

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 941016 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **941016**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12Q 1/68
C12N 15/10

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **04.09.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **03.03.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **03.05.1994**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **04.09.1992 PCT/JP1992/001135**
Internationell ansökan - International
application

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

04.09.1991 US 755462 09.07.1992 US 910791

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Daikin Industries Ltd., Umeda Center Building, 4-12, Nakazaki- nishi 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530, JAPAN, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Sena, Elissa P., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Calhoun, Cornelia J., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Zarling, David A., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Kaksois-D-silmukan muodostumisen diagnostiset sovellutukset

Diagnostiska tillämpningar av bildning av dubbel-D-slingan

Kaksois-D-silmukan muodostumisen diagnostiset sovellutukset - Diagnostika tillämpningar av dubbel D-ögleformation

5 Tämä hakemus on osittainen jatko samanaikaisesti haetulle, kanssaomistetulle U.S. hakemukselle sarjanumero 07/910 791, jätetty 9. heinäkuuta 1992, mikä on osittainen jatko samanaikaisesti haetulle, kanssaomistetulle U.S. hakemukselle sarjanumero 07/755 462, jätetty 4. syyskuuta
10 1992, mikä on osittainen jatko samanaikaisesti haetulle, kanssaomistetulle U.S. hakemukselle sarjanumero 07/520 321, jätetty 7. toukokuuta 1990.

15 Tämä keksintö koskee RecA-katalysoitujen stabiilien kaksois-D-silmukkarakenteiden muodostumista, joita voidaan käyttää lukuisissa diagnostisissa menetelmissä, kahden koettimen sieoaaus/määrittäminen systeemit, RecA:n helpottama DNA-amplifikaatio ja in situ hybridisaatio mu-
kaanluettuina.

20

Ausubel, F.M., et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., Media PA.

Bryant, F.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 297 (1985).

25

Cassuto, E., et al., Mol. Ge. Genet. 208: 10 (1987).

Chen, T.R., Cytogenet. Cell. Genet. 48:19-24 (1988).

Cheng, S., et al., J. Biol. Chem. 263: 15110 (1988).

Cheng, S., et al., Photochemical Probes in Biochemistry (P.E. Nielsen, toim.) sivut 169-177 (1989).

30

Corey, D.R., et al., Science 238: 1401 (1987).

Cox, M.M. et al., Ann. Rev. Biochem. 56: 229-262 (1987).

Davis, L.G., et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Publishing Co. (1986).

35

Dreyer, G.B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 82: 968 (1985).

Eisen, J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7481 (1988).

Fey, M.F., Schweiz. Med. Wochenschr. 120(20): 731-737 (1990).

Fishel, R.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3683 (1988).

5 Fugisawa, H., et al., Nucleic Acids Res. 13: 7473 (1985).

Ganea, D., et al., Mol. Cell Biol. 7: 3124 (1987).

Gonda, D.K., et al., Cell 34:647-654 (1983).

Griffith, J., et al., Biochem. 24: 158 (1985).

Halbrook, J., et al., J. Biol. Chem. 264: 21403 (1989).

10 Harlow, E., et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988).

Haase, A.T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 4971 (1990).

Hsieh, P., et al., Genes Dev. 4: 1951 (1990).

15 Hsieh, P., et al., J. Biol. Chem. 264: 5089 (1989).

Hsieh, P., et al., Cell 44: 885 (1986).

Keene, K. et al., Nucleic Acid Res. 12: 3057 (1984).

Kemp, D.J., et al., PCT International Application, International Publication No. WO 90/06374 (Application No.

20 PCT/AU89/00526), 14 June 1990.

Kimeic, E.B., Cell 44: 545 (1986).

Kimeic, E.B., Cold Spring Harbor Symp. 48: 675 (1984).

Kingston, H.M., B.M.J. 299 (6690): 34-37 (1989).

Kolodner, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84: 5560 (1987).

Leahy et al., J. Biol. Chem. 261: 6954 (1986).

Lowenhaupt, K., et al., J. Biol. Chem. 264: 20568 (1989).

Madiraju, M.V.V.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6592 (1988).

30 Maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

McCarthy, J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5854 (1988).

McEntee, K., et al., J. Biol. Chem. 256: 8835 (1981).

35 Moore, S.P., et al., J. Biol. Chem. 19: 11108 (1990).

Morriscal, S.W., et al., Biochem. 29: 837 (1990).

Moser, H.E., et al., Science 238: 645 (1987).

Mullis, K.B., U.S. Patent No. 4 683 202, issued 28 July 1987.

Mullis, K.B., et al., U.S. Patent No. 4 683 195, issued 28 July 1987.

5 Nelson, M., et al., Nucl. Acids Res. 17: 389 (1989).

Olson, M., et al., Science 245: 1434-1435 (1989).

Radding, C.M., Ann. Rev. Genet. 16: 405 (1982) 25: 1990.

Rigas, B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 9591 (1986).

10 Roca, A.I., et al., Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 25: 415 (1990).

Saiki, R.K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6230 (1989).

15 Sambrook, J., et al., Teoksessa Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol. 2 (1989).

Scharf, S.J., et al., Science 233: 1076-1078 (1986).

Shibata, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 1638 (1979).

20 Shibata, T., et al., J. Biol. Chem. 256: 7557 (1981).

Sluka, J.P., et al., Science 238: 1129 (1987).

Strickler, J.G., et al., Am. J. Clin. Pathol. 93(4 Suppl. 1): S44-8 (1990).

25 Sugino, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3683 (1988).

Trask, B., et al., Hum. Genet. 78: 251 (1988).

van Dekken, H., et al., Cytometry 11: 153 (1990).

van Dekken, H., et al., Cytometry 11: 579 (1990).

Wachsmuth, K., Rev. Infect. Dis. 8(5): 682-692 (1986).

30 Weier, H-U.G., et al., J. Histochem. and Cytochem. 38: 421 (1990).

Woodbury, C.P., et al., Biochemistry 22(20): 4730-4737 (1983).

35 Zlvin, R.A., et al., European Patent Application No. 883-07793.5, Publication No. 0 305 145, 1 March 1989.

RecA+ proteiini on (villityyppi) 37 842 daltonin proteiini-

ni, joka löydettiin Escherichia coli bakteerista, mikä on tärkeää homologista DNA-rekombinaatiota varten. Suurin osa sen biokemian ja entsymologian tiedosta on peräisin in vitro tutkimuksista käyttämällä puhdistettua RecA+ proteiinia. Lukuisat in vitro tutkimukset ovat osoittaneet, että RecA+ proteiini liittyy läheisesti homologisten DNA-sekvenssien pariutumisreaktioon, mikä lopulta johtaa homologisiin rekombinaatiotapahtumiin (Radding; katso Cox et al. tai Roca et al. viimeaikaisia RecA+ proteiinin ominaisuuksia). Tämä pariutumisreaktio tekee RecA+ proteiinin erittäin hyödylliseksi DNA:n diagnostisiin sovellutuksiin.

ATP:n läsnäollessa RecA+ proteiini katalysoi juosteen vaihdon lukuisten substraattien välillä, merkityksellistä ollen yksi- ja kaksijuosteiset DNA:t DNA-koetinsovellutuksiin. RecA-proteiinin peittämät yksijuosteiset DNA-koettimet ovat vuorovaikutuksessa kaksijuosteisen ("natiivin") kohdesekvenssin homologisen osan kanssa ensin muodostaen rekombinaatiovälituotteen, jossa on hybridisoituneita, osittain yhteenliittyneitä molekyylejä, joita kutsutaan (yksittäis) D-silmukoiksi (tai joissakin tapauksissa kolmejuosteisiksi rakenteiksi) (Shibata et al., 1979). Tätä seuraa haarautunut kulkeminen ja täydellisten hybridimolekyylien muodostuminen alkuperäisten yksi- ja kaksijuosteisten DNA:n välille riippuen niiden homologian määrästä.

Lyhyet korvaussilmukat tai kolmijuosteiset D-silmukkarakenteet lineaarisissa kohteissa ovat tavallisesti epästabiileja deproteinaation jälkeen. RecA-proteiinin on osoitettu muodostavan stabiileja komplekseja, joissa on lyhyet oligonukleotidit, 9-20 bp (tai suurempi) pituudeltaan ATPγS:n ja ylimäärän RecA-proteiinia läsnäollessa (Leahy et al.). Kun käytetään lineaarisia kaksijuosteisia kohteita, näyttää stabiili koetinkohdepariutuminen RecA:n poistamisen jälkeen vaativan (i) vähintään 38-56 bp homo-

logisen alueen ja (ii) koetinkohteen homologian sijainti lineaarisen dupleksin päässä (Hsieh et al. 1990; Gonda et al.).

5 Rigas et al. ilmoittivat, että yksijuosteinen 43-meeri voisi muodostaa yksittäisen D-silmukkakompleksin, joka on stabiili deproteinoisoinnille, kun käytettiin kaksijuosteista, negatiivisesti superkoil sirkulaarista plasmidi-DNA:ta kohteena.

10

Kun käytetään kaksijuosteista negatiivisesti superkoil sirkulaarista kohde-DNA:ta, voidaan myös RecA-peitetyt yksijuosteiset oligonukleotidikoettimet stabiloida psoraaleenilla ristiinsitomisella ennen RecA-proteiinin poistoa: koetinkohde yksittäiset D-silmukkatuotteet voidaan saada, jos oligot ovat vähintään 30-meeriä kooltaan (Cheng et al., 1989). Jotta saadaan psoraalilla ristiinsitomisella stabiloituja yksittäisiä D-silmukka koetinkohdekomplekseja, kun kaksijuosteisia lineaarisia DNA-

15 duplekseja käytetään kohde-DNA:na, täytyy koettimien olla vähintään 80-107-meeriä kooltaan (Cheng et al., 1988): näillä reaktioilla on hyvin alhainen tehokkuus verrattuna samanlaisiin reaktioihin negatiivisten superkoil sirkulaaristen kohteiden kanssa.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

Kokeet, jotka on suoritettu tämän keksinnön vahvistukseksi, ovat osoittaneet että koetin:kohde-DNA-komplekseja, jotka ovat stabiileja deproteinoisoinnille, voidaan synnyttää RecA-proteiini-katalysoiduissa reaktioissa edellyttäen että dupleksikoettimia, joissa on sekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia koetinjuosteiden välillä, käytetään hybridisaatioreaktioissa. Tämä havainto tarjoaa lukuisia mahdollisuuksia diagnostiselle sovellutukselle, joka käyttää tätä stabiilia RecA-proteiini-katalysoitua koetin:kohde hybridisaatiodupleksia.

Tähän menetelmään kuuluu diagnostinen menetelmä havaita

lineaarinen dupleksi DNA-analyytti, jolla on ensimmäinen ja toinen juoste, missä analytyillä on ensimmäinen sisäinen DNA-kohdesekvenssi. Menetelmä opettaa tarjoamaan kahden DNA-koettimen sarjan, joissa jokaisessa on sekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia ensimmäisen kohdesekvenssijuosteen kanssa tai toisen kohdesekvenssijuosteen kanssa, missä näillä koettimilla on myös alue, jossa ne menevät komplementaarisesti toistensa päälle. Molemmat koetinjuosteet päällystetään sitten RecA-proteiinilla RecA-proteiini-peittämisreaktiossa. RecA-peitetyt koettimet yhdistetään lineaarisen dupleksi-DNA:n kanssa, missä on kohdesekvenssi, olosuhteissa, jotka tuottavat koetin:kohdekompleksin. Tässä koetin:kohde-kompleksissa on sekä koetinjuosteet että molemmat lineaarisen dupleksianalyytin juosteet. Koetin:kohde-kompleksi on stabiili deproteinoimiselle, vaikka tämän keksinnön menetelmässä ei välttämättä deproteinoisoida. Koetin-DNA:n läsnäolo koetin:kohdekompleksissa määritetään sitten.

Eräässä tämän keksinnön suoritusmuodossa RecA-proteiini on Escherichia colin villityypin RecA-proteiini. Vaihtoehtoisesti RecA-proteiini voi olla Escherichia colin mutantti recA-803-proteiini tai RecA-kaltainen proteiini lukuisista lähteistä.

Tämän keksinnön recA-proteiinipeittämisreaktiot voidaan suorittaa käyttämällä lukuisia kofaktoreita, ATP γ S, rATP (yksin ja regenerointisysteemin läsnäoloessa), dATP, GTP γ S ja ATP γ A:n ja rATP:n ja ATP γ S:n ja ADP:n seokset mukaanluettuina.

Eräässä tämän keksinnön suoritusmuodossa koetinjuosteiden välinen komplementaarinen päällekkäisyyden alue on vähintään 78 emäsparia ja vähemmän kuin noin 500 emäsparia. Koetinjuosteissa voi myös olla DNA:n pääteterminaalin laajentuma, joka ei ole komplementaarinen kummankaan kohdejuosteen kanssa. Kun molemmissa juosteissa on sellainen

pääteterminaalin laajentuma, voivat nämä laajentumat olla komplementaarisia toistensa kanssa.

Eräs tapa, jolla saadaan aikaan tämän keksinnön menetelmän määrittäminen, on koetin:kohde-kompleksin deproteiniointi, jonka jälkeen on koetin:kohde-kompleksin elektroforeettinen erottaminen vapaasta koettimesta. Koetin:kohde-kompleksi voidaan deproteinisoida lukuisilla menetelmillä, SDS:llä tai proteinaasi K:lla käsittely mukaanluettuna, samoin standardit kemialliset deproteiniointimenetelmät, kuten fenoli-perusteiset menetelmät. Vaihtoehtoisesti, määrittämiseen saattaa sisältyä sieppaussysteemi, joka vangitsee koetin:kohde-kompleksin, missä ensimmäinen koetinjuoste leimataan sieppausosalla ja toinen koetinjuoste leimataan määrittämisosalla. Yksi koetinjuoste voi olla esimerkiksi biotiinileimattu ja toinen digoksigeniini-leimattu. Koetin:kohde-kompleksi voidaan sitten siepata/määrittää käyttämällä kiinteätä kannattaja-streptavidiinia (tai avidiinia)/leimattua anti-digoksigeniinia tai kiinteätä kannattaja-anti-digoksigeniini vasta-aine/leimattua streptavidiinia (tai avidiinia). Erilaisessa suoritusmuodossa ensimmäisessä koetinjuosteessa on sieppausosa ja toisessa koetinjuosteessa on radioaktiivinen leima käytettäväksi määrittämiseen.

Koetinjuosteet voidaan leimata sieppausta varten lukuisilla tavoilla, esimerkiksi käyttämällä biotiinia tai digoksigeniinia kiinnittyneenä koettimeen ja streptavidiini (avidini) tai anti-digoksigeniini vasta-ainetta vastaavasti, sieppaamiseen. Koetinjuosteet voidaan leimata myös määrittämistä varten käyttämällä lukuisia erilaisia osia mukaanluettuina: radioaktiivinen, biotiini, digoksigeniini. Radioaktiiviset leimat voidaan tunnistaa esimerkiksi autoradiografialla tai tuikelaskennalla. Biotiinin tai digoksigeniinin läsnäolo voidaan määrittää streptavidiinilla tai anti-digoksigeniini-vasta-aineella, vastaavasti, missä streptavidiini (tai avidini) tai an-

ti-digoksigeniini leimataan radioaktiivisesti, entsyymi-leimataan (esim. alkaalinen fosfataasi, peroksidaasi, beta-galaktosidaasi tai glukosioksidaasi) tai fluorikromileimataan (esim. fluoreskeiini, R-fykoerytriini tai rodoamiini). Koetinjuosteiden määrittäminen koetin:kohde-

5 kompleksissa voidaan saada aikaan myös DNA-polymeraasin helpottamalla alukkeen laajenemisella jokaisen koetinjuosteen 3'-päistä, missä alukkeen laajennus suoritetaan kaikkien neljän dNTP:n läsnäollessa ja yhdessä tai useam-

10 massa dNTP:ssä on määritettävä osa.

Tämän keksinnön menetelmään sisältyy lisäksi tarjota kahden DNA-koettimen toinen sarja, joissa on ensimmäinen ja toinen juoste, jotka ovat komplementaarisia toisen dup-

15 leksin kohdesekvenssin kanssa, missä koettimen ensimmäisessä juosteessa on sekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia toisen kohdesekvenssin yhden juosteen kanssa ja koettimen toisessa juosteessa on sekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia toisen kohdesekvenssin yhden juosteen

20 kanssa, missä (i) näillä koettimilla on myös alue, missä komplementaarisesti menevät toistensa kanssa päällekkäin ja (ii) koettimien toinen sarja ei hybridisoidu koettimen ensimmäisen sarjan kanssa. Kaksi koetinsarjaa on peitetty RecA-proteiinilla RecA-proteiini-peittämisreaktiossa. RecA-peitetyt koetinsarjat on yhdistetty lineaarisen

25 duplexi-DNA:n kanssa, missä on kaksi kohdesekvenssiä. Yhdistäminen tehdään olosuhteissa, jotka tuottavat koetin:kohde-komplekseja, joissa on kaikki neljä koetinjuostetta. Tuloksena oleva koetin:kohde-kompleksi on stabiili deproteinoisoinnille. Koetin-DNA:n läsnäolo määritetään

30 sitten koetin:kohde-komplekseissa.

Menetelmää, johon sisältyy kaksi koetinsarjaa, voidaan käyttää monessa samalla lailla kuin edellä kuvattiin yksittäiselle koetinsarjalle. Ensimmäinen koetinsarja voidaan esimerkiksi leimata sieppausosalla ja toinen koetinsarja leimata määrittämisosalla.

35

Voidaan käyttää myös kaksijuosteista koetin:duplexi-kohdekomplekseja, joissa on kaksi koetinsarjaa RecA-proteiinin helpottamassa DNA-amplifikaatiomenetelmässä. Kaksi koetinsarjaa voidaan hybridisoida niiden duplexeihin kohdesekvensseihin ATPγS:n [tai rATP (sopivan ATP-regeneraattiosysteemin kanssa tai ilman), dATP:n ja ATPγS:n ja ADP:n seoksien läsnäollessa] ja annetaan reagoida reaktioseoksessa, jossa on myös neljä dNTP:tä, RecA-proteiini ja DNA-polymeraasi. Tämä reaktio suoritetaan alle lämpötilan, joka vaaditaan kahden kohdejuosteen termiseen hajoamiseen ja jatketaan kunnes on saavutettu toivottu kohdesekvenssin amplifikaation aste. Amplifikaatioreaktioihin voi lisäksi kuulua toistuvia (i) DNA-polymeraasin ja (ii) RecA-proteiini-peitettyjen koettimien lisäyksiä amplifikaatioreaktioiden aikana. Muita amplifikaation lähestymistapoja, joita voidaan soveltaa tähän keksintöön, on esitetty samanaikaisesti haetussa U.S. hakemuksessa nro. 07/520 321, jätetty 7. toukokuuta 1990. Jokaisessa koetinsarjassa yhden juosteen 3'-pää on sisäinen alueeseen, joka kuvattiin kahdella alukesarjalla: nämä päät ovat tarpeellisia amplifikaatioreaktiolle. Kuitenkin jokaisen alukeparin vastakkaiset 3'-pää, ulospäin alueesta, joka on kuvattu kahdella alukesarjalla, voidaan blokata inhiboimaan laajennustuotteiden muodostumista näistä päistä. Tätä amplifikaatiomenetelmää voidaan käyttää myös määritysmenetelmänä, missä koettimen määrittäminen koetin:kohde-kompleksissa sadaan aikaan DNA-polymeraasin helpottamalla alukkeen laajenemisella jokaisen koetinjuosteen 3'-päistä, missä alukkeen laajenemisreaktio suoritetaan kaikkien neljän dNTP:n läsnäollessa ja yhdessä tai useammassa dNTP:ssä on havaittava osa.

Kaksijuosteisia koetin:dupleksikohdekomplekseja voidaan myös käyttää blokkamaan minkä tahansa kohteena olevan restriktiokohdan pilkkominen. BlokkauSPilkkominen voidaan saada aikaiseksi lukuisilla tavoilla: (i) muodostetaan

koetin:kohdekompleksi ja käsitellään restriktioentsyymillä ennen kompleksin deproteinisointia; (ii) käytetään metyloituja tai ei-metyloituja koettimia, riippuen valitun entsyymin herkkyydestä läsnäoleviin metyyliiryhmiin; ja (iii) viedään huonosti yhteen sopivat sekvenssit koettimen jokaiseen juosteeseen, mikä eliminoi restriktiokohdan koettimen hybridisoituessa.

Kaksijuosteisia koetin:dupleksikohdekomplekseja voidaan myös käyttää synnyttämään kaksijuosteisen kohde-DNA:n kohde-spesifinen pilkkominen. Kaksijuosteista koetinta voidaan modifioida osilla, jotka kykenevät pilkkomaan kohdedupleksin jokaisen juosteen: tämä koettimen modifiointi voi tapahtua ennen deproteinisointia tai sen jälkeen riippuen pilkkovan osan luonteesta. Esimerkkejä sellaisista osista ovat rauta FeII (rauta/EDTA-helpottavalle pilkkomiselle), ei-spesifinen fosfodiesteri- ja restriktioendonukleasit. Kummassakin tapauksessa pilkkomisspesifisyyden antaa kohdesekvenssi, joka on rajattu kaksijuosteiseen oligonukleotidikoettimeen.

Sekä restriktiokohdan suojausmenetelmä että kohdennettu pilkkomismenetelmä ovat hyödyllisiä restriktiofragmentin pituuden polymorfian analyysissä.

Eräaseen toiseen tämän keksinnön suoritusmuotoon sisältyy menetelmä eristää lineaarinen duplexi DNA-analyytti, jossa on ensimmäinen ja toinen juoste, jossa on ensimmäinen sisäinen DNA-kohdesekvenssi, missä duplexi DNA-analyytti on läsnä nukleinihappomolekyylien seoksessa. Tässä menetelmässä tarjotaan kahden DNA-koettimen sarja, joissa on ensimmäinen ja toinen juoste, missä ensimmäisessä ja toisessa koetinjuosteessa (i) on ensimmäisen ja toisen kohdesekvenssi-juosteiden komplementaariset sekvenssit ja (ii) missä näissä komplementaarisisissa sekvensseissä on myös koetinjuosteiden komplementaarinen päällekkäisyys. Koettimet päällystetään sitten RecA-prote-

iinilla. Päälystetyt koettimet yhdistetään sitten lineaariseen dupleksi DNA:han, jossa on kohdesekvenssi, olosuhteissa, jotka tuottavat koetin:kohdekompleksin, jossa on koetinjuosteet ja molemmat kohdejuosteet: tuloksena

5 oleva koetin:kohdekompleksi on stabiili deproteïnisaatiolle. Koetin:kohdekompleksi erotetaan nukleinihappomolekyylien seoksesta. Sitten erotetaan dupleksi DNA-analyytti, jossa on kohdesekvenssi.

10 Tässä menetelmässä kompleksi voidaan erottaa nukleinihapposeoksesta käyttämällä esimerkiksi koettimia, joissa on biotiiniosia, jotka streptavidini tai avidini sieppavat. Streptavidini tai avidini voidaan sitoa kiinteään kantajaan, kuten paramagneettiset helmet.

15 Menetelmään kuuluu lisäksi eristetyn koetin:kohdekompleksin lämpödenaturointi lämpötilassa (i) joka on riittävä vapauttamaan dupleksin DNA-analyytin, jossa on kohdesekvenssi kompleksista ja (ii) dupleksi DNA-analyytin,

20 jossa on kohdesekvenssi, sulamispisteessä tai sen alle. Tämä johtaa yksijuosteisten DNA-molekyylien, jotka on johdettu siepatusta dupleksista, eristämiseen.

25 Tämän keksinnön eräs toinen suoritusmuoto on menetelmä määrittää lineaarinen dupleksi DNA-analyytti nukleinihappomolekyylien seoksessa. Menetelmään sisältyy eristää lineaarinen dupleksi DNA-analyytti, kuten edellä kuvattiin ja saadaan yksijuosteisia DNA-molekyylejä, jotka on johdettu dupleksista DNA-analyytistä: tämä saadaan tavallisesti aikaan kuumentamalla dupleksia dupleksin sulamis-

30 lämpötilan yläpuolella (lämpödenaturointi). Lisätään yksijuosteisiin kohde-DNA-analyyttimolekyyleihin ainakin yksi DNA-synteesialuke, joka on komplemetaarinen kohdesekvenssin kanssa ja jossa ei ole sekvenssejä, joita oli

35 jommassakummassa alkuperäisessä koettimessa. DNA-analyytin määrittäminen suoritetaan DNA-polymeraasin helpottamalla alukkeen laajentamisella alukkeen 3'-päästä, mil-

loin alukkeen laajentaminen suoritetaan kaikkien neljän dNTP:n läsnäollessa ja vähintään yhdessä dNTP:ssä on määrítettävissä oleva osa.

5 Tämän keksinnön kaksijuosteisia koetin:dupleksikohdekomplekseja voidaan käyttää myös diagnostiseen in situ määrittystekniikkoihin.

10 Kuvio 1 kuvaa lambda-genomin koettimien ja alukkeiden suhteen, luetteloitu taulukossa 1.

Kuvio 2 esittää 500 bp lambdan genomisen alueen nukleotidisekvenssin: tämä sekvenssi on esitetty myös SEQ ID NRO: 1:nä.

15

Kuvio 3 osoittaa autoradiogrammin DNA:n juovansiirtogeelelektroforeesimäärittäyksestä valaisemaan RecA-proteiinin sitoutumista DNA-koettiin.

20 Kuvio 4 osoittaa etidiumbromidivärjätyn geelin, missä deproteinisoitujen hybridisaatioreaktioiden, käyttämällä 500-meeri- ja 280-meeri-koettimia, komponentit eroteltiin. Kuvio 4B osoittaa kuviossa 4A olevan geelin autoradiogrammin.

25

Kuvio 5A osoittaa etidiumbromidivärjätyn geelin, missä deproteinisoitujen hybridisaatioreaktioiden, käyttämällä 280-meeri-, 121-meeri- ja 79-meeri-koettimia, komponentit eroteltiin. Kuvio 5B osoittaa kuviossa 5A olevan geelin autoradiogrammin.

30

Kuvio 6A osoittaa etidiumbromidivärjätyn geelin, missä deproteinisoitujen hybridisaatioreaktioiden, käyttämällä erilailla leimattuja 121-meeri-koettimia, komponentit eroteltiin. Kuvio 6B osoittaa kuviossa 6A olevan geelin autoradiogrammin. Kuvio 6B esittää, että kaksi DNA-koetinjuostetta ovat tarpeelliset stabiilien, deproteinisoi-

35

tujen, RecA-proteiini-katalysoidun hybridisaation komplekseja.

5 Kuvio 7 kuvaa stabiilien kaksijuosteisten koetin:duplexi lineaaristen kohde-DNA-kompleksien mallin.

10 Kuvio 8 osoittaa geelin, josta stabiilit kaksijuosteiset koetin:duplexi lineaariset kohde-DNA-kompleksit eristettiin, missä duplexit koetinjuosteet olivat tunnusmerkil-
lisesti leimattu.

Kuvio 9 kuvaa erilaisia kaksijuosteisia koetin:duplexi lineaarisia kohde-DNA-komplekseja.

15 Kuviot 10A, 10B ja 10C kuvaavat lukuisia määrityssysteemejä, jotka perustuvat yksittäiseen kaksijuosteiseen koetin:duplexi lineaariseen kohde-DNA-kompleksiin.

20 Kuviot 11A ja 11B kuvaavat lukuisia määrityssysteemejä, jotka perustuvat moninkertaiseen kaksijuosteiseen koetin:duplexi lineaariseen kohde-DNA-kompleksiin.

25 Kuvio 12 osoittaa RecA-proteiinin katalysoiman kahden kaksois-D-silmukka-alukkeen paikannuksen natiivissa kohde-DNA:ssa (kuvio 12A) ja DNA:n amplifikaation DNA-polymeraasilla, jonka jälkeen ligoidaan DNA-ligaasilla (aluke/
koetin korvauksen puuttuessa) (kuvio 12B).

30 Kuvio 13 osoittaa DNA-polymeraasin välittämän signaali-amplifikaatioreaktion käyttämällä yksittäistä kaksois-D-silmukkakoetinta (kuvio 13A) tai moninkertaisia kaksois-D-silmukkakoettimia (kuvio 13B). Kuviossa 13, X ja X' voivat olla samat tai eri; esimerkiksi X voi olla radioaktiivisesti leimattu ja X':ssä voi olla digoksigeniini-
35 osa.

Kuvio 14 kuvaa määrityssysteemin, mihin sisältyy ei-kohde-kompleksoidun kaksijuosteisen koettimen restriktioendonukleaasipilkkomisen käyttö, missä tuloksena olevan tuotteen sieppaaminen suoritetaan ennen (kuvio 14B) tai jälkeen (kuvio 14A) restriktioentsyymipilkkomisen.

Kuvio 15 kuvaa restriktiokohdan suojaamisen joko metyloinnilla tai RecA-proteiinilla. Metylointisuojausten tapauksessa kaksois-D-silmukka deproteinisoidaan ennen restriktioendonukleaasipilkkomista (kuvio 15A). RecA-proteiinisuojausten tapauksessa kaksois-D-silmukka deproteinisoidaan restriktioendonukleaasipilkkomisen jälkeen (kuvio 15B).

Kuvio 16 osoittaa etidiumbromidivärjätyn agarosigeelin, missä deproteinoitujen, RecA-välitettyjen kaksois-D-silmukka hybridisaatioreaktioiden, käyttämällä lämpödenaturoitua 280-meeri-koetinta ja erilaisia kofaktoreita, komponentit eroteltiin elektroforeesissa.

Kuvio 17 osoittaa kuviossa 16 olevan geelin autoradiogrammin kuivaamisen jälkeen.

Kuvio 18 osoittaa etidiumbromidivärjätyn agarosigeelin, missä deproteinoitujen, RecA-välitettyjen kaksois-D-silmukka hybridisaatioreaktioiden, käyttämällä lämpödenaturoitua 500-meeri-koetinta ja ATP γ - ja ATP γ S/rATP-seoksia kofaktoreina, komponentit eroteltiin elektroforeesissa.

Kuvio 19 osoittaa kuviossa 18 olevan geelin autoradiogrammin kuivaamisen jälkeen.

I. RecA-katalysoidun koetin:kohde hybridisaatiokompleksien, jotka ovat stabiileja deproteinoinnille, aikaansääminen.

A. DNA-koettimet ja alukkeet.

Kokeet, jotka suoritettiin nojaamalla tähän keksintöön, osoittavat että voidaan käyttää lyhyitä kaksijuosteisia DNA-molekyylejä tai komplementaarisia yksijuosteisia molekyyliä luomaan hybridisaatiokomplekseja lineaaristen kohde-DNA-molekyylien kanssa sisäisiin alueisiin ja nämä kompleksit ovat stabiileja deproteïnisaatiolle. Esimerkkinä näistä stabiileista hybridisaatiokomplekseista, kaksijuosteisista ja komplementaarisista yksijuosteisista DNA-molekyyleistä, jotka ovat vaihtelevan pituisia, valmistettiin käytettäväksi koettimina ja alukkeina (esimerkki 1, taulukko 1). Näillä DNA-molekyyleillä valittiin olevan homologiaa lambda-faagin genomien 500 bp:n alueen kanssa erilaisten osien kanssa. Näiden koettimien ja alukkeiden suhteet, luetteloitu taulukossa 1, lambda-genomiin on kuvattu kuviossa 1. 500 bp:n lambda-genomisen alueen nukleotidisekvenssi on esitetty kuviossa 2.

B. RecA-proteiinin valmistus ja koettimen päällystys.

Tässä keksinnössä RecA-proteiini viittaa RecA:n kaltaisten rekombinanttiproteiinien perheeseen, joilla kaikilla on olennaisesti kaikki tai useimmat samat toiminnot, erityisesti: (i) proteiinin kyky asettaa kunnolla alukkeita niiden homologisiin kohteisiin myöhempää DNA-polymeraasin tekemää laajentamista varten; (ii) RecA-proteiinin kyky valmistaa topologisesti DNA:ta DNA-synteesiin; ja (iii) RecA-proteiini/DNA-aluekompleksien kyky tehokkaasti löytää ja sitoutua komplementaarisiiin sekvensseihin. Parhaiten luonnehdittu RecA-proteiini on *E. colista*; villityypin proteiinien lisäksi on tunnistettu joukko mutantti-RecA:n kaltaisia proteiineja (esim. recA-803, Madiraju, et al.). Lisäksi monilla organismeilla on RecA:n kaltaisia juosteensiirtoproteiineja (esim., Fugisawa, H., et al.; Hsieh, P., et al., 1986; Hsieh, P., et al., 1989, Fishel, R.A., et al.; Cassuto, E., et al.; Ganea, D., et al.; Moore, S.P., et al.; Keene, K., et al.; Kimeic, E.B., 1984; Kimeic, E.B., 1986; Kolodner, R., et al.;

Sugino, A., et al.; Halbrook, J., et al.; Eisen, A., et al.; McCarthy, J., et al., Lowenhaupt, K., et al.).

RecA-proteiinia saadaan tyypillisesti bakteerikannoista, jotka ylituottavat proteiinia: esimerkki 2 kuvaa villi-
 5 tyypin E. coli RecA-proteiinin puhdistuksen ja mutantti recA-803-proteiinin sellaisista kannoista. Vaihtoehtoisesti RecA-proteiinia voidaan ostaa myös esimerkiksi Pharmacialta (Piscataway NJ).

Olosuhteet, joita käytetään peittämään DNA-koettimet RecA-proteiinilla ja ATP γ S:llä, on kuvattu esimerkissä 3. Vaihtoehtoisesti koettimet voidaan peittää käyttämällä
 10 GTP γ S:ää, rATP:tä (yksin tai rATP:tä regeneroivan systeemin läsnäollessa (Boerhinger Mannheim)), dATP:tä, ATP γ S:n ja rATP:n seoksia tai ATP γ S:n ja ADP:n seoksia. ATP γ S:n, rATP:n, dATP:n ja GTP γ S:n käyttö kofaktorina RecA-proteiinipeittämisreaktiossa on kuvattu esimerkissä 10. Kaksois-D-silmukkakompleksin muodostumisen tulokset käyttä-
 15 mällä näitä kofaktoreita, on esitetty kuvioissa 16 ja 17. Kuvio 17 osoittaa että jokaisen ATP γ S:n, rATP:n, dATP:n ja GTP γ S:n läsnäollessa muodostui kaksois-D-silmukkahybridisaatiokomplekseja, jotka ovat stabiileja deproteiinisaatiolle. Lisäksi esimerkki 11 kuvaa ATP γ S/rATP-seoksien
 20 käytön kofaktoreina RecA-proteiinipeittämisreaktioissa. Kuvioissa 18 ja 19 nähdyt tulokset osoittavat, että sellaisten seosten läsnäollessa muodostui kaksois-D-silmukkahybridisaatiokomplekseja, jotka ovat stabiileja deproteiinisaatiolle. ATP γ S/rATP:n lisäksi myös muiden kofaktori-
 25 rien seokset toimivat RecA-proteiinipeittämisreaktiossa.

Koettimien peittämistä RecA-proteiinilla voidaan arvioida lukuisilla tavoilla. Ensimmäiseksi proteiinin sitoutuminen DNA:han voidaan tutkia käyttämällä juovansiirtogeeli-
 35 määrittäyksiä (McEntee et al.). Esimerkki 3 kuvaa juovansiirtogeelimäärittäyksen käytön valaisemaan RecA-proteiinin sitoutumista DNA-koettiin. Leimattuja koettimia peitet-

tiin RecA-proteiinilla ATP:n läsnäollessa ja peittämisreaktioiden tuotteet erotettiin agarosigeelielektroforeesilla: kuvio 3 osoittaa saadun DNA:n autoradiogrammin geelissä. Kuviossa 3 esitetty tieto osoittaa, että sen jälkeen kun RecA-proteiinia on inkuboitu denaturoidun dupleksin koetin-DNA:n kanssa, RecA-proteiini peittää tehokkaasti yksijuosteisia koettimia, jotka on johdettu duplexi-koettimen denaturoinnista. Kun RecA-monomeerien suhde nukleotideihin koettimessa nousee 0, 1:27, 1:2,7 - 3,7:1 121-meerille (linjat 1-4, vastaavasti) ja 0, 1:22, 1:2,2 - 4,5:1 159-meerille (linjat 58, vastaavasti), laskee DNA-koettimen elektroforeettinen liikkuvuus, s.o. hidastuu johtuen RecA:n sitoutumisesta DNA-koettimeen. DNA:n koettimen liikkumisen osittainen hidastuminen, jota havaittiin linjoissa 2,3 ja 6,7, heijastaa koetin-DNA:n ei-kyllästymisen RecA-proteiinilla. Täten kuten odotettiin (Leahy et al.), vaaditaan ylimäärä RecA-monomeerejä DNA-nukleotideihin lyhyiden DNA-koettimien tehokasta RecA-peittämistä varten.

Toinen menetelmä arvoimaan proteiinin sitoutumista DNA:han on nitroselluloosasuodatin-sitomismäärityksien käyttö (Leahy et al.; Woodbury et al.). Nitroselluloosasuodatin-sitomismenetelmä on erityisen hyödyllinen määritettäessä proteiini:DNA-kompleksien dissosiaationopeuksia käyttämällä leimattua DNA:ta. Suodattimen sitomismäärityksessä DNA:proteiini-kompleksit jäävät suodattimelle, kun vapaa DNA kulkee suodattimen läpi. Tämä määritysmenetelmä on kvantitatiivisempi dissosiaation nopeuden määrityksissä, koska DNA:proteiini-kompleksien erottaminen vapaasta koettimesta on hyvin nopea.

Jotta suoritetaan sellaiset suodattimen sitomismääritykset, nitroselluloosasuodattimia (Achleicher ja Schuell, BA85-suodattimet tai HAW P0025 nitroselluloosasuodattimet) esikäsitellään tyypillisesti, upotetaan puskuriin ja sitten laitetaan tyhjäsuodatuslaitteeseen. DNA:proteiini-

5 sitomisreaktiot laimennetaan usein vähentämään komponenttien konsentraatiota ilman kompleksien hajottamista. Reaktioiden annetaan kulkea levyjen läpi käyttämällä tyhjää. Alhaisissa suolaolosuhteissa DNA:proteiini-kompleksi tarttuu suodattimeen, kun taas vapaa DNA kulkee läpi. Levyt laitetaan tuikelaskinnesteseen (New England Nuclear, National Diagnostics, Inc.) ja cpm määritetään käyttämällä tuikelaskinta.

10 C. DNA-kohteet.

Jotta tutkitaan RecA-katalysoiman koettimien hybridisaation spesifisyyttä homologisten kaksijuosteisten lineaaristen DNA-kohteiden kanssa sisäisissä kohdissa, käytettiin lukuisia lambda-DNA-kohteiden mallisysteemejä, seuraavat mukaanluettuina:

20 (1) 14 DNA-fragmentin seos, ulottuen kooltaan 92-8598 bp, jonka oli tuottanut täydellisen lambdan genomisen DNA:n (48,5 kb; Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg MD) DraI (Promega) restriktioentsyymipilkkominen. Kohde-fragmentti, joka on homologinen kuvioissa 1 ja 2 kuvatulle alueella, on 8370 bp DraI-fragmentti. Koettimien kanssa homologinen (homologiset) alue(et), luetteloitu taulukossa 1, olivat kaikki vähintään 832 bp kaksijuosteisen kohde-DNA-fragmentin 3'-päässä.

30 (2) Kahden fragmentin seos (38412 ja 10090 bp), jonka oli tuottanut täydellisen lambdan genomisen DNA:n ApaI restriktioentsyymipilkkominen. Likimäärin 10 kb fragmentilla on kuvioissa 1 ja 2 kuvattu alue. Tämä homologia-alue on vähintään 2460 bp kaksijuosteisen kohde-DNA-fragmentin 3'-päästä.

35 (3) 10 kb fragmentti, jonka ApaI on pilkkonut lambda-DNA:sta, agaroosigeelipuhdistettu ja deproteinisoitu.

(4) Lambdan kaksoispilkkominen DraI:llä ja BamHI:llä,

missä kohde-DNA-fragmentti on 2957 bp, koetinhomologiaa vähintään 832 emästä kaksijuosteisen kohde-DNA-fragmentin 3'-päästä.

- 5 (5) Kokonaista lambdan virus-DNA:ta käytettiin kohteena. Tässä tapauksessa koetin:kohdehomologia oli vähintään 7131 emästä kokonaisen lambda-genomin 5'-päästä.

10 D. RecA:n helpottama hybridisaatiokompleksien muodostuminen kaksijuosteisen koettimen ja kohde-DNA-sekvenssien välille.

RecA:n peittämien yksijuosteisten DNA-koettimien ja kohde-DNA:n sekoittaminen aloittaa homologian etsimisen RecA:n peittämien DNA-koettimien ja dupleksien kohde-DNA-molekyylien välillä. Yksittäisen koetinsekvenssin tapauksessa, kun RecA:DNA-koetinfilamentti kerran on muodostunut, se voi katalysoida homologian etsimisen ja D-silmukan muodostumisen komplementaarisen koetin- ja kohde-DNA-sekvenssien välillä. Perinteisiä yksittäisiä D-silmukoita voi muodostua yksijuosteisten RecA-peittämien DNA-koettimien välille, joilla on noin 500 emäksen, tai vähemmän, homologiaa lineaaristen kaksijuosteisten kohde-DNA:n välillä. Nämä D-silmukat ovat epästabiileja proteiinin poiston jälkeen, kun koetin:kohdehomologian asema on lineaarisen kohteen sisäisessä asemassa.

25

Kokeet, jotka on suoritettu nojautuen tähän keksintöön, ovat osoittaneet, että 500-meeriset ja pienemmät koettimet voivat muodostaa stabiileja deproteinoituja RecA-katalysoituja kaksois-D-silmukka koetin:kohdekomplekseja dupleksien lineaaristen DNA-kohteiden sisäisiin kohtiin. Kuitenkin sellaisten stabiilien rakenteiden muodostamiseksi täytyy käyttää vähintään kahta koetinta, joilla on päällekkäinmenevät komplementaariset sekvenssit toisiinsa nähden. Kaksi koetinta ovat RecA-peitettyjä yksijuosteisia DNA-koettimia ja käytetään RecA-katalysoiduissa koetin:kohde-hybridisaatioreaktioissa.

30

35

Esimerkki 4 kuvaa RecA-proteiinin välittämän kaksois-D-silmukoiden muodostumisen tai moninkertaisten. 500- ja 280-meerin koettimet päällystettiin RecA:lla ja kohde-DNA oli 8369 bp lambda DNA DraI-fragmentti, joka on kuvattu edellä. RecA-proteiini-koetin-nukleotidi-suhde oli 1,5:1 500-meerille ja 1,3:1 280-meerille. Kaksijuosteinen DNA-koetin-homologinen kaksijuosteinen DNA-kohdefragmentti-suhde oli 11:1 500-meerille ja 22:1 280-meerille. Kuvio 4A osoittaa etidiumbromidivärjätyn DNA-geelin, jossa erotettiin deproteinisoitujen hybridisaatioreaktioiden DNA-komponentit.

Kuvio 4B osoittaa DNA:n autoradiogrammin geelissä, joka nähdään kuviossa 4A. Kuviossa 4B esitetyt tulokset osoittavat 500-meeri:kohde ja 280-meeri:kohde-DNA hybridisaatiotuotteiden, jotka ovat stabiileja deproteinisaatiolle, muodostumisen. Vertailu reaktioiden välillä RecA-proteiinin kanssa ja ilman, osoittaa että RecA:ta vaaditaan homologisen koetin:kohde-DNA-kompleksien muodostumiseksi.

pUC18 kaksijuosteista sirkulaarista DNA sisällytettiin positiiviseksi kontrolliksi esimerkissä 4. Negatiivisesti superkoil kaksijuosteisten sirkulaaristen DNA-molekyylien tiedetään muodostavan koetin:kohde RecA-proteiinin katalysoimia hybridisaatiotuotteita lyhyiden yksijuosteisten koettimien kanssa, jotka ovat stabiileja deproteinisaatiolle (Rigas et al.; ja Cheng et al., 1988).

Jotta vahvistetaan edellä olleissa kokeissa muodostuneiden hybridisaatiotuotteiden identtisyys, RecA-proteiinipeitettyjen koettimien annettiin reagoida kohdefragmenttien kanssa, jotka oli johdettu lambdan genomisen DNA:n DraI/BamHI kaksoispilkkomisella. Tässä kokeessa kaksoispilkkomisen tuottama homologinen kohdefragmentti oli 2957 bp pituudeltaan ja koetin:kohdesekvenssihomologian asema oli muuttumaton edellisistä kokeista (s.o. 832 bp homolo-

gisen kohdefragmentin 3'-päästä). Hybridisaatioreaktiot suoritettiin samanlaisissa olosuhteissa kuin juuri kuvattiin 8370 bp:n lambda DNA DraI-kohdefragmentille.

5 Elektroforeettisen erotuksen jälkeinen autoradiografinen analyysi näistä RecA-proteiinin katalysoimista hybridi-
saatioreaktoista osoitti, että deproteinisoidut koetin:
kohde-DNA-kompleksit kulkivat nyt 2957 bp kohdefragmentin
asemaan varmistaen että koetin:kohde-DNA-hybridisaatio-
10 reaktio oli todella spesifinen homologisten kohteiden
kanssa.

RecA-proteiinin katalysoimat koetin:kohdereaktiot suori-
tettiin ylimäärän ei-homologisten lineaaristen DNA-kohde-
15 molekyylien läsnäollessa.

Esimerkki 5 kuvaa kompleksien, jotka ovat stabiileja de-
proteinisaatiolle, muodostumisen pienten kaksijuosteisten
koettimien ja lineaaristen kaksijuosteisten kohde-DNA:n
20 välillä. Esimerkissä 5 esitetyissä hybridisaatioreakti-
oissa denaturoidut koettimet päällystettiin RecA-proteiini-
koetinnukleotidi-suhteessa 1,8:1, 0, 5,7:1, 2,6:1 ja
11,8:1, linjat 1-6, vastaavasti kuvioissa 5A ja 5B. Kaksi-
juosteinen koetin - kaksijuosteinen kohdefragmentti-suh-
25 teet olivat 4,8:1 (280-meeri), 3,6:1 (121-meeri) ja 5,2:1
(79-meeri). Kuvio 5A osoittaa DNA:n etidiumbromidivärjä-
tystä geelistä, jossa erotettiin deproteinisoitujen hyb-
ridisaatioreaktioiden komponentit.

30 Kuvio 5B osoittaa autoradiogrammin geelistä, joka nähdään
kuviossa 5A. Kuviossa 5B esitetyt tulokset osoittavat,
että voidaan muodostaa stabiili deproteinisoitu hybridi-
saatio koetin:kohdetuote koettimien kanssa, jotka ovat
lyhyempiä kuin 280 emästä kooltaan. Liian paljon RecA-
35 proteiinin lisäys näyttää vähentävän muodostuneen stabiili-
nin tuotteen määrää DNA-hybridisaatioreaktiossa (vertaa
linjat 4, 5 ja 6). Koska tässä kokeessa käytetyt 121-mee-

rin ja 79-meerin koettimet oli johdettu ^{32}P -päästä leimat-
 tujen 280-meerin ja 500-meerin dupleksien koettimien
 restriktioentsyymipilkkomisesta, jokaisessa DNA-koetti-
 messa oli joko 5'-juoste tai 3'-juoste leimattu, ei mo-
 lemmat, kuten 280-meerillä; molekyylien 5'- ja 3'-päät
 tunnistetaan suhteessa kokonaisen lambdan DNA:han. Sig-
 naalit, jotka havaittiin kuvion 5B linjoissa 3-6, osoit-
 tavat että joko 5'- tai 3'-koetinjuoste voi ottaa osaa
 koetin:kohdereaktioon: tämä havainto on yhtäpitävä johto-
 päätöksen kanssa, että molemmat juosteet ovat mukana koe-
 tin:kohde-DNA-hybridisaatiokompleksin, joka on stabiili
 deproteinisatiolle, muodostumisessa.

Lukuisat hybridisaatiokokeet, jotka ovat esimerkissä 4 ja
 5 kuvatun perusprotokollan mukaisia, ovat vahvistaneet
 että RecA-proteiinin katalysoima hybridisaatioreaktio voi
 tapahtua laajalla alueella reaktio-olosuhteita. Kun käy-
 tetään eri konsentraatioita kohde-DNA:ta, on deproteini-
 soidun hybridin saanto suhteellinen homologisen kohde-
 DNA:n määrään reaktiossa. Joitakin reaktio-olosuhteita on
 tiivistelmänä seuraavassa:

(i) Testattiin ATP γ S-konsentraatioita 1-12 mM koetin-Re-
 cA:n peittämisreaktiossa. Tämä ATP γ S:n konsentraatio-alue
 antoi stabiileja hybridisaatiotuotteita kohteen lisäämi-
 sen jälkeen: edullinen alue oli 2.4-8 mM. ATP γ S, rATP
 (yksin ja regeneraationsysteemin läsnäollessa), dATP,
 GTP γ S ja ATP γ S:n ja rATP:n seokset toimivat myös koetti-
 men peittämisreaktioissa (esimerkit 10 ja 11). Lisäksi
 kun reaktiossa käytetään ATP γ :n kaupallisia valmisteita,
 voi valmisteen puhtaus vaihdella valmisteesta toiseen.
 Pharmacialta saadut ATP γ S:t ovat tavallisesti noin 95-97
 % ATP γ S:ää. ATP γ S, jota saadaan Sigmalta, vaihtelee noin
 75 % - noin 90 % ATP γ S:ää: näissä valmisteissa on taval-
 lisesti noin 10 % - 20 % ADP:tä. ATP γ S sekä Pharmacia-
 että Sigma-lähteistä on testattu: valmisteet molemmista
 näistä lähteistä toimivat hyvin RecA kaksois-D-silmukka-

reaktioissa. Täten ATP γ S:n ja ADP:n yhdistelmät toimivat myös RecA:n välittämässä kaksois-D-silmukkahybridisaatio-reaktioissa. Lisäksi DNA-koettimet päällystettiin tehokkaasti RecA-proteiinilla ATP γ S:n ja rATP:n seoksen läsnäollessa, edullisissa seoksissa oli noin 1,4-1 mM kumpaa-kin komponenttia, vastaavasti. Näiden kokeiden tulokset osoittavat, että RecA voi käyttää suurta määrää kofaktoreita ja kofaktorien yhdistelmiä kaksois-D-silmukkakompleksien muodostumiseen.

(ii) Mg⁺⁺-asetaatikonsentraatiot lopullisessa reaktiossa, jossa on koetin- ja kohde-DNA:t, toimi laajalla Mg⁺⁺-konsentraatioiden alueella: 4-25 mM, edullisen alueen ollessa 6-8 mM;

(iii) RecA-proteiinikonsentraatiot 8,4-41 μ M testattiin koettimen peittämisreaktiossa: jokainen konsentraatio oli aktiivinen;

(iv) RecA-proteiini-koetin-nukleotidisuhteet koettimen peittämisen aikana 1:3-6:1 olivat tehokkaat edullisen alueen ollessa noin 2:1 - 4:1 suhteet;

(v) Lopulliset (μ M) kaksoisjuoste DNA-koetin - kaksoisjuoste DNA-kohdemolekyyli-suhteet olivat 2:1-22:1 kaikki tuottivat stabiilit deproteinisoidut koetin:kohdehybridit;

(vi) DNA-hybridisaatioreaktio toimii vastaavassa Tris-HCl-reaktiopuskurissa (pH 7,5), vaikka koettimen peittäminen ja juosteen siirto asetaattipuskurissa näyttää antavan enemmän tuotteita kuin Tris-systeemi;

(vii) recA-803-mutanttiproteiini oli aktiivinen muodostamaan stabiileja hybridisaatiokomplekseja;

(viii) Hybridisaatioreaktio toimii yksijuosteisen sitovan

(SSB) proteiinin läsnäollessa (Moorical et al.);

5 (ix) RecA-proteiinin peittämät yksijuosteiset DNA-koettimet, peitetyt denaturoidut kaksijuosteiset koettimet mu-
kaanluettuina, varastoituna -20°C:ssa useita päiviä oli-
vat aktiivisia hybridisaatiokompleksien muodostamisessa
sen jälkeen kun niitä oli inkuboitu kohteen kanssa 37°C:-
ssa;

10 (x) Hybridisaatioreaktio voidaan suorittaa kokonainen
lambdan genomisen DNA kohteena. Koetin:kohdehybridisaa-
tioreaktiot voidaan myös suorittaa, kun kohde-DNA on upo-
tettu agarositäytteisiin tai mikrohelmiin; esimerkiksi
15 stabiileja kaksois-D-silmukkahybridejä on muodostunut
käyttämällä RecA-proteiinipeitettyjä koettimia, joissa on
koskemattomat 48,5 kb λDNA-kohteet upotettuna agarosi-
täytteisiin;

20 (xi) Komplementaarisen päällekkäisyyden alue koetinjuos-
teiden välillä on tyypillisesti noin 79 emäsparia ja vä-
hemmän kuin noin 500 emäsparia. Koettimet, joilla on tä-
män asteinen komplementaarinen päällekkäisyys, muodosta-
vat stabiileja tuotteita sisäisiin kohdekohtiin tämän
keksinnön RecA-katalysoidussa hybridisaatioreaktiossa.
25 Stabiilien hybridisaatiotuotteiden luominen osoitettiin
myös lineaaristen molekyylien lopussa (esimerkiksi käyt-
tämällä 80-meerikoettimia ja 500-meeri-dupleksia kohteena
(kuvio 1)). Standardi koetinjuoste-kohdejuoste komplemen-
taarisuus on 90-100 %. RecA-proteiinin tiedetään kuiten-
30 kin katalysoivan hybridisaatiokompleksien, joissa on jon-
kin verran ei-spesifistä emäsparivuorovaikutusta, muodos-
tumista (Cheng et al. 1989). Sen mukaisesti koetin:kohde-
komplementaarisuutta voidaan vähentää riippuen koettimen
koosta ja määritysreaktion vaaditusta spesifisyydestä:
35 tyypillisesti komplementaarisuus ei ole alhaisempi kuin
70 % emäsparin yhteensopivuus jokaisen koetinjuosteen ja
kohdejuosteen välillä.

(xii) Koettimet, joilla on vähemmän kuin noin 79 emäspä-
rin päällekkäisyyttä, voidaan käyttää tässä keksinnössä:
kaksois-D-silmukan stabilisaatio, deproteinoisoinnin jäl-
keen, voi olla edullinen kun käytetään näitä pienempiko-
koisia koettimia. Eräs menetelmä stabiloida lisää kak-
sois-D-silmukkakomplekseja on psoraali ristiinsitominen
(Cheng et al., 1988): sellainen ristiinsitominen on eri-
tyisen edullinen in situ, koska se sallii karkeat pesu-
olosuhteet.

Tulokset, jotka on esitetty kuviossa 5B, osoittavat että
havaitut koetin:kohdetuotteet olivat stabiileja depro-
teinisoinnille koska molemmat DNA-koetinjuosteet olivat
läsä samassa kohdemolekyylissä. Eräs sellaisen stabiilin
kompleksin edustaja nähdään kuviossa 7. Tähän rakentee-
seen viitataan tässä kaksois-D-silmukka- tai moninkertai-
nen DNA-rakenne vastakohtana perinteiselle yksittäiselle
D-silmukalle tai kolmejuosteinen korvaussilmukka tai kol-
minkertainen rakenne (kaksi kohdejuostetta ja yksittäinen
DNA-koetin komplementaarinen erityiselle yksittäiselle
kohdejuosteelle).

Esimerkki 6 esittää tietoja, jotka vahvistavat että kaksi
RecA-proteiinin peittämää DNA-koetinjuostetta vaaditaan
stabiilien deproteinoitujen koetin:kohdehybridisaatio-
tuotteiden tuottamiseksi limeaarisella kohde-DNA-molekyy-
lillä DNA-homologian sisäisellä alueella. Yksittäisiä
121-meerin koetinjuosteita syntetisoitiin kemiallisesti
varmistamaan, että yksittäiset koetinjuosteet eivät olisi
kontaminoituneet komplementaarisen (vastakkainen) DNA-
juosteen pinistä määristä. Jotta erotetaan kummankin kah-
den yksittäisen komplementaarisen DNA-koetinjuosteen läs-
näolo, leimattiin koettimet tunnusmerkillisesti: yksi
juoste 5'-terminaalisisella ³²P-leimalla ja toinen yksittäi-
sellä 5'-terminaalisisella biotiinileimalla.

Koska vain yksi juoste leimattiin radioaktiivisesti, olivat jokaisen kaksois-D-silmukka DNA-hybridisaatioreaktion ^{32}P -spesifiset aktiivisuudet samat: sen mukaisesti kaikkien kokeiden tulosten välinen vertailu oli mukavampaa.

5 Hybridisaatioreaktiot suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 6. Kuvio 6A osoittaa etidiumbromidivärjätyn geelistä, jossa erotettiin deproteinisoitujen hybridisaatioreaktioiden DNA-komponentit.

10 Kuvio 6B osoittaa autoradiogrammin DNA:sta geelissä, joka nähdään kuviossa 6A. Kuviossa 6B esitetyt tulokset osoittavat, että vaaditaan kaksi koetinjuostetta stabiiliin deproteinisoidun koetin:kohdehybridin tuottoon. Lisäksi reaktio toimii, ovatpa molemmat koettimet peitetyt RecA-

15 proteiinilla yhdessä tai erillisissä reaktioissa. Lisäksi hybridisaatioreaktio tuottaa deproteinisoituja stabiileja komplekseja jopa kun DNA-koettimet lisätään reaktioon peräkkäin (linjat 5 ja 6). ^{32}P -juosteen lisääminen ensin reaktioseokseen näyttää antavan enemmän DNA-hybridisatiotuotetta. On mahdollista, että terminaalinen biotiinileima on hieman inhibitoorinen johtuen kemiallisen väliskeulun koosta tai leiman sijainnista koettimessa.

20 Kuitenkin huolimatta koettimen lisäysjärjestyksestä hybridisaatioreaktioihin, vaaditaan kaksi koetinjuostetta luomaan stabiilit deproteinisoidut homologiset kompleksit. RecA:n välittämä homologinen koettimen kohdistusreaktio voi käyttää myös koettimia, joissa on biotiinia liitettynä sisäisiin asemiin. Sellaisia koettimia voidaan syntetisoida käyttämällä polymeraasiketjureaktion modifi-

25 kaatiota (Mullis; Mullis et al.), missä bio-14-dATP korvaa tietyn prosenttiosuuden (esim. 5-25 %) dATP:stä, jota normaalisti käytetään synteessin aikana.

30 RecA:n helpottaman, lyhyiden DNA-koettimien homologisen pariutumisen nopeuden niiden samaa alkuperää olevien kohdesekvenssien kanssa on osoitettu olevan positiivisesti yhteenkuuluva kiinnittyneiden heterologisten DNA-häntien

35

pituuden kanssa (Gonda et al.). Sen mukaisesti voi koet-
 timiin, joita käytetään tämän keksinnön hybridisaatioreak-
 tioissa, sisältyä heterologisia häntiä, s.o. terminaali-
 sia sekvenssejä, jotka eivät ole homologisia kohde-DNA:n
 5 kanssa, jotta nopeutetaan koetinsekvenssin homologista
 pariutumista kohdesekvenssiin.

E. Sieppaus/määrityssysteemi.

Sekä ^{32}P - että biotiini-leimattujen 121-meeri koetinjuos-
 10 teiden läsnäolo samassa kohdemolekyylissä varmistettiin
 lisäksi käyttämällä sieppaus/määrityssysteemiä (esimerkki
 7). Deproteinisoidut kaksois-D-silmukkatuotteet siepat-
 tiin käyttämällä streptavidini-magneettisia helmiä. Bio-
 tiinin sisältävän koettimen sieppaus sieppasi samanaikai-
 15 sesti ^{32}P -leimatun koettimen. Kuvio 8 osoittaa DNA:n gee-
 listä, josta koetin:kohdekompleksit eristettiin ennen
 biotiiniosan streptavidinin sieppausta. DNA-kompleksit
 eristettiin uuttamalla geelifragmenteista vastaten odo-
 tettua koetin:kohdekompleksin kokoa (esimerkki 7). Sitten
 20 uutettu DNA altistettiin streptavidini-peitetuille para-
 magneettisille helmille. Sitten helmet eristettiin ja
 laitettiin tuikenesteeseen ^{32}P -leimatun DNA-koetinjuos-
 teen määrittämiseksi. Tämän analyysin tulokset on esitet-
 ty taulukossa 2. Tiedot osoittavat, että vain reaktiot,
 25 jotka käyttävät kahta koetinjuostetta ja RecA-proteiinia,
 antavat sieppaussignaalin yli taustan. Tässä kokeessa
 käytettiin eristettyä DNA-kohdetta, joka kulkee 10 kb
 kohde-DNA asemassa sieppausta varten, täten sulkien pois
 kompleksirekombinaatiotuotteiden mahdollisen läsnäolon
 30 moninkertaisten 10 kb kohteiden välillä, jotka voitaisiin
 siepata ja määrittää ilman että yksittäisessä 10 kb koh-
 demolekyylissä on todella kaksois-D-silmukkarakenne. Li-
 säksi näissä reaktioissa muodostuneet hybridimolekyylit
 ovat melko stabiileja eristysolosuhteissa tukien johto-
 35 päätöstä, että siepattu ^{32}P -signaali ei ollut komplemen-
 taarisen koettimen uudelleenytymisen tekotuote.

II. Hyödyllisyys.

Kuvio 9 osoittaa joukon mahdollisia kaksois-D-silmukkarakenteita. Kuvio 9A edustaa kaksois-D-silmukkarakenteen muodostumista sisäiseen kohtaan DNA-kohdemolekyylissä.

5 Kuvio 9B edustaa samanlaista rakennetta paitsi, että koetin-DNA-molekyylit on hännitetty heterologisella DNA:lla (Gonda et al.). Sellainen hännitys voi toimia useita tarkeituuksia varten: (i) helpottaa RecA:n laittamista pienien koettimien päälle; (ii) antaa laajennusmolekyylin leijmojen liittämiseksi koettimeen, esimerkiksi digoksigeniini tai biotiini; (iii) antaa sieppaussekvenssin; ja (iv) antaa sekvenssin hybridisoitua lisäreportterimolekyyliin.

15 Kuvio 9C edustaa tilannetta, missä käytetään kahta koetinta, joilla on komplementaarisen päällekkäisyyden alue (s.o. alue, jossa ne ovat toisiinsa nähden komplementaarisia) homologisten terminaalisten laajentumien lisäksi (s.o. alueet, jotka ovat komplementaarisia kohde-DNA:n kanssa, mutta eivät toisen koettimen kanssa).

20 Kuvio 9D edustaa tilannetta, missä käytetään kahta koetinta, joilla on komplementaarisen päällekkäisyyden alue heterologisten terminaalisten laajentumien lisäksi (s.o. alueet, jotka eivät ole komplementaarisia kohde-DNA:n kanssa, mutta eivät toisen koettimen kanssa). Kuvio 9F osoittaa samankaltaisen tilanteen, missä heterologiset terminaaliset laajentumat ovat molemmissa 5'- ja 3'-päissä jokaisessa koetinjuosteessa. Kuvio 9G kuvaa tilanteen, missä homologiset hännät ovat komplementaarisia toistensa kanssa, mutta eivät kohde-DNA:n kanssa.

35 Kaksois-D-silmukkarakenteiden ei tarvitse koostua vain kahdesta koettimesta. Esimerkiksi kuvio 9E osoittaa, että kaksois-D-silmukkarakenne, joka on luotu 5 erillisestä koetinjuosteesta: sisäisillä koetinjuosteilla on komplementaarisen päällekkäisyyden alueet useampaan kuin yhteen muuhun juosteeseen. Komplementaarisen päällekkäisyyden

koko alue on tyypillisesti 70-500 emäsparia, mutta kuten edellä keskusteltiin, tämä alue voi olla pienempi.

5 Kuvion 9 rakenteet kuvaavat useita mutta ei kaikkia mahdollisia koetin- ja kohde-DNA:n yhdistelmiä, jotka voivat luoda kaksois-D-silmukkarakenteita, jotka ovat stabiileja deproteinisatiolle. Eräs yhteinen piirre kaksijuosteille koettimille, joita on tarkoitus käyttää kaksois-D-silmukkareaktioissa, on komplementaarisen päällekkäisyyden alueet koetinjuosteiden välillä.

Kyky muodostaa stabiilia RecA-proteiinia, jota on katalysoitu deproteinisoiduilla kaksois-D-silmukka koetin: kohde-komplekseilla sisäisissä kohdissa, sallii homologisten lineaaristen DNA-kohteiden spesifisen tunnistamisen. Tämä kaksois-D-silmukkareaktio tarjoaa uusia mahdollisuuksia hybridisaatiodiagnostiikkaan. Määrittäminen tarjoaa etuja, että tunnusmerkillisesti leimatut komplementaariset koetinjuosteet voidaan käyttää yksittäisessä reaktiossa ja tarvitaan tuntea vain yksi pieni kohdesekvenssi.

25 Komplementaaristen koettimien uudelleen yhteenliittymisen inhiboituu, kun käytetään kyllästäviä tasoj RecA-proteiinia (Bryant et al.). Sellaisten koettimien uudelleen yhteenliittymistä vähentää myös ATPγS:n liittäminen kofaktoriksi koettimen peittäviin reaktioihin.

30 Kuten edellä kuvattiin, tämän keksinnön kompleksit, jotka muodostuvat RecA-proteiinin peittämien koettimien ja kohde-DNA:n välille, ovat stabiileja deproteinisatioreaktioille (kuten kuvattiin). Joissakin sovellutuksissa ei kuitenkaan vaadita RecA-proteiinin poistoa komplekseista sovellutuksen toteuttamiseksi. Sellaissä tapauksissa ainoa rajoitus on, että jäljelle jäävät proteiinimolekyylit eivät ole vuorovaikutuksessa sovellutuksen kanssa (esim. katso kappale F, alla).

A. Kohde-DNA:t.

Tämän keksinnön menetelmää voidaan käyttää diagnosoimaan tarttuvia tauteja, joita aiheuttavat kliinisten näytteiden organismit. Nämä organismit voidaan diagnosoida määrittämällä aiheuttavalle organismille luonteenomainen spesifinen DNA. Sellaisiin organismeihin kuuluvat seuraavat: bakteerit, kuten Salmonella, Neisseria, Chlamydia, Shigella ja Streptomyces; virukset, kuten Herpes simplex virus-1 (HSV-1), herpes simplex virus-2 (HSV-2), ja adenovirus, kaikki kaksijuosteisia DNA-viruksia; parasiitit, kuten Plasmodium ja Giardia; ja mykoplasma, kuten Mycoplasma pneumonia, M. genitalium ja Pneumocystis.

Mitä tahansa diagnostista määritystä varten koetinsekvenssit valitaan tiettyyn homologia-alueeseen kohde-DNA:ssa. Kohde-DNA voidaan valmistaa lukuisista erilaisista lähteistä standarditekniikoilla: esimerkiksi, vesipitoiset liuokset, nisäkaskudos, viljellyt solut, kasvukudos, bakteerit, hiiva, veri ja veren komponentit (Ausubel et al.; Maniatis et al.; Sambrook et al.; Davis et al.; Fey; Strickler et al.; Kingston; Wachsmuth).

Yleensä tämän keksinnön määrittämismenetelmiä voidaan käyttää määrittämään duplexi-DNA missä tahansa nukleiinihaponäytteessä. Muihin sovellutuksiin kuin tarttuvien tautien kliiniseen diagnosiin sisältyy (i) viljellyistä nisäkässoluista kontaminanttien, kuten mykoplasma, seulominen (Zlvin et al.), (ii) tiettyjen geneettisten sairauksien, joita aiheuttavat spesifiset deletiot/mutaatiot, insertiot tai uudelleenjärjestäytymiset nisäkäs-DNA:ssa, diagnoosi, kuten α -talassemia, β -talassemia tai krooninen myelosyyttinen leukemia ja (iii) koettimien hybridisaatio erottamaan annetun kohdesekvenssin läsnäolo tai puuttuminen dupleksissa DNA-molekyylissä.

B. Yhden kaksois-D-silmukkarakenteen käyttö diagnostisiin sovellutuksiin.

Kuvio 10 valaisee lukuisia suoritustuotoja, joissa käytetään yhtä kaksois-D-silmukkarakennetta vastaavien eristämiseen ja tunnistamiseen duplekseissa DNA-kohteissa. Yksi koetin voidaan leimata sieppausyksiköllä (esim. kuten

5 tehtiin biotiinilla esimerkissä 7). Toinen koetin leimataan sitten määritysosalla, kuten radioaktiivinen leima, biotiini tai digoksigeniini tai muut modifioidut emäkset. Koettimet voidaan päällystää ja hybridisoida nukleiinihaponäytteeseen, josta testataan kohdesekvenssin läsnä-

10 olo. Hybridisaatioreaktiot voidaan deproteinisoida tai käyttää suoraan.

Koetin, joka on leimattu sieppausosalla, vangitaan. Tämä vangitseminen voidaan saada aikaan, esimerkiksi leimamalla koetin biotiiniosalla ja altistamalla reaktioseos streptavidiinille, joka on kiinnitetty kiinteään kantajaan. Sieppausosa voi vaihtoehtoisesti olla digoksigeniini ja vangitseminen voidaan saada aikaan käyttämällä anti-digoksigeeniini vasta-ainetta kiinnittyneenä kiinteään

20 kantajaan. DNA-molekyylien päihin voidaan liittää lisäryhmiä sopivasti seuraavasti. Oligonukleotidikoetin yhdistetään digoksigeniini-11-dUTP:n kanssa (dTTP:n, 2'-desoksiuridiini-5'-trifosfaatin analogi, joka on kytketty digoksigeniiniin 11-atomi-välikehaaran kautta, Boehringer

25 Mannheim, Indianapolis IN) ja terminaalaisella desoksinukleotidyyli transferaasilla (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Liittyneiden dig-11-dUTP-osien lukumäärä tätä menetelmää käyttäen näytti olevan vähemmän kuin 5 (mahdollisesti vain 1 tai 2). Vaihtoehtoisesti dig-11-dUTP-osia voidaan

30 liittää koettimen nukleotidisekvenssiin kuten biotiinin kanssa.

Seuraavia kaksijuosteisten koettimien yhdistelmiä on tyypillisesti käytetty määrityssysteemin sieppaamisessa: (i) ensin koetin/sieppaus, leimattu biotiinilla tai digoksigeniinilla, toinen koetin/määritys, radioleimattu; (ii) ensin koetin/sieppaus, leimattu biotiinilla, toinen koe-

35

tin/määritys, leimattu digoksigeniinillä; tai (iii) ensin koetin/sieppaus, leimattu digoksigeniinillä, toinen koetin/määritys, leimattu biotiinillä.

5 Eräs tavanomainen menetelmä sekvestrata siepattu DNA, on streptavidini-konjugoidun superparamagneettisten polystyreenihelmien käyttö, kuten esimerkissä 7 kuvattiin. Sen jälkeen, kun DNA on siepattu, voidaan helmet saada takaisin laittamalla reaktioputket magneettitelineeseen.

10

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää avidiini-päällystettyjä agaroosihelmiä. Biotinyloidut agaroosihelmet (immobilisoitu D-biotiini, Pierce) sidotaan avidiiniin. Avidiinillä, kuten streptavidiinillä on 4 sitomiskohtaa biotiinille. Yhtä näistä sitomiskohdista käytetään sitomaan avidiini biotiiniin, joka on kytkeytynyt agaroosihelmiin 16 atomivälikeulokkeen kautta: muut biotiinikohdat jäävät saataville. Helmet sekoitetaan hybridisaatiokompleksien kanssa sieppaamaan biotinyloitunut DNA (esimerkki 7).

20

Vaihtoehtoisiin menetelmiin (Harlow et al.) helmien sieppaamisen menetelmille, jotka juuri kuvattiin, sisältyvät seuraavat streptavidinyloidut tai avidinyloidut kannattajat: pieniä proteiineja sitovat suodattimet tai 96-kai-
von maljat tai modifioidut biotiinin sieppaamisen menetelmät, kuten iminobiotiini (Rigas, B., et al.).

25

Kumpaakin edellä olevaa helmimenetelmää varten helmet eristetään ja siepatun hybridisaatiokompleksin määrä määritetään kvantitatiivisesti. Kvantitatiivinen määritysmenetelmä riippuu siitä, kuinka toinen juoste-DNA-koetin on valmistettu. Jos toinen koetin on radioaktiivisesti leimattu, voidaan helmet laskea tuikelaskimessa. Siepattu DNA voidaan vaihtoehtoisesti määrittää käyttämällä kemiluminesenssiä, fluoresenssi- tai kolorimetristä määrittäys-
systeemiä.

30

35 Monissa edellä kuvatuissa kokeissa on hyödynnetty ra-

diroleimattuja oligonukleotidejä: esimerkki 7 yhdistää biotiini-leimatun ensimmäisen koettimen käytön radioaktiivisesti leimatun toisen koettimen kanssa. Edellä on keskusteltu tekniikoista, jotka sisältyvät oligonukleotidien radioleimaamiseen. Rutiininomaisesti saavutetaan 10^8 cpm/ μ g DNA spesifinen aktiivisuus käyttämällä standardimenetelmiä (esim. leimataan oligonukleotidin pää adensiini [γ - 32 P]-5'-trifosfaatilla ja T4 polynukleotidikinaasilla). Tämä spesifisen aktiivisuuden taso sallii pienen DNA-määrien mittaamisen joko geelien tai suodattimien, jotka on laitettu filmin päälle, autoradiografialla tai laskemalla suoraan näyte tuikelaskimessa.

Radioleimaus ja kemiluminesenssi (i) ovat hyvin sensitivisiä, sallien oligonukleotidin alifemtomoolin määrien määrittämisen. Kemiluminesenssimäärityksen tapauksessa on keksitty protokollia täyttämään massa-seulontamäärityksen vaatimuksia. Ei-isotooppiset DNA-määritystekniikat ovat periaatteellisesti liittäneet alkaalista fosfataasia määritettäväksi leimaksi antaen entsyymille kyvyn antaa muuttaa paljon substraattia tuotteeksi ja substraattien, jotka tuottavat kemiluminesenssi- tai värillisiä tuotteita, saamiseksi.

Kemiluminesenssin määrittämiseksi voidaan biotinyloidut tai digoksigeniini-leimatut oligonukleotidikoettimet määrittää käyttämällä kemiluminesenssimäärityssysteemiä "SOUTHERN LIGHTS", jonka on kehittänyt Tropix, Inc. Perustekniikkaa voidaan soveltaa määrittämään DNA, joka on siepattu joko helmiin, suodattimiin tai liuokseen.

Alkaalinen fosfataasi on kytketty siepattuun DNA-kompleksiin. Tämän tekemiseksi voidaan käyttää lukuisia menetelmiä, jotka on johdettu tavanomaisesti käytetyistä ELISA-tekniikoista (Harlow et al.; Pierce, Rockford IL). Esimerkiksi toinen juoste-DNA-koetin voidaan leimata päästä digoksigeniini-11-dUTP:llä (dig-11-dUTP) ja terminaalin

transferraasi (kuten edellä on kuvattu). Sen jälkeen, kun DNA on siepattu ja poistettu hybridisaatioseoksesta, annetaan anti-digoksigeniini-alkaalisen fosfataasi-konjugoidun vasta-aineen reagoida (Boehringer Mannheim, Indianapolis IN) digoksigeniiniä sisältävän oligonukleotidin kanssa. Vasta-aine-entsyymi-konjugaatti tunnistaa anti-geenisen digoksigeniinin osan.

Siepatut DNA-hybridisaatiotuotteet määritetään käyttämällä alkaalisia fosfataasi-konjugoituja digoksigeniinin vasta-aineita seuraavasti. Eräs kemiluminesenssiaine alkaaliselle fosfataasille on 3-(2'-spiroadamantaani)-4-metoksi-4-(3'-fosforyylioksi)-fenyyli-1,2-dioksietaanidinatriumsuola (AMPPD). AMPPD:n defosforylaatio johtaa ei stabiiliin yhdisteeseen, joka hajoaa vapauttaen pidentyneen, tasaisen valoemission 477 nm:ssä. Valon mittaaminen on hyvin herkkää ja voi määrittää DNA:n erittäin pieniä määriä (esim. 10^2 - 10^3 attomoolia).

Kolorimetrisiä substraatteja alkaalista fosfataasisysteemiä varten on myös testattu. Koska kolorimetriset substraatit ovat käyttökelpoisia, on valoemissiosysteemin käyttö herkempää.

Vaihtoehto edellä olleelle biotiinin sieppaussysteemille on digoksigeniinin käyttö biotiinin sijasta modifioimaan ensimmäinen juostekoetin: biotiinia käytetään sitten korvaamaan digoksigeniinin osia edellä kuvatussa systeemissä. Tässä järjestelyssä anti-digoksigeeni-vastainetta käytetään sieppaamaan DNA-hybridisaatiokompleksi. Streptavidinia, joka on konjuguoitu alkaaliseen fosfataasiin, käytetään sitten määrittämään siepattujen oligonukleotidien läsnäolo.

Vaihtoehtoisiin sieppaussysteemeihin kuuluu seuraavaa:
(i) DNA:ta sitovan proteiinin ja sen samaa alkuperää olevan sitovan sekvenssin käyttö, missä samaa alkuperää ole-

va sekvenssi on sieppaava osa, joka on liitetty ensimmäiseen juostekoettiin 5'-terminaalisisena sekvenssinä (Kemp et al.); ja (ii) hybridisaatiosieppaamisen käyttö, missä ei kohteen kanssa komplementaarinen DNA-sekvenssi, kuten poly(T) on liitetty 5'-terminaalisisena sekvenssinä ensimmäiseen juostekoettiin ja komplementaarista nukleinihappoa, kuten poly(A), käytetään sieppaamaan koetin ja liittyneenä ollut nukleinihappo hybridisaatiolla. Jompaa kumpaa näistä kahdesta menetelmästä voidaan käyttää kiinteän kannattajan yhteydessä.

Eräs toinen vaihtoehtoinen systeemi on kiinnittää yksi koetin membraaniin (Saiki et al.), peittää koetin, lisätä kohdetta ja toista peitettyä koetinta, deproteinisoida, pestä ja määrittää.

Kuvio 10 valaisee useita järjestelyitä yhden kaksois-D-silmukkarakenteen määrittämiseksi. Kuvio 10A osoittaa yhden koetinjuosteen, joka on leimattu sieppausosalla, kuten biotiiniin, ja toisen koetinjuosteen, joka on leimattu määritysosalla, kuten digoksigeniiniin. Kuvio 10B osoittaa yhden koetinjuosteen, joka on leimattu sieppausosalla, kuten digoksigeniiniin, ja toisen koetinjuosteen, jolla on homologinen hännänpidentymä, joka on leimattu moninkertaisilla määritysosilla, kuten biotiiniin. Kuvio 10C valaisee määrittäksen lisäämisen (tai sieppausosien) heterologisiin häntiin, jotka ovat kiinnittyneet joko ja/tai molempiin kaksijuosteisen koettimen juosteisiin.

C. Moninkertaisten kaksois-D-silmukka-rakenteiden käyttö diagnostisiin sovellutuksiin.

Sen lisäksi että voidaan käyttää yhtä kaksois-D-silmukkarakennekompleksia sieppaus/määrittäyssysteemeissä, voidaan käyttää yhtä hyvin moninkertaisia kaksois-D-silmukkarakenteita. Tapauksissa, joissa koetinjuosteiden uudelleen yhteenliittymisen saattaa olla ongelma, esimerkiksi suurempien koettimien kanssa, antaa moninkertaisten kaksois-

D-silmukkarakenteiden käyttö vähentyneen taustan. Tässä menetelmässä tarvitsee tuntea kaksi tai useampi sekvenssi kohdesekvenssissä.

5 Kuvio 11 valaisee lukuisia järjestelyitä määrittämiselle, joka perustuu kahteen kaksois-D-silmukkarakenteeseen. Kuvio 11A osoittaa esimerkin leimata molemmat juosteet ensimmäisessä dupleksikoettimessa sieppausosassa ja mo-
 10 lemmat toisen dupleksikoettimen juosteet reportteri-/määrittämissä rityksryhmällä. Sieppausosa voi olla joko yhdessä tai molemmissa ensimmäisen koetinsarjan juosteissa. Tässä systeemissä hybridisaatiokompleksit siepataan kuten edellä kuvattiin, ensimmäisen dupleksikoettimen juosteiden uudelleenliittymisen ei kuitenkaan tuota taustaa re-
 15 aktiolla, koska kummassakaan juosteessa ei ole reportteri-/määrittämissä rityksryhmää. Sieppauksen jälkeen hybridisaatiokompleksit määritetään toisen dupleksikoettimen läsnäolon perusteella hybridisaatiokompleksissa. Reportteriryhmän määrittäminen saadaan aikaan kuten edellä on kuvattu.

20 Tämän systeemin toinen suoritusmuoto, joka perustuu moninkertaisiin kaksois-D-silmukkarakenteiden läsnäoloon kohdekompleksissa, on kuvattu kuviossa 11B. Tässä tapauksessa leimataan ensimmäisen dupleksikoettimen vain yksi
 25 juoste sieppausosalla ja toisen dupleksikoettimen vain yksi juoste leimataan reportteriosalla.

Kuten edellä on kuvattu yhdelle kaksois-D-silmukkarakenteen määrittämiselle, voidaan lisätä heterologisia häntiä
 30 ja kohde-DNA:n kanssa homologisia sekvenssejä duplekseihin koettimiin.

D. Kaksois-D-silmukkarakenteiden käyttö RecA-proteiinin
 35 helpottamissa DNA-amplifikaatioreaktioissa.
 On kuvattu DNA-amplifikaatioreaktioita, jotka pääasiassa ovat riippuvaisia termisestä denaturaatiosta (Mullis; Mullis et al.; Scharf et al.) juosteen erottamiseksi

valmistettaessa jatkuvaa amplifikaatiota varten. Alla on kuvattu kaksi määrittelyssysteemiä, jotka perustuvat DNA-amplifikaatioon sen jälkeen kun on muodostunut yksittäinen tai monia kaksois-D-silmukoita.

5

(i) Eräässä tämän keksinnön amplifikaatio/määrittelymenetelmässä käytetään hyödyksi moninkertaisia kaksois-D-silmukkarakenteita helpottamaan amplifikaatiota tarvitsematta termistä denaturaatiota.

10

Kokeet, jotka on suoritettu tämän keksinnön vahvistukseksi, ovat osoittaneet että kahden komplementaarisen DNA-alueparin, jotka ovat homologisia kaksijuosteisen kohteen eri alueiden kanssa, käyttö tämän keksinnön hybridisaatioreaktioissa johtaa kahden kaksois-D-silmukan muodostumiseen kohde-DNA:ssa. Nämä kaksois-D-silmukat reunustavat ja määrittävät spesifisen DNA-alueen natiivissa dupleksikohteessa (kuvio 12A): DL801/2 ja DL803/4 (taulukko 1) ovat esimerkkejä koettimista/alukkeista, jotka

15

20

Erilaiset DNA-polymeraasit tunnistavat tuloksena olevan DNA-kohderakenteen substraattina DNA-synteesiin. Esimerkiksi yhdestä sellaisesta amplifikaatioreaktiosta on esitetty esimerkissä 8. Esimerkissä 8 kuvatun amplifikaatioreaktion substraatti on lambda-DNA genomi. Alukkeet rajoittavat kohdealueen noin 500 bp:iin. Amplifikaatioreaktioissa on tyypillisesti DNA-polymeraasi (esim. Klenowin fragmentti), RecA-proteiinilla peitettyt alukkeet, ATP γ S (tai rATP (yksin ja regeneraationsysteemin läsnäollessa), dATP, GTP γ S ja ATP γ S:n ja rATP:n tai ATP γ S:n ja ADP:n seokset) kohdesubstraatti, tarpeellisia kofaktoreita ja kaikki 4 dNTP:tä (modifioidut tai leimatut dNTP:t mukaanluettuina). Näissä reaktioissa voi olla myös DNA-helikaa-

25

30

35

Nämä reaktio-olosuhteet suosivat alukkeiden laajenemista niiden 3'-päissä samanaikaisella alukkeen pidentymisellä 5'-3' suuntaan. Kahden tai useamman neljän DNA-alukkeen 3'-pään laajenemisen rakenteessa polymeraasilla rajaavat DNA-kohdeamplifikaation alueet DNA-alukkeiden välillä (katso kuvio 13). Kahden muun alukkeen DNA-polymeraasin laajeneminen voi myös tapahtua niiden 3'-päissä elleivät nämä ole kemiallisesti tai fysikaalisesti blokatut rajoittamaan DNA-amplifikaatiota määrättyyn alueeseen (esimerkki 8).

DNA-polymeraasit, jotka katalysoivat 3'-laajenemista alukkeiden välillä, saattavat korvata alukkeet samassa juosteessa tai vaihtoehtoisesti uusi(a) syntetisoitu(ja) tuote (tuotteita) voitaisiin ligoida alukkeeseen DNA-liigaasilla, lämpöresistentit tai lämpösensitiiviset DNA-liigaasit mukaanluettuina (Epicentre Technologies, Madison, WI). Replikaatiota voidaan helpottaa myös lisäämällä sopivaa DNA-helikaasia, topoisomeraasia, yksijuosteisia sitovia proteiineja (SSB), geeni 32 (tai muu samanlainen) proteiineja tai RecBCD-koodattuja entsyymejä tai muita proteiineja, joista joillakin on liittyneitä helikaasiaktiivisuuksia. Mitä tahansa alukkeita, jotka RecA-proteiini on oikein paikallistanut, voitaisiin käyttää replikaation aloitukseen.

Koettimet, joita käytetään kahden kaksois-D-silmukan RecA-proteiinin katalysoimassa DNA-amplifikaatiossa, ovat tyypillisesti 60-80 bp kooltaan. Koettimia, jotka ovat suurempia tai pienempiä, voidaan myös käyttää yhtä hyvin, mutta reaktio-olosuhteita saatetaan tarvita modifioida, esimerkiksi liittämällä stabiloivia peptidejä (esim. SSB tai geeni 32 proteiini), lääkkeitä, vasta-aineita, polyamideja tai ristiinreagoivia reagensseja).

Moninkertaisia alukkeita, jotka ovat erilaisia kooltaan, voidaan myös käyttää. Alukkeet voivat olla myös homologi-

sia kohde-DNA-dupleksin kanssa pitkin niiden koko pituutta tai niissä voi olla pää- tai sisäisiä alueita, joissa on osittainen homologia, kuten heterologiset hännät (katso alla). Ainoa vaatimus näille alukkeille on, että toivotun amplifikaatiotuotteen 3'-laajenemiseen käytetyt emäkset ovat saatavilla aluke-DNA-synteesiin. Kuten edellä kuvattiin, voi alukkeissa olla myös modifioituja fosfaattirunkoja tai emäksiä, kuten biotiini tai digoksigeeniini tai mukaanliitettyjä toimintoja, kuten DNA-modifioivat entsyymit ja kemialliset aineet.

Reaktio ylimäärällä RecA-proteiinilla peitettyjen alukkeiden läsnäollessa sallii uusien moninkertaisten tai kaksois-D-silmukoiden muodostumisen uudestaan replikoi-
vaan ja amplifioituun DNA:han. RecA-proteiinin peittämät alukkeet toimivat aloittamaan lisäkierroksia DNA-synteesissä ja tällä tavalla DNA-kohde amplifioidaan ilman, että tarvitaan kohde-DNA:n lämpödenaturointia asettamaan amplifioidut alukkeet.

DNA-amplifikaatioreaktioissa voidaan käyttää kuinka montaa DNA-polymeraasia tai polymeraasien seosta tahansa seuraavat mukaanluettuina: E. coli DNA-polymeraasi I:n Klenowin suuri fragmentti; T7; T4 ja/tai muita virus- tai solun DNA-polymeraaseja ja niiden mutantteja, esimerkiksi Klenowin kaksoismutanttiproteiinit, joilla ei ole eksonukleaasiaktiivisuutta.

Kahden kaksois-D-silmukkareaktioiden DNA-tuotteet on käytettyjen DNA-alukkeiden määräämät. Kaksois-D-silmukka-alueiden, jotka on tarkoitus amplifioida, vasen ja oikea aluke määräävät uudestaan syntetisoitujen DNA-amplifikaatiotuotteiden 5'-pää. Kun alukkeita ei ole korvattu, voidaan uudestaan syntetisoitu DNA-tuote ligoida RecA-katalysoituun amplifikaatioreaktioon, kuten kuviossa 12B on kuvattu.

Käyttämällä moninkertaisia alukesarjoja on myös mahdollista luoda DNA-amplifikaatiotuotteet, joilla on kohesiiviset päät. DNA-tuotteet voivat hybridisoitua niiden päällekkäisten kohesiivisten päiden kautta ja näiden yhteenliittyneiden DNA:n pituutta jatketaan myöhemmin (Haase et al.). Olemassa olevien juosteiden pidentäminen, korvaussynteesi ja RecA-katalysoitu emäspariutumisen päällekkäin menevillä alueilla saattaa lisätä suurien DNA-kohteiden saantoa. Tämä voi olla tärkeää RecA-katalysoidulle DNA:n amplifikaatiolle soluissa in situ, mikä voi tietyissä olosuhteissa (Haase et al.) vaatia suuria DNA-tuotteita tai mukaanliitettyjä ryhmiä in situ retentiota varten.

Kaksois-D-silmukkareaktio tai moninkertaiset kaksois-D-silmukat voidaan muodostaa stabiilisti agarosissa in situ amplifikaatioreaktioissa. Agarooosi on tyypillisesti alhaisessa lämpötilassa sulavaa muunnosta, vaikka eri tyyppisten agarosien seokset ovat mahdollisia ja agarosin konsentraatio on noin 0,4-1 %. Näissä olosuhteissa agarosigeeli tarjoaa rajoittavan alustan, joka sallii lyhyempien DNA-tuotteiden retention: tämä on erityisen hyödyllistä in situ reaktioissa (katso alla).

RecA:n helpottama DNA-amplifikaatioreaktio voidaan suorittaa 37°C:ssa yhtä hyvin kuin korotetuissa lämpötiloissa, jotka ovat alle kohde-DNA-dupleksin tai aluke:kohdehybridien termisen denaturaatiolämpötilan, esimerkiksi 50-60°C. Korotettujen lämpötilojen käyttö näissä reaktioissa laajentaa alukkeen pidentämiseen saatavilla olevien entsyymien valikoimaa ja saattaa sallia pidempien DNA-juosteiden syntetisoimisen. Amplifikaatioreaktion lämpötila sanelee reaktiokomponenttien valinnan: esimerkiksi villityypin *E. coli*n RecA-proteiinilla peitetyt koettimet lisätään kohde-DNA:han 37-39°C:ssa, DNA-synteesi suoritetaan sitten 50-55°C:ssa *Thermus aquaticus* DNA-polymeraasilla, reaktiolämpötila alennetaan sitten 37-39°C:een ja

RecA-proteiinilla peitetyt koettimet lisätään uudelleen. Vaihtoehtoisesti korkeissa lämpötiloissa lämpötilaresistenssit RecA:n kaltaiset proteiinit voisivat korvata vililyyppin E. coli RecA-proteiinin (kuten on keskusteltu samanaikaisesti haetussa, kanssaomistetussa U.S. hakemuksessa sarjanro. 07/520 321).

Kahden kaksois-D-silmukan tai moninkertaisen kaksois-D-silmukan reaktio, jossa käytetään RecA-proteiinin katalysoimaa alukkeen sijoittamista DNA-amplifikaatioreaktioita varten on tärkeitä diagnostisia sovellutuksia DNA:n määrittämiseen ja amplifikaatioon liuosdiagnostiikassa tai in situ diagnostiikassa.

(ii) Toinen määritysmenetelmä, joka käyttää hyväkseen kaksois D-silmukkaa ja DNA-amplifikaatiota, käyttää leimatun tai modifioidun dNTP:n polymeraasilisäystä signaali-amplifikaatioon. Cheng et al. (1988) osoittivat alukkeen 3'-pään pidentymisen yksittäisessä (kolmijuosteisessa) D-silmukkarakenteessa. Sen jälkeen, kun on muodostunut yksittäinen kaksois-D-silmukka kohde-DNA-molekyyliin, reaktioon lisätään DNA-polymeraasi, tarpeelliset kofaktorit ja kaikki neljä dNTP:tä. Juosteen pidentyminen tapahtuu kaksijuosteisen koettimen joko yhden tai molempien juosteiden 3'-päistä (kuvio 13A). Vaihtoehtoisesti juosteen 3'-pää, jossa on sieppausosa, voidaan blokata estämään alukkeen laajenemista. Yksi tai useampi dNTP leimataan standardimenetelmämääritystä varten (esim. biotiini, digoksigeniini tai fluoresenssit tai radioaktiiviset osat). Leimatun dNTP:n liittäminen johtaa määrityssignaalin amplifikaatioon.

Tätä menetelmää voidaan käyttää lisää hyödyksi käyttämällä moninkertaisia D-silmukkarakenteita kohdentamaan kiinnostuksen kohteena oleva alue (kuten edellä kuvattiin). Kaksijuosteisten alukkeiden 3'-päät, jotka ovat ulospäin kohdealueesta, voidaan joko blokata (kuten kuvattiin ku-

viossa 13B tähdellä) tai ei. Tätä signaaliampelifikaation menetelmää voidaan lisätä edelleen käyttämällä moninker-
 taisia kaksois-D-silmukkarakenteita kohdistamaan kiinnos-
 tuksen kohteena oleva alue (kuten edellä kuvattiin). Kak-
 5 sijuosteisten alukkeiden, jotka ovat kohdealueesta ulos-
 päin, 3'-päät voidaan joko blokata (kuten kuvattiin ku-
 viossa 13B tähdellä) tai ei. Tätä signaaliampelifikaatiomenetelmää voidaan lisätä edelleen käyttämällä monia
 RecA:n helpottamia amplifikaatiokiertoja, kuten edellä
 10 kuvattiin, leimatun osan läsnäollessa.

Kohteen määrittäminen signaaliampelifikaatiolla voidaan myös saada aikaan seuraavasti. Kaksois-D-silmukka muodostetaan kohdesekvenssissä käyttämällä kahta koetinjuostetta, mis-
 15 sä ainakin yksi juosteista sisältää sieppausosan. Saatu kaksois-D-silmukkakompleksi voidaan deproteinisoida ja siepata saattamalla sieppausosa kosketuksiin sieppaus-
 lustan kanssa. Siepattu kompleksi vapautetaan kuumentamalla: kompleksi voidaan vapauttaa joko dsDNA:na tai ss-
 20 DNA:na. Jos tarpeellista, esim. jos kompleksi vapautetaan dsDNA:na, kompleksi denaturoidaan ja kohde-DNA vapautetaan. Tähän seokseen lisätään DNA-synteesialuke (-alukkeita), jo(t)ka on (ovat) komplementaarisia kohdesekvenssin kanssa. Näissä alukkeissa ei ole sekvenssejä, jotka
 25 olivat alkuperäisessä kaksijuosteisessa koettimessa. Sit-
 ten lisätään DNA-polymeraasi ja dNTP, sopivissa puskuriolosuhteissa, syntetisoimaan DNA hybridisoituneesta (hybridisoituneista) alukkeesta (alukkeista). Tämä alukekohdistettu mallisäiesynteesi voidaan suorittaa leimattujen
 30 dNTP:n läsnäollessa, esimerkiksi radioleimatut dNTP:t, biotiini-leimatut dNTP:t, FITC-leimatut dNTP:t tai muut sopivasti leimatut prekursorit. Leiman mukaanliittäminen sallii kohteen kohdistamisen sopivilla määrittämissysteemeillä, kuten fluorometri FITC-leimattujen dNTP:n läsnä-
 35 ollessa.

E. Kaksois-D-silmukkarakenteiden käyttö RecA-proteiinin

helpottamassa in situ hybridisaatiossa.

Eräs toinen menetelmä, jossa käytetään kaksois-D-silmukkarakennetta, on in situ hybridisaatio kiinnitettyjen solujen kanssa (esimerkki 9): RecA:n helpottamat in situ hybridisaatiomenetelmät on kuvattu kanssaomistetussa kansainvälisessä PCT julkaisussa Nro. WO 93/05177 "In situ Hybridization Method", julkaistu 18. maaliskuuta 1993. RecA-proteiinilla peitettyjen kaksois-dupleksikoettimien in situ hybridisaatio antaa kyvyn paikallistaa kohdesekvenssi eristetyssä, kiinnitetyssä biologisessa rakenteessa tai tumassa tai tumatilavuudessa suhteessa muihin kohdistettuihin sekvensseihin ja/tai tumamembraaniin käyttämällä samapolttopisteistä laser pyyhkäisymikroskooppia (van Dekken et al.).

Eräs sovellutus in situ menetelmästä on kuvattu esimerkiksi 9D. Tässä menetelmässä jakaantuvat HEP-2-solut kiinnitetään ja koetetaan RecA/kromosomi-X-alfasatelliitti-DNA-koetinkompleksilla ja leimataan FITC-avidiinilla. Koettimen sitomisen malli jakaantuvissa tumissa arvioidaan käyttämällä standardia valofluoresenssi- tai laser pyyhkäisymikroskooppitekniikoita. Sidotun koettimen paikallistamiseksi samaa kenttää tarkastellaan faasikontrastimikroskoopilla vaihtamatta linssien polttopistettä. Peittämällä saadut kaksi mikrovalokuvaa voidaan nähdä tumamembraanin suhteellinen asema ja tumajakaantumisen taso suhteessa koetin-leimattuihin kromosomeihin.

Tämä keksinnön näkökohta tarjoaa yksinkertaistetut in situ menetelmät paikallistamaan kohdesekvenssi(t) biologisessa rakenteessa. Kiinnitetyt solut tai solunalaiset rakenteet koetetaan suspensiossa tai objektilaseilla, jonka jälkeen on virtaussytometrinen tai mikroskooppinen analyysi. Menetelmä vähentää tekotuotteet eliminoimalla lämpödenaturointivaiheen tarpeen ja sallii nopeamman ja spesifisemmän kohdesekvenssien määrittelyn. Menetelmää voidaan käyttää yhtä hyvin ainutlaatuisiin, pieni- ja/tai

suuri kopiolukuisiin kohdesekvensseihin.

Erityisesti menetelmä sallii pienikopiolukuisten sekvenssien määrityksen ilman että ensin vaaditaan sekvenssien amplifiointia. Koska useimpiin geenikartoitus- ja kromosomitutkimuksiin odotetaan sisältyvän spesifisiä, ainutlaatuisia tai pienikopiolukuisia sekvenssejä, tämä in situ menetelmä tarjoaa tärkeän edun geenikartoitustutkimuksille, samoin kuin diagnostisiin sovellutuksiin, joihin sisältyy ainutlaatuisia tai pienikopiolukuisia normaaleja, mutantti- tai patogeenisiä sekvenssejä. Tämä keksintö sallii myös kromosomisisällön määrityksen virtausytometrisellä määrityksellä.

Tämän in situ menetelmän eräs yleinen diagnostinen sovellutus on käyttö kartoittamaan valikoitua geeniä tai säätelysekvenssiä kromosomissa ja/tai kromosomin erityisessä alueessa. Kohdegeeni voi olla sellainen, joka (a) synnyttää valikoidun geenituotteen, (b) arvellaan suorittavan kriittisen solukontrollitoiminnan, kuten solun tai viruksen onkogeeni, (c) on samankaltainen toistuvan sekvenssin kanssa, (d) uskotaan sisältävän geneettisen vian, joka estää aktiivisen geenituotteen ilmentymisen, (e) saattaa olla samankaltainen kromosomiasemassa markkerikoetinaluueeseen tunnetun kartta-aseman kanssa ja/tai (f) saattaa edustaa integroitunutta virussekvenssiä.

Koetinjuosteet in situ hybridisaatiota varten voidaan leimata lukuisilla tavoilla, mukaanluettuna suora leimaus fluoresenssiosilla, kuten fluoreskeiini-11-dUTP (Boehringer-Mannheim). Lisäksi yksittäisiä koetinjuosteita voidaan käyttää luomaan kytkeytynyt fluoresenssisysteemi, missä esimerkiksi fluoresenssiosan emissioenergia, liittyneenä juosteeseen emittoi valoa toisen fluoresenssiosan, joka on liittynyt toiseen koetinjuosteeseen, kiihdytysenergialla. Sellainen kytketty fluoresenssisysteemi hyödyntää koetinjuosteiden läheisyyden kaksois-D-

silmukkakompleksissa.

5 Kun DNA-koettimet kohdistetaan spesifisiä solupatogeenejä vastaan, tyypillisesti määritettäessä virus- tai bakteeripatogeeneja koskemattomassa solussa, voidaan kiinnitetyt, leimatut solut tutkia valo- tai fluoresenssimikroskoopilla määrittämään ja paikallistamaan infektoivia patogeenejä soluissa. Vaihtoehtoisesti soluinfektio ja prosenttiosuus infektoituneista soluista voidaan määrittää
10 fluoresenssiaktivoitulla solun lajittelulla (FACS) sen jälkeen, kun RecA-proteiinin peittämät dupleksikoettimet on in situ hybridisoitu tumiin tai soluihin suspensiossa (Trask et al.).

15 F. Kaksois-D-silmukkarakenteiden käyttö restriktioentsyymipilkkomiseen perustuvassa määrittelyssysteemissä. Tämän keksinnön kaksois-D-silmukkarakenteita voidaan käyttää määrittämään kohde-DNA:n läsnäoloa näytteessä viemällä muunnoksia kohde/kaksois-D-silmukkakompleksiin,
20 mikä modifioi havaittavalla tavalla tämän kompleksin herkkyyden restriktioentsyymipilkkomista vasten. Alla on kuvattu lukuisia esimerkkejä sellaisista määrittelyssysteemeistä.

25 Eräs määrittelysmenetelmä, joka käyttää hyväkseen kaksois-D-silmukkaa ja restriktioentsyymipilkkomista, on seuraava. Valitaan alue kohde-DNA:ssa kaksoisjuostekoetinsekvenssiksi. Koetinsekvenssi modifioidaan sisältämään sisäinen restriktiokohta, jota ei ole kohde-DNA:ssa. Sellainen
30 restriktiokohta voidaan valita siten, että minimoidaan emäspariyhteensopivuus kohteen ja koettimen välillä (kuvio 14). Sitten muodostetaan kaksois-D-silmukka ja kompleksit deproteinisoidaan. Sitten kompleksit siepataan kiinteään kantajaan ja pilkotaan restriktioentsyymillä,
35 jota varten on tuotu kohta koetinsekvenssissä (kuviossa 14A, PvuII). Vaihtoehtoisesti, kompleksit voidaan pilkkoa restriktioendonukleaasilla ennen sieppausta (kuvio 14B).

Koska PvuII restriktiokohtaa ei ole vielä järjestetty uudelleen, kun koetin hybridisoidaan kohdesekvenssiin, restriktioentsyymi pilkkoo vain renaturoidut koetin:koetinkompleksit, ei koetin:kohdekomplekseja. Kiinteä kannattaja pestään ja siitä tutkitaan määritysosan läsnäolo. Tämä menetelmä sallii minkä tahansa taustasignaalin vähenemisen, jota voidaan syöttää koettimen renaturoinnilla.

Toinen määritysmenetelmä toimii samalla periaatteella. Tässä menetelmässä kohde-DNA on ei-metyloitu ja kaksijuosteinen koetin-DNA metyloidaan ennen RecA-peroteiinipeittämistä. Muodostuu kaksois-D-silmukkakompleksi, kompleksi siepataan ja deproteinisoidaan. Sitten näyte pilkotaan, esimerkiksi DpnI, joka pilkkoo sen tunnistuskohdan (SEQ ID Nro: 2) vain, kun A-jäännös molemmissa juosteissa on metyloitu. Koska metyloitua restriktiokohdtaa ei muodostu, kun koetin hybridisoituu kohdesekvenssiin, DpnI pilkkominen tapahtuu vain, kun koettimet renaturoidaan. Kiinteä kannattaja pestään ja siitä tutkitaan määritysosan läsnäolo. Kuten edellä tämä menetelmä sallii myös minkä tahansa taustasignaalin vähenemisen, jota synnytetään koettimen renaturoinilla.

DNA:n metylointitilaa voidaan myös käyttää hyväkseen käyttämällä kohde/kaksois-D-silmukkakomplekseja seuraavasti. Tässä menetelmässä joko kohde-DNA metyloidaan tai kaksijuosteinen koetin metyloidaan ennen RecA-proteiinipeittämistä. Muodostuu kaksois-D-silmukkakompleksi, kompleksi siepataan ja deproteinisoidaan. Siepatut kompleksit voidaan eristää kiinteästä kannattajasta ja pilkkoa moniin näytteisiin. Yksi näyte pilkotaan metylaasisensitiivisellä tai metylaasi-riippuvaisella restriktioentsyymillä ja toinen pilkotaan metylaasi-insensitiivisellä restriktioentsyymillä: esimerkiksi MboI ei pilko DNA:ta, kun A-jäännös metyloidaan ja Sau3A I pilkkoo saman restriktiokohdan riippumatta A-jäännöksen metylointitilasta.

Sitten näytteet voidaan fraktioida koon mukaan (esim. agarooosi- tai akryyliamidigeeli tai HPLC) ja verrataan näytteiden juovakuvioita. Tämä menetelmä sallii eristyk-
 5 sen ja sen jälkeisen valitun fragmentin restriktiofrag-
 mentin pituuden polymorfisuuden lukuisten näytteiden vä-
 lillä eri lähteistä.

Metylointia voidaan myös käyttää suojaamaan spesifistä
 10 restriktioentsyymikohtaa pilkkomiselta (Nelson et al.).
 Jos esimerkiksi oli toivottavaa eristää MboI-fragmentti,
 joka ulottuu tietyn alueen yli, mutta sisäisesti alueelle
 oli MboI-kohta, fragmentti voitiin eristää seuraavsti.
 Muodostuu kaksois-D-silmukkarakenne sisäiseen restriktio-
 15 tiokohtaan kohde-DNA:ssa käyttämällä metyloituja koetti-
 mia. Kohde/kaksois-D-silmukkakompleksi deproteinisoidaan,
 pilkotaan MboI:llä ja siepataan (kuvio 15A). Tätä mene-
 telmää voidaan käyttää (i) tutkimaan restriktioentsyymi-
 polymorfisuutta restriktiokohdissa, jotka ovat suojatun
 20 kohdan vieressä fragmenteissa, jotka saatiin eri lähteis-
 tä tai (ii) siepataan ja kloonataan haluttu sekvenssi
 käyttämällä restriktioentsyymiä jopa kun sisäinen pilkko-
 miskohta on läsnä tuota entsyymiä varten. Tosiasia, että
 deproteinisoidut kaksois-D-silmukkarakenteet ovat alttii-
 25 ta restriktioentsyymipilkkomiselle, on osoitettu PleI-
 restriktioendonukleaasi kohdistetulla koetin:kohdekom-
 pleksien, jotka muodostuivat 500-meerikoettimien ja 2,9
 kb homologisten kohdefragmenttien kanssa, pilkkomisella.

Kaksijuosteisia RecA-proteiinipeitettyjä koettimia voi-
 30 daan itsessään käyttää suojaamaan spesifistä restriktio-
 entsyymikohtaa pilkkomiselta. Tässä tapauksessa kompleksi
 ei ole deproteinisoitu. Kohde/kaksois-D-silmukkakompleksi
 pilkotaan restriktioendonukleaasilla ja siepataan (kuvio
 35 15B). Vaihtoehtoisesti kaksijuosteisia RecA-proteiinipei-
 tettyjä koettimia voidaan käyttää suojaamaan modifikaatiokohtaa,
 esimerkiksi metylaatiokohta, modifikaatiolta.

Tässä tapauksessa, kuten edellä olleelle restriktiokohdan suojaukselle, kompleksi ei ole deproteinoitu. Kohde/kaksois-D-silmukkakompleksia käsitellään modifioivalla reagenssilla ja sitten deproteinoitetaan. Modifikaatio-

5 kohdekohdat kohde/kaksois-D-silmukkakompleksissa suojataan ja modifikaatio puuttuu.

Kyky blokata restriktiokohtapilkkomista on hyödyllistä geenikartoituksessa. Esimerkiksi, jos kohde-DNA rajaa tietyn alueen genomissa, kuten PvuI-kohta noin 26,3 kb

10 lambda-genomissa, tunnettu kohta suojataan jollain edellä kuvatuista lähestymistavoista. Ei-suojattu ja suojattu lambda-genominen DNA pilkotaan PvuI:llä. Muutos restriktiofragmenttikuvioissa kahden pilkotun palan välillä sal-

15 lii päätellä, mitkä fragmentit ovat vierekkäin -- perustuen juovien katoamiseen ja uusien juovien kokoihin näytteessä, jossa on blokattuja restriktiokohtia.

Restriktioentsyymit ja niiden vasteet metylaatiotiloille on yleisesti saatavilla ja olosuhteet niiden käyttöä varten tunnetaan alalla (Ausubel et al.; Maniatis et al.).

20

G. Kaksois-D-silmukoiden käyttö luomaan kohdistettu pilkkominen DNA:han.

25 Oligonukleotidejä on käytetty ohjaamaan pilkkovia aineita spesifisiin yksijuosteisiin ja kaksijuosteisiin nukleinihappokohtiin (Corey et al.; Dreyer, G.B. et al; Moser, et al.). Eräs oligonukleotidi-ohjatun pilkkomisen etu on, että kokeen tekijä ei ole enää riippuvainen olemassa olevista pilkkomistoiminnoista: mikä tahansa toivottu DNA-pilkkomistoiminta voidaan tehdä räätälintyönä. Tämän keksinnön RecA-proteiinin peittämiä kaksijuosteisia koettimia voidaan käyttää luomaan kohdistettu pilkkominen lukuisilla tavoilla. Esimerkiksi valitaan spesifinen koh-

30 desekvenssi ja luodaan kaksijuosteinen DNA-koetin, joka vastaa valittua sekvenssiä. EDTA-osa on liittynyt yhteen tai molempiin oligonukleotidikoettimen juosteisiin.

35

Dreyer et al. on kuvannut menetelmän EDTA:n liittymisestä oligonukleotidiin tymidiinin C-5:n kautta. Koetin voidaan sitten peittää RecA-proteiinilla ja muodostuu kaksois-D-silmukkakompleksi kohde-DNA:n kanssa. Pilkkominen tapahtuu hapen läsnäollessa Fe(II):n ja pelkistävän aineen (tavallisesti DTT) lisäyksen jälkeen EDTA-koetin:kohdehybrideihin.

Vaihtoehtoisesti, pilkkominen voidaan saada aikaan käyttämällä peptidifragmentteja, jotka on johdettu DNA-sitovista/pilkkovista proteiineista (Sluka, J.P., et al.), jotka ovat kiinnittyneet ologinukleotidikoettiin. Lisäksi restriktioendonukleaasit, joilla on useita pilkkomiskohtia tai suhteellisen ei-spesifiset fosfodiesterääsit, kuten stafylokokkinukleaasi, voidaan liittää oligonukleotidiin luomaan hybridi-katalyyttinen aine, jolla on lisääntynyt sekvenssispesifisyys (Corey et al.).

Oligonukleotidit ovat kiinnittyneet fosfodiesterääsiin tai muuhun pilkkovaan aineeseen joko ennen RecA-proteiinin peittämistä tai kaksois-D-silmukkakompleksin muodostumisen ja deproteinisoinnin jälkeen. Sen jälkeen kun fosfodiesterääsi, nukleaasi tai peptidi on yhdistynyt kaksois-D-silmukkakompleksin kanssa, modifioidaan reaktio-olosuhteita sallimaan molempien kohde-DNA-juosteiden hydrolyysi kohdistetulla tavalla. Riippuen katalyyttisen aineen aktiivisuudesta, joko yksi tai molemmat kaksijuosteisen koettimen juosteista modifioidaan sisältämään aine.

H. Kaksois-D-silmukan käyttö DNA:n rikastamisessa.

Tämän keksinnön kaksois-D-silmukkahybridisaatiokompleksia voidaan myös käyttää erottamaan ja rikastamaan valittuja kohde-DNA-sekvenssejä. Kaksijuosteinen koetin voidaan muodostaa esimerkiksi sisältämään sieppausosa yhdessä tai molemmissa koetinjuosteissa. Muodostuu kaksois-D-silmukkakompleksi kaksijuosteisen koettimen ja kohde-DNA:n vä-

lille, jota on DNA-seoksessa. Kaksois-D-silmukkakomplek-
sit, joissa on koetin- ja kohdesekvenssi, erotetaan sit-
ten reaktioseoksesta käyttämällä sieppausosaa, esimerkik-
si liittämällä kiinteään kannattajaan. Kompleksi voidaan
5 sitten dissosoida kuumentamalla vapauttamaan kohde-dup-
pleksi kannattajasta ja jos tarpeellista, vapautunut DNA
renaturoidaan regeneroimaan alkuperäinen kohde-dupleksi-
DNA. Vaihtoehtoisesti koko kaksois-D-silmukka saatetaan
yksinkertaisesti vapauttaa kiinteästä kantajasta.

10 Jotta testataan, voidaanko kohdennettu dupleksi DNA va-
pauttaa hybridistä yksinkertaisesti kuumentamalla, tut-
kittiin deproteinisoitujen kaksois-D-silmukkahybridien,
jotka muodostuivat ^{32}P -päästä leimatuista 500-meeri-koet-
15 timista ja 10,1 kb *ApaI*-kohdefragmentista, terminen sta-
biilisuus: hybridit olivat täysin stabiileja 75°C:ssa
1xTBE-puskurissa. Noin puolet DNA-koetinjuosteista vapau-
tui 80°C:ssa. Olenaisesti kaikki DNA-koetinjuosteista
vapautui kohteesta 85°C:ssa. Tämä sulamisprofiili on sa-
20 manlainen kuin duplekseille koetin:kohdehybrideille, joi-
ta muodostui kuumentamalla ja sitten hitaasti jäähdyttä-
mällä reaktioseos *RecA*-proteiinin puuttuessa. Hybridin
sulamisprofiili oli likimäärin 10°C alempi kuin dupleksin
500-meeri-koettimen, itse-hybridisoitunut samanlaisissa
25 ionisissa olosuhteissa.

Hybridisaatioreaktio on potentiaalisesti hyödyllinen koh-
dentamaan kromosomaalisia tai geenifragmentteja, jotka
vain sekvenssimerkityt kohdat tunnistavat (STSs) (Olson,
30 et al.) seuraavista syistä.

(i) *RecA*-välittämä hybridisaatioreaktio ei vaadi dupleksi
DNA-kohteen denaturointia hybridin muodostumista varten,
ja

35 (ii) kohteet vapautuvat eristetyistä hybrideistä kuumen-
tamalla lämpötilaan, joka hajottaa koettimen koetin:koh-
dekompleksin, mutta ei denaturoi dupleksikohdetta sisäl-
tävää analyyttiä, esim. kromosomaalinen tai geenin sisäl-

tävä fragmentti. Kohde-DNA-analyytti voidaan sitten saada takaisin dupleksimuodossa.

5 Lisäksi hybridin sulamislämpötilan huolellinen kontrolli
sallisi valitsemisen hybridejä vastaan, joilla saattaisi
olla vain osittaista homologiaa koettimen kanssa. Ehdoton
sulamislämpötilavalinta voi olla tärkeää, kun koettimia
käytetään kohde-DNA:n kompleksiseoksien kanssa. Eräs etu
saada takaisin duplexi kohde-DNA versus kaksijuosteinen
10 denaturoitu kohde-DNA, on että duplexi DNA on taipuvai-
nen olemaan resistentimpi leikkausvoimille kuin kokonaan
denaturoitu yksijuosteinen DNA. Duplexin kohde-DNA:n
takaisinsaaminen tämän keksinnön menetelmällä sallisi
spesifisen dupleksigeenin tai genomisegmenttien, suuret
15 kromosomaaliset fragmentit mukaanluettuina, rikastamisen
ja eristämisen, mitä voidaan sitten käyttää edelleen ma-
nipulointeihin ja/tai analyysiin.

20 Kohde-DNA-duplekseja, jotka saatiin tällä menetelmällä,
voidaan käyttää DNA-amplifikaatioreaktioissa (Mullis;
Mullis et al.) tai standardeissa kloonaustekniikoissa
(Ausubel et al; Maniatis et al).

I. Homogeeninen diagnostinen määrittäminen

25 Homogeeniselle diagnostiselle määrittämiselle, joka voi
määrittää spesifisen natiivin kohde-DNA-duplexin, on
testattu protokolla. Tähän määrittämiseen sisältyy kaksi-
juosteisen kohteen sieppaus käyttämällä kaksois-D-silmuk-
kahybrideitä, jonka jälkeen on DNA-signaaliampifikaatio,
30 kuten alla on lyhyesti kuvattu.

(i) Kaksijuosteisten DNA-kohteiden sieppaus

35 Tekniikkaa voidaan suunnitella käyttämään kaksois-D-sil-
mukkahybridejä spesifisesti sieppaamaan suuri kaksijuos-
teinen DNA, kuten lambda-DNA-genomi (-50 kb). Reaktiota
voidaan myös soveltaa sieppaamaan pienempiä duplexia
DNA-kohteita. Tekniikka käyttää RecA-peitettyjä yksijuos-

teisia koettimia, jotka on leimattu sieppausosalla, kuten biotiini, edullisesti ollen keskimäärin 300-500 emästä kooltaan. Kaikki DNA-koettimet ovat edullisesti homologia sekvenssien kanssa, edullisesti noin 1000 emäksen alue duplexi-DNA-kohteessa. Biotinyloidut koettimet valmistetaan nick-translaatiolla, edullisesti noin 1000 bp DNA-dupleksifragmentti bio-14-dATP:n läsnäollessa. Lämpödenaturoitu koetin-DNA peitetään RecA-proteiinilla ja sitten annetaan reagoida dupleksin kohde-DNA:n kanssa.

Sen jälkeen kun koetin:kohdehybridi on muodostunut, voidaan hybridisaatioreaktioseos pysäyttää, esimerkiksi 20 mM EDTA:lla ja käsitellään 0,5 M suolalla ja hybridit voidaan siepata pestyyn magneettiseen Dynabeads[®] M-280 Streptavidiniin (Dynal). Sieppauksen jälkeen helmet pestään 3X puskurissa, jossa on 1 M suolaa. On todennäköistä, että korkeat suolaolosuhteet ainakin osittain poistivat osan sidotusta RecA-proteiinista. Kohde-DNA-sieppaus voidaan mitata käyttämällä ³²P-leimattua lambda-DNA:ta ja suoraan laskemalla radioaktiivisuus, joka jää liittyneenä helmiin pesun jälkeen. Sieppausreaktion, jossa käytettiin suurta lambda-DNA-genomia (-50 kb), tulokset nähdään taulukossa 3. Biotinyloidun koettimen, joka oli hybridisoitunut kaksijuosteisen kohteen kanssa, sieppauksen reaktion spesifisyys varmistettiin liittämällä mukaan 3 kontrollireaktiota (taulukko 3, reaktiot 2-4). Nämä reaktiot osoittivat että: (1) Vaadittiin RecA-peitettyä biotinyloitua koetinta spesifiseen kohde-DNA:n sieppaamiseen (reaktio 1), koska merkittävää signaalia ei saatu reaktiossa ilman RecA:ta (reaktio 2), (2) RecA:n sisällyttäminen reaktioon ei ollut syy kohdesieppaukseen, koska esiintyi vain taustatason DNA-sieppausta ei-biotinyloidun ei-homologisen DNA-koettimen, joka on peitetty RecA:lla, läsnäollessa (reaktio 3) ja (3) keskimääräinen tausta, ei-spesifinen kohde-DNA-sieppaus oli noin 3,5 % (reaktiot 2-4).

(ii) Signaaliampelifikaatio siepatusta DNA:sta

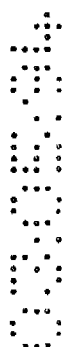
Alla on kuvattu lyhyesti prototyypin protokolla havaitsemaan helmien sieppaama kohde-DNA. Tätä vaihetta varten siepattu kohde vapautetaan helmistä kuumentamalla reaktioseoksessa, jossa on dNTP-prekursoreita, joista yksi tai useampi on leimattu (esim. bio-14-dATP:llä tai dNTP:llä suoraan määritettävällä leimalla, kuten FITC-11-dUTP, jne...) ja ss DNA-aluke (tai alukkeita), jo(t)ka ei(vät) ole homologinen (homologisia) alkuperäiselle sieppauskoetinsekvensseille, mutta homologinen (homologisia) vain kohdesekvenssien kanssa, lisätään ja annetaan hybridoitua yksijuosteisiin kohde-DNA:n. Hybridisoitumisen jälkeen reaktio jäädytetään ja DNA-polymeraasientsyymi, edullisesti DNA-polymeraasi T7 (Sequenase[®] Verion 2,9, USB) ja sopiva puskuri lisätään sallimaan DNA-synteesiä alukkeen pidentymisellä. Vaihtoehtoisesti voitaisiin myös käyttää korkean lämpötilan polymeraasia ja reaktiota inkuboidaan lämpötilassa, joka sallii prosessiivisen DNA-synteesin. Alukkeen pidentymisen aikana liitetään leimattu(j)a DNA-prekursoria (-prekursoreita) uudestaan syntetisoituun (syntetisoituihin) DNA-juosteeseen (-juosteisiin). Koska DNA-aluke (-alukkeet) ei(vät) ole homologinen (homologisia) aikaisemmin käytetyn (käytettyjen) RecA-peitetyn (-peitettyjen) koettim(i)en kanssa, leiman liittäminen osoittaa spesifisesti oikein siepatun kohteen läsnäolon. Sieppausosan käyttö joko suoraan liittyneenä alukkeeseen (alukkeisiin), kuten poly(A), tai joka voidaan lisätä myöhemmin, sallii amplifioituneen kohdesignaalin, joka on oligo(dT):ssä kiinnittynään magneettihelmiin, selluloosaan, jne, myöhemmän sieppauksen. Sieppausta seuraa ei-liittyneen prekursorileiman poisto amplifioituneesta DNA:sta ja jos tarpeellista, käytetään blokkusainetta, kuten esimerkiksi I-Block (Southern-Light[™], Tropix) blokkamaan ei-spesifinen määritysaineen sitoutuminen (esim. AVIDx-AP, Tropix) sieppausmatriisiin. Blokkauksen jälkeen lisätään substraattia sallimaan spesifinen signaalin määrittäminen amplifioituneesta kohde-DNA:sta ja signaali määritetään millä tahansa sopivalla keinolla. Kaavioimainen luonnos

homogeenisestä diagnostisesta kaksois-D-silmukkamäärityksestä nähdään alla seuraavasti. Vaikka esitetään spesifinen leimaus-, sieppaus- ja määrittyskaavio, on lukuisia tapoja, joissa sellainen määrittys voitaisiin toteuttaa käytännössä.

5

Kaavioimainen luonnos homogeenisestä diagnostisesta dupleksi-DNA-kohteista kaksois-D-silmukkahybridien kanssa osoitetaan seuraavassa:

10



Määrittysvaiheiden kuvaus

Perusreaktiot

Koetin:kohdehybridien muodostuminen RecA-peitetty ss biotinyloitu
DNA-kohteet + dupleksit kohde-DNA

Sekoita ja inkuboi 37°C:ssa 45 min - 1 h

- + EDTA ja 0,5 M suola
- + magneettiset helmet

10 Homologisen dupleksin kohde-DNA:n
sieppaus helmiin

Helmet siepattu
Koetin:kohde-DNA-hybridit

15 Ei-hybridisoituneen DNA:n poisto pesemällä

Pesut 1 M NaCl-puskurissa

Pestyt helmet siepattujen hybridien kanssa

20

Kohdesignaaliamplyfikaatio

Lämpödestabiloi hybridit

1. Hybridoi kohde alukseen (alukkeiden)* kanssa

Poista helmet

25

Kuumenna kohde-DNA poly(A):n kanssa (sieppaa) aluke (alukkeet)* [100°C, 5 min], jäähdytä

30

Alukkeet hybridoitu DNA-kohdejuosteiden kanssa

2. Laajenna aluketta (alukkeita) DNA-polymeraasin kanssa biotinyloidun (biotinyloitujen) nukleotidi(e)n liittämiseksi

+ polymeraasi [esim. T7 Sequenase Version 2,0]
ja reaktantit leimattu (leimatus) DNA-prekursori(t) mukaanluettu(i)na [esim. bio-

Toista

35

14-dATP]

Kohdesignaalin määrittäminen

5

Leimattu kohde-DNA

1. Amplifioidun DNA:n sieppaus

10

+ oligo dT helmet
 Pesut 0,5 M NaCl-puskurissa

Siepattu biotinyloitu kohde-DNA

2. Reaktio avidiini-alkaalisien fosfataasin (AP) kanssa

15

Pesut 0,5 M ja 0,1 M NaCl-
 puskuureissa
 Helmien blokkauk-
 + AVIDX-AP

AP-leimattu DNA helmillä

20

3. Amplifioituneen DNA:n määrittäminen

Pesu substraattipuskurissa
 + AP-substraatti
 Signaalin tuottaminen

Signaalin määrittäminen

* ei-homologinen koetin-DNA:n kanssa, homologinen toivotun kohde-DNA:n kanssa

25

Seuraavat esimerkit valaisevat, mutta eivät millään tavalla ole tarkoitettu rajoittamaan tätä keksintöä.

5 Restriktioentsyymit saatiin Boehringer Mannheimilta (Indianapolis, IN) tai New England Biolabs (Beverly MA) ja käytettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

10 Yleisesti, oligonukleotidit radioleimattiin [γ - ^{32}P]ATP:llä ja T4-polynukleotidikinaasilla. Leimausreaktiot suoritettiin puskureissa ja valmistajan suosittelimilla menetelmillä (New England Biolabs, Beverly MA; Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg MD; tai Boehringer/Mannheim, Indianapolis IN). Oligonukleotidit erotettiin puskurista ja liittymättömät trifosfaatit käyt-
15 tämällä Nensorb 20-esi-muodostettua pylvästä (NEN-DuPont, Boston, MA) valmistajan ohjeiden mukaisesti ja sen jälkeen dialysoitiin versus dd H₂O, jos tarpeellista.

20

Esimerkki 1

RecA-peittämien koettimien valmistus

25

On luotu kaksi- ja yksijuosteisten DNA-koettimien ja alukkeiden sarjoja. Kuviossa 1 nähdään näiden koettimien ja alukkeiden asemat suhteessa viereiseen lambdan faagigenomin 500 emäsparin alueeseen: kuviossa 2 on esitetty lambdagenomin nukleotidisekvenssin tämä alue. Jokaisen koettimen ja alukkeen 5'- ja 3'-pään emäsasemat, suhteessa lambdan virusgenomiin on luetteloitu
30 taulukossa 1.

Taulukko 1

Lambda-emäksiä, jotka kuvaavat koetin- ja aluke-DNA-sekvenssejä

35

Koetin tai aluke	Emäkset mukaanleuttuna sekvenssi*	Koko (emäs) tai (bp)
------------------	-----------------------------------	----------------------

	PCR01*	7131-7155	25
	PCR02*	7606-7630	25
	PCR03A*	7351-7390	40
	DL80-1*	7131-7210	80
5	DL80-2**	7131-7210	80
	DL80-3*	7551-7630	80
	DL80-4**	7551-7630	80
	500(ds)	7131-7630	500
	280(ds)	7351-7630	280
10	159(ds)	7472-7630	159
	121(ds)	7351-7471	121
	Biotiini-121*	7351-7471	121
	121- ³² P**	7351-7471	121
	70(ds)	7552-7630	79
15	Biotiini-79*	7552-7630	79

* 5'-juoste

** Vastakkainen juoste.

Taulukko 2

Koetin:kohdehybridien sieppaus helmeen osoittaa, että RecA-katalysoitu kaksois-D-silmuk-
katuote sisältää 2 DNA-koetinjuostetta

5

10	Reaktio	RecA	Koetinjuoste(et)		³² P radioaktiivinen DNA	
			Biotiini (siepattu) DNA)	³² P (radioaktiivinen reportteri-DNA	lukua siepattu % kokonais lukua/min	Korjattu % lukua/min*
15	1	-	+	+	4	0
	2	+	-	+	11	0
	3	+	+	-	0	0
	4	+	+	+	110	98

* Katso kuvio 8 näyttereaktoiden selitykseksi. Prosenttiosuudet laskettiin ³²P-luvuista, jotka jäivät Dynal streptavidini-peitettuihin helmiin jokaisen sieppausreaktion jälkei-
sen 3 pesun jälkeen 1X asetaattireaktiopuskurilla. Odotetut kokonais-³²P-luvut/min määri-
tettiin tuikelaskemalla DNA jauhetuissa geeliivipaleissa kokeista, jotka olivat identti-
set kuviossa 8 olleiden kanssa. Koska ei lisätty radioaktiivista DNA:ta reaktioon 3
(sisälsi biotiinisieppauskoettimen vain), ei radioaktiivisia lukuja odotettu tähän reak-
tioon.

† Radioaktiiviset ³²P-luvut DNA:ssa korjattiin ei-spesifiselle taustan DNA-lukujen helmen
sieppaukselle (s.o. luvut reaktiosta 2 ilman biotiinisieppauskoetinta).

30

Alukkeet PCR01 ja PCR02 vastaavat alukkeita, jotka on toimitettu "GENEAMP" DNA-amplifikaatiotestipakkauksessa (Perkin Elmer Cetus, Norwalk CT).

- 5 Yksijuosteiset alukkeet (PCR01, PCR02 ja PCR03A) ja yksijuosteiset koettimet (DL80-1-4, biotiini-121, 121-³²P ja biotiini-79) syntetisoitiin kemiallisesti käyttämällä kaupallisesti saatavilla olevia fosforamidiitti prekursoreita Applied Biosystems 380B DNA-syntetisoijassa (Applied Biosystems, Foster City CA).

- 15 DNA-molekyylit biotinyloitiin reaktiolla biotiinifosforamidiitin kanssa viimeisessä 5' emäksessä (New England Nuclear-DuPont, Boston, MA) ennen blokkauksen purkamista. Kaikki kemiallisesti syntetisoidut DNA-molekyylit deblokattiin valmistajan teknisten tietojen mukaisesti.

- 20 Lyhyitä DNA-koettimia (25-meeri) käytettiin ilman lisäpuhdistusta. Yksijuosteiset 80-meeri ja 121-meeri DNA-koettimet puhdistettiin polyakryyliamidigeelielektroforeesilla käyttämällä 8 % ja 5 % tai 8 % polyakryyliamidigeelejä, vastaavasti. Saatiin täysikokoisia DNA-tuotteita leikkaamalla DNA-juovat geeleistä, jotka vastasivat oikean kokoista DNA-molekyyliä. DNA-molekyylit saatiin takaisin geelipaloista elektroeluaatiolla käyttämällä "ELUTRAP" systeemiä (Schleicher ja Schuell, Keene, NH). Sekä koettimet että alukkeet väkevöitiin standardilla etanolisaostumisella (Maniatis et al.).
- 30 Koetin- ja aluke-DNA-konsentraatiot määritettiin perustuen UV-absorbanssiin 260 nm:ssä laimennetusta DNA:sta.

- 35 Lambda-genomin kaksijuosteiset 500 ja 280 bp alueet (kuvio 1) syntetisoitiin käyttämällä alukkeita PCR01 ja PCR02 tai PCR03A ja PCR02, vastaavasti, Taq-polymeraasia ja standardia DNA-amplifikaatioreaktio-olosuhteita (Perkin Elmer Cetus; Mullis; Mullis et al.). Amplifi-

kaatiotuotteet erotettiin DNA-alukkeista elektroforeesilla 0,7 % agarosi- (Sigma type II, Sigma, St. Louis MO) geelissä (500-meeri) tai 0,4 % "NUSIEVE" (FMC BioProducts, Rockland, ME) agarosigeelissä (280-meeri).

5 DNA-molekyylit juovissa vastaten amplifikaatiotuotteita elektroeluoitiin, väkevöitiin ja niiden todelliset konsentraatiot määritettiin kuten edellä kuvattiin.

10 Kaksijuosteiset 121- ja 159-meerikoettimet saatiin puhdistetun 280-meerin restriktopilkkomisella käyttämällä entsyymiä AluI (New England Biolabs, Beverly MA). DNA-koettimet eristettiin geilelektroforeesilla, elektroeluoitiin ja väkevöitiin kuten edellä.

15 Kaksijuosteinen 79-meerikoetin saatiin puhdistetun 500-meerin restriktopilkkomisella käyttämällä entsyymiä HpaII. Pilkkomistuotteet erotettiin ja puhdistettiin leikkaamattomasta DNA:sta lelektroforeesilla käyttämällä joko 3 % tai 4 % "NUSIEVE" (FMC BioProducts) geelejä tai 1 % agarosigeelejä. Geeleistä saatiin spesifiä DNA-fragmentteja, kuten edellä kuvattiin.

20

25 Yksijuosteiset tai kaksijuosteiset DNA-molekyylit leimattiin 5'-päästä (Maniatis et al.) [$\gamma^{32}\text{P}$ ATP:llä ja T4 polynukleotidikinaasilla Promega, Madison WI). Jos tarpeellista, DNA-molekyylit defosforyloitiin alkaalisella fosfataasilla (Boehringer Mannheim, Indianapolis IN) ennen kuin leimattiin T4 polynukleotidikinaasilla. Eiliittynyt leima poistettiin käyttämällä "NEOSORB 20"

30 nukleiinihapon puhdistuspylvästä (NEN-DuPont). Leimatut DNA-molekyylejä voitiin puhdistaa lisää dialyysillä steriiliä, kahdesti tislattua, vettä vastaan, jonka jälkeen väkevöitiin kylmäkuivaamalla. Saatiin myös ^{32}P -päästä leimattu 121-, 159- tai 79-meeri ^{32}P -pää-leimattun 280-meerin tai 500-meerin sopivalla restriktioentsyymipilkkomisella.

35

Esimerkki 2Villityypin RecA- ja mutantti RecA 803-proteiinien puhdistus

- 5 RecA- ja recA-803-proteiinit eristettiin ylituottavista kannoista JC12772 ja JC15369 (saatu A.J.Clark ja M. Madiraju). Näissä kannoissa ovat RecA- ja recA-803-koodaussekvenssit plasmideilla suurena kopiolutukuna/solu.
- 10 Kokonaisproteiinin analyysi JC12772- ja JC15369-soluuutteista SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla, denaturoivissa olosuhteissa, osoitti, että 38 000 daltonin RecA- tai recA-803-proteiini on pääproteiini, jota näissä kannoissa tuotetaan.
- 15 RecA- ja recA-803-proteiinit puhdistettiin modifioimalla jo olemassa olevia menetelmiä (Shibata et al., 1981; Griffith et al., 1985) käyttämällä nopeaa proteiinintekromatografiaa (FPLC) käyttämällä hydroksyyliapatiittipylvästä, joka on saatu jauheena (BioRad), jonka jälkeen anionin ("MONO Q", Pharmacia) vaihtopylvästä.
- 20

Proteiini puhdistusta tarkkailtiin seuraavasti:

- 25 (i) tunnistettiin 38 000 daltonin RecA-proteiini SDS-PAGE:lla ("PHASTGEL" systeemi, Pharmacia, Piscataway NJ);
- (ii) RecA ssDNA-riipuvaisen ATPaasi-aktiivisuuden määrittäminen käyttämällä [γ - 32 P]ATP:tä ja yksijuosteista DNA:ta (Shibata et al., 1981). Reaktion tuotteet erotettiin käyttämällä PEI-selluloosa ohutlevykromatografiaa (EM Science, NJ): PEI-maljat kehitettiin liuottimessa, jossa oli 0,5 M LiCl ja 0,25 M muurahaishappo. Tuotteet määritettiin autoradiografialla.
- 30 (iii) DNAasi-aktiivisuuden määrittäminen. DNAasi-aktiivisuutta tarkkailtiin inkuboimalla RecA-proteiininäytteitä seoksen kanssa, jossa oli phiX174 suoristettuna ja superkoil sirkulaarinen kaksijuosteinen RF ja sirkulaarinen yksijuosteinen DNA RecA juosteensiirtopuskurissa
- 35

(Cheng et al., 1988) 1 h 37°C:ssa. DNA-nicking:ä ja pilkkomista tarkkailtiin deproteinisaation jälkeen tekemällä nähtäväksi DNA:ta etdiumbromidilla agarosigeelielektroforeesin jälkeen ja vertaamalla jokaisen DNA-tyypin RecA-inkuboiduissa näytteissä määriä niiden kanssa, joita inkuboitiin puskurissa ilman RecA:ta. Käytettiin vain RecA-proteiininäytteitä, jotka osoittivat ei-havaittavaa DNAasi-aktiivisuutta.

(iv) D-silmukka-aktiivisuuden määrittäminen 500-meeri-oligonukleotidikoettimen kanssa käyttämällä menetelmää, joka on modifioitu Cheng et al. (1988) menetelmästä.

Hopeavärjätyt SDS-polyakryyliamidigeeliprofiilit lopullisesta "MONO-Q"-puhdistetusta RecA- ja recA-803-proteiineista osoittivat yksittäisen 38 000 daltonin juovan jokaisesta valmisteesta, jossa ei olennaisesti ollut muita solun polypeptidejä.

Esimerkki 3

RecA-proteiini peittämisreaktiot

Koettimien RecA-proteiinipeittäminen suoritettiin normaalisti standardissa 1X RecA-peittämisreaktiopuskurissa (10X RecA reaktiopuskuri: 100 mM Tris-asetaatti (pH 7,5 37°C:ssa), 20 mM magnesiumasetaatti, 500 mM natriumasetaatti, 10 mM DTT ja 50 % glyseroli (Cheng et al 1988). Kaikki koettimet, olivatpa kaksijuosteisia tai yksijuosteisia, denaturoitiin kuumentamalla 95-100°C:een 5 min, laitettiin jäihin 1 min ja altistettiin Tommy-sentrifuugissa sentrifugaatiolle (10 000 rpm) 0°C noin 20 sek. Denaturoidut näytteet lisättiin välittömästi huoneenlämpötilan RecA-peittämisreaktiopuskuriin, joka oli sekoitettu ATPγS:n ja laimentimen (kahdesti tislattu H₂O) kanssa, jos tarpeellista.

Tässä reaktioseoksessa oli tyypillisesti seuraavat komponentit: (i) 2,4 mM ATPγS; ja (ii) 10-40 ng kaksijuos-

teista koetinta. Tähän seokseen lisättiin nopeasti joko (i) 1 μ l RecA-proteiinia, tavallisesti 5,2 mg/ml (ostettu Pharmacialta tai puhdistettu kuten edellä kuvattiin) tai (ii) yhtä suuri tilavuus RecA-varastopuskuria (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 1,0 mM DTT ja 50 % glyseroli) ja sekoitettiin. Lopullinen reaktiotilavuus koettimen RecA-peittämiselle oli tavallisesti noin 10 μ l. Koettimen RecA-päällystäminen aloitettiin inkubamalla koetin-RecA-seoksia 37°C:ssa 10 min.

10

RecA-proteiinikonsentraatiot peittämisreaktioissa vaihtelivat koettimen koon ja lisätyn koettimen mukaan: RecA-proteiinikonsentraatio oli tyypillisesti alueella 6,8-51 μ M. Kun yksijuosteisia DNA-koettimia peitettiin RecA:lla riippumatta niiden komplementaarista koetinjuosteista, vähennettiin kummankin ATP γ S- ja RecA-proteiinikonsentraatiot puoleen konsentraatioista, joita käytettiin kaksijuosteisille koettimille: se tarkoittaa, että RecA-proteiini- ja ATP γ S-konsentraatiosuhteet pidettiin vakiona yksittäisten koetinjuosteiden annetulle konsentraatiolle.

Kuvio 3 osoittaa autoradiogrammin kuvaten RecA-proteiinin sitoutumisen 121-meerin ja 159-meerin DNA-koettiin mitattuna DNA-juovan siirtomäärityksillä. Lämpödenaturoidut 32 P-leimatut kaksijuosteiset 121-meerin ja 159-meerin DNA-koettimien annettiin reagoida RecA-proteiinin kanssa, kuten edellä kuvattiin. Lopullisissa RecA-DNA-reaktioseoksissa oli 2,4 mM ATP γ S:ää. Jokaiseen neljään reaktioon, jossa oli 0,01 μ g joko denaturoitua 121- tai 159-meeri-DNA-koetinta, lisättiin RecA-proteiinia tai RecA-varastopuskuria. RecA:n lopullinen konsentraatio jokaisessa reaktiossa oli 0, 0,137, 1,37 tai 13,7 μ M linjoissa 1 ja 5, 2 ja 6, 3 ja 7 tai 4 ja 8, vastaavasti (kuvio 3). Kaikki RecA/DNA-koetin peittämisreaktiot suoritettiin lopullisessa 10 μ l:n tilavuudessa. RecA:n sitominen aloitettiin inkuboimalla

kaikkia reaktioita 37°C:ssa 10 min. 5 µl eriä kutakin reaktiota laitettiin 2 % agarosigeeliin 1X TE-puskurissa ja elektroforesoitiin 9,2 v/cm 2 h. φX-174 DNA:n HaeIII-pala (GIBCO-BRL, Gaithersburg MD) toimi kaksijuosteisen DNA:n kokomarkkerina (M). Markkeri-DNA leimattiin 5'-päästä ³²P:llä kuten edellä on kuvattu. Geeli kuivattiin ilmassa saran-kääreessä Bioscycler-uunissa 65°C:ssa. Kuivattu geeli altistettiin sitten röntgenfimille.

Kuten kuviosta 3 voidaan nähdä, lisääntyy DNA-koettimien elektroforeettisen liikkuvuuden hidastuminen kasvavan RecA-konsentraation mukana.

Samoja olosuhteita kuin edellä kuvattiin, käytettiin recA-803-proteiinille.

Esimerkki 4

RecA-proteiinin välittämien monikertojen muodostuminen

Koettimen peittämisreaktiot suoritettiin kuten esimerkiksi 3 kuvattiin. Sen jälkeen kun peittäamisreaktiot olivat täydelliset, lisättiin jokaiseen reaktioon kohde-DNA:ta. Kohde-DNA johdettiin lambda-virusgenomista ja jos pilkottiin restriktioentsyymillä, oli siinä DNA-fragmentteja, jotka olivat homologisia koetinsekvenssin kanssa ja ei-homologisia yhtä hyvin. Lisättiin tyypillisesti 0,66-1,5 µg kohde-DNA:ta jokaiseen reaktioon 1X reaktiopuskurissa. Kokonaisreaktion magnesiumionikonsentraatio säädettiin 12 mM:ksi lisäämällä erä 0,2 M magnesiumasetaattia. Lopulliset reaktiutilavuudet olivat tavallisesti 20 µl kohde-DNA-lisäyksen jälkeen.

Koetin-kohdeseoksia inkuboitiin 37°C:ssa sallimaan RecA-katalysoidut homologiset koetin:kohdereaktiot. Sen jälkeen, kun oli inkuboitu 60 min, reaktiot deproteinoitiin proteinaasi K:lla (10 mg/ml) 37°C:ssa 15-20

min, jonka jälkeen lisättiin natriumdodekyylisulfaattia (SDS) lopulliseksi konsentraatioksi 0,5-1,2 % (w/v). Annos jokaista reaktiota laitettiin kaivoihin 0,7-1,0 % agarosigeeleihin, sen jälkeen kun oli lisätty seurantaväriä (Maniatis et al.). Geelejä elektroforesoitettiin joko huoneenlämpötilassa tai 4°C:ssa. Geelit värjättiin etidiumbromidilla ja DNA-molekyylit tehtiin näkyviksi UV-valolla. Geelit valokuvattiin käyttämällä punaista suodatinta ja Polaroid 667 musta-valkoista filmiä.

10

Kun reaktioissa käytettiin radioleimattuja DNA-koettimia, määritettiin koetin:kohdekompleksit autoradiografialla joko määristä tai kuivatusta agarosigeeleistä käyttämällä joko DuPont "CRONEX QUANTA III" tai "LIGHTENING PLUS" vahvistusvarjostimia ja Kodak "X-OMAT AR5" filmiä. Signaalin määrän määrittämiseksi kohde-DNA-juovat, jotka osoittivat signaalia autoradiogrammeissa, leikattiin geeleistä, murskattiin, suspendoitiin tuikkoktaliin ("AQUASOL-2", DuPont-NEN, Boston MA), ja radioaktiivisuus laskettiin Packard 2000 CA Tri-Carb nestetuikeanalyysattorissa.

20

Kaksijuosteisten 280-meeri- ja 500-meerikoettimien (taulukko 1) annettiin reagoida kaksijuosteisen lineaarisen kohde-DNA-fragmentin kanssa (8370 bp lambda DraI pilkottu fragmentti, jossa on jokaista koetinsekvenssiä), kuten edellä kuvattiin. Denaturoidut koetin-DNA-molekyylit peitettiin RecA-proteiinilla 2,4 mM ATP-γS:n ja 34,2 μM RecA-proteiinin läsnäollessa. Denaturoidut koettimet, joita ei peitetty RecA-proteiinilla, lisättiin samoihin reaktio-olosuhteisiin miinus RecA-proteiini. Sen jälkeen kun oli inkuboitu 10 min 37°C:ssa, lisättiin jokaiseen koetinseokseen 0,66 μg lambdan genomista DNA:ta, joka oli pilkottu restriktioentsyymillä DraI: genomisen DNA suspendoitiin 1X reaktiopuskuriin, jossa oli säädetty Mg²⁺-konsentraatio, kuten edellä kuvattiin. Lopullinen mikromoolinen kaksijuos-

25

30

35

teisen koettimen suhde homologiseen kaksijuosteiseen kohdefragmenttiin oli 10,6:1 500-meerille ja 21,6:1 280-meerille. Koetin:kohdereaktioiden inkubaatio suoritettiin, kuten edellä kuvattiin.

5

Reaktiot deproteinoitiin ja laitettiin 0,7 % aga-roosigeeliin. DNA:lle tehtiin elektroforeesi koetin- ja kohde-DNA-fragmenttien erottamiseksi. Valokuva etidiumbromidivärjätystä DNA:sta geelissä, jossa oli nämä reaktiot, nähdään kuviossa 4A. Kolme reaktiota vasemmalla puolella ovat kontrollireaktioita käyttämällä pUC18 kaksijuosteista sirkulaarista DNA-kohdetta ja RecA-peitettyä yksijuosteista 69-meeri-koetinta (nämä kontrollisubstraattit antoi B. Johnston, SRI, Menlo Park, CA). Keskilinjassa oli 1 kb markkeri-DNA (GIBCO-BRL). Neljä reaktiota geelin oikeassa laidassa olivat lambda DraI-pilkottuja kohde-DNA:ta.

10

15

20

25

30

Tämä geeli kuivattiin ja altistettiin röntgenfilmille, kuten edellä kuvattiin. Saatu autoradiogrammi nähdään kuviossa 4B. Sekä RecA-peitettyt 500-meeri- ja 280-meerikoettimet hybridioituivat spesifisesti oikean kohdefragmentin kanssa, joka oli DraI lambda DNA-pala. Koetin:kohde-DNA-homologian asema on vähintään 832 bp 8370 bp kohdefragmentin 3'-päästä. Tämä tulos osoittaa 500-meeri- ja 280-meeri-RecA-helpottaman DNA-hybridisaatiotuotteiden muodostumisen, jotka ovat stabiileja deproteinoinnille. Näiden stabiilien DNA-kompleksien luominen vaatii RecA-proteiinin.

Esimerkki 5

Stabiilin kompleksin muodostuminen pienien kaksijuosteisten koettimien ja lineaaristen kaksijuosteisten kohde-DNA:n välille

35

Tämä esimerkki kuvaa pienten kaksijuosteisten koettimien käytön luomaan komplekseja lineaarisen kaksijuosteis-

sen DNA:n kanssa, jotka ovat stabiileja deproteinisaatiolle.

Seuraavat hybridisaatioreaktiot suoritettiin, kuten esimerkiksi 4 kuvattiin. Kaikki proteiinin peittämisreaktiotilavuudet olivat 10 μ l. Jokaisessa reaktiossa oli 2,4 mM ATP γ S:ää ja 20,5 μ M RecA:ta, ellei toisin mainita. Lopullisissa reaktioissa oli 1,3 μ g DraI pilkottua lambda DNA:ta. Seuraavat reaktio-olosuhteet vastaavat linjoja kuvioissa 5A ja 5B: linjat 1 ja 2, 280-meeri koetin RecA-proteiinin kanssa ja ilman, vastavasti; linja 3, 121-meeri-proetiini RecA-proteiinin kanssa; linjat 4-6, 79-meeri koetin RecA-proteiinin kanssa. Reaktiot linjoissa 5 ja 6 sisälsivät RecA-proteiinikonsentraatiot 8,54 ja 41 μ M RecA koettimen peittämisreaktion aikana. Reaktiot deproteinisoitiin ja laitettiin 0,7 % agarosigeeliin. Geelille tehtiin elektroforeesi koettimen ja kohde-DNA-fragmenttien erottamiseksi.

20

Kuvio 5A osoittaa valokuvan etidiumbromidivärjätystä DNA:sta agarosigeelissä osoittaen lambdasta DraI-pilkotut kohdefragmentit edellä olleista reaktioista. Kuvio 5B osoittaa DNA:n autoradiografian kuviossa 5A nähdyssä agarosigeelissä. Nuolet merkitsevät DraI lambda kohdefragmentin, joka on homologinen käytettyjen koettimien kanssa, kulkuaseman. Tulokset osoittavat, että kompleksit, jotka ovat stabiileja deproteinisaatiolle, voidaan saavuttaa kaikilla RecA-peitetyillä DNA-koettimilla: 280-meeri, 121-meeri ja 79-meeri. Kuten edellä, muodostui stabiileja komplekseja vähintään 832 emästä lineaarisen kaksijuosteisen DNA-kohdemolekyylin päästä.

25

30

Esimerkki 6Stabiili kompleksin muodostuminen vaatii kaksijuosteisen koettimen5 A. Vaatimus kaksijuosteiselle DNA-koettimelle.

RecA-peitettyjä DNA-koettimia käytettiin hybridisaatioon 3,0 μg :n kanssa lambda DraI-pilkottua kohde-DNA:ta/reaktio (60 min), kuten kuvattiin esimerkissä 4.

10 Käytettiin kahta kemiallisesti syntetisoitua yksijuosteista DNA 121-meeriä. Juosteet olivat komplementaarisia toistensa kanssa. Yksi juoste oli biotiinileimattu ja toinen ^{32}P -leimattu.

15 Seuraavat reaktionumerot vastaavat linjoja kuvioissa 6A ja 6B. Reaktioissa 1, 2, 5, 6 ja 3, 4 oli 2,4 mM tai 4,8 mM ATP γS :ää. Kaikki reaktiot käyttivät 20 ng ^{32}P -leimattua DNA-koetinjuostetta ja 10,4 μg RecA-proteiinia: jokaisessa reaktiossa oli sama ^{32}P -spesifinen aktiivisuus. Reaktioissa 3-6 oli myös biotiini-leimattu

20 juoste. Reaktioissa 3 ja 4 lisättiin molemmat DNA-koettimet 10 μl RecA alkureaktioihin samaan aikaan. Reaktioita 5 ja 6 varten ^{32}P - ja biotiini-leimatut koettimet peitettiin jokainen RecA:lla erillisissä 10 μl :n reaktioissa, sitten puolet jokaista reaktioseosta inkuboi-

25 tiin kohde-DNA:n kanssa 30 min ennenkuin lisättiin puuttuva RecA-peitetty DNA-koetinjuoste. ^{32}P -leimattu DNA-juoste lisättiin ensin reaktioon 5 ja toiseksi reaktioon 6.

30 Kaikki reaktiot deproteinisoitiin proteinaasi K:lla ja SDS:llä ennen elektroforeesia. Kuvio 6A osoittaa valokuvan etidumbromidi-värjätystä DNA:sta agarosigeelissä osoittaen lambda DraI:n pilkkomia kohdefragmentteja edellä olleista reaktioista. Reaktio-olosuhteet on tiivistettynä kuvioissa 6A ja 6B. Kuviossa 6B on näkyvissä

35 autoradiogrammi ilmakeivästä kuvion 6A geelistä.

Stabiilien deproteinoisoitujen tuotteiden, joita muodostuu homologisessa sisäisessä sekvenssissä lineaarisessa kohde-DNA:ssa (linjat 3, 5 ja 6, vertaa linja 2), tuottamiseksi vaaditaan 2 DNA-koetinjuostetta.

5

B. Malli kaksijuosteiselle stabiilille tuotteelle.

Kuvio 7 osoittaa mahdollisen mallin deproteinoisoidulle kaksijuosteiselle RecA-katalysoidulle hybridisaatio-

10 tuotteelle. Kuvio 7 kuvaa stabiilin kaksois-D-silmukka monikerran, joka muodostui lyhyiden päästä leimattujen DNA-koettimien ja kaksijuosteisen lineaarisen DNA-koh-

teen kanssa. Osoitettu malli kuvaa hybridisaation 8370 bp DraI DNA lambda-kohteeseen, missä koetin:kohdehomo-

15 logia alkaa vähintään 832 emästä kohteen lyhyestä päästä (3'-pää suhteessa koko lambda-genomiin). DraI-fragmenttiin sisältyvät lambdaemäkset 93-8462. Taulukossa 1

on kuvattu homologian tarkat kohdat. Yksijuosteinen RecA-proteiinilla peitetty koetin ei anna tuloksena

komplekseja, jotka ovat stabiileja deproteinisaatiolle

20 (katso kuvio 6B edellä).

Esimerkki 7

Koetin:kohde-sieppaus ja DNA-määritys

A. Hybridisaatioreaktiot.

25

Komplementaariset 121-meeri DNA-koettimet (taulukko 1) syntetisoitiin kemiallisesti kukin erikseen. Komplementaariset juosteet leimattiin tunnusmerkillisesti käyttämällä [γ - ^{32}P]ATP:tä ja biotiiniä (reportteri ja sieppausosat, vastaavasti). Kaikissa koettimen peittoreaktio-

30 seoksissa oli 2,4 mM ATP γ S:ää, 20 ng yksijuosteista koetinta, 5,2 μg RecA-proteiinia (5,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Pharmacia) tai vastaava tilavuus RecA-varastopuskuria (ilman RecA-proteiinia)/10 μl reaktio. Kokeita varten, joissa käytettiin sekä biotiini- että ^{32}P -leimattuja koettimia

35 (reaktiot 1 ja 4), sekoitettiin 10 μl erät vastaavia biotiini- tai ^{32}P -leimattuja koettimen peittämiä reak-

tioita yhteen (antamaan 20 μ l) ennenkuin nämä seokset lisättiin kohde-DNA-seokseen. Jotta pidetään kaikki reaktioutilavuudet vakioina, käytettiin reaktioihin joissa oli vain yksi yksijuosteinen koetinjuoste (reaktiot 2 ja 3) 10 μ l koetinsesota, 10 μ l koetinreaktiopuskuria (s.o. ei toista koetinta) ja 20 μ l koetin-DNA-seosta.

Lambda kohde-DNA-seos valmistettiin seuraavsti: 1X Re-
 cA-reaktiopuskuri, 1:10 laimennus 0,2 M kantaliuos Mg-
 asetaattia ja ApaI-pilkottua lambda DNA:ta. Lisättiin
 jokaiseen 20 μ l:n koetinreaktioseokseen 20 μ l kohde-
 DNA-seosta. Näitä reaktioita inkuboitiin 60 min 37°C:
 ssa. 40 μ l:n reaktiot deproteinisoitiin, jaettiin kah-
 teen yhtä suureen erään, kaksi erää laitettiin vierek-
 käisiin kaivoihin 0,7 % agarosigeelissä ja komponentit
 fraktioitiin elektroforeesilla (kuten edellä on kuvat-
 tu).

Kaikkien reaktioiden, joissa oli 32 P-leimattu juoste
 (1, 2 ja 4), spesifinen alkuaktiivisuus oli identtinen.
 Jokaisen reaktion etidiumbromidi-värjätty geeli vierek-
 käisine duplikaattilinjoinen nähdään kuviossa 8. Jo-
 kaisen reaktion sisältö on tiivistettynä kuviossa 8.

Geelin jokaisesta linjasta leikattiin osa, joka vastasi
 10,1 kb lambda kohde-DNA:ta (kuvio 8). Jokainen leikat-
 tu fragmentti laitettiin mikrosentrifuugiputkeen ja
 jäädytettiin nopeasti käyttämällä kuivaa jäätä. Jokai-
 sessa geelifragmentissa ollut DNA saatiin takaisin pu-
 ristamalla jäätynyttä geeliä taitetun parafilmin välis-
 sä, kunnes nestettä ei enää puristunut ulos. Tämä DNA:
 ta sisältävä neste poistettiin sitten varovasti "EPPEN-
 DORF"-mikropipetillä.

B. Sieppaus/määritysanalyysi.

Kahden koetinjuosteen läsnäolo samassa kohdemolekyylis-

- sä (yksi biotiinileimattu ja toinen ^{32}P -leimattu) määritettiin sieppaamalla biotiini:kohdehybridit streptavidiini-peitettyihin paramagneettisiin helmiin (Dynal, Oslo, Norja). Valmistajan helmien varastointipuskuri
- 5 poistettiin ennen käyttöä. Helmet pestiin 1X RecA-reaktiopuskurilla, 10X RecA-puskurissa ja lopuksi 1X RecA-reaktiopuskurissa. Ennen DNA-sieppausta lisättiin yhtä suuret tilavuudet pestyjä helmiä yksittäisiin 1,5 ml mikrosentrifuugiputkiin ja lopullinen pesupuskuri poistettiin.
- 10 Neste poistettiin kaikista helmisuspensioista asettamalla mikrosentrifuugiputket, joissa oli helmiseokset, magneettiseen erottamistelineeseen (Promega, Madison WI).
- 15 DNA:ta sisältävät reaktionäytteet edeltä lisättiin jokainen mikrosentrifuugiputkeen, joissa oli annos pestyjä paramagneettisia helmiä. Näytteet sekoitettiin ja inkuboitiin huoneenlämpötilassa 15 min. Koska helmet laskeutuvat ajan mukaan, sekoitettiin seoksia useita
- 20 kertoja inkubaation aikana varmistamaan tehokas biotiini:streptavidiini-annos. Sieppausreaktion jälkeen, s.o. streptavidiinin biotiiniin sitoutumisen jälkeen, kerättiin paramagneettiset helmet jokaisessa reaktiossa magneetilla ja reaktioneste poistettiin.
- 25 Jokainen helmien näyte pestiin 3 kertaa 1X RecA-reaktiopuskurilla. ^{32}P -leimatun koetinjuosteen läsnäolo määritettiin lisäämällä nestemäistä tuikelaskin fluoria helmiin ja laskemalla siepatun DNA:n radioaktiivisuus
- 30 jokaisessa reaktiossa. Nämä tiedot on esitetty taulukossa 2.

Taulukossa 2 prosenttiosuudet laskettiin ^{32}P -radioleimatuista DNA-lukujen pienistä määristä, joita jää Dynal streptavidini-peitettyjen helmien päälle jokaisen sieppausreaktion 3 pesun jälkeen 1X asetaattireaktiopuskurilla. ^{32}P -leimattu DNA lisättiin reaktioon 3, jossa on biotiinin sieppaama koetin ainoastaan: tästä reaktiosta ei odotettu radioaktiivisia DNA-lukuja. Taulukossa 2 oleva "odotetut kokonaisluvut" määritettiin seuraavasti. Suoritettiin identtiset reaktiot kuin edellä kuvattiin ja tuotteet erotettiin agarosigeeli-elektroforeesilla. Geelifragmentit, jotka vastasivat 10,1 kb kohde-DNA:ta, leikattiin geelistä, jauhettiin ja laitettiin "AQUASOL:iin". Tulokset osoittavat, että hybridisaatiotuote, jossa on kaksi komplementaarista mutta tunnusomerkillisesti leimattua koetinta, voidaan siepata käyttämällä streptavidini-vuorovaikutusta biotiinilla leimatun koetinjuosteen kanssa ja sen jälkeen määritetään leimalla komplementaarisessa koetinjuosteessa.

20

Tämä stabiilien koetin:kohdehybridien helmisieppaus tukee, että RecA-proteiinin katalysoimissa homologisissa koetin:kohde-komplekseissa todella oli kaksi homologista koetinjuostetta samassa kaksijuosteisessa kohde-molekyylissä.

25

Esimerkki 8

RecA+ helpottama DNA-amplifikaatio ilman kohde-DNA:n denaturontia

30

Olosuhteet RecA-proteiinin helpottamalle DNA-amplifikaatiolle on kuvattu samaanaikaan haetussa ja kanssaomistetussa sarjanro. 07/520 321, "Menetelmä nukleiinihappohybridisaatiolle ja amplifikaatiolle", jätetty 7. toukokuuta 1990, liitetty tähän viitteeksi.

35

Kaksijuosteiset koetin/alukeparit, jotka vastaavat DL8-

01/2:ta ja DL803/4:ää (taulukko 1), denaturoitiin ja peitettiin RecA-proteiinilla, kuten edellä kuvattiin. Jotta varmistetaan, että DNA-alukkeiden pidentyminen tapahtuu vain toivottuun suuntaan, voidaan sopivien alukkeiden 3'-päätt lopettaa 2',3'-didesoksinukleotidilla. Didesoksinukleotidilta puuttuu 3'-hydroksyyli-ryhmä, joka on tavanomaisessa dNTP:ssä. Hydroksyyli-ryhmän puuttuminen inhiboi laajentumisen estämällä fosfodiesterisidoksen muodostumisen didesoksinukleotidin ja seuraavan tavanomaisen dNTP:n välille. Didesoksinukleotidin lisääminen alukkeeseen voidaan saavuttaa käyttämällä entsyymien terminaalista desoksinukleotidisiirtoa (Pharmacia, Piscataway, NH).

Koettimien annetaan sitten reagoida kohde-DNA:n kanssa, kuten edellä kuvattiin. Edellä olleen reaktion tuote, koostuen kahdesta kaksois-D-silmukan sarjasta, käytetään sitten substraattina tyypillisessä DNA-amplifikaatioreaktiossa. DNA-reaktio voidaan suorittaa puskurissa, jossa on 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 8-12 mM MgCl₂ ja 50 mM NaCl, johon on lisätty 200-750 µM dNTP:tä ja DNA-polymeraasia (esim. eksonukleaasiton, DNA-polymeraasi I, Klenow tai T7 DNA-polymeraasi). Lisäksi reaktioon voidaan liittää muita entsyymejä tai proteiineja (esim. DNA-helikaasi, topoisomeraasi, DNA-ligaasi ja yksijuosteinen sitova (SSB) proteiini), joka voi helpottaa spesifisen amplifikaatiotuotteen muodostumista. Reaktion annetaan edistyä niin kauan kuin tarpeellista 37°C:ssä. Lopetuksen jälkeen näytteet voitaisiin deproteinisoida (SDS, Proteinaasi K ja/tai fenoli-uutettu) ja analysoida geielektroforeesilla. Elektroforeettisen erottamisen jälkeen voidaan tuloksena ollut amplifioitu DNA tehdä näkyväksi joko geelin DNA:n etidiumbromidiväri-jäyksellä tai DNA-hybridisaatiolla kohde-spesifisen DNA-koettimen kanssa. Vaihtoehtoisesti, amplifikaatio DNA-koettimet voisivat olla biotinyloidut ja uudelleen syntetisoitu DNA siepataan sopivin keinoin ja sitten

repostoidaan ja määritetään kuten edellä kuvattiin.

DNA-synteesireaktiot on merkitty 1-2 yksikön E. coli
DNA-polymeraasi I:n, jossa ei ole eksonukleaasia, li-
säyksellä (U.S. Biochemicals) ja 750 μ M kumpaakin dNTP:
5 tä. Reaktiot pidetään 37°C:ssa.

Sen jälkeen, kun ensin on lisätty polymeraasia, reakti-
oon voidaan liittää mukaan 1 yksikkö, esim. Klenowin
10 ja/tai lisäksi tulevia dNTP:tä, tarkoin määrättyinä
väliaikoina, jotka ovat jakaantuneet ajallisesti reak-
tion kulkuun.

Näytteitä käsitellään proteinaasi K:lla ennenkuin lai-
tetaan elektroforeettiseen erotukseen. Elektroforeetti-
seen erotuksen jälkeen voidaan tuloksena olleet ampli-
fioituneet DNA-fragmentit tehdä näkyviksi joko geelin
etidiumbromidivärjäyksellä tai hybridisaatiolla kohde-
spesifisen koettimen kanssa.

20 Hybridisaatioanalyysiä varten geeli voidaan siirtää
standardiprotokolleilla (Maniatis et al.) hybridisaati-
on siirtokalvolle (HYbond-N, Amersham). DNA sidotaan
ristiin UV:llä (Stratolinker, Stratagene) membraaniin.
25 UV-käsitelty siirtomembraani hybridisoidaan päästä lei-
matun (Boehringer Mannheim) koettimen PCR03A kanssa
(taulukko 1): PCR03A (natiivin lambda-genomin nukleoti-
dit 7351-7390) on 40-meeri vastaten 500 emäsparin lamb-
da-mallisäikeen sisäistä DNA-sekvenssiä, joka on edellä
30 olleen amplifikaatioreaktion kohde. Kalvolle tehdään
autoradiografia.

Esimerkki 9

In situ DNA-määrittäminen, jossa käytetään kaksois-D-silmukka-reaktioita

5 A. Koetin-kompleksin valmistus.

10 Biotinyloitu kromosomi X alfa-satelliitti DNA-koetin saadaan ONCOR:lta (gaithersburg, MD). Vaihtoehtoisesti koettimet voidaan biotinyloidia standardi nick-translaatiomenetelmin tai polymeraasiketjureaktiolla (Weier et al., 1990).

15 Kaksijuosteinen koetin laimennettuna steriiliin ddH₂O:hon haluttuun konsentraatioon ennen denaturointia, denaturoidaan 0,5 ml:n mikrosentrifuugiputkessa 100°C:n lohkolämmittimessä 5 min. Putki laitetaan välittömästi jäävesihauteeseen 1-2 min, jonka jälkeen on lyhyt sentrifugaus 4-6°C "TOMY"-mikrosentrifuugissa ja putket palautetaan jäävesihauteeseen. Noin 5 min ennen denaturoidun DNA-koettimen lisäystä hybridisaatioseokseen, putki, jossa on koetin, laitetaan jäihin pakastimeen -20°C:een. Koetin-hybridisaatioseoksessa on seuraavat komponentit laajalla konsentraatioalueella ja on yhdistetty luettelon järjestyksessä: 1 µl 10X RecA-reaktiopuskuria [10X RecA-reaktiopuskuri:100 mM Tris-asetaatti pH 7,5 37°C:ssa, 20 mM magnesiumasetatti, 500 mM natriumasetatti, 10 mM DTT ja 50 % glyseroli (Cheng et al., 1988)]; 1,5 µl ATPγS 16,2 mM:sta kantaliuoksesta (Pharmacia) [GTPγ, rATP (yksin tai rATP-regeneraatio-systeemin läsnäollessa), dATP, ATPγS:n ja ADP:n seoksia voidaan myös käyttää joissakin reaktioissa]; 0,75 µl 20 mM magnesiumasetatti; 4-60 ng (tai enemmän joissakin reaktioissa) denaturoitua koetinta steriilissä vedessä; 1,25 µl 0,137 mM kantaliuos RecA-proteiinia, kun ostettu Pharmacialta [kun saatu muista lähteistä tai valmistettu laboratoriossa, lisätty määrä (µl:na) vaihtelee kantaliuoksen konsentraation mukaan].

35

Seosta inkuboidaan 37°C:ssa 10 min, jonka jälkeen lisätään 0,5 μ l/reaktio 200 mM magnesiumasetaattia. Reaktiokomponenttien lopulliset konsentraatiot ovat: 4,0 mM - 10 mM Tris-asetaattia, 2,0 mM - 15 mM magnesiumasetaattia, 20,0 mM - 50 mM natriumasetaattia, 0,4 mM - 1,0 mM DTT:tä, 2 % - 5 % glyserolia, 1 mM - 2,5 mM ATP γ S:ää, 0,005 mM - 0,02 mM RecA-proteiinia.

10 B. Hep-2-kiinnitettyjen solutumien valmistaminen.

Hep-2-solut on alunperin johdettu miespuolisen ihmisen kurkunpään ihon pintasolukon epiteelikudoksen syöpäku-
doksesta. Hep-2 on solulinja, jossa kromosomistojen
määrä vaihtelee (Chen).

15 Soluja viljellään 24 h sen jälkeen, kun ne on ympätty DMEM-alustaan (Whittaker tai Gibco-BRL), johon liitetty mukaan 10 % FBS, natriumpuryvaattia ja penisilliini/streptomysiiniantibioottiseos 37°C:ssa standardiolosuhteissa. Solut pelletoidaan alhaisella sentrifugaatio-
20 nopeudella ja pelletti suspendoidaan uudestaan 75 mM KCl:ään 37°C:n vesihauteessa 5-15 min, jotta haluttu määrä tumaturpoamista tapahtuisi, jonka jälkeen solu-
kiinnitys suoritettuna lisäämällä 3:1 jääkylmää metanoli:etikkahappoa ja sentrifugoidaan 6°C:ssa. Putkeen
25 jätetään 1 ml nestettä pelletoitujen solujen kanssa, lisätään lisää jääkylmää metanoli:etikkahappoa ja solut sekoitetaan sekoittamalla putkea varovasti, jonka jälkeen sentrifugoidaan. Toistetut metanoli-asetatti-lisäykset hajottavat sytoplasman (Hep-2 ja muut solutyypit voidaan kiinnittää vaihtoehtoisilla tavoilla, joista
30 jotkut eivät hajota sytoplasmaa.)

35 Eristetyt tumavalmisteet kiinnitetään suspendoimalla uudestaan 3:1 metanoli:etikkahappoon n. 2×10^6 /ml konsentraatiolla ja tiputetaan joko pipetillä 10 μ l:n erissä puhtaille lasisille objektilaseille, joita on

pidetty -20°C:ssa, tai suspendoidut tumat varastoidaan -20°C:een myöhempää käyttöä varten.

C. Hybridisaatioreaktiot kiinnitetyille valmisteille.

5 10 µl koetinseosta/reaktio esimerkistä 9A laitetaan kiinnitetyn valmisteen päälle lasisille objektilaseille. Lasiset peitinlasit laitetaan hybridisaatioalueiden päälle ja suljetaan kautsuliimalla ja reaktioita inkuboidaan kosteassa säiliössä 37°C:ssa CO₂-inkubaattoris-

10 sa 1-4 h.

Inkubaation jälkeen kautsuliima poistetaan käsin ja objektilasit pestään coplin-purkeissa 3 kertaa 10 min, jokainen 2X SSC:ssä (20X SSC: 3 M NaCl, 0,3 M natriumsitraatti, pH 7,0, käytetään kaikissa SSC:tä sisältävissä valmisteissa näissä määrityksissä) vesihauteessa 37°C:ssa. Myös muita pesuolosuhteita voidaan käyttää.

15

Objektilasit laitetaan esiblokkausliuokseen [4X SSC, 0,1 % "TRITON[®] X-100", 5 % neilikanpunainen rasvaton kuivamaito, 2 % normaali vuohen seerumi (Gibco), 0,02 % natriumatsidi, pH 7,0] 25 min huoneenlämpötilassa (RT), jonka jälkeen upotus 5 µg/ml FITC-avidiini DCS:ään, solunlajittelupuhtautta (Vector, A-2011) esiblokkaus-

20

25 liuoksessa 25 min huoneenlämpötilassa. Objektilasit pestään peräkkäin 4X SSC:ssä, 4X SSC:ssä ja 0,1 % "TRITON[®] X-100":ssa ja 4X SSC:ssä 10 min jokainen huoneenlämpötilassa, jonka jälkeen lyhyt huuhtelu kahdesti tislatussa vedessä. Sitten objektilasit kuivataan.

30

Objektilaseille laitetaan haalistumista estävää ainetta [100 mg p-fenyleenidiamiinidihydrokloridia (Sigma P15-19) 10 ml:ssa fosfaattipuskuroitua suolaliuosta, säädetty pH:hon 8 0,5 M:lla karbonaatti-bikarbonaattipuskurilla (0,42 g NaHCO₃ säädetty pH 9:ksi NaOH:lla 10 ml:ssa ddH₂O:ssa) lisättynä 90 ml:aan glyserolia ja 0,22 µm suodatus] ja peitinlasit laitetaan valmisteiden

35

päälle. Haalistumista estävää ainetta, jossa on vasta-väriä, kuten propidiumjodidia tai DAPI-liuosta, voidaan käyttää haalistumista estävän aineen sijasta yksin.

- 5 Jos tarpeellista, suoritetaan signaaliampplifikaatio seuraavasti: objektilaseja pestään 5-10 min 4X SSC:ssä ja 0,1 % "TRITON" X-100":ssa RT:ssä peitinlasien ja haalistumista estävän aineen poistamiseksi, jonka jälkeen inkuboidaan esiblokkausliuoksessa 20 min asti.
- 10 Sitten peitinlaseja inkuboidaan biotinyloidun anti-avidiini vasta-aineen kanssa (Vector BA-0300) konsentraationa 5 $\mu\text{g/ml}$ laimennettuna esiblokkausliuokseen 30 min 37°C. Objektilasit pestään peräkkäin 10 min kulloinkin 4X SSC:ssä, 4X SSC:ssä ja 0,1 % "TRITON" X-100":ssa, 4X
- 15 SSC:ssä RT:ssä, jonka jälkeen inkuboidaan esiblokkausliuoksessa 20 min RT:ssä, sitten upotetaan esiblokkausliuokseen, jossa 5 $\mu\text{g/ml}$ FITC-avidiinia 20 min RT:ssä. Objektilasit pestään jälleen 4X SSC-sarjoissa, huuhtelaaan lyhyesti ddH₂O:ssa ja objektilaseilla, joihin on
- 20 laitettu haalistumista estävää ainetta tai haalistumista estävää ainetta vastavärin kanssa.

- 25 Spesifiset signaalit määritetään käyttämällä standardifluoresenssimikroskooppi havointotekniikoita.

D. Spesifisten kromosomisekvenssien määrittäminen kiinnite-tyissä tumissa ja kokosoluissa.

- Hybridisaatioseos yhdistetään seuraavassa järjestyksessä: 1 μl 10X RecA-reaktiopuskuria, 1,5 μl ATP γ S (16,2 mM kantaliuos, Pharmacia), 0,75 μl magnesiumasettaattia (20 mM kantaliuos), 12 μl (esimerkki 8A), jossa on 20-60 tai enemmän ng denaturoitua koetinta ddH₂O:ssa, RecA (0,137 mM kantaliuos, Pharmacia). Seosta inkuboidaan 37°C:n vesihauteessa 10 min, jonka jälkeen lisätään 0,5
- 30 μl 200 mM magnesiumasettaattia.
- 35

HEp-2-solutumat tai kokosolut, jotka valmistettiin ja

- kiinnitettiin kuten edellä kuvattiin, varastoidaan kiinnitettyinä metanoli:etikkahapossa 3:1 (tai muissa sopivissa kiinnityслиuoksissa) -20°C :ssa noin $2-3 \times 10^6/\text{ml}$ konsentraationa. Noin 0,5 ml suspendoituja tumia, noin $1-1,5 \times 10^6$ tumaa (tai koko solua) sentrifugoidaan "TOMY"-sentrifuugissa säädettynä 3-6, 0,5 tai 1,5 ml mikrosentrifuugiputkessa. Tumat tai kokosolut suspendoidaan uudestaan peräkkäin 200 μl :aan - 1 ml:aan 70 %, 85 % ja 100 % jääkylmää EtOH:ta. Lopullisen sentrifugaation jälkeen ja 100 % EtOH-supernatantin poiston jälkeen, pelletti suspendoidaan uudestaan 200-500 μl :aan 1X RecA-reaktiopuskuria 0,5 ml mikrosentrifuugiputkessa, huoneenlämpötilassa ja sentrifugoidaan.
- 15 Täydellinen koetinseos sekoitetaan pelletin kanssa ja putki laitetaan 37°C :een vesihauteeseen 1,5-2,5 h. Inkubaatio lopetetaan lisäämällä 250 μl 2X SSC:tä 37°C :ssa, jonka jälkeen sentrifugoidaan. Pelletti suspendoidaan uudestaan 250 μl :aan 2X SSC:tä 37°C :ssa ja inkuboidaan 5 min 37°C :ssa. Sentrifugaation jälkeen pelletti suspendoidaan uudestaan 500 μl :aan blokkauслиuosta huoneenlämpötilassa 20 min, sitten sentrifugoidaan ja suspendoidaan uudestaan 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FITC-avidiiniin 100 μl :ssa blokkauслиuosta huoneenlämpötilassa 20 min. Putki sentrifugoidaan ja sekoitetaan 250 μl :aan 4X SSC:tä pelletin kanssa, sentrifugoidaan jälleen ja 250 μl 4X SSC:tä 0,1 % "TRITON" X-100":n kanssa sekoitetaan pelletin kanssa ja sentrifugoidaan jälleen ja 250 μl :n 4X SSC:tä kaikki huoneenlämpötilassa. Joissakin tapauksissa käytetään erilaisia konsentraatioita ja/tai eri pesukomponentteja. Lopullisen sentrifugaation jälkeen pelletti sekoitettiin noin 20 μl :n kanssa haalistumista estävän aineen kanssa. Valmistetut tumat laitetaan objektilasille ja spesifinen signaali määritetään käyttämällä standardeja fluoresenssimikroskooppitekniikoita.

Esimerkki 10

RecA-välittämä kaksois-D-silmukkahybridisaatioreaktiot, joissa käytetään lukuisia kofaktoreita

5

Tämä esimerkki kuvaa kaksois-D-silmukkakompleksin muodostumisen käyttämällä joukkoa erilaisia kofaktoreita RecA-proteiinin peittämisreaktioihin.

- 10 Kaksois-D-silmukkareaktiot suoritettiin 1X D-silmukka-
puskurissa (10X puskuri: 100 mM Tris-asettaatti (pH 7,5
37°C:ssa), 20 mM magnesiumasettaatti, 500 mM natriumase-
taatti, 10 mM DTT ja 50 % glyseroli (Cheng et al. 1988)
käyttämällä 38 ng koetinta ja jossa on ATPγS:ää (Phar-
15 macia), rATP:tä (Pharmacia), dATP:tä (USB) tai GTPγS:ää
(Pharmacia) 1,2 mM konsentraationa. Reaktiot pantiin
toimeen regeneraatiostyteen kanssa ja ilman ja niissä
oli 1,2 μg λ/ApaI kohde-DNA-pala (New England Biolabs,
Beverly MA). Koetin oli lambda 280-meeri (taulukko 1),
20 joka oli leimattu päästä ³²P:llä (Ausubel, et al.).
Lambda kohdefragmentti, s.o. ApaI-f fragmentti, jossa on
koettimen kanssa homologisia sekvenssejä, on pienempi
10,1 kb fragmentti, joka on merkitty nuolella kuviossa
16. RecA:n lopullinen konsentraatio kaikissa RecA:ta
25 sisältävissä reaktioissa oli 12,3 μM. Lopullinen mag-
nesiumasettaattikonsentraatio oli tyypillisesti noin 12
mM jokaisessa reaktiossa (esimerkki 4).

- 30 Kaksois-D-silmukan muodostumisreaktiot deproteinisoi-
tiin käyttämällä 10 mg/ml proteinaasi K:ta ja 0,5 %
SDS:ää. Deproteinisoidut RecA-välittämät kaksois-D-sil-
mukkahybridisaatioreaktiot, joissa oli lämpödenaturoitu
280-meerin koetin ja erilaiset kofaktorit, kuten edellä
kuvattiin, liuotettiin uudestaan elektroforeesilla aga-
35 roosigeelissä. Geeli värjättiin etdiumbromidilla (Ma-
niatis, et al.) ja geelin valokuva nähdään kuviossa 16.
Geeli kuivattiin ja altistettiin röntgenfilmille.

Kuvio 17 on kuivatun kuviossa 16 nähdyn geelin autora-
diorafia. Kuviossa 17 linjat vastaavat seuraavia reak-
tio-olosuhteita. RecA: linja 2, ei RecA; linjat 1, 3-7,
5 +RecA. Kofaktorit: ATP γ S, linjat 1 ja 2; rATP, linjat 3
ja 4; dATP, linjat 5 ja 6; GTP γ S, linja. Linjoissa 3 ja
5 on myös ATP-regenerointisysteemi [6 mM kreatiinifos-
faatti, 10 U/ml fosfokreatiinikinaasi (Sigma, St. Louis
MO) ja 100 mg/ml BSA (Promega, Madison WI)]. Kaikki
10 reaktio-olosuhteet olivat kuten edellä kuvattiin.

Näytteen alkuperä on merkitty kuvioissa 16 ja 17. Kuten
voidaan nähdä kuviossa 17 esitetyistä tuloksista, muo-
dostui stabiileja kaksois-D-silmukkakomplekseja jokai-
15 sen kofaktorin läsnäollessa, kuten on osoitettu leima-
tuilla juovilla vastaten 10,1 kb lambda kohdefragmentin
sijaintia (nuoli).

Esimerkki 11

20 RecA-välittämät kaksois-D-silmukkahybridisaatioreakti-
ot, joissa on ATP γ S tai ATP γ S:n ja rATP:n seos

Tämä esimerkki kuvaa kaksois-D-silmukkakompleksin muo-
dostumisen käyttämällä ATP γ S:ää ja ATP γ S/rATP-seoksia
25 kofaktoreina RecA-proteiinin peittämisreaktioille.

Reaktio-olosuhteet olivat kuten esimerkissä 10 kuvat-
tiin. Kuvio 18 osoittaa valokuvan etidiumbromidivärjä-
tystä agarosigeelistä, jossa deproteinisoitujen RecA-
30 välittämien kaksois-D-silmukkahybridisaatioreaktioiden
komponentit käyttämällä 20 ng lämpödenaturoituja 500-
meerikoettimia (taulukko 1) erotettiin elektroforeesil-
la. Koettimet olivat päästä 32 P-leimatut kuten edellä.
Geeli kuivattiin ja altistettiin röntgenfilmille.

35 Kuvio 19 osoittaa kuivatun kuviossa 18 nähdyn geelin
autoradiorafian. Kuviossa 19 linjat vastaavat seuraavia

reaktio-olosuhteita. Linjat 1, 3 ja 5 -- ATP γ S kofaktori (1,2 mM). Linjat 2, 4 ja 6 -- ATP γ S- ja rATP-kofaktorien yhdistelmä (0,73 mM ja 0,5 mM, vastaavasti). Linjat 1, 2 ja 3, 4 -- reaktiot tehty kahdella eri

5 λ /ApaI kohde-DNA-pilkkomiserällä (New England Biolabs). Reaktiot linjoissa 5 ja 6 käyttivät λ /DraI kohde-DNA-pilkkomista. Kaikissa reaktioissa oli 1,5 μ g kohde-DNA-seosta. RecA-konsentraatiot kaikissa reaktioissa olivat 6,85 μ M. Kaikki konsentraatiot perustuvat lopulliseen

10 20 μ l tilavuuteen. Kaikki reaktio-olosuhteet olivat kuten edellä.

Näytteen alkuperä on merkitty kuvioissa 18 ja 19. Kuten voidaan kuviossa 19 esitetyistä tuloksista nähdä, muodostui stabiileja kaksois-D-silmukkakomplekseja jokaisen kofaktorin läsnäollessa, kuten on osoitettu leima-

15 tuilla juovilla, jotka vastaavat 10,1 kb ja 8,4 kb lambda kohdefragmenttien sijaintia (nuolet).

20 Koska keksintöä on kuvattu viittaamalla spesifisiin menetelmiin ja suoritusmuotoihin, on ymmärrettävää että erilaisia modifikaatioita ja muutoksia voidaan tehdä irtoamatta keksinnöstä.

25 Esimerkki 12

Homogeeninen diagnostinen määrittäminen

A. Lambda-DNA-kohteen leimaaminen

Sieppausreaktion arvioimisen helpottamiseksi lambda

30 DNA:ta (BRL), jota kuumennettiin 65°C:een 5 min, leimattiin päästä 32 P-leimalla käyttämällä Klenowin täyte-reaktiota. Leimausreaktiossa oli 10 μ l Klenowin puskuria (50 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM MgCl $_2$, 10 mM β -merkaptoetanoli), 8 μ l 1,25 mM dNTP-seosta, 5 μ l [α - 32 P]-

35 dCTP, 18,3 μ l 0,82 μ g/ μ l lambda DNA, 2 μ l 5 U/ μ l Klenowin DNA-polymeraasi (Pharmacia) ja 56,7 μ l dd H $_2$ O. Sen jälkeen kun oli inkuboitu 37°C:ssa 30 min, reaktio a-

5 jettiin Sephadex[®] G-50 (Pharmacia) pylvään läpi 1 ml ruiskussa, leimattu DNA saostettiin etanolissa 0,3 M NaOAc:n läsnäollessa, suspensoitiin uudestaan 20 mM Tris-HCl:ään pH 7,5, 0,1 mM EDTA (TE) ja sitten etanolisaostettiin toinen kerta. Kuivattu DNA-pelletti suspendoitiin uudestaan 45 µl:aan TE-puskuria. DNA-konsentraatio määritettiin sen absorbanssilla 260 nm:ssä spektrofotometrissä.

10 B. DNA-koettimen synteesi ja biotinylointi

Syntetisoitiin 1000 bp alue lambda-genomia käyttämällä standardiprotokollia termisesti kierretylle PCR:lle. Reaktiossa käytettiin kahta kemiallisesti syntetisoitua aluketta PCR02 ja PCR01000 (sekvenssi: 5' GCGGCACGGAGT-GAGCAAGCGTGA 3', mukaanluettuna emäkset 6631-6655 lambda-genomissa), kaikkia neljää dNTP-prekursoria ja Taq DNA-polymeraasia (Promega). Syntetisoitu 1000-meerin DNA (lambdaemäkset 6631-7630 mukaanluettuina) sentrifugoitiin Sephadex G-50-pylvään läpi (Pharmacia) ja DNA saatiin etanolisaostuksella (2X). 1000-meerin DNA suspendoitiin TE-puskuriin ja sen konsentraatio määritettiin OD-mittauksella 260 nm:ssä ja vahvistettiin DNA Dipstick[™]:llä (Invitrogen). Sitten puhdistettu 1000-meeri leimattiin bio-14-dATP:llä (Gibco-BRL) käyttämällä BRL:n Nick-translaatiosysteemiä. Hieman modifioimalla BRL:n protokollaa ja lisäämällä kahdesti suositettu määrä entsyymiseosta ja inkuboimalla 15-16°C 1 h 15 min, saatiin DNA-koettimia, joiden keskimääräinen yksijuosteinen koko oli 300-500 emästä. Nick-transloidut koettimet saostettiin 0,3 M NaOAc:ssä etanolissa ja TE:hen uudelleen suspendoimisen jälkeen DNA-konsentraatio määritettiin DNA-Dipstick[™]:llä (Invitrogen).

35 C. Koettimien ja koetin:kohdehybridisaatioiden RecA-peittäminen

Yksijuosteinen, nick-transloitu koetin peitettiin RecA-proteiinilla reaktioseoksessa, jossa oli 1 µl 10X ase-

taattireaktiopuskuria (Cheng et al, 1988), 1,5 μ l 3,24 mM ATP γ S:ää (Sigma), 0,6 μ l recA:ta (2,76 μ g/ μ l), 4,4 μ l steriiliä ddH₂O:ta ja 2 μ l lämpödenaturoitua DNA-koetinta (15 ng/ μ l). DNA lämpödenaturoitiin 100°C:ssa 5 min, jäädytettiin nopeasti jäävesihauteessa, sentrifugoitiin 4°C:ssa Tomy-mikrosentrifuugissa 20 sek nesteen keräämiseksi ja sitten lisättiin oikea annos välittömästi seokseen, jossa oli muita reaktiokomponentteja. RecA-peittämisreaktioseoksen kokonaistilavuus koettimen lisäämisen jälkeen oli 10 μ l. Koetinseosta inkuboitiin 37°C:ssa 15 min, jonka jälkeen lisättiin 10 μ l lambda kohde-DNA-seosta, jossa oli 4 μ l 10X asetaattireaktiopuskuria, 4 μ l 0,2 M Mg(OAc)₂:ta, 4 μ l ³²P-leimattua kokonaista duplexi-lambda-DNA:ta (280 ng/ μ l; aikaisemmin kuumennettu 65°C:een 5 min) ja 28 μ l ddH₂O:ta. RecA-välittämää hybridisaatioreaktiota inkuboitiin 37°C:ssa 60 min, sitten lisättiin 1,3 μ l 300 mM EDTA:ta (pH 8,0) antamaan lopullinen noin 20 mM konsentraatio. Tämän jälkeen lisättiin 21 μ l 20 mM Tris-asetaatipuskuria, pH 7,5 1 M NaCl:n kanssa antamaan lopullinen 0,5 M konsentraatio. Tehtiin 3 kontrollireaktiota yhdessä RecA-reaktion kanssa, jossa oli lambda-koetin. Ensimmäinen kontrollioreaktio oli identtinen RecA-reaktion kanssa, paitsi että siinä ei ollut RecA-proteiinia ja sen sijaan lisättiin yhtä suuri määrä RecA varastopuskuria. Kaksi muuta kontrollireaktiota olivat identtiset kokeille, joissa oli lambda-koettimet, paitsi että lambda-koettimet korvattiin vastaavalla määrällä ei-leimattua, nick-transloitua ϕ X174 DNA RFI DNA:ta (NE-Biolabs). Noin 5 min ennen käyttöä pestiin 300 ml Dynabeads[®] (Dyna) 3 kertaa 20 mM Tris-asetaatissa, pH 7,5, 1 M NaCl. Pesupuskuri poistettiin keräämällä helmet magneettiseen erotustelineeseen (Promega) ja jokainen hybridisaatioreaktio (0,5 m:ssa NaCl:ssä) lisättiin erilliseen annokseen (100 μ l) pestyjä helmiä mikrosentrifuugiputkessa ja inkuboitiin helmien kanssa huoneenlämpötilassa 30 min ravistellen satunnaisesti helläva-

raisesti putkia, jotta suspendoitiin helmet varovasti uudestaan reaktionesteeseen. Sieppauksen jälkeen neste poistettiin ja helmet pestiin 3X 100 μ l:lla 20 mM Tris-asetaattia pH 7,5 1 M NaCl.

5

Radioaktiivisuus helmissä ja pesuvesissä määritettiin laskemalla Safety-Solvessa (RPI Corp.) Packard tuikelaskimessa. Näiden kokeiden tulokset nähdään taulukossa 3.

10

Taulukko 3

Kaksois-D-silmukkahybridisaatioreaktio RecA-peitettyjen biotinyloitujen komplementaaristen lambda DNA-koettimien kanssa sallii kaksijuosteisen, n. 50 kb lambda-virus-kohde-DNA:n sieppaamisen magneettisiin helmiin.

15

Reaktio	Yksijuosteinen koetin-DNA	RecA-proteiini	% siepattu 32 P-leimattusta lambda-DNA-kohteesta
---------	---------------------------	----------------	---

20

1	lambda	+	45,9
2	lambda	-	3,7
3	λ X174 ^a	+	3,6
4	ϕ X174 ^a	-	3,1

25

^a Ei-biotinyloitu, nick-transloitu RFI

30

Selostus taulukkoon 3: RecA-välittämät kaksois-D-silmukhareaktiot, joissa käytettiin biotinyloituja (nick-transloitu bio-14-dATP:llä) lambda-DNA-koettimia tai ei-leimattuja (nick-transloitu dATP:llä) λ X174 RFI-koettimia ja 32 P-leimattuja koko lambdan genomisia DNA-kohteita, suoritettiin. Yksijuosteiset koettimet, jotka saatiin nick-translaatiolla, olivat keskimäärin 300-500 emästä kooltaan ja lambda-DNA-koettimet olivat kaikki homologisia vieressä olevalle 1000 bp lambda-

35

viruksen genomisen alueen kanssa. RecA-peittämien ss koettimien annettiin reagoida lambda-kohde-DNA:n kanssa 1 h 37°C:ssa, käsiteltiin 20 mM EDTA:lla ja 0,5 M NaCl:llä ja affiniteettisiepattiin juuri pestyihin streptavidini-peitettyihin magneettisiin Dynabeads[®]:hin (Dyna-
 5 nal). Ei-siepattu DNA poistettiin reaktioseoksesta pesemällä. ³²P-leimattun lambda-DNA:n %, joka jäi helmiin pesun jälkeen, määritettiin tuikelaskennalla. Reaktiot, joissa ei ollut RecA-proteiinia ja/tai λX174 DNA-sek-
 10 venssejä koettimena, toimivat kontrolleina (katso tekstiä ja menetelmiä yksityiskohtia varten). Tulokset osoittavat, että kaksois-D-silmukkahybridit, joita muodostuu nick-transloitujen koettimien ja suurten kaksijuosteisten kohde-DNA:n välille, voidaan siepata spesifisesti ja määrittää magneettisilla helmillä.
 15

D. Signaaliampelifikaatio

Tarkoitusta varten määrittää siepattu kohde-DNA, kun kohde ei ole leimattu ja/tai signaalin, jolla määritetään pienikopiolukuiset kohteet, amplifioimiseksi pestyt Dynabeads[®], joissa oli kiinnittynyt siepattu DNA, pestiin kerran 1X T7-puskurilla (10X puskur: 400 mM Tris HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT) ja sitten suspendoitiin uudestaan 44 µl:aan amplifikaatioreak-
 20 tioseosta, jossa oli 31,1 µl ddH₂O:ta, 0,5 µl jokaista 10 mM dCTP, dGTP ja dTTP, 9,4 µl 0,53 mM bio-14-dATP (BRL) ja 2 µl 0,8 µM poly(A)-aluketta [sekvenssi: 5'A₁₅ ATACGGCTGAGGTTTTCAACGGC 3': mukana olevat emäkset (ilman poly(A)-häntää) ovat numerot 8001-8023 lambda-genomissa]. Aluke, kohde-DNA-seos kuumennettiin sitten
 25 100°C:een 5 min ja jäähdytettiin noin 37°C:een noin 10 min ennen kuin seuraavat lisättiin; 5 µl 13 U/µl T7 Sequenase[®] Version 2,0 (USB) ja ddH₂O 50 µl lopulliseen tilavuuteen. Sitten reaktiota inkuboitiin 1 h 37°C:ssa
 30 ennen kuin lopetettiin lisäämällä 5 µl 0,3 M EDTA:ta, pH 8,0.
 35

E. Signaalimääritys

Bio-14-dATP:n liittäminen aluke-syntetisoituun DNA:han määritettiin käyttämällä Southern-Light™ (Tropix) kemiluminesenssimääritystä. DNA:t amplifikaatioreaktioista, T7-entsyymin kanssa tai ilman, laimennettiin TE:hen ja lisättiin 1 µl DNA-seosta 4 µl:aan 200 mM NaOH:ta 12,5 mM EDTA:n kanssa, inkuboitiin huoneenlämpötilassa 5-10 min, sitten sijoitettiin kuivalle Tropilon-45™ nailonkalvolle muovikääreen päällä. DNA-täplät kuivat-
 tiin ilmassa ja kuivattu kalvo siirrettiin 3MM CHR (Whatman) kromatografiapaperille ja tiputettiin 20X SSC 3MM-paperille nailonkulmien ympärille. Kun DNA-täplät kasteltiin, DNA sitoutui ristiin kalvon kanssa Stratagene Stratalinkkerillä, joka oli säädetty "auto":lle.
 Sen jälkeen kun nailon oli täydellisesti kostutettu 20X SSC:llä, käytettiin Southern-Light™ (Tropix) biotinyloitua DNA-määritysmenetelmää AVIDx-AP:n kanssa (alkaallinen fosfataasi; Tropix) ja AMPPD-substraattia, valmistajan suositteleman protokollan mukaisesti. Kemiluminesenssi määritettiin käyttämällä Camera Luminometer (Tropix) ja Polaroid 612 filmiä. Tulosten vertailu reaktioista T7 Sequenase[®]:n kanssa tai ilman, osoitti että biotiini oli liittynyt DNA:han ja oli helposti havaittavissa käyttämällä kemiluminesenssimääritystä.
 Jos määrittämisessä käytetään epäsuoraa leiman määrittämenetelmää (s.o. biotiini-leiman annettu reagoida AVIDx-AP:n kanssa määrittämistä varten, mieluummin kuin suora liittyneen leiman määrittäminen, kuten FITC) ja määrittäsvaihe tehdään helmillä [Dynabeads[®], Dynal; oligo-(dT)-helmet, Promega] tai matriisissa [kuten oligo(dT)-selluloosa, Stratagene Poly(A) Quick™], täytyy sieppausmatriisia inkuboida jonkin aineen kanssa blokaamaan ei-spesifistä määrittämisreagenssin tarttumista matriisiin, I-Block-reagenssiseosta (blokkauksuskuri: Southern-Light™, Tropix) on käytetty tähän tarkoitukseen. Pestyt helmet [tai oligo(dT)-selluloosa], jossa on kiinnittynyt DNA, pestiin 1X blokkauksuskurissa, sit-

ten inkuboitiin blokkaustrupkurissa 10-30 min, ennekuin pestiin ja lisättiin AVIDx-AP (Tropix). Ylimäärä sitoutumatonta AVIDx-AP:tä poistettiin sitten pesemällä Tropix-kontrollin mukaisesti. Sieppausmatriisi pestiin
5 sitten puskurilla, joka oli substraatinmäärityksen kanssa sekoitettavaa (määrityspuskuri, Tropix, voidaan käyttää kemiluminesenssimääritykseen; vaihtoehtoisesti määritykseen fluoresenssillä voidaan käyttää JBL Scientific ATTOPHOS-systeemiä, sen sekoitettujen puskurien
10 kanssa). Substraatti lisätään ja DNA-sitoutunut AP määritetään sopivin keinoin.

Sekvenssiluettelo

(1) Yleistä tietoa:

- (i) Hakija: Sena, Elissa P.
Calhoun, Cornelia J.
Zarling, David A.

5

- (ii) Keksinnön otsikko: Kaksois-D-silmukkamuodos
tuksen diagnostiset sovellutukset

10

- (iii) Sekvenssien lukumäärä: 2

- (iv) Kirjeenvaihto-osoite:

- (A) Vastaanottaja: Peter Dehlingerin lakitoi-
misto

15

- (B) Katu: 350 Cambridge Avenue, Suite 300
(C) Kaupunki: Palo Alto
(D) Valtio: CA
(E) Maa: USA
(F) Postinumero: 94306

20

- (v) Tietokoneen lukema muoto:

- (A) Välinetyyppi: floppydisk
(B) Tietokone: IBM PC yhteensopiva
(C) Toimiva systeemi: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: PatentIn Release #1,0, versio
#1,25

25

- (vi) Tämänhetkiset hakemustiedot:

- (A) Hakemusnumero:
(B) Jättöpäivä:
(C) Luokitus:

30

- (vii) Aikaisemmat hakemustiedot:

- (A) Hakemusnumero: USA 07/520 321
(B) Jättöpäivä: 7.5.1990
(A) Hakemusnumero: USA 07/755 462
(B) Jättöpäivä: 4.9.1991

35

(viii) Patenttiasiamies:

(A) Nimi: Fabian, Gary R.

(B) Rekisteröintinumero: 33 875

(C) Viite/asiarekisterinumero: 4255-0001.32

5

(ix) Tietoliikenne informaatio:

(A) Puhelin: (415) 324 0880

(B) Telefax: (415) 324 0960

10 (2) Informaatio Seq ID Nro. 1:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 500 emäsparia

(B) Tyyppi: nukleiinihappo

15 (C) Juoste: kaksois

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: DNA (genominen)

(iii) Oletettu: ei

(iv) Alkuperäinen lähde:

20 (A) Organismi: lambda

(viii) Sijainti genomissa:

(A) Kromosomi/segmentti: 500 emäsparia

(B) Karttasijainti: 7131-7630

(C) Yksiköt: bp

25 (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro. 1:

(2) Informaatio Seq ID Nro. 2:

GATGAGTTTCG TGTCCGTACA ACTGGCGTAA TCATGGCCCT TCGGGGCCAT TGTTTCTCTG 60

30 TGGAGGAGTC CATGACGAAA GATGAACTGA TTGCCGTCT CCGCTCGCTG GGTGAACAAC 120

TGAACCGTGA TGTCAGCCTG ACGGGGACGA AAGAAGAAGT GGCCTCCGT GTGGCAGAGC 180

TGAAAGAGGA GCTTGATGAC ACGGATGAAA CTGCCGGTCA GGACACCCCT CTCAGCCGGG 240

35 AAAATGTGCT GACCGGACAT GAAAATGAGG TGGGATCAGC GCAGCCGGAT ACCGTGATTC 300

TGGATACGTC TGAAGTGGTC ACGGTCGTGG CACTGGTGAA GCTGCATACT GATGCACTTC 360

ACGCCACGCG GGATGAACCT GTGGCATTTC TGCTGCCGGG AACGGCGTTT CGTGTCTCTG 420

5

- 20

GATC

Patenttivaatimukset

1. Diagnostinen menetelmä määrittää lineaarinen dupleksi DNA-analyytti, jolla on ensimmäinen ja toinen juoste, missä on ensimmäinen sisäinen DNA-kohdesekvenssi, mihin sisältyy
 - 5 tarjotaan kahden DNA-koettimen sarja, joissa on ensimmäinen ja toinen koetinjuoste, missä ensimmäisessä ja toisessa koetinjuosteessa (i) on sekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia ensimmäisen ja toisen kohdesekvenssijuosteen kanssa, ja (ii) missä näillä komplementaarisilla sekvensseillä on myös komplementaarinen
 - 10 päällekkäisyys koetinjuosteiden välillä, koetinjuosteet päällystetään RecA-proteiinilla RecA-proteiini-peittämisreaktiossa,
 - 15 RecA-peitetyt koettimet yhdistetään lineaarisen dupleksi-DNA:n kanssa, missä on kohdesekvenssi, olosuhteissa, jotka tuottavat koetin:kohdekompleksin, jossa on koetinjuosteet ja molemmat kohdejuosteet, ja missä mainittu kompleksin on stabiili deproteinisoinnille,
 - 20 koetin-DNA:n läsnäolo määritetään koetin:kohdekompleksissa.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut DNA-koettimet valmistetaan nick-translaatiolla.
 - 25
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitussa peittämisreaktiossa on kofaktori, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ATPγS:stä, rATP:stä, dATP:stä ja GTPγS:stä.
 - 30
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu kofaktori on rATP ja mainittu reaktio suoritetaan ATP-regeneraatiojärjestelmän läsnäollessa tai puuttuessa.
 - 35
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n-

n e t t u siitä, että mainittu kofaktori on ATPγS:n ja rATP:n tai ATPγS:n ja ADP:n seos.

5 6. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, missä mainittu kofaktori on ATPγS.

7. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, missä mainittu kofaktori on ATP.

10 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että RecA-proteiini on Escherichia colin villityypin proteiini.

15 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että RecA-proteiini on Escherichia colin recA-803-proteiini.

20 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että koetinjuosteiden välinen komplementaarisen päällekkäisyyden alue on vähintään 78 emäsparia ja vähemmän kuin noin 500 emäsparia.

25 11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että koetinjuosteessa on DNA:n päässä oleva terminaalinen laajentuma, joka ei ole komplementaarinen kummankaan kohdejuosteen kanssa.

30 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että jokaisessa koetinjuosteessa on DNA:n päässä oleva terminaalinen laajentuma ja DNA-laajentumat ovat komplementaarisia toistensa kanssa.

35 13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että koetinjuosteessa on radioaktiivinen osa.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n-

n e t t u siitä, että mainittu määrittäminen saadaan aikaan deproteinisoimalla koetin:kohdekompleksi, jonka jälkeen on koetin:kohdekompleksin elektroforeettinen erottaminen vapaasta koettimesta.

5

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ensimmäinen koetinjuoste leimataan sieppausosalla ja toinen koetinjuoste leimataan määritysosalla.

10

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sieppausosa on biotiini ja koetin:kohdekompleksin sieppaaminen saadaan aikaan streptavidiinilla.

15

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että streptavidiini on sitoutunut kiinteään kannattajaan.

20

18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, missä toisessa koetinjuosteessa on määritysosa, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu radioaktiivisesta leimasta ja digoksigeniinistä.

25

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että määritysosa on digoksigeniini ja digoksigeniinin läsnäolo määritetään käyttämällä anti-digoksigeniinin vasta-ainetta, jossa on reportteriosa.

30

20. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä määrittämään restriktiofragmentin pituuden polymorfisuus, mihin lisäksi sisältyy

suojataan tunnettu restriktiokohta käyttämällä koetin:kohdekompleksia, jossa on molemmat koetinjuosteet ja tutkimalla fragmentaatiokuvio, joka seuraa kohde-DNA:n restriktioentsyymipilkkomisesta.

35

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainittu suojaaminen saadaan ai-
kaan pilkkomalla restriktioentsyymillä ennen koetin:-
kohdekompleksin deproteïnisaatiota.

5

22. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainittu suojaaminen saadaan ai-
kaan metyloimalla molemmat koetinjuosteet ennen kahden
koetinjuosteen peittämistä RecA-proteiinilla RecA-pro-
teiinin peittämisreaktiossa.

10

23. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, missä
määrittämismenetelmään kuuluu lisäksi restriktiofragmentin
pituuden polymorfisuuden analyysi, missä kohde-DNA:n
pilkkominen saadaan aikaan liittämällä osa yhteen tai
molempiin koetinjuosteisiin, joka on kykenevä pilkko-
maan kohde-DNA:n, muodostaen koetin:kohdekompleksin ja
luomalla reaktio-olosuhteet, jotka sallivat kohde-DNA:n
pilkkomisen pilkkovalla osalla.

15

20

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että pilkkova osa on rauta FeII-mole-
kyyli.

25

25. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että pilkkova osa valitaan ryhmästä,
joka koostuu ei-spesifisistä fosfodiesteraseista ja
restriktioendonukleaaaseista.

30

26. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että määrittämismenetelmään sisältyy vie-
lä restriktiofragmentin pituuden polymorfisuuden ana-
lyysi, missä kohde-DNA:n pilkkominen suoritetaan muo-
dostamalla koetin:kohdekompleksi, johon on liittynyt
osa, joka kykenee pilkkomaan kohde-DNA:n yhdeksi tai
molemmiksi koetinjuosteiksi ja aikaansaamaan reaktio-
olosuhteet, jotka sallivat kohde-DNA:n pilkkomisen

35

pilkkovalla osalla.

27. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, missä
5 mainittu määritysmenetelmä suoritetaan DNA-polymeraasin
helpottamalla alukkeen laajentamisella yhden tai molempien
koetinjuosteiden 3'-päistä, t u n n e t t u siitä,
että alukkeen laajentaminen suoritetaan kaikkien neljän
dNTP:n läsnäollessa ja yhdessä tai useammassa dNTP:ssä
on määritettävä osa.

10

28. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, mihin
vielä sisältyy antaa toinen kahden DNA-koettimen sarja,
joissa on ensimmäinen ja toinen koetinjuoste, jotka
ovat komplementaarisia toisen kohdesekvenssijuosteen
15 kanssa, missä koettimen ensimmäisessä juosteessa on
komplementaarisia sekvenssejä toisen kohdesekvenssin
toisen juosteen kanssa ja koettimen toisella juosteella
on komplementaarisia sekvenssejä toisen kohdesekvenssin
toisen juosteen kanssa, missä (i) näillä koettimilla on
20 myös komplementaarisen päällekkäisyyden alue toistensa
kanssa ja (ii) koettimien toinen sarja ei hybridisoidu
koettimien ensimmäisen sarjan kanssa.

20

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, t u n
n e t t u siitä, että mainitut DNA-koettimet valmiste-
25 taan nick-translaatiolla.

25

30. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, t u n
n e t t u siitä, että ensimmäinen koetinsarja leimataan
30 sieppausosalla ja toinen koetinsarja leimataan määri-
tysosalla.

30

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, missä
sieppausosa on biotiini tai digoksigeniini.

35

32. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, missä
määritysosa valikoidaan ryhmästä, joka koostuu radioak-

tiivisesta leimasta, biotiini ja digoksigeniini.

5 33. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, missä mainittuun määrittelyyn sisältyy sieppaussysteemin käyttö, joka vangitsee koetin:kohdekompleksin.

34. Patenttivaatimuksen 33 mukainen menetelmä, missä sieppaussysteemiin sisältyy koetinsarjan biotinylointi ja sieppaus suoritetaan käyttämällä streptavidiniä.

10

35. Patenttivaatimuksen 34 mukainen menetelmä, missä streptavidiini on sidottu kiinteään kantajaan.

15

36. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kaksi koetinsarjaa määrittävät kohde-DNA:n sisäisen alueen ja jokaisella koetinsarjalla on yksi juoste, jossa on 3'-pää sisäisesti alueeseen päin ja 3'-pää ulkoisesti alueeseen päin.

20

37. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, missä mainittu määrittelymenetelmä suoritetaan DNA-polymeraasin helpottamalla alukkeen laajentamisella kummankin koetinjuosteen 3'-päistä, t u n n e t t u siitä, että alukkeen laajentaminen suoritetaan kaikkien neljän dNTP:n läsnäollessa ja yhdessä tai useammassa dNTP:ssä on määritettävä osa.

25

30

38. Patenttivaatimuksen 37 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kummankin koetinjuosteen ulkoiset 3'-päät on blokattu siten, että alukkeen laajentuminen ei ole mahdollista ulkoisista 3'-päistä.

35

39. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, missä alukkeen laajentamisreaktio suoritetaan alle lämpötilan, joka vaaditaan termiseen kahden kohdejuosteen hajoomiseen ja jatketaan, kunnes haluttu kohdesekvenssin amplifikaation aste on saavutettu.

40. Patenttivaatimuksen 39 mukainen menetelmä, missä mainittuun reagoimiseen sisältyy vielä DNA-polymeraasin lisäys.

5

41. Patenttivaatimuksen 39 mukainen menetelmä, missä mainittuun reagoimiseen sisältyy vielä RecA-proteiinin peittämien koettimien lisäys.

10

42. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, missä mainittuun peittämisreaktioon sisältyy ATP_γS.

15

43. Patenttivaatimuksen 42 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut DNA-koettimet valmistetaan nick-translaatiolla.

44. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, missä mainittuun peittämisreaktioon sisältyy ATP.

20

45. Patenttivaatimuksen 44 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut DNA-koettimet valmistetaan nick-translaatiolla.

25

46. Menetelmä eristää lineaarinen duplexi DNA-analyytti, jossa on ensimmäinen ja toinen juoste, missä on ensimmäinen sisäinen DNA-kohdesekvenssi, mihin sisältyy että tarjotaan kahden DNA-koettimen sarja, joissa on ensimmäinen ja toinen koetinjuoste, missä ensimmäisessä ja toisessa koetinjuosteessa (i) on sekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia ensimmäisen ja toisen kohdesekvenssijuosteen kanssa, ja (ii) missä näillä komplementaarisilla sekvensseillä on myös komplementaarinen päällekkäisyys koetinjuosteiden välillä, koetinjuosteet päällystetään RecA-proteiinilla RecA-proteiini-peittämisreaktiossa, RecA-peitettyt koettimet yhdistetään lineaarisen duplexi-DNA:n kanssa, missä on kohdesekvenssi, olosuhteissa,

30

35

jotka tuottavat koetin:kohdekompleksin, jossa on koetinjuosteet ja molemmat kohdejuosteet, ja missä mainittu kompleksin on stabiili deproteinoimiselle, erotetaan koetin:kohdekompleksi nukleinihappomolekyylien seoksesta ja
5 eristetään duplexi DNA-analyysi, jossa on kohde-sekvenssi koetin:kohdekompleksista.

47. Patenttivaatimuksen 46 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu DNA-koekkeet valmistetaan nick-translaatiolla.
10

48. Patenttivaatimuksen 46 mukainen menetelmä, missä koekkeet on sidottu kiinteään kantajaan.
15

49. Patenttivaatimuksen 46 mukainen menetelmä, missä mainituissa koekkeissa on vähintään yksi biotiiniosa.

50. Patenttivaatimuksen 49 mukainen menetelmä, missä mainittu erottaminen suoritetaan käyttämällä streptavidinia.
20

51. Patenttivaatimuksen 50 mukainen menetelmä, missä streptavidini on sidottu kiinteään kantajaan.
25

52. Patenttivaatimuksen 46 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittuun eristämiseen sisältyy lisäksi koetin:kohdekompleksin lämpödenaturointi lämpötilassa (i) joka on riittävä vapauttamaan duplexi-DNA-analyysin, jossa on kohde-sekvenssi kompleksista ja (ii) lämpötilassa, joka on alle duplexi-DNA-analyysin, jossa on kohde-sekvenssi.
30

53. Patenttivaatimuksen 52 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että duplexi-DNA-analyysi denaturoidaan yksijuosteiseksi DNA:ksi.
35

54. Patenttivaatimuksen 46 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainittuun eristämiseen sisältyy
lisäksi koetin:kohdekompleksin lämpödenaturointi lämpö-
tilassa (i) joka on riittävä vapauttamaan duplexi-DNA-
analyytin, jossa on kohdesekvenssi kompleksista ja (ii)
5 lämpötilassa, joka on duplexi-DNA-analyytin tai yli,
jossa on kohdesekvenssi.

55. Menetelmä määrittää lineaarinen duplexi DNA-ana-
lyytti, jolla on ensimmäinen ja toinen juoste, missä on
10 ensimmäinen sisäinen DNA-kohdesekvenssi, missä mainittu
duplexi-DNA-analyytti on läsnä nukleiinihappomolekyy-
lien seoksessa, mihin sisältyy
että eristetään lineaarinen duplexi-DNA-analyytti,
15 kuten patenttivaatimuksessa 46 kuvattiin, t u n n e t-
t u siitä, että mainittuun eristämiseen sisältyy lisäk-
si koetin:kohdekompleksin lämpödenaturointi lämpötilas-
sa (i) joka on riittävä vapauttamaan duplexi-DNA-ana-
lyytin, jossa on kohdesekvenssi kompleksista ja (ii)
20 lämpötilassa, joka on duplexi-DNA-analyytin tai yli,
jossa on kohdesekvenssi.

että lisätään vähintään yksi DNA-synteesialuke, joka on
komplementaarinen kohdesekvenssin kanssa ja jolla on
5'- ja 3'-pää, missä mainitulla alukkeella ei ole sek-
venssejä, jotka ovat jommassakummassa kahdessa DNA-ko-
25 ettimessä, ja
missä DNA-analyytin määrittäminen suoritetaan DNA-polymeraas-
sin helpottamalla alukkeen laajentamisella alukkeen 3'-
päästä, missä alukkeen laajentaminen suoritetaan kaik-
30 kien neljän dNTP:n läsnäollessa ja vähintään yhdessä
dNTP:ssä on määritettävä osa.

56. Patenttivaatimuksen 55 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainitut DNA-koettimet valmiste-
35 taan nick-translaatiolla.

57. Patenttivaatimuksen 55 mukainen menetelmä, t u n-

n e t t u siitä, että mainitussa alukejuosteessa on DNA:n pään terminaalinen laajentuminen, joka ei ole komplementaarinen kummankaan kohdejuosteen kanssa.

5 58. Patenttivaatimuksen 55 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että ainakin yhdessä DNA-synteesialuk-
keessa on sieppausosa.

10 59. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, missä
mainittuun määrittämiseen sisältyy edelleen saada ai-
kaan alukkeen laajentamistuotteita, joissa on siep-
pausosa ja määrittämysosa ja mainitut tuotteet eristetään
käyttämällä sieppausosaa.

15

$\frac{1}{15}$

↓ = AluI kohta

X = HpaII kohta

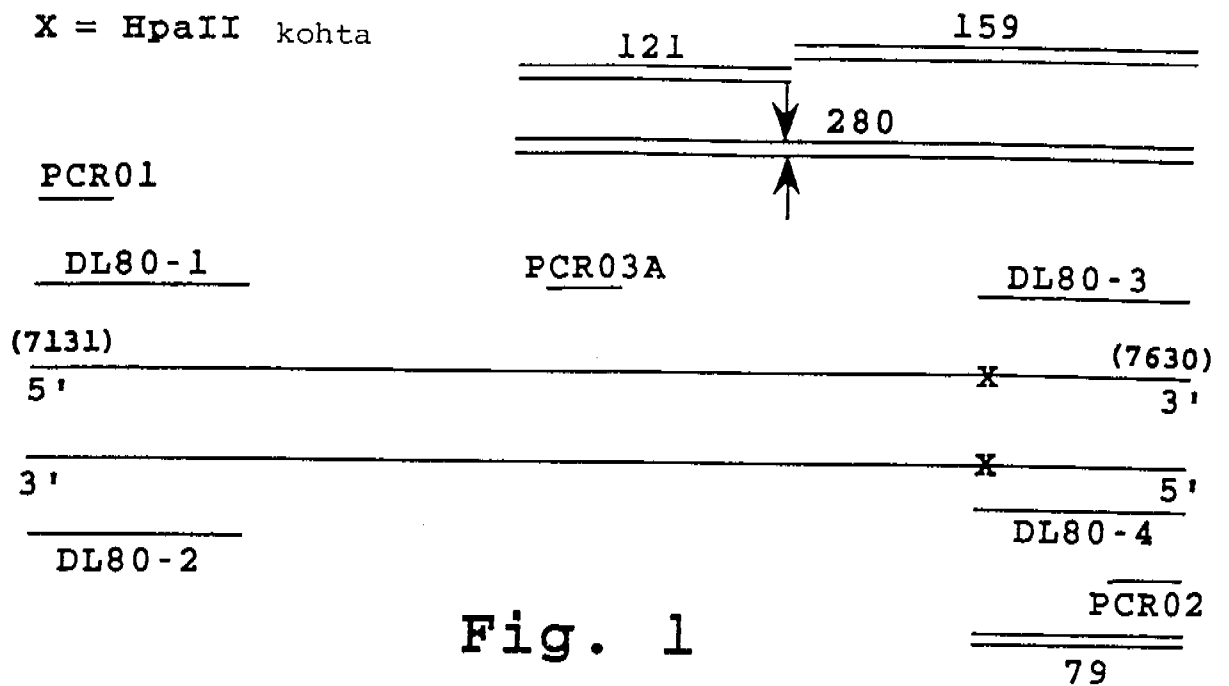


Fig. 1

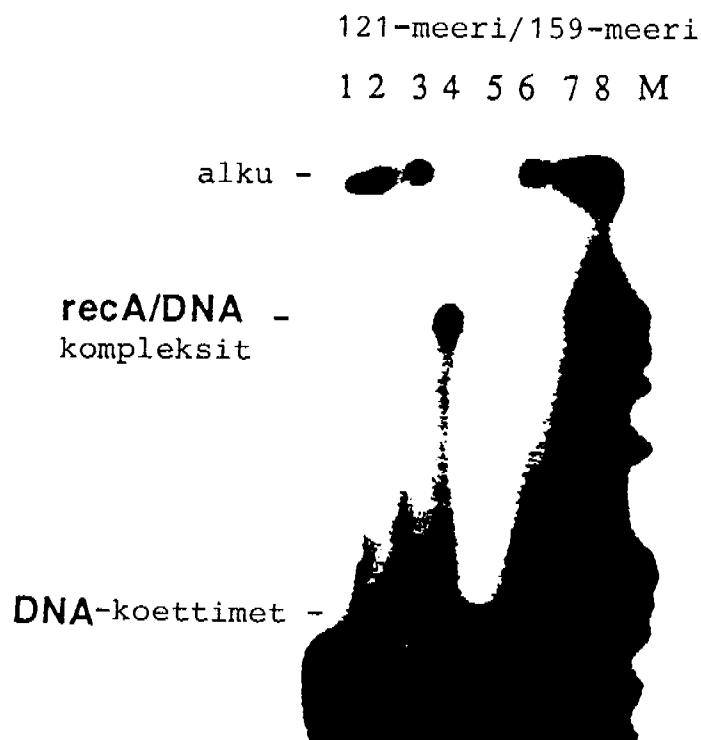


Fig. 3

3/15

markkeri



lambdan DraI

pUC18 1kb pilkottu



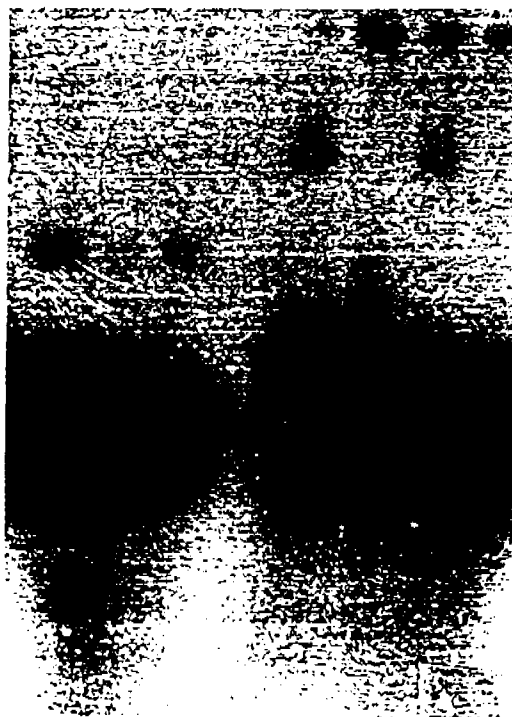
Fig. 4A

kohde: pUC18/ds ympyrä) lambdan DraI pilkottu

koetin: ss 69-meeri		+	+					500-meeri
Rec A:	+	+	+	+	-	+	+	280-meeri

sd-ympyrä .

69-meeri .



- DraI kohde fragmentti

- 500-meeri
- 280-meeri

Fig. 4B

4/15

1 2 3 4 5 6



← DraI pilkottu
kohdefragmentti

Fig. 5A

1 2 3 4 5 6

DraI pilkottu →
kohdefragmentti



Fig. 5B

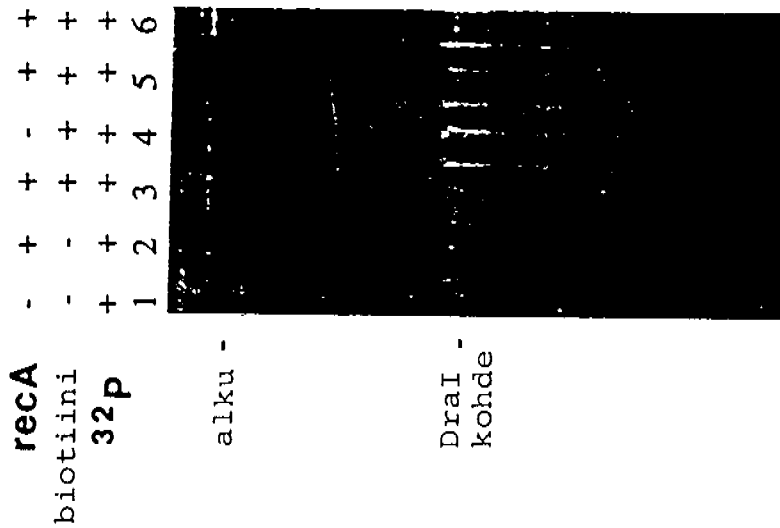


Fig. 6A

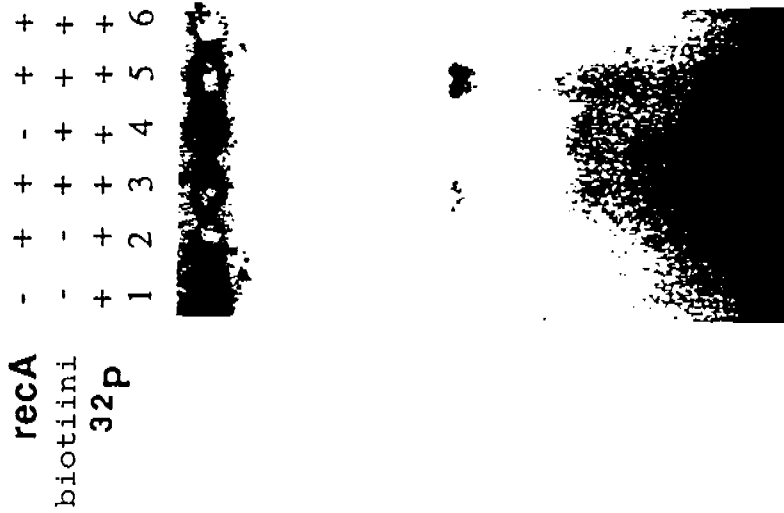


Fig. 6B

recA							
biotiini	32P	1	2	3	4		
-	+	+	+	+	+		
+	-	+	+	+	+		
+	+	+	+	-	+		

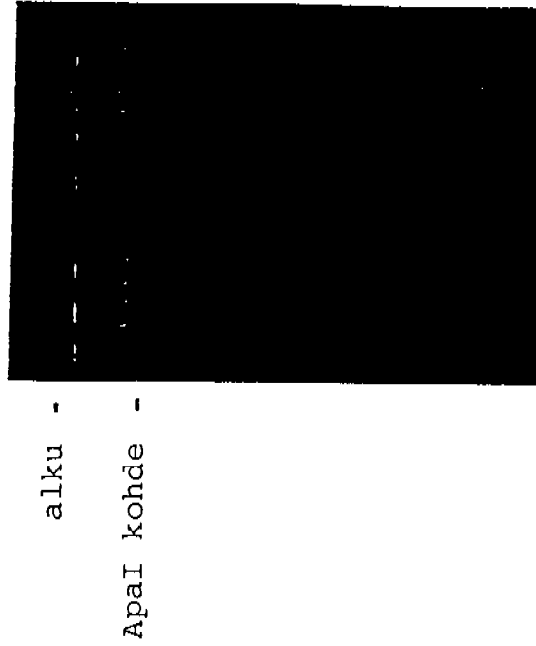


Fig. 8

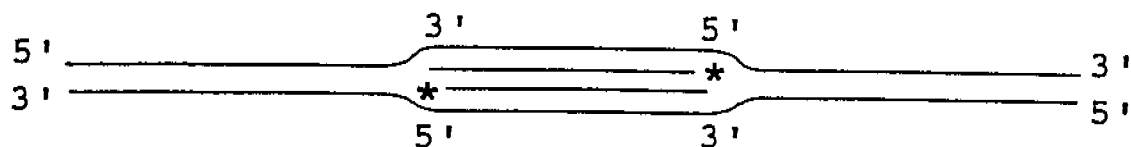


Fig. 7

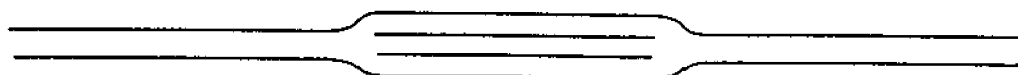


Fig. 9A

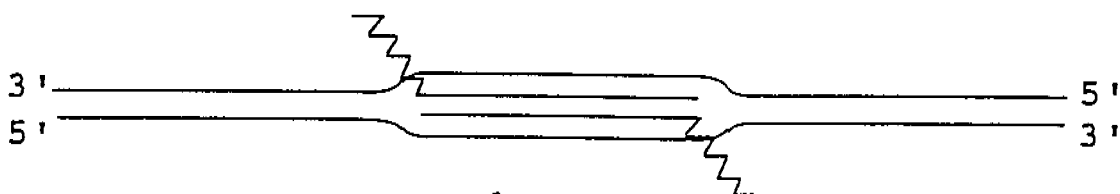


Fig. 9B

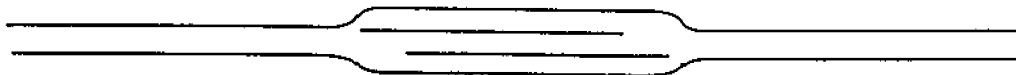


Fig. 9C

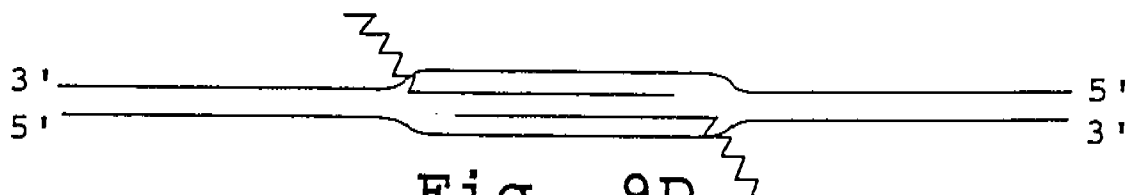


Fig. 9D

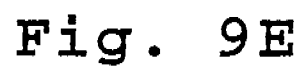


Fig. 9F

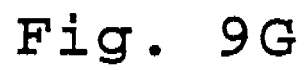


Fig. 9G

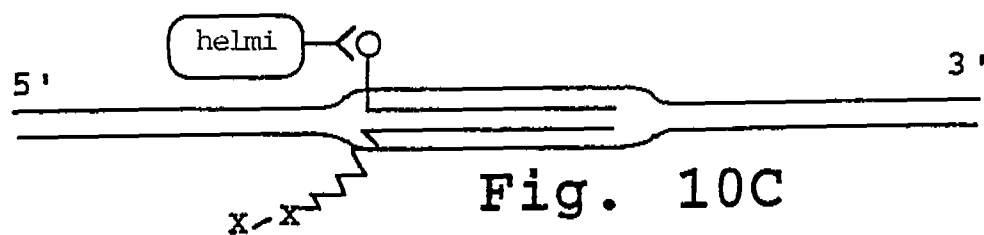
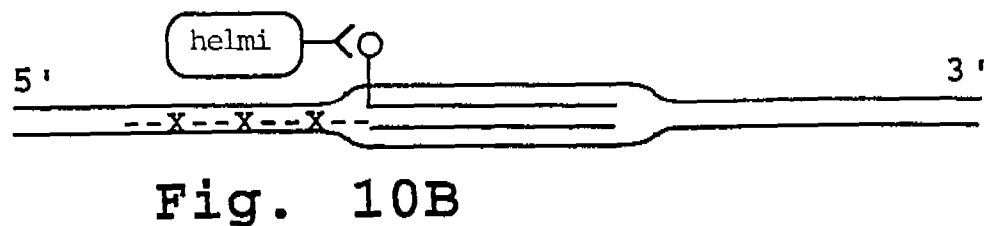
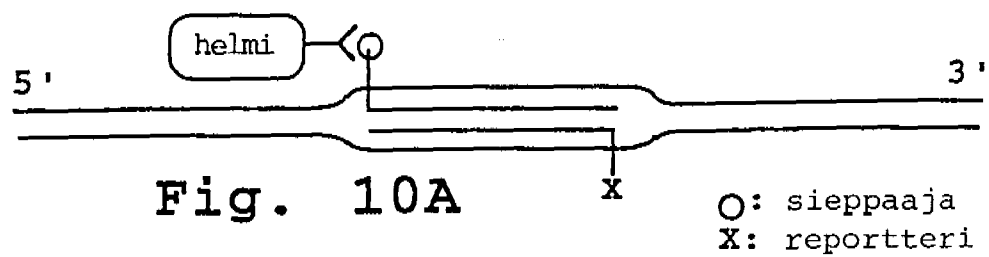
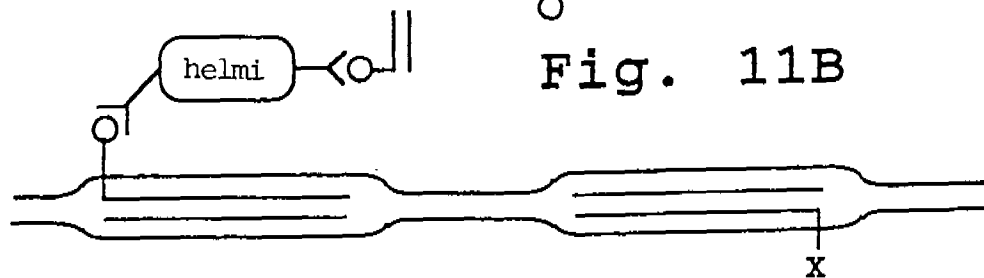
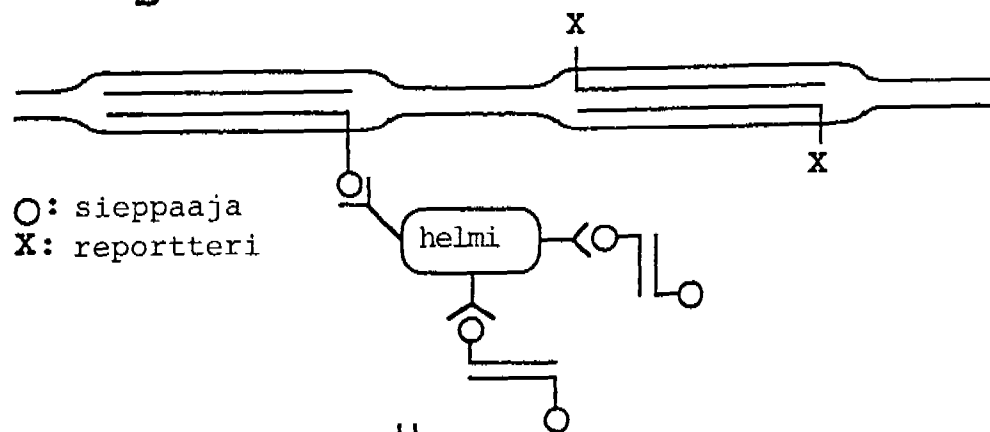


Fig. 11A



030894

041018

9/15

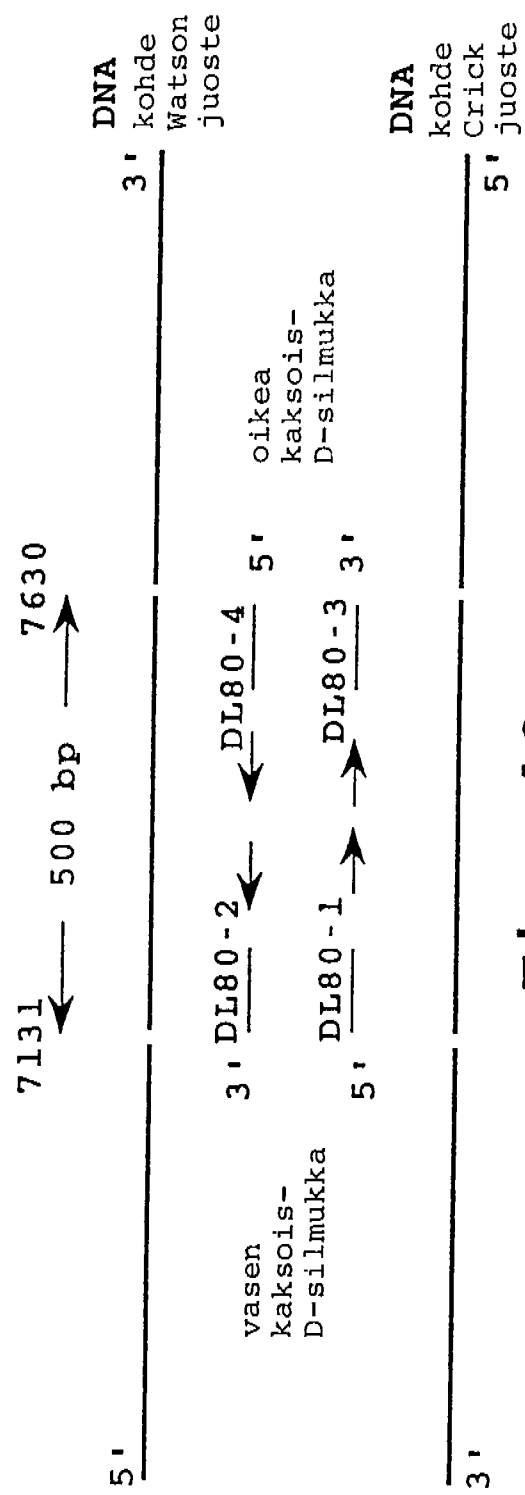


Fig. 12A

Ei alukkeen korvausta ja mahdollista liguatiota

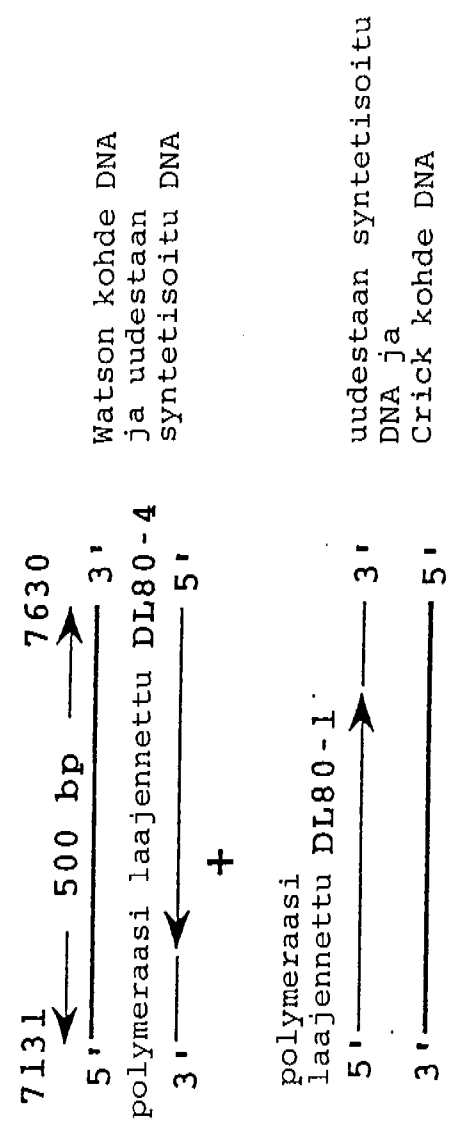
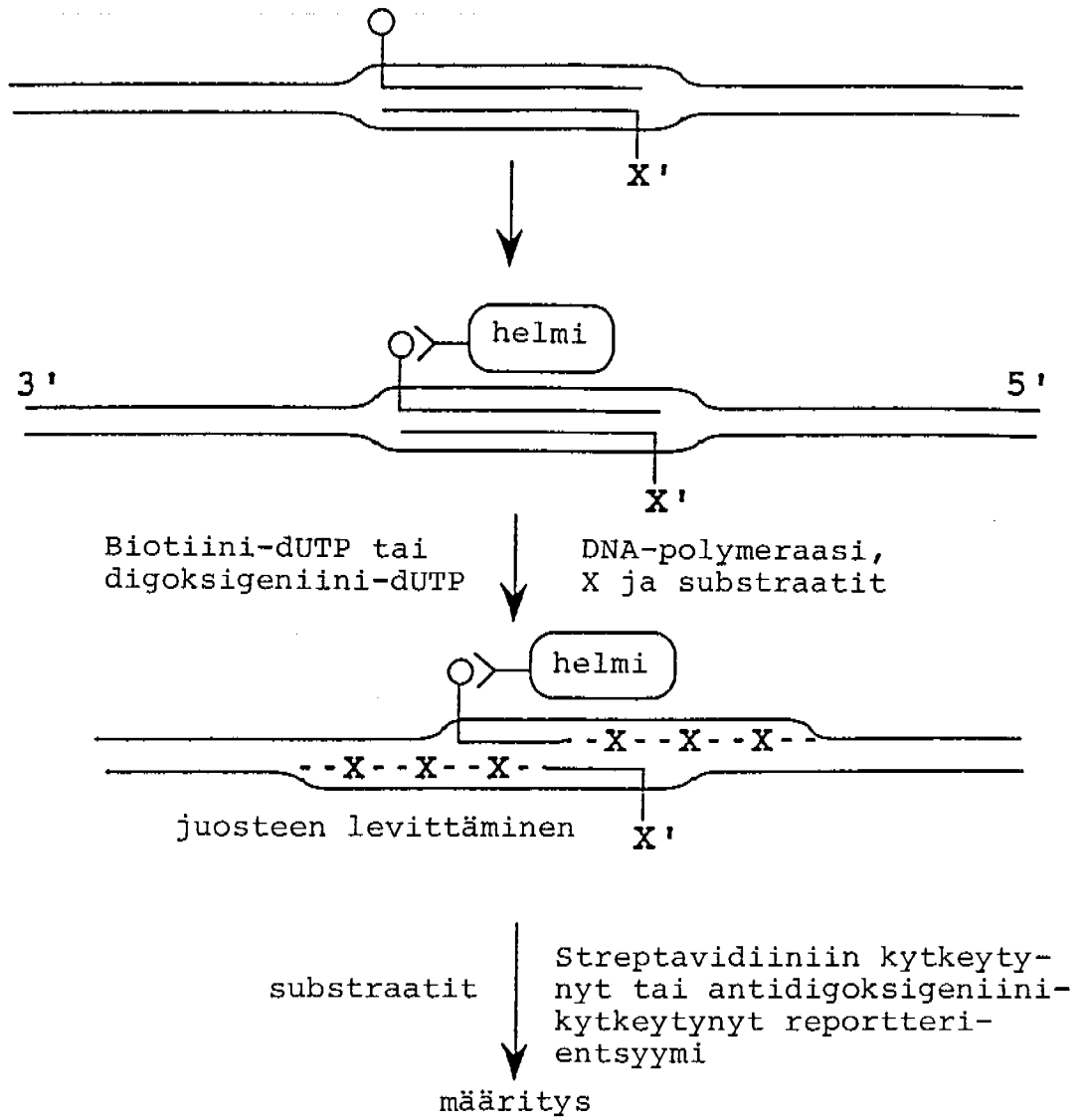


Fig. 12B



X,X' = a leimattu osa,
kuten biotiini-dUTP
tai digoksigeniini-
dUTP

Fig. 13A

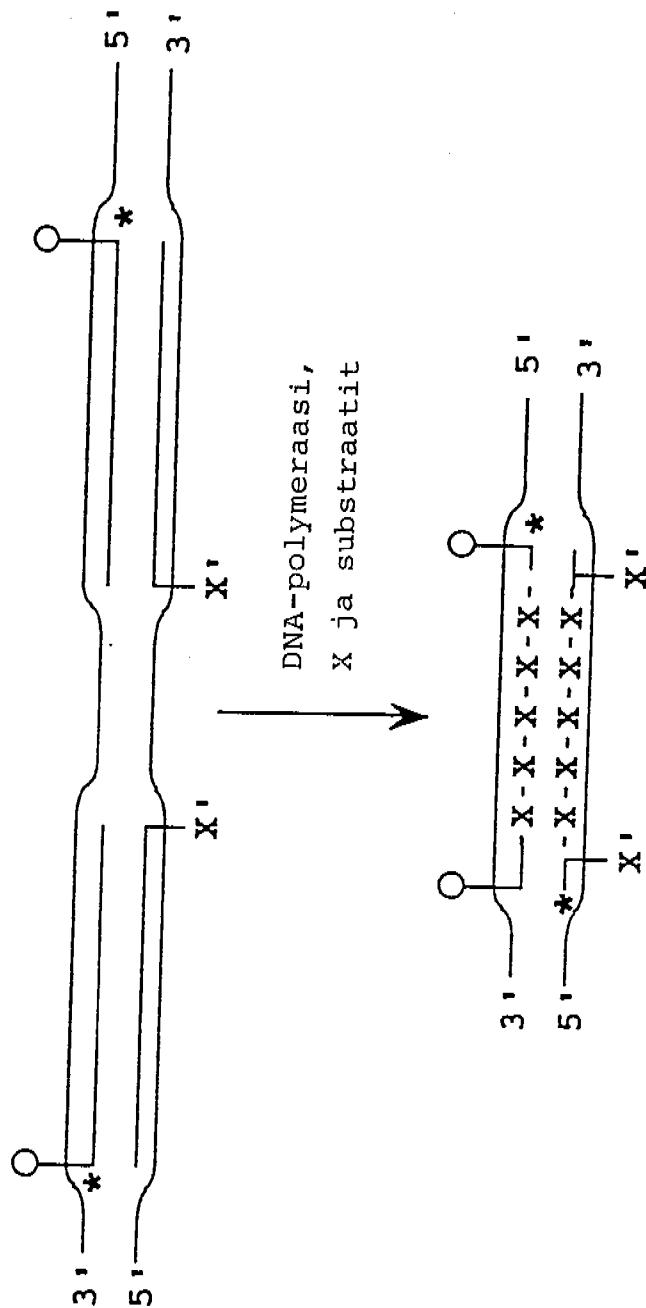


Fig. 13B

12/15

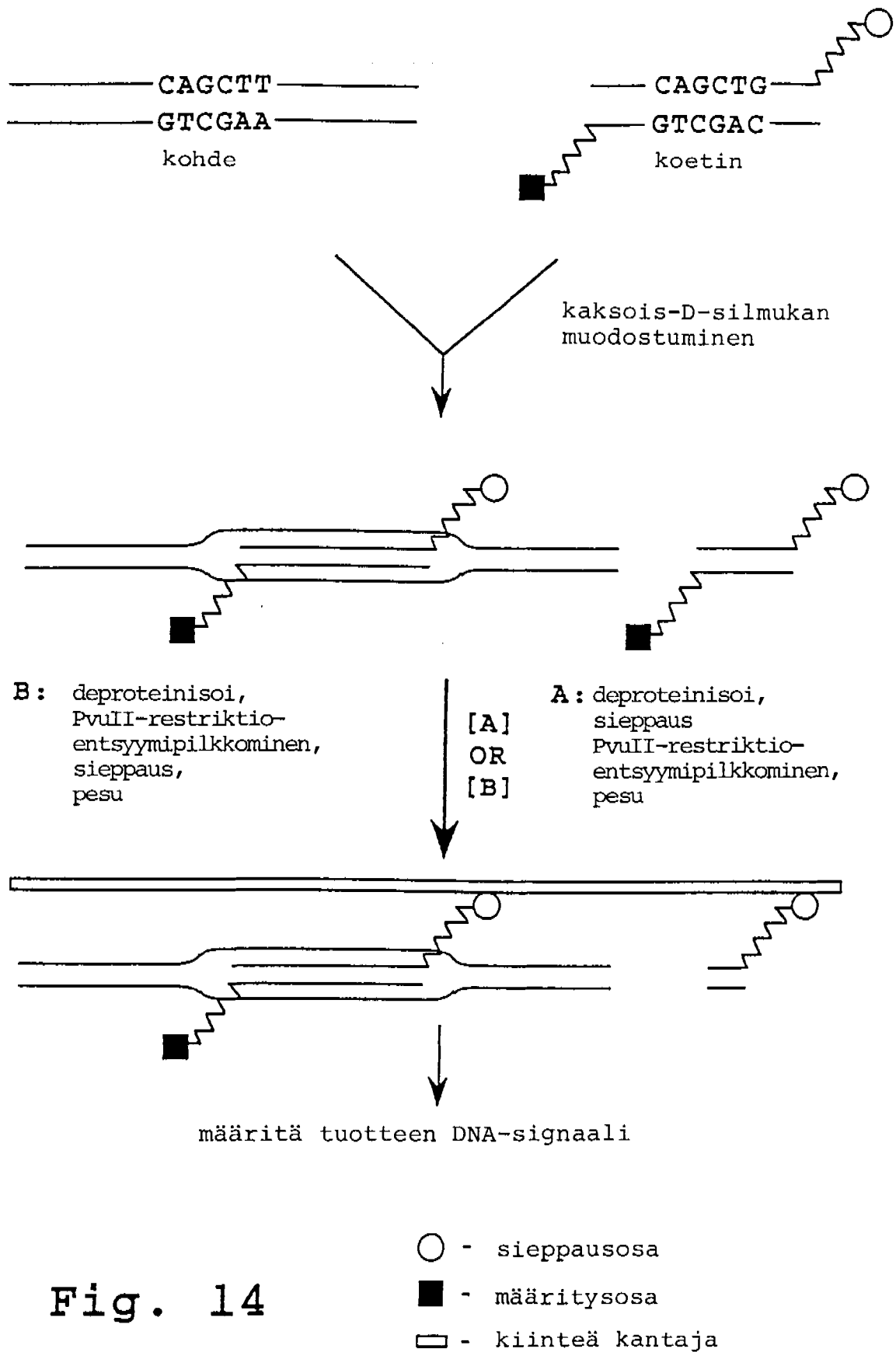


Fig. 14

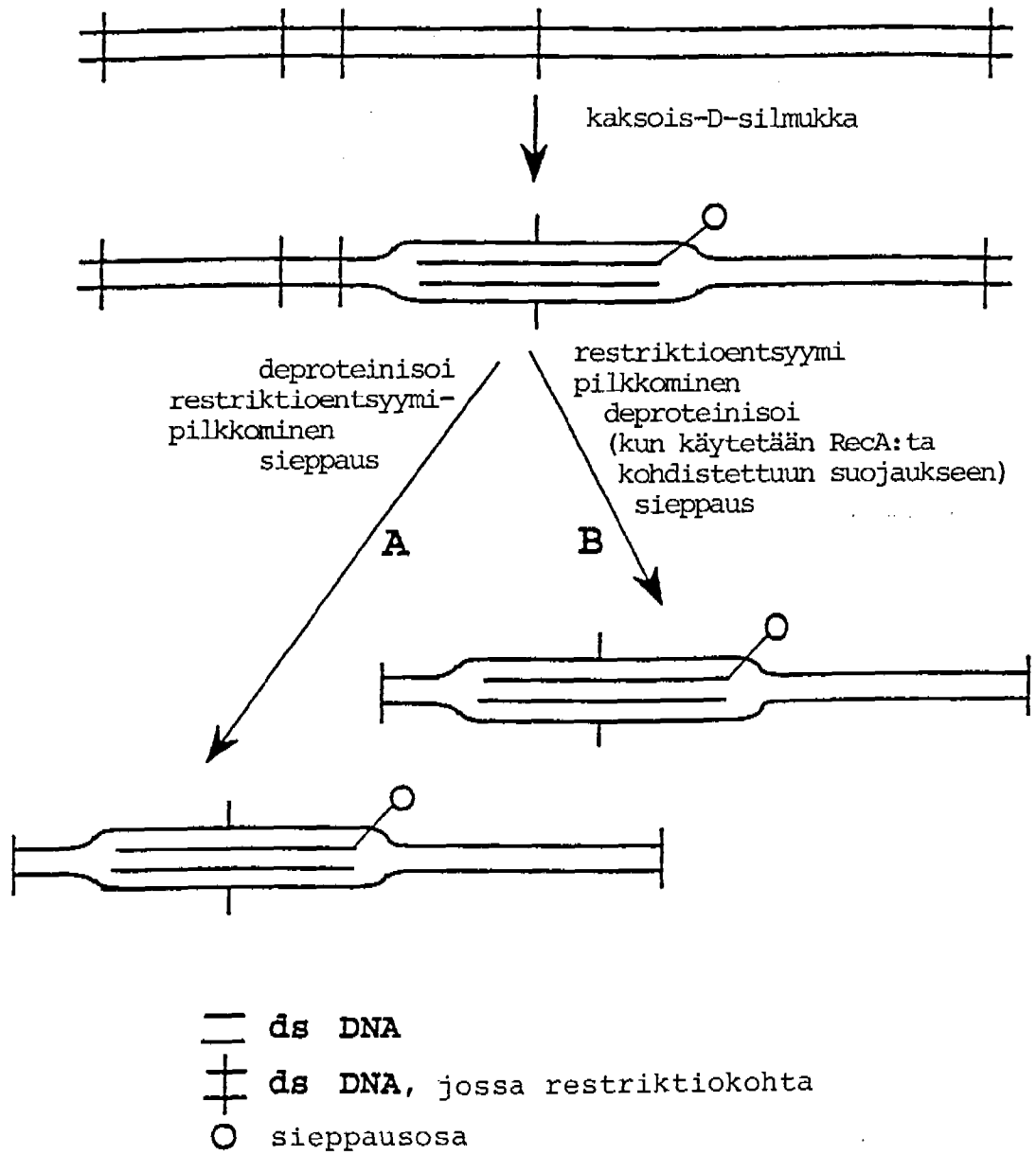


Fig. 15

14/15

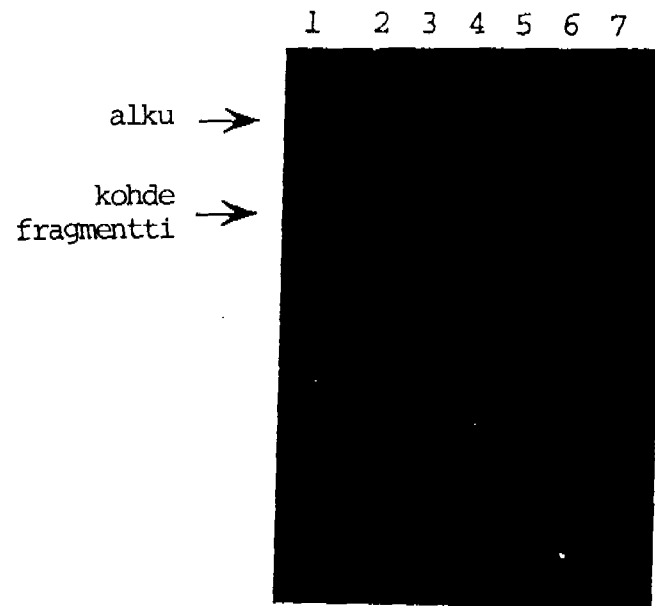


Fig. 16

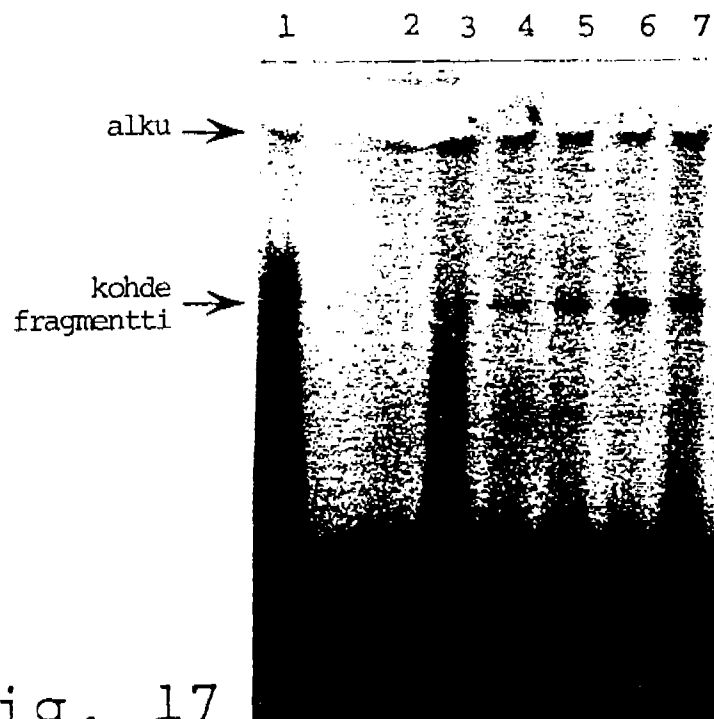


Fig. 17

15/15

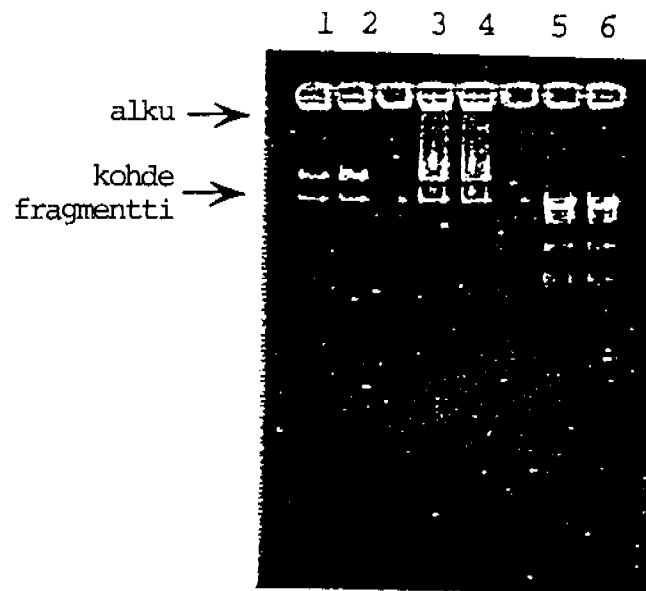


Fig. 18

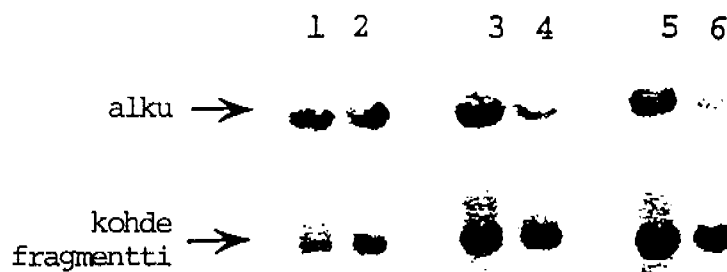


Fig. 19

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP A-322311

WO A-8701730 (C12Q 1/68)

JP-A-63109800

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Atte Leikas

Allekirjoitus