(19) DANMARK (11) **DK 174957 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷.: **C 12 Q 1/68**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1988 05510**

(22) Indleveringsdag: **1988-10-03**

(24) Løbedag: **1988-10-06**

(41) Alm. tilgængelig: **1989-04-10**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2004-03-22**

(30) Prioritet: **1987-10-09 FI 874466**

(73) Patenthaver: **Sangtec Molecular Diagnostics AB, Box 20045, S-161 02 Bromma, Sverige**

(72) Opfinder: **Hans Erik Söderlund, Salonkitie 19, 02940 Espoo, Finland**
Tuula Marjut Ranki, Keltasirkuntie 2, 02260 Espoo, Finland
Ann-Christine Elisabeth Syvaenen, Mannerheimintie 138 A 11, 00270 Helsinki, Finland
Petri Uolevi Buchert, Tiistilaentie 6 D 27, 02230 Espoo, Finland
Anne Maritta Jaervinen, Viipurinkatu 12 A, 00510 Helsinki, Finland
Stefan Henrik Karlsson, Aapelinkatu 10 E 30, 02230 Espoo, Finland
Kai Mikael Korpela, Neitsytpolku 5 B 44, 00140 Helsinki, Finland
Matti Heikki Sakari Laaksonen, Poutintie 13 A 16, 00400 Helsinki, Finland
Gunnel Solveig Kristina Loennqvist, Toeyrymaeki 3, 02760 Espoo, Finland
Jukka Tapani Tenhunen, Paeaeskylaenrinne 10 A 6, 00500 Helsinki, Finland
Arja Marjatta Weckman, Tallbergin Puistotie 6 A 5, 00200 Helsinki, Finland

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau A/S, Høje Taastrup Boulevard 23, 2630 Taastrup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Hybridiseringsmetode**

(56) Fremdragne publikationer:
EP A2 200113
EP A2 139489
WO A1 86/03589
US A 4459361

(57) Sammendrag:

Hybridiseringsmetode og udstyr og reagenssæt til anvendelse ved hybridiseringen

Påvisning af nukleinsyrer ved hybridisering under anvendelse af passende forbehandlede partikler som fast bærer kan ske ved at man filtrerer en hybridiseret eller uhybridiseret nukleinsyreprøve over i en beholder, fortrinsvis en sprøjte, i hvilken enten den i prøven eventuelt tilstedeværende eftersøgte nukleinsyre om nødvendigt hybridiseres og bindes til partiklerne, der enten er til stede i beholderen eller som indføres deri efter hybridisering under formidling af en nukleinsyreprobe; eller ved at man filtrerer kopier af de eftersøgte nukleinsyremolekyler over i en holder i hvilken dis-

fortsættes

se kopier om nødvendigt hybridiseres og bindes til nævnte partikler, der enten er til stede i eller som indføres i beholderen efter hybridisering under formidling af modificerede primere ved hjælp af hvilke de er blevet polymeriseret. Derefter frafiltreres partiklerne og vaskes i samme beholder et antal gange, hvorefter den eftersøgte nukleinsyre påvises på hensigtsmæssig måde. Selve påvisningen sker især ved hjælp af mærkede, fx radioaktivt mærkede atomer, fx ^{32}P.

Opfindelsen angår også et reagenssæt til brug ved fremgangsmåden; det indeholder mindst to indbyrdes ikke-homologe prober af hvilke den ene, detektorproben, er udstyret med eller kan udstyres med en påviselig markør, og den anden, fangproben, har en komponent med affinitet til en anden komponent; desuden indeholder sættet en beholder med et filter og partikler til hvilke nævnte anden komponent er bundet.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til at forbedre hybridisering ved hjælp af filtrering.

Forskellige hybridiseringsmetoder er tidligere blevet beskrevet i f. eks. de europæiske patentansøgninger EP 0 139 489 og EP 0 200 113. Dog nævner ingen af disse skrifter muligheden for at filtrere prøven enten før eller efter hybridisering eller muligheden for at vaske den dannede prøve før påvisning ved den gentagne filtreringsmetode. Som det vil blive beskrevet mere udførligt nedenfor er disse to træk det særegne ved den foreliggende opfindelse.

En metode til analyse af en inkuberet prøve bestående af en ligand bundet til partikler og et bindemiddel, i hvilken prøve liganden fortrinsvis er et protein og bindemidlet fortrinsvist er et antistof til proteinet, er beskrevet i det amerikanske patentskrift 4.459.361. Prøven filtreres før analyse, hvorefter både filtratet såvel som det faste stof, der ikke kan passere filteret, analyseres. Denne metode indbefatter imidlertid ikke den gentagne filtreringsmetode ifølge den foreliggende opfindelse.

I den internationale patentansøgning WO 86/03589 beskrives en metode til analyse af biospecifikke affinitetsreaktioner, hvilken metode omfatter binding af et stof til receptorer, som er immobiliseret på et bæremateriale indeholdt i en kolonne. Før analyse kan prøven vaskes inden i kolonnen, idet det kemiske analyseprodukt, der ønskes analyseret, tilbageholdes i kolonnen ved hjælp af fastholdelsen til bærematerialet. Muligheden for at anvende denne kolonne til hybridisering er ikke nævnt.

Som det vil blive beskrevet mere udførligt nedenfor adskiller den foreliggende opfindelse sig derfor markant fra den kendte teknik, idet den hybridiserede eller uhybridiserede prøve filtreres gennem et filter ind i en beholder, fortrinsvis en sprøjte, hvorved uopløselige biologiske urenheder holdes tilbage på filteret og derved frasepareres. Inde i beholderen bindes den eftersøgte nukleinsyre til faste partikler, hvorefter det er muligt at vaske nukleinsyren (stadig bundet til partiklerne) inde i sprøjten ved gentagne suspenderinger efterfulgt af filtrering gennem ovenfor nævnte filter, idet partiklerne ikke kan passere dette filter.

Teknikken i den sandwich-hybridisering der er benyttet ved fremgangsmåden er beskrevet i europæisk patentskrift nr. 79139, og de grundlæggende principper i væskehybridisering (solution hybridization) er beskrevet i britisk patentskrift nr. 2169403. Væskehybridisering foretages i opløsningsfase ved at man bruger mindst to indbyrdes ikke-homologe prober med evne til at hybridisere med den eftersøgte nukleinsyre idet mindst den ene af proberne, detektorproben, er udstyret eller er i stand til at blive udstyret med en påviselig mærkning, og mindst én, fangproben, har evne til at blive bundet ved dannelse af et affinitetspar til en anden bestanddel, som er bundet til en fast bærer.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det også muligt at anvende en væskehybridisering i hvilken detektorproben eller fangproben er erstattet med en modificeret primer. Brugen af modificerede primere ved hybridisering er beskrevet i britisk patentansøgning nr. 8805681. Ved den metode bruges der to modificerede primere som er komplementære til de modsatrettede strenge af mål-nukleinsyren. Yderligere behøves der mindst én nukleinsyreprobe som er i stand til at hybridisere selektivt med mål-nukleinsyren og som ikke er homolog med de ovennævnte primere.

Hvis en modificeret primer virker som detektorprobe, dvs. er udstyret eller kan udstyres med en påviselig mærkning, vil den pågældende selektive probe være analog med den fangprobe der bruges i væskehybridisering, dvs. at den er udstyret eller kan udstyres med den ene del af et affinitetspar eller et reaktionspar. Hvis der bruges en modificeret primer som fangprobe, bruges den selektive probe som detektorprobe, dvs. at den er udstyret eller kan udstyres med en påviselig mærkning.

Ved fremgangsmåden lader man de modificerede primere hybridisere med de komplementære strenge af den eftersøgte nukleinsyre efter at de er gjort enkeltstrengede. Derefter inkuberes blandingen under tilstedeværelse af en polymerase som erkender skabelonen (template), dvs. det eftersøgte nukleinsyremolekyle; på grund af polymeraseaktiviteten kan primerne forlænges til kæder indeholdende indtil flere tusinde baser. Polymeriseringsreaktionen gentages om nødvendigt indtil der er opnået det antal af kopier af den eftersøgte nukleinsyre der behøves for at opnå den i det givne tilfælde ønskede følsomhed og hvor hver kopi er udstyret med én modificeret primer. I tilfælde af at den eftersøgte nukleinsyre er et enkeltstrenget RNA, benyttes der i første trin en revers-transkriptase ved hjælp af hvilken der først dannes en cDNA-streng. Efter polymeriseringen udføres der hybridisering mellem kopierne af den eftersøgte nukleinsyre, udstyret med modificerede primere, og den selektive probe.

Sandwich-hybridisering udføres ved anvendelse af mindst to indbyrdes ikke-homologe prober med evne til at hybridisere med den eftersøgte nukleinsyre, hvoraf den ene, fangproben, er bundet til en fast bærer og den anden, detektorproben, er udstyret eller i stand til at blive udstyret med en detekterbar mærkning. Det er ligeledes muligt at benytte hybridisering med en fast bærer, i hvilken der bruges en modificeret primer som detektorprobe (GB 8805681).

I dette tilfælde er den ved fremgangsmåden anvendte nukleinsyreprobe, der kan hybridisere selektivt med den eftersøgte nukleinsyre, bundet til en mikropartikel.

Både ved sandwich-hybridiseringsmetoden og ved væskehybridiseringsmetoden skilles al overskydende detektorprobe fra den mellem den eftersøgte nukleinsyre, fangproberne og detektorproberne dannede hybrid ved omhyggelig vaskning af de til den faste bærer (filter, rørepind, mikrotiterbakke etc.) bundne hybrider. I det tilfælde at der bruges mikropartikler som den faste bærer, udføres adskillelsen ved centrifugering og flere ganges vask af partiklerne, som beskrevet i en artikel om væskehybridisering, Nucleic Acids. Res. 14, 5037-5048, 1986, og i europæisk patentskrift nr. 205532 om sandwich-hybridisering. Det er også muligt at pakke mikropartiklerne i en kromatografisøjle og eluere den overskydende detektorprobe fra søjlen (GB 2169403). Når der bruges modificerede primere udføres adskillelsen ved de samme metoder som ved sandwich-hybridisering og væskehybridisering.

Det er opfindelsens formål ved hjælp af to eller flere filtreringer i samme beholder at fremskynde og lette gennemførelse af hybridiseringsmetoder og desuden at forbedre deres følsomhed, reproducerbarhed og økonomi. Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det desuden muligt uden omstændelige, forberedende behandlingstrin at udføre nukeinsyreanalyser på prøver som indeholder store mængder af vanskeligt fjerneligt biologiske urenheder.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen bruges der passende forbehandlede partikler som fast bærer. Der er dukket flere problemer op i forbindelse med fraskillelse af partiklerne fra hybridiseringsblandingen, når der er anvendt konventionelle procedurer, især når prøven har indeholdt store mængder uopløselige biologiske urenheder. Ved centrifugering kan disse urenheder ikke skilles fra de hybrider der ønskes bestemt; de skiller sig ud fra hybridiseringsopløsningen sammen med partiklerne. Yderligere

mistes en del af partiklerne under de gentagne vaskeprocesser idet de hænger fast på væggene af centrifugen og vaskebeholderne. Brug af kromatografsøjler er for sin del langsom og omstændelig, især i rutineanalyser, og også dyr.

Ifølge opfindelsen kan man afhjælpe de ovennævnte problemer ved at filtrere en hybridiseret eller uhybridiseret nukleinsyreprøve over i en beholder i hvilken enten den i prøven eventuelt tilstedeværende eftersøgte nukleinsyre om nødvendigt hybridiseres og bindes til partikler som er til stede i beholderen eller til partikler som indføres i beholderen efter hybridisering under formidling af en nukleinsyreprobe, eller ved at filtrere kopier af de eftersøgte nukleinsyremolekyler over i en beholder i hvilken kopierne af den eftersøgte nukleinsyres molekyler om nødvendigt hybridiseres og bindes til partikler som er til stede i beholderen eller til partikler som indføres i beholderen efter hybridisering under formidling af de modificerede primere ved hjælp af hvilke de var polymeriseret, og ved at man derefter filtrerer partiklerne og vasker dem et passende antal gange i den samme beholder, hvorefter man detekterer den eftersøgte nukleinsyre ved en i det givne tilfælde egnet fremgangsmåde.

Bindingen af den eftersøgte nukleinsyre til partiklerne foretages fx ved at man lader den eftersøgte nukleinsyre hybridisere med en til partiklerne bundet nukleinsyreprobe eller med en probe der kan bindes til partiklerne, eller ved at man lader den nukleinsyreprobe, som har hybridiseret med den eftersøgte nukleinsyre, blive bundet til partiklerne, eller ved at man binder kopierne af den eftersøgte nukleinsyres molekyler til partiklerne under formidling af de modificerede primere ved hjælp af hvilke de blev polymeriseret.

Ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan de i prøven tilstedeværende uopløselige biologiske urenheder bekvemt elimineres. Fordelene ved denne fremgangsmåde

frem for centrifugeringsmetoder og kromatografmetoder er at vaskeprocesserne bliver nemme og hurtige. Yderligere er vaskeprocesserne effektive fordi partiklerne straks og fuldstændigt resuspenderes i vaskeopløsningen. Man undgår tab af partikler som altid forekommer ved centrifugeringsmetoderne, fordi filtreringerne foregår i en og samme beholder. Dette forbedrer fremgangsmådens følsomhed og reproducerbarhed.

De vigtigste hybridiseringsmetoder i hvilke fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan bruges, beskrives mere udførligt i det følgende. Brugen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er imidlertid ikke begrænset til de nedenfor beskrevne metoder; det er indlysende at en fagmand kan benytte fremgangsmådens princip også i andre hybridiseringsmetoder.

1. Væskehybridisering forbedret ved hjælp af filtrering

Hybridisering foretages i opløsning under betingelser som er beskrevet tidligere (GB 2169403). Efter hybridiseringen filtreres reaktionsopløsningen, hvorved hybrider og overskydende detektorprobe og fangprobe passerer gennem filteret, mens alle eventuelt i hybridiseringsopløsningen tilstedeværende uopløselige biologiske urenheder forbliver udenfor. Hybrider som bliver tilbage i filteret kan om nødvendigt genvindes ved at man skyller filteret med en hybridiseringsopløsning som ikke indeholder nukleinsyrer. Derefter lader man hybriderne binde sig til partiklerne under betingelser som vælges på grundlag af det i fremgangsmåden anvendte affinitetspar.

Hybridiseringen kan også foretages efter filtreringen. I så tilfælde er det bedst ikke at tilsætte partiklerne førend efter hybridiseringen, da tilsætning af partikler inden hybridiseringen kan have skadelig virkning på hybridiseringskinetikken.

Efter bindingen skilles partiklerne fra hybridiseringsopløsningen ved filtrering og al overskydende detektorprobe vaskes bort fra partiklerne ved filtrering af vaskevæsken gennem filteret et ønsket antal gange.

De yderligere trin i forbindelse med påvisning af hybriderne afhænger af den detektionsmetode der er valgt til det givne tilfælde. Hvis der bruges en radioaktiv probe, kan der foretages måling direkte på partiklerne eller filtrene, eller detektorproben kan skilles fra partiklerne fx ved hjælp af natriumhydroxid.

Eluering med natriumhydroxid fungerer som en yderligere vask, som forbedrer følsomheden af analysen, og er nem at udføre ved filtrering. Hvis der bruges enzymatisk påvisning, adskilles farveopløsningen fra partiklerne efter reaktionen og måles.

En måde til udøvelse af fremgangsmåden er belyst i tegningen ved trinnene a-g ved hvilke hybridiseringsopløsningen filtreres ved hjælp af en sprøjte.

Trinnene i fremgangsmåden er:

Trin a: Hybridisering mellem detektorprober (1), fangprober (2) og mål-nukleinsyre (3) udføres i en særskilt beholder.

Trin b: Partikler (4) tilsættes om nødvendigt og et filter (5) sættes på sprøjten (6).

Trin c: Hybridiseringsopløsningen trækkes op i sprøjten.

Trin d: Filteret skylles om nødvendigt ved at en hybridiseringsopløsning (7), der ikke indeholder nukleinsyrer, trækkes gennem det.

Trin e: Hybriderne bindes til partiklerne under betingelser som er fordelagtige for dannelsen af affinitetspar.

Trin f: Hybridiseringsopløsningen skilles fra partiklerne ved at man tømmer sprøjten, og partiklerne vaskes fri for uhybridiseret detektorprobe ved hjælp af skyllevæske (8).

Trin g: Detektorproberne elueres fra partikler i et elueringsmiddel (9), og detektorproberne påvises i den ovenstående væske. Eventuelt kan trin g erstattes med måling af detektorproberne direkte fra partiklerne eller filtrene.

Reagenssættet indeholder mindst to indbyrdes ikke-homologe prober med evne til at hybridisere med den eftersøgte nukleinsyre, hvoraf mindst den ene af proberne, detektorproben, er udstyret med eller i stand til at blive udstyret med en mærkning, og mindst én, fangproben, er udstyret med et sted (site) eller en komponent eller er i stand til at blive udstyret med en komponent med affinitet til en anden komponent. Yderligere indeholder sættet mindst ét filter og en beholder, fortrinsvis en sprøjte, som er forbundet med eller kan forbindes med det nævnte filter samt partikler, til hvilke den ovennævnte anden bestanddel er blevet bundet.

2. Fremgangsmåde ved væskehybridisering som er forbedret ved filtrering og i hvilken en modificeret primer bruges som detektorprobe

Den eftersøgte nukleinsyres molekyler kopieres som tidligere beskrevet (britisk patentansøgning nr. 8805681) ved at man bruger to primere som er komplementære til de modsatrettede strenge af den eftersøgte nukleinsyre, og som er udstyret eller kan udstyres med en påviselig mærkning. Hybridisering udføres derefter mellem de med modificerede primere udstyrede kopier af den eftersøgte nukleinsyre og fangproben, som er i stand til at hybridisere selektivt med dem, og som er udstyret med et sted eller en komponent eller kan udstyres med en komponent der har affinitet til en anden komponent. Fangproben må ikke være homolog med de i fremgangsmåden anvendte modificerede primere. Hybridiseringsopløsningen filtreres over i en beholder, fortrinsvis i en sprøjte, i hvilken bindingen til partikler skal foregå. Filteret vaskes om nødvendigt, hvorefter

man lader hybriderne binde sig til partiklerne under passende betingelser. Hvis hybridisering ikke udføres førend efter filtreringen, tilsættes partiklerne fortrinsvis først efter hybridiseringen.

Efter bindingen skilles partiklerne fra hybridiseringsopløsningen og eventuel overskydende modificeret primer ved filtrering og vask af partiklerne det ønskede antal gange. Påvisning kan udføres enten direkte fra partiklerne eller filteret, eller ved at man eluerer de med modificerede primere udstyrede kopier af den eftersøgte nukleinsyres molekyler og ved at man måler mærkningen i den ovenstående væske.

Reagenssættet indeholder to primere, som er komplementære til de modsatte polariteter af den eftersøgte nukleinsyre, og som er udstyret med eller kan udstyres med en påviselig mærkning, samt en nukleinsyreprobe, dvs. en fangprobe som har evne til at hybridisere selektivt med den eftersøgte nukleinsyre, og som er udstyret med et sted (site) eller en komponent eller som kan udstyres med en komponent som har affinitet til en anden komponent, og som ikke er homolog med de ovennævnte modificerede primere. Yderligere indeholder sættet mindst ét filter og en beholder med fordel en sprøjte, som er forbundet med eller kan forbindes med nævnte filter, samt partikler, til hvilke den ovennævnte anden komponent er blevet bundet.

3. Væskehybridiseringsmetode som er forbedret ved filtrering og under anvendelse af en modificeret primer som fangprobe

Den eftersøgte nukleinsyres molekyler kopieres ved en tidligere beskrevet fremgangsmåde (GB patentansøgning nr. 8805681) ved hjælp af to primere som er komplementære til de modsatrettede polariteter af den eftersøgte nukleinsyre og er udstyret med et område (site) eller en komponent, der har affinitet til en anden komponent, eller kan udstyres med en sådan komponent. Hybridisering foretages

mellem de med modificerede primere udstyrede kopier af den eftersøgte nukleinsyres molekyler og den detektorprobe, der har evne til at hybridisere selektivt med dem og er udstyret eller i stand til at blive udstyret med en påviselig markør. Detektorproben må ikke være homolog med de ved fremgangsmåden anvendte modificerede primere. Hybridiseringsopløsningen filtreres over i en beholder, hensigtsmæssigt en sprøjte, filteret vaskes om nødvendigt, og de med modificerede primere udstyrede kopier af den eftersøgte nukleinsyre bindes til partiklerne. Hvis hybridiseringen først udføres efter filtreringen tilsættes partiklerne fortrinsvis efter hybridiseringen.

Efter bindingen skilles partiklerne fra hybridiseringsopløsningen og tillige eventuelle overskydende detektorprober ved filtrering og ved at de vaskes et ønsket antal gange, hvorpå påvisning (detektering) udføres som beskrevet ovenover under punkt 1.

Reagenssættet indeholder to primere som er komplementære til de modsatrettede strenge af den eftersøgte nukleinsyre, og som er udstyret med et område (site) eller en komponent (eller kan udstyres med en komponent) der har affinitet til en anden komponent, samt en nukleinsyreprobe, dvs. en detektorprobe som kan hybridisere selektivt med den eftersøgte nukleinsyre, og som er udstyret eller kan udstyres med en påviselig markør, og som ikke er homolog med den modificerede primer. Yderligere indeholder sættet mindst ét filter og en beholder, hensigtsmæssigt en sprøjte, som er forbundet med eller kan forbindes med nævnte filter, samt partikler, til hvilke den ovennævnte anden komponent er blevet bundet.

4. Fremgangsmåde ved sandwich-hybridisering forbedret ved hjælp af filtrering

En hybridiseringsopløsning indeholdende indbyrdes præ-hybridiserede eller fortrinsvis uhybridiserede molekyler af den eftersøgte nukleinsyre og detektorprober filtre-

res for at fjerne alle uopløselige biologiske urenheder. Molekyler af den eftersøgte nukleinsyre, der forbliver i filteret, kan om nødvendigt genvindes ved at man skyller filteret med en hybridiseringsvæske som ikke indeholder nukleinsyrer. Hybridisering udføres derefter mellem den eftersøgte nukleinsyre og de til partikler bundne fangprober, og på samme tid udføres hybridisering mellem den eftersøgte nukleinsyre og detektorproberne, såfremt der ikke er udført præ-hybridisering. Endelig skilles partiklerne fra hybidiseringsopløsningen ved filtrering, og påvisning udføres enten direkte fra partiklerne eller fra vaskeopløsningen som beskrevet ovenover angående væskehybridisering.

Figurserien a-f (fig. 2) angiver en fremgangsmåde, ved hvilken der bruges en sprøjte:

Trin a: Partikler, til hvilke fangproberne (3) er blevet bundet, indføres om nødvendigt i sprøjten. Filteret (4) anbringes.

Trin b: Hybridiseringsopløsningen, der indeholder den eftersøgte nukleinsyre (5), og detektorproben (6) trækkes op i sprøjten.

Trin c: Om nødvendigt skylles filteret ved at man trækker en hybridiseringsopløsning (7), der ikke indeholder nukleinsyrer, igennem det.

Trin d: Der gennemføres hybridisering.

Trin e: Hybridiseringsopløsningen skilles fra partiklerne ved at man tømmer sprøjten, og partiklerne i sprøjten vaskes fri for uhybridiserede prober ved hjælp af en vaskevæske (8).

Trin f: Detektorproberne elueres fra partiklerne i en eluent (9), og detektorproberne påvises i den overstående væske.

Trin a kan helt udelades hvis partiklerne og filteret er blevet fikseret på forhånd. Inden trin c er

det muligt at udføre en præ-hybridisering i hvilken den eftersøgte nukleinsyre og detektorproben hybridiseres med hinanden. Som i væskehybridisering kan trin f erstattes ved at man måler detaktorproben direkte fra partiklerne.

Det ved fremgangsmåden anvendte reagenssæt indeholder mindst to indbyrdes ikke-homologe prober med evne til at hybridisere med den eftersøgte nukleinsyre, hvoraf mindst den ene, detektorproben, er udstyret eller i stand til at blive udstyret med en påviselig markør, og mindst én, fangproben, er bundet til partiklerne. Yderligere indeholder sættet mindst et filter og en beholder, fortrinsvis en sprøjte, som er forbundet med eller med hvilken det er muligt at forbinde det nævnte filter.

5. Hybridisering med fast bærer, forbedret ved filtrering og med brug af en modificeret primer som detektorprobe

Den eftersøgte nukleinsyres molekyler kopieres ved hjælp af to primere som er komplementære til de modsatrettede strenge af den eftersøgte nukleinsyre og er udstyret eller kan udstyres med en påviselig markør. Nukleinsyreopløsningen filtreres over i en beholder, hensigtsmæssigt en sprøjte, og filteret vaskes om nødvendigt med en hybridiseringsopløsning som ikke indeholder nukleinsyrer. Hybridisering udføres mellem de med modificerede primere udstyrede kopier af den eftersøgte nukleinsyre, og den til partikler bundne nukleinsyreprobe, der har evne til at hybridisere selektivt med kopierne. Nukleinsyreproben må ikke være homolog med de modificerede primere. Derefter skilles partiklerne fra hybridiseringsopløsningen og overskydende modificeret primer ved filtrering og vask et ønsket antal gange. Påvisning udføres enten direkte på partiklerne eller ved eluering af de med modificerede primere udstyrede kopier af den eftersøgte nukleinsyre og måling af markøren i den ovenstående væske.

Reagenssættet indeholder to primere som er komplementære til de modsatrettede strenge (polariteter) af den eftersøgte nukleinsyre og som er udstyret eller kan udstyres med en påviselig markør, samt en nukleinsyreprobe, dvs. en fangprobe, som er i stand til at hybridisere selektivt med den eftersøgte nukleinsyre og som er bundet til en partikel og ikke er homolog med ovennævnte primere. Yderligere indeholder sættet mindst ét filter og en beholder, fortrinsvis en sprøjte, som er forbundet med eller som kan forbindes med nævnte filter, samt partikler til hvilke den ovennævnte anden bestanddel er bundet.

Den praktiske anvendelse af fremgangsmåden til væskehybridisering er beskrevet nedenfor ved hjælp af nogle eksempler.

Eksempel 1

Udvinding af hybrider i væskehybridisering ved filtrering af "Pandex"-avidinpartikler

Materialer

De anvendte faste bærere er avidin-coatede polystyrenpartikler ("Epicon" avidinpolystyren-assay particles, Pandex Laboratories, Inc., USA). Partiklernes diameter er i gennemsnit 0,8 µm, og på grund af deres ringe størrelse forbliver de jævnt fordelt i opløsningen. Partiklerne foreligger som en 5%s v/r (vægt/rumfang, dvs. forhold mellem faststof og væske som mellem g og ml) opløsning. For at fjerne eventuelt frit avidin, ultralydbehandles og vaskes partiklerne én gang inden brug.

Til filtrering af hybridiseringsopløsningen og fraskillelse af de faste bærerpartikler fra opløsningen bruges der polyvinyldifluoridfiltre med en porestørrelse på 0,45 µm ("Millex"-HV_{13} fra Millipore).

Hybriderne bindes til partiklerne i en 1 ml stor engangssprøjte i hvilken det er praktisk at udføre vaskeprocesserne.

Hybridisering

Det eftersøgte DNA var plasmidet pBR-322 som var lineariseret ved hjælp af EcoRI enzymet. De anvendte detektorprober var ^{32}P-mærket plasmid pKTH 1300. De anvendte fangprober var fotobiotinylerede fager mKTH 1301 og 1302. Fremstillingen af detektorproberne og fangproberne er beskrevet i Journal of Biotechnology, Vol. 5, 267-277, 1987. Hybridiseringen foretoges i 120 µl af en opløsning som i den mængde indeholdt de følgende mængder reagenser: 10^8, 10^9 eller 10^{10} molekyler af det eftersøgte DNA, 4,6 x 10^5 cpm radioaktiv probe, dvs. 7 x 10^8 molekyler, og 1 x 10^{10} molekyler af hver af de biotinylerede mKTH 1301 og 1302. Yderligere indeholdt hybridiseringsopløsningen 0,6M natriumklorid, 20 mM natriumfosfat, 1 mM EDTA og 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS). Hybridiseringen forløb i tre timer ved 65°C.

Udvinding af hybriderne

20 µl af en ultralydbehandlet, én gang vasket 5%s suspension af "Pandex" avidin-partikler indførtes i 1 ml store engangssprøjter. Derefter anbragtes "Millex" HV_{13} filterenheder i sprøjterne og der blev trukket 120 µl reaktionsopløsning op i sprøjterne. For at skylle hybriderne af filteret blev der yderligere trukket 120 µl DNA-fri hybridiseringsopløsning op i hver sprøjte hvorefter det samlede rumfang i sprøjterne blev 260 µl. Bindingen af hybriderne til partiklerne fandt sted ved 37°C i 15 min i et "end-over-end" blandeapparat. Efter bindingen vaskedes partiklerne med en vaskeopløsning, som indeholdt 15 mM natriumklorid, 1,5 mM natriumcitrat og 0,2% SDS og som havde en temperatur på 50°C. Først vaskedes partiklerne fem gange ved at sprøjten blev trukket fuld (1 ml) af vaskeopløsning der straks udtømtes igen. Yderligere vaskedes de to gange ved at man lod opløsningen virke i to minutter hver gang. Efter vaskeprocesserne elueredes detektorproben fra

hybriderne ved at der blev trukket 125 µl af en opløsning, som indeholdt 0,2 M natriumhydroxid og 1 mM EDTA, op i sprøjten. Opløsningen fik lov at virke i 5 minutter ved stuetemperatur, hvorefter behandlingen gentoges én gang. Der sattes 2 ml "Aquasol" scintillationsvæske til de ovenstående natriumhydroxid-væsker, og deres radioaktivitet måltes ved hjælp af en betatæller.

Resultater

Resultaterne kan sammenfattes i følgende tabel:

Eftersøgt DNA[1)]	Specifik cpm[2)]	signal/baggrund
10^8	4012	8,0
10^9	27551	49,0
10^{10}	46515	82,0

1) Antal af molekyler

2) cpm er et gennemsnit af tre parallelle bestemmelser; 0-prøvens signal (573 cpm) er subtraheret fra den specifikke cpm.

Eksempel 2

Udvinding af hybrider ved filtrering i sandwich-hybridisering på mikropartikler

Reagenser

Reagenserne til sandwich-hybridiseringen var derivater af det 4,2 kb store kryptiske plasmid (pJD1) fra Neisseria gonorrhoeaa (C. Korch, P. Hagblom og S. Normark, 1983. Sequence-specific DNA modification in Neisseria gonorrhoeae. Journal of Bacteriology 155, 1324-32). Rekombinantplasmidet Flo1/pUM1, der indeholder det kryptiske plasmid fra N. gonorrhoeae i pBR322, anvendtes som det eftersøgte DNA. Rekombinantplasmidet pKTH1368, der indeholder et 1,3 kb stort HinfI-TaqI fragment af det kryptiske plasmid fra N. gonorrhoeae, anvendtes som fangprobe. De

rekombinante fager mKTH1369 og mKTH1370 (begge polariteter) der indeholder et 1,7 kb stort HinfI-HinfI fragment i fagen M13 mp10, anvendtes som detektorprobe. Det eftersøgte DNA (Flo1/pUM1) lineariseredes med EcoR1.

Mærkning

Fagerne mKTH1369 og mKTH1370, der anvendtes som detektorprober, blev mærket med [α-^{32}P]dCTP (U.K. Amersham) ved primerforlængelse med Klenow-fragmentet af DNA-polymerase I til en specifik aktivitet på ca. 10^8 cpm/µg. Plasmidet pKTH1368, der blev brugt som sporstof til at mængdebestemme den til mikropartiklerne bundne mængde DNA, mærkedes ved nicktranslation (12) med [α-^{32}P]dCTP til en specifik aktivitet omkring 10^8 cpm/µg.

Binding af fangprober til mikropartikler

Fangproberne fæstnedes til ensartede polystyrenmikropartikler (O = 4,5 µm), der på deres overflade indeholder sekundære hydroxygrupper. Hydroxygrupperne på partiklernes overflade aktiveredes ved tilsætning af 0,29 g (1,5 mmol) p-toluensulfonylklorid og 60 µl (0,75 mmol) pyridin til 30 mg partikler i 1 ml acetone med inkubering under skiftevis opret og omvendt stilling i 20 timer ved stuetemperatur. Partiklerne overførtes til vandig opløsning ved vask af dem med stigende koncentrationer af H_2O i acetone. Endelig vaskedes partiklerne en enkelt gang med 0,2M boratbuffer pH 9,5 og de opslæmmedes derefter i samme buffer til en koncentration på 30 mg/ml. Plasmidet pKTH1368 denatureredes og fragmenteredes ved kogning i 0,2M NaOH i 5 minutter. 10 µg pKTH1368 inkuberedes med 1 mg aktiverede kugler i 75 µl 0,2M boratbuffer pH 9,5 i 18 timer ved stuetemperatur under rotation med bund og top skiftevis opadvendt. Partiklerne skilles fra opløsningen ved centrifugering. Mængden af koblet DNA kvantiteredes ved hjælp af radioaktivt mærket pKTH1368 som sporstof. De p-toluensulfonylgrupper, der ikke havde reageret, blokeredes med 1M

Tris-HCl buffer pH 9,0 i 4 timer ved stuetemperatur. Kuglerne opslæmmedes i 0,05M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1M NaCl og 0,01% natriumdodecylsulfat (SDS) til en koncentration på 30 mg/ml og opbevaredes ved +4°C.

Hybridisering og udvinding af hybrider

Hybridiseringsreaktionen udførtes i 1 ml store engangssprøjter med "Millex" HV13 filterenheder (filtre som i eksempel 1), hvori der indførtes 1 mg partikler pr. analyse, hvilket svarer til $3,7 \times 10^{10}$ molekyler fangprobe (61 fmol). Som detektorprober brugtes der pr. reaktion 2×10^8 molekyler 300000 cpm (0,3 fmol) ^{32}P-mærket mKTH1369 og mKTH1370. 70 µl reaktionsopløsning indeholdende 0,6M NaCl, 60 mM natriumcitrat pH 7,6 (4 x SSC), 20 mM natriumfosfat og 0,25% SDS, detektorprober og de i nedenstående tabel angivne mængder af det eftersøgte DNA blev trukket top i sprøjterne. For at skylle det eftersøgte DNA af filtrene blev der trukket yderligere 30 µl DNA-fri hybridiseringsopløsning op i sprøjten, hvorefter det samlede rumfang i sprøjterne var 100 µl. Hybridiseringstiden var 5 timer ved 65°C. Efter hybridiseringen vaskedes partiklerne fem gange ved 55°C med 0,1 x SSC, 0,2% SDS ved at opløsningen blev suget gennem filteret. Efter vaskeprocesserne udførtes eluering af hybriderne og påvisning som tidligere beskrevet (se eksempel 1).

Resultater

Resultaterne er sammenfattet i følgende tabel:

Eftersøgt DNA*	Specifik cpm**	signal/baggrund
4×10^7	762	8,5
10^8	963	10,7
4×10^8	6877	76,4
10^9	12925	143,6

*) antal molekyler

**) cpm er et gennemsnit af fire parallelle bestemmelser; 0-prøvens signal (90 cpm) er blevet fratrukket det specifikke cpm.

Eksempel 3

Udvinding af hybrider i væskehybridisering ved filtrering af Pandex-avidin partikler, hvori en modificeret primer bruges som detektorprobe

Materialer og reagenser

De anvendte faste bærere, filtre og beholdere var som beskrevet i eksempel 1. I dette eksperiment var det eftersøgte et rekombinant-plasmid (pBR322/CMV HindIII L) som indeholder et 12,3 kb stort fragment af cytomegalovirusgenomet (CMV, AD 169, ATCC, VR-538). De to anvendte detektorprimere (P_a, P_b, fig. 3) var 20 nukleotider lange og syntetiseret med standardmetoder på en automatiseret syntesemaskine. De svarer til to regioner som i det CMV-specifikke indskud var 111 nukleotider fra hinanden. To selektive fangprober (S_1, S_2, fig. 3) genkendte regioner på hver af de to strenge mellem de to detektorprimere. Detektorprimerne blev mærket med ^{32}P i deres 5'-ender til en specifik aktivitet på 4×10^9 CPM/µg ved anvendelse af den velkendte reaktion med polynukleotidkinase og γ-^{32}P-ATP (Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982).

Biotinylerede nukleotider føjedes til 3'-enderne af fangproberne ved anvendelse af bio 11-dUTP (BRL) og terminal transferase (Promega Biotech.) som beskrevet af Riley et al., DNA 5 (4), pp. 333-337, 1986 . Det eftersøgte plasmid blev lineariseret ved hjælp af enzymet EcoRI. Klenow-fragment af DNA polymerase blev købt hos Boehringer-Mannheim.

Kopiering af det søgte DNA

Fire forskellige reaktioner indeholdt henholdsvis 0, 10^4, 10^6, 10^8 molekyler (svarende til 2×10^{-20}, 2×10^{-18} og 2×10^{-16} mol) af det søgte DNA. Yderligere indeholdt alle fire reaktioner i et samlet rumfang på 50 µl: 2 pmol hver af de to primere, 0,5 mM af hver af de fire deoxynukleosidtrifosfater (dvs. dATP, dCTP, dGTP og dTTP), 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl og 10 mM dithiotretiol. Blandingen opvarmedes til 100°C i 2 min., derefter inkuberedes den i 5 minutter ved 37°C hvorpå der tilsattes 1 µl (svarende til 1 unit) DNA polymerase. Derefter inkuberedes blandingen igen i 10 minutter ved 37°C. Kogning efterfulgt af detektorprimernes baseparring og en inkubering med tilsat DNA polymerase udgør DNA syntese-cyklus. Kredsløbet gentages 16 gange.

Hybridisering

Efter den sidste cyklus opvarmedes prøven igen til 100°C, hvorefter den tilsattes 10 pmol af den selektive probe sammen med 0,9M NaCl, 2 mM EDTA, 20 mM natriumfosfat pH 7,5 og 0,1% natriumdodecylfosfat.

Rumfanget øgedes til 100 µl og de anførte koncentrationer er de endelige koncentrationer. Hybridiseringen forløb i en time ved 50°C.

Udvinding af hybrider

Pandex-avidinpartikler indførtes i 1 ml store engangssprøjter og "Millex" HV_{13} filterenheder anbragtes i sprøjterne som i eksempel 1. 100 µl af reaktionsblandingen blev trukket op i sprøjterne. For at skylle hybrider af filteret blev yderligere 120 µl DNA-fri hybridiseringsopløsning trukket op i sprøjterne, hvorefter det samlede rumfang var 240 µl. Bindingen af hybriderne til partiklerne og vaskningen af partiklerne udførtes som i eksempel 1. Efter vaskeprocesserne blev de med modificerede primere

udstyrede kopier af de eftersøgte nukleinsyremolekyler påvist som i eksempel 1.

Resultater

Resultaterne kan sammenfattes i følgende tabel:

Eftersøgt DNA (mol)	^{32}P-aktivitet i samlede hybrider[a] (CPM over baggrund)[b] Antal kredsløb = 16
0	0
2×10^{-20}	1050
2×10^{-18}	15000
2×10^{-16}	51300

a) Gennemsnit af to bestemmelser

b) ND - ikke påviselig (radioaktivitet mindre end 2 gange gennemsnitlig beggrundsaktivitet.

Eksempel 4

Udvinding af hybrider i væskehybridisering ved filtrering af Pandex-avidinpartikler hvori en modificeret primer bruges som fangprobe

Det eftersøgte DNA samt de anvendte materialer og reagenser var de samme som i eksempel 3 med følgende undtagelser: De som fangprober benyttede primere (P_a, P_b, fig. 3) blev ikke mærket med ^{32}P, men deres 5'-ender blev i stedet modificeret så de indeholdt en biotinrest. Denne kemiske modifikation blev udført ved anvendelse af kendte metoder som beskrevet af Chollet og Kawashima, Nucleic Acids Research, 13, s. 1529-1541, 1985. De to selektive prober (S_1 og S_2, fig. 3) blev i dette tilfælde mærket i deres 5'-ender så at de virkede som detektorprober. Deres specifikke aktivitet var henholdsvis ca. 2×10^9 og $2,5 \times 10^9$ cm/µg.

Kopieringen af det eftersøgte DNA og hybridiseringen udførtes som beskrevet i eksempel 3. De biotinylerede fangprober blev dog tilsat i 10 gange så stor mængde, dvs. 20 pmol hver pr. reaktion. Der udførtes 16 kredsløb som beskrevet i eksempel 3, hvorefter prøven opvarmedes til 100°C og der tilsattes 0,5 pmol af hver af de ^{32}P-mærkede prober S_1 og S_2. Hybridiseringen udførtes under de samme betingelser som i eksempel 3.

Hybriderne blev derefter samlet på Pandex-avidin partikler og vasket og deres ^{32}P-aktiviet talt som i eksempel 3. Resultaterne er vist i følgende tabel:

Eftersøgt DNA (mol)	^{32}P-aktivitet i samlede hybrider[a] (CPM over baggrund)[b]
	Antal kredsløb = 16
0	0
2×10^{-20}	1420
2×10^{-18}	18500
2×10^{-16}	68300

a) Gennemsnit af to bestemmelser

b) ND - ikke påviselig

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til påvisning af nukleinsyrer ved hybridisering ved hjælp af filtrering, k e n d e t e g n e t ved, at en hybridiseret eller uhybridiseret nukleinsyreprøve suges op gennem et filter i en sprøjte, i hvilken den eftersøgte nukleinsyre (målnukleinsyren) hybridiseres, om nødvendigt, og bindes til partikler i samme sprøjte eller til partikler som tilføres efter hybridiseringen under formidling af en nukleinsyreprobe, eller hvor kopier af målnukleinsyremolekylerne bindes til partiklerne under formidling af modificerede primere ved hjælp af hvilke kopierne blev polymeriseret, hvorefter partiklerne i sprøjten skilles fra ved filtrering og vaskes i samme sprøjte et i det givne tilfælde hensigtsmæssigt antal gange, hvorpå målnukleinsyren påvises på en i det givne tilfælde, hensigtsmæssig måde.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at nukleinsyreprøven filtreres ind i en sprøjte, i hvilken målnukleinsyren hybridiseres med nukleinsyreproben, der er bundet til en partikel, eller med en probe som kan være bundet til en partikel, eller man lader den med målnukleinsyren hybridiserede nukleinsyreprobe binde sig til partikler, eller binder kopier af målnukleinsyremolekylerne til partikler under formidling af de modificerede primere, ved hjælp af hvilke de var blevet polymeriseret, hvorefter partiklerne i sprøjten frafiltreres og vaskes i sprøjten et i det givne tilfælde hensigtsmæssigt antal gange, og målnukleinsyren påvises på en i det givne tilfælde hensigtsmæssig måde.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at følgende trin gennemføres:

a) der udføres hybridisering mellem målnukleinsyren, fangproben og detektorproben,

b) hybridiseringsopløsningen filtreres,

c) om nødvendigt genvindes de hybrider som er tilbage i filteret ved skylning af filteret med en hybridiseringsopløsning der ikke indeholder nukleinsyrer,

d) hybriderne bindes til partikler,

e) partiklerne skilles fra hybridiseringsopløsningen,

f) partiklerne vaskes fri for uhybridiserede detektorprober, og

g) målnukleinsyren påvises ved en i det givne tilfælde egnet fremgangsmåde.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at følgende trin gennemføres:

a) hybridiseringsopløsningen filtreres,

b) om nødvendigt genvindes de målnukleinsyremolekyler som er tilbage i filteret ved skylning af filteret med en hybridiseringsopløsning som ikke indeholder nukleinsyrer,

c) hybridiseringen udføres mellem målnukleinsyren, fangproben og detektorprober,

d) partiklerne tilsættes,

e) hybriderne bindes til partiklerne,

f) partiklerne skilles fra hybridiseringsopløsningen,

g) partiklerne vaskes fri for eventuelle uhybridiserede detektorprober, og

h) målnukleinsyren påvises ved en i det givne tilfælde hensigtsmæssig fremgangsmåde.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at følgende trin gennemføres:

a) den eftersøgte nukleinsyres molekyler kopieres ved anvendelse af to primere der er komplementære til de modsatte polariteter af den eftersøgte nukleinsyre og er udstyret med eller kan udstyres med en påviselig markør,

b) der udføres hybridisering mellem den eftersøgte nukleinsyres molekylkopier udstyret med modificerede primere og fangprober, som har evne til at hybridisere selektivt med dem og er udstyret med et sted (site) eller en komponent eller kan udstyres med en komponent med affinitet til en anden komponent og ikke er homolog med de modificerede primere,

c) hybridiseringsopløsningen filtreres,

d) når det er nødvendigt, genvindes et hvilket som helst hybrid, der forbliver i filteret, ved at rense filteret med en hybridiseringsopløsning, som ikke indeholder nukleinsyrer,

e) hybriderne fikseres til partiklerne,

f) partiklerne skilles fra hybridiseringsopløsningen,

g) partiklerne vaskes fri for et overskud af modificerede primere, og

h) målnukleinsyremolekylkopierne, der er forsynet med en modificeret primer, påvises ved en fremgangsmåde, som er passende i det givne tilfælde.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at følgende trin gennemføres:

a) den eftersøgte nukleinsyres molekyler kopieres ved anvendelse af de primere som er komplementære til de modsatte polariteter af den eftersøgte nukleinsyre og er udstyret med eller kan udstyres med en detekterbar markør,

b) opløsningen indeholdende kopierne af det eftersøgte nukleinsyremolekyle, der er forsynet med en modificeret primer, filtreres,

c) om nødvendigt, udvindes kopierne af det eftersøgte nukleinsyremolekyle, som er forsynet med en modificeret primer, ved skylning af filteret med en hybridiseringsopløsning som ikke indeholder nukleinsyrer,

d) der udføres hybridisering mellem kopierne af det eftersøgte nukleinsyremolekyle, der er forsynet med en modificeret primer og fangproben som er i stand til at hybridisere

selektivt med dem og som er udstyret med et sted (site) eller en komponent eller kan udstyres med en komponent med affinitet til en anden komponent og ikke er homolog med de modificerede primere,

e) partiklerne tilsættes,

f) hybriderne bindes til partiklerne,

g) partiklerne skilles fra hybridiseringsopløsningen,

h) partiklerne vaskes fri for eventuelt overskud af modificerede primere, og

i) kopierne af det eftersøgte nukleinsyremolekyle, som er forsynet med en modificeret primer,påvises ved en i det givne tilfælde hensigtsmæssig fremgangsmåde.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at følgende trin gennemføres:

a) mål-nukleinsyremolekylerne kopieres ved anvendelse af to primere som er komplementære til de modsatte polariteter af målnukleinsyren og er forsynet med et sted (site) eller en komponent, eller kan forsynes med en komponent, med affinitet til en anden komponent,

b) der udføres hybridisering mellem målnukleinsyremokylkopierne som er forsynet med en modificeret primer og detektorproben, hvilken detektorprobe har evne til at hybridicere selektivt med dem, og er udstyret med en detekterbar markør og ikke er homolog med de modificerede primere,

c) hybridiseringsopløsningen filtreres,

d) om nødvendigt genvindes de i filteret tilbageblevne hybrider ved skylning af filteret med en hybridiseringsopløsning som ikke indeholder nukleinsyrer,

e) hybriderne bindes til partiklerne,

f) partiklerne skilles fra hybridiseringsopløsningen,

g) partiklerne vaskes fri for eventuelt overskud af detektorprobe, og

h) målnukleinsyremolekylkopierne, som er udstyret med en modificeret primer, påvises ved en i det givne tilfælde hensigtmæssig fremgangsmåde.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g - n e t ved at følgende trin gennemføres:

a) målnukleinsyremolekylerne kopieres ved anvendelse af to primere som er komplementære til de modsatte polariteter af målnukleinsyren og er udstyret med et aktivt sted (site) eller en komponent, eller kan udstyres med en komponent med affinitet eller reaktivitet over for en anden komponent,

b) opløsningen indeholdende målnukleinsyremolekylkopierne forsynet med en modificeret primer filtreres,

c) hvilke som helst målnukleinsyremolekylkopier, som er forsynet med en modificeret primer og som forbliver i filteret, udvindes ved at filteres skylles med en hybridiseringsopløsning som ikke indeholder nukleinsyrer,

d) der udføres hybridisering mellem (i) målnukleinsyremolekylkopierne som er forsynet med en modificeret primer og (ii) detektorproben som har evne til at hybridisere selektivt med dem og er udstyret eller kan udstyres med en detekterbar mærkning og ikke er homologe med de modificerede primere,

e) partiklerne tilsættes,

f) hybriderne bindes til partiklerne,

g) partiklerne skilles fra hybridseringsopløsningen,

h) partiklerne vaskes fri for eventuelt overskud af detektorprober, og

i) de med en modificeret primer udstyrede målnukleinsyrekopier påvises ved en i det givne tilfælde hensigtsmæssigt fremgangsmåde.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g - n e t ved at følgende trin gennemføres:

a) hybridiseringsopløsningen indeholdende målnukleinsyremolekylerne og detektorproberne filtreres,

b) om nødvendigt genvindes alle de målnukleinsyremolekyler, som måtte være tilbage i filteret ved skylning af filteret med en hybridiseringsopløsning som ikke indeholder nukleinsyrer,

c) der udføres hybridisering mellem detektorproberne, målnukleinsyremolekylerne og fangproberne som er fikseret til partiklerne,

d) partiklerne skilles fra hybridiseringsopløsningen,

e) partiklerne vaskes fri for eventuelt overskud af detektorprober, og

g) målnukleinsyrer påvises ved en i det givne tilfælde hensigtsmæssig fremgangsmåde.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved at målnukleinsyremolekylerne og detektorproberne forhybridiseres før filtrering, i hvilket tilfælde hybridiseringen i trin c) udføres mellem kun den i forvejen dannede hybrid og fangproben.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at følgende trin gennemføres:

a) målnukleinsyremolekylerne kopieres ved anvendelse af to primere som er komplementære til de modsatte polariteter af målnukleinsyren og er forsynet med eller kan forsynes med en detekterbar mærkning,

b) opløsningen, der indeholder målnukleinsyremolekylkopierne forsynet med en modificeret primer, filtreres,

c) om nødvendigt genvindes alle målnukleinsyremolekylkopier forsynet med en modificeret primer som stadig måtte være til stede i filteret, ved skylning af filteret med en hybridiseringsopløsning som ikke indeholder nukleinsyrer,

d) hybridisering udføres mellem (i) målnukleinsyremolekylkopierne, der er forsynet med en modificeret primer, og (ii) den nukleinsyreprobe som har evne til at hybridisere selektivt med dem og som er bundet til partiklerne og ikke er homologe med de modificerede primere,

e) partiklerne skilles fra hybridiseringsopløsningen,

f) partiklerne vaskes fri for eventuelt tilstedeværende overskud af modificerede primere, og

g) de målnukleinsyremolekylkopier som er udstyret med en modificeret primer påvises ved en i det givne tilfælde hensigtsmæssig fremgangsmåde.