

Nukleinsavak izotermikus amplifikációja szilárd hordozón

Kivonat

5

A találmány tárgyát eljárások képezik nukleinsav izotermális amplifikálására szilárd hordozó alkalmazásával. Ezek az eljárások hasznosak nagy teljesítményt igénylő alkalmazásokban, különösen nukleinsav-szekvenálásban.

10

Jellemezés alá /
Jelentés

Nukleinsavak izotermikus amplifikációja szilárd hordozón

A találmány tárgya a nukleinsav amplifikáció területére vonatkozik. Közelebbről a találmány tárgya eljárás nukleinsavak szilárd felszín alkalmazásán alapuló izotermális amplifikálá-
sára, és olyan alkalmazásokban hasznos készülék és reagenskészletek, amelyek nagy teljesít-
ményt igényelnek, különösen a nukleinsav-szekvenálásra.

A nukleinsav-szekvencia-elemzés sok tevékenység sarokkövévé vált a biológiában, bi-
otechnológiában és gyógyászatban. A nukleinsav-szekvenciák meghatározásának a képessége
egyre inkább fontos, minthogy megkezdődött az ember és más magasabb rendű szervezetek
nagy genomjainak meghatározása, és például az egyedi nukleotid polimorfizmusok (SNP) de-
tektálása és a génexpresszió szkrínelésében és monitorozása. A nukleinsav-szekvenálás által
biztosított genetikai információnak sok felhasználása van, például a drogfelfedezésben és
validálásban, betegségek diagnosztizálásában, kockázatértékelésben és organizmusok azonosí-
tásában és jellemzésében.

Egy organizmus, betegség vagy populációk egyedei vonatkozásában megbízható gene-
tikai információ iránti igény gyors növekedése miatt egyre inkább fontos ennek következtében
javítani a szekvenálási eljárások teljesítményét. Az ilyen alkalmazások alapvető célkitűzése a
jelentőséggel bíró — és egy sejttypusból, organizmusból vagy egyedek populációjából száрма-
zó — nukleinsavakban található négy bázis — adenin (A), citozin (C), guanin (G) és timin (T)
vagy uracil (U) — szekvenciájának a meghatározása. A nukleinsav-szekvenáló eljárások több-
sége [összefoglalás: Van H és mtsai., Science 289, 1890-1892 (2000)] lehetővé teszi a nuklein-
sav-szekvencia meghatározását, akár közvetlenül (láncindítókkal irányított nukleotid-kiterjesz-
tés vagy hibridizációs módszerek alkalmazásával), akár közvetetten (elektroforetikus és/vagy
hasítási elemzéssel). Azonban a nukleinsav-szekvencia-elemzésre irányuló bármilyen alkalmá-
zás tudományos és gazdasági értéke nagyban függ az eljárás aktuális teljesítményétől.

A megbízható eredmények eléréséhez megfelelő mennyiségű és minőségű izolált nukle-
insav előállításához szükséges fáradozások képviselik az egyik fő problémát, amit figyelembe
kell venni, amikor értékeljük egy szekvenálási eljárás teljesítményét. A szekvenálandó nuklein-
savat tartalmazó eredeti minta gyakran nem biztosít elegendő anyagot az ilyen vizsgálat elvég-
zéséhez, hacsak nem alkalmazunk viszonylag nagy mennyiségű kiindulási anyagot és/vagy je-
lentékeny emberi beavatkozást. Ez különösen fontos az igazságügyi és régészeti DNS-minták
esetében, vagy adott sejttypusokból előállított mRNS-minták esetében, ahol több száz

nanogramm izolált DNS-szekvenciát igénylő szekvenálási eljárást kell végrehajtani nanogramm, vagy kevesebb összes genomiális DNS-ből.

Az ilyen problémák áthidalására főleg adoptált megoldás a DNS-szekvencia amplifikálása csak a jelentőséggel bíró fragmens több másolatának előállításával. Általában a nukleinsavak amplifikálása lépések sorozatának az ismétlését igényli:

a) Biztosítunk egy első nukleinsavat (templát), amely tartalmazza a jelentőséggel bíró szekvenciát;

b) Biztosítunk egy második nukleinsavat (láncindító), amely tartalmaz — legalább a 3' végén — egy olyan szekvenciát, amely komplementer az első nukleinsavban lévő szekvenciával, és szomszédos vagy belső helyzetű a jelentőséggel bíró szekvencia 3' végéhez képest;

c) Olyan körülményeket biztosítunk, amelyek lehetővé teszik a templát és a láncindító átalakulását egyszálú molekulává, legalább a két nukleinsav komplementer régiójában;

d) Olyan körülményeket biztosítunk, amelyek lehetővé teszik a hibridizációt a templátban és a láncindítóban található komplementer szekvenciák között;

e) Biztosítunk egy nukleinsav-polimerázt, amely képes a templát komplementer szálának a megszintetizálására a hibridizált láncindító 3' végétől kezdődően a Watson és Crick féle bázispárosodási szabályok szerint (A-T vagy A-U és C-G);

f) Előidézzük a keletkezett kétszálú nukleinsav szétválását (az egyik szál az eredeti templáthoz tartozik, a másik szál tartalmazza a láncindítót fuzionáltatva ahhoz a szekvenciához, amely komplementer a templát azon régiójával, ahol a nukleotid-lánchosszabbítás lehetséges volt), oly módon, hogy mindegyik szál templáttá válhat egy másik hibridizációban és polimerizációban.

Általában egy második láncindítót is adunk az amplifikációs reakcióhoz, hogy megindítsuk a polimerizációt a jelentőséggel bíró szekvenciával szomszédos, vagy azon belső helyzetű újonnan szintetizált szálhoz történő hibridizáció révén. Ha két láncindítót alkalmazunk — mindegyik specifikus egy komplementer szálra —, a ciklusok ilyen ismétlése lehetővé teszi a templát szekvencia mindkét szála több másolatának a szintézisét a láncindítókhoz hibridizáló szekvenciák közötti részről. Más megoldásképpen, ha csak egy láncindítót biztosítunk, az egyik szál több másolata keletkezik.

A fő szempont az eredeti és újonnan szintetizált szálak dehibridizációját és azoknak a szabad láncindító-molekulákhoz történő hibridizációját lehetővé tevő körülmények folyamatos helyreállítása, hogy újrakezdődjön a polimerizáció, és gyorsan előállítsuk a specifikus nukleinsav-szekvencia kívánt mennyiségét. A láncindító molekulák általában jelentősen magasabb

koncentrációban vannak jelen, mint a templát molekulák, így módon fenntartható az amplifikációs folyamat exponenciális kinetikája.

A nukleinsavak egyszálú és kétszálú formája közötti átmenetet rendszerint azon rendszer hőmérsékletének az emelésével és csökkentésével érik el, amelyben az amplifikációs folyamatot végrehajtják. Ebben a vonatkozásban az amplifikációhoz szükséges elemeket (templát, láncindítók, nukleinsav-polimeráz, nukleotidok, sók) egy külső eszközzel létrehozott sorozatos melegítési és hűtési fázisoknak vetik alá.

Ilyen megközelítési módot — amelyet általában termociklizálásnak neveznek — alkalmaznak a jól ismert 'Polimeráz-láncreakció' módszerben [PCR; Taylor, G.R., „Polymerase chain reaction: basic principles and automation”, „PCR: a Practical approach”, szerk.: Mcpherson, M.J. és mtsai., kiad.: Oxford Univ. Press (1991)], amely során az alábbi lépéseket hajtják végre pontos sorrendben és előre meghatározott időszakokban:

a) Denaturálás (90°C – 95°C , 30-60 másodpercen keresztül). A külső eszköz biztosítja a nukleinsav-molekulák megnövekedett mozgásához szükséges energiát (hő formájában), olyan szinten, ami elegendő a kétszálú konformációt stabilizáló nem kovalens kölcsönhatások megszüntetéséhez. Ezt a lépést el is hagyhatjuk az első ciklusban, ha a templát és a láncindítók már eleve egyszálú formában vannak, de abszolút szükséges az összes későbbi ciklusban.

b) Hibridizáció (35°C – 80°C , 30-90 másodpercen keresztül). A láncindítókban és a templátban lévő komplementer szekvenciák hibridizálhatnak, ha a hőmérsékletet lecsökkentjük. Ezt a hőmérsékletet — amelyet gondosan ügyelve szabályozunk, hogy elkerüljük a csak korlátozottan homológ molekulák hibridizációját — eseti alapon számítjuk ki, mivel a láncindító és templát komplementer régiókban található nukleinsav-szekvencia hosszának és G/C-tartalmának a függvénye.

c) Lánchosszabbítás (60°C – 85°C , 60-180 másodpercen keresztül). Ez az egyetlen lépés, amelyben ténylegesen új nukleinsav-molekulák keletkeznek. Az a hőmérséklet, amelyen a lánchosszabbítást végezzük, a kiválasztott polimeráz függvénye, és — néhány kivételtől eltekintve — nem egyezik meg a hibridizációs hőmérséklettel. Általában az újonnan szintetizált szál meghosszabbítását általánosan alkalmazott polimerázokkal végezzük egy vagy néhány perc alatt, az amplifikálandó nukleinsav hosszától függően. Új láncindítási események nem jöhetnek létre mindaddig, amíg az ilyen meghosszabbított láncok nem szabadulnak fel — legalább részlegesen — egyszálú molekulaként a lánchosszabbítás eredményeképpen keletkező kétszálú molekulából.

Rendszerint annak érdekében, hogy további elemzéshez elegendő mennyiségű nukleinsavat állítsunk elő, ezeket a lépéseket 15-40 cikluson keresztül kell ismételni, ami után a PCR-reakció általában telítést ér el a polimeráz kimerülése miatt.

Habár sok más különböző technológiát, stratégiát és reakciókörülményeket kifejlesztettek az alapséma alapján, a PCR-nek komoly korlátai vannak egy sor specifikus előfeltétel megléte miatt:

a) melegítő és hűtő eszköz;

b) polimeráz, amely nagyon gyors és pontos marad még sok ciklus után is a nukleinsav denaturációjához szükséges magas hőmérsékleteken is;

c) az amplifikációs folyamat szétörödelése számos ciklussá, így módon a polimerizáció nem folyamatos, hanem szinkronizált a termociklizálással. A nukleinsav-polimerizációs reakciót nem lehet folyamatos módon végezni, mivel szabályos időközönként meg kell szakítani, hogy újrateremtsük azokat a körülményeket, amelyek szükségesek a szabad láncindító és templát molekulák közötti hibridizációhoz, ami lelassítja az egész folyamatot.

Különböző megoldásokat tártak fel a szakirodalomban a klasszikus PCR ilyen korlátainak a leküzdésére, különösen alternatív megközelítési módok biztosítására, hogy lehetővé tegyék a szálak szétválását és a hibridizációt izotermális körülmények között, termociklizálás nélkül.

A szálleszorítási amplifikáció („Strand Displacement Amplification”, SDA) egy izotermális nukleinsav-amplifikációs és detekciós eljárás, amely polimerázt alkalmaz olyan endonukleázzal együtt, amely csak a polimerizált szálát vágja el, oly módon, hogy a polimeráz leszorítja ezt a szálát, és egy új polimerizált láncot hoz létre [EP 497272. számú európai szabadalmi irat; Walker, G.T., PCR Methods Appl. 3, 1-6. old. (1993)]. Ezt a módszert, amely az egyszálú szál behasításán, meghosszabbításán és leszorításán alapul, különféleképpen adaptálták [WO 96/23904. számú nemzetközi közzétételi irat; Westin, L. és mtsai., Nat. Biotechnol. 18, 199-204. old. (2000)], de ennek a megközelítési módnak korlátozott az alkalmazhatósága. Egy endonukleázt kell alkalmaznunk a polimerázzal együtt, és ezáltal a teljes folyamat végrehajtására megengedett hőmérsékletek tartománya korlátozott azokra, ahol mindkét enzim aktivitása megmarad. Az endonukleázok esetében ez a tartomány (általában 25-50 °C) általában túl alacsony ahhoz, hogy elkerüljük a nem specifikus hibridizációt a templáthoz, ami a reakciók egy jelentős részében nem produktív, vagy nem kívánatos termékeket eredményez. Ezenfelül a láncindítókként és/vagy templátokként működő nukleinsavakat módosítani is kell, mivel feltét-

lenül szükséges, hogy az endonukleáz felismerő helye hiányozzon a templát amplifikálandó régiójából, míg mindig jelen kell lennie a láncindító szekvenciájában.

A 'gördülő kör' amplifikáció („Rolling Circle Amplification”, RCA) olyan módszer, amelyben DNS-polimerázt alkalmaznak, amely cirkularizált oligonukleotid-próbákat hosszabbít meg izotermális körülmények között lineáris vagy geometrikus kinetikával, és a DNS-molekula egymás után kapcsolt másolatait hozza létre leszorítási események bonyolult mintázatának eredményeképpen [Walter, N.G. és Strunk, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7937-7941. old. (1994); WO 94/03624. számú nemzetközi közzétételi irat]. Ebben az esetben is — még ha a technológiát különféle módokon adaptálták is [WO 97/19193. számú nemzetközi közzétételi irat; Isaksson, A. és Landegren, U., Curr. Opin. Biotechnol. 10, 11-15. old. (1999)] —, a módszernek számos korlátja van, mint például a cirkularizált molekulák alkalmazása és az, hogy az amplifikált molekulák nem egyedi entitások, hanem molekulák sorozatai, amelyek az eredeti szekvenciák különböző számú másolatát tartalmazzák, egymás után egymáshoz kapcsolva.

Más módszereket is kifejlesztettek a probléma megoldására, köztes DNS-RNS hibrid alkalmazásával izotermális, többenzimes reakcióban, amely RNS-polimerázt, ribonukleázt és reverz-transzkriptázt tartalmaz [WO 91/04340., WO 92/08800., WO 97/04126. számú nemzetközi közzétételi iratok; Gebinoga, M. és Oehlenschläger, F., Eur. J. Biochem. 235, 256-261. old. (1996)]. Nyilvánvaló, hogy számos problémával találkozhatunk magunkat szemben ezeknek az eljárásoknak az alkalmazásánál, amelyek az RNS gyors lebomlásával és olyan körülmények megtalálásának bonyolultságával kapcsolatosak, amelyek között az összes komponens egyszerre helyesen működik a reakcióban, fenntartva az amplifikációs folyamat specifitását és sebességét.

Még ha az amplifikációs technológiáknak nagy szerepe is van a nagyon kis mennyiségű nukleinsav-szekvenciák elemzésében, a nukleinsav-szekvenálási eljárások teljesítménye nem csak azzal kapcsolatos, hogy az izolált nukleinsavak a feldolgozáshoz elegendő mennyiségben legyenek elérhetők, és megbízható információt kapjunk, hanem annak a lehetőségével is, hogy lehetséges legyen több minta gyors és kis emberi beavatkozást igénylő feldolgozására. A genetikai információ többségét még mindig olyan technológiákkal állítják elő, amelyek fáradtságosak, munkaigényesek, nehezen automatizálhatók, és viszonylag nagy eszközöket igényelnek, mint például az elektroforézis. Ezenfelül az ilyen eljárások általában csak az egyes szekvenálandó nukleinsav-entitások egyedi feldolgozását teszik lehetővé. Tehát sok technológiát fejlesztettek ki specifikus megoldások biztosítására, hogy lehetővé tegyék számos különböző nukleinsav párhuzamos elemzését.

Szokásos módszer a szakirodalomban a teljesítmény növelésére sok minta párhuzamos feldolgozása szilárd hordozó alkalmazásával, amit gyakran „DNS-mikrorácsnak” („microarray”) vagy „DNS-chip”-nek neveznek, amelyre nukleinsavakat immobilizálnak, és azután elemeznek különböző megközelítési módok alkalmazásával, akár jelzett egyedi nukleotidok, akár jelzett nukleinsavak alkalmazásával [Southern, E. és mtsai., Nat. Genet. 21, 5-9. old. (1999); Lockhart, D.J. és Winzeler, E.A., Nature 405, 827-836. old. (2000)]. Nagy molekulák (például 500 nukleotidnál hosszabb molekulák), valamint kisebb molekulák, mint például oligonukleotid-láncindítók hatékonyan kapcsolhatók szilárd hordozóhoz kovalensen fizikai vagy kémiai módszerekkel, akár nem specifikusan, akár specifikus kémiai csoportok alkalmazásával az egyik végükön [Adessi, C. és mtsai., Nucleic Acids Res. 28, E87. old. (2000); Okamoto, T. és mtsai., Nat. Biotechnol. 18, 438-441. old. (2000)]. A megfelelő robotikus és mikromechanikus rendszerek és mikroszkopikus módszerek kombinációja technikailag megvalósíthatóvá teszik cm^2 -enként több millió nukleinsav rendezett elhelyezését és elemzését a hordozón.

Hasonló megközelítési módok alkalmazásával lánchosszabbítási reakciót végezhetünk akár a láncindítók, akár a templát molekulák immobilizálásával (WO 91/13075., WO 00/47767. számú nemzetközi közzétételi iratok). Más megoldásképpen láncindítókat kapcsolhatunk a felszínre, és — együtt az oldatban található szabad láncindítókkal — lehetővé tesszük az amplifikációt és a PCR-termék kötődését a felszínre [Andreadis, J.D. és Chrisey, L.A., Nucleic Acids Res. 28, e5. old. (2000)]. Láncindítókat immobilizálhatunk a mátrixra is, és a templát molekulákat a folyadékfázisban tarthatjuk olyan hőmérsékleti tartományban ($58^\circ\text{C} - 74^\circ\text{C}$), amely lehetővé teszi véletlenszerű és szabályozatlan módon az egyensúly kialakulását az egyszálú és kétszálú formák között, valamint az egybázisos lánchosszabbítást [Dubiley, S. és mtsai., Nucleic Acids Res. 27, e19. old. (1999)].

Ezeknek a technológiáknak a fő hátránya az, hogy minden egyes alkalmazáshoz először egy DNS chipet kell tervezni és gyártani, amely tevékenység még mindig eléggé hosszú, bonyolult és drága, és ezáltal csak akkor engedhető meg anyagilag, amikor nagyon nagy számú chipre van szükség. Ezenfelül a chipeket gyakran csak hibridizációra és/vagy egybázisos lánchosszabbításra lehet alkalmazni, és nem lehet újra felhasználni, és minden egyes chip esetében csak egy nukleinsav mintát lehet egyszerre feldolgozni [Cheung, V.G. és mtsai., Nat. Genet. 21, 15-19. old. (1999); Bowtell, D.D., Nat. Genet. 21, 25-32. old. (1999)].

Újabban más technológiákat fejlesztettek ki az amplifikációs és szekvenálási teljesítménnyel kapcsolatos problémák — legalább részleges — megoldására, a két folyamat hatékonyabb összekapcsolásával.

A WO 96/04404. számú nemzetközi közzétételi iratban (Mosaic Technologies Inc.) eljárásokat tárnak fel mintában potenciálisan megtalálható cél-nukleinsav detektálására. Az eljárás cél-nukleinsav PCR-alapú amplifikációjának indukálását foglalja magában, amennyiben a cél-nukleinsav jelen van a tesztelt mintában. Specifikus láncindítókat kapcsolnak szilárd hordozóhoz, lehetővé téve, hogy az amplifikált cél-nukleinsav szintén kapcsolódjon a szilárd hordozóhoz. A két szál-specifikus láncindítót — akárcsak a hagyományos PCR esetében — specifikusan úgy tervezik, hogy hibridizáljanak az amplifikálandó célszekvenciát szegélyező vagy azon belül található szekvenciákkal, és szokásos termociklizáló folyamatot irányítsanak.

Az első lépés ebben a PCR-alapú amplifikációs folyamatban a cél-nukleinsav hibridizációja az első, hordozóhoz kapcsolt specifikus láncindítóhoz („primer 1”, 1. láncindító). Azután egy első lánchosszabbítási termék keletkezik az 1. láncindító szekvenciájának a meghosszabbításával, amely komplementer a cél-nukleinsavhoz. Amikor a hordozót a szálak dehibridizációjához szükséges magas hőmérsékletnek teszik ki, a cél-nukleinsav felszabadul, és azután részt vehet további hibridizációs reakciókban más 1. láncindító molekulákkal, amelyek a hordozóhoz lehetnek kapcsolva. Az első kötődött lánchosszabbítási termék azután hibridizálhat a második specifikus láncindítóval („primer 2”, 2. láncindító), amely szintén a hordozóhoz van kapcsolva, és egy második lánchosszabbítási termék keletkezhet a 2. láncindító szekvenciájának a meghosszabbításával, amely komplementer az elsővel, és amely szintén kötődik a hordozóhoz. Ily módon a cél-nukleinsav és az első és második lánchosszabbítási termékek olyan templat-molekulák, amelyek képesek részt venni több hibridizációs és lánchosszabbítási folyamatban, amit csak a cél-nukleinsav kezdeti jelenléte és a kezdetben jelen lévő 1. láncindító és 2. láncindító mennyisége korlátoz. A végeredmény a célszekvencia számos másolata, a felszínhez kapcsolva.

Az ebben a dokumentumban feltárt amplifikációs módszert általánosan híd-amplifikációnak („Bridge Amplification”) nevezik, mivel az első ciklus után — amikor a templat az oldatban van — mind a templat, mind a láncindító molekulák immobilizálva vannak a hordozóhoz az 5' végükön keresztül, tehát egy tipikus hídszerű szerkezetet alkotnak ezzel, amikor hibridizálnak.

Mivel ez az amplifikációs folyamat csak a cél-nukleinsav immobilizációját teszi lehetővé, a hordozó monitorozása lehetővé teszi a felhasználó által a láncindítók tervezésekor előre

meghatározott specifikus célszekvencia jelenlétének vagy hiányának az általános kvalitatív értékelését. A híd-amplifikációt tehát nagy teljesítményű szekvencia-elemzési eljárásként alkalmazhatjuk, ha első és második láncindítók különböző készleteit rendezzük el a szilárd hordozó különböző régióiban, és nem kívánjuk a célszekvencia bázisonkénti elemzését. Ezenfelül ez a technológia jelentősen javíthatja különböző szekvenciák és/vagy minták sorozatos elemzését, ha csak az egyes különböző célszekvenciákra specifikus láncindítók ismertek, és hasonló amplifikációs körülmények között amplifikálhatják a célszekvenciát.

Más technológiák megpróbálják hatékonyabban kihasználni a híd-amplifikáció mögött álló mechanizmust. A WO 98/44151. számú nemzetközi közzétételi iratban (Glaxo) feltárják, hogy — az immobilizált láncindítókkal komplementer kapcsolószekvenciáknak mindegyik elemzendő nukleinsav-templát mindkét végéhez történő hozzáadásával — hogyan lehet minden egyes, az oldatban lévő templát molekulát véletlenszerűen elhelyezni és amplifikálni, függetlenül azok aktuális méretétől. Ezen az úton azonos amplifikációs PCR-termékeket immobilizálnak nagy sűrűségben a szilárd hordozó egy meghatározott területére, amit „DNS-kolóniának” neveznek, hasonlóan a bakteriális kolóniákhoz, amelyeket egy csészén figyelnek meg. Minden egyes DNS-kolónia egyedileg láthatóvá tehető és elemezhető, például jelzett referenciaszekvenciával történő hibridizációval vagy láncindító-hosszabbítási megközelítési mód alkalmazásával. A WO 98/18957. számú nemzetközi közzétételi iratban (Appl. Res. Syst.) feltárják, hogy hogyan lehet javítani a híd-amplifikációs technológia hatékonyságát a láncindító és templát molekulák egyidejű immobilizálásával a szilárd hordozóra, mielőtt az amplifikáció a valóságban megkezdődik.

A híd-amplifikáción alapuló technológiák jelentős hátránya az, hogy akármilyen láncindító-szekvencia-specifitást és immobilizációs stratégiát is választunk, nincs kitanítás arra, hogy hogyan hajtsuk végre a folyamatot izotermális körülmények között (azaz a termociklizálás szükségessége nélkül), és ezáltal még mindig ugyanolyan korlátai vannak, mint amelyek a PCR-rel kapcsolatosak. Még ha lehetséges is kevesebb ciklust alkalmazni az elemző és vizualizáló rendszerek érzékenysége miatt, további komplikációt jelent az, hogy a dehibridizációs hőmérséklet befolyásolhatja a szilárd hordozó egyöntetűségét, valamint a felszínre kötődő nukleinsavak stabilitását. Azonban a szakirodalomban feltárt egyik izotermális amplifikációs rendszer sem éri el — egyidejűleg — az amplifikálható és elemezhető különböző templát molekulák sűrűségét és az önállóságot, ami a híd-amplifikációt jellemzi.

Tehát előnyös lenne olyan eljárást tervezni, amelyben a láncindító hibridizációja, a szál meghosszabbítása és a szálak szétválása folyamatosan történik állandó hőmérsékleten, a híd-

amplifikáció elvét alkalmazva. Valójában a kritikusabb tényező a szálak szétválásának az elérése, mivel csak a hőmérsékletet vagy komplex és specifikus módszerek alkalmazását tárták fel a szakirodalomban ennek a problémának a megoldására. A WO 97/47767. számú nemzetközi közzétételi iratban (Sarnoff Corp.) kémiai vagy elektrosztatikus denaturációs eljárásokat javasoltak az amplifikációs folyamatban. Azonban az ilyen eljárásokhoz nagyon speciális eszközökre van szükség, mint például elektromos mező létrehozó eszközre, vagy vegyszerekre, mint például NaOH, amelyek alig kompatibilisek a szokásos amplifikációs eljárásokkal, és további specifikus lépéseket tesznek szükségessé (azaz láncindítók módosítását, a vegyszerek elmosását a lánchosszabbítás újrakezdése előtt).

10 A híd-amplifikációnak további előnyei is lennének, ha lehetséges volna egyszerűen a szálak szétválásának a kiváltása izotermális körülmények között, feltéve, hogy a szálak szétválása csak a lánchosszabbítás befejeződése után lenne lehetséges, vagy — ha az nem fejeződött be — nem zavarná a nukleinsav-polimerázt a lánchosszabbítás befejezésében.

15 Felismertük, hogy a szálainak az 5' végén ugyanahhoz a szilárd hordozóhoz immobilizált kétszálú nukleinsav szálainak a szétválását könnyen elérhetjük izotermális körülmények között, ha a nukleinsav hossza korlátozza a meghajlás lehetőségét. Sikeresen kihasználtuk ezt a biofizikai tulajdonságot izotermális DNS-kolóniák létrehozására a híd-amplifikáció alkalmazásával.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat:

20 Az 1. ábrán a szilárd hordozón történő izotermális amplifikáció mechanizmusának schematikus ábrázolását mutatjuk be. A betűk és számok a találmány leírásában meghatározott működések és komponenseket jelölik.

A 2. ábrán a templát T1 plazmid-inzert szekvenciáját mutatjuk be. A különböző láncindítókhoz hibridizáló és a példákban tesztelt specifikus templátokat amplifikáló szekvenciákat aláhúztuk. A láncindító nevét és a lánchosszabbítás irányát a felső sorban jelöljük.

A 3. ábrán a szilárd hordozón izotermálisan amplifikált, fluoreszcensen festett nukleinsavak digitális invertált képeit mutatjuk be, amelyeket CCD kamerával felszerelt epifluoreszcens mikroszkóppal vettünk fel. A képek méretarányát a kép bal felső sarkában jelezzük.

30 A 4. ábrán *PicoGreen*TM festékkel festett mérőhelyek alján megfigyelt DNS-kolóniák sűrűségének log-log görbét mutatjuk be az izotermális amplifikálás után, amikor különböző koncentrációjú templátot immobilizáltunk. Mindegyik pont 3 megfigyelés átlaga. A vonal meredeksége 1.

Az 5. ábrán az összes fluoreszcencia variációját mutatjuk be, amikor a különböző hosszúságú templatokat amplifikáltunk izotermálisan. Ugyanazt az önkényes egységet alkalmaztuk az összes görbe esetében.

A 6. ábrán az összes fluoreszcencia összehasonlítását mutatjuk be, amikor a T386 templatot a mérőhelyekre immobilizáljuk, vagy oldatban van, vagy a T386 templat hiányzik az amplifikációs folyamatból.

A 7. ábrán PCR-rel vagy folyadékfázisú izotermális amplifikációval előállított amplifikációs termékekkel megfuttatott 2%-os agarózgél digitalizált képét mutatjuk be, amelyet 30 percen keresztül futtattunk 10 V/cm-rel. 1., 5., 9., 13. sáv: 2,5 µl molekulatömeg marker (*Superladder low*, 100 bázispáros létra; Gensura), a megfelelő bázisszámokat a baloldalon tüntetjük fel. 2., 3. és 4. sáv: 6 µl amplifikált és tisztított T90 templat PCR termociklizálás után (2. sáv), vagy izotermális körülmények után 72 °C-on (3. sáv) és 78°C-on (4. sáv). 6., 7. és 8. sáv: 2,5 µl amplifikált és tisztított T386 templat PCR termociklizálás után (6. sáv), vagy izotermális körülmények után 72 °C-on (7. sáv) és 78°C-on (8. sáv). 10., 11. és 12. sáv: 2,5 µl amplifikált és tisztított negatív kontroll (csak láncindítók) PCR termociklizálás után (10. sáv), vagy izotermális körülmények után 72 °C-on (11. sáv) és 78°C-on (12. sáv). A gél *SybrGreen™* festékkel (Molecular Probes, Eugene OR) festettük meg.

A 8. ábrán 2 számlálási kísérlet átlagát mutatjuk be, amely a beépült ³²P-dCTP mennyiségét mutatja különböző enzimek alkalmazásával végzett izotermális amplifikáció alkalmazásával: Dynazyme (Dyn.), Pfu-polimeráz (Pfu), Taq-polimeráz (Taq), VENT™ (Vent).

A 9. ábrán különböző hőmérsékletek (A) vagy DMSO százalékok (B) alkalmazásával végzett izotermális amplifikációval kapott fluoreszcencia mennyiségének a variációját mutatjuk be különböző hosszúságú templatok alkalmazása mellett. Mindegyik görbét normalizáltuk a a legmagasabb értékhez viszonyítva.

A 10. ábrán agarózgél digitalizált képét mutatjuk be, amelyet 30 percen keresztül futtattunk 10V/cm elektromos mezőben, és amelyre különböző kiindulási anyagok alkalmazásával kapott PCR-termékeket vittünk fel. Az 1. és 8. sáv 100 bp DNS-létra (*Superladder low*, Gensura), a megfelelő bázisszámokat a baloldalon tüntetjük fel. A PCR kiindulási anyaga 0,1 ng T386 volt (2. sáv), nem volt kiindulási anyag (3. sáv), olyan mérőhelyek egy alikvotja, ahol T386 immobilizálva volt (4. és 6. sáv), vagy sem (5. és 7. sáv), és az amplifikáció izotermális volt (4. és 5. sáv), vagy sem (6. és 7. sáv). A gél *SybrGreen™* festékkel (Molecular Probes, Eugene OR) festettük meg. A gyengén festődő csíkok a gél alján a PCR amplifikációban alkalmazott láncindítók.

Egy makromolekula flexibilitását hagyományosan az állandó hosszal mérik, azaz azzal a minimális hosszúsággal, amellyel a makromolekulának rendelkeznie kell, hogy meghajlítható legyen anélkül, hogy szignifikánsan módosulna a lokális szerkezete. A nukleinsav-polimerázokkal kompatibilis sókoncentrációk mellett az ilyen hosszúság megközelítőleg 5 nanométer (vagy 15 bázis) egyszálú DNS esetében, és megközelítőleg 50 nanométer (vagy 150 bázispár) kétszálú DNS esetében [Tinland, B. és mtsai., *Macromolecules* 30, 5763-5765. old. (1997); Williams, L.D. és Maher, L.J., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 497-521. old. (2000)]. Más szóval, a kétszálú DNS — a szerkezetét stabilizáló nagy számú nem kovalens kölcsönhatás miatt — sokkal merevebb, mint az egyszálú DNS. Hasonló megfigyeléseket tettek az RNS esetében is, habár az állandó hossz becsült értéke a kétszálú RNS esetében különbözik a szakirodalomban 35 és 72 nanométer között [Zacharias, M., *Biopolymers* 54, 547-560. old. (2000); Kebbekus, P. és mtsai., *Biochemistry* 4, 4354-4357. old. (1995)]. Tehát amikor a külső körülmények görbületet kényszerítenek rá, egy kétszálú molekula sokkal magasabb mechanikai stresszt visel el, mint egy egyszálú molekula.

Sok biofizikai vizsgálat megpróbálta mennyiségileg meghatározni és megjósolni a kétszálú DNS-ben jelen lévő nem kovalens kölcsönhatásokra ható mechanikai stresszből eredő energia destabilizáló hatását, amely az összefüggő 5'/3' végződés transzkripciójának, feltekerczésének vagy mechanikai szétválásának a következménye lehet [összefoglalva: Strick, T.R. és mtsai., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 523-543. old. (2000)]. Az ilyen egyszálú/kétszálú nukleinsav-átmenetekről kimutatták azt is, hogy természetes jelenség és nem szabályozott, amikor a kétszálú molekula a denaturáló hőmérséklethez közeli hőmérsékletre kerül [Dubiley, S. és mtsai., *Nucleic Acids Res.* 27, e19. old. (1999)]. Azonban sohasem mutatták ki, hogy az ilyen jelenség indukálható és kihasználható, amikor kétszálú DNS molekulák mindkét 5' vége (részlegesen vagy teljesen) egyidejűleg immobilizálva van szilárd hordozóra. Ezenfelül egyik sem — és a híd-amplifikációval kapcsolatos technológiákat leíró egyik dokumentum sem — javasolta azt, hogy az ilyen energiát akarattal indukálhatunk, hogy elkerüljük a termociklizálást, amikor híd-amplifikációt végzünk.

Az 1. ábrán összefoglaljuk a találmány alapját képező molekuláris mechanizmusokat.

Amikor a szilárd hordozóhoz (c) immobilizált egyszálú láncindítókhoz (a' és a'') és templátokhoz (b) tartozó komplementer szekvenciák elég közel vannak egymáshoz ahhoz, hogy hibridizáljanak (1), mindegyik láncindító/templát hibridizációs termék többé-kevésbé erősen meggömbült, az immobilizált 5' végek távolságától függően (1A. ábra).

Az amplifikációs oldat (d) jelenlétében egy nukleinsav-polimeráz molekula (e) megkezdheti egy új szál szintetizálását a hibridizált láncindító 3' végétől, amely az immobilizált templát másolata (2). A kétszálú régió következőképpen meghosszabbodik a kezdeti hibridizációs régiótól, és a komplex folyamatosan növekvő mennyiségű meggörbült kétszálú nukleinsavat tartalmaz (1.B ábra).

A lánchosszabbítás során a polimeráztól távol eső kétszálú szegmens spontán denaturálódhat, a kétszálú konformáció merevsége és a két rögzített helyzetű 5' vég által rákényszerített görbület közötti ellentét által indukált mechanikai stressz hatása (3). A kétszálú nukleinsavat stabilizáló nem kovalens kölcsönhatások egyenletes mechanikai stresszt hozhatnak létre, ha a templát nem elég hosszú ahhoz, hogy elviselje ezt a merevebb szerkezetet a görbült konfigurációban. A molekula kétszálú része egyre kevésbé képes elviselni a rákényszerített görbületet a molekulában jelen lévő növekvő számú kölcsönhatással, és a mechanikai stressz csak a templát kétszálú konfigurációban lévő részletének csökkentésével szüntethető meg. Ebben a pillanatban az a részlet, amely gyengébben kapcsolódik össze, és ezáltal könnyebben abszorbeálja az ilyen stresszt, a templát molekula 3' vége, távolabb az előrehaladó nukleinsav-polimeráztól, és egyszálúvá válhat. A görbület által indukált stressz ennek következtében csökken, és a polimeráz továbbhaladhat addig, amíg a stressz ismét túl erős ahhoz, hogy abszorbeálódjon. Míg ez a folyamat folyamatos, a kétszálú nukleinsav-molekulák folyamatosan „kinyílnak”, ezáltal a 3' véget hozzáférhetővé teszi egy másik láncindítóval történő hibridizációra (4) és egy második DNS-polimeráz-molekula megkezdheti a templát második másolatának elkészítését (5). Ez a folyamat bázisonként is végbemehet. Az 1-2 bázisonkénti szálfelnyílás által aktivált mechanikai stressz a templát 3' végénél együtt járhat 1-2 bázis beépítésével a polimeráz útján az újonnan szintetizált szál 3' végén (1C. ábra).

Ha egyszer a templát első másolata elkészült, vagy el fog készülni, a második szálát szintetizáló DNS-polimeráz képes mechanikai stresszt kiváltani a közös szálon, amely folyamatosan elválik és leszorítódik a szintetizált szálról (6; 1D. ábra).

A reakció azután befejezésig folytatódhat, azaz a templát mindkét szála immobilizált és valószínűleg megindítja a korábban leírt amplifikációt. Ha egyszer a templát második szála is elkészül, vagy el fog készülni, a templát egyszálú 5' vége felszabadulhat (7), és hibridizálhat egy másik, közelében lévő immobilizált láncindítóval (8), míg egy másik nukleinsav-polimeráz molekula újratekzdheti a szintézist (9). Ugyanakkor az első egyszálú másolat egy másik láncindítóval hibridizálhat (10) és új másolást indíthat meg (11). Ez a folyamat — amit az 1E. ábrán mutatunk be — lehetővé teszi azt, hogy az újonnan szintetizált másolatok folyamatosan egy-

szálú nukleinsavvá alakuljanak át a mechanikai szétválás és leszorítás révén, ami reprodukálható bármelyik, immobilizált láncindítóhoz hibridizáló immobilizált templát molekula által, bármilyen külsőleg létrehozott ciklizáló aktivitás nélkül.

A találmányban megmutatjuk, hogy a nukleinsav flexibilitása — ami jelenősen eltér az
5 egyszálú és kétszálú forma esetében — lehetővé teszi, hogy a templátok részlegesen felszabaduljanak egyszálú molekulaként, míg a polimerizáció tovább folyik. Meglepő módon azt is megmutatjuk, hogy ez az esemény nem befolyásolja a polimeráz aktivitását, hanem alkalmazható a templát molekula izotermális amplifikálásának irányítására újonnan szintetizált molekulákká, amelyek mindegyike immobilizálva van szilárd hordozó különböző elkülönült területére.

10 A híd-amplifikációs eljárás találmány szerinti javítása lehetővé teszi kevert egyszálú/kétszálú konfigurációkkal rendelkező komplementer szekvenciák exponenciális előállítását szilárd hordozó elkülönült területein, mint ahogyan a WO 98/44151. és WO 00/18957. számú nemzetközi közzétételi iratok feltárják, de izotermálisan és folyamatos módon. Amikor az azonos amplifikált molekulák mennyiségét elegendőnek tekintjük, az azokban a szabadalmi beje-
15 lentésekben leírt szekvenálási és más analitikai eljárásokat azonosan alkalmazhatunk az izotermálisan létrehozott DNS-kolóniákon, vagy magán a szilárd hordozón, vagy a DNS-kolóniákból az oldatba a szakterületen korábban leírt eljárásokkal felszabadított molekulákon.

Az amplifikációs folyamat találmány szerinti folyamatossága — összekapcsolva az izotermális körülményekkel — nyilvánvaló előnyöket biztosít a szakirodalomhoz képest idő- és
20 energiatakarékosság vonatkozásában, annak érdekében, hogy nukleinsav-molekulákat nagyteljesítményű szekvenálási eljárásokat lehetővé tévő alakban és mennyiségben állítsunk elő. Arra is rá kell mutatnunk, hogy a találmány szerint a szilárd hordozó alkalmazása nem csak egy eszköz, amely lehetővé teszi az amplifikált molekulák párhuzamos utólagos elemzést (ami jól ismert a szakterületen), hanem lényeges komponense az izotermális körülmények közötti, folya-
25 matosan nukleinsav-amplifikáció végrehajtásának.

Habár a kétszálú DNS állandó hossza 150 bázispár, a találmány szerinti eljárások működőképesnek bizonyultak DNS- vagy RNS-templátok széles hossztartományában, több száz nukleotid hosszúságig. Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy ez a tartomány tovább szélesíthető akár 1000 nukleotidot tartalmazó templátokra is, a találmányban feltárt példákban 68-605
30 nukleotid hosszúságú DNS-molekulák esetében alkalmazott empirikus eljárások alkalmazásával azonosított körülmények alkalmazásával.

A találmány fő célja eljárás biztosítása legalább egy, akár 1000 nukleotid hosszúságú nukleinsav-szegmens izotermális amplifikálására, amely az alábbi lépéseket tartalmazza:

a) legalább egy nukleinsav-templátot alakítunk ki, amely tartalmazza az amplifikálandó nukleinsav(ak)at, amelyek az 5' végén egy Y jelű oligonukleotid-szekvenciát és a 3' végén egy Z jelű oligonukleotid-szekvenciát tartalmaz(nak), és ezenfelül a nukleinsav(ak) az 5' végén szilárd hordozóra történő immobilizálásra alkalmas eszközt hordoz(nak);

5 b) kialakítunk egy vagy több X jelű láncindító-kolóniát, amelyek képesek hibridizálni a Z jelű oligonukleotid-szekvenciával vagy az Y jelű oligonukleotid-szekvenciával, és az 5' végükön szilárd hordozóra történő immobilizálásra alkalmas eszközt hordoz(nak);

c) a nukleinsav-templát(ka)t és a kolónia-láncindítókat összekeverjük olyan oldattal, amely lehetővé teszi az immobilizálásukat az 5' végükön keresztül szilárd hordozóra szilárd hordozó jelenlétében, oly módon, hogy mind a nukleinsav-templát(ok), mind a kolónia-láncindítók 5' vége kötődjön a szilárd hordozóra;

d) amplifikációs oldatot adunk a szilárd hordozóhoz, amely legalább egy nukleinsav-polimerázt és nukleotid-prekurzorokat tartalmaz, az immobilizált nukleinsav-templát(ok) szekvenciájával azonos vagy komplementer nukleinsavak izotermális létrehozására és immobilizálására.

A találmány szerinti eljárást sikeresen elvégeztük 68-605 bázist tartalmazó egyszálú DNS-molekulák izotermális amplifikálására szilárd hordozón.

A c) lépésben immobilizált nukleinsav mennyisége határozza meg a találmány szerinti módszerrel létrehozható, felületegységre eső DNS-kolóniák átlagos számát. Az immobilizálandó DNS-molekulák koncentrációinak az előnyös tartományát a példákban 1 nM és 0,01 nM közöttinek határoztuk meg a templát molekulák esetében, és 50 és 1000 nM közöttinek határoztuk meg a kolónia-láncindítók esetében. A nukleinsavak ilyen koncentrációja 1000-100000/mm² sűrűségű DNS-kolóniák létrehozását teszi lehetővé.

A találmány szerinti amplifikációs folyamatban alkalmazott állandó hőmérséklet az a hőmérséklet, amelyen a kiválasztott nukleinsav-polimeráz optimális aktivitást mutat. A példákban bemutatjuk, hogy a szakterületen ismert nukleinsav-amplifikációs rendszerekben rendszeresen alkalmazott nukleinsav-polimerázok alkalmazhatók a találmány szerinti eljárásban is, 70°C és 85°C közötti, előnyösebben 77°C és 81 °C közötti hőmérsékleteken. Ez a tartomány használható a hibridizáláshoz is, mivel a nemspecifikus láncindító-templát hibridizációs események általában csökkent mértékűek ezeken a hőmérsékleteken.

Az „izotermális” kifejezés a leírás szerinti értelemben megegyezik a „lényegében azonos hőmérséklet” kifejezéssel, ami azt jelenti, hogy az eljárás végrehajtására egy specifikus nuklein-

sav-polimerázzal eredetileg kiválasztott hőmérséklettől való eltérés egy kereskedelmi forgalomban kapható termosztát deviációs tartományába esik.

A „szilárd hordozó” kifejezés alatt a leírás szerinti értelemben bármilyen olyan szilárd felületet értünk, amelyhez nukleinsavak kapcsolhatók, mint például latex gyöngyök, dextrán
5 gyöngyök, polisztirol felszínek, polipropilén felszínek, poliakrilamid gél, arany felszínek, üveg felszínek és szilikon lemezek. Előnyösen a szilárd hordozó üveg vagy polisztirol felszín.

A „nukleinsav-templát” kifejezés alatt a leírás szerinti értelemben olyan entitást értünk, amely amplifikálható nukleinsavat (DNS-t vagy RNS-t) tartalmaz, és a reakcióban egyszálú, kétszálú vagy kevert egyszálú-kétszálú nukleinsavként van jelen. A nukleinsav-templátokat fel-
10 építő nukleotidok lehetnek természetben előforduló vagy természetben nem előforduló nukleotidok.

A „kolónia-láncindító” kifejezés alatt a leírás szerinti értelemben olyan entitást értünk, amely oligonukleotid-láncindítót tartalmaz, amely immobilizálható szilárd hordozóra az 5' végénél fogva, és képes hibridizálni egy komplementer szekvenciához a 3' végénél, specifikus
15 polimeráz-reakciót indítva be.

A „degenerált láncindító-szekvenciák” kifejezés alatt a leírás szerinti értelemben rövid oligonukleotid-szekvenciát értünk, amely képes hibridizálni bármilyen nukleinsav-fragmenshez, függetlenül a nukleinsav-fragmens szekvenciájától.

A „nukleinsav szilárd hordozóra történő immobilizálására alkalmas eszköz” kifejezés
20 alatt a leírás szerinti értelemben bármilyen kémiai vagy nem-kémiai kapcsolási eljárást értünk, beleértve kémiai úton módosítható funkciós csoportokat is. A „kapcsolás” kifejezés alatt a nukleinsav szilárd hordozóra történő immobilizálását értjük kovalens kapcsolással vagy nem-kovalens kapcsolással. A „kémiai úton módosítható funkciós csoport” kifejezés alatt a leírás szerinti értelemben olyan csoportot értünk, mint például foszfát-csoport, karboxil- vagy alde-
25 hid-csoport, tiol, vagy amino-csoport.

A „nukleinsav-kolónia” kifejezés alatt a leírás szerinti értelemben olyan elkülönült területet értünk, amely két komplementer nukleinsav-szál több másolatát tartalmazza.

A „derivatizált felszín” kifejezés alatt a leírás szerinti értelemben olyan felszínt értünk, amely módosítva lett kémiaiilag reaktív csoportokkal, mint például amino-, tiol- vagy akrilát-
30 csoportokkal.

A „funkcionalizált felszín” kifejezés alatt a leírás szerinti értelemben olyan derivatizált felszínt értünk, amely módosítva lett specifikus funkciós csoportokkal, mint például maleil- vagy szukcinil-csoportokkal.

A találmány szerinti eljárásokkal amplifikálható nukleinsavak közé tartozik DNS, például genomiális DNS, komplementer DNS, rekombináns DNS, vagy DNS bármilyen más szintetikus vagy módosított formája. A hosszuk változhat az egyidejűleg az ugyanazon szilárd hordozóra immobilizált templát molekulák között, és lehetnek ismert vagy ismeretlen szekvenciájú nagyobb nukleinsav-molekulák fragmensei vagy kisebb részletei. Az amplifikálandó nukleinsavak származhatnak bármilyen forrásból (például lehetnek korlátozott restrikciós enzim

5 emésztéssel előállított genomiális DNS-fragmensek). Azonban szokásos gésebészeti módszerek alkalmazásával történő további feldolgozásokra lehet szükség, mielőtt alkalmazzuk azokat a találmány szerinti eljárásokban, amint azt a WO 00/18957. számú nemzetközi közzétételi

10 iratban összefoglalják, különösen az Y és Z jelű szekvenciák hozzáadása vonatkozásában, amelyek szükségesek a kolónia-láncindítókkal való hibridizációhoz. Az mRNS esetében az izolált mRNS-t átalakíthatjuk cDNS-sé reverz-transzkriptáz alkalmazásával, és azt követően kétszálú DNS-sé, mielőtt adaptáljuk a találmány szerinti eljárásokhoz.

Más megoldásképpen amikor a templát természetes, szintetikus vagy módosított RNS-molekula, azt közvetlenül amplifikálhatjuk a találmány szerinti eljárás útján, a szakterületen ismert specifikus enzim alkalmazásával, amely kétszálú RNS-t képes létrehozni egyszálú RNS-ből.

15

A találmány szerinti nukleinsav-templátok nemcsak amplifikálandó nukleinsavat tartalmaznak, hanem az Y és Z jelű oligonukleotid-szekvenciákat is, amelyeknek ismert a szekvenciája, és különböző hosszúságúak lehetnek. A találmány szerinti eljárásokban alkalmazható Y és Z jelű oligonukleotid-szekvenciák előnyösen legalább öt nukleotid hosszúságúak, előnyösen 5 és 100 közötti nukleotid hosszúságúak, és előnyösebben megközelítőleg 20 nukleotid hosszúságúak.

20

A találmány szerinti Y és Z jelű oligonukleotid-szekvenciákat a szakterületen szokásos és hagyományos módszerekkel állíthatjuk elő, vagy kereskedelmi forrásokból szerezhethetjük be azokat. Ha több amplifikálandó nukleinsav-szekvencia van, akkor az Y és Z jelű oligonukleotidok kapcsolását ugyanabban vagy különböző reakcióban hajthatjuk végre.

25

A nukleinsav-templát 5' és 3' végein található Y és Z jelű oligonukleotid-szekvenciáknak nem kell a templát legvégén lenniük. Habár az Y és Z jelű oligonukleotid-szekvenciák előnyösen például a nukleinsav-templátok 5' és 3' végének (terminusok) közelében találhatók (például 0-100 nukleotid távolságon belül az 5' és 3' végtől), azok lehetnek távolabb is (például több mint 100 nukleotid távolságra) a nukleinsav-templát 5' vagy 3' terminusától, feltéve,

30

hogy az Y és Z szekvenciája olyan amplifikálható nukleinsav-szekvenciát szegélyez, amely nem hosszabb, mint 1000 bázis.

Ha egyszer a nukleinsav-templátot előállítottuk, az amplifikálható, mielőtt alkalmazzuk a találmány szerinti eljárásokban. Az ilyen amplifikációt a szakterületen jól ismert és dokumentált eljárásokkal hajthatjuk végre, például a templát nukleinsav expressziós vektorba történő inzertálásával és megfelelő biológiai gazdában történő amplifikációjával, vagy PCR-rel történő amplifikációval. Azonban ez az amplifikációs lépés nem esszenciális, mivel a találmány szerinti eljárás lehetővé teszi nukleinsav-templát több másolatának az előállítását a nukleinsav-templát egy másolatából létrehozott nukleinsav-kolóniában, és azt végrehajthatjuk csak azért, hogy 5' végen kémiaiag módosított immobilizáló csoportot építsünk be, amint azt a példákban bemutatjuk.

Végezetül a nukleinsav-templátot kétszálú molekulaként immobilizálhatunk a szilárd hordozóra, de egyszálúvá alakíthatjuk a szakterületen jól ismert és dokumentált eljárások alkalmazásával, például 94 °C-ra történő melegítéssel és jégen történő gyors lehűtéssel 0 °C-ra, vagy mosással 0,1-0,5 M NaOH-val.

A kolónia-láncindítóban található, a templát(ok)ban található oligonukleotid-szekvenciákkal komplementer szekvenciákat úgy választjuk meg, hogy maximális hibridizációs aktivitásuk legyen a komplementer szekvenciával, és nagyon alacsony nem-specifikus hibridizációs aktivitásuk legyen bármilyen más szekvenciával. A kolónia-láncindító 5-100 bázis hosszúságú lehet, de előnyösen 15-25 bázis hosszúságú. Természetben előforduló és természetben nem előforduló nukleotidok lehetnek jelen a láncindítóban.

Egy vagy két különböző kolónia-láncindítót alkalmazhatunk nukleinsav-kolóniák előállítására a találmány szerinti eljárásokban. Egy alapvető megvalósítási mód szerint két különböző kolónia-láncindítót (X' és X'') keverünk össze a nukleinsav-templátokkal a c) lépésben, és az X' és X'' kolónia-láncindítók szekvenciái olyanok, hogy a Z jelű oligonukleotid-szekvencia képes hibridizálni az X' kolónia-láncindítók egyikével és az Y jelű oligonukleotid-szekvencia ugyanaz, mint az X'' kolónia-láncindítók egyike. Más megoldásképpen az Z jelű oligonukleotid-szekvencia komplementer az Y jelű oligonukleotid-szekvenciával, és az X' kolónia-láncindító ugyanaz, mint az Y jelű oligonukleotid-szekvencia.

Amikor előállítjuk a találmány szerinti nukleinsav-templátokat és láncindítókat, további kívánatos szekvenciákat építhetünk be a szakterületen jól ismert és dokumentált eljárások alkalmazásával. Ilyen további szekvenciák lehetnek például restrikciós enzim helyek, módosított nukleotidok vagy más nukleinsav-címkék, amelyek lehetővé teszik az adott nukleinsav-

templát-szekvenciát tartalmazó amplifikációs termékek azonosítását és/vagy izolálását. Más kívánt szekvenciák közé tartoznak visszahajló („fold-back”) DNS-szekvenciák (amelyek hajtúrhurkokat vagy másmilyen másodlagos szerkezeteket alakítanak ki, amikor egyszálúvá válnak), 'szabályozó' DNS-szekvenciák, amelyek fehérje/DNS kölcsönhatásokat irányítanak, mint például promóter, enhancer, replikációs origó vagy operátor DNS-szekvencia, amelyeket specifi-

A találmány szerinti kolónia-láncindítókat beépíthetjük degenerált láncindító-szekvenciákba is. Az ilyen degenerált láncindítók ily módon nem igénylik az Y és Z jelű oligonukleotid-szekvenciák jelenlétét a nukleinsav-templát(ok)ban ahhoz, hogy bekövetkezzen a templát hibridizációja, habár a degenerált láncindítók alkalmazása az X és Y jelű oligonukleotid-szekvenciákat tartalmazó templáthoz való hibridizációban nincs kizárva. Azonban a találmány szerinti amplifikációs eljárásokban történő alkalmazásra a degenerált láncindítóknak hibridizálniuk kell a templátban található nukleinsav-szekvenciákhoz az amplifikálandó nukleinsav-szekvencia mindkét oldalán, vagy azt szegélyezniük kell.

A fent leírt módon előállított nukleinsav-templát és láncindítók 5' végét módosítjuk, hogy tartalmazza a nukleinsav-templát(ok) és a kolónia-láncindítók 5' végének immobilizálására szolgáló eszközt. A nukleinsavak immobilizálása az 5' vég alkalmazásával szabadon hagyja a 3' véget a hordozótól távol, oly módon, hogy a templátok és a láncindító 3' vége hibridizálhat, és irányíthatja egy új szál szintézisét.

Az immobilizációs protokollnak el kell kerülnie a templátok és a láncindítók elszabadulását a szilárd hordozóról az izotermális amplifikáció folyamán. Tehát az immobilizációs eszközök előnyösen kémiai úton módosítható funkciós csoportok, amelyek lehetővé teszik kovalens kötés kialakulását a molekulák és a derivatizált felszínű szilárd hordozó között, amelyet azt követően módosítunk bifunkciós keresztkötő reagensekkel, funkcionizált felszínt biztosítva. Más megoldásképpen az immobilizációt irreverzibilis passzív adszorpcióval vagy specifikus molekulák közötti affinitás kihasználásával is elérhetjük (például avidinnel bevont felszínre biotinilált molekulák immobilizálásával).

Az immobilizálandó nukleinsavak 5' végéhez hozzáadandó, kémiai úton módosítható funkciós csoportok példái a tiol, hidroxil, dimetoxiltritol (DMT), amino vagy foszfát csoportok, valamint karboxil vagy aldehid csoportok. A szilárd hordozó derivatizálására alkalmas keresztkötő ágensek példái az 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid hidroklorid (EDC), szukcinil-anhidrid, fenildiizotiocianát vagy maleinsav-anhidrid, vagy hetero-bifunkciós keresztkötő ágens, mint például m-maleimidobenzoil-N-hidroxiszukcinimid-észter (MBS), N-szukcinimidil-

[4-jodoacetyl]-aminobenzoát (SIAB), szukcinimidil-4-[N-maleimidometil]-ciklohexán-1-karboxilát (SMCC), N-γ-maleimidobutiriloxi-szukcinimid-észter (GMBS), szukcinimidil-4-[p-maleimidofenil]-butirát (SMPB) és a megfelelő (vízoldható) szulfo-vegyületek. Legelőnyösebben a nukleinsav-templátokat és láncindítókat tiol, foszfát vagy amino csoportokkal módosítjuk az 5' végükön, és keresztkötő ágensként 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid hidrokloridot (EDC) tartalmazó immobilizációs oldattal immobilizáljuk azokat.

Habár a szilárd hordozó lehet bármilyen szilárd felszín, amelyre nukleinsavakat lehet immobilizálni, mint például latex vagy dextrán gyöngyök, polisztirol felszínek, polipropilén felszínek, poliakrilamid gél, arany felszínek, üveg felszínek és szilikon lemezek, előnyösen a szilárd hordozó eléggé merev ahhoz, hogy ne befolyásolja a lánchosszabbítás alatt kifejtett erő, és lehetővé tegye nukleinsav kovalens kapcsolását mono- vagy bifunkciós keresztkötő reagensek alkalmazásával, amint azt korábban leírták a WO 00/18957. számú nemzetközi közzétételi iratban. Ha egyszer mind a találmány szerinti nukleinsav-templátokat, mind a kolónia-láncindítókat megsztetizáltuk, vagy megtisztítottuk egy mintából, és módosítottuk a korábban leírt módon, összekeverhetjük azokat olyan koncentrációban, amelyet úgy számítottunk ki, hogy figyelembe vettük a jelen szabadalmi bejelentésben bemutatott adatokat, valamint a DNS-kolóniák kívánt sűrűségét. Előnyösen a templát koncentrációja szub-nanomoláris, és a kolónia-láncindítók 50-100000-szer koncentráltabbak.

Ha egyszer a kolónia-láncindítókat és nukleinsav-templátokat immobilizáltuk a szilárd hordozóra, a találmány szerinti DNS-kolóniákat létrehozhatjuk az izotermális amplifikációs reakció végrehajtásával, amint az 1. ábrán bemutatjuk, ily módon minden egyes kolónia az eredetileg immobilizált nukleinsav-templát és komplementer szekvenciájának több másolatát tartalmazza. A kialakult nukleinsav-kolónia határát egy lokális terület határozza meg, amelyre a kiindulási templát-nukleinsavat immobilizáltuk. Nyilvánvaló, hogy ha egyszer a templát-molekulának és komplementerének több másolatát szintetizáltuk meg a találmány szerinti amplifikációs eljárás végrehajtásával, akkor a létrehozott nukleinsav-kolónia határa tovább terjedhet, habár a keletkezett kolónia határa továbbra is annak a szilárd hordozónak egy kis részére korlátozódik, amelyre a nukleinsavakat immobilizáltuk.

A DNS-kolóniák méretét és számát szabályozhatjuk annak az időnek a modulálásával, amennyire a szilárd hordozót kitesszük az izotermális amplifikációnak. Ily módon a szilárd hordozó felszínén kialakult nukleinsav-kolóniák száma a hordozóra kezdetben immobilizált nukleinsav-templátok számától függ, feltéve, hogy elegendő számú immobilizált kolónia-láncindító van olyan távolságban, amely lehetővé teszi a templát-molekulákkal való hibridizáci-

ót. A nukleinsav-templátok és láncindítók kiindulási sűrűségének a szabályozásával optimális helyzetet érhetünk el, amelyben nagy sűrűségben lévő egyedi nukleinsav-kolóniákat állíthatunk elő izotermálisan a szilárd hordozón elégséges méretben ahhoz, hogy lehetővé tegyünk az elemzésüket, és elegendő számú amplifikált szekvenciát tartalmazzanak.

5 A találmány szerinti izotermális amplifikációt DNS- vagy RNS-függő DNS-polimerázzal hajthatjuk végre, plusz nukleozid-trifoszfát molekulák vagy bármilyen más nukleotid-prekurzorok, például módosított nukleozid-trifoszfát molekulák készletével.

A találmány szerint alkalmazható nukleinsav-polimerázok példái közé tartozik a DNS-polimeráz (Klenow-fragmens, T4 DNS-polimeráz), termotabil DNS-polimerázok [Perler, F.B. és mtsai., Adv. Protein Chem. 48, 377-435. old. (1996)], amelyeket különféle termotabil baktériumokból azonosítottak és klónoztak (mint például Taq, VENT, Pfu, Tfi DNS-polimerázok), valamint azok genetikailag módosított variánsai (TaqGold, VENTexo, Pfu exo). Előnyösen a kolónia-láncindító meghosszabbítására alkalmazott nukleinsav-polimeráz stabil olyan hőmérsékleten, amelyen a láncindító és templát hibridizációja elegendően specifikus ahhoz, hogy elkerüljük a templát nem teljes vagy hibás amplifikációját.

Az amplifikációs oldat nukleotid-prekurzorként előnyösen dezoxiribonukleotid-trifoszfátokat tartalmaz, például dATP-t, dTTP-t, dCTP-t, dGTP-t, amelyek természetben előfordulnak vagy nem fordulnak elő, mint például fluoreszcens vagy radioaktív csoporttal módosítottak. Nagyszámú szintetikusán módosított nukleinsavat kifejlesztettek kémiai és biológiai eljárások céljaira, annak érdekében, hogy növeljék a nukleinsavak detektálhatóságát és/vagy funkcionális diverzitását. A funkcionizált/módosított molekulák teljesen kompatibilisek lehetnek a természetben található polimerizáló enzimekkel, megtartva a természetes társaik bázispárosodási és replikációs tulajdonságait, amint ezt nemrégiben összefoglalták [Thum, O. és mtsai., Angew. Chem. Int. Ed. 40, 3990-3993. old. (2001)].

25 Amikor a templát RNS- vagy DNS-molekula, és az amplifikációs terméket kétszálú RNS formájában kívánjuk előállítani, a nukleinsav-polimeráz lehet RNS- vagy DNS-függő RNS-polimeráz, például virális RNS-replikáz vagy ribozim [Johnston, W.K. és mtsai., Science 292, 1319-25. old. (2001); Tayon, R., Jr. és mtsai., Nucleic Acids Res 29, 3576-3582. old. (2001)]. Az amplifikációs oldat ennek következtében nukleotid-prekurzorként ribonukleotid-trifoszfátokat tartalmazhat.

30 Az amplifikációs oldat más komponenseit a választott nukleinsav-polimeráztól függően adjuk, és azok lényegében megfelelnek a szakterületen ismert vegyületeknek, amelyekről ismert, hogy támogatják az egyes polimerázok aktivitását. Jól ismert a szakterületen, hogy az

olyan vegyületek koncentrációja, mint például dimetil-szulfoxidé (DMSO), szarvasmarha-szérumalbuminé (BSA), Triton X-100-é vagy $MgCl_2$ -é fontos az optimális amplifikáció szempontjából, és ezért a felhasználó könnyedén beállíthatja ezeket a koncentrációkat a találmány szerinti eljárásokban a leírásban bemutatott példák alapján.

5 A kolóniákat alkotó nukleinsav-szálak több másolatát általában szilárd hordozóra immobilizáljuk, és lehetnek egyszálú, kétszálú vagy kevert egyszálú-kétszálú konfigurációban, amelyek mindegyike egyidejűleg jelen lehet egyetlen DNS-kolóniához tartozó amplifikált molekulák populációjában. Tehát ha az szükséges, hogy egy eljárásban az összes nukleinsav-molekulát egy adott konfigurációban elemezzük és/vagy szekvenáljuk (akár teljesen vagy egy

10 jelentőséggel bíró részletet), további kezeléseket alkalmazhatunk az izotermálisan amplifikált termékeken, hogy az összes (vagy legalább legtöbbjük) ilyen állapotban legyen. Például hőmérséklet, kémiai vagy elektromosan irányított denaturációt alkalmazhatunk az amplifikációs termékek egyszálú DNS-sé történő átalakítására. Az ilyen molekulák azután hatékonyabban képesek hibridizálni egy láncindítóval, amelyet a folyadék fázisba adunk vagy a hordozóra kapcsolunk, és amelynek komplementer a szekvenciája az amplifikált szál egy belső szekvenciájával.

15 A szekvenálási eljárástól függően ez a „segítő” oligonukleotid lehetővé teheti a szekvencia különböző módokon történő detektálását. Megjelölhetjük azt, vagy lánchosszabbítást indíthat jelzett/módosított nukleotid(ok) alkalmazásával. Más megoldásképpen lehetővé teheti a hibridizációs lépés vagy a lánchosszabbítási lépés után kialakult specifikus szekvenciát vagy szerkezetet felismerő endonukleáz enzimek alkalmazását.

20

A találmány szerinti nukleinsav-kolóniákat különböző méretben és sűrűségben állíthatjuk elő, az alkalmazott körülményektől függően. A kolóniák mérete előnyösen 0,2 és 6 mikrométer közötti. A találmány szerinti eljárásban alkalmazható nukleinsav-kolóniák sűrűsége tipikusan $1000/mm^2$ és $100000/mm^2$ közötti. Nagyobb sűrűségek — mint például $100000/mm^2$ és

25 $10000000/mm^2$ közötti — egyformán elérhetők a találmány szerinti eljárásokkal. Csak a képelemzésre napjainkban alkalmazható technológiák (mikroszkópok, CCD-kamerák, szoftver) jelentenek korlátozást az egyedi DNS-kolóniák ilyen sűrűségben történő tiszta felbontása tekintetében, amelyeket valószínűleg áthidalnak a jövőben.

Ha egyszer előállítottuk izotermálisan a nukleinsav-kolóniákat, különféle technológiákat alkalmazhatunk egy vagy több DNS-kolónia egyidejű láthatóvá tételére és/vagy jellemzésére, például hogy igazoljuk, hogy az izotermálisan létrehozott DNS-kolóniák sűrűsége és mérete megegyezik a várttal. A specifikus módszertől függően az analitikai eljárás eredményét vagy a szilárd hordozó monitorozásával állapíthatjuk meg, amelyen az izotermális amplifikációt vég-

30

rehajtottuk, vagy az ilyen hordozóról a folyadékfázisba felszabadított anyag monitorozásával állapíthatjuk meg. Adott esetben az izotermális amplifikációra alkalmazott(ak)tól eltérő nukleinsav-molekulákat alkalmazhatunk specifikus analitikai eljárásokban, és hibridizálhatjuk azokat az amplifikációs termékekhez a folyadékfázisban, optimális hibridizációs körülmények között, amelyeket könnyedén meghatározhatunk kísérletileg az egyes nukleinsav-szekvenciákra a szakterületen jól ismert eljárások alkalmazásával.

A DNS-kolóniákkal alkalmazható kolónia-vizualizáló vagy szekvencia-meghatározó eljárásokat leírtak a WO 00/18957. számú nemzetközi közzétételi iratban. Az ilyen eljárások nem kimerítő példái közé tartozik a hibridizáció jelzett oligonukleotidokkal, jelzett nukleotidok beépítése, újra-amplifikáció specifikus próbák alkalmazásával, DNS-kötő festékek alkalmazása, emésztés szekvencia- vagy szerkezet-specifikus endonukleázokkal, és más DNS-módosító enzimek (mint például ligázok, metilázok, exonukleázok) és más DNS-kötő enzimek alkalmazása.

Az izotermálisan amplifikált nukleinsav-kolóniák sűrűségét és méretét kiszámíthatjuk a szekvencia-elemzést megelőzően, fluoreszcens detekciós eljárások alkalmazásával, amelyek jól ismertek a szakterületen. Például interkalálódó festékeket alkalmazhatunk, mint például etídium-bromidot vagy *PicoGreen*TM-t (Molecular Probes, Eugene, OR), vagy más kémiai DNS-festő eljárást, mint például *Ulisys*TM-t (Molecular Probes) a felszínre immobilizált, izotermálisan amplifikált kétszálú molekulák festésére, és az eredményt epifluoreszcens mikroszkóppal figyelhetjük meg, amint a 3. ábrán bemutatjuk. Bármilyen olyan eszközt alkalmazhatunk a szekvencia meghatározására, amely lehetővé teszi a megfelelő jel detektálását és mennyiségi meghatározását, amelyeket a WO 00/18957. számú nemzetközi közzétételi iratban foglalnak össze. A mikroszkóp alternatívái jól ismertek a szakember számára, mint például letapogató eszköz.

Egy vagy több nukleinsav teljes vagy részleges szekvenciáját meghatározhatjuk egy vagy több DNS-kolóniában jelen lévő amplifikált nukleinsav-templát teljes vagy részleges szekvenciájának a meghatározásával. Az ilyen további lépés(ek)e)t végrehajthatjuk magán a szilárd hordozón lévő amplifikált nukleinsavakon, vagy miután az egy vagy több DNS-kolóniához tartozó egyik vagy mindkét nukleinsav-szálat felszabadítottuk. Előnyösen több szekvenciát határozunk meg egyidejűleg.

Közelebbről, amikor az amplifikációs termék közvetlen jelölése vagy az amplifikációs termék szekvenálása kívánatos, jelzett nukleotidot adunk az amplifikációs oldathoz, ami után a reakciót elég ideig hagyjuk folyni ahhoz, hogy izolált DNS-kolóniákat detektálhassunk. A je-

lölő csoport lehet radioaktív vagy fluoreszcens, mint például *Texas Red*, és hozzáadhatjuk az
amplifikációs oldathoz, végső soron a templát-molekulák amplifikálására alkalmazottaktól eltérő
láncindítókkal együtt, megfelelő koncentrációban (tipikusan a nem jelzett dATP koncentrációjának
egytizede és egyezrede közötti koncentrációban). Azonban a jelzett nukleotidok ma-
5 gas koncentrációja gátolhatja az amplifikációs folyamatot, ami a szakember számára jól ismert
más amplifikációs módszerek, mint például folyadékfázisú PCR kapcsán.

Tehát a találmány szerinti eljárások magukban foglalják szekvencia-meghatározás le-
galább egy lépésének végrehajtását is egy vagy több izotermálisan amplifikált DNS-kolónián. A
szekvencia-meghatározás a beépített jelzett nukleotid(ok) következménye lehet, a szilárd hor-
10 dozóra immobilizált vagy a folyadékfázisban lévő kolónia-láncindítók vagy más láncindítók al-
kalmazásával. Más megoldásképpen a szekvencia-meghatározás jelzett oligonukleotid(ok) hib-
ridizációjának, vagy egy vagy több DNS-kolóniához tartozó egyik vagy mindkét nukleinsav-
szál felszabadításának a következménye lehet.

A találmány egy további megvalósítási módja szerint az eljárás magában foglalja egy
15 vagy több izotermálisan létrehozott DNS-kolóniához tartozó egyik vagy mindkét nukleinsav-
szál felszabadításának a lépését is, oly módon, hogy azok visszanyerhetők az oldatban későbbi
felhasználás végett. Az ilyen nukleinsavak felszabadítását kémiai, optikai, fizikai vagy enzimatikus
módon érhetjük el, amely elhasítja a kötést a láncindítók és a felszín, vagy az amplifikált
nukleinsavakban található egy specifikus szekvencia, szerkezet vagy nukleotid között. Például
20 a WO 00/58329. számú nemzetközi közzétételi iratban (Goldsborough, A.) nukleinsav-
molekulát szilárd hordozóról leválasztó eljárást tárnak fel egy nem hagyományos nukleotid sze-
lektív elhasításával. Más megoldásképpen az immobilizált DNS-kolóniákban található szekven-
ciákat bármilyen ismert amplifikációs módszer, mint például PCR alkalmazásával újra-amplifi-
kálhatjuk abban a folyadékfázisban, amelybe a kolóniák belemerülnek.

25 Bármilyen DNS-kolónia-detektáló rendszert előnyösen kombinálva alkalmazunk egy
elemző rendszerrel, annak érdekében, hogy meghatározzuk az egyes kolóniákba beépített
nukleotidok számát és természetét például közvetlenül minden egyes láncindító-meghosszabí-
tási lépés után, vagy később rögzített adatok alkalmazásával, lehetővé téve egy adott kolóniá-
ban lévő nukleinsav-templát szekvenciájának a meghatározását.

30 A találmány szerinti eljárásokat alkalmazhatjuk nukleinsav-kolóniák izotermális körülmények közötti létrehozására is. Találmány szerinti nukleinsav-kolóniát egyetlen találmány sze-
rinti immobilizált nukleinsav-templátból hozhatunk létre. A találmány szerinti eljárás lehetővé

teszi számos ilyen nukleinsav-kolónia egyidejű előállítását, amelyek mindegyike potenciálisan különböző immobilizált szekvenciát tartalmazhat.

A találmány tárgya egy alternatív megoldás biztosítása a nukleinsav-amplifikáció és szekvenálás problémájára, nukleinsavak szilárd hordozón történő izotermális amplifikálásához
5 szükséges szignifikánsan leegyszerűsített eljárások biztosításával. A találmány — még ha csak korlátozott hosszúságú nukleinsav-szekvenciák esetében alkalmazható is (1000 bázis hosszúságig) — kielégíti a nagyteljesítményű eljárások iránti növekvő igényeket.

A genomikában és rokon területeken (farmakogenomika, drogfelfedezés, élelmiszerek jellemzése, genotipizálás, diagnosztika, génexpresszió monitorozása, genetikai diverzitás jel-
10 lemezése, egész genom szekvenálása és polimorfizmus felfedezése) gyakran a meghatározandó és összehasonlítható nukleinsav-szekvenciák több száz különböző genomiális, rekombináns vagy retro-transzkribált DNS-fragmenssel rokonok, amelyek egyike sem hosszabb 1000 bázisnál. Tehát a találmány szerinti eljárások — nem korlátozó példaként — különösen alkalmasak DNS-szekvenciák azonosítására olyan helyzetekben, ahol sok személy (például 500) sok génjét
15 vagy mRNS-ét (például 500-at) kell egyidejűleg megszekvenálni, vagy nagyszámú (például milliós) polimorfizmust kell egyidejűleg értékelni, vagy nagyszámú gén (például 100000) expresszióját kell egyidejűleg monitorozni.

Például az átfogó génexpressziós elemzés különféle eljárásai lehetővé teszik a sejtek szubpopulációinak vagy mikroanatómiai szerkezetek tipikus génexpressziójának a jellemzését.
20 Ezek a nagyon érzékeny módszerek gyakran alkalmaznak komplementer DNS-t, amely rövid, 10-20 bázispárnyi fragmensekre („címkék”) van szegmentálva, amely bázisszám elegendő egyedi mRNS-ek azonosítására, ily módon egy adott fehérjét kódoló mRNS mennyisége durván kiszámítható, vagy összehasonlítható különböző minták között, az ilyen mRNS-sel összefüggő, a mintában jelen lévő „címkék” számának megszámlálásával. Ezek a szegmensek általá-
25 ban tandem vannak ligálva a szekvenálás érdekében, mint a SAGE [„Serial Analysis of Gene Expression”; Velculescu, V.E. és mtsai., Trends Genet. 16, 423-425. old. (2000)] vagy más rendszerek esetében, amelyek mindig címkék létrehozásán alapulnak II. típusú restrikciós endonukleázok alkalmazásával (WO 98/53806. számú nemzetközi közzétételi irat). A találmány szerinti eljárások elősegíthetik a címkék azonosítását és megszámlálását. A megfelelő
30 kapcsolószekvenciáknak az immobilizáció és szilárd hordozón történő izotermális amplifikáció lehetővé tétele végett az egyes címkékhez történő ligálása után az adott címkének megfelelő egyedi kolóniákat láthatóvá tehetjük, és értékelhetjük képelemző szoftver alkalmazásával. Ezen

az úton az egyes címkék gyakoriságát a cDNS-populációban kiszámíthatjuk anélkül, hogy az összes címkét plazmidokba klónozandó konkatemerekkel ligálnánk.

Hasonló megközelítési módot alkalmazhatunk EST-kel vagy genomiális DNS-sel annak érdekében, hogy haplotípusokat vagy specifikus SNP-ket azonosítsunk, amelyek betegséggel
5 vagy más fenotípusokkal kapcsolatosak, mivel — ebben az esetben — alapvető fontosságú ezernyi apró egyedi nukleinsav-szegmens szekvenciájának az azonosítása.

Ily módon a találmány egy további megvalósítási módja szilárd hordozón történő izotermális nukleinsav amplifikációs eljárás alkalmazása a genomika, farmakogenomika, drog-
felfedezés, élelmiszerek jellemzése, genotipizálás, diagnosztika, génexpresszió monitorozása,
10 genetikai diverzitás jellemzése, egész genom szekvenálása és polimorfizmus felfedezése területén, vagy nukleinsavak amplifikálását magában foglaló bármilyen más alkalmazásban alkalmazható nukleinsav-molekulák biztosítására nukleinsav-szekvenálásban és újra-szekvenálásban.

A találmány egy még további megvalósítási módja szerint a találmány tárgya reagens-
15 készlet szilárd hordozón történő izotermális nukleinsav amplifikációra, a genomika, farmakogenomika, drogfelfedezés, élelmiszerek jellemzése, genotipizálás, diagnosztika, génexpresszió monitorozása, genetikai diverzitás jellemzése, egész genom szekvenálása és polimorfizmus felfedezése területén, vagy nukleinsavak amplifikálását magában foglaló bármilyen más alkalmazásban alkalmazható nukleinsav-molekulák biztosítására nukleinsav-szekvenálásban és újra-
20 szekvenálásban.

A találmány szerinti eljárással előállított amplifikációs termékek azonosítására és jellemzésére szolgáló, jelzett nukleotidok alkalmazó eljárás példája lehet az alábbi:

1a) amplifikált nukleinsavakat állítunk elő és teszünk láthatóvá a szilárd felszínen a jelen szabadalmi bejelentésben korábban leírt eljárások alkalmazásával, és rögzítjük az eredményt;

25 1b) az amplifikált nukleinsavakat kezeljük oly módon, hogy eltávolítjuk a láthatóvá tételhez alkalmazott interkalálódó festéket;

1c) az amplifikált nukleinsavakat — legalább részben — egyszálú molekulákká alakítjuk át;

1d) oligonukleotido(ka)t adunk a folyadék vagy szilárd fázishoz, ahol a fázis és/vagy az
30 oligonukleotid(ok) lehetnek az izotermális amplifikációban alkalmazott(ak) vagy különbözők, és ahol az oligonukleotid(ok) legalább egy, amplifikált termékben jelenlévő szekvenciával hibridizálni képes 3' végen található szekvenciát kell, hogy tartalmazzanak;

1e) az oligonukleotid(ok) és az amplifikált molekula közötti hibridizációra megfelelő körülményeket biztosítunk;

1f) nukleinsav-polimerázt és legalább egy típusú jelzett nukleotidot biztosítunk a folyadékfázisban, együtt alkalmas pufferrel, olyan körülmények között, amely lehetővé teszi a lán-
5 indítók meghosszabbítását;

1g) detektáljuk a jelzett nukleotido(ka)t tartalmazó amplifikált nukleinsavakat ezen jelek útján vagy ezen jel és az amplifikált termék kölcsönhatása útján, és rögzítjük az eredményt;

1h) adott esetben eltávolítjuk a folyadékfázist és megismételjük az 1f) és 1g) lépést az előző lánchosszabbításban alkalmazottól eltérő jelet tartalmazó nukleotid(ok) alkalmazásával,
10 és rögzítjük az eredményt;

1i) adott esetben megismételjük az 1c-1f) lépéseket az előző lánchosszabbításban alkalmazottól eltérő oligonukleotidok és/vagy jelzett nukleotid(ok) alkalmazásával, és rögzítjük az eredményt.

A fenti eljárás különösen alkalmas a találmány szerinti amplifikált termékek bázison-
15 kénti szekvenálásának lehetővé tételére, ahol az eredmények relatív variációit jellé alakítjuk át, és összehasonlítjuk, hogy bizonyítsuk jelzett nukleotid beépülését, amint a WO 00/18957. számú nemzetközi közzétételi irat leírja.

A találmány szerinti eljárással előállított amplifikációs termékek azonosítására és jellemzésére szolgáló, jelzett oligonukleotidok alkalmazó eljárás példája lehet az alábbi:

20 2a) amplifikált nukleinsavakat állítunk elő és teszünk láthatóvá a szilárd felszínen a jelen szabadalmi bejelentésben korábban leírt eljárások alkalmazásával, és rögzítjük az eredményt;

2b) az amplifikált nukleinsavakat kezeljük oly módon, hogy eltávolítjuk a láthatóvá tételhez alkalmazott interkalálódó festéket;

25 2c) az amplifikált nukleinsavakat — legalább részben — egyszálú molekulákká alakítjuk át;

2d) oligonukleotido(ka)t adunk a folyadék vagy szilárd fázishoz, ahol a fázis és/vagy az oligonukleotid(ok) lehetnek az izotermális amplifikációban alkalmazott(ak) vagy különbözők, és ahol az oligonukleotid(ok) legalább egy, amplifikált termékben jelenlévő szekvenciával hibridizálni képes 3' végen található szekvenciát kell, hogy tartalmazzanak;

30 2e) az oligonukleotid(ok) és az amplifikált molekula közötti hibridizációra megfelelő körülményeket biztosítunk;

2f) detektáljuk a jelzett nukleotido(ka)t tartalmazó amplifikált nukleinsavakat ezen jelek útján vagy ezen jel és az amplifikált termék kölcsönhatása útján, és rögzítjük az eredményt;

2g) adott esetben megismételjük a 2c-2f) vagy 2e-2f) lépéseket eltérő szekvenciát és/vagy jelet tartalmazó oligonukleotidok alkalmazásával, és rögzítjük az eredményt.

A találmány szerinti eljárással előállított amplifikációs termékek azonosítására és jellemzésére szolgáló, restrikciós enzimek alkalmazó eljárás példája lehet az alábbi:

5 3a) amplifikált nukleinsavakat állítunk elő és teszünk láthatóvá a szilárd felszínen a jelen szabadalmi bejelentésben korábban leírt eljárások alkalmazásával, és rögzítjük az eredményt;

3b) az amplifikált nukleinsavakat kezeljük oly módon, hogy eltávolítjuk a láthatóvá tételhez alkalmazott interkalálódó festéket;

10 3c) az amplifikált nukleinsavakat legalább egy restrikciós endonukleázt tartalmazó oldattal kezeljük, amely legalább egy találmány szerinti amplifikációs termékben jelen lévő és/vagy a b) lépés után kapott kétszálú nukleinsav-molekulát potenciálisan hasít, együtt alkalmas pufferrel és olyan körülmények között, amely lehetővé teszi az ilyen enzimatisz aktivitást;

3d) visszanyerjük a felszabadított nukleinsavakat;

15 3e) megismételjük a 3a) lépést és rögzítjük az eredményt; összehasonlítjuk a láthatóvá tétel eredményét az emésztés előtt és után;

3f) adott esetben megismételjük a 3b-3e) lépéseket egy másik restrikciós endonukleázzal, és rögzítjük az eredményt.

20 Ha egyszer a találmány szerinti amplifikációs eljárások és termékek tulajdonságai világosak, az ilyen elemzésre specifikus további lépések szükségessége és típusai könnyen kikövetkeztethetők a technika állása, valamint az alábbi nem korlátozó ábrák és példák ismeretében, amelyek bemutatják a találmány alapvető részleteit és bizonyos alkalmazásait.

1. példa: szilárd hordozóra immobilizált templát DNS izotermális amplifikálása

Eljárások

DNS szekvenciák

25 A P1 (24-tagú; 1. azonosítószámú szekvencia), P2 (24-tagú; 2. azonosítószámú szekvencia) és P3 (40-tagú; 3. azonosítószámú szekvencia) jelű láncindítók szintetikus oligonukleotidok, amelyek C6-amino kapcsolócsoporthoz hordoznak az 5' végükön. Ezt a kémiai csoportot
30 alkalmaztuk láncindítók és templátok szilárd hordozóra történő immobilizálására a találmány szerinti eljárásokban.

A T3 (9. azonosítószámú szekvencia) és T4 (10. azonosítószámú szekvencia) jelű templátok, amelyek 68-tagúak, és az 5' végükön a P1-nek megfelelő szekvenciát és a 3' végü-

kön a P2-vel komplementer szekvenciát tartalmaznak, és a T90 (90-tagú, és az 5' végén a P1-nek megfelelő szekvenciát és a 3' végén a P2-vel komplementer szekvenciát tartalmaz; 11. azonosítószámú szekvencia) jelű templátok szintetikus oligonukleotidok, amelyek C6-amino kapcsolócsoporthoz hordoznak az 5' végükön (T90), vagy 5' foszfát-csoportot (T3 és T4).

5 A T155 (155-tagú; 12. azonosítószámú szekvencia), T203 (203-tagú; 13. azonosítószámú szekvencia), T386 (386-tagú; 14. azonosítószámú szekvencia) és T605 (605-tagú; 15. azonosítószámú szekvencia) jelű templátok az 5' végükön a P3-nak megfelelő szekvenciát és a 3' végükön a P2-vel komplementer szekvenciát tartalmaznak. Ezeket a T1 (8. azonosítószámú szekvencia) egymásba ágyazott fragmenseinek az amplifikálásával állítottuk elő, amely egy
10 823 bázispár hosszúságú szekvencia pBSk⁻ plazmidban (Stratagene), amint a 2. ábrán bemutatjuk. A direkt P3 láncindító (40-tagú, és az 5' végén a P1-nek megfelelő szekvenciát és a 3' végén a T1 szekvenciával komplementer 16 nukleotidot tartalmaz; 3. azonosítószámú szekvencia) 5' amino kapcsolócsoporthoz tartalmaz. A P155r (4. azonosítószámú szekvencia), a P203r (5. azonosítószámú szekvencia), P386r (6. azonosítószámú szekvencia) és P605r (7. azonosítószámú szekvencia) reverz láncindítók 44-tagú szintetikus oligonukleotidok, amelyek az 5'
15 végükön a P2-nek megfelelő szekvenciát és a 3' végükön a T1 szekvencia másik 16 nukleotidjával komplementer szakaszt tartalmaznak. Ezeket a templátokat 100 µl, alábbi összetételű oldattal amplifikáltuk: 5 egység Taq-polimeráz (Perkin-Elmer), 1x Taq-puffer (Perkin-Elmer), 200 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Pharmacia), 5 ng/µl pBSk plazmid, 1 µM P3
20 láncindító és 1 µM megfelelő reverz láncindító. Húsz PCR-ciklust (94 °C 30 másodpercen keresztül, 62 °C 30 másodpercen keresztül, 72 °C 60 másodpercen keresztül) hajtottunk végre, és a kapott terméket megtisztítottuk *QiaQuick* reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával a gyártó utasításait követve. A tisztított nukleinsavak visszanyerésére alkalmazott oldat 10 mM (pH 7,5) puffert tartalmazott.

25 Az összes szintetikus oligonukleotidot a Microsynth cégtől (Switzerland) szereztük be.

A láncindító és templát nukleinsav szilárd hordozóra történő immobilizálására szolgáló protokoll

A találmány szerinti eljárások megvalósíthatóságának demonstrálásához alkalmazott szilárd hordozót a *Nucleolink*TM (Nunc, Denmark) nevezetű funkcionális szintetikus anyagból készített lapos fenekű mérőhelyek belseje alkotta, amelyek olyan mikrotiterlemez alakban
30 voltak elrendezve, amely beleillett egy 96-mérőhelyes PCR-készülékbe. Amikor megtöltöttük a példákban alkalmazott immobilizációs és amplifikációs oldat térfogatával (15-20 µl), az egyes mérőhelyek oldatoknak valójában kitett felszíne megközelítőleg 30 mm²-nek felelt meg.

A láncindítókat és templátokat *Nucleolink*TM lemezekhez kapcsoltuk, amelyeket jégen tartottunk amíg a nukleinsavakat meghígítottuk immobilizációs oldatban — amely 10 nM imidazolt és 10 mM 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid hidrokloridot (EDC) tartalmazott — és a mérőhelyekhez adtuk. Ha egyszer a mérőhelyeket megtöltöttük, a lemezeket 10 percen keresztül inkubáltuk 50 °C-on. A mérőhelyeket azután szobahőmérsékleten kétszer megmostuk 0,4 M NaOH-t és 0,1% Tween-20-at tartalmazó oldattal, és végezetül háromszor TNT-vel, ami egy 100 mM Tris-HCl-t (pH 7,5), 150 mM NaCl-t és 0,1% Tween-20-at tartalmazó oldat, mielőtt alávetettük az izotermális amplifikációnak.

Az amplifikált nukleinsavak láthatóvá tételére szolgáló protokoll

Az izotermális amplifikáció után a mérőhelyeket háromszor kiöblítettük 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) pufferrel, és azután a DNS-kolóniákat láthatóvá tettük a mérőhelyeknek *PicoGreen*TM-nel (Molecular Probes) — amely egy olyan molekula, amely fluoreszcál, amikor kétszálú DNS-hez kötődik, és amelyet rutinszerűen 2000-szeresre hígítunk 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) pufferben — az alkalmazásával. Mindegyik mérőhelyet 50 µl *PicoGreen*TM oldattal inkubáltuk 10 percen keresztül szobahőmérsékleten.

A mérőhely fenekén immobilizált DNS-kolóniákat epifluoreszcens mikroszkóppal (Axiovert 100TV, Zeiss, Germany) figyeltük meg, amely hűtött CCD-kamerával (Micomax 512x768, Princeton instruments, Trenton, NJ) volt felszerelve, amit a *Winview* szoftver (Princeton instruments, Trenton, NJ) kontrollált. A 2 másodperces expozícióval kapott képeket az analízáló szoftver (Soft Imaging System GmbH, Germany) vagy más ekvivalens szoftver alkalmazásával elemeztük.

Eredmények

A P1 és P2 láncindítókat és a T90 és T386 templátokat a korábban leírt módon kapcsoltuk *Nucleolink*TM mérőhelyekre. A templátok az állandó hossz megközelítőleg 0,6-szeresének és 2,5-szeresének megfelelő számú nukleotidot tartalmaznak, hogy azonosítsuk azon templát-hossz első tartományát, amelynél a találmány szerinti eljárások alkalmazhatók.

A mérőhelyeket 20 µl immobilizációs oldattal töltöttük meg, amely tartalmazta a P1 és P2 láncindítókat (mindegyik 250 nM), és az egyes mérőhelyekben különböző típusú templátot és koncentrációt alkalmaztunk, amint az I. táblázatban bemutatjuk:

I. Táblázat

Mérőhely száma	Templát neve	Templát koncentrációja (nM)
A1	T90	3,1
B1	T90	1
C1	T90	0,3
D1	T90	0,1
E1	T90	0,03
F1	T90	0,01
G1	T90	0,003
H1	-	0
A2	T386	3,1
B2	T386	1
C2	T386	0,3
D2	T386	0,1
E2	T386	0,03
F2	T386	0.01
G2	T386	0,003
H2	-	0

Az izotermális amplifikációt a mérőhelyeknek 1 órán keresztül 78 °C-on történő inkubálásával hajtottuk végre 15 µl amplifikációs oldatban, amely az alábbiakat tartalmazta: 1 egység Pfu-polimeráz (Stratagene), 10% dimetil-szulfoxid (DMSO), 80 µM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Pharmacia), 200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100 és 0,1 mg/ml BSA. Az izotermális amplifikációt szokásos 96-mérőhelyes PCR-készülékben (MJ-Research PTC-200) hajtottuk végre, amelyet állandó 78 °C-ra állítottunk be a fűtött tető alkalmazásával.

A kapott képeket a 3. ábrán mutatjuk be. Az alkalmazott DNS-festési eljárás miatt a jel a (legalább részben) kétszálú, a *Nucleolink*TM mérőhelyek fenekére immobilizált és amplifikált DNS jelenléte miatt van. A képeket invertáltuk a jobb nyomtathatóság érdekében. A 130 AU-nál (a CCD-kamerát kontrolláló szoftver által számított önkényes egység, „Arbitrary Units”) kisebb vagy azzal egyenlő jelek fehérek, és a 350 AU-nál nagyobb vagy azzal egyenlő jelek feketék.

A 3. ábrán azt mutatjuk be, hogy amikor csak láncindítók voltak kapcsolva (H1 és H2), a kép teljesen fehér, demonstrálva, hogy nincs detektálható spontán amplifikáció. Míg a templát legmagasabb koncentrációjánál (A1/2, B1/2) az amplifikációs termékek befedik a teljes felszínt, telítve a képet, különálló DNS-kolóniákat nyertünk a C1/2, D1/2 és E1/2 mérőhelyeken, a két templát szubnanomoláris koncentrációjánál. Az ilyen „foltok” száma (amelyek mindegyike 1-5 μm^2 -t foglal el) megközelítőleg lineárisan növekszik a kapcsolási lépés folyamán alkalmazott templát koncentrációjának a függvényében. Az amplifikációt két különböző hosszúságú templáttal hajtottuk végre, és különböző templát/láncindító arány alkalmazásával az immobilizációs eljárás folyamán.

Az izotermális amplifikáció hatékonyságának kvantitatívabb elemzését mutatjuk be a 4. ábrán a DNS-kolóniák számának tekintetében. A tesztelt kísérleti körülmények között (imidazol/EDC nukleinsav-immobilizációs oldat, *Nucleolink*TM mérőhelyek, 10 perc inkubáció 50°C-on, és két láncindító egyenként 250 mM koncentrációban) az immobilizációs oldatban szubnanomoláris koncentrációban adott, 90-386 nukleotid hosszúságtartományba eső templátok izotermálisan amplifikálhatók DNS-kolóniákként a szilárd hordozón, több tízezer DNS-kolóniát eredményezve mm^2 -enként.

Az izotermális amplifikációs eljárást alkalmaztuk más templát-hosszúságok és láncindítók különböző koncentrációinak az alkalmazásával is. Nyolc *Nucleolink*TM mérőhely sorozatát töltöttük meg 20 μl immobilizációs oldattal, amely állandó szubnanomoláris koncentrációjú templátot tartalmazott az A sorozatból (0,14 nM T155), a B sorozatból (0,2 nM T203), a C sorozatból (0,08 nM T386) és a D sorozatból (0,04 nM T606). A koncentrációkat az egyes templátokra kapott görbék alapján állapítottuk meg, amint kettőt bemutatunk a 4. ábrán.

A nyolc mérőhely P1 és P2 láncindítót tartalmazott a II. táblázatban bemutatott koncentrációkban.

II. Táblázat

Mérőhely száma	P1 (nM)	P2 (nM)
1	250,0	250,0
2	75,0	75,0
3	55,0	55,0
4	37,5	37,5
5	22,5	22,5
6	6,8	6,8
7	2,0	2,0
8	0,6	0,6

Az izotermális amplifikáció fent leírt módon történő végrehajtása után mértük a találmány szerinti eljárás hatékonyságát a fluoreszcens jel alapján, amelyet normalizáltunk a templát hosszúságára, különböző láncindító-koncentrációknál (5. ábra). A normalizálás szükséges volt, mivel a hosszabb templátok több DNS-festő vegyületet építenek be, így módon a nyers fluoreszcencia jelet a háttér levonása után elosztottuk a templát hosszával (kilobázisokban kifejezve).

Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a P1 és P2 láncindítóknak találmány szerinti eljárást követő detektálható amplifikáció eléréséhez szükséges mennyisége az immobilizációs oldatban és a korábban megállapított amplifikációs körülmények között részben a templát hosszúságától függ. Míg a jel elég erős, amikor az teljes láncindító-koncentráció kisebb, mint 100 nM a kisebb templátok esetében, amelyek hossza megközelíti az állandó hosszat (T90 és T155, sorrendben az állandó hossz 0,6 és 1-szerese), a hosszabb templátok (T386 és T605, sorrendben az állandó hossz 2,5 és 4-szerese) még mindig amplifikálódnak, de a teljes láncindító-koncentrációnak felette kell lennie 100 nM-nak. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy kisebb mechanikai stressz indukálható hosszabb immobilizált nukleinsavakon, ami valószínűleg egy alternatív háromdimenziós konfigurációt tételez fel, amely abszorbeálja az izotermális szál-szétválás és leszorítás irányításához szükséges mechanikai stressz egy részét.

Annak érdekében, hogy igazoljuk azt, hogy az amplifikált termékek valóban a láncindítók és templátok szilárd hordozón történő megfelelő immobilizálásával jönnek létre, az alábbi kontroll kísérleteket hajtottuk végre.

Egy első kísérletben a korábban leírt izotermális amplifikációs és láthatóvá tévő protokollt immobilizált láncindítókkal és azok nélkül hajtottuk végre (P1 és P2, 250 mM mindegyikből), és templáttal (0,08 nM T386), akár immobilizálva, akár oldatban. Amint a 6. ábrán bemutatjuk, az összes fluoreszcencia nagyon gyenge akkor, amikor a templát oldatban van, vagy hiányzik, még akkor is, ha nagy mennyiségű láncindító van immobilizálva. Az ilyen jel feltehetőleg a kismértékű ön-amplifikáció miatt van. Ily módon bizonyított, hogy csak mindkét láncindító és a templát immobilizációja teszi lehetővé kétszálú DNS izotermális amplifikációját DNS-kolóniák formájában.

Egy második kontroll kísérletben az előző kísérletekben alkalmazott nukleinsavakat alkalmaztuk folyadékfázisú PCR körülményeinek alkalmazásával, vagy a szilárd felszínen alkalmazott izotermális körülmények között.

Az amplifikációs kísérletekben alkalmazott amplifikációs oldat az alábbiakat tartalmazta: 0,05 egység/μl Pfu-polimeráz (Stratagene), 80 μM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Pharmacia), 200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100 és 0,1 mg/ml BSA, 1 μM P1 láncindító, 1 μM P2 láncindító, templáttal vagy anélkül (0,13 nM T386 vagy 0,33 nM T90). Az amplifikációs oldatot három részre osztottuk szét, és mindegyiket különböző amplifikációs körülményeknek tettük ki: 20 ciklus termociklizáló PCR (94 °C 30 másodpercen keresztül, 60°C 30 másodpercen keresztül, 72 °C 1 percen keresztül), 1 óra 72 °C-on vagy 1 óra 78 °C-on. Az amplifikációs termékeket megtisztítottuk *Qiaquick* oszlopokon (Qiagen), és 2% agarózgélre vittük fel.

Amint a 7. ábrán bemutatjuk, nem kaptunk amplifikációs terméket izotermális körülmények között, még akkor sem, ha a láncindítók képesek amplifikálni ugyanazt a templátot folyadékban, amikor termociklizáló körülményeket alkalmaztunk.

Teszteltük a különböző kereskedelmi forgalomban kapható DNS-polimerázok hatékonyságát a találmány szerinti eljárásokban történő alkalmazásra radioaktív nukleotid beépülésének a mérésével. Az izotermális amplifikációt P1 és P2 láncindítók alkalmazásával hajtottuk végre (mindegyik 250 nM), T3 és T4 alkalmazásával vagy anélkül, nagyon rövid templátokat (68-tagút) adva nagy feleslegben (mindegyik 5 nM). Az izotermális amplifikációt 80 °C-on hajtottuk végre 90 percen keresztül, az alábbi amplifikációs oldat 20 μl-ének alkalmazásával: 0,5 egység DNS-polimeráz, 5% DMSO, 80 μM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Pharmacia), 200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100 és 0,1 mg/ml BSA, és 128 μM α³²P-dCTP. Az alkalmazott DNS-

polimerázok az alábbiak voltak: Dynazyme™ (Finzyme, Finland), Pfu-polimeráz (Promega), Taq-polimeráz (Perkin Elmer) és Vent™ polimeráz (New England Biolabs).

Az izotermális amplifikáció után a *Nucleolink*™ mérőhelyeket ötször kiöblítettük 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) pufferrel, szcintillációs folyadékba (Ultima gold; Packard) helyeztük, és számláltuk Beckmann szcintillációs számlálóban, hogy kiszámítsuk a beépült jelzett nukleotid mennyiségét.

Amint a 8. ábrán bemutatjuk, az összes tesztelt polimeráz lehetővé teszi a találmány szerinti izotermális amplifikációs eljárást, de különböző hatásfokkal és különböző háttér amplifikációs szintekkel. A Pfu és a Vent™ polimeráz mutatta a legjobb specifikus / nem specifikus arányt.

A találmány szerinti izotermális amplifikáció alkalmazásának más alternatív körülményeit teszteltük a hőmérséklet és DMSO-koncentráció vonatkozásában, összehasonlítva a különböző hosszúságú templatok alkalmazásával kapott eredményeket.

Az egyes templatokat (0,14 nM T155, 0,2 nM T203, 0,08 nM T386 és 0,04 nM T606) *Nucleolink*™ mérőhelyek különböző sorozataira immobilizáltuk egyenként 250 nM P1 és P2 láncindítókkal. Az izotermális amplifikációt vagy 10% DMSO-val hajtottuk végre, de PCR-készülékben hőmérséklet-gradienst létrehozva a mérőhelyek sorozatában, vagy 78 °C-on, de különböző mennyiségű DMSO jelenlétében. Az izotermális amplifikáció, öblítés és láthatóvá tétel után mértük a DNS-kolóniák teljes fluoreszcenciáját képelemző szoftver alkalmazásával, amely meghatározza a képen lévő összes folt intenzitását. Amint a 9A. és 9B. ábrákon bemutatjuk, az amplifikált termék mennyisége nagymértékben függ az alkalmazott amplifikációs körülményektől. Az izotermális amplifikáció különösen hatékony az összes templat esetében, 77 és 81 °C között, és 8% és 14% DMSO-koncentráció között.

2. példa: az amplifikált nukleinsav elemzése

Ha egyszer a DNS-kolóniákat izotermálisan előállítottuk, kísérleteket hajtottunk végre az amplifikált nukleinsavak bizonyos tulajdonságainak értékelésére.

Az egyes foltokban jelen lévő nukleinsav átlagos mennyiségét DNS-festéssel és radioaktívan jelzett nukleotid alkalmazásával becsültük meg, Pfu-polimeráz és a 8. ábrán bemutatott kísérletben alkalmazott immobilizációs, amplifikációs, vizualizációs és számlálási körülmények alkalmazásával.

A T386 templatot alkalmaztuk mérőhelyek sorozatában különböző koncentrációkban (1 nM, 0,31 nM), vagy nem volt jelen. A beütésszámokat DNS-kolóniánkénti molekulaszámmá

alakítottuk át, figyelembe véve a mérőhely amplifikációs oldattal borított felszínét (megközelítőleg $27,56 \text{ mm}^2$, amikor $15 \text{ }\mu\text{l}$ térfogatot és 4 mm átmérőjű mérőhelyet alkalmaztunk), az egyes elemzett képek méretét (megközelítőleg $0,08 \text{ mm}^2$), valamint a jel specifikus aktivitását. Az eredményeket a III. táblázatban foglaljuk össze.

III. Táblázat

	1 nM T386-et tartalmazó mérőhelyek						0,3 nM T386-et tartalmazó mérőhelyek						Nincs T386
Beütésszám	8304	8536	6754	8615	6427	4867	3687	4787	4988	2902	3693	4072	843
Kolóniák száma	3846	3831	3149	3788	2844	2349	1808	2087	2408	1218	1638	1935	0
Szálak átlagos száma kolóniánként	3007	3103	2987	3167	3147	2885	2840	3194	2885	3318	3140	2931	N.A.
	3049 ± 109						3051 ± 193						

N.A.: nem alkalmazható

Ez a kísérlet azt mutatja, hogy a találmány szerinti eljárások lehetővé teszik egyetlen templát-molekula izotermális amplifikálását egy elkülönült területen lévő több ezer immobilizált szállá. Ezenfelül, míg a DNS-kolóniák száma világosan függ a templát koncentrációjától, a találmány szerinti eljárás hatékonysága — a DNS-kolóniánként amplifikált szálak számával mérve — független a templát koncentrációjától a működési körülmények között (azaz a nM tartományban).

Szintén lehetséges volt az izotermális amplifikáció termékeinek a visszanyerése a felszínről. A fent leírt immobilizációs protokollt négy mérőhelyen alkalmaztuk, P1 és P2 láncindítók alkalmazásával az összesben, és T386-cal kettőben, de csak kettőben, az egyikben T386 immobilizálva és a másik anélkül, amelyeket a korábban leírt izotermális amplifikációs protokollnak vetettük alá. Azután mindegyik mérőhelyet 60 µl PCR-oldattal töltöttünk meg, amely az alábbiakat tartalmazta: 5 egység Pfu-polimeráz (Stratagene), 10% DMSO, 100 µM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Pharmacia), 200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100 és 0,1mg/ml BSA, és P3 és P386r láncindítók (mindegyik 1 µM). Egy PCR-ciklust hajtottunk végre a mérőhelyekben (94 °C 30 másodpercen keresztül, 60°C 30 másodpercen keresztül, 72 °C 60 másodpercen keresztül), és azután a PCR-oldat 30 µl-ét átvittük PCR-csőbe. Kontrollként egy másik PCR-csövet megtöltöttünk 30 µl azonos PCR-oldattal, amelyhez 0,1 ng T386-ot adtunk. Tíz PCR-ciklust (94 °C 30 másodpercen keresztül, 60°C 30 másodpercen keresztül, 72 °C 60 másodpercen keresztül) hajtottunk végre azután, és mindegyik minta 4 µl-ét 2% agarózgélre vittük fel. Az eredményeket a 10. ábrán mutatjuk be. Az izotermális amplifikációs termék összemérhető PCR-terméket ad a T386-tal oldatban előállított PCR-termékkel, míg a termék alig látható, ha a DNS olyan csőhöz van kapcsolva, amely nem ment át izotermális amplifikáción. A kontrollok azt mutatták, hogy nem keletkeznek műtermékek, mint például láncindító-dimerek, az izotermális amplifikáció és a PCR-amplifikáció folyamán sem.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás legalább egy, akár 1000 nukleotidot tartalmazó nukleinsav-szegmens izotermális amplifikálására, *azzal jellemezve*, hogy

- 5 a) legalább egy nukleinsav-templátot alakítunk ki, amely tartalmazza az amplifikálandó nukleinsav(ak)at, ahol a nukleinsav(ak) az 5' végén egy Y jelű oligonukleotid-szekvenciát és a 3' végén egy Z jelű oligonukleotid-szekvenciát tartalmaz(nak), és ezenfelül a nukleinsav(ak) az 5' végén szilárd hordozóra történő immobilizálásra alkalmas eszközt hordoz(nak);

- 10 b) kialakítunk egy vagy több X jelű kolónia-láncindítót, amelyek képesek hibridizálni a Z jelű oligonukleotid-szekvenciával, és az 5' végükön szilárd hordozóra történő immobilizálásra alkalmas eszközt hordoznak;

- c) a nukleinsav-templát(ka)t és a kolónia-láncindítókat összekeverjük olyan oldattal, amely lehetővé teszi az immobilizálásukat az 5' végükön keresztül szilárd hordozóra szilárd hordozó jelenlétében, oly módon, hogy mind a nukleinsav-templát(ok), mind a kolónia-láncindítók 5' vége kötődjön a szilárd hordozóra;
- 15

d) amplifikációs oldatot adunk a szilárd hordozóhoz, amely legalább egy nukleinsav-polimerázt és nukleotid-prekurzorokat tartalmaz, az immobilizált nukleinsav-templát(ok) szekvenciájával azonos vagy komplementer nukleinsavak izotermális létrehozására és immobilizálására.

- 20 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy két különböző kolónia-láncindítót (X' és X'') keverünk össze a nukleinsav-templátokkal, és az X' és X'' jelű kolónia-láncindítók szekvenciái olyanok, hogy a Z jelű oligonukleotid-szekvencia képes hibridizálni az X' jelű kolónia-láncindítók egyikével és az Y jelű oligonukleotid-szekvencia ugyanaz, mint az X'' jelű kolónia-láncindítók egyike.

- 25 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az Y jelű oligonukleotid-szekvenciával komplementer Z jelű oligonukleotid-szekvenciát, és az Y jelű oligonukleotid-szekvenciával azonos X jelű kolónia-láncindítót alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több, degenerált láncindító-szekvenciát tartalmazó X jelű kolónia-láncindítót, és az amplifikálandó nukleinsav(ak)at tartalmazó, és az 5' és a 3' végükön Y vagy Z jelű oligonukleotid-szekvenciákat nem tartalmazó nukleinsav-templát(ka)t alkalmazunk.
- 30

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nukleinsav-templátként genomiális DNS-t, komplementer DNS-t, rekombináns DNS-t, vagy szintetikus

vagy módosított DNS, RNS mRNS bármilyen formáját, vagy szintetikus vagy módosított RNS bármilyen formáját alkalmazzuk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nukleinsav-templátként 68 és 605 bázis közötti hosszúságú nukleinsavat alkalmazunk.

5 7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az immobilizációs oldatban 1 nM és 0,01 nM közötti koncentrációjú nukleinsav-templát(ka)t alkalmazunk.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az immobilizációs oldatban 1000 nM és 50 nM közötti koncentrációjú kolónia-láncindítókat alkalmazunk.

10 9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nukleinsav-polimerázként DNS-függő DNS-polimerázt vagy RNS-függő DNS-polimerázt alkalmazunk.

10. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nukleinsav-polimerázként 70 °C és 85°C között aktiv DNS-polimerázt alkalmazunk.

11. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az amplifikációt 77 °C és 81 °C közötti hőmérsékleten hajtjuk végre.

15 12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az amplifikációs oldatban lévő nukleotid-prekursorokként dezoxiribonukleotid-trifoszfátokat alkalmazunk.

20 13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a nukleinsav-templát(ok) és a kolónia-láncindítók 5' végének immobilizálására szolgáló eszközökként kémiai úton módosítható funkcionális csoportokat alkalmazunk, amelyek lehetővé teszik kovalens kötés kialakulását a molekulák és a szilárd hordozó között.

25 14. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a nukleinsav-templátokat és a láncindítókat tiol, foszfát vagy amino csoporttal módosítjuk az 5' végükön, és 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid hidrokloridot (EDC) tartalmazó immobilizációs oldattal immobilizáljuk azokat.

15. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nukleinsav kovalens kötéssel történő kötését mono- vagy bifunkciós keresztkötő ágens alkalmazásával lehetővé tévő szilárd hordozót alkalmazunk.

30 16. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a nukleinsav-templát(ok) és a kolónia-láncindítók immobilizálására szolgáló eszközként a szilárd hordozóra affinitással immobilizált kémiai kötőmolekulákat alkalmazunk.

17. Az 1-16. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 6% és 14% közötti DMSO-t tartalmazó amplifikációs oldatot alkalmazunk.

18. Az 1-17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, DNS-kolóniák izotermális létrehozására szilárd hordozón.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mm²-enként 1000 és 100000 közötti sűrűségű nukleinsav-kolóniát hozunk létre.

5 20. A 18. vagy 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az amplifikált nukleinsav láthatóvá is tesszük.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy kétszálú DNS közé interkalálódó ágenst, jelzett nukleotido(ka)t vagy jelzett oligonukleotido(ka)t alkalmazunk.

10 22. A 18-21. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több nukleinsav-kolóniához tartozó egy vagy több immobilizált nukleinsav-szálat felszabadítunk kémiai, optikai, fizikai vagy enzimatisz uton.

23. A 18-22. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szekvencia-meghatározás legalább egy lépését hajtjuk végre egy vagy több nukleinsav-kolónián.

15 24. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szekvencia-meghatározást jelzett nukleotid(ok) beépítésével végezzük.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a jelzett nukleotido(ka)t kolónia-láncindítók alkalmazásával építjük be.

20 26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a jelzett nukleotido(ka)t a kolónia-láncindítóktól eltérő láncindítók alkalmazásával építjük be, amelyek hibridizálnak egy vagy több amplifikált nukleinsavhoz.

27. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több nukleinsav-kolóniához tartozó egy vagy több nukleinsav-szál jelzett oligonukleotiddal/oligonukleotidokkal történő hibridizációjából következő szekvencia-meghatározást végzünk.

25 28. A 23-27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy radioaktív vagy fluoreszcens csoportot alkalmazunk jelként.

29. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 22. igénypont szerinti egyik vagy mindkét nukleinsav-szál felszabadításából következő szekvencia-meghatározást végzünk.

30 30. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy legalább egy nukleinsav-kolóniában jelen lévő amplifikált nukleinsav-templát teljes vagy részleges szekvenciáját határozzuk meg.

31. A 19-29. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a plusz lépéseket egyidejűleg egy vagy több nukleinsav-kolónián hajtjuk végre.

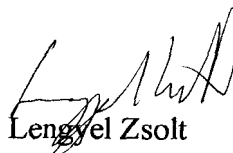
32. Az 1-31. igénypontok bármelyike szerinti eljárás alkalmazása a genomika, farmako-
genomika, drogfelfedezés, élelmiszerek jellemzése, genotipizálás, diagnosztika, génexpresszió
monitorozása, genetikai diverzitás jellemzése, egész genom szekvenálása és polimorfizmus
5 felfedezése területén, vagy nukleinsavak amplifikálását magában foglaló bármilyen más alkal-
mazásban alkalmazható nukleinsav-molekulák biztosítására nukleinsav-szekvenálásban és újra-
szekvenálásban.

33. Reagenskészlet szilárd hordozón történő izotermális nukleinsav amplifikációban
történő alkalmazásra, amely 1-31. igénypontok bármelyike szerinti eljárást tartalmaz a genomi-
ka, farmakogenomika, drogfelfedezés, élelmiszerek jellemzése, genotipizálás, diagnosztika,
10 génexpresszió monitorozása, genetikai diverzitás jellemzése, egész genom szekvenálása és po-
limorfizmus felfedezése területén, vagy nukleinsavak amplifikálását magában foglaló bármilyen
más alkalmazásban alkalmazható nukleinsav-molekulák biztosítására nukleinsav-szekvenálás-
ban és újra-szekvenálásban.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivőjelölt

41 oldal
10 oldal
5 melléklet
56 oldal