren er avidin.

8.

10 Elektrokjemiluminescensanalysen ifølge krav 1, karakterisert ved at den elektrokjemiluminescensmarkøren er en rutheniumchelat.

9.

15 Fremgangsmåte for å detektere i en prøve et middel som modulerer helikaseaktiviteten i en prøve, karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter

(a) å kombinere prøven, en helikase og et første nukleinsyre som omfatter en elektrokjemiluminescensmarkør og hybridisert til en komplementær andre nukleinsyre, og dermed danne en blanding;

20 (b) å inkubere blandingen fra trinn (a) under betingelser hvor helikasen kan dehybridisere de første og andre nukleinsyrene i fravær av prøven;

(c) å fange dehybridiserte første nukleinsyre; og

(d) å måle elektrokjemiluminescens fra den fangede første nukleinsyren.

10.

25 Fremgangsmåten ifølge krav 9, karakterisert ved at middelet er hemmer av helikaseaktivitet.

11.

30 Fremgangsmåten ifølge krav 9, karakterisert ved at helikasen er en human eller patogen helikase.

12.

Fremgangsmåten ifølge krav 11, karakterisert ved at den patogene helikasen er en fungal, viral, bakteriell eller parasitthelikase.

13.

Fremgangsmåten ifølge krav 9, karakterisert ved at den omfatter mellom trinnene (b) og (c),

- 5 (i) å inkubere de dehybridiserte nukleinsyrer med en tredje nukleinsyre komplementært til den første nukleinsyren og som omfatter en kapringsligand, under betingelser hvor de første og tredje nukleinsyrene kan hybridisere; og
- (ii) å inkubere de hybridiserte første og tredje nukleinsyrene fra trinn (i) med en kapringsreseptor som bindes til kapringsliganden.

10 14.

Fremgangsmåten ifølge krav 13, karakterisert ved at kapringsliganden er biotin og kapringsreseptoren er avidin.

15.

- 15 Fremgangsmåten ifølge krav 13, karakterisert ved at kapringsreseptoren er på overflaten av magnetiske kuler.

16.

- 20 Fremgangsmåten ifølge krav 15, karakterisert ved at kapringsliganden er biotin og kapringsreseptoren er avidin.

17.

Fremgangsmåten ifølge krav 9, karakterisert ved at elektrokjemiluminescensmarkøren er en rutheniumchelat.

25

18.

Kitt for elektrokjemiluminescensdeteksjon av helikaseaktivitet, karakterisert ved at den omfatter

- (a) en første nukleinsyre som omfatter en elektrokjemiluminescensmarkør;
- 30 (b) en andre nukleinsyre komplementær til første nukleinsyre;
- (c) en helikase.

19.

- 35 Kittet ifølge krav 18, karakterisert ved at den første nukleinsyren er hybridisert til den andre nukleinsyren.

20.

Kittet ifølge krav 18, karakterisert ved at det videre omfatter en tredje nukleinsyre komplementær til den første nukleinsyre og som omfatter en kapringsligand.

5 21.

Kittet ifølge krav 20, karakterisert ved at det videre omfatter en kapringsreseptor.

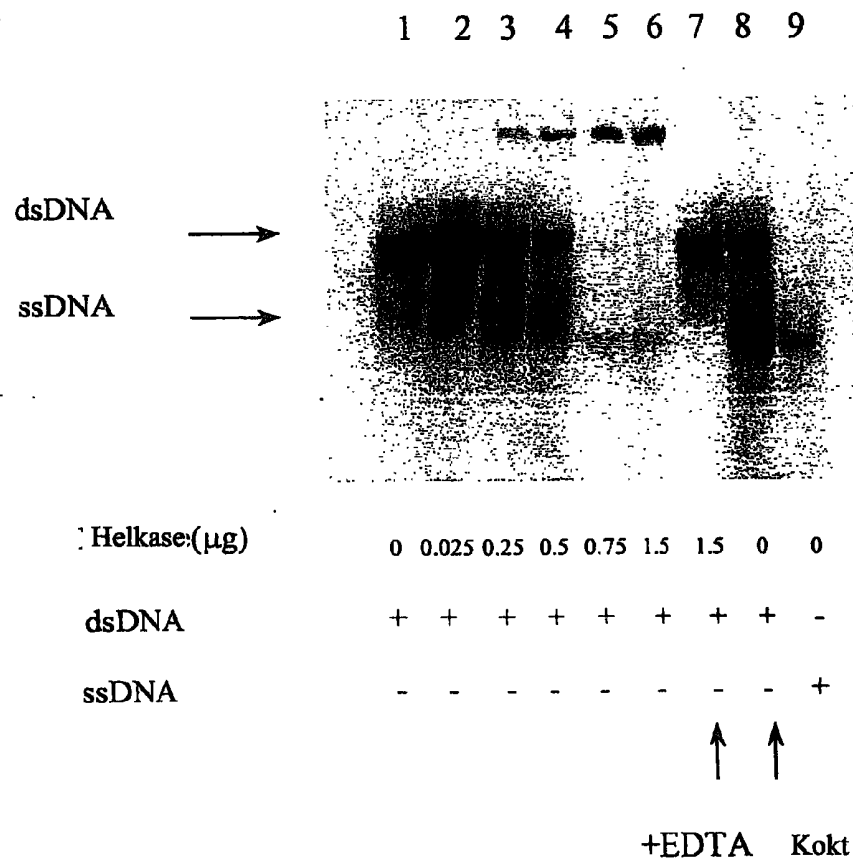
22.

10 Kittet ifølge krav 21, karakterisert ved at kapringsreseptoren er på overflaten av magnetiske kuler.

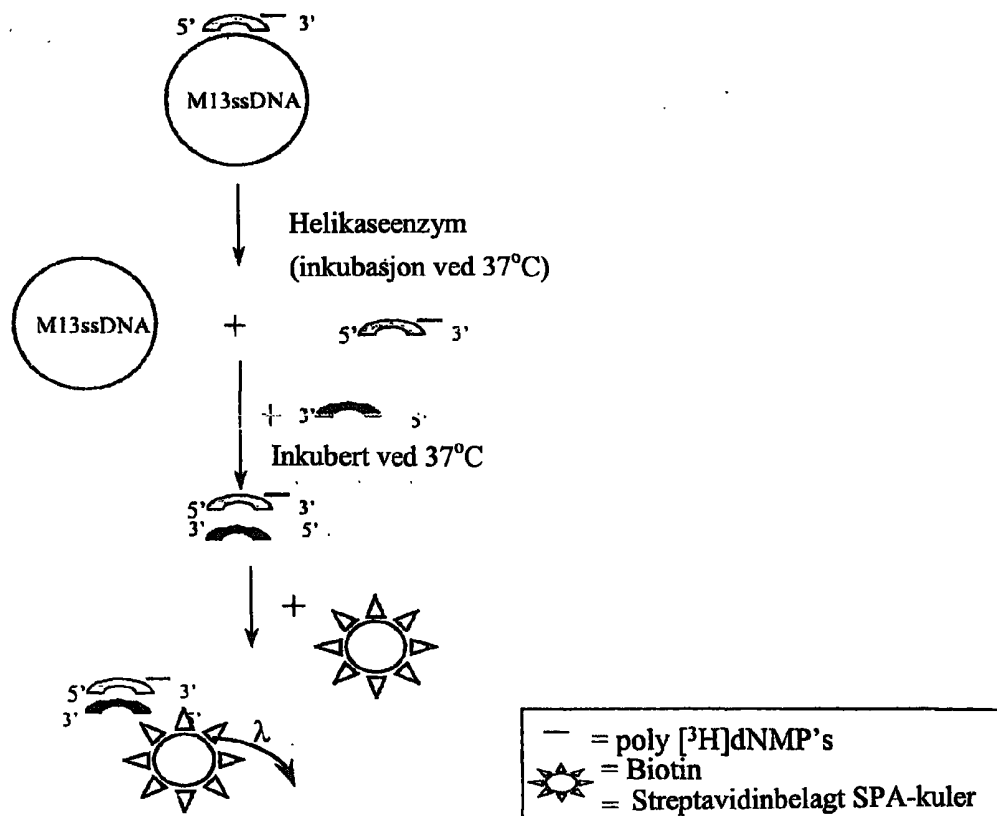
23.

15 Kittet ifølge krav 22, karakterisert ved at kapringsliganden er biotin og kapringsreseptoren er avidin.

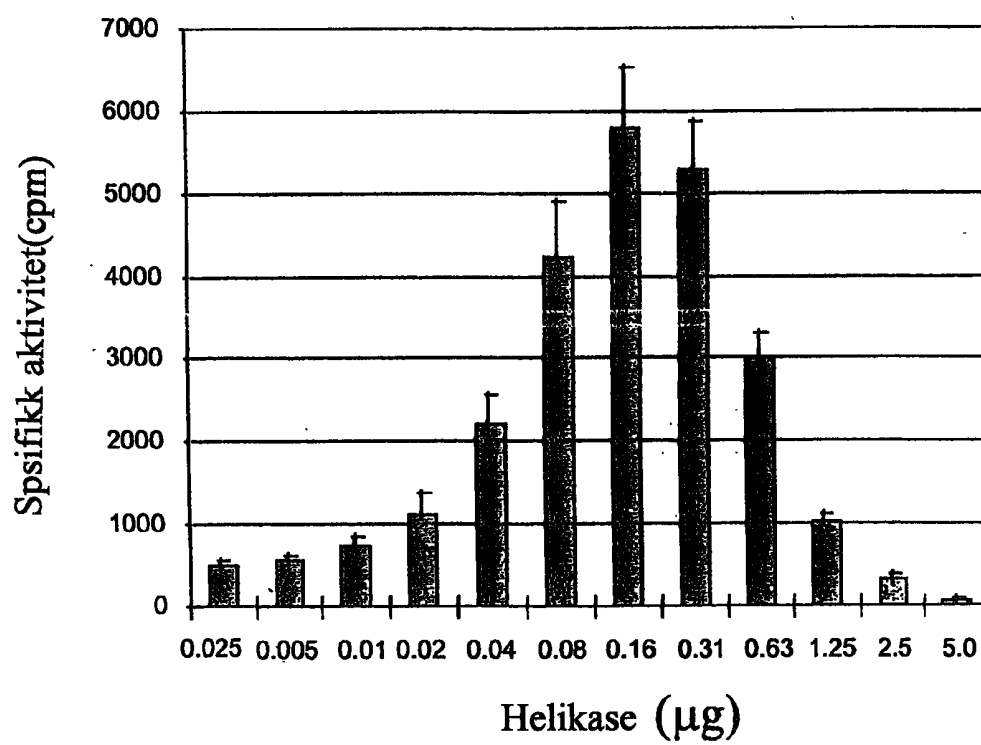
FIGUR 1



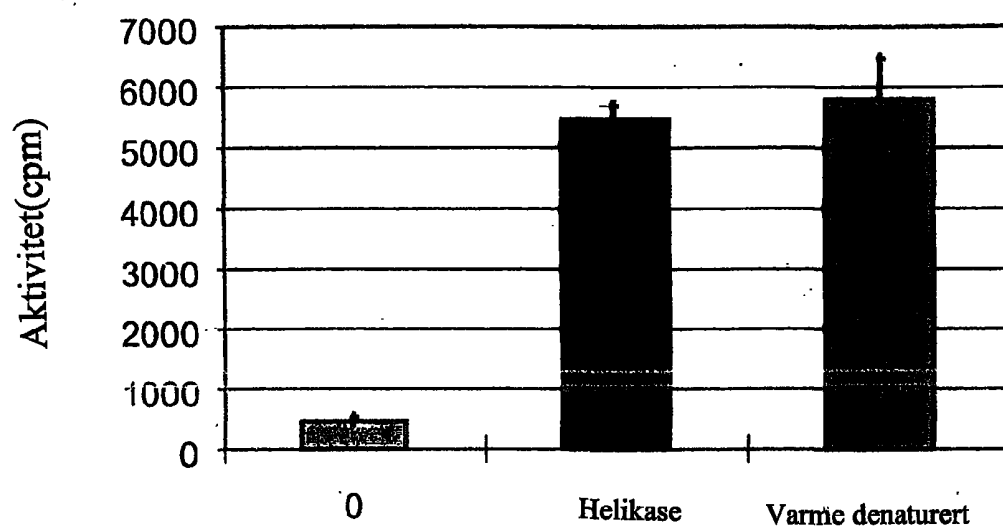
Figur 2



Figur 3



Figur 4



Figur 5

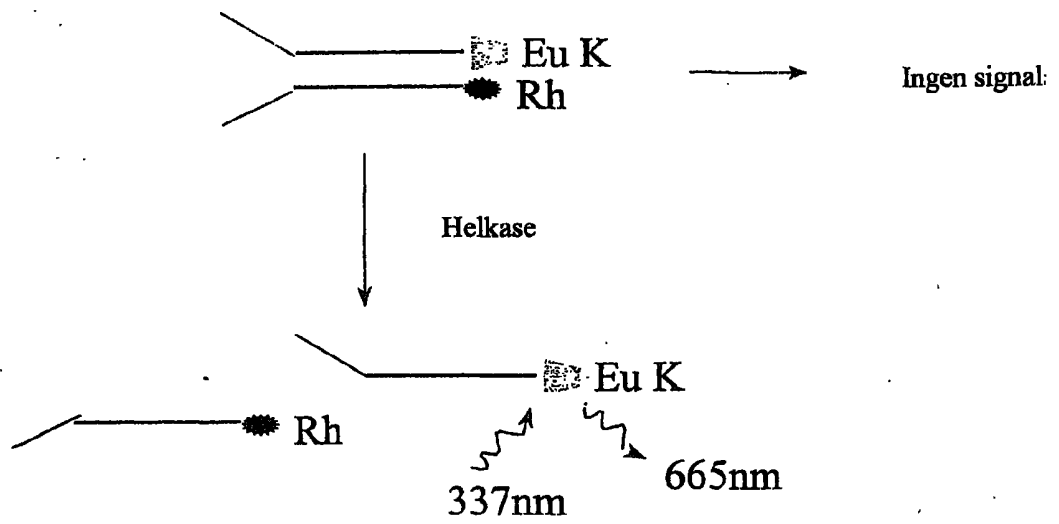
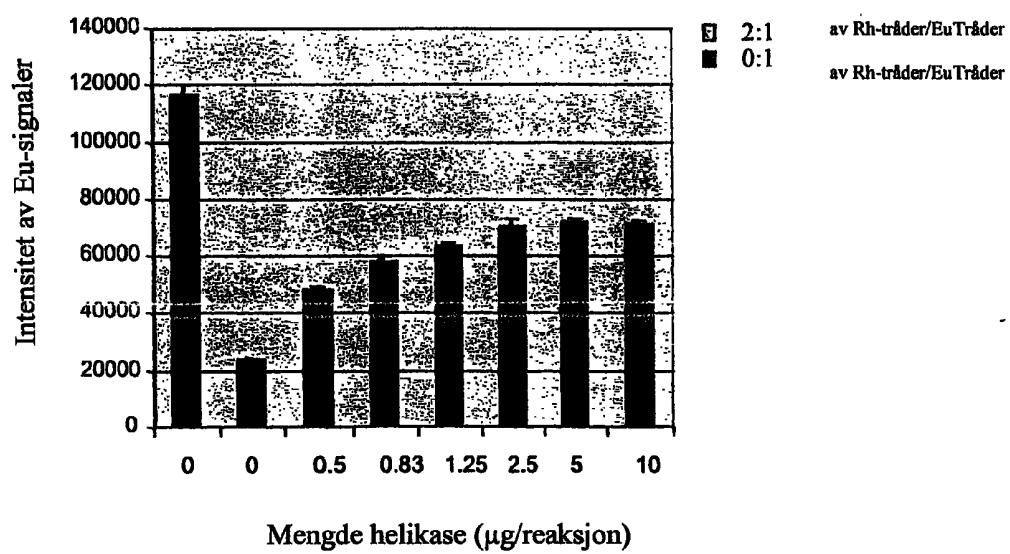
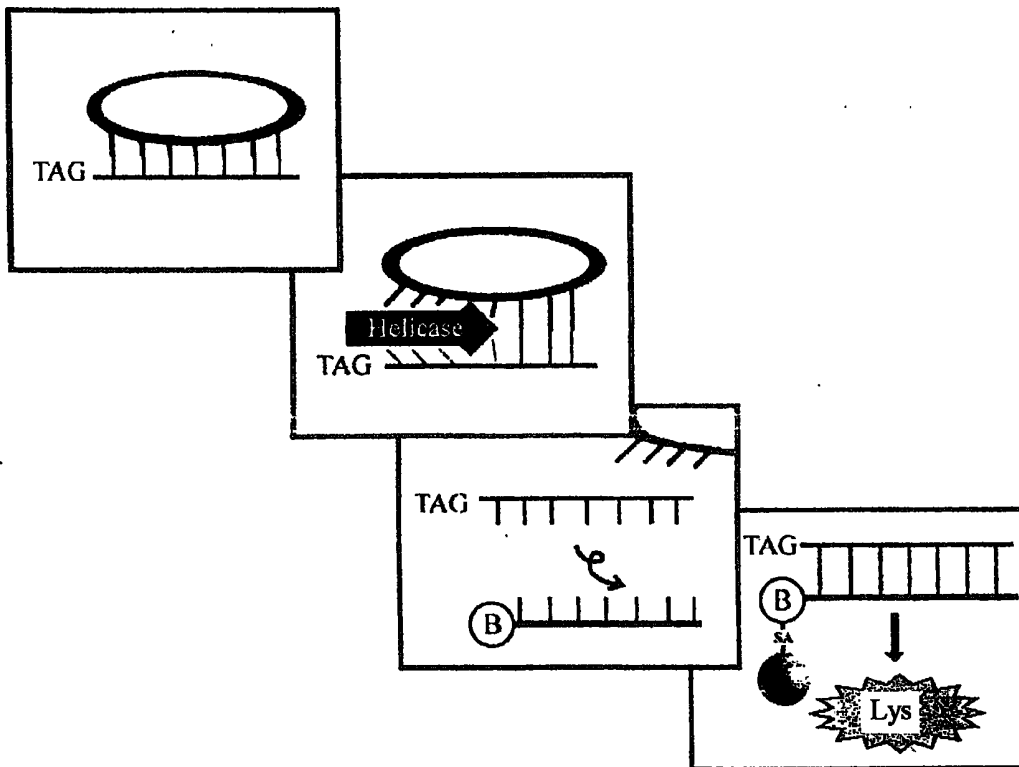


Figure 6



Figur 7

Figur 8

