



C (45) Patentti hakemusta
1.10.1983

(51) Kv.4/Int.Cl.4 C 12 N 11/00, C 12 Q 1/00, 1/68,
G 01 N 33/58, C 12 N 15/00

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	840640
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	16.02.84
(23) Alkupäivä - Giltighetsdag	17.06.83
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	16.02.84
(44) Nähtäväksipanon ja kuuljulkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.12.88
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/US83/00946
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	17.06.82
USA(US)	389381

(71) Imreg, Inc., Suite 1400, 144 Elk Place, New Orleans, Louisiana, USA(US)

(72) A. Arthur Gottlieb, New Orleans, Louisiana, USA(US)

(74) Oy Kolster Ab

(54) DNA:n toteamiseen perustuvia herkkiä testejä malignisuuksien toteamiseksi -
Sensitiva tester baserade på konstaterandet av DNA för påvisande av malignitet

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena on parannettu, kätevämpi, herkempi testi tietyjen malignisuuksien toteamiseksi ihmis- ja eläinpotilaissa. Testipotilaista peräisin olevia seerumeita sekoitetaan leimattuun DNA:han entsyymikonjugoidun matriisin läsnäollessa. Normaaaleista ja syöpätautisista potilaista peräisin olevat seerumit reagoivat eri tavoin matriisin kanssa, mahdollistaen potilaan diagnoosin.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser ett förbättrat, behändigare och känsligare prov för upptäckande av vissa maligniteter hos mänskliga och animala individer. Sera från test-individer blandas med märkt DNA i närvaro av en enzymkonjugerad matris. Sera från normala och cancerbehaftade individer reagerar olika med matrisen, vilket möjliggör ställande av diagnos för individen.

DNA:n toteamiseen perustuvia herkkiä testejä malignisuuksien toteamiseksi

Keksinnön taustaa

5

1. Keksinnön ala

Tämä keksintö koskee parannettuja keinoja ihmis- ja eläinpotilaiden testaamiseksi tiettyjen malignisuuksien läsnäolon suhteen. Erityisemmin julkaistaan suoritusmuoto, joka sallii lymfoidisten malignisuuksien (leukemioiden) useiden tyyppien diagnoosin.

10

2. Taustan ja tekniikan tason yksityiskohtainen tarkastelu

Keksijä on keksinyt, että hiiristä tai ihmispotilaista, joilla on tiettyjä malignisuuksia, kerätyt veriseerumit ja muut kehon nesteet sisältävät tiettyjä ainutlaatuisia kaksijuosteisia DNA-molekyyliä, joilla on kyky selektiivisesti inhiboida DNA-polymeraaseina tunnetun entsyymiryhmän tiettyjä jäseniä. Näitä DNA-molekyyliä ei ole läsnä seerumeissa, jotka on saatu hiiristä tai ihmispotilaista, joilla ei ole näitä malignisuuksia. Keksijä on, muiden kanssa, kuvannut tätä havaintoa ja näitä DNA:ita, asiaan liittyvän informaation keralla, sarjassa artikkeleita. Katso: Perisco ja Gottlieb, DNA Polymerases of Myeloma, Nature New Biology 239:173-76 (1972); Gottlieb, Smith, Plescia, Perisco ja Nicholson, Inhibitor of DNA polymerase, Nature 246:480-82 (1973); Gottlieb, Smith, Plescia, Nicholson, Bowers, Pankuch ja Berkoben, An Inhibitor of DNA Polymerase, teoksessa Fundamental Aspects of Neoplasia, luku 20, s. 269-77 (1975); Gottlieb, Gottlieb ja Nicholson, Inhibition of DNA polymerase by Sera, teoksessa Bibliotheca Haematologica, No. 43 (Basel 1976); Brennessel, Buhner ja Gottlieb, Use of Insoluble Heparin for Isolation of DNA Polymerase, Analytical Biochemistry 87: 411-17 (1978); Gottlieb, Chang, Buhner ja Brennessel, Isolation from Murine Myeloma and Leukemia Cells of a Selective Inhibitor of DNA polymerase, Cancer Research

25

30

35

40: 758-70 (1980). Näihin DNA:ihin viitataan tässä tekstissä kollektiivisesti termillä "DNA-L".

DNA-L on seos DNA-molekyylejä, jotka ovat 150-300 emäsparin alueella. Mikä hyvänsä näistä DNA-molekyyleistä
5 voi selektiivisesti inhiboida R-1 DNA-polymeraasia. Keksijä on erotellut nämä DNA-molekyylit kahteen ryhmään, DNA-1 ja DNA-2, jotka voidaan erotella kromatografian avulla. Samankaltaisia DNA-molekyylejä voidaan uuttaa normaalista mak-
sasta, mutta ei normaaleista veriseerumeista. Normaaleista
10 veriseerumeista puuttuvat nämä DNA:t ja leukemiapotilaiden seerumeissa on näitä DNA:ita. Kaikki edellä olevat DNA-L-molekyylit voidaan kloonata ja niitä voidaan käyttää testi-
menettelyissä, joita kuvataan tässä tekstissä.

DNA-L-molekyylejä on kaksi tässä pääasiallisen mie-
15 lenkiinnon omaavaa ryhmää, joista kumpikin sisältää rajoite-
tun, mutta määrittämättömän lukumäärän erilaisia molekyylejä. Tässä pääasiallisen mielenkiinnon omaavia DNA:ita voidaan nimittää "DNA-1" ja "DNA-2". Uskotaan, että näillä
DNA:illa voi olla tärkeä osa leukeemisten solujen replikaatiossa.
20 DNA-1:llä ja DNA-2:lla on tärkeitä yhteisiä ominaisuuksia.

Sekä DNA-1:n että DNA-2:n on osoitettu aiheuttavan selektiivistä inhibitiota R-1 DNA-polymeraasientsyymin suhteen, jota tavataan hiiren myeloomassa, ja jota voi
25 esiintyä muissa tuumoreissa ja normaaleissa kudoksissa. (Inhibitio on "selektiivinen" siinä suhteessa, että muita DNA:ita voi hyvin olla olemassa, jotka erottelemattomasti inhiboivat tätä ja muita polymeraasientsyymejä. Mielenkiintoa omaavat DNA:t inhiboivat R-1 DNA-polymeraasia eivätkä inhiboi muita tunnettuja polymeraasientsyymejä.) R-1
30 DNA-polymeraasientsyymin voidaan saada talteen MOPC-21-myeloomatuumorista menettelyin, joita kuvataan julkaisussa Analytical Biochemistry 87:411-17 (1978), supra. On epäolennaista, että entsyymin on hiiri-alkuperää, koska se
35 reagoi sekä humaani- että hiirilähteistä peräisin olevien mielenkiintoa omaavien DNA:iden kanssa.

Nykyiset leukemiatestit, kuten luuydintestit, voivat olla epämukavia ja traumaattisia potilaalle. Sitä paitsi niiden herkkyyys rajoittuu syöpäsolujen melkoisten lukumäärien läsnäolon toteamiseen, joten varhaiset leukemiatapaukset saattavat jäädä havaitsematta. Tämän keksinnön menettelyihin ei kuulu vasta-aineiden tuottaminen, kuten Bogoch'in työssä Detection of Malignant Tumor Cells, US-patentti nro 4 298 590 (3. marraskuuta 1981). Sellaisia työläitä ja epäsuoria mittausten menetelmiä ei käytetä tässä.

10 Tämän keksinnön yhteenveto

Tämän keksinnön testimenettely määrittää DNA:iden (tämän jälkeen "syöpä-DNA:t") läsnäolon, joiden läsnäolo kehon nesteissä merkittävässä määrissä liittyy malignien solujen kasvuun ja joiden läsnäolo täten ilmaisee malignien solujen läsnäolon kehossa. Tämä saavutetaan altistamalla väliaine, joka mahdollisesti sisältää syöpä-DNA:ita, mahdolliselle "kilpailevalle sitoutumiselle", missä kilpailija (jota joskus nimitetään "DNA-koettimeksi") on tunnettu määrä jotakin sellaista syöpä-DNA:ta. Alempana kuvattava väliaine on veriseerumia, jota keksijä pitää parempana käyttää johtuen sen kätevyydestä ja saatavuudesta, mutta muut väliaineet, kuten ascites-neste ja lymfa, sisältävät myös tässä tarkasteltuja syöpä-DNA:ita ja saattavat sisältää muita syöpä-DNA:ita, joilla on samankaltaista mielenkiintoa. Selkäydinneste, duodenaalinneste, mahaneste, pleuraalinneste, virtsa, sylki, muut limaiset eritteet ja muut kehon nesteet voivat myös sisältää samankaltaisia DNA:ita.

Tässä kuvattavassa testissä sekoitetaan syöpä-DNA:n suhteen testattavaa seerumia tunnettuun määrään leimattua syöpä-DNA:ta (DNA-koetinta). Seos "viedään" jäljempänä kuvattuun "entsyymi-konjugoituun matriisiin", joka sitoutuu syöpä-DNA:han, mutta ei muunlaisiin DNA:ihin, joi-
ta voi olla läsnä, eikä muihin läsnä oleviin aineisiin. Sit-
ten käytetään testimenettelyä sen määrittämiseksi, kuinka
35 paljon leimattua DNA:ta (DNA-koetinta) entsyymikonjugoitu

matriisi sitoi tai jäi jäljelle testiseoksen jäännökseen.

Kun entsyymi-konjugoitu matriisi sitoo suhteellisesti vähemmän leimattua DNA:ta, syynä on se, että leimaamaton samankaltainen DNA testiseerumista kilpaili entsyymi-konjugoidulla matriisilla olevista entsyymipaikoista ja sulki leimatun DNA:n pois niistä. Kun entsyymi-konjugoitu matriisi sitoo suhteellisesti enemmän leimattua DNA:ta, syynä on, ettei leimatun DNA:n kanssa samankaltaista leimaamatonta DNA:ta ollut läsnä testiseerumissa kilpaillakseen entsyymikonjugoidulla matriisilla olevista paikoista ja täten sulkeakseen niistä pois leimattua DNA:ta.

Tämän keksinnön yksi pääasiallinen edistysaskel on se, että on keksitty herkkiä testimenettelyjä, jotka sallivat leukemian tai uudelleenpuhkeamisten varhaisen toteamisen ja jotka sallivat remission voimassaolon määrittämisen. Näiden menettelytapojen uskotaan olevan niin herkkiä, että ne toteavat niin harvojen kuin 250:n malignin solun läsnäolon hiirissä tai, veren ja kehon painon pohjalta ekstrapoloiden, likimain 750 000:n malignin solun läsnäolon ihmisessä. Viimeksi mainittua lukua voidaan verrata niihin likimain $4,5 \times 10^{10}$ soluun, jotka ovat läsnä tyypillisessä ihmisen verenkierrossa, niin että testi toteaa likimain 15 miljoonasosaa. Nykyisten leukemiatestien taas sitä vastoin uskotaan kykenevän toteamaan leukemian vain kun likimain 10 000 000 malignin solua tai likimain 220 miljoonasosaa on jo vakiintunut kehoon.

On useita syitä, miksi halutaan herkempää testiä, joka sallii malignisuuksien, kuten leukemian varhaisemman toteamisen. Ensinnäkin uskotaan, että varhaisemmin aloitettu hoito aiheuttaa vähemmän vahinkoa potilaan keholle ja mahdollisesti lisää potilaiden henkiinjäämismahdollisuuksia. Mutta varhainen diagnoosi on välttämätön ennen kuin määrätään selkeästä terapiasta, joka voi olla heikentävää. Toiseksi, leukemiat ovat hyvin hälyttäviä tauteja. Mononukleoosi sekoitetaan usein leukemiaan, johtuen molempien oireiden

samankaltaisuudesta. On tärkeää saada negatiivinen leukemia-diagnoosi välittömästi mononukleootapauksissa, johtuen mahdollisen leukemian diagnoosin vakavista haitallisista psykologisista vaikutuksista nuoriin potilaisiin ja heidän vanhempiinsa.

Keksinnön menetelmä on myös halvempi, kätevämpi, vähemmän traumaattinen potilaalle, helpommin sovellettavissa suuren mittakaavan seulontaan ja käytännöllisempi käyttää saman potilaan usein toistuvaan testaukseen - verrattuna olemassa oleviin menettelyihin.

Keksijän suosimassa kielenkäytössä, tässä yhteydessä, termi "leukemia" sulkee sisäänsä ei vain sellaiset hiiri-leukemiat kuin MCDV 12 ja L1211, vaan myös multippelin myelooman ja muut ihmisen tai eläimen lymfoidisysteemin malignisuudet. Niinpä seuraava tarkastelu ja patenttivaatimukset tulisi lukea termin "leukemia" sellaisen käytön valossa.

Edullisen suoritusmuodon yksityiskohtainen kuvaus

Tämän keksinnön testimenettely on uusi ja parannettu testauskeino malignisuuksien, sellaisten kuin leukemia, jotka liittyvät erityisiin DNA:ihin, läsnäolon toteamiseksi. Leukemian tapauksessa DNA on DNA-L. Keksijä uskoo, että voi olla olemassa toisia DNA:ita, jotka samaan tapaan liittyvät toisiin malignisuuksiin ja jotka ovat käytettävissä samankaltaisiin testimenettelyihin.

I. Testinäytteen valmistus

Alkuaskel keksijän leukemiatestissä on ottaa tietty määrä verta (tai muuta kehon nestettä) tutkittavasta potilaasta, poistaa solut sentrifugoinnilla seerumin valmistamiseksi (veren tapauksessa) ja valmistaa testinäyte siitä. Tämän tekemiseksi kehon nesteen näytettä käsitellään 70 %:lla ammoniumsulfaatilla kaiken näytteessä olevan proteiinin saostamiseksi. Saostuma heitetään pois ja pintaneste otetaan talteen. Viimeksi mainittu puhdistetaan olennaisesti sentrifugoinnilla ja dialyysillä. Tuloksena saatava kirkas neste on "testinäyte".

Esimerkki 1

Testinäyte

0,5 ml veriseerumia saadaan laboratoriohiirestä. Kyl-
lästettyä ACS Reagent Grade -laatuksen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:n vesiliuos-
5 ta lisätään tipoittain näytteeseen, kunnes saavutetaan lo-
pullinen konsentraatio 70 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Tuloksena saatava pro-
teiinisaostuma poistetaan sentrifugoimalla käyttäen 1 700 g
10 minuutin ajan ja heitetään pois. Likimain 1 ml kirkasta
pintanestettä saadaan täten aikaan. Se dialysoidaan 12 000:n
molekyylipainon dialyysipussissa 0,01 M Tris.HCl -puskuria
(pH 7,8) vastaan yli yön 4°C :ssa. Dialyysipussiin jäljelle
jäävä materiaali (likimain 1 ml) on testinäyte.

Testit voidaan suorittaa suoraan esimerkin 1 testi-
näytteestä, mutta keksijä katsoo olevan edullista ensin puh-
15 distaa se edelleen "puhdistusmatriisilla", kuten kuvataan
alempana esimerkissä 8B.

II. DNA-L:n valmistus

Keksijä on kuvannut yleisesti DNA-L:n uuttamista
julkaisussa Cancer Research 40:758 (1980), supra. DNA-L
20 on DNA:iden seos. On mahdollista käyttää DNA-1:n ja DNA-2:n
DNA-L-seosta tässä kuvattujen testien suorittamiseen.
Menettely vaatii DNA:1:stä ja DNA-2:sta tuntemattomissa ja
vaihtelevissa osuuksissa koostuvan tuotteen käyttöä. Keksi-
jä on tästä syystä kehittänyt valinnanvaraisen menettelyn
25 DNA-1:n ja DNA-2:n erottelemiseksi toisistaan. Keksijä on
myös kehittänyt menettelyn kloonien saamiseksi yksittäisistä
DNA:ista, jotka kuuluvat DNA-L-ryhmään.

DNA-1:n ja DNA-2:n erotteluun tarkoitettuun menette-
lyyn kuuluu se, että ihmis- tai hiiritestinäytteelle,
30 joka on valmistettu, kuten edellä on kuvattu esimerkissä 1
ja otettu potilaalta, jolla tiedetään olevan leukemia tai
myelooma, tehdään sarjakromatografia. Kromatografia suori-
tetaan jollakin entsyymikonjugoidulla matriisilla. Tämä on
matriisi, johon voidaan sitoa entsyymi. Toinen esimerkki on
35 agaroosipohjainen, geelimäinen aine, johon entsyymi voidaan
kovalenttisesti sitoa stabiililla tavalla, niin että se on

käytettävissä tulevaa käyttöä varten. Toisessa esimerkissä käytetään mikropalloja. Molempia esimerkkejä kuvataan alla.

- Yleistä menettelyä entsyymi-konjugoitujen matriisien valmistamiseksi ehdotetaan julkaisussa Affinity Chromatography, Principles and Methods (Pharmacia). Valitun hartsin täytyy olla sellainen, johon kiinnostuksen kohteena oleva entsyymi sitoutuu. Pharmacia'n tuote CNBr-Sepharose[®] on havaittu soveliaaksi R-1 DNA -polymeraasille ja keksijä on kehittänyt menettelyn sellaisen matriisin valmistamiseksi.
- 10 Keksijä ei ole tietoinen mistään julkaistusta tai muutoin ennestään tunnetusta menettelystä entsyymi-konjugoidun matriisin valmistamiseksi, jossa R-1 DNA -polymeraasi on sidottu matriisiin.

- Seuraava menettely eroaa yllä siteeratusta yleisestä menettelystä useissa tärkeissä suhteissa. Keksijä on keksinyt, että alempana kuvattavissa menettelyissä ja testeissä käytettäväksi tehokkaan Sepharose[®]-geeli-entsyymi-konjugoidun matriisin valmistamiseksi, so. toistettavien ja yhdenmukaisten tulosten saamiseksi, on tärkeää tai ehkä jopa välttämätöntä esikäsitellä entsyymikonjuguoitu matriisi puskuriliuoksella, joka sisältää DNA:ta, kuten alkalidenaturoitua lohen siemennesteen DNA:ta (Millipore Corp.). Tällä tavalla käsitelty matriisi pestään puskuriliuoksella. Jollei tätä esikäsitteilyprosessia DNA:lla tehdä, Sepharose[®]-geeli-entsyymikonjuguoitu matriisi ei ilmeisesti reagoi spesifisesti DNA-L:n kanssa, niin että saadaan vaihtelevia testituloksia. Uskotaan, että DNA-esikäsitteily sitoo ja siten eliminoi menettelystä, joka seuraa, ne entsyymi-konjugoidulla matriisilla olevat sitomiskohdat, joilla on yleinen tai ei-selektiivinen affiniteetti DNA:han, vastakohtana paikoille, joilla on selektiivinen affiniteetti DNA-L:ään. Uskotaan, että sellaisen esikäsitteilymenettelyn käyttö sellaisten matriisien yhteydessä on alalla aiemmin tuntematon. Vaikka tämän vaiheen välttämättömyys on osoitettu vain entsyymille,
- 35 joka on konjuguoitu Sepharose[®] en, oletetaan, että sellainen vaihe tarvitaan tai osoittautuu toivottavaksi myös

entsyymikonjugoiduille helmille, joita kuvataan esimerkissä 3A ja muille entsyymi-konjugoiduille matriiseille.

Esimerkki 2

DNA-1:n ja DNA-2:n puhdistetun seoksen valmistus

- 5 Kätevä tilavuus (2 ml) esimerkin 1 testinäytettä valmistetaan poolatusta seerumista, joka on otettu sisäsiitteisistä hiiristä, joilla on myelooma MOPC-21. Esimerkin 1 lopussa olevaa dialyysivaihetta seuraa konsentroida 30-%:ista polyetyleeniglykolia 0,01 M Tris.HCl-puskurissa (pH 7,8)
- 10 vastaan. Tuloksena saatavaa liuosta puhdistetaan edelleen kromatografialla DEAE-selluloosalla (Whatman) käyttäen lineaarista 0 - 1,0 M KCl-gradienttia 0,01 M Tris.HCl-puskurissa (pH 7,8). DNA eluoituu 0,45 M KCl:n kohdalla ja eluoidut fraktiot konsentroidaan dialyysillä polyetyleeniglykolia
- 15 vastaan.

- Tuloksena saatava DNA-valmiste säädetään 0,4 M:ksi natrium-PO₄-puskurissa (pH 7,0) ja lämpödenaturoidaan inkuboimalla 16 minuutin ajan 68°C:ssa. Tislattua vettä lisätään fosfaattikonsentraation saattamiseksi 0,14 M:ksi ja seos
- 20 pannaan 1 ml:n pylvääseen, joka on hydroksyyliapatiitista (DNA grade, Bio-Rad Labs) ja joka on tasapainotettu 0,01 M natrium-PO₄-puskurissa (pH 7,0), keitetty viiden minuutin ajan ja pidetty 68°C:ssa. Sen jälkeen kun DNA-seos on pantu pylvääseen, pylvään sallitaan valua painovoiman vaikutuksesta ja ylimääräinen neste heitetään pois. Sitten 6,0 ml
- 25 0,14 M natrium-PO₄-puskuria (pH 7,0, 68°C) kerrostetaan varovasti pylvääseen ja valutetaan.

- Mielenkiinnon omaava kaksijuosteinen DNA vapautetaan sitten pylväästä panemalla siihen varovasti 8,0 ml 0,4 M
- 30 natrium-PO₄-puskuria (pH 7,0). Tuloksena saatavaan kaksijuosteisen DNA:n puhdistetun seoksen valmistamiseen viitataan termillä "seka-DNA-L" tai "DNA-L-seos".

Esimerkki 2A

Samankaltainen valmiste (MCDV-12)

- 35 Esimerkin 2 menettely toistetaan hiirillä, joilla on leukemia MCDV-12.

Esimerkki 2B

Samankaltainen valmiste (L-1211)

Esimerkin 2 menettely toistetaan hiirillä, joilla on leukemia L-1211.

5 Esimerkki 2C

Samankaltainen valmiste

(Poolattu MOPC 21, MCDV-12, L-1211)

Esimerkin 2 menettely toistetaan poolatulla seerumilla, joka on otettu hiiristä, joilla on myelooma MOPC-21,
10 leukemia MCDV-12 ja leukemia L-1211, vastaavasti, niin että kukin leukemia on edustettuna DNA-L-seoksessa.

DNA-1:n ja DNA-2:n erottelu ja edelleenpuhdistus saadaan aikaan seka-DNA-L:n fraktioinnilla entsyymi-konjugoidulla matriisilla. Tämä on liukenematon Sepharose[®] (Pharmacia)-
15 matriisi, johon R-1 DNA -polymeraasi on kovalenttisesti kiinnitetty. Se valmistetaan sen menetelmän yleisellä pohjalla, jonkin verran muutettuna vastatakseen tämän tilanteen erityisiä tarpeita, jota menetelmää kuvataan julkaisussa Affinity Chromatography - Principles and Methods (Pharmacia)
20 ja joka perustuu Axen'in, Porath'in ja Ernback'in alkupe-
räiseen menetelmään, Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides, Nature 214:1302-04 (1967). Muita liukenemattomia matriiseja
25 Sepharose[®], kuvattu alempana. Esimerkiksi tiedetään käyttää lasihelmiä, keramiikkaa ja piihappoa tuen antamiseksi entsyymeille entsyymaattisissa prosesseissa. Entsyymi-konjugoitu matriisi täytyy myös esikäsitellä, jotta se sitoutuisi spesifisesti DNA-L:ään, kuten kuvataan alempana.

30 Esimerkki 3

Entsyymi-konjugoidun matriisin valmistus

1 g CNBr-aktivoitua Sepharose[®] 4B:tä (Pharmacia) turvotetaan 0,001 M HCl:ssä lasisuodattimella ja pestään 15
minuutin ajan 200 ml:lla 0,001 M HCl. Tuloksena saatavaa
35 geeliä pestään 0,1 M NaHCO₃:lla (pH 8,3) ja sitten 0,1 M NaHCO₃:lla (pH 8,3), joka sisältää 0,5 M NaCl. Geeli

suspendoidaan sitten 3,5 ml:aan viimeksi mainittua puskuria. Sitten lisätään puhdistettua R-1 DNA -polymeraasia (joka sisältää likimain 0,040 mg proteiinia 1,0 ml:ssa 0,28 M kalium- PO_4 -puskuri (pH 6,3) 0,001 M DTT:tä (ditiotreitolia; ja 20 % glyserolia kerralla) geelilietteeseen ja seosta ravistellaan ranneliikeravistelijalla yön yli 4°C:ssa.

Geeli pestään sitten kahdesti 0,1 M NaHCO_3 :lla, joka sisältää 0,5 M NaCl (pH 8,3), ennen kuin jäljellä olevat aktiiviset ryhmät suljetaan 1 M Tris.HCl-puskurilla (pH 8,0) kahden tunnin ajan huoneen lämmössä. Seuraa kolme geelin pesukierrosta: kukin kierros koostuu pesusta 0,1 M asestaattipuskurilla, joka sisältää 1 M NaCl (pH 4,0) ja sitä seuraa pesu 0,1 M boraattipuskurilla, joka sisältää 1 M NaCl (pH 8,0).

Tällä tavalla valmistettu Sepharose[®]-geeli, joka sisältää R-1 DNA-polymeraasin, suspendoidaan sitten 5 ml:aan "puskuri-A:ta" (0,054 M Tris.HCl (pH 7,8), joka sisältää 0,005 M 2-merkaptotetanolia, 0,0001 M MnCl_2 , 0,04 M KCl). Sitten valetaan 1 ml:n minipylväs. Entsyymi-konjugoitu matriisi on nyt käyttövalmis. Se voidaan myös varastoida ja säilyy hyvässä kunnossa, kun sitä säilytetään 4°C:ssa, ainakin kolmen kuukauden ajan. Tämä tuote sisältää likimain 10 mikrogrammaa entsyymiä millilitraa kohti. Mutta tulokset vaihtelevat kunkin erän mukaan, ja tarvitaan määrittäminen tarkkan entsyymipitoisuuden määrittämiseksi.

Esimerkki 4

Polybead-entsyymi-konjugoidun matriisin valmistus
Keksijä on kehittänyt vaihtoehtoisen entsyymi-konjugoidun matriisin, joka saattaa olla yksinkertaisempi käyttää ja tuloksiltaan luotettavampi kuin Sepharose[®]-geeli. Se perustuu Polybead-mikropartikkeleihin (Polysciences Inc., Warrington, Pa.), joilla on pinnoillaan karboksyyli-ryhmiä. Näitä helmiä kutsutaan myös "karboksyliduiksi monodispersseiksi mikropalloiksi".

Likimain 0,1 g Polybead-mikropartikkeleja ("helmiä") pestään perusteellisesti kalium- PO_4 -puskurissa (pH 7,2 -

7,6). Likimain 25 mikrolitraa helmien konsentroitua suspensiota lisätään 75 mikrolitraan samaa kalium- PO_4 -puskuria yhdessä 10 mikrolitran kanssa 1-etyyli-3,3-dimetyyliamino-propyylikarbodi-imidin (ECDI) 50-%:ista liuosta (vedessä).

- 5 Seosta inkuboidaan huoneen lämmössä (24°C) 30 minuutin ajan. Helmet pestään sitten kahdesti samalla kalium- PO_4 -puskurilla ja suspendoidaan uudelleen 75 mikrolitran eriin tätä puskuria, joka sisältää 4 % glyserolia. Helmet siirretään syrjään ja varastoidaan tässä tilassa.

- 10 Likimain 75 mikrolitraa edellä olevaa varastoitua helmituotetta pannaan koeputkeen. Sitten 25 mikrolitraa puhdistettua R-1 DNA-polymeraasia, 0,5 - 1,0 mikrogrammaa/mikrolitra, PO_4 /DTT/glyserolissa siten kuin on kuvattu esimerkissä 3, lisätään, kunnes seos saavuttaa 100 mikrolitraa.

- 15 Seosta inkuboidaan sitten 60 minuutin ajan 4°C :ssa.

10 mikrolitraa 0,2 M glysiiniä (pH 7,6 - 8,0) tai 10 mikrolitraa naudan seerumialbumiinin liuosta (20 mg/ml) lisätään sitten hitaasti seokseen ja inkubointia suoritetaan 30 minuutin ajan huoneen lämmössä (24°C) ajoittain sekoit-

- 20 taen. Helmet pestään sitten kahdesti "varastointipuskurilla" (0,05 M Tris pH 7,8; 0,004 M beeta-merkaptetanoli; 0,04 M KCl 0,2 mg/ml seerumialbumiini; 0,0001 M MnCl_2 20 % glyseroli) ja suspendoidaan uudelleen 50 mikrolitraan varastointipuskuria. Se siirretään sitten sivuun siihen asti, kun sitä käytetään. Ennen helmien käyttöä testimenettelyssä
25 helmet pestään denaturoidun lohen siemennesteen DNA:n 0,1-%:isessa liuoksessa varastointipuskurissa, mitä seuraa huuhtelu varastointipuskurissa. Tuote sisältää likimain 5,0 mikrogrammaa entsyymiä millilitraa kohti, mutta määritys
30 tarvitaan tarkan entsyymipitoisuuden varmistamiseksi.

Esimerkki 5

Pylvään esikäsittely ja DNA-1:n ja DNA-2:n erotteleminen

- 35 Esimerkin 3 minipylvästä esikäsitellään 5 ml:lla jolakin mukavasti saatavissa olevalla ei-ihmisen, ei-hiiren DNA:ta, kuten alkalidenaturoitua lohen siemennesteen

DNA:ta (50 mikrogrammaa/ml), joka johdetaan pylvään läpi 4°C:ssa. Pylväs pestään sitten perättäisesti 10 ml:lla puskuria A, 10 ml:lla puskuria A plus 0,5 M KCl ja 10 ml:lla puskuria A taas. Esimerkin 2 seka-DNA-L-valmiste (DNA-1:n ja DNA-2:n puhdistettu seos) johdetaan pylvään läpi ja eluaattia uudelleenkierrätetään pylvään läpi 20 minuutin ajanjakson ajan.

Pylväs valutetaan ja pestään uudelleen 5 ml:lla puskuria A (esimerkki 3), mitä seuraa DNA-L-seoksen eluutio 5 ml:lla KCl:n lineaarista gradienttia (0,1 M puskurissa A). DNA-1 eluoituu 0,1 M KCl:n kohdalla, DNA-2 eluoituu 0,22 M KCl:n kohdalla. Sen jälkeen, kun gradientti on suoritettu loppuun, pylväs pestään 5 ml:lla puskuria A, joka sisältää 1 M KCl. (Pylväs voidaan regeneroida tulevaa käyttöä varten pesemällä 15 ml:lla puskuria A).

Alunalkaen sisäänpannusta DNA:sta saadaan talteen likimain 4,5 % DNA-1:nä ja 4,6 % DNA-2:nä.

On mahdollista käyttää jostakin elävästä lähteestä uutetun luonnollisen DNA-L:n puhdistettua seosta näihin testeihin, mutta keksijä pitää parempana käyttää puhdasta, kloonattua tuotetta. Se on halvempaa ja kätevämpää, kun menettely on kerran vakiinnutettu. Sen uskotaan olevan myös tieteellisesti paremmin perusteltua, koska se eliminoi mahdollisen vaihtelevan tekijän, so. kontaminoivien DNA:iden läsnäolon DNA-L-valmisteessa ja kloonattu DNA on tarkalleen samaa DNA:ta jokaisessa suoritettavassa testissä.

Keksijä on siitä syystä käyttänyt kloonausmenettelyä, jossa käytetään pBR322-plasmidia kloonausvektorina. Seuraava esimerkki viittaa DNA-1:een, mutta menettely DNA-2:n tai DNA-L-seoksen kloonaukseksi on olennaisesti identtinen. Tässä käytetty yleinen lähestymistapa perustuu menetelmään, jota kuvataan julkaisussa Bahl, Mariani, Wu, Stawinsky ja Narang, A General Method For Inserting Specific DNA Sequences Into Cloning Vehicles, Gene 1: 81-92 (1976). Menetelmässä käytetään "linkkereitä", jotka ovat sensitiivisiä restriktioentsyymille Bam I, kuten on kuvattu julkaisussa

- Scheller, Dickerson, Boyer, Riggs ja Itakura, Chemical Synthesis of Restriction Enzyme Recognition Sites Useful for Cloning, Science 196:177-80 (1977). Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kloonausmenetelmää, jossa käytetään yksijuosteista M13-fagia, kuten ovat kuvanneet Sanger, Coulson, Barrell, Smith ja Roe, J. Molecular Biology (1980) 143: 161-178.

Esimerkki 6

DNA-1:n kloonaus

- 10 Valmistetaan fosforylaatiopuskuri (10X), joka koostuu 0,7 M Tris.HCl:stä (pH 7,6) ja 0,1 M $MgCl_2$:sta. 1 mikrolitra puskuria sekoitetaan 0,5 mikrolitraan 0,01 M ATP:tä, 5 mikrolitraan 0,01 M DTT:tä, 1 mikrolitraan 4,5 mg/ml T4-polynukleotidikinaasia (New England Biolabs). Sitten lisätään 500 ng Bam-linkkeriä liuotettuna 1 mikrolitraan vettä. Lisää vettä lisätään tilavuuden saamiseksi 10 mikrolitraksi. Seosta inkuboidaan yhden tunnin ajan 37°C:ssa ja se pakastetaan sitten -20°C:ssa varastointia varten. Tähän seokseen viitataan termien "fosforyloitu Bam-linkkeri" tai
- 20 "PBM".
- Valmistetaan seos, joka sisältää 10 yksikköä T4-DNA-ligaasia (New England Biolabs) 82 mikrolitrassa 0,07 M Tris.HCl:ää (pH 7,5), joka sisältää 0,007 M $MgCl_2$ ja 70 mikromo ATP. Tähän lisätään 10 mikrogrammaa esimerkin 7 leimattua DNA-1:tä ja 1,8 mikrogrammaa PBM:ää 18 mikrolitrassa vettä. Tuloksena saatavia 100 mikrolitraa seosta inkuboidaan 15°C:ssa yön yli ja reaktio pysäytetään saattamalla seoksen lämpötila 65°C:een 10 minuutin ajaksi. Tämä tuottaa seoksen, joka sisältää DNA-linkkerimolekyylin.
- 30 Seokseen lisätään sitten 100 yksikköä Bam HI:tä 10 mikrolitrassa vettä ja 12 mikrolitraa Bam 10X puskuria (0,2 M Tris.HCl (pH 8,0) 0,07 M $MgCl_2$, 0,02 M BME, 1 M NaCl). Seosta inkuboidaan 37°C:ssa kolmen tunnin ajan ja reaktio pysäytetään lisäämällä 12 mikrolitraa 0,2 M
- 35 Na_2EDTA :ta. Tämä leikkaa PBM:n DNA-linkkerimolekyylistä.

DNA-linkkeriseosta käsitellään perättäin fenolilla ja eetterillä DNA-linkkerin uuttamiseksi siitä. Uutteen ti-lavuus pienennetään 20 mikrolitraan johtamalla typpikaasua sen yli.

- 5 Konsentroituu uute johdetaan 1 ml:n pylvään läpi, jossa on Sephadex[®] G-50 (Pharmacia) tasapainotettuna 0,01 M Tris.HCl:ssä (pH 7,8), joka sisältää 0,05 M NaCl. Yhden ti-pan fraktioita kerätään mikrofugiputkiin. DNA-linkkerin si-jainti määritetään ³²P-leiman toteamisen avulla, ja DNA-
10 linkkeriä sisältävän liuoksen tilavuus mitataan (likimain 0,1 ml). DNA-linkkeri otetaan talteen lisäämällä 10 mikro-litraa 3 M Na-asettaattia ja 0,2 ml etanolia. Seoksen anne-taan olla -20°C:ssa yön yli.

- Saostettu DNA-linkkeri pelletoidaan sentrifugoimalla
15 ja kuivataan vakuuissa. Pelletit liuotetaan 30 mikrolit-raan vettä ja varastoidaan -20°C:ssa.

- 1 mikrogramma pBR322 (BRL Labs) käsitellään BAM I:llä ja bakteeriperäisellä alkalisella fosfataasilla ja laitetaan 5 mikrolitran tilavuuteen vettä. Tähän lisätään 2 mikrolit-
20 raa IOX-ligaasipuskuria (20 yksikköä T4 DNA-ligaasia 2 mik-rolitrassa) ja 1 mikrogramma DNA-linkkeripellettejä 2 mik-rolitrassa vettä. Tilavuus säädetään 20 mikrolitraksi lisää-mällä vettä. Seosta inkuboidaan 15°C:ssa yön yli. Tuloksena DNA-linkkeri ligatoituu nyt pBR322-plasmidivektoriin ja
25 seos sisältää DNA-linkkeri-pBR322-vektorin.

- HB101 E.coli infektoidaan sitten DNA-linkkeri-pBR322-vektorilla. Isäntä-HB-101-soluja esikäsitellään jäähdytetyl-lä 0,1 M CaCl₂:lla ja inkuboidaan 4°C:ssa 15 minuutin ajan ja otetaan talteen sentrifugoimalla. 0,3 ml:aan solupellet-tiä lisätään 100 mg vektoria. E. coli/vektori-seosta inku-
30 boidaan sitten jäiden päällä 10 minuutin ajan ja sille anne-taan sitten 30 sekunnin lämpöshokki 37°C:ssa. E. coli/vek-toria inkuboidaan sitten jäiden päällä 90 minuutin ajan.

- "ML-väliaine"-seos valmistetaan 1 %:sta Bactopep-
35 tone'a, 0,5 %:sta hiivauutetta ja 0,5 %:sta NaCl:a. Sit-ten lisätään 2 ml ML-alustaa E. coli/vektori-seokseen ja

seosta inkuboidaan 37^o:ssa 60 minuutin ajan. Ampisilliiniä lisätään seokseen niin, että saadaan aikaan konsentraatio 40 mikrogrammaa/ml ja inkubointia jatketaan 37^oC:ssa 30 minuutin ajan.

- 5 0,5 ml seosta maljataan ML-alustalle, joka sisältää 50 mikrogrammaa/ml ampisilliiniä. Tehdään erillinen maljaus käyttäen seoksen laimennusta 1:10. Maljoja inkuboidaan yön yli 37^oC:ssa. Pesäkkeiden lukumäärä lasketaan.

- Replikamaljoja tehdään sitten ampisilliinille ja tetrasykliinille. Mielenkiintoa omaavat E. coli-pesäkkeet ovat ne, jotka ovat menettäneet resistenssin tetrasykliinille ja säilyttäneet resistenssin ampisilliinille. Likimain 5-10 pesäkettä säilyy hengissä noin 300:sta sellaisesta, jotka havaitaan alkuperäisillä ampisilliiniä sisältävillä maljoilla.

- Kutakin E. coli-pesäkettä kasvatetaan erillisesti 10 ml:ssa ML-alustaa seitsemän tunnin ajan 37^oC:ssa. Kloramfenikolia lisätään sitten niin, että se saavuttaa konsentraation 100 mikrogrammaa/ml, ja inkubointia jatketaan 37^oC:ssa yön yli. Liuokset poolataan ja sentrifugoidaan solupelletin talteenottamiseksi. Pelletti otetaan 0,7 ml:aan STET-puskuria (0,05 M Tris.HCl (pH 8,0), joka sisältää 8 % sakkarosia, 5 % Triton-X-100, 0,5 M EDTA), johon lisätään 50 mikrolitraa lysotsyymiä (10 mg/ml).

- 25 Seos sentrifugoidaan välittömästi 12 000 g:ssä 10 minuutin ajan huoneen lämmössä. Tuloksena saatava pintaneste pannaan mikrofugiputkiin. Yhtä suuri tilavuus (likimain 0,4 ml) isopropanolia lisätään ja seos pannaan -20^o:seen yhden tunnin ajaksi ja sentrifugoidaan sitten.

- 30 Tuloksena saatava pelletti pestään etanolilla, suspendoidaan uudelleen 0,5 ml:aan puskuria (0,02 M Tris.HCl (pH 8,1), joka sisältää 0,01 M EDTA, 0,1 M NaCl) ja käsitellään RNAasi-A:lla (Millipore), RNAasilla T1 (Sigma) ja proteinaasilla K (EM Biochemicals, Darmstadt) vastaavissa lo-
35 pullisissa konsentraatioissa 100 mikrogrammaa/ml, 25 U/ml ja 0,025 mg/ml viiden tunnin ajan 37^oC:ssa.

Seosta uutetaan sitten 0,5 ml:lla puskurilla kyllästettyä fenolia ja ravistellaan viiden minuutin ajan ja uutetaan kloroformilla (0,166 ml) viiden minuutin ajan. Tuloksena saatavaa vesifaasia uutetaan eetterillä fenolin ja kloroformin poistamiseksi. 0,05 ml 3 M Na-asetaattia lisätään vesifaasiin ja sitten seuraa 2 tilavuutta kylmää etanolia. Seosta pidetään yön yli -20°C :ssa.

Saostettu DNA pestään etanolilla, vakuumikuivataan ja suspendoidaan uudelleen sopivaan tilavuuteen (likimain 100 ml) 0,005 M Tris.HCl (pH 7,4), joka sisältää 0,0001 M EDTA.

Sitten täytyy testata näyte DNA:sta. Sen kyky inhiboida R-1 DNA-polymeraasia osoittaa sen identtisyyden. DNA testataan leikkaamalla se pBR322-vektorista. Tämä suoritetaan valmistamalla ja käyttämällä "digestiseosta". Digestiseos on 100 mg/ml naudan seerumialbumiinia, 0,02 M Tris.HCl (pH 7,0), 0,1 M NaCl, 0,007 M MgCl_2 ja 0,002 M 2-merkaptetanolia. 0,1 ml:aan digestiseosta lisätään 50 mikrogrammaa pBR322-DNA:ta, jossa on insertti ja 50 yksikköä BAM HI:tä. Seosta inkuboidaan yhden tunnin ajan 37°C :ssa.

Inserttimuotoinen plasmidi-DNA erotellaan sitten geelielektroforeesilla. Käytetään 2-%:ista agarosigeeliä puskurin kanssa, jossa on 0,08 M trizma-emästä, 0,033 M Na-asetaattia, 0,036 M NaCl ja 0,004 M EDTA.

Vaihtoehtoista kloonausmenetelmää voidaan käyttää. Esimerkissä 2 saatu kaksijuosteisen DNA:n seos eli "DNA-L-seos" kromatografoidaan uudelleen DEAE-selluloosalla (Whatman) käyttäen lineaarista 0 - 1,0 M KCl-gradienttiä 0,01 M Tris HCl -puskurissa (pH 7,8). DNA eluoituu 0,44 - 0,5 M kohdalla ja siihen viitataan tämän jälkeen termillä DEAE-II-DNA. Eluoidut fraktiot, jotka sisältävät DEAE-II-DNA:ta, konsentroidaan dialyysillä polyetyleeniglykolia vastaan. Tämä lisäpuhdistus poistaa hajonneen DNA:n ja tuottaa puhtaamman, kaksijuosteisen, heterogeenisen DNA:iden seoksen. Seos sisältää DNA-1:tä ja DNA-2:ta. Vaihtoehtoisesti DNA-1 ja DNA-2 voidaan valmistaa, kuten on kuvattu esimerkissä 5.

Kloonaus käyttäen bakteriofagia M13 mp8 voidaan suorittaa millä hyvänsä edellä mainituista DNA-fraktioista seuraavalla menettelyllä:

Esimerkki 6A

5 Toinen kloonausmenettely

- DEAE-II-DNA suspendoidaan 25 mikrolitraan liuosta, joka sisältää 0,067 M Tris pH 8,0, 0,0067 M $MgCl_2$, 0,01 M 2-merkapttoetanolia ja 25 M dGTP, dCTP, dATP ja dTTP. Sitten lisätään T4 DNA-polymeraasia (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) 0,014 yksikköä/mg DNA ja inkubointi suoritetaan 15°C:ssa kahden tunnin ajan. Tämä on muunnos Challberg'in ja Englund'in menetelmistä, joita on kuvattu julkaisussa Enzymology 65:39-43 (1980). Tätä menettelyä käytetään luomaan "tylppiä päitä" DNA-molekyyliin.
- 10 2 mikrogrammaa fagin M13 mp8 replikatiivimuotoista DNA:ta (New England Nuclear, Boston, Mass.) leikataan SmaI-restriktioendonukleaasilla (New England Biolabs, Beverly, Mass.) ja saostetaan etanolilla. Tämä muuttaa ympyrän muotoisen replikatiivisen muodon lineaariseksi DNA:ksi. Näin käsitelty lineaarinen DNA suspendoidaan uudelleen 25 mikrolitraan 0,01 M Tris pH 7,8 ja lisätään 280 yksikköä bakteeriperäistä alkalista fosfataasia (Bethesda Research Laboratories). Seosta inkuboidaan 65°C:ssa yhden tunnin ajan, minkä jälkeen liuosta uutetaan perättäin fenolilla ja eetterillä.
- 15 Valmistetaan ligaatioseos, joka sisältää 0,3 - 10 nanogrammaa tylppäpäistä DNA:ta, 10 nanogrammaa M13-fagin DNA:ta ja 80 yksikköä T4 DNA -ligaasia (New England Biolabs) 0,05 M Tris'issä, pH 7,8; 0,01 M $MgCl_2$; 0,02 M ditiotreitolia; 0,001 M ATP; ja 50 mikrogrammaa/ml naudan seerumi-
- 20 albumiinia (nukleaasivapaata, Bethesda Research Laboratories) 20 mikrolitran tilavuudessa. DNA ligatoidaan M13-fagiin inkuboimalla tätä seosta yön yli 15°C:ssa ja lineaarinen DNA tulee uudelleen ympyrän muotoiseksi.
- 25 Sitten on välttämätöntä saattaa uudelleen ympyrän muotoiseksi tullut DNA, joka nyt sisältää kloonattavan DNA:n, johonkin sopivaan isäntään, jossa DNA voi replikoitua. Tätä
- 30
- 35

kutsutaan transfektioksi ja suoritetaan Mandel'in ja Higa'n menettelyn (J. Molecular Biology 53:154 (1970) muunnoksella. E. coli-kantaa JM103 kasvatetaan logaritmiseen vaiheeseen (A600, likimain 0,4) 2 x YT-alustassa (16 mg/ml Bacto-Tryptone, 10 mg/ml hiivauutetta, 10 mg/ml NaCl). 25 ml viljelmää pannaan jäiden päälle 15 minuutin ajaksi ja solut pelletoidaan sitten sentrifugoimalla ja suspendoidaan 10 ml:aan jääkylmää 0,01 M NaCl. Tämän jälkeen solut pelletoidaan taas sentrifugoimalla, suspendoidaan uudelleen 10 ml:aan jääkylmää 0,1 M CaCl₂ ja jätetään jäiden päälle 20 minuutiksi. Solut pelletoidaan sitten ja suspendoidaan uudelleen 2 ml:aan jääkylmää 0,1 M CaCl₂ ja inkuboidaan jäiden päällä taas 15 minuuttia. 0,3 ml soluja lisätään sitten ligatoidun DNA:n eriin ja pannaan 37^o:n vesihauteeseen 30 sekunniksi. Seos pannaan sitten jäiden päälle 90 minuutiksi ravistellen silloin tällöin ja sitten solut maljataan alustalle, joka sisältää isopropyylitiogalaktosidia (IPTG) ja dibromi-dikloori-indoligalaktosidia (xgal) Messing'in menetelmän mukaisesti (Methods in Enzymology, 1983). Sen jälkeen, kun on inkuboitu yön yli 37^oC:ssa, kirkkaat plakit valikoidaan edelleen seulottaviksi.

Yksijuosteista fagi-DNA:ta saadaan sitten käyttäen menetelmiä, joita ovat kuvanneet Sanger, Coulson, Barrell, Smith ja Rose julkaisussa J. Molecular Biology 143:161 (1980), muutamien muunnoksien. Fagiplakit otetaan talteen hammastikulla ja pannaan 1 ml:n viljelmiin, joissa on logaritnivaiheisia JM103-soluja (A650, likimain 0,3) 2 x YT-alustassa 17 x 100 mm:n viljelyputkissa. Putkia pyörretetään 300 kierrosta minuutissa 4-8 tunnin ajan 37^oC:ssa korkit ilmanvaihtoaukollisina ilmastuksen sallimiseksi. Kunkin putken sisältö siirretään 1,5 ml:n Eppendorf-sentrifugiputkiin ja sentrifugoidaan viisi minuuttia Eppendorf-sentrifugissa. Pintaneste kaadetaan toiseen Eppendorf-putkeen ja 200 mikrolitraa 20-%:ista polyetyleeniglykoli 6000:ta 2,5 M NaCl:ssä lisätään. Putkia pyörteytetään sitten ja inkuboidaan huoneen lämmössä ainakin 15 minuutin ajan Eppendorf-

sentrifugissa. Pintanesteet poistetaan niin perusteellisesti kuin mahdollista käyttäen pasteurpipettejä, joissa on ulosvedetyt kapillaarikärjet. Pelletit suspendoidaan uudeen 100 mikrolitraan 0,01 M tris. (pH 7,8), joka sisältää
5 0,0001 M EDTA ja uutetaan 50 mikrolitralla neutraloitua fenolia. DNA etanolisaostetaan ja saatetaan lopulliseen tilavuuteen 25 mikrolitraa. Likimain 5 mikrogrammaa DNA:ta saadaan talteen tällä menettelyllä.

5 mikrolitraa DNA-liuosta (sisältäen likimain 1 mikrogramman DNA:ta) yhdistetään 1 mikrolitraan 15-emäsparista kaksijuosteista M13-primeria (2,5 mikrogrammaa/ml, New England Biolabs, Beverly, Mass.) 1 mikrolitraan puskuria (0,07 M Tris HCl, pH 7,5; 0,07 M MgCl₂; 0,5 M NaCl) ja 3 mikrolitraan H₂O. Tämä seos vedetään kapillaariputkeen,
15 jonka molemmat päät suljetaan liekillä ja pannaan sitten vesiputkeen (13 x 100 mm) 100°C:seen viideksi minuutiksi. Seoksen annetaan jäädä vesiputkeen 30 minuutiksi tämän jäähtyessä huoneen lämpötilaan, Anderson'in, Gait'in, Mayol'in ja Young'in menetelmän mukaisesti, jota on kuvattu julkaisussa Nucleic Acids Research 8:1731 (1980).
20

Kunkin edellä olevan kapillaariputken sisältö pannaan Eppendorf-putkeen ja yhdistetään 1 mikrolitraan 0,1 M ditiotreitolia, 2 mikrolitraan liuosta, joka on 0,0022 M kunkin 4:n dNTP:n suhteen ja 1 yksikköön DNA-polymeraasin I
25 Klenow-fragmenttia (New England Biolabs). DNA:ta sisältäviä seoksia inkuboidaan 20 minuutin ajan huoneen lämpötilassa, jona aikana seuraavat lisättiin: 0,5 mikrolitraa 1 mg/ml nukleasivapaata naudan seerumialbumiinia (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) ja 5 yksikköä Eco RI:tä
30 (Miles Laboratories, Elkhart, Ill.) ja Bam HI:tä (New England Biolabs, Beverly, Mass.) kumpaistakin. Inkubointia jatketaan yhden tunnin ajan 37°C:ssa.

Näin saatujen näytteiden elektroforeesi suoritetaan 2-%:isissa agarosigeeleissä käyttäen juoksevaa puskuria,
35 jossa on 0,08 M Tris HCl pH 7,8, 0,03 M natriumasetaattia, 0,036 M natriumkloridia, 0,004 M EDTA ja 0,5 mikrogrammaa/ml

etidiumbromidia. Geelit ajetaan upotettuina minigeelilaitteessa. (C.B.S. Scientific, Del Mar, Cal.) 20 m.a. vakiovirralla. Asianomaisten DNA:iden vaellus voidaan mitata havainnoimalla geelejä ultraviolettivalossa hetkellä, jolloin
5 jäljitysväri bromifenolisininen on vaeltanut 3 tai 4 cm alkukohdasta.

Fageja plakeista, joilla on havaittu olevan insertioita, käytetään yhden ml:n viljelmien tekemiseen, kuten edellä on kuvattu seulontaa varten 10 ml:n erää 1 ml:n viljelmistä, jotka on jäädytetty -70° :ssa, voidaan käyttää
10 suoraan plakeista hammastikuilla otettujen fagien sijasta. Fagiviljelmiä lisätään 200-500 ml:aan E. coli JM 101:n logaritmivaiheista viljelmää (A600, likimain 0,3) 2x YT-alustassa. Tätä viljelmää ravistellaan 37° :ssa neljän tunnin
15 ajan, kloramfenikolia lisätään sitten 100 mikrogrammaan/ml ja inkubointia jatketaan vielä 2-3 tuntia.

Replikatiivisen muodon puhdistus suoritettiin Holmes'in ja Quiglye'n menetelmällä, jota on kuvattu julkaisussa Analytical Biochemistry 114:193 (1981). Solut pel-
20 letoidaan sentrifugoimalla ja pestään käyttäen 0,01 M Tris, 0,002 M EDTA, sitten sentrifugoidaan ja suspendoidaan uudelleen 20-35 ml:aan 8-%:ista sakkaroosia, 5-%:ista Triton X 100, 0,05 M EDTA ja 0,05 M Tris, pH 8,0 (STET-puskuri). Li-
sätään 25-50 mikrolitraa lysotsyymin perusliuosta, jossa on
25 50 mg/ml (Worthington Biochemicals, Freehold, N.J.). Solususpensio saatetaan kiehumaan liekin yläpuolella, pannaan kiehuvaan vesihauteeseen 40 sekunniksi ja välittömästi pyöritetään 12 000 x G:ssä 10 minuutin ajan. Pintaneste, joka sisältää replikatiivista muotoa olevan DNA:n, dekantoidaan
30 ja DNA saostetaan isopropanolilla. Replikatiivinen muoto puhdistetaan edelleen CsCl-tiheysgradienttisentrifugoinnilla käyttäen etidiumbromidia. Etidiumbromidi poistetaan DNA-liuoksesta kahdella uutolla CsCl-kyllästetyllä isopropanolilla. Näytteitä dialysoidaan sitten 0,01 M Tris, pH 7,8,
35 0,0001 M EDTA vastaan ja konsentroidaan 30-%:ista polyetyleeniglykolia samassa puskurissa vastaan.

Restriktioentsyymejä Bam HI ja Eco RI käytetään insertioiden poisleikkaamiseen, jotka erotellaan vektori-DNA:sta 2-%:isilla agarosigeeleillä, jotka ajetaan kuten on kuvattu seulontamenettelyllä yllä. Insertiovyöt elektro-

5 eluoidaan kouruihin, joita on leikattu agarosiin, käyttäen Yang'in, Lis'in ja Wu'n menetelmää, Methods in Enzymology 68:176 (1979), etanolisaostetaan ja rekonstituoidaan sopivalla puskurilla.

Analyyttisiä testejä on suoritettu kloonatulle

10 DNA-L:lle DNA:n identtisuuden varmistamiseksi suuremmalla spesifisyydellä. Kolmen DEAE-II-DNA:n, jotka on kloonattu MOPC-21-tuumorikudoksesta, osittaiset sekvenssit luetteloidaan alempana:

Kloonin "A" sekvenssi (210 emäsparia pitkä)

15

1	11	21	31
AACCACGCTT	TTGCCAACCG	AACACCATTG	GGTGATGCCA

20

41	51	61	71
TCGATTCAAC	ATATTGCTG	TCGGTGCAGA	GCCGCATCTG

25

81	91	101	111
ACACGGTTGG	TTCAACGCGC	AGATCACGGC	GGTCATTTCC

121	131	141	151
ATGCGGTTGT	TGGTGGTCTG	CGGCTCGGAG	CCGACCAGTT

161

CCTTCTCCT

30

Kloonin "B" sekvenssi

35

1	11	21	31
TTATCAGTGA	TTACATATCA	TTTGAGTTCT	TTTGTGATTG

41	51	61
TGTTACTCAC	TCAGGCTCAT	TGTGTGA

Kloonin "C" sekvenssi

1 11 21 31
 TGATTTTCAG ATTTCTTGCC ATATTCCACG TCCTACAGTG
 5
 41
 GCATTCTA

III. DNA:n leimaus

10 DNA-1:n kloonauksen jälkeen saattaa olla toivottavaa
 "leimata" se kloonausmenettelyn osien varmennuksen mahdol-
 listamiseksi. Sitä paitsi alempana kuvattavat malignisuus-
 testimenettelyt vaativat "leimatun" DNA:n käyttöä, so.
 DNA:n, joka on fysikaalisesti tai kemiallisesti käsitelty
 15 niin, että sitä voidaan seurata ja mitata seuraavien menet-
 telyjen läpi. Tyypillisesti käytetään radioaktiivista ma-
 teriaalia molekyylien leimaamiseksi sellaisia tarkoitusp-
 riä varten. Keksijä on havainnut, että fosfori 32 (^{32}P)
 ja tritium (^3H) ovat erityisen käyttökelpoisia ja tehokkai-
 20 ta isotooppeja DNA-L:n leimaamiseen. On myös alalla tunnet-
 tua käyttää optisesti aktiivisia leimoja, kuten värejä tai
 fluoresoivia komplekseja ja käyttää säteilyä läpäisemättö-
 miä agensseja täten leimattujen aineiden visualisoinnin
 avuksi. Tästä syystä tarkoitetaan sisällyttää leimaamisen
 25 käsitteeseen (siten kuin jäljempänä esitetään patentti-
 vaatimuksissa) kaikki sellaiset toisiaan vastaavat keinot.

Edelleen saattaa kilpailevaan sitoutumiseen käytet-
 tävä leimattu DNA olla modifioitu syöpä-DNA, joka on va-
 littu affiniteettinsa entsyymiin, johon testin luonnollinen
 30 syöpä-DNA sitoutuu, perusteella; tällaisissa tapauksissa
 modifioitua DNA:ta voidaan käyttää luonnollista perää olevan
 DNA:n sijasta testin DNA-koettimena.

Radioaktiivinen leima pannaan sisään DNA-molekyyliin
 entsyymaattisella prosessilla, kuten kuvataan alempana. Seu-
 35 raava esimerkki viittaa DNA-1:een, mutta menettely DNA-2:lle
 tai DNA-1:stä, DNA-2:sta tai DNA-L:stä kloonatulle DNA:lle

on olennaisesti identtinen. Alempana käytettävä termi "DNAasi I" viittaa bakteriaaliseen entsyymiin, joka kykenee aikaansaamaan yksijuosteisia katkoksia tai aukkoja kaksijuosteisiin DNA-molekyyleihin. Tässä käytetty DNAasi I -entsyymi on se, jota saadaan Millipore Corp:sta, mutta on olemassa muitakin toimittajia.

Esimerkki 7

DNA-1:n leimaus ^{32}P :llä

- Seos, joka sisältää 5 000 mikroCuria kantajavapaa-
10 ta radioleimattua (^{32}P) deoksinukleosiditrifosfaattia (dCTP), joka on leimattu alfa-asemassa, valmistetaan 1,0 ml:aan 0,01 M M Tris.HCl-puskuria (pH 7,4). Kunkin neljän leimaamattoman deoksinukleosiditrifosfaatin (jotka tunnetaan alalla nimillä dCTP, dATP, dGTP ja TTP) erilliset
15 liuokset valmistetaan, jotka sisältävät 0,2 nanomoolia/ mikrolitra ja käyttäen samaa puskuria. Sitten valmistetaan seos, joka sisältää 20 mikrolitraa radioleimattua ^{32}P -deoksinukleosiditrifosfaattia, 10 mikrolitraa kutakin leimaamattomista deoksinukleosiditrifosfaateista dGTP, dATP ja
20 TTP ja 2 mikrolitraa leimaamatonta dCTP. Tätä seuraa 10 mikrolitraa 10x reaktiopuskuria ja 2 mikrogrammaa esimerkin 6 DNA:ta 2 mikrolitrassa. Sekoittamisen jälkeen lisätään ti-
lattua vettä, niin että kokonaistilavuudeksi saadaan 97 mikrolitraa. Tähän viitataan "leimausseoksena".
25 "Aktivointipuskuri" valmistetaan sekoittamalla 10 ml Tris.HCl (pH 7,6), 0,005 M MgCl_2 ja 1 mg/ml nukleasivapaa-
ta BSA:ta. 9 mikrolitraa aktivointipuskuria sekoitetaan 1 mikrolitraan liuosta, joka sisältää 100 mikrogrammaa/ml
DNAasia I (vastaa 0,1 mikrogrammaa DNAasia I), ja seos jä-
30 tetään 4°C :seen kahden tunnin ajaksi. Tähän seokseen viita-
taan termillä "aktivoitu DNAasi I".

- Yksi mikrolitra aktivoitua DNAasia I lisätään 97 mikrolitraan leimausseosta ja tuloksena saatavaa seosta inkuboidaan 10 minuutin ajan 15°C :ssa. Tähän seokseen lisätään
35 sitten kaksi yksikköä E. coli DNA-polymeraasia I (1 yksikkö/mikrolitra) 2 mikrolitrassa kalium- PO_4 (pH 7,0) -puskuria.

Puskuri on 0,001 M 2-merkaptoetanolin suhteen ja sisältää 50 % glyserolia. Reaktiota jatketaan yhden tunnin ajan ja se pysäytetään lisäämällä 0,2 ml 0,3 M Na₂EDTA (pH 8,0). DNA erotellaan sitten jäännösnukleotideista kromatografialla Sephadex[®] G-50 -pylväässä (hieno laatu) (Pharmacia), joka on etukäteen tasapainotettu sopivassa tilavuudessa 0,01 M Tris.HCl:ää, joka sisältää 0,001 M Na₂EDTA (pH 8,0).

Esimerkki 7A

DNA:n leimaus fluoresoivalla värillä (etidiumbromidi) 1,0 ml:aan 0,1-%:ista etidiumbromidiliuosta lisätään 1,0 ml liuosta, joka sisältää 10 mikrogrammaa DNA-L/ml. Seokselle tehdään geelisuodatus Sephadex[®] G-10 -pylväässä reagoimattoman etidiumbromidin poistamiseksi. Leimattu DNA-L otetaan talteen 0,01 M Tris.HCl:ään, joka sisältää 0,0001 M Na₂EDTA:ta, (pH 8,0), kuten esimerkin 6 lopussa.

Etidiumbromidi interkalatoituu DNA-kaksoisheliksin juosteiden väliin. Se on viritettävissä 518 nm:n aallonpituudella ja emittoi 610 nm:n aallonpituudella.

Esimerkki 7B

DNA:n leimaus fluoresoivan vasta-aineen menetelmällä "Nick-translaatio"-menettelyä, joka on samankaltainen kuin esimerkissä 7 oleva, voidaan käyttää biotinyloidun deoksiuridiinitrifosfaatin (dUTP) kanssa. Yhtä menettelyä kuvataan julkaisussa Gardner, Non-radioactive DNA Labeling: Detection of Specific DNA and RNA Sequences on Nitrocellulose and in situ Hybridizations, Biotechniques 1:38-41 (1983).

Biotinyloitua dUTP:tä käytetään esimerkin 7, kappale 1, ³²O-leimatus deoksinukleosiditrifosfaatin sijasta. Niinpä 100 nanomoolia biotinyloitua deoksinukleosiditrifosfaattia (dUTP) pannaan 2 mikrolitraan 0,01 M Tris:iä (pH 7,4). Ei-biotinyloitujen deoksinukleosiditrifosfaattien (dATP, dCTP, cAMP, TTP) erilliset liuokset tehdään samoihin puskuri-konsentraatioihin siten, että 2 mikrolitraa tulee sisältämään 50 nanomoolia kutakin ei-biotinyloiduista deoksinukleosidifosfaateista. Sitten valmistetaan seos, joka sisältää

2 mikrolitraa biotinyloitua dUTP:ta ja 2 mikrolitraa kutakin ei-biotinyloiduista deoksinukleosiditrifosfaateista. Tätä seuraa 10 mikrolitraa 10x reaktiopuskuria ja 2 mikrogrammaa esimerkin 6 DNA:ta 2 mikrolitrassa. Sekoittamisen jälkeen lisätään tislattua vettä kokonaistilavuuden saamiseksi 97 mikrolitraksi. Tähän viitataan "leimausseoksena".

Sitten seurataan menettelyä, jota kuvataan esimerkin 7 kappaleissa 2 ja 3.

Biotiini todetaan sitten biotinyloituneelta DNA:lta vasta-aineella, erityisesti vuohen anti-biotiinin IgG-fraktiolla ja fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC)-konjugoidun kaniinin anti-vuohi-vasta-aineella (Enzo Biochem Inc.). Vuohen anti-biotiini sitoutuu DNA:ssa olevaan biotiiniin, mitä sitten seuraa FITC-kaniini-anti-vuohi-vasta-aineen sitoutuminen vuohi-anti-biotiiniin. DNA:n molekyylipaino on likimain yhtä suuri kuin immunoglobuliinin. Tästä syystä 1 mikrogramman biotinyloitunutta DNA:ta annetaan reagoida 1 mikrogramman kanssa vuohen anti-biotiinin IgG-fraktiota, mitä seuraa reaktio 1 mikrogramman kanssa FITC-konjugoitua kaniinin anti-vuohi-vasta-ainetta. Koko DNA:n ja vasta-aineiden muodostamaa kompleksia käytetään testissä samalla tavalla kuin radioleimattua DNA:ta.

IV. Entsyymi-konjugoidun matriisin ja puhdistusmatriisin valmistus testejä varten

Saattaa olla joukko entsyymejä muissa kudoksissa muista lajeista, jotka DNA-L kykenee selektiivisesti inhiboimaan. Vaikka keksijä on toistaiseksi löytänyt vain yhden, joka on tehokas näissä testeissä, uskotaan, että yrityksen ja erehdyksen menettelyt kehittäisivät muita, jotka ovat käyttökelpoisia näissä testeissä tässä kuvattujen menettelyjen pohjalta. Tässä käytetty entsyymi on R-1 DNA-polymeraasi, joka on uutettu hiiren myeloomatumorista menettelyllä, jota kuvataan julkaisussa Analytic Biochemistry 87:411 (1978), supra. Keksijä on testannut R-1 DNA-polymeraasia näytteillä, jotka sisältävät muita DNA:ita, joita saattaa olla läsnä

veressä ja muissa kehon nesteissä ja havainnut, että mikään noista DNA:ista ei näyttänyt spesifisesti inhiboivan R-1 DNA-polymeraasia (selektiivisesti sitoutuvan siihen).

Esimerkki 8

- 5 Entsyymi-konjugoidun matriisin valmistus testejä varten

Suoritetaan esimerkin 3 tai 4 menettely käyttäen samaa CNBr-aktivoitua-Sepharose[®]:a tai Polybeads'eja. Esimerkin 5 esikäsittelemennettely suoritetaan. Entsyymisisältö
10 määritetään menettelyllä, jota on kuvattu julkaisussa Gottlieb et al., Cancer Research 40:758-770 (1980), supra, ja merkitään muistiin.

Tuloksena saatava tuote on R-1 DNA-polymeraasi-ent-
15 syymi-konjugoitu matriisi, joka on sopiva käytettäväksi tässä kuvattavissa testeissä. Se säilyy stabiilina 4°C:ssa ainakin kolmen kuukauden ajan. Se voidaan regeneroida toistettua käyttöä varten pesemällä 1 M KCl:llä määrityspuskurin seuraamana.

Seeruminäytteet voivat sisältää pieniä määriä "ulkopuolisia DNA:ita", so. DNA:ita, jotka eivät ole yhteydessä DNA-L:ään. Sellaiset ulkopuoliset DNA:t voisivat häiritä testin tarkkuutta sitoutumalla osaan R-1 DNA-polymeraasista entsyymi-konjugoidulla matriisilla. Kuitenkaan sellaiset ulkopuoliset DNA:t eivät ole spesifisiä R-1 DNA-polymeraasille.
25 Tästä syystä ne voidaan "puhdistaa pois" käyttäen ulkopuolista entsyymiä jollakin sopivalla matriisilla. Käännteinen transkriptaasi-entsyymi, joka on johdettu Rauscher'in leukemiaaviruksesta, ei inhiboidu DNA-1:n, DNA-2:n tai DNA-L:n vaikutuksesta, mutta sitä inhiboi laaja joukko erilaisia mui-
30 ta, ulkopuolisia DNA:ita. Yhtä menetelmää entsyymin valmistamiseksi kuvataan julkaisussa Ross, Scolnik, Todaro ja Aaronson, Nature New Biology 231: 163-70 (1971). Tätä entsyymiä voidaan käyttää puhdistusmatriisin valmistamiseen testi-
näytettä varten, kuten kuvataan alempana.

Esimerkki 8A

Puhdistusmatriisin valmistus testejä varten

Likimain 0,1 grammaa Polybead Microspheres'ejä pestään kalium- PO_4 -puskurissa (pH 7,2 - 7,6). Likimain 25 mikrolitraa helmien konsentroituja suspensiota lisätään 75 mikrolitraan samaa kalium- PO_4 -puskuria yhdessä 10 mikrolitran kanssa 1-etyyli-3-3-dimetyyliaminopropyylikarbodiimidin 1 gramma/ml -liuosta H_2O :ssa (ECDI). Seosta inkuboidaan huoneen lämpötilassa (24°C) 30 minuutin ajan. Helmet pestään sitten samalla kalium- PO_4 -puskurilla ja suspendoidaan uudelleen 75 mikrolitran eriin tätä puskuria, joka sisältää 4 % glyserolia. Helmet siirretään syrjään ja varastoidaan tässä tilassa.

Likimain 75 mikrolitraa edellä olevaa varastoitua helmituotetta pannaan koeputkeen. Puhdistettua käänteistä transkriptaasia (0,5 - 1,0 mikrogrammaa/mikrolitra) lisätään, kunnes seos saavuttaa 100 mikrolitran tilavuuden. Seosta inkuboidaan sitten 30 minuuttia huoneen lämmössä (24°C).

10 mikrolitraa 0,2 M glysiiniä (pH 7,6 - 8,0) tai 10 mikrolitraa naudan seerumialbumiinin liuosta (20 mg/ml) lisätään sitten hitaasti seokseen ja inkubointia suoritetaan 30 minuutin ajan huoneen lämmössä (24°C), ravistellen ajoittain. Helmet pestään sitten kahdesti "varastointipuskurilla" (0,05 M Tris pH 7,8; 0,004 M beeta-merkaptotetanolia; 0,04 M KCl 0,2 mg/ml naudanseerumialbumiinia; 0,0001 M MnCl_2 20-%:ista glyserolia) ja suspendoidaan uudelleen 50 mikrolitraan varastointipuskuria. Se pannaan sitten syrjään, kunnes käytetään. Ennen käyttöä helmet työstetään pestyinä 0,1-%:isessa denaturoidun lohen siemennesteen DNA:n liuoksessa varastointipuskurissa, mitä seuraa huuhtelu varastointipuskurissa. Tämä tuote on "puhdistusmatriisi".

Esimerkki 8B

Puhdistusmatriisin käyttö testinäytteen puhdistamiseen

Likimain 1 cm^3 esimerkin 1 testinäytettä sekoitetaan 10 mikrolitraan esimerkin 8A puhdistusmatriisia. Seosta

ravistellaan perusteellisesti ja se siirretään syrjään 30 minuutiksi huoneen lämmössä (24°C). Sitä sentrifugoidaan sitten 10 minuuttia 1 000 g:ssä. Pintaneste on "puhdistettu testinäyte". Helmet voidaan ottaa talteen ja käyttää uudelleen.

V. Testimenettely

Kuten jo on osoitettu, keksintö toteaa syöpä-DNA:n (DNA:n, jonka tuotto huomattavassa määrässä liittyy malignisuuksiin) läsnäolon "kilpailevan sitoutumisen" avulla. Leimattu syöpä-DNA "kilpailee" minkä hyvänsä syöpä-DNA:n kanssa (so. toimii DNA-koettimena sille), jota esiintyy testipotilaan veressä (tai muussa kehon nesteessä), entsyymikonjugoidussa matriisissa olevalla entsyymillä olevista sitoutumiskohdista. Koska entsyymi-konjugoitu matriisi on esikäsitelty muulla DNA:lla (kuten lohen siemennesteen DNA:lla), ne entsyymi-konjugoidulla matriisilla olevat sitoutumiskohdat, joilla on yleinen affiniteetti DNA:ta kohtaan (pikemminkin kuin selektiivinen affiniteetti mielenkiinnon kohteena olevaa syöpä-DNA:ta, kuten esimerkiksi DNA-L:ää, kohtaan), ovat jo sidotut eivätkä häiritse testimenettelyä. Myös se mahdollisuus, että läsnä olisi ulkopuolisia DNA:ita, jotka voisivat häiritä testiä, koska ne sitoutuvat mihin hyvänsä joukosta entsyymipaikkoja, mahdollisesti mukaan lukien R-1 DNA -polymeraasi, saadaan ehkäistykseen esikäsittelemällä testinäytettä puhdistusmatriisilla. Entsyymi-konjugoidun matriisin ottaman ja siihen sitoutuneen leimatun syöpä-DNA:n osuus on suhteessa kilpailevan syöpä-DNA:n läsnäoloon tai poissaoloon testipotilaan veressä (tai nesteessä). Jos läsnä ei ole yhtään kilpailevaa syöpä-DNA:ta, maksimimäärä leimattua syöpä-DNA:ta sitoutuu entsyymikonjugoituun matriisiin. Mutta jos kilpailevaa DNA:ta on läsnä, vähäisempi määrä leimattua DNA:ta sitoutuu entsyymikonjugoituun matriisiin. Entsyymi-konjugoituun matriisiin näissä olosuhteissa sitoutuneen leimatun DNA:n (DNA-koettimen) osuus on täten indikaattori syöpä-DNA:n läsnäololle testipotilaan veressä tai nesteessä.

Testimenettelyyn kuuluvat vaiheet testinäytteen valmistaminen testipotilaan verestä tai nesteestä (esimerkki 1), sen puhdistaminen puhdistusmatriisilla (esimerkit 8A ja 8B), leimatun DNA:n sekoittaminen (esimerkki 7) - edullisemmin kloonatun (esimerkki 6) kuin luonnollisen - puhdistettuun testinäytteeseen, leimattua DNA:ta sisältävän testinäytteen ("DNA/näyte-seos") "vieminen" entsyymi-konjugoituun matriisiin (esimerkki 8) ja lopuksi sen määrittäminen, kuinka paljon leimattua DNA:ta on tullut sidotuksi entsyymikonjugoituun matriisiin.

DNA/näyte-seoksen "viemiseksi" entsyymi-konjugoituun matriisiin jokin tunnettu määrä DNA/näyte-seosta sekoitetaan puskuriin ja johonkin tunnettuun määrään esimerkin 8 esikäsiteltyä entsyymi-konjugoitua matriisia. Viimeksi mainittu sisältää jonkin tunnetun määrän entsyymiä. Tuloksena saatavaa seosta inkuboidaan sitten 15 minuutin ajan 25°C:ssa. Matriisi erotetaan sitten DNA/näyte-seoksen ja puskurin nestejäännöksestä sentrifugoimalla. Parhaiden tulosten saamiseksi leimatun DNA:n ja entsyymi-konjugoidun matriisin suhteellisilla konsentraatioilla tulisi olla sellainen suhde, että - mielenkiintoa omaavien syöpä-DNA:iden (jotka, leukemian tapauksessa ovat DNA-L) ennakoituilla konsentraatioilla testinäytteessä - normaalilla verinäytteellä ja "malignilla" verinäytteellä tehdyn testin tulosten välillä on melkoinen ero (esimerkiksi 10 % vastaan 90 %). Tämä saavutetaan edullisesti silloin, kun: (1) testinäytteeseen lisätyn DNA-L:n määrä lievästi ylittää entsyymi-konjugoidussa matriisissa olevan entsyymin määrän (molekyylien määrän mukaan), niin että lisätty DNA-L voi sitoutua kaikkiin paikkoihin entsyymille ja että vielä jää lievä ylimäärä DNA-L:ää ja (2) testinäytteessä läsnäoleva luonnollisen DNA-L:n määrä, jos potilaalla on malignisuus, on ainakin useita kertoja entsyymin määrä (molekyylien määrän mukaan).

Keksijä uskoo, että 1 molekyyli DNA:ta sitoutuu 1 molekyyliin entsyymiä, että DNA-L:n molekyylipaino on likimain yhtä suuri kuin 0,65 R-1 DNA-polymeraasientsyymin

molekyyllipainosta, niin että 0,65 nanogrammaa puhdasta DNA-L:ää ja 1,0 nanogrammaa puhdasta entsyymiä kumpikin edustavat samaa molekyylien (so. DNA-L:n tai entsyymin, tässä järjestyksessä) lukumäärää ja että 0,65 nanogrammaa

5 DNA-L:ää sitoutuu 1,0 nanogrammaan R-1 DNA -polymeraasia ja niin edelleen. Edelleen uskotaan, että entsyymin molekyyllipaino on likimain 200 000 ja että DNA-L:n molekyyllipaino on likimain 130 000. Seuraavana tulevia esimerkkejä kuvataan puhdistetun DNA-L:n ja olennaisesti homogeenisuuteen

10 puhdistettujen R-1 DNA -polymeraasientsyymin valmisteiden valossa.

On ainakin kaksi tapaa testata leimatun DNA:n ottoa. Toinen on testata jäännösnestettä, joka jää jäljelle entsyymikonjugoidun matriisin poistamisen jälkeen. Jos x prosenttia

15 leimatusta DNA:sta (DNA-koettimesta) jää jäljelle jäännösneesteeseen, 100-x prosenttia sitoutui entsyymi-konjugoituun matriisiin. Toinen tapa on testata entsyymi-konjugoitua matriisia uuttamalla siitä olennaisesti kaikki sitoutunut, leimattu DNA ja mittaamalla viimeksi mainittu. Ideaalisesti

20 kaksi menetelmää ovat toisiaan täydentäviä ja leimatun DNA:n kahden määrän (jäännösnesteessä ja entsyymi-konjugoidussa matriisissa) summan tulisi olla yhtä suuri kuin testiseerumiin lisätyn leimatun DNA:n määrä.

Valitettavasti näin ei tapahdu, johtuen koevirheistä.

25 Ensimmäisen menetelmän, jäännösnestemäärittäysmenetelmän, uskotaan olevan tarkin. Toiseen menetelmään, matriisimäärittäysmenetelmään, tulee mukaan häviöitä pesussa, riittämättömässä uutossa ja niin edelleen, joiden uskotaan kohoavan noin 25 %:iin. Tämä arvio perustuu keksijän testeihin,

30 joissa käytettiin testiseerumia, jossa oli 100 % leimattua DNA-L:ää, siten että DNA-L:ää oli läsnä ylimäärin verrattuna käytettävissä oleviin paikkoihin, niin että noin 50 % olisi ollut kummassakin osuudessa ja joissa suoritettiin molemmat määrittäysmenetelmät ja katsottiin kaiken häviön liittyvän

35 matriisimäärittäysmenetelmiin.

Edullinen suoritustapa ainakin DNA-L:ää ja leukiemiä varten on tästä syystä jäännösneestemääritysmenetelmä pikemmin kuin matriisimääritysmenetelmä, vaikkakin viimeksi mainittu on tarkistus ensin mainitulle. Voidaan myös
5 todeta, että matriisimääritysmenetelmän menettelyt ovat työläämpiä ja aikaavievempiä kuin jäännösneestemääritysmenetelmän menettelyt.

Kaikki seuraavat esimerkit viittaavat DNA-1:een. Kaikissa keksijän tuntemissa suhteissa DNA-2 tuottaa identtiset
10 tulokset DNA-1:een verraten, eikä siitä, kumpaa käytetään tai käytetäänkö seosta, joka sisältää DNA-1:tä ja DNA-2:tä, aiheudu mitään keksijän tuntemaa eroa. Myöskään ei havaita mitään eroa testien, joissa käytetään kloonattua DNA-L:ää, joka on alkuperäisesti saatu, vastaavasti ihmisistä tai hiiristä,
15 tulosten välillä, vaikkakin uskotaan, että ihmisen ja hiiren DNA-L eivät ole identtiset. Kuitenkin tuloksissa saattaa olla eroja, jotka aiheutuvat useiden erilaisten kloonattujen DNA:iden ja seerumeiden, jotka ovat peräisin useilta eri potilailta, joilla on erilaiset lymfoidiset
20 syövät, käytöstä.

Esimerkki 9

Normaalin hiiren testi (jäännösneestemääritysmenetelmä)
1,0 cm³ seerumia saadaan laboratoriohiirestä, jonka uskotaan olevan normaali. Testinäyte valmistetaan esimerkin
25 1 mukaisesti ja puhdistetaan esimerkkien 8A-8B mukaisesti. 0,5 cm³:iin puhdistettua testinäytettä lisätään 0,5 cm³ vesipitoista puskuroitua seosta, joka sisältää esimerkin 7 leimatun DNA-1:n liuoksen. DNA-liuos sisältää 1,0 mikrogrammaa/cm³ esimerkin 6 puhdasta, leimattua, kloonattua DNA-1:tä, eli yhteensä 500 nanogrammaa. Liuokset sekoi-
30 tetaan perusteellisesti ja tuloksena saatava DNA/näyte-seos on sitten valmis "vietäväksi" entsyymikonjugoituun matriisiin.

0,5 ml määritetyn ja esikäsitellyn entsyymi-konjugoidun matriisin suspensiota, joka sisältää 650 nanogrammaa
35 R-1 DNA-polymeraasientsyymiä, lisätään DNA/näyte-seokseen.

Sen jälkeen, kun oli inkuboitu 25°C:ssa 15 minuutin ajan, matriisi otetaan talteen sentrifugoimalla ja pannaan syrjään.

Jäännösneste kerätään. Se testataan leimatun DNA-1:n suhteen nestetuikespektrometrialla. Havaitaan jäännösnesteen
5 sisältävän 78 nanogrammaa leimattua DNA-1:tä. Tämä on 16 % määrästä, joka alunalkaen oli DNA/näyte-seoksessa.

Hiiri pidetään hengissä 30 päivän ajan ja tapetaan sitten, minä aikana se ei osoita mitään malignisuuden merkejä.

10 Esimerkki 10

Normaalin hiiren testi (matriisimääritysmenetelmä)

Esimerkin 9 testi toistetaan, mutta määritys suoritetaan matriisista nestetuikespektrometrialla.

Havaitaan, että matriisi on sitonut itseensä 28 nanogrammaa leimattua DNA-1:tä. Tämä on 56 % määrästä, joka
15 alunalkaen oli DNA/seerumi-seoksessa.

Esimerkki 11

Leukemiaa sairastavalle hiirelle suoritettu testi

Esimerkin 9 kappaleiden 1-3 menettely toistetaan laboratoriohiirellä, jolla tiedetään olevan multippelimeyelooma. Jäännösnestemääritysmenetelmää käytetään.
20

Havaitaan, että jäännösneste sisältää 410 nanogrammaa leimattua DNA-1:tä. Tämä on 82 % määrästä, joka alunalkaen oli DNA/näyte-seoksessa. Tämän prosenttiosuuden suhde
25 esimerkki 9:n vastaavaan (normaali hiiri) on likimain 5,1:n suhde 1:een.

Hiiri tapetaan. Tutkimus autopsiassa paljastaa tyyppilliset myelooman tunnusmerkit.

Testimenetelmän herkkyyden osoittamiseksi leukemia-
30 solujen pienten pesäkkeiden varhaisessa toteamisessa käytettäväksi voidaan valmistaa laimennettu leukemianäyte. Puhdistettu testinäyte esimerkin 11 hiirestä laimennetaan tästä syystä puhdistetulla testinäytteellä esimerkin 9 normaalista hiirestä suhteessa 1:1 000. Aikaisempaa testime-
35 nettelyä muunnetaan DNA-L:n vähäisemmän määrän, jonka ennakoidaan olevan läsnä, ottamiseksi huomioon.

Esimerkki 12

Leukemiaa sairastavalle hiirelle suoritettu laimennustesti

Esimerkin 9 testimenettelyjä seurataan laimennetulla puhdistetulla testinäytteellä. $0,5 \text{ cm}^3$:iin laimennettua puhdistettua testinäytettä lisätään $0,5 \text{ cm}^3$ vesipitoista puskuroitua seosta, joka sisältää $1,0 \text{ nanogrammaa/cm}^3$ esimerkin 7 puhdasta, leimattua, kloonattua DNA-1:tä, so. yhteensä $0,5 \text{ nanogrammaa}$. Samoin käytetään $0,65 \text{ nanogrammaa}$ entsyymiä. Jäännösnestemääritysmenetelmän käyttö osoittaa, että jäännös-
10 nösneeste sisältää $0,4 \text{ nanogrammaa}$ leimattua DNA:ta, mikä on 80% alkuperäisestä määrästä.

Sama testi toistetaan esimerkin 9 sekoittamattomalla "normaalilla" testiseerumilla. Jäännösnestemääritysmenetelmän käyttö osoittaa, että jäännösneeste sisältää $0,08 \text{ nanogrammaa}$ leimattua DNA-1:tä, mikä on 16% alkuperäisestä
15 määrästä. Kahden prosenttiosuuden suhde on viiden suhde yhteen.

Esimerkki 13

Normaalille ihmispotilaalle suoritettu testi

20 $1,0 \text{ cm}^3$ seerumia saadaan ihmispotilaasta, jonka uskotaan olevan normaali. Testinäyte valmistetaan esimerkin 1 mukaisesti ja puhdistetaan esimerkkien 8A-8B mukaisesti.

$0,5 \text{ cm}^3$:iin puhdistettua testinäytettä lisätään $0,5 \text{ cm}^3$ vesipitoista puskuroitua seosta joka sisältää kloonattua DEAE-II-liuosta, joka on leimattu esimerkin 7 mukaisesti. DNA-liuos sisältää $1,0 \text{ mikrogrammaa/cm}^3$ esimerkin 6A
25 puhdasta, leimattua, kloonattua hiiri-DNA-L:ää, eli yhteensä 500 nanogrammaa . Liuokset sekoitetaan perusteellisesti ja tuloksena saatava DNA/näyte-seos on sitten valmis "vievä-
30 täväksi" entsyymi-konjugoituun matriisiin.

$0,5 \text{ ml}$ esikäsitellyn ja määritetyn entsyymi-konjugoidun matriisin suspensiota, joka sisältää likimain 650 nanogrammaa puhdasta R-1 DNA-polymeraasientsyymiä, lisätään DNA/näyte-seokseen. Sen jälkeen, kun on inkuboitu 25°C :ssa
35 15 minuutin ajan, matriisi otetaan talteen sentrifugoimalla ja pannaan syrjään uudelleen kierrätystä varten.

Jäännösneeste kerätään. Se testataan leimatun DNA-1:n suhteen nestetuikespektrometriallla. Havaitaan, että jäännösneeste sisältää 70 nanogrammaa leimattua DNA:ta. Tämä on 14 % määrästä, joka alunalkaen oli DNA/näyte-seoksessa.

5 Potilas tutkitaan kuuden kuukauden kuluttua, eikä hänessä näytä olevan mitään leukemian tunnusmerkkejä.

Esimerkki 14

Leukemiapotilaalle suoritettu testi

10 Esimerkin 13 lukujen 1-3 menettelyt toistetaan ihmispotilaan osalta, jolla tiedetään olevan leukemia. Jäännösnestemäärittäysmenetelmää käytetään.

Havaitaan, että jäännösneeste sisältää 430 nanogrammaa leimattua DNA:ta. Tämä on 86 % määrästä, joka alunalkaen oli DNA/näyte-seoksessa. Tämän prosenttiosuuden suhde esimerkin 13 (normaali ihmispotilas) vastaavaan on likimain 15 6,1:n suhde yhteen.

Potilaan tutkimus autopsiassa paljastaa tyypilliset leukemian tunnusmerkit.

20 Testimenetelmän herkkyyden osoittamiseksi leukemia-solujen pienten pesäkkeiden varhaisessa toteamisessa käytettäväksi voidaan valmistaa laimennettu leukemianäyte. Esimerkin 14 leukemiapotilaalta peräisin oleva puhdistetun testiseerumin näyte laimennetaan siitä syystä esimerkin 13 normaalilta ihmispotilaalta peräisin olevalla puhdistetulla 25 testinäytteellä, suhteessa 1:1 000. Aiempaa testimenettelyä muunnetaan DNA-L:n vähäisemmän määrän, jonka ennakoidaan olevan läsnä, ottamiseksi huomioon.

Esimerkki 15

30 Leukemiapotilaan näytteellä suoritettu laimennustesti

Esimerkin 13 testimenettelyjä seurataan puhdistetun laimennetun testinäytteen osalta. $0,5 \text{ cm}^3$:iin puhdistettua laimennettua testinäytettä lisätään $0,5 \text{ cm}^3$ vedellistä puskuroidua seosta, joka sisältää $1,0 \text{ nanogrammaa/cm}^3$ esimerkin 35 6A puhdasta, leimattua, kloonattua DEAE-II-DNA:ta, so. yhteensä $0,5 \text{ nanogrammaa}$. Samoin käytetään $0,65 \text{ nanogrammaa}$

entsyymiä. Jäännösnestemääritysmenetelmän käyttö osoittaa, että jäännösneeste sisältää 0,42 nanogrammaa leimattua DNA:ta, mikä on 84 % alkuperäisestä määrästä.

- Sama testi toistetaan esimerkin 13 sekoittamattomalla
- 5 "normaalilla" testiseerumilla. Jäännösnestemääritysmenetelmän käyttö osoittaa, että jäännösneeste sisältää 0,09 nanogrammaa leimattua DNA:ta, mikä on 18 % alkuperäisestä määrästä. Kahden prosenttiosuuden suhde on 4,7:n suhde yhteen.

VI. Tarvikesarjat ja laitteet

- 10 Suuren mittakaavan seulonnan ja testauksen, joiden uskotaan olevan välttämättömät FDA:n vaatimusten tyydyttämiseksi (so. väärrien positiivisten ja negatiivisten tulosten poissaolon osoittaminen "kaksoissokko"-olosuhteissa), mahdollistamiseksi ja testin suorittamisen suhteellisen taitamattoman laboratoriohenkilökunnan toimesta mahdollistamiseksi
- 15 on kehitetty muunneltu menettely, jossa käytetään testitarvikesarjoja ja asiaan omistettua testilaitteistoa.

- Ensinnäkin käytetään standardoitua testimenettelyä, johon kuuluvat etukäteen sekoitetut reagenssit, niin että
- 20 testi voidaan helposti suorittaa. Tarvikesarja koostuu etukäteen valmistetusta leimatusta DNA-materiaalista, missä leima on jokin fluoresoiva väri (mukaan lukien fluoresoivat kompleksoivat aineet), etukäteen valmistetusta entsyymikonjugoidusta matriisista ja etukäteen valmistetusta "puhdistusmatriisista". Toisekseen käytetään sovitettua
- 25 fluoresenssinmittauskonetta, joka on erityisesti sovitettu ja kalibroitu leukemiatestimenettelyä varten. Tämä menettely ei ehkä ole yhtä tarkka kuin yllä kuvattu radiomääritysmenettely, mutta se on paljon helpompi ja paljon halvempi.
- 30 (Radioaktiivista leimausta voidaan käyttää sen sijaan, mutta radiomäärityslaitteisto on paljon kalliimpi kuin alempana kuvattava fluoresenssimäärityslaitteisto.)

A. Tarvikesarjojen valmistus ja käyttö

Esimerkki 16

DNA tarvikesarjaa varten

Puhdasta, kloonattua DEAE-II-DNA:ta valmistetaan

- 5 DNA-L:stä, joka on saatu potilaan, jonka tiedetään kuolleen leukemiaan, seerumista. Esimerkin 6A menetelmää käytetään.

- Seuraavat sekoitetaan 1,0 cm³:iin 0,005 M Tris.HCl-puskuria (pH 7,4); 0,5 mg edellisen kappaleen DNA:ta, leimattuna fluoresoivalla leimalla esimerkin 7A mukaisesti (Radioaktiivinen leimaus, esimerkiksi ³²P:llä tai ³H:lla on vaihtoehtoinen keino, kuten yllä on osoitettu. Esimerkin 7B menettelyä voidaan myös käyttää.) Sekoittamisen jälkeen lisätään suolaliuosta, U.S.P. (kuten esimerkiksi Baxter Laboratories), kokonaistilavuuden saamiseksi 500 cm³:ksi.

- 15 Kuhunkin likimain 1 000:sta 1,0 cm³:n astiasta pipetoidaan 0,5 cm³ (500 nanogrammaa leimattua DNA:ta) edellisen kappaleen seosta. Astiat ("DNA-astiat") suljetaan umpeen ja pannaan jääkaappiin varastointia varten likimain 5°C:seen.

- 20 Yhden DNA-astian sisältö kaadetaan 100 ml:n mittalaasiin. Suolaliuosta lisätään, niin että tilavuus saadaan 50 ml:ksi. Kuhunkin likimain 100:sta 1 cm³:n astiasta pipetoidaan 0,5 ml (5 nanogrammaa DNA:ta) laimennettua DNA-liuosta. Astiat ("1:100-DNA-astiat") suljetaan umpeen ja
- 25 pannaan jääkaappiin varastointia varten likimain 5°C:seen.

Esimerkki 17A

Entsyymi-konjugoitu matriisi tarvikesarjoja varten

- Likimain 10 g esimerkin 4 Polybead Microparticles'eja ("helmiä") pestään kalium-PO₄-puskurissa (pH 7,4). Likimain
- 30 250 ml helmien konsentroitua suspensiota lisätään 750 ml:aan samaa PO₄-puskuria yhdessä 100 ml:n kanssa ECDI:tä (1 g/ml vettä). Seosta inkuboidaan huoneen lämmössä yhden tunnin ajan. Helmet pestään sitten samalla puskurilla ja suspendoidaan uudelleen puskuriin, joka sisältää 4 % glyserolia.

- 35 Likimain 750 ml helmituotteesta pannaan dekantertiin. Puhdistettua R-1 DNA-polymeraasia, kuten on kuvattu

esimerkissä 3, jonka tiedetään määrityksen perusteella sisältävän likimain 8 mikrogrammaa/ml entsyymiä, lisätään, kunnes seos saavuttaa tilavuuden noin 1,0 l. Seosta inkuboidaan likimain yhden tunnin ajan 4°C:ssa. Helmet sisältävät nyt yhteensä likimain 2 mg R-1 DNA-polymeraasient-
5 syymiä.

100 ml 0,2 M glysiiniä (pH 7,6 - 8,0) tai 100 ml naudan seerumialbumiinin liuosta (20 mg/ml) lisätään sitten hitaasti seokseen ja inkubointia suoritetaan 30 minuutin ajan huoneen lämmössä (24°C), ravistellen ajoittain. Helmet pestään sitten kahdesti "varastointipuskurilla" (0,05 M Tris pH 7,8; 0,0004 M beeta-merkaptotetanol; 0,04 M KCl 0,2 mg/ml naudan seerumialbumiini; 0,0001 M MnCl₂ 20 % glyserolia) ja suspendoidaan uudelleen 50 ml:aan
15 varastointipuskuria. Seoksesta määritetään entsyymipitoisuuden menetelmän mukaisesti, jota kuvataan julkaisussa Cancer Research 40:758-70, supra. Entsyymipitoisuus 0,5 ml:ssa seosta ylittää lievästi 650 nanogrammaa. Riittävästi helmituotetta, joka on tuloksena tämän esimerkin kappaleesta 1,
20 lisätään määritettyyn seokseen 0,5 ml:n seosta entsyymipitoisuuden pienentämiseksi 650:ksi nanogrammaksi.

Edellä olevaan seokseen lisätään 5 cm³ 1 mg/ml alkali-denaturoitua lohen siemennesteen DNA:ta (Millipore Corp.) sekoittaen samalla 4°C:ssa. Seosta sekoitetaan hitaasti
25 4°C:ssa 30 minuutin ajan. Materiaali pestään sitten varastointipuskurissa ja varastoidaan sopivassa tilavuudessa varastointipuskuria, niin että tilavuudeksi tulee 1,5 l.

Kuhunkin likimain 3 000:sta 1,0 cm³:n astiasta pannaan 0,5 cm³ edellä olevaa (650 ng) entsyymiä. Astiat ("matriisiastiat") suljetaan umpeen ja pannaan jääkaappiin varastointia varten likimain 5°C:seen.
30

Yhden matriisiastian sisältö kaadetaan 100 ml:n mittalasiin. Lisätään suolaliuosta, niin että tilavuudeksi tulee 50 ml. Kuhunkin likimain 100:sta 1 cm³:n astiasta pipetoidaan 0,5 ml laimennettua liuosta. Astiat ("1:100-
35

matriisiastiat") suljetaan umpeen ja pannaan jääkaappiin varastointia varten likimain 5°C:seen.

Esimerkki 17B

Puhdistusmatriisi tarvikesarjoja varten

- 5 Likimain 10 g esimerkin 3A Polybead Microparticles'eja ("helmiä") pestään kalium- PO_4 -puskurissa (pH 7,4). Likimain 250 ml helmien konsentroitua suspensiota lisätään 750 ml:aan samaa PO_4 -puskuria yhdessä 100 ml:n kanssa ECDI:tä (1 g/ml vettä). Seosta inkuboidaan huoneen lämmössä 1 tunnin ajan.
- 10 Helmet pestään sitten samalla puskurilla ja suspendoidaan uudelleen puskuriin, joka sisältää 4 % glyserolia.

- Likimain 750 ml helmituotteesta pannaan dekantteriin. Likimain 25 mg puhdistettua käänteistä transkriptaasia 250 ml:ssa vettä, kuten on kuvattu esimerkissä 8A, lisätään,
- 15 kunnes seos saavuttaa likimain tilavuuden 1,0 l. Seosta inkuboidaan likimain yhden tunnin ajan 4°C:ssa.

- 100 ml 0,2 M glysiiniä (pH 7,6 - 8,0) tai 100 ml naudan seerumialbumiinin liuosta (20 mg/ml) lisätään sitten hitaasti seokseen ja inkubointia suoritetaan 30 minuutin
- 20 ajan huoneen lämmössä (24°C) sekoittaen ajoittain. Helmet pestään sitten kahdesti "varastointipuskurilla" (0,05 M Tris pH 7,8; 0,0004 M beeta-merkaptotanolli; 0,04 M KCl 0,2 mg/ml naudan seerumialbumiini; 0,0001 M MnCl_2 20 % glyserolia) ja suspendoidaan uudelleen 50 ml:aan varastointipuskuria.
- 25

- Edellä olevaan seokseen lisätään 5 cm³ 1 mg/ml alkali-denaturoitua lohen siemennesteen DNA:ta (Millipore Corp.) sekoittaen samalla 4°C:ssa. Seosta sekoitetaan hitaasti 4°C:ssa 30 minuutin ajan. Materiaali pestään sitten
- 30 varastointipuskurissa ja varastoidaan sopivassa tilavuudessa varastointipuskuria niin, että tilavuudeksi tulee likimain 1,5 l.

- Kuhunkin likimain 3 000:sta 1,0 cm³:n astiasta pannaan 0,5 cm³ edellä olevaa. Astiat ("matriisiastiat") sul-
- 35 jetaan umpeen ja pannaan jääkaappiin varastointia varten likimain 5°C:seen.

Esimerkki 18

Tarvikesarjan käyttö

Valmistetaan testinäyte esimerkin 1 mukaisesti. 2 cm³:n astiaan ("testiastia") pannaan 0,5 cm³ testinäytettä. Sitten
5 avataan yksi esimerkin 17B puhdistusmatriisiastia ja kaadetaan samaan 2 cm³:n testiastiaan. Seosta ravistellaan perusteellisesti 15 minuutin ajan 25°C:ssa (huoneen lämpö). Testiastia sentrifugoidaan (1 000 g) helmien ja pintanesteen erottelemiseksi. (Helmet otetaan talteen ja kierrätetään
10 uudelleen.) Pintaneste otetaan talteen ja pannaan samaan tai eri 2 cm³:n testiastiaan. Yksi esimerkin 16 DNA-astia avataan ja lisätään pintanesteeseen 2 cm³:n testiastiassa. Kaksi liuosta sekoitetaan perusteellisesti kiivaalla ravistelulla.

15 Yksi esimerkin 17A matriisiastia avataan ja kaadetaan 2 cm³:n testiastiaan. Liuokset sekoitetaan perusteellisesti kiivaalla ravistelulla. Testiastia pannaan syrjään 15 minuutiksi huoneen lämmössä (25°C).

Testiastialle tehdään sentrifugointi (1 000 g) helmien ja pintanesteen erottelemiseksi. (Helmet otetaan talteen ja pannaan syrjään uudelleenkierrätystä varten.) Yksi cm³ pintanestettä pannaan 1 cm³:n astiaan ("määritysastia")
20 määritystä varten, mitä kuvataan alempana.

B. Laitteisto

25 Määritys suoritetaan sovitetulla laitteistolla, joka mittaa esimerkin 18 pintanesteen fluoresenssin. Laitteisto esitetään kuviossa 1 perspektiivi- ja leikkauskuvana edullisesta asemasta, joka on hieman testiastian yläpuolella ja muutamia jalkoja pois päin siitä lateraalisesti. Laitteiston
30 kehikko on puinen laatikko B ja näytetään kuviossa 1 laatikosta B vain lattian 2 yläpinta ja seinien 4 ja 6 sisäpinta. Seinät 4 ja 6 ovat ne, jotka ovat kauempana katsojasta; lähemmät seinät on leikattu pois eikä niitä esitetä kuviossa 1. Poistettavissa oleva kansi 8 peittää laatikkoa, kun testiä
35 suoritetaan. Laatikon sisäpinnat on maalattu himmeällä mustalla.

Vertikaalinen aukko 10 on sijoitettu kanteen 8 ja on aukon 10 halkaisija hieman suurempi kuin esimerkin 18 määrittäjäastian 12 halkaisija. Määrittäjäastiassa 12 on sisällä esimerkin 18 testinäytteen pintaneste 14, joka on neste, joka sisältää DNA-L:ää, joka on leimattu fluoresoivalla värillä. Laakea aukko tai syvennys 16 sijaitsee lattiasa 2 suoraan aukon 10 alapuolella, niin että aukkoon 10 pantujen määrittäjäastioiden 12 pohjat lepäävät tukevasti ennaltasäädettyssä paikassa lattialla 2.

10 Aukko 18 sijaitsee seinässä 4, likimain samalla etäisyydellä seinästä 6 kuin ovat aukot 10 ja 12. Ultraviolettilähde (ei näkyvissä) valaisee aukon 18 läpi. Ultraviolettilähde voi edullisesti olla 4 watin ultraviolettilamppu, maksimiemissio 360 nm:n kohdalla (General Electric NF4T4/BL).
15 Siinä voi olla suodatin ultraviolettilähteen ja määrittäjäastian 12 välissä asiaankuulumattomien frekvenssien eliminointiseksi.

Aukko 20 sijaitsee seinässä 6 likimain samalla etäisyydellä seinästä 4 kuin ovat aukot 10 ja 16. Fotodetektio-
20 laite 20A (ei näkyvissä kuviossa 1) sijaitsee aukon 20 takana. Fotodetektio-laite 20A voi olla mikä hyvänsä sopiva optinen mittauslaite. Esimerkiksi se voi edullisesti olla valomonistinputki (esimerkiksi Hamamatsu 1P4 -valomonistinputki). Siinä voi olla suodatin (ei näkyvissä) laitteen 20A
25 ja määrittäjäastian 12 välissä.

Laitteiston käyttämiseksi pannaan esimerkin 18 määrittäjäastia 12 aukon 10 läpi lepäämään aukkoon 16. Ultraviolettilähde aktivoidaan (voimanlähde ja katkaisija eivät näkyvissä) ja ultraviolettivalo ja ultraviolettivalonsäde U
30 kulkee määrittäjäastian 12 nesteen 14 läpi. Ultraviolettivalo aikaansaa sen, että väri fluoresoi ja säteilee näkyvää valoa kaikkiin suuntiin. Yksi sellainen suunta on fluoresenssivalon tien F suunta, joka on suorassa kulmassa ultraviolettisolähteen U nähden ja olennaisesti vapaa ultraviolettisolähteestä tulevasta säteilystä. Fluoresenssivalon F intensiteetti mitataan fotodetektio-laitteella 20A, eikä

ultraviolettisäde U olennaisesti vaikuta laitteen 20A tulostukseen.

Laitteen 20A tulostusta prosessoivat ja sen näyttävät kuviossa 2 esitettävät laitteet. Johdotus vahvistaa ja kalibroi tulostuksen, niin että se voidaan edullisesti näyttää kaupallisesti saatavissa olevan kolminumeroisen digitaalisen volttimittarin ("DVM") näytöllä, joka ulottuu 000:sta 999:ään. Niinpä, jos laitteen 20A tulostusta merkitään x , johdostuksen tulostusta voidaan merkitä $y=ax+b$, missä y on DVM-näytön lukema ja a ja b ovat vakioita, jotka on valittu tekemään $y =$ likimain 200, kun noin 20 % fluoresoivalla värillä leimatusta DNA-L:stä on läsnä esimerkin 13 jäännösnesteessä ja tekemään $y =$ likimain 700, kun noin 70 % fluoresoivalla värillä leimatusta DNA-L:stä on läsnä esimerkkien 14 ja 15 jäännösnesteessä. (Nämä lukemat, tässä järjestyksessä, vastaavat "ei malignisuutta" ja "ilmeinen malignisuus".)

Kuten esitetään kuviossa 2, fotodetektiolaitteen 20A tulostus syötetään esivahvistimeen 22. Esivahvistin voi edullisesti olla mikä hyvänsä suuresta joukosta kaupallisesti saatavissa olevia operaatiovahvistinlastuja, edullisesti jokin kaksinkertainen op-amp-lastu, kuten esimerkiksi ICL 7611 tai ICL 7621. R_a :n, potentiometri 24, säätö kontrolloi vahvistusta ja siten yhtälön $y=ax+b$ vakiota a . (Esivahvistimen 22 ulostulo on R_a/R kertaa sisääntulo.) Esivahvistimen 22 ulostulo syötetään summaimeen 26. Ulostulo R_b :stä, potentiometri 28, syötetään myös summaimeen 26, joka laskee yhteen nämä kaksi sisääntuloa. R_b :n säätö kontrolloi yhtälön $y=ax+b$ vakiota b . Summain voi olla jokin operaatiovahvistin- tai differentiaalivahvistinlastu, edullisesti toinen op-amp jollakin kaksinkertaisella lastulla, kuten esimerkiksi ICL 7621 (esimerkiksi Radio Shack No. RS 276-2331).

Summainen 26 ulostulo edustaa yhtälön $y=ax+b$ tekijää y . Se syötetään DVM-laitteeseen 30, joka edustaa analogi-digitaali-muuntajasta, vahvistimesta ja digitaalinäytöstä.

Sellainen laite voidaan tehdä puolijohdelaitteista, kuten Teledyne Semiconductor -lastusta 7107 ja kolmesta LED- tai LCD-näyttölastusta (kuten Radio Shack No. RS 276-053 tai Radio Shack No. RS 276-075). Tai jotakin kaupallista DVM:ää,
 5 joka sisäisesti sisältää vahvistimen, analogi-digitaali-muuttajan, näytön, pariston ja niin edelleen, voidaan edullisesti käyttää. Tyypillinen sellainen laite on Fluke DVM Model No. 8022B; toinen on Radio Shack No. RS 22-191.

Edellä oleva järjestelmä antaa automaattisesti numeerisen lukeman, joka osoittaa leimatun DNA-L:n likimääräisen prosenttiosuuden jäännösneesteessä, kun järjestelmää käytetään yhdessä esimerkkien 16-18 tarvikesarjojen kanssa. Järjestelmään viitataan tästälähtien "DNA-L-laitteistona".

On välttämätöntä kalibroida DNA-L-laitteisto aika
 15 ajoin, mm. koska reagenssien eri valmistuserillä on erilaiset entsymaattiset tai väriaktiivisuudet.

Esimerkki 19

DNA-L-laitteiston kalibrointi

Yksi esimerkin 16 $1,0 \text{ cm}^3$:n DNA-astia (500 ng DNA:ta
 20 $0,5 \text{ cm}^3$:ssä) merkitään "Astia A" ja avataan. Yksi viidesosa astian A sisällöstä (100 ng DNA:ta $0,1 \text{ cm}^3$:ssä) pipetoidaan toiseen $1,0 \text{ cm}^3$:n astiaan, joka merkitään "Astia B". Suolaliuosta lisätään kumpaankin astiaan niin, että tilavuus saadaan $1,0 \text{ cm}^3$:ksi. Astiasta A pipetoidaan $0,125 \text{ cm}^3$ ja
 25 heitetään pois. Suolaliuosta lisätään astiaan A, niin että tilavuus saadaan $1,0 \text{ cm}^3$:ksi. Astia A sisältää nyt 350 ng DNA:ta $1,0 \text{ cm}^3$:ssä; astia B sisältää nyt 100 ng DNA:ta $1,0 \text{ cm}^3$:ssä.

Astia A pannaan DNA-L-laitteiston aukkojen 10 ja 16
 30 läpi. Potentiometrit R_a ja R_b asetetaan likimääräisiin keskipisteiksi. Virtaa johdetaan laitteistoon, mukaan lukien ultraviolettivalo.

Jos näytön lukema on enemmän tai vähemmän kuin 700, R_a :ta säädetään, kunnes lukema on likimain aiemman lukeman
 35 ja 700:n puolivälissä. Virta kytketään pois, astia A poistetaan ja astia B pannaan sisälle sen paikalle.

Virtaa johdetaan laitteistoon. Jos näytön lukema on enemmän tai vähemmän kuin 200, R_D :tä säädetään, kunnes lukema on likimain aiemman ja 200:n puolivälissä. Virta kytetään pois, astia B poistetaan ja astia A pannaan sisälle sen
5 paikalle.

Edellä olevien kahden kappaleen menettelyjä toistetaan, kunnes asianomaiset lukemat ovat 700 ja 200.

Esimerkki 20

DNA-L-laitteiston käyttö

10 Esimerkin 18 $1,0 \text{ cm}^3$:n määritysastia pannaan kalibroituun DNA-L-laitteistoon. Virtaa johdetaan laitteistoon ja DVM-lukema merkitään muistiin.

Mittarin lukema on likimain 200 normaalille testipotilaalle, 700 tai enemmän henkilölle, jolla on aktiivinen
15 leukemia. Lukemat, jotka ovat 200:n ja 700:n välillä, eivät ole vakuuttavia ja osoittavat toisen testin välttämättömyyden, johtuen testivirheestä tai varhaisen leukemian läsnäolosta.

Jos toinen testi johtaa lukemaan, joka on 200:n ja
20 700:n välillä, esimerkin 21 menettelyihin on indikaatio.

Esimerkki 21

DNA-L-laitteiston käyttö varhaisen leukemian testissä

Esimerkin 18 menettelyä seurataan käyttäen testinäytettä, joka on peräisin potilaalta, jolla epäillään olevan
25 varhainen leukemia, esimerkiksi johtuen lukemasta 200-700 esimerkin 20 viimeisen kappaleen menettelyssä. Kuitenkin käytetään esimerkkien 16 ja 17A 1:100 -DNA- ja -matriisiastioita pikemminkin kuin tavallisia DNA- ja matriisiastioita.

30 DNA-L-laitteisto kalibroidaan uudelleen esimerkin 19 mukaisesti käyttäen A'- ja B'-astioita, joissa käytetään esimerkin 16 1:100 -DNA-astiaa esimerkin 16 DNA-astian sijasta. (Muutoin A' vastaa A:ta ja B' B:tä. Astia A' sisältää 3,5 nanogrammaa DNA:ta $1,0 \text{ cm}^3$:ssä; astia B' sisältää
35 1 nanogramman DNA:ta $1,0 \text{ cm}^3$:ssä.)

Kalibroinnin jälkeen seurataan esimerkin 20 menet-
telyä. Lukema, joka on likimain 200, osoittaa DNA-L:n pois-
saolon potilaan testinäytteestä. Lukema, joka on 500 tai
enemmän, osoittaa DNA-L:n läsnäolon potilaan testinäyttees-
5 sä ja viittaa leukemian mahdollisuuteen, täten osoittaen
tarpeen huolitellumpaan testaukseen ehdolle tulleen diagnoo-
sin varmistamiseksi.

Yleisiä loppuhuomautuksia

Edellä olevat menettelyt tarjoavat kokonaan uuden
10 diagnostisen menetelmän, joka on tähän asti tuntematon lää-
ketieteelle. Uskotaan olevan tärkeää, että näissä menette-
lyissä käytetään puhtaita, laboratoriossa tuotettuja reagens-
seja (kuten esimerkiksi kloonattua DNA:ta) pikemmin kuin
(lukuun ottamatta entsyymiä) aineita, jotka täytyy saada
15 luovuttajista ja sitten puhdistaa. Yllä kuvatuissa menette-
lyissä käytetään hyväksi DNA-L:ää (DNA:ita, joihin vii-
tataan termein DNA-1 ja DNA-2), mutta keksijä uskoo, että
muita DNA:ita, jotka liittyvät muihin malignisuuksiin (so.
muihin kuin lymfoidisen järjestelmän malignisuuteen), tul-
20 laan eristämään ja havaitsemaan käyttökelpoisiksi testeissä,
jotka ovat yllä kuvattujen testien vähäisiä muunnelmia ja
jotka tuottavat samantyyppisen tuloksen samalla tavalla.

Sitä paitsi voidaan käyttää hyväksi muita matriise-
ja sopivan entsyymikonjugoidun matriisin valmistamiseksi.
25 Muita hartseja voidaan käyttää sekä samoin myös polystyree-
ni- ja lateksihelmiä, joihin entsyymi voidaan kemiallisesti
sitaa. Esimerkkejä viimeksi mainitusta ovat hydrofiiliset
lateksipallot ("Covaspheres[®] MX tai FX", Covalent Technology
Corp., Ann Arbor, Michigan). Keksintöä voidaan harjoittaa
30 minkä hyvänsä olennaisesti liukenemattoman materiaalin avul-
la, johon entsyymi voidaan sitoa, sillä mitä hyvänsä sel-
laista materiaalia voidaan käyttää hyväksi entsyymi-konju-
goidun matriisin valmistukseen. Muita entsyymejä, joilla on
selektiivinen affiniteetti asiaankuuluvaan DNA:han (so.
35 jotka kykenevät selektiivisesti sitoutumaan siihen), voi-
daan käyttää hyväksi. Tästä johtuen tässä tekstissä

käytetty termi "entsyymi-konjugoitu matriisi" on tarkoitettu sisältämään minkä hyvänsä sellaisen matriisiaineen, johon mikä hyvänsä entsyymi voidaan kiinnittää, joka tulee selektiivisesti sitoutumaan tässä tekstissä kuvattuihin DNA:ihin
5 (tai jota nämä selektiivisesti inhiboivat tai jolla "on selektiivinen affiniteetti" näihin).

Vaikkakin keksintöä on kuvattu ensisijaisesti yhteydessä sen yhteen spesifiseen ja edulliseen suoritusmuotoon, ymmärretään, että siitä voidaan tehdä lisämuunnelmia
10 poikkeamatta sen hengestä ja suojapiiristä. Muutamia sellaisia muunnelmia kuvataan yllä. Tämä hakemus on tarkoitettu kattamaan keksinnön kaikki variaatiot, käytöt tai sovellutukset, jotka seuraavat, yleisesti, keksinnön periaatteita ja joihin kuuluvat mukaan sellaiset poikkeamat tästä julkaisusta,
15 jotka kuuluvat tunnettuun tai tavanomaiseen käytäntöön alalla, johon keksintö kuuluu tai jotka ovat ilmeisiä alan asiantuntijoille.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä malignisuuden läsnäolon määrittämiseksi ihmis- tai eläinkehossa, t u n n e t t u siitä, että

5 (1) testinäyte valmistetaan kehon nesteen näytteenä, joka on kerätty testipotilaasta,

(2) testinäyte sekoitetaan valmisteeseen, joka sisältää R-1 DNA-polymeraasia selektiivisesti inhiboivaa leimattua DNA-L, DNA-1 ja/tai DNA-2,

10 (3) seos viedään R-1 DNA-polymeraasientsyymi-konjugoituun matriisiin, joka matriisi edullisesti on agarosi-pohjainen aine tai mikropartikkeleista koostuva aine, ja

(4) suoritetaan määrittäminen leimatun DNA:n osuuden määrittämiseksi, joka on sitoutunut entsyymi-konjugoituun matriisiin tai joka ei ole sitoutunut siihen.

15 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että leimattu DNA on DNA-L ja malignisuus on jokin leukemia.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymikonjugoitu matriisi esikäsittellään, ennen vaihetta (3), ainakin yhdellä DNA:lla, joka on muu kuin DNA-L, DNA-1 tai DNA-2.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA on leimattu jollakin fluoresoivalla väriaineella.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA on leimattu 32P:llä.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisävaiheen ensimmäisen ja toisen vaiheen välillä, jossa lisävaiheessa testinäyte puhdistetaan ulkopuolisesta DNA:sta käyttäen puhdistusmatriisia.

7. Menetelmä R-1 DNA-polymeraasientsyymi-konjugoidun matriisin valmistamiseksi, käytettäväksi patenttivaatimuksen 1 mukaisessa menetelmässä, t u n n e t t u siitä, että

valikoidaan ensimmäinen DNA, joka on selektiivisesti R-1 DNA-polymeraasia inhiboiva DNA-L, DNA-1 tai DNA-2,

valikoidaan R-1 DNA-polymeraasientsyymi, jonka kanssa ensimmäisellä DNA:lla on selektiivinen affiniteetti,

5 valikoidaan olennaisesti liukenematon matriisimateriaali, joka on edullisesti agaroosipohjainen aine tai mikropartikkeleista koostuva aine ja johon entsyymi voi sitoutua,

valmistetaan R-1 DNA-polymeraasientsyymi-konjugoitu matriisi sekoittamalla matriisi R-1 DNA-polymeraasiliuokseen, ja

esikäsitellään matriisi ainakin yhdellä DNA:lla, joka on muu kuin ensimmäinen DNA.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että malignisuus on jokin leukemia ja ensimmäinen DNA on DNA-L.

9. Testipakkaus, käytettäväksi patenttivaatimuksen 1 mukaisen menetelmän suorittamiseen, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

20 ensimmäisen säiliön, joka sisältää etukäteen mitatun määrän leimattua DNA-L:ää, ja

toisen säiliön, joka sisältää patenttivaatimuksen 12 mukaista entsyymi-konjugoitua matriisia, johon on sitoutuneena etukäteen mitattu määrä R-1 DNA-polymeraasia.

25 10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen testipakkaus, t u n n e t t u siitä, että DNA-L on leimattu fluoresoivalla väriaineella.

11. Patenttivaatimuksen 9 mukainen testipakkaus, t u n n e t t u siitä, että DNA-L-molekyylien lukumäärä ensimmäisessä säiliössä on vähän suurempi kuin toisessa säiliössä olevan entsyymin aktiivisten entsyymikohtien lukumäärä.

30 12. Patenttivaatimuksen 9 mukainen testipakkaus, t u n n e t t u siitä, että siinä on kolmas säiliö, joka
35 sisältää puhdistusmatriisia.

13. Laitteisto, käytettäväksi patenttivaatimuksen
1 mukaisen menetelmän suorittamiseen, ja johon kuuluu
fluorometrinen laite, joka käsittää

valaistusvälineet,

5 välineet fluoresenssin toteamiseksi, ja

10 välineet havaitun fluoresenssin lukemiseksi ja tulos-
tamiseksi, t u n n e t t u siitä, että laitteeseen on
asennettu ainakin osittain läpinäkyvä säiliö, joka sisältää
fluoresoivalla väriaineella leimatun DNA-L:n liuosta, ja
joka on asennettu niin, että se ainakin osittain valais-
taan valaistusvälineillä ja niin, että välineet fluoresens-
sin toteamiseksi vastaanottavat valon, joka siirtyy valais-
tusvälineistä säiliön läpi.

Patentkrav

1. Förfarande för bestämning av närvaron av malignitet i mänsko- eller djurkroppen, k ä n n e t e c k -
5 n a t därav, att man
- (1) framställer ett testprov av ett kroppsvätskeprov som tagits av testpatienten,
- (2) blandar testprovet med ett preparat, vilket innehåller märkt DNA-L, DNA-1 och/eller DNA-2, som selektivt inhiberar R-1-DNA-polymeras,
10
- (3) inför den nämnda blandningen i en R-1-polymeras enzymkonjugerad matris, vilken matris fördelaktigt är ett agarosbaserat ämne eller ett av mikropartiklar bestående ämne, och
- 15 (4) utför en bestämning för att fastställa andelen märkt DNA, som bundits vid den enzymkonjugerade matrisen eller som inte bundits vid den.
2. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det märkta DNA:et är DNA-L och
20 att maligniteten är någon form av leukemi.
3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den enzymkonjugerade matrisen förbehandlas före steget (3), med åtminstone ett annat DNA, som inte är DNA-L, DNA-1 eller DNA-2.
- 25 4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att DNA:et märkts med någon fluorescerande färg.
5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att DNA:et märkts med 32P.
- 30 6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det mellan det första steget och det andra steget omfattar ett ytterligare steg, vari testprovet renas från utomstående DNA genom att använda en reningsmatris.
- 35 7. Förfarande för framställning av en R-1 DNA-polymeras enzymkonjugerad matris att användas vid förfarandet vid patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

väljer ett första DNA, vilket är DNA-L, DNA-1 eller DNA-2, som selektivt inhiberar R-1 DNA-polymeras, väljer ett R-1-DNA-polymeras enzym, till vilket det första DNA:et har selektiv affinitet,

5 väljer ett väsentligen olösligt matrismaterial, vilket fördelaktigt är ett agarosbaserad ämne eller ett av mikropartiklar bestående ämne och till vilket det nämnda enzymet kan bindas,

10 framställer en R-1-DNA-polymeras enzymkonjugerad matris genom att blanda matrisen i en R-1 DNA-polymeras-lösning, och

förbehandlar matrisen med åtminstone ett annat DNA än det första DNA:et.

15 8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e - t e c k n a t därav, att maligniteten är någon form av leukemi och att det första DNA:et är DNA-L.

9. Testförpackning att användas vid utförande av förfarandet enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a d därav, att den omfattar

20 en första behållare, vilken innehåller en i förväg utmätt mängd märkt DNA-L, och

en andra behållare, vilken innehåller en enzymkonjugerad matris enligt patentkravet 12, till vilken bundits en i förväg utmätt mängd R-1-DNA-polymeras.

25 10. Testförpackning enligt patentkravet 1, k ä n - n e t e c k n a d därav, att DNA-L:et märkts med en fluorescerande färg.

11. Testförpackning enligt patentkravet 9, k ä n n e - t e c k n a d därav, att antalet DNA-L-molekyler i den första behållaren är något större än antalet aktiva enzymplatser i enzymet i den andra behållaren.

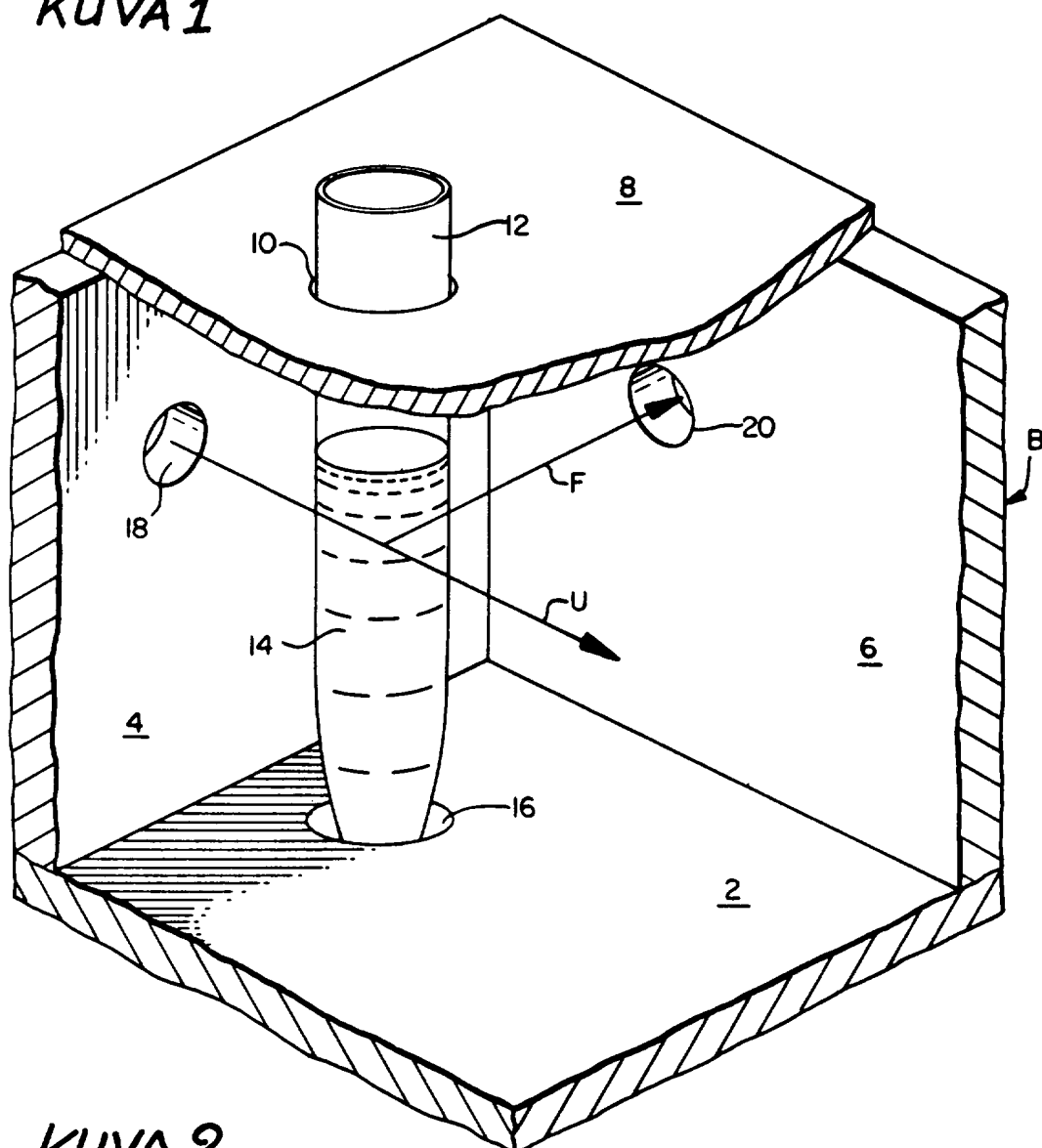
30 12. Testförpackning enligt patentkravet 9, k ä n - n e t e c k n a d därav, att den har en tredje behållare, vilken innehåller en reningsmatris.

13. Apparatur att användas vid utförande av för-
farandet enligt patentkravet 1, och till vilken hör fluori-
metrisk apparat, som omfattar
- 5 belysningsanordningar,
 anordningar för detektering av fluorescensen,
 och anordningar för avläsning och registrering
av den detekterade fluorescensen,
- k ä n n e t e c k n a d därav, att man i apparaturen in-
stallerat en åtminstone delvis genomskinlig behållare,
- 10 vilken innehåller en läsning av DNA-L, som märkst med en
fluorescerande färg, och som installerats så att den åt-
minstone delvis belyses av belysningsanordningarna, och så,
att de anordningar som detekterar fluorescensen mottar det
ljus, som förflyttar sig från belysningsanordningarna genom
- 15 behållaren.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Cancer Research, vol. 40, 1980, p. 758-770.

KUVA 1



KUVA 2

