

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 962000 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 962000

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/11

C12P 19/34

C12Q 1/68

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 14.11.1994

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 10.05.1996

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 10.05.1996

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 14.11.1994 PCT/US1994/013041
Internationell ansökan - International
application

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

12.11.1993 US 152482

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •The Scripps Research Institute, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Erlander, Mark G., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Sutcliffe, Gregor J., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Menetelmä erikseen ekspressoituvien mRNA:iden identifioimiseksi saman- aikaisesti sekä suhteellisten pitoisuuksien mittaamiseksi

Förfarande för samtidig identifiering av separat expresserande mRNA sa mt mätning av relativa koncentrationer

Menetelmä erikseen ekspressoituvien mRNA:iden identifioimiseksi samanaikaisesti sekä suhteellisten pitoisuuksien mittaamiseksi - Förfarande för samtidig identifiering av separat expresenterande mRNA samt mätning av relativa koncentrationer

5

Tämä keksintö kohdistuu menetelmiin, joilla identifioidaan erikseen ekspressoituvia lähetti-RNA-molekyyliä (mRNA:ita) samanaikaisesti sekä mitataan niiden suhteelliset pitoisuudet.

10

Biokemiallisen tutkimuksen lopullisena tavoitteena tulisi olla organismin muodostavien proteiinimolekyylien täydellinen karakterisointi. Tähän sisältyy niiden identifiointi, sekvenssimäärittäminen, niiden anatomisten kohtien osoittaminen, joissa ne ekspressoituvat, niiden biokemiallisten aktiivisuuksien selvittäminen sekä sen ymmärtäminen, kuinka nämä aktiivisuudet vaikuttavat organismin fysiologiaan. Lääkesovelluksissa tähän kuvaukseen tulisi sisältyä myös tieto siitä, kuinka kaikkien proteiinien pitoisuus muuttuu vasteena farmaseuttisille tai toksisille aineille.

Tarkastelkaamme ongelmaa: Kuinka paljon geenejä on? Kysymys kuinka monta geeniä nisäkkäässä ekspressoituu on vielä vähintään kahden vuosikymmenen tutkimuksen jälkeen selvittämättä. Vain muutama tutkimus on suoraan kohdistunut geenien ekspressoitumismalleihin eri kudoksissa. Mutaatiokuormitustutkimuksissa, J O Bishop, "The Gene Numbers Game", Cell 2:81-86, 1974, T Ohta & M Kimura, "Functional Organization of Genetic Material as a Product of Molecular Evolution", Nature 223:118-119, 1971, on esitetty, että essentiaalisia geenejä on $3 \times 10^4 - 10^5$.

Ennen cDNA-kloonaustekniikoita geeniekspressiota koskevat tiedot saatiin RNA-kompleksisuustutkimuksilla: analogiset mittaukset (bulkkimittaukset) perustuivat havaintoihin esiintyvyyksien runsaudesta. Alkuvaiheen analogiset kompleksisuustutkimukset

mukset vääristyivät odottamattomassa määrin piileviin komplikaatioihin, jotka johtuivat siitä, että molekyylit kaikissa kudoksissa, jotka muodostavat suurimman osan sen mRNA-massasta, käsittävät vain pienen fraktion kokonaiskompleksisuudesta.

5 Myöhemmin saatiin cDNA-kloonauksen avulla suoritettua digitaalisia mittauksia (ts. yksittäisten lajien sekvenssispesifisiä mittauksia); näin ollen tuoreemmat käsitykset mRNA-ekspressiota perustuvat yksittäisistä RNA-lajeista tehtyihin todellisiin havaintoihin.

10

Analogisilla RNA-kompleksisuusmittauksilla on nisäkkäiden kudoksista tutkittu laajimmin aivoja, maksaa ja munuaisia. Pienimmät kompleksisuusarviot ovat tehneet Hastie ja Bishop (N D Hastie & J B Bishop, "The Expression of Three Abundance
15 Classes of Messenger RNA in Mouse Tissues", Cell 9:761-774, 1976), heidän mukaansa aivossa ilmentyy 26×10^6 nukleotidia jyrsijägenomin 3×10^9 emäsparista, 23×10^6 maksassa ja 22×10^6 munuaisissa RNA-settien ollessa lähes täydellisesti päällekkäisiä. Tämä indikoi erittäin minimaalista kudosspesifisten
20 mRNA:iden lukumäärää. Kokemus on kuitenkin osoittanut, että näiden lukujen täytyy olla selvästi aliarvioituja, sillä monien mRNA-molekyylien, joiden esiintymisrunsaus on todennäköisesti jäänyt tämän varhaisen tutkimuksen havainnointirajojen alapuolelle, on osoitettu ekspressoituvan aivoissa vaikka niitä ei
25 ole havaittavissa maksassa tai munuaisissa. Monet muut tutkijat (J A Bantle & W E Hahn, "Complexity and Characterization of Polyadenylated RNA in the Mouse Brain, Cell 8:139-150, 1976, D M Chikaraishi, "Complexity of Cytoplasmic Polyadenylated and Non-Adenylated Rat Brain Ribonucleic Acids", Biochemistry
30 18:3249-3256, 1979) ovat saaneet mittauksissa analogisiksi kompleksisuuksiksi $100-200 \times 10^6$ nukleotidia aivoissa ja 2-3-kertaisesti pienempiä arvioita maksan ja munuaisten osalta. Aivojen mRNA:ista 50-65% ei havaita maksassa tai munuaisissa. Nämä arvot on vahvistettu digitaalisilla kloonaukskokeilla (R J
35 Milner & J G Sutcliffe, "Gene Expression in Rat Brain" Nucl Acids Res 11:5497-5520, 1983).

Bulkki-mRNA:n analogisten mittausten mukaan keskimääräinen mRNA-pituus näytti olevan 1400-1900 nukleotidia. Systemaattisessa aivojen mRNA:n digitaalisessa analyysissä, jossa käytettiin 200 satunnaisesti valittua aivojen cDNA:ta mitattaessa

5 RNA:n kokoa Northern-hybridisaatiolla (Milner & Sutcliffe, supra) havaittiin, että kun mRNA-kokotiedot arvioitiin RNA-prevalenssin kannalta, keskimääräinen pituus oli 1790 nukleotidia, sama kuin analogisilla mittauksilla määritetty. Aivojen mRNA:n kompleksisuuden muodostavien mRNA:iden keskimääräinen

10 pituus oli kuitenkin 5000 nukleotidia. Nämä harvinaisemmat RNA:t olivat paitsi pidempiä myös selvästi aivospesifisempiä vallitsevampien aivo-mRNA:iden ollessa enemmän kaikkialla ekspressoituvia ja keskimäärin paljon lyhyempiä.

15 Nämä mRNA:iden pituudet on vahvistettu vielä myöhemminkin aivo-mRNA:iden pituudesta, joiden sekvenssit oli määritetty (J G Sutcliffe, "mRNA in the Mammalian Central Nervous System", Annu Rev Neurosci 11:157-198, 1988). Nukleotidikompleksisuus $1-2 \times 10^8$ ja keskimääräinen mRNA-pituus 5000 nukleotidia tarkoittavat

20 siis arviolta 30000 aivoissa ekspressoituvaa mRNA:ta, josta noin 2/3 ei havaita maksassa tai munuaisissa. On todennäköistä, että aivoissa ekspressoituu huomattava osa nisäkkäiden kudosspesifisistä geeneistä. Useimmat aivojen mRNA:t ekspressoituvat pieninä pitoisuuksina. Nisäkkäiden kokonais-mRNA-

25 kompleksisuutta ei ole mitattu, eikä vielä tiedetä, onko 5000 nukleotidia hyvä arvio ei-neuraalisten kudosten mRNA:iden osalta. Melko hyvä arvio geenien kokonaismäärästä lienee 50000-100000.

30 Fysiologisen toiminnon kemian ymmärtämiseksi tärkeintä on genomien koodaamien proteiinisekvenssien tunteminen samoin kuin solutyypin, joissa ne ilmentyvät. Nykyisin proteiinisekvenssit pystytään luotettavasti johtamaan cDNA:ista, ei geeneistä, koska genomisissa sekvensseissä on läsnä välisekvenssejä (int-

35 ronit). Nisäkkään genomien täydellinen nukleotidisekvenssikään ei korvaa sen ekspressoituneiden sekvenssien karakterisointia.

Tarvitaan siis systemaattinen strategia transkriptoituneiden sekvenssien kokoamiseksi ja niiden ekspressoitumiskohtien osoittamiseksi. Tällainen strategia olisi erityisen hyödyllinen määritettäessä differentiaalisesti aivoissa ilmeneviä sekvenssejä. Tällaisen tutkimuksen mahdollinen päämäärä on luonnollisesti loppuun saattaminen, toisin sanoen kaikkien mRNA:iden tunnistaminen. Loppuun saattaminen voi olla vaikeaa, koska eri mRNA:iden esiintymisrunsaus vaihtelee ja koska monet eri kudokset ekspessoivat monia erilaisia mRNA:ita. Tähän
 5
 10 pyritessä saadaan asteittain yhä tarkempi kuva geenivaroisuuden dimensioista.

Tutkimuksissa, jotka on suoritettu Craig Venter -laboratoriossa (M D Adams et al, "Complementary DNA Sequencing: Expressed
 15 Sequence Tags and Human Genome Project", Science 252:1651-1656, 1991, M D Adams et al, "Sequence Identification of 2,375 Human Brain Genes", Nature 355:632-634, 1992) on saatu eristettyä sattumanvaraisesti valittuja ihmisen aivojen mRNA:iden cDNA-klooneja, määritettyä niiden 3'-päiden lyhyet single-pass-
 20 sekvenssit, noin 300 emäsparia, sekä koottua noin 2500 näistä "ekspressoituneiden sekvenssileimojen" tietokannaksi. Tämä tietokanta on hyödyllinen, mutta sillä ei saada tietoa differentiaalisesta ekspressiosta. On siis tärkeämpää pystyä tunnistamaan geenejä niiden ekspressoitumisen yleismallin perusteella eri aivoalueilla ja muissa kudoksissa sekä vasteena eri
 25 paradigmoille kuten erilaisille fysiologisille tai patologisille tiloille tai lääkehoidon vaikutukselle, kuin yksinkertaisesti niiden yksittäisessä kudoksessa ekspressoituminen.

30 Eräissä tutkimuksissa on keskitytty polymeraasiketjureaktion (PCR) käyttämiseen tietokannan kokoamiseksi. Williams et al (J G K Williams et al, "DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers", Nucl Acids Res 18:6531-6535, 1990) ja Welsh & McClelland (J Welsh & McClelland, "Genomic Fingerprinting Using Arbitrarily Primed PCR and a Matrix of
 35 Pairwise Combinations of Primers", Nucl Acids Res 18:7213-7218,

1990) ovat osoittaneet, että kun käytettiin sattumanvaraisesti valittujen sekvenssien yksittäisiä 10-meerin alukkeita, ts. mitä tahansa 10-meerin aluketta, PCR-reaktioon kompleksisten DNA-templaattien kuten ihmisen, kasvin, hiivan tai bakteerin genomisen DNA:n kanssa, saatiin ryhmä PCR-tuotteita. Alukkeis-
 5 tamistapahtumiin osoitettiin liittyvän epätäydellistä alukkeen ja templaatti-DNA:n komplementaarisuutta. Oletettavasti osittain yhteen sopimattomia alukkeiden sitoutumiskohtia on satunnaisesti jakautuneena kaikkialle genomiin. Ajoittain kaksi
 10 näistä vastakkaisesti suuntautuneista kohdista sijoittui tarpeeksi lähelle toisiaan muodostamaan PCR-tuotevyöhykkeen. Tuotteita oli keskimäärin 8-10, niiden koko vaihteli alueella noin 0,4 - noin 4 kb, ja niiden mobiliteetti oli erilainen eri alukkeilla. PCR-tuotteiden ryhmässä ilmeni erilaisuutta saman
 15 lajin eri yksilöiden välillä. Tutkimuksen tekijöiden mukaan yksittäisiä satunnaisia alukkeita voitaisiin käyttää tuottamaan DNA-katkoskirjon (RFLP) kaltaista tietoa geenitutkimuksiin. Muut tutkijat ovat käyttäneet tätä tekniikkaa (S R Woodward et al, "Random Sequence Oligonucleotide Primers Detect Polymorphic
 20 DNA Products Which Segregate in Inbred Strains of Mice", Mamm Genome 3:73-78, 1992, J H Nadeau et al, "Multilocus Markers for Mouse Genome Analysis: PCR Amplification Based on Single Primers of Arbitrary Nucleotide Sequence". Mamm Genome 3:55-64, 1992).

25

Kaksi ryhmää (J Welsh et al, "Arbitrarily Primed PCR Fingerprinting of RNA", Nucl Acids Res 20:4965-4970, 1992, P Liang & A B Pardee, "Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction", Science 257:967-
 30 971, 1992) käytti tätä menetelmää mRNA-populaatioiden vertailuun. Liangin ja Pardeen tutkimuksessa tätä menetelmää, jota kutsutaan mRNA-differentiaaliesitykseksi, käytettiin siihen, että vertailtiin kahdessa toistensa sukuisen solutyypissä, normaaleissa ja tumorigeenisissä hiiren A31-soluissa ekspres-
 35 soituvien mRNA:iden populaatioita. Kaikissa kokeissa käytettiin satunnaista 10-meeriä 5'-alukkeena sekä poly-A-häntien

alasetille komplementaarista oligonukleotidia 3'-ankkurialuk-
keena, PCR-monistus suoritettiin kun läsnä oli ³⁵S-dNTP:tä
molemmista solutyypeistä valmistetuilla cDNA:illa. Tuotteet
eroteltiin sekvensointigeeleillä, ja 100-500 nukleotidistä
5 saatuja 50-100 vyöhykettä tarkasteltiin. Vyöhykkeet muodos-
tuivat monistumisen kautta cDNA:ista, jotka vastaavat sellais-
ten mRNA:iden 3'-päitä, jotka sisältävät 3'-ankkurialukkeen
sekä osittain yhteen sopimattoman 5'-alukekohdan, kuten on
havaittu genomisilla DNA-templaateilla. Jokaisella alukeparil-
10 la kahdesta cDNA:sta monistettujen vyöhykkeiden malli oli
samanlainen, intensiteetiltään noin 80 % vyöhykkeistä oli
sellaisia, ettei niitä voinut erottaa. Jotkut vyöhykkeistä
olivat intensiivisempiä jommassa kummassa PCR-näytteessä,
muutama oli havaittavissa pelkästään toisesta näytteestä.

15

Lisätutkimukset (P Liang et al, "Distribution and Cloning of
Eukaryotic mRNAs by Means of Differential Display: Refinements
and Optimization", Nucl Acids Res 21:3269-3275, 1993) ovat
osoittaneet, että menettelytapa toimii pienillä tulo-RNA-pitoi-
20 suuksilla (vaikkei se olekaan kvantitatiivista harvinaisemmilla
lajeilla), ja spesifisyys sijoittuu pääasiallisesti 3'-ankku-
rialukkeen viimeiseen nukleotidiin. Vähintään kolmannes iden-
tifioiduista differentiaalisesti havaituista PCR-tuotteista
vastaa differentiaalisesti ekspressoituneita mRNA:ita virheel-
25 lisen positiivisen osuuden ollessa vähintään 25 %.

Jos kaikki nisäkkään 50000-100000 mRNA:ta olisivat saatavilla
tätä satunnaisaluke-PCR-monistusta varten, tarvittaisiin noin
80-95 5'-satunnaisaluketta ja 12 3'-ankkurialuketta noin 1000
30 PCR-paneeliin ja geeliin Poissonin jakauman perusteella lasketun
todennäköisyyden ollessa, että noin kaksi kolmasosaa näistä
mRNA:ista saataisiin identifioitua.

Seuraavista syistä on epätodennäköistä, että kaikki mRNA:t
35 saataisiin havaittua tällä menetelmällä. Jotta mRNA tulisi
esiin tällaisessa kartoituksessa, sitä täytyy olla läsnä niin

paljon, että se saa aikaan autoradiografiasignaalin, ja sen 3'-päässä täytyy olla 500 nukleotidia, joita voidaan käyttää täsmäämättömyysalukesitomiseen ja alukkeistamiseen. Mitä vallitsevampi yksittäinen mRNA-laji on, sitä todennäköisemmin
 5 siitä muodostuu tuote. Vallitsevista lajeista voi siis muodostua vyöhykkeitä monin eri satunnaissalukkein. Koska tämä jälkimmäinen ominaisuus sisältäisi satunnaissalukkeisiin perustuvan ennakoimattoman satunnaisuustekijän, satunnaissalukemenetelmällä olisi vaikeaa päästä loppuun asti. Myöskin tiedon tulee olla
 10 laboratorion toiseen vietyssä ja luotettavaa, täsmäämättömyysalukkeistamisen tulee olla erittäin hyvin toistettavissa erilaisissa laboratorio-olosuhteissa eri PCR-laitteilla, reaktio-olosuhteiden vaihdellessa jonkin verran. Koska täsmäämättömyysalukkeistamisen perustaa ei vielä tunneta hyvin, tämä on
 15 haittapuoli tietokannan kokoamiselle tiedoista, jotka saadaan Liang & Pardee -differentiaaliesitysmenetelmällä.

On siis olemassa tarve saada entistä parempi menetelmä mRNA-lajien differentiaaliesitykseen, jolla saadaan vähennettyä 5'-
 20 pään luomiseen liittyvää epävarmuutta ja eri asetuksilla ehdottomasti toistettavissa olevia tietoja. Edullisesti tällainen menetelmä ei ole riippuvainen potentiaalisesti ei toistettavissa olevasta täsmäämättömyysalukkeistamisesta. Edullisesti tällaisessa menetelmässä tarvitaan täydelliseen tutkimukseen
 25 vähemmän PCR-paneleita ja geelejä ja saadaan nopeasti akkumuloituvaa kaksoisjuosteen sekvenssitietoa. Edullisesti tällainen menetelmä myös vähentää samasta mRNA-lajista saatavien kilpailevien signaalien määrää, jopa poistaa sellaiset kokonaan.

30

Olemme kehittäneet entistä paremman menetelmän mRNA:iden samanaikaiseksi sekvenssispesifiseksi identifioimiseksi mRNA-populaatiosta. Yleistasolla menetelmässä:

35 1) valmistetaan kaksijuosteisia cDNA:ita mRNA-populaatiosta käyttämällä 12 ankkurialukkeen seosta, jokaisessa ankkurialuk-

keessa on i) 7-40 T-tähteen alue, ii) pilkkoutumiskohta, jossa käytetään yli kuusi emästä tunnistavaa restriktioendonukleaasia pilkkoutumiskohdan sijaitessa T-tähteen alueen 5'-puolella, iii) 4-40 nukleotidin täytesegmetti, joka sijaitsee restriktio-
 5 endonukleaasipilkkoutumiskohdasta 5'-puolen suuntaan, ja iv) kaikkien ankkurialukkeiden 3'-päässä vaiheistustähteet -V-N, V:n ollessa deoksiribonukleotidi valittuna ryhmästä A, C ja G, ja N:n ollessa deoksiribonukleotidi valittuna ryhmästä A, C, G ja T, sekoituksen sisältäessä ankkurialukkeita, joihin sisälty-
 10 vät kaikki V:n ja N:n mahdollisuudet,

2) tuotetaan kloonattuja inserttejä sopivasta isäntäsolusta, joka on transformoitu vektorilla vektorin sisältäessä cDNA-näytteen, joka on pilkottu ensimmäisellä restriktioendonukleaa-
 15 silla ja siihen on insertoitu toinen restriktioendonukleasi pilkotun cDNA-näytteen ollessa insertoitu vektoriin antisense-suunnassa suhteessa vektorissa olevaan bakteriofagispesifiseen promoottoriin ensimmäisen restriktioendonukleasin tunnistamassa neljän nukleotidin sekvenssin ja toisen restriktioendonukle-
 20 aasin aikaansaadessa pilkkoutumisen ankkurialukeseoksen jo-
 kaisen jäsenen yhdessä kohdassa,

3) luodaan kloonatuista inserteistä linearisoituja fragmentteja suorittamalla hajotus vähintään yhdellä restriktioendonukleaa-
 25 silla, joka on erilainen kuin ensimmäinen ja toinen restriktio-
 endonukleasi,

4) luodaan antisense-cRNA-transkripteistä cRNA-valmiste inkuboimalla linearisoituja fragmentteja bakteriofagispesifisellä
 30 RNA-polymeraasilla, joka pystyy käynnistämään transkription bakteriofagispesifisestä promoottorista,

5) jaetaan cRNA-valmiste kuudeksitoista alapooliksi, ja transkriptoidaan ensimmäisen juosteen cDNA jokaisesta alapoolista
 35 käyttämällä lämpöstabiilia käänteistranskriptaasia ja yhtä kuudestatoista alukkeesta, joiden 3'-terminaali on -N-N, jossa

N on yksi neljästä deoksiribonukleotidista A, C, G, ja T, alukkeen ollessa vähintään 15 nukleotidin pituinen, vastaten sekvensseiltään bakteriofagispesifisen promoottorin 3'-päättä ja jatkuessa läpi vähintään kahteen cRNA:n ensimmäiseen nukleoti-
 5 diin seoksen sisältäessä kaikki kaikki 3'-pään kahden nukleoti-
 din mahdollisuudet,

6) käytetään kaikkien kuudentoista alapoolin transkriptio-
 tuotetta templaattina polymeraasiketjureaktiossa, jossa käytet-
 10 tiin 3'-aluketta, joka vastaa sekvensseiltään vektoria, joka
 sijaitsee vektorin cDNA-näytteen insertointikohdan vieressä ja
 5'-aluketta, joka valitaan ryhmästä: i) aluke, josta ensim-
 mäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä alapoolia varten, ii)
 aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä
 15 alapoolia varten jatkettuna 3'-päästään lisätähteellä -N, jossa
 N voi olla joko A, C G tai T, ja iii) aluke, jota käytettiin
 syntetoitaessa ensimmäisen juosteen cDNA tätä alapoolia varten
 jatkettuna 3'-päästään kahdella lisätähteellä -N-N, jossa N voi
 olla joko A, C, G tai T, polymeraasiketjureaktion avulla monis-
 20 tettujen fragmenttien tuottamiseksi, ja

7) erotellaan polymeraasiketjureaktion avulla monistetut frag-
 mentit elektroforeettisesti esittämään näytteessä läsnä olevien
 mRNA:iden 3'-päitä edustavat vyöhykkeet.

25

Tyypillisesti ankkurialukkeissa on kaikissa 18 T-tähdettä T-
 tähdealueella, ja ankkurialukkeiden täytesegmentti on 14 täh-
 teen pituinen. Sopiva täytesegmentin sekvenssi on A-A-C-T-G-G-
 A-A-G-A-A-T-T-C (SEQ ID NO: 1).

30

Yli kuusi emästä tunnistavalla restriktioendonukleaasilla
 pilkottava kohta on tyypillisesti NotI-pilkkoutumiskohta.
 Tässä tapauksessa sopivien ankkurialukkeiden sekvenssi on A-A-
 C-T-G-G-A-A-G-A-A-T-T-C-G-C-G-G-C-C-G-C-A-G-G-A-A-T-T-T-T-T-
 35 T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-V-N (SEQ ID NO: 2).

Bakteriofagispesifinen promoottori valitaan tyypillisesti ryhmästä T3-promoottori ja T7-promoottori. Tyypillisimmin se on T3-promoottori.

5 cDNA:n cRNA:sta transkriptoinen alukkeistamiseen käytettävien kuudentoista alukkeen sekvenssi on tyypillisesti A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N (SEQ ID NO: 3).

Vektori voi olla plasmidi pBC SK⁺ pilkottuna ClaI:llä ja NotI:-
10 llä, jolloin vaiheen 6 3'-aluke voi olla G-A-A-C-A-A-A-A-G-C-T-G-G-A-G-C-T-C-C-A-C-C-G-C (SEQ ID NO: 4).

Ensimmäinen neljän nukleotidin sekvenssin tunnistava restriktioendonukleaasi on tyypillisesti MspI, vaihtoehtoisesti se voi
15 olla TaqI tai Hin PII. Vain yhdessä kohdassa ankkurialukeseoksen ankkurialukkeista pilkkova restriktioendonukleaasi on tyypillisesti NotI.

mRNA-populaatio on tavallisesti rikastettu polyadenyloiduilla
20 mRNA-lajeilla.

Tyypillinen isäntäsolu on Escherichia coli.

Vaihe, jossa luodaan kloonattujen inserttien linearisoituja
25 fragmentteja käsittää tyypillisesti seuraavat kohdat:

a) jaetaan insertin sisältämä vektori kahdeksi fraktioksi, ensimmäinen fraktio pilkottuna restriktioendonukleasilla XhoI ja toinen fraktio pilkottuna restriktioendonukleasilla SalI,
30

b) yhdistetään ensimmäinen ja toinen fraktio pilkkomisen jälkeen,

c) jaetaan yhdistetyt fraktiot kolmeen osaan ja pilkotaan
35 ensimmäinen kolmannes restriktioendonukleasilla HindIII,

toinen kolmannes restriktioendonukleaasilla BamHI ja kolmas kolmannes restriktioendonukleaasilla EcoRI, ja

d) yhdistetään kolmasosat hajottamisen jälkeen, niin että
5 saadaan linearisoitujen fragmenttien populaatio, josta noin yksi kuudesosa vastaa pilkkoutumistuotetta kaikilla vaihtoehtoina olevilla entsyymiyhdistelmillä.

Tyypillisesti vaihe, jossa erotellaan polymeraasiketjureaktiolla monistetut fragmentit elektroforeettisesti, käsittää fragmenttien elektroforesoinnin vähintään kahdelle geelille.

Menetelmä voi käsittää myös vähintään yhden mRNA:ista 3'-pään sekvenssin määrittämisen, esimerkiksi:

15

1) eluoimalla vähintään yksi mRNA:ta vastaava cDNA elektroferogrammista, jossa näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavat vyöhykkeet ovat esitettynä,

20 2) monistamalla eluoitu cDNA polymeraasiketjureaktiolla,

3) kloonamalla monistettu cDNA plasmidiin,

4) tuottamalla kloonattua DNA:ta vastaavaa DNA plasmidista, ja

25

5) sekvensoimalla kloonattu cDNA.

Keksinnön eräs puoli on menetelmä, jolla identifioidaan samanaikaisesti sekvenssispesifisesti mRNA:ita, jotka vastaavat
30 antisense-cRNA-poolin jäseniä edustaen mRNA-populaation 3'-päitä, antisense-cRNA-pooliin kuuluvien antisense-cRNA:iden päättyessä 5'-päässään bakteriofagispesifistä vektoria vastaavaan alukesekvenssiin ja 3'-päässään sekvenssiin, joka vastaa sekvensseiltään vektorin sekvenssiä. Menetelmässä:

35

1) jaetaan antisense-cRNA-poolin jäsenet kuudeksitoista alapooliksi ja transkriptoidaan ensimmäisen juosteen cDNA jokaisesta alapoolista käyttämällä lämpöstabiilia käänteistranskriptaasia ja yhtä kuudestatoista alukkeesta, joiden 3'-terminaali on -N-
 5 N, jossa N on yksi neljästä deoksiribonukleotidista A, C, G, ja T, alukkeen ollessa vähintään 15 nukleotidin pituinen, vastaten sekvensseiltään bakteriofagispesifisen promoottorin 3'-päättä ja jatkuessa läpi vähintään kahteen cRNA:n ensimmäiseen nukleotidiin seoksen sisältäessä kaikki 3'-pään kahden nukleotidin
 10 mahdollisuudet,

2) käytetään kaikkien kuudentoista alapoolin transkriptiotuotetta templaattina polymeraasiketjureaktiossa, jossa käytetään 3'-aluketta, joka vastaa sekvensseiltään vektorin sekvenssiä, joka sijaitsee vektorin cDNA-näytteen insertointikohdan
 15 vieressä, ja 5'-aluketta, joka valitaan ryhmästä: i) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä alapoolia varten, ii) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-päästään lisätähteellä
 20 -N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T, ja iii) aluke, jota käytettiin syntetisoitaessa ensimmäisen juosteen cDNA tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-päästään kahdella lisätähteellä -N-N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T, polymeraasiketjureaktion avulla monistettujen fragmenttien tuottamiseksi, ja
 25

3) erotellaan polymeraasiketjureaktion avulla monistetut fragmentit elektroforeettisesti esittämään näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavat vyöhykkeet.

30 Vielä eräs esillä olevan keksinnön puolista on menetelmä, jolla havaitaan muutos mRNA:n ekspressoitumismallissa kudoksessa, johon liittyy fysiologinen tai patologinen muutos. Tämän menetelmän vaiheet ovat:

35 1) otetaan ensimmäinen näyte kudoksesta, jossa fysiologisia tai patologisia muutoksia ei ole tapahtunut,

2) määritetään mRNA-ekspressiomalli ensimmäisestä kudospäytteestä suorittamalla edellä kuvatun menetelmän vaiheet 1)-3), identifioidaan samanaikaisesti sekvenssispesifisesti mRNA:ita, jotka vastaavat mRNA-populaation 3'-päitä edustavien antisense-
 5 cRNA-poolin jäseniä ja luodaan ensimmäinen esitys ensimmäisessä näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavista vyöhykkeistä,

3) otetaan toinen näyte kudoksesta, jossa on tapahtunut fysiologinen tai patologinen muutos,
 10

4) määritetään mRNA-ekspressiomalli toisesta kudospäytteestä suorittamalla edellä kuvatun menetelmän vaiheet 1)-3), identifioidaan samanaikaisesti sekvenssispesifisesti mRNA:ita, jotka
 15 vastaavat antisense-mRNA-poolin jäseniä ja luodaan toinen esitys toisessa näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavista vyöhykkeistä,

5) verrataan ensimmäistä ja toista esitystä ja määritetään mikä
 20 vaikutus fysiologisella tai patologisella muutoksella on mRNA-ekspressiomalliin kudoksessa.

Tyypillisesti tämä vertailu tehdään vierekkäisillä kaistoilla.

25 Kudos voi olla peräisin keskushermostosta tai keskushermoston tietyistä rakenteista. Vaihtoehtoisesti kudos voi olla peräisin jostakin muusta elimestä tai elinjärjestelmästä.

Eräs esillä olevan keksinnön puolia on menetelmä lääkkeen
 30 sivuvaikutuksen tutkimiseksi. Menetelmässä voidaan käyttää seuraavia vaiheita:

1) otetaan ensimmäinen näyte kudoksesta, jota on käsitelty yhdisteellä, jonka fysiologinen vaikutus tunnetaan,

2) määritetään mRNA-ekspressiomalli ensimmäisestä kudospäytteestä suorittamalla edellä kuvatun menetelmän vaiheet 1)-3), identifioidaan samanaikaisesti sekvenssispesifisesti antisense-cRNA-poolin jäseniä vastaavat mRNA:t ja luodaan ensimmäinen
 5 esitys ensimmäisessä näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavista vyöhykkeistä,

3) otetaan toinen kudospäyte elimestä, jota on käsitelty lääkeaineella, jonka sivuvaikutusta tutkitaan,

10

4) määritetään mRNA-ekspressiomalli toisesta kudospäytteestä suorittamalla edellä kuvatun menetelmän vaiheet 1)-3), identifioidaan samanaikaisesti sekvenssispesifisesti antisense-mRNA-poolin jäseniä vastaavat mRNA:t ja luodaan toinen esitys toisessa näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavista
 15 vyöhykkeistä,

5) verrataan ensimmäistä ja toista esitystä, niin että saadaan havaittua sellaisten mRNA-lajien läsnäolo, joiden ekspressioon
 20 tunnetulla yhdisteellä ei ole ollut vaikutusta, mutta johon tutkittava lääke on vaikuttanut, jolloin selviää mikä on tutkittavan lääkkeen vaikutuksen ja tunnetun yhdisteen vaikutuksen ero ja siis mikä on sivuvaikutus.

25 Tutkittava lääkeaine voi olla keskushermostoon vaikuttava lääkeaine, esimerkiksi antidepressiivi, neurolepti, rauhoittava lääke, kouristuksia estävä lääke, monoamiinioksidaasi-inhibiittori tai stimulantti. Vaihtoehtoisesti lääkeaine voi olla johonkin toiseen lääkeluokkaan kuuluva lääkeaine kuten Parkinsonin taudin lääke, luuston lihaksiston relaksantti, analgeetti, paikallisanesteetti, kolinerginen, antispasmodinen, steroidinen tai ei-steroidinen anti-inflammatorinen lääke.
 30

Eräs esillä olevan keksinnön puolista ovat esillä olevan keksinnön käyttämiseen sopivat alukkeiden ja alukkeiden de-
 35 generaattiseosten panelit. Tällaisia ovat:

1) alukepaneli, joka käsittää kuusitoista aluketta, joiden sekvenssi on A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N (SEQ ID NO: 3), jossa N on yksi neljästä deoksiribonukleotidistä, A, C, G tai T,

5

2) alukepaneli, joka käsittää 64 aluketta, joiden sekvenssi on A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N-N (SEQ ID NO: 5), jossa N on yksi neljästä deoksiribonukleotidistä, A, C, G tai T,

10 3) alukepaneli, joka käsittää 256 aluketta, joiden sekvenssi on A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N-N-N (SEQ ID NO: 6), jossa N on yksi neljästä deoksiribonukleotidistä, A, C, G tai T,

4) alukepaneli, joka käsittää 12 aluketta, joiden sekvenssi on
15 A-A-C-T-G-G-A-A-G-A-A-T-T-C-G-C-G-G-C-C-G-C-A-G-G-A-A-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-V-N (SEQ ID NO: 2), jossa V on deoksiribonukleotidi, joka valitaan ryhmästä A, C ja G, ja N on deoksiribonukleotidi, joka valitaan ryhmästä A, C, G ja T,

20 5) alukedegeneraattiseos, joka käsittää seoksena 12 aluketta, joiden sekvenssi on A-A-C-T-G-G-A-A-G-A-A-T-T-C-G-C-G-G-C-C-G-C-A-G-G-A-A-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-V-N (SEQ ID NO: 2), jossa V on deoksiribonukleotidi, joka valitaan ryhmästä A, C ja G, ja N on deoksiribonukleotidi, joka valitaan ryhmästä A,
25 C, G ja T, kaikkia kahtatoista aluketta on läsnä suurin piirtein ekvimolaarinen määrä.

Nämä ja muita keksinnön piirteitä, puolia ja etuja selvittävät tarkemmin seuraava kuvaus, oheiset patenttivaatimukset sekä
30 mukana olevat kuviot, joissa:

kuvio 1 on diagrammaattinen kuvaus esillä olevan keksinnön mukaisesta menetelmästä, jossa nähdään eri alukkeistus-, pilkkomis-, kloonaus- ja monistusvaiheet, ja

kuvio 2 on autoradiogrammi geelistä, jossa nähdään tulos esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän suorittamisesta käyttämällä PCR-vaiheessa useita 5'-alukkeita, jotka vastaavat tunnettuja aivojen mRNA:iden sekvenssejä ja käyttämällä lähtömateriaalina maksan ja aivojen mRNA:ta.

Olemme kehittäneet menetelmän, jolla suoritetaan samanaikainen sekvenssispesifinen identifiointi ja mRNA:iden esittäminen mRNA-populaatiosta.

10

Kuten alla ilmenee, tällä menetelmällä on lukuisia sovelluskohteita lääkkeiden tutkimisessa, fysiologisten ja patologisten tilojen tutkimuksessa sekä geenikartoituksessa. Näitä sovelluskohteita käsitellään alla.

15

I. mRNA:IDEN SAMANAIKAINEN SEKVENSSISPESIFINEN IDENTIFIOINTI

Esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä, joka perustuu polymeraasiketjureaktio (PCR) -tekniikkaan, saadaan visualisoidua lähes kaikki kudoksissa ekspressoituvat mRNA:t selvästi erottuvana vyöhykkeenä geelillä intensiteetillä, joka vastaa karkeasti ottaen mRNA:n pitoisuutta. Menetelmä perustuu havaintoon, että käytännöllisesti katsoen kaikki mRNA:t päättyvät 3'-poly(A)-häntään, mutta se ei kuitenkaan ole riippuvainen häntään sitoutuvan alukkeen spesifisyydestä.

25

Yleisesti ottaen menetelmän vaiheet ovat:

- 1) valmistetaan kaksijuosteisia cDNA:ita mRNA-populaatiosta käyttämällä 12 ankkurialukkeen sekoitusta, jokaisessa ankkurialukkeessa i) 7-40 T-tähteen alue, ii) pilkkoutumiskohta, jossa käytetään yli kuusi emästä tunnistavaa restriktioendonukleaasia pilkkoutumiskohdan sijaitessa T-tähteen alueen 5'-puolella, iii) 4-40 nukleotidin täytesegmetti, joka sijaitsee restriktioendonukleaasipilkkoutumiskohdasta 5'-puolen suuntaan, ja iv) kaikkien ankkurialukkeiden 3'-päässä vaiheistustähteet -

35

V-N, jossa V on deoksiribonukleotidi valittuna ryhmästä A, C ja G, ja N on deoksiribonukleotidi valittuna ryhmästä A, C, G ja T, sekoituksen sisältäessä ankkurialukkeita, joihin sisältyvät kaikki V:n ja N:n mahdollisuudet,

5

2) tuotetaan kloonattuja inserttejä sopivasta isäntäsolusta, joka on transformoitu vektorilla vektorin sisältäessä cDNA-näytteen, joka on pilkottu ensimmäisellä restriktioendonukleaa-
silla ja siihen on insertoitu toinen restriktioendonukleaa-
10 pilkotun cDNA-näytteen ollessa insertoitu vektoriin antisense-
suunnassa suhteessa vektorissa olevaan bakteriofagispesifiseen
promoottoriin ensimmäisen restriktioendonukleaaasin tunnistaa-
neljän nukleotidin sekvenssin ja toisen restriktioendonukleaa-
sin aikaansaadessa pilkkoutumisen ankkurialukeseoksen jokaisen
15 jäsenen yhdessä kohdassa,

3) luodaan kloonatuista inserteistä linearisoituja fragmentteja suorittamalla hajotus vähintään yhdellä restriktioendonukleaa-
silla, joka on erilainen kuin ensimmäinen ja toinen restriktio-
20 endonukleaaasi,

4) luodaan antisense-cRNA-transkripteista cRNA-valmiste inkuboimalla linearisoituja fragmentteja bakteriofagispesifisellä RNA-polymeraasilla, joka pystyy käynnistämään transkription
25 bakteriofagispesifisestä promoottorista,

5) jaetaan cRNA-valmiste kuudeksitoista alapooliksi ja transkriptoidaan ensimmäisen juosteen cDNA jokaisesta alapoolista käyttämällä lämpöstabiilia käänteistranskriptaasia ja yhtä
30 kuudestatoista alukkeesta, joiden 3'-terminaali on -N-N, jossa N on yksi neljästä deoksiribonukleotidista A, C, G, ja T, alukkeen ollessa vähintään 15 nukleotidin pituinen, vastaten sekvensseiltään bakteriofagispesifisen promoottorin 3'-päästä ja jatkuessa läpi vähintään kahteen cRNA:n ensimmäiseen nukleoti-
35 diin seoksen sisältäessä kaikki 3'-pään kahden nukleotidin mahdollisuudet.

- 6) käytetään kaikkien kuudentoista alapoolin transkriptio-
 tuotetta templaattina polymeraasiketjureaktiossa, jossa käyte-
 tään 3'-aluketta, joka vastaa sekvensseiltään vektorin sekvens-
 siä, joka sijaitsee vektorin cDNA-näytteen insertointikohdan
 5 vieressä ja 5'-aluketta, joka valitaan ryhmästä: i) aluke,
 josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä alapoolia
 varten, ii) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistet-
 tiin tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-päästään lisätähteellä
 -N, jossa N voi olla joko A, C G tai T, ja iii) aluke, jota
 10 käytettiin syntetöitaessa ensimmäisen juosteen cDNA tätä ala-
 poolia varten jatkettuna 3'-päästään kahdella lisätähteellä -N-
 N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T, polymeraasiketjureak-
 tion avulla monistettujen fragmenttien tuottamiseksi, ja
- 15 7) erotellaan polymeraasiketjureaktion avulla monistetut frag-
 mentit elektroforeettisesti esittämään näytteessä läsnä olevien
 mRNA:iden 3'-päitä edustavat vyöhykkeet.

Tämä työjärjestys on kuvattu kuviossa 1.

20

A. mRNA:n eristäminen

Menetelmän ensimmäisenä vaiheena on mRNA-populaation eristä-
 minen tai hankkiminen. RNA-erotusmenetelmät ovat alalla hyvin
 tunnettuja ja niitä kuvaa esimerkiksi teos J Sambrook et al,
 25 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor
 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, vol 1,
 luku 7, "Extraction, Purification and Analysis of Messenger RNA
 from Eukaryotic Cells", joka on liitetty oheen viitteeksi.
 Tunnetaan muitakin eristys- ja erotusmenetelmiä. Tyypillisesti
 30 eristäminen suoritetaan kun läsnä on kaotrooppisia aineita
 kuten guanidiumkloridia tai guanidiumtiosyanaattia, mutta
 vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muitakin pinta-aktiivisia
 aineita ja erotusaineita.

35 mRNA eristetään erotetusta kokonais-RNA:sta tyypillisesti
 kromatografoimalla oligo(dT)-selluloosan tai muun kromatogra-

fisen väliaineen avulla, joka pystyy sitomaan mRNA-molekyylien polyadenyloidun 3'-osan. Vaihtoehtoisesti, ei kuitenkaan yhtä edullisesti, voidaan käyttää kokonais-RNA:ta. Yleisesti ottaen on kuitenkin edullista eristää poly(A)⁺-RNA.

5

B. Kaksijuosteisen cDNA:n valmistaminen

Kaksijuostesia cDNA:ita valmistetaan sitten mRNA-populaatiosta käyttämällä kahdentoista ankkurialukkeen seosta käänteistranskriptaasin käynnistämiseksi. Kaikissa ankkurialukkeissa on:

- 10 i) 7-40 T-tähteen alue, ii) pilkkoutumiskohta, jossa käytetään yli kuusi emästä tunnistavaa restriktioendonukleaasia pilkkoutumiskohdan sijaitessa T-tähteiden alueen 5'-puolella, iii) 4-40 nukleotidin täytesegmentti, joka sijaitsee restriktioendonukleaasipilkkoutumiskohdasta 5'-puolen suuntaan, ja iv) kaik-
- 15 kien ankkurialukkeiden 3'-päässä vaiheistustähteet -V-N, jossa V on deoksiribonukleotidi valittuna ryhmästä A, C ja G, ja N on deoksiribonukleotidi valittuna ryhmästä A, C, G ja T. Seos sisältää ankkurialukkeet, joihin sisältyvät kaikki V:n ja N:n mahdollisuudet.

20

Tyypillisesti kaikissa ankkurialukkeissa on T-tähdealueella 18 T-tähdettä, ja ankkurialukkeiden täytesegmentti on 14 tähteen pituinen.

- 25 Sopiva täytesegmentin sekvenssi on A-A-C-T-G-G-A-A-G-A-A-T-T-C (SEQ ID NO: 1). Tyypillisesti yli kuusi emästä tunnistavalla restriktioendonukleaasilla pilkottava kohta on NotI-pilkkoutumiskohta. Suositeltavalla ankkurialukkeiden joukolla on sekvenssi A-A-C-T-G-G-A-A-G-A-A-T-T-C-G-C-G-G-C-C-G-C-A-G-G-A-A-T-
- 30 T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-V-N (SEQ ID NO: 2).

Yksi tämän kahdentoista ankkurialukkeen seoksen jäsenistä aloittaa synteessin määrättyssä asemassa näytteen kaikkien mRNA-lajien kopioiden 3'-päässä määrittäen näin kaikkien lajien 3'-

35 pään päätepisteen.

Tämä reaktio toteutetaan alalla tunnetuissa kaksijuosteisen mRNA:n valmistuksessa käytettävissä olosuhteissa. Tällaisia tekniikoita kuvataan esimerkiksi teoksessa Vol 2, J Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", "Construction and
5 Analysis of cDNA Libraries". Tavallisesti käytetään siivekkään myeloblastoosiviruksen käänteistranskriptaasia.

C. cDNA-näytteen pilkkominen käänteisendonukleaaseilla

cDNA-näyte pilkotaan kahdella restriktioendonukleaasilla.

- 10 Ensimmäinen restriktioendonukleaasi on endonukleaasi, joka tunnistaa 4 nukleotidin sekvenssin. Tämä saa tavallisesti useimmat cDNA:t pilkkoutumaan useassa kohdassa. Toinen restriktioendonukleaasi saa aikaan pilkkoutumisen ankkurialukkeiden seoksen jokaisen jäsenen yhdessä kohdassa. Ensimmäinen rest-
15 riktioendonukleaasi on tyypillisesti MspI ja toinen restriktioendonukleaasi NotI. Tämä entsyymi Not ei saa aikaan pilkkoutumista useimmissa cDNA:issa. Tämä on toivottavaa, jotta saataisiin minimoitua kloonattujen inserttien häviäminen, joka seuraisi cDNA:iden pilkkoutuessa muissa kohdissa kuin ankkuri-
20 kohdassa.

Vaihtoehtoisesti ensimmäinen restriktioendonukleaasi voi olla TaqI tai HinPII. Näitä kahta jälkimmäistä restriktioendonukleaasia käytettäessä pystytään havaitsemaan harvinaisempia

- 25 mRNA:ita, joita MspI ei pilko. Ensimmäinen restriktioendonukleaasi saa aikaan 5'-ulokkeen, joka sopii kloonaukseen haluttuun vektoriin kuten jäljempänä pohditaan. Tämä kloonaus, pCB SK⁺ -vektoriin, tapahtuu ClaI-kohtaan kuten jäljempänä esitetään.

30

cDNA-hajotuksen olosuhteet ovat alalla hyvin tunnetut, ja niitä kuvataan esimerkiksi teoksessa J Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", vol 1, luku 5, "Enzymes Used in Molecular Cloning".

35

D. Pilkotun cDNA:n insertointi vektoriin

Ensimmäisellä ja toisella restriktioendonukleaasilla pilkottu cDNA-näyte insertoidaan sitten vektoriin. Sopiva vektori on plasmidi pBC SK⁺, joka on pilkottu restriktioendonukleaaseilla 5 ClaI ja NotI. Vektori sisältää bakteriofagispesifisen promootorin. Tyypillisesti promoottori on T3-promoottori tai T7-promoottori. Suositeltava promoottori on bakteriofagi-T3-promoottori. Pilkottu cDNA insertoidaan promoottoriin suunnassa, joka on antisense-suuntainen suhteessa bakteriofagispesifiseen promoottoriin. 10

E. Sopivan isäntäsolun transformointi

Vektoria, johon pilkottu cDNA on insertoitu, käytetään sitten transformoimaan sopiva isäntäsolu, joka voidaan tehokkaasti 15 transformoida tai transfektoida insertin sisältävällä vektorilla. Sopivia kloonausvektoreita on kuvattu esimerkiksi teoksessa Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", supra. Tyypillisesti isäntäsolu on prokaryoottinen. Eri-tyyseen sopiva isäntäsolu on jokin E. coli -kanta. Sopiva E. coli -kanta on MC1061. Edullisesti käytetään myös pientä alikvoottia transformoimaan E. coli -kanta XL1-Blue, niin että insertin sisältävien kloonien prosentuaalinen määrä määrittyy sinisten ja valkoisten pesäkkeiden suhteellisista prosentuaalisista määristä X-gal-alustoilla. Tyypillisesti hyväksyttäviä 20 ovat vain kirjastot, joissa on 5×10^5 rekombinanttiylimäärä. 25

F. Linearisoitujen fragmenttien luominen

Seuraavaksi kaikista cDNA-kirjastoista tehdään plasmidivalmisteet, tyypillisesti miniprep-valmisteina. Linearisoituja fragmentteja luodaan sitten suorittamalla hajotus vähintään yhdellä 30 restriktioendonukleaasilla, joka on erilainen kuin edellä esitetyt ensimmäinen ja toinen restriktioendonukleaasi. On suositeltavaa jakaa alikvootti kloonattuja inserttejä kahdeksi pooliksi, joista ensimmäinen on hajotettu XhoI:llä ja toinen 35 SalI:llä. Linearisoitujen plasmidien poolit yhdistetään, sekoitetaan ja jaetaan kolmeen osaan. Kolmasosat hajotetaan

HindIII:lla, BamHI:llä ja EcoRI:llä. Tätä menettelytapaa käytetään, koska inserttien ja antisense-transkriptien luomiseksi T3-RNA-polymeraasin templaatti täytyy ensin pilkkoa restriktioendonukleasilla, joka suorittaa pilkkomisen sivu-
 5 avissa sekvensseissä, ei inserttien itsensä sisällä. Koska 3'-terminaalin MspI-fragmenttien keskimääräinen pituus on 256 emäsparia, noin 6 % inserteistä sisältää kohtia entsyymille, jossa on heksameeritunnistussekvenssi. Nämä insertit menetettäisiin jatkoanalyysin kannalta, jos käytettäisiin vain yhtä
 10 ainoaa entsyymiä. Näin ollen on edullista jakaa reaktio, niin että vain jompaa kumpaa kahdesta entsyymistä käytetään linearisointiin kussakin puolessa reaktiossa. Vain molemmille entsyymeille kohdat sisältäviä inserttejä (noin 0,4 %) menetetään näytteiden kummastakin puoliskosta. Samoin kumpikin cDNA-
 15 näyte on eri määrin kontaminoitunut inserttejä sisältämättömillä transkripteilla, jotka saattaisivat johtaa tehokkuuden vaihteluun myöhemmissä eri näytteiden polymeraasiketjureaktioissa johtuen alukkeisiin kohdistuvan kilpailun differentiaalisuudesta. Kun suoritetaan kolmasosanäytteiden pilkkominen
 20 yhdellä kolmesta entsyymistä, joissa on vain yksi kohde pCB SK⁺:ssa sen ClaI- ja NotI-kohtien välissä, ei muodostu transkripteja, jotka sisältäisivät sitoutumiskohdat mahdollisille 5'-alukkeille insertin sisältämättömille plasmideille suoritettavassa PCR-prosessissa. Kun käytetään kolmea entsyymiä reaktion kolmanneksille voidaan käyttää vähemmän insertin sisältäviä sekvenssejä, jotka sisältävät kohdat myös entsyymille
 25 samalla kuin saadaan ratkaistua ongelma, jonka aiheuttaa mahdollinen kontaminoituminen insertin sisältämättömillä sekvensseillä. Jos käytettäisiin vain yhtä entsyymiä, menetettäisiin
 30 noin 10 % insertin sisältävistä sekvensseistä, mutta tämä luku vähenee noin 0,1 %:iin, koska vain ne sekvenssit, jotka eivät pilkkoudu kaikilla kolmella entsyymillä, menetetään.

G. crRNA:n luominen

35 Seurava vaihe on crRNA-valmisteen luominen antisense-cDNA-transkripteista. Tämä suoritetaan inkuboimalla linearisoituja

fragmentteja RNA-polymeraasilla, joka pystyy käynnistämään transkription bakteriofagispesifisestä promoottorista. Tyypillisesti, kuten edellä esitettiin, promoottori on T3-promoottori, ja polymeraasi on siksi T3-RNA-polymeraasi. Polymeraasia
 5 inkuboidaan linearisoitujen fragmenttien ja neljän ribonukleosiditrifosfaatin kanssa syntetointiin sopivissa olosuhteissa.

H. Ensimmäisen juosteen cDNA:n transkriptointi

cRNA-valmiste jaetaan sitten kuudeksitoista alapooliksi.

- 10 Ensimmäisen juosteen cDNA transkriptoidaan sitten jokaisesta alapoolista käyttämällä lämpöstabiilia käänteistranskriptaasia ja aluketta jäljempänä kuvattuun tapaan. Suositeltava käänteistranskriptaasi on *Thermus thermophilus* -sesta saatava rekombinantti käänteistranskriptaasi, rTth, jota valmistaa Perkin
 15 Elmer -yhtiö (Norwalk, CT). Tämä entsyymi tunnetaan myös RNA-riippuvaisena DNA-polymeraasina. Tällä käänteistranskriptasilla lämpökäsittely suoritetaan 60°C:ssa, ja transkriptioreaktio 70°C:ssa. Tämä edistää alukkeen ja cRNA:n tarkkaa komplementaarisuutta. Käytettävä aluke on yksi kuudeksitoista aluk-
 20 keesta, joiden 3'-terminaali on -N-N, jossa N on yksi neljästä deoksiribonukleotidista, A, C, G tai T, alukkeen ollessa vähintään 15 nukleotidin pituinen, vastaten sekvenssiltään bakteriofagispesifisen promoottorin 3'-päättä ja jatkuessa läpi vähintään cRNA:n kahteen ensimmäiseen nukleotidiin.

25

Kun bakteriofagispesifinen promoottori on T3-promoottori, alukeilla on tyypillisesti sekvenssi A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N (SEQ ID NO: 3).

30 I. PCR-reaktio

Seuraava vaihe on käyttää transkriptiotuotetta kaikissa kuudeksatoista alapoolissa templaattina polymeraasiketjureaktiossa alukeilla alla kuvattuun tapaan, niin että saadaan polymeraasiketjureaktiomonistettuja fragmentteja.

Käytettävät alukkeet ovat: a) 3'-aluke, joka vastaa sekvensseiltään vektorin sekvenssiä, joka sijaitsee vektorin cDNA-näytteen insertointikohdan vieressä, ja b) 5'-aluke, joka valitaan ryhmästä: i) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA 5 valmistettiin tätä alapoolia varten, ii) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-päästään lisätähteellä -N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T, ja iii) aluke, jota käytettiin syntetisoitaessa ensimmäisen juosteen cDNA tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-päästään kahdella lisätähteellä -N-N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T.

Silloin kun vektori on plasmidi pBC SK⁺, pilkottuna ClaI:llä ja NotI:llä, sopiva 3'-aluke on G-A-A-C-A-A-A-A-G-C-T-G-G-A-G-C-T-
15 C-C-A-C-C-G-C (SEQ ID NO: 4). Kun bakteriofagispesifinen promoottori on T3-promoottori, sopivilla 5'-alukkeilla on sekvenssi A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N (SEQ ID NO: 3), A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N-N (SEQ ID NO: 5), tai A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N-N-N (SEQ ID NO: 6).

20

PCR suoritetaan tyypillisesti kun läsnä on ³⁵S-dATP käyttämällä PCR-ohjelmana 15 sekuntia 94°C:ssa denaturointiin, 15 sekuntia 60°C:ssa liittämiseen ja 30 sekuntia 72°C:ssa syntetointiin Perkin-Elmer 9600 -laitteessa (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk,
25 CT). Liittämisvaiheen korkea lämpötila minimoi 5'-alukkeen ja sen 3'-pään artifaktuaalisen väärän alukkeistumisen ja edistää suurta kopioitumistarkkuutta.

Vaihtoehtoisesti PCR-amplifikaatio voidaan toteuttaa kun läsnä
30 on jotain ³²P-leimattua deoksiribonukleosiditrifosfaattia kuten [³²P]dCTP. Maksimaalisen resoluution kannalta on kuitenkin yleensä kuitenkin edullista käyttää ³²S-leimattua deoksiribonukleosiditrifosfaattia. Voidaan käyttää muitakin havainnointimenetelmiä, muun muassa ei-radioaktiivista leimaamista.

35

Näistä reaktiosarjoista saadaan 16, 64 ja 256 tuotteen poolit alukkeelle, joka on sama kuin aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin. Saadaan 64 tuotepoolia alukkeelle, joka jatkuu 3'-päässään ylimääräisellä tähteellä N, jossa N voi olla mikä tahansa neljästä nukleotidistä. Saadaan 256 tuotetta alukkeelle, joka jatkuu 3'-päässään kahdella ylimääräisellä tähteellä -N-N, jossa N voi taas olla mikä tahansa neljästä nukleotidistä.

10 Esillä olevan keksinnön mukaista menetelmää voidaan jatkaa käyttämällä pitempiä ryhmiä 5'-alukkeita, joita on jatkettu 3'-päästään lisänukleotideilla. Esimerkiksi aluke, jonka 3'-terminaali olisi -N-N-N-N-N johtaisi 1024 tuotteeseen.

15 J. Elektroforeesi

Polymeraasiketjureaktiolla vahvistetut fragmentit erotellaan sitten elektroforeettisesti esitysvyöhykkeiksi, jotka edustavat näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä.

20 PCR-vahvistettujen fragmenttien erotteluun käytettävät elektroforeettiset tekniikat ovat alalla tunnettuja, eikä ole tarpeen mainita niistä sen enempää tässä. Vastaavat tuotteet erotellaan denaturoiville DNA-sekvensointigeeleille ja visualisoidaan autoradiografian avulla. Tässä erityisesti kuvatussa vektorisysteemissä geelit ajetaan siten, että ensimmäiset 140 emäsparia ajetaan pohjastaan, koska vektorisukuiset sekvenssit lisäävät cDNA:iden pituutta 140 emäsparin verran. Tämä luku voi vaihdella, jos käytetään jotain toista vektorisysteemiä, ja sopivat elektroforeesiolosuhteet, niin että vektorisukuiset

30 sekvenssit ajetaan pohjalta, voidaan määrittää ajatellen kyseessä olevan vektorin sekvenssejä. Tyypillisesti kaikki reaktiot ajetaan eri denaturoiville geeleille, niin että käytetään vähintään kahta geeliä. On suositeltavaa suorittaa joukko reaktioita rinnan, esimerkiksi eri kudoksista, ja erotella

35 kaikki reaktiot käyttämällä samaa aluketta samalla geelillä. Samalle geelille voidaan erotella huomattava määrä reaktioita.

Tyypillisesti voidaan jopa kolmekymmentä reaktiota erotella samalle geelille ja suorittaa vertailu. Kuten jäljempänä esitetään, näin saadaan määritettyä kudosspesifisesti mRNA:ita.

5 Eroteltujen cDNA-lajien havainnointiin käytetään tavallisesti autoradiografiaa. Voidaan kuitenkin käyttää muitakin havainnointimenetelmiä, esimerkiksi fosforikuvausta tai fluoresenssia, joissain sovelluksissa niillä saatetaan päästä suurempaan herkkyyteen.

10

Kaavion mukaan kaikista mRNA-näytteistä tuotetut cDNA-kirjastot sisältävät kopioita 3'-päistä MspI:n distaalisimmasta kohdasta lähtö-RNA-näytteen kaikkien poly(A)⁺-mRNA:iden poly(A)-häntien alkuun suurin piirtein mRNA:iden suhteellisten lähtöpitoisuuksien mukaan. Koska kaikkien lajien inserttien molemmat päät ovat sekvensseiltään täsmällisesti määriteltäviä, ne ovat pituudeltaan yhtenäisiä ja ne pystytään myöhemmin visualisoimaan diskreetteinä vyöhykkeinä geelillä, huolimatta siitä, mikä on mRNA:n kudoslähde.

20

Kun tutkimiseen käytetään perättäisiä vaiheita pitenevin alukkein cDNA:t käyttäytyvät olennaisesti monivaiheisen PCR:n tapaan. Nämä vaiheet parantavat kontrollin laatua ja vähentävät taustaa, joka saattaisi muodostua kohdistamattomien cDNA:iden monistumisesta. Suositeltavassa toteutusmuodossa toinen käänteistranskriptasivaihe jakaa cRNA:n edelleen kuudeksitoista alapooliksi käyttäen aluketta, joka liittyy pBC SK⁺:sta johdettuun sekvenssiin, mutta jatkuu läpi ei-regeneroidun MspI-kohdan CGG:n ja käsittää insertin kaksi nukleotidia (-N-N).

30 Tässä vaiheessa lähtöpopulaation potentiaaliset 50000-100000 mRNA:ta erottuvat kuudeksitoista noin 3000-6000 jäsentä sisältäväksi alapooliksi. Seuraavan PCR-vaiheen sarjaiteroinnissa, joissa tuotteisiin insertoidaan autoradiografista visualisointia varten radioaktiivinen leima, nämä poolit erottuvat edelleen neljäksi tai kuudeksitoista alapooliksi kun käytetään

progressiivisesti toisiaan pitempiä 5'-alukkeita, jotka sisältävät kolme tai neljä insertin nukleotidia.

Edellyttämällä korkeassa lämpötilassa suoritettun 3'-pään sitoutumisessa suurta täsmällisyyttä käänteistranskriptaasivaiheessa -N-N-asemien kohdalla, ja sen jälkeen edellyttämällä taas tällaista suurta osumatarkkuutta -N-N-N tai -N-N-N-N -iteroinneissa, alukkeiden yhteen sopimattomuudesta -N-N -asemissa johtuva häviö saadaan vähenemään erittäin voimakkaasti.

10

Menetelmän vaiheet, jotka alkavat cDNA-preparaatin jakamisella kuudeksitoista alapooliksi ensimmäisen juosteen cDNA:n transkriptoinnilla kaikista alapoolista, voidaan suorittaa erikseen menetelmänä, jolla saadaan samanaikaisesti tunnistettua sekvenssispesifisesti mRNA:t, jotka vastaavat mRNA-populaation 3'-päitä edustavien antisense-cRNA-poolien jäseniä.

II. MENETELMÄN SOVELTAMINEN mRNA-MALLIEN ESITTÄMISEKSI

Edellä kuvatulla menetelmällä, jolla havaitaan mRNA-ekspressiomalleja kudoksessa ja erotellaan nämä mallit geelielektroforeesin avulla, on paljon käyttökohteita. Eräs sovellus on sen käyttö havaitsemaan mRNA-ekspressiomallin muutos kudoksessa, johon liittyy fysiologinen tai patologinen muutos. Yleisesti ottaen menetelmän vaiheet ovat:

25

1) otetaan ensimmäinen näyte kudoksesta, jossa fysiologisia tai patologisia muutoksia ei ole tapahtunut,

2) määritetään mRNA-ekspressiomalli ensimmäisestä kudoksenäytteestä suorittamalla edellä kuvatun menetelmän vaiheet mRNA-populaation 3'-päitä edustavien antisense-cRNA-poolien jäseniä vastaavien mRNA:iden samanaikaiseksi sekvenssispesifiseksi identifioimiseksi, ja luodaan ensimmäinen esitys ensimmäisessä näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavista vyöhykkeistä,

35

3) otetaan toinen näyte kudoksesta, jossa on tapahtunut fysiologinen tai patologinen muutos,

4) määritetään mRNA-ekspressiomalli toisesta kudoksenäytteestä suorittamalla edellä kuvatun menetelmän vaiheet mRNA-populaation 3'-päitä edustavien antisense-cRNA-poolien jäseniä vastavien mRNA:iden samanaikaiseksi sekvenssispesifiseksi identifiointiseksi, ja luodaan toinen esitys toisessa näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavista vyöhykkeistä,

10

5) verrataan ensimmäistä ja toista esitystä ja määritetään mikä vaikutus fysiologisella tai patologisella muutoksella on mRNA-ekspressiomalliin kudoksessa.

15 Vertailu tehdään tyypillisesti yhden geelin vierekkäisillä kaistoilla.

Kudos voi olla peräisin keskushermostosta. Erityisesti se voi olla johdettu keskushermostoon kuuluvasta rakenteesta, joita
 20 ovat verkkokalvo, aivokuori, hajukäämi, talamus, hypothalamus, aivolisäkkeen etulohko ja takalohko, hippokampus, nucleus accumbens, amygdala striatum, pikkuaivot, aivorunko, suprakiasmaattinen nukleus ja selkäydin. Kun kudos on keskushermostopäistä, mainittu fysiologinen tai patologinen muutos voi olla
 25 Alzheimerin tauti, Parkinsonin tauti, iskemia, alkoholiriippuvuus, huumeriippuvuus, skitsofrenia, amyotrofinen lateraaliskleroosi, multippeli skleroosi, depressio tai bipolaarinen maanis-depressiivinen häiriö. Esillä olevan keksinnön mukaista menetelmää voidaan vaihtoehtoisesti käyttää myös tutkittaessa
 30 sirkadiaanisia vaihteluita, ikääntymistä tai pitkäaikaista potentiaatiota, jälkimmäisen vaikuttaessa hippokampukseen. Lisäksi, erityisesti keskushermoston tietyissä rakenteissa ilmeneviin mRNA:ihin liittyen, menetelmää voidaan käyttää tutkittaessa aivoalueita, joiden tiedetään osallistuvan moni-
 35 mutkaisiin toimintoihin, esimerkiksi oppimiseen ja muistamiseen, tunteisiin, huumausaineriippuvuuteen, glutamaattineuro-

toksisuuteen, syömiskäyttäytymiseen, haistamiseen, virusinfektioihin, näkemiseen sekä liikuntahäiriöihin.

Tätä menetelmää voidaan käyttää myös yksilölle lääkeaineiden ja/tai toksiinien antamisen vaikutusten tutkimiseen vertailemalla kudoksen mRNA-mallia ennen lääkeaineen tai toksiinin antoa ja sen jälkeen. Voidaan myös tutkia sähköshokkiterapian vaikutusta.

10 Vaihtoehtoisesti kudokseksi voi olla elimestä tai elinjärjestelmästä, joita ovat sydän- ja verisuonijärjestelmä, hengitysjärjestelmä, ruoansulatusjärjestelmä, ääreishermostojärjestelmä, maksa, munuaiset, luuston lihakset ja lisääntymisjärjestelmä, taikka mistä tahansa muusta elimistön elimestä tai elinjärjestelmästä. mRNA-malleja voidaan tutkia esimerkiksi maksasta, sydäimestä, munuaisista tai luuston lihaksesta. Lisäksi mistä tahansa kudoksesta voidaan ottaa näytteitä eri aikoina, niin että saadaan selville sirkadiaaninen mRNA-ekspression vaikutus. Tämän menetelmän avulla saadaan siis selvitettyä tiettyjen mRNA-lajien osuus tietyistä toiminnan tai toimintahäiriön mallista.

mRNA:iden 3'-päitä edustava antisense-cDNA-pooli voidaan luoda edellä ensimmäisessä osassa kuvatun menetelmän vaiheina 1)-4).

25 Esillä olevan keksinnön mRNA-erottelumenetelmää voidaan samoin käyttää osana menetelmää, jolla tutkitaan lääkkeen sivuvaikutuksia. Yleisesti ottaen tällaisessa menetelmässä:

1) otetaan ensimmäinen näyte kudoksesta, jota on käsitelty yhdisteellä, jonka fysiologinen vaikutus tunnetaan,

2) määritetään mRNA-ekspressiomalli ensimmäisestä kudoksenäytteestä suorittamalla edellä kuvatun menetelmän vaiheet mRNA-populaation 3'-päitä edustavien antisense-cRNA-poolien jäseniä vastaavien mRNA:iden samanaikaiseksi sekvenssispesifiseksi identifioimiseksi, ja luodaan ensimmäinen esitys ensimmäisessä

näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavista vyöhykkeistä,

3) otetaan toinen kudoksenäyte elimestä, jota on käsitelty lääkeaineella, jonka sivuvaikutusta tutkitaan,

4) määritetään mRNA-ekspressiomalli toisesta kudoksenäytteestä suorittamalla edellä kuvatun menetelmän vaiheet mRNA-populaation 3'-päitä edustavien antisense-cRNA-poolien jäseniä vastavien mRNA:iden samanaikaiseksi sekvenssispesifiseksi identifi-

5) verrataan ensimmäistä ja toista esitystä, niin että saadaan havaittua sellaisten mRNA-lajien läsnäolo, joiden ekspressioon tunnetulla yhdisteellä ei ole ollut vaikutusta, mutta johon tutkittava lääkeaine on vaikuttanut, jolloin selviää mikä on tutkittavan lääkeaineen vaikutuksen ja tunnetun yhdisteen vaikutuksen ero ja siis mikä on sivuvaikutus.

20

Erityisesti tätä menetelmää voidaan käyttää lääkeaineilla, jotka vaikuttavat keskushermostoon, niitä ovat esimerkiksi antidepressiivit, neuroleptit, rauhoittavat lääkkeet, kouristuksia estävät lääkkeet, monoamiinioksidaasi-inhibiittorit ja stimulantit. Tätä menetelmää voidaan itse asiassa käyttää mille tahansa lääkeaineelle, joka saattaa vaikuttaa mRNA-ekspressioon tietyssä kudoksessa. Voidaan tutkia esimerkiksi mikä on vaikutus mRNA-ekspressioon sellaisilla aineilla kuin Parkinsonin taudin lääkkeet, luuston lihaksiston relaksantit, anal-

35

Eräs esillä olevan keksinnön käyttökohde on aikaansaada esille saatujen mRNA-lajien 3'-pään sekvenssi. Tavallisesti sekvenssin aikaansaamiseksi käytettävän menetelmän vaiheet ovat:

- 5 1) eluoidaan vähintään yksi mRNA:ta vastaava cDNA elektroferogrammista, jossa näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavat vyöhykkeet on esitetty,
- 2) monistetaan eluoitu cDNA polymeraasiketjureaktiolla,
- 10 3) kloonataan monistettu cDNA plasmidiin,
- 4) tuotetaan kloonattua DNA:ta vastaavaa DNA plasmidista, ja
- 15 5) sekvensoidaan kloonattu cDNA.

Ekskisoitu cDNA voidaan monistaa PCR-vaiheessa aiemmin käytetyillä alukkeilla. cDNA voidaan sitten kloonata PCR II:een (Invitrogen, San Diego, CA) TA-kloonauksella ja ligaatiolla
20 vektoriin. Sitten voidaan tuottaa DNA:sta miniprep-valmisteita standarditekniikoin subklooneista ja osasta, joka on denaturoitu ja jaettu kahteen alikvoottiin automaattista sekvensointia varten Sangerin dideoksiketjuterminaatiomenetelmällä. Automaattiseen sekvensointiin voidaan käyttää kaupallisesti saatavilla olevaa sekvensaattoria, esimerkiksi ABI-sekvensaattoria.
25 Näin saadaan määritettyä komplementaariset sekvenssit useimmille tutkituista cDNA:ista, pituusalue 50-500 bp, koko fragmentin läpi.

30 Näitä partiaalisia sekvenssejä voidaan sitten käyttää GenBankin kaltaisten geenitietokantojen läpi käymiseen sekvenssi-identtisyyksien ja samankaltaisuuksien tunnistamiseen esimerkiksi sellaisten ohjelmien kuin BLASTN tai BLASTX avulla. Koska
tällä menetelmällä muodostuu sekvenssejä vain mRNA:iden 3'-
35 päistä, on odotettavissa, että avoimia lukukehyksiä (ORF) tulee vastaan vain satunnaisesti, sillä aivo-mRNA:iden 3'-translatoi-

tumattomien alueiden pituus on keskimäärin yli 1300 nukleotidia (J G Sutcliffe, supra). Potentiaalisista ORF:stä voidaan tutkia tunnusmerkkiproteiinimotiiveja.

5 Saatuja cDNA-sekvenssejä voidaan sitten käyttää alukeparien luomiseen semikvantitatiivista PCR:ää varten kudosekspressio-
mallien vahvistamiseksi. Valittuja tuotteita voidaan käyttää
myös eristämään täysimittaisia cDNA-klooneja jatkoanalyysyä
varten. Alukepareja voidaan käyttää genomisen DNA:n SSCP-PCR-
10 monistukseen (Single Strand Confirmation Polymorphism-PCR).
Tällainen amplifikaatio voidaan toteuttaa esimerkiksi inter-
spesifisten takaristeytettyjen hiirten panelista, niin että
saadaan määritettyä jokaisen PCR-tuotteen linkki jo linkitet-
tyihin markkereihin. Tällä tavoin voidaan saada kartoitettua
15 uusia geenejä ja saadaan lähde kartoitettujen hiirimutantti-
lokusten ja homologisten ihmisen tautigeenien ehdokkaiden
identifiointiin. SSCP-PCR:ssä käytetään synteettisiä oligo-
nukleotidialukkeita, jotka monistavat PCR:n kautta pienen (100-
200 bp) segmentin. (M Orita et al, "Detection of Polymorphisms
20 of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Strand Conforma-
tion Polymorphisms", Proc Natl Acad Sci USA 86:2766-2770, 1989,
M Orita et al, "Rapid and Sensitive Detection of Point Muta-
tions in DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reac-
tion", Genomics 5:874-879, 1989).

25

Ekskisooidut cDNA-fragmentit voidaan leimata alalla tunnetuin
tekniikoin radioaktiivisesti ja varmistaa mRNA-jakauma
Northern-hybridisaatiolla tai in situ -hybridisaatiolla ja
selvittää vastaavan täysimittaisen mRNA:n koko ja prevalenssi.
30 Koetinta voidaan käyttää myös cDNA-kirjaston tutkimiseen, niin
että saadaan eristettyä klooneja luotettavampaa ja täydellisem-
pää sekvenssinmäärittystä varten. Leimattuja koettimia voidaan
käyttää myös muihin tarkoituksiin, esimerkiksi in vitro -eks-
pression tutkimiseen.

35

5

10

15 3) alukepaneli, joka käsittää 256 aluketta, joiden sekvenssi on
A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N-N-N (SEQ ID NO: 6), jossa N
on yksi neljästä deoksiribonukleotidistä, A, C, G tai T,

20 A-A-C-T-G-G-A-A-G-A-A-T-T-C-G-C-G-G-C-C-G-C-A-G-G-A-A-T-T-T-T-
T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-V-N (SEQ ID NO: 2), jossa V on
deoksiribonukleotidi, joka valitaan ryhmästä A, C ja G, ja N on
deoksiribonukleotidi, joka valitaan ryhmästä A, C, G ja T,

35

Keksintöä kuvataan seuraavan esimerkin avulla. Esimerkki on vain kuvaava, sitä ei ole tarkoitettu keksintöä rajoittavaksi.

ESIMERKKIAivo-mRNA:iden erottelu käyttämällä eri pitoisuuksia tunnettuja aivo-mRNA-sekvenssejä vastaavia alukkeita

Esillä olevan keksinnön tehokkuuden demonstroimiseksi sitä sovellettiin käyttämällä 5'-alukkeita, jotka oli 3'-päästään jatkettu kahdella nukleotidilla ja jotka vastasivat tunnettujen aivo-mRNA:iden sekvenssejä, eri pitoisuuksin, esimerkiksi neuronispesifistä enolaasia (NSE) karkeasti ottaen pitoisuudella 0,5 % (S Forss-Petter et al, "Neuron-Specific Enolase: Complete Structure of Rat mRNA, Multiple Transcriptional Start Sites and Evidence for Translational Control", J Neurosci Res 16:141-156, 1986), RC3:a noin 0,01 % ja somatostatiinia 0,001 % (G H Travis & J G Sutcliffe, "Phenol Emulsion-Enhanced DNA-Driven Subtractive cDNA Cloning: Isolation of Low-Abundance Monkey Cortex-Specific mRNAs", Proc Natl Acad Sci USA 85:1696-1700, 1988), vertaamaan cDNA:ita, jotka on valmistettu kirjastoista, jotka on koottu aivokuori-, striatum-, pikkuaivo- ja maksa-RNA:ista edellä kuvattuun tapaan. Mistä tahansa tietystä RNA-näytteestä saatiin 50-100 vyöhykettä lyhyillä autoradiografia-altistuksilla. Vyöhykkeet olivat täysin toistettavissa duplikaattinäytteinä.

Noin kaksi kolmasosaa vyöhykkeistä oli erilaisia aivo- ja maksanäytteiden osalta, mukaan lukien tunnettuja oikean pituisia aivospesifisiä mRNA:ita vastaavat vyöhykkeet. Tämä varmistettiin ekskisoimalla vyöhykkeet geeleistä ja suorittamalla amplifikaatio ja sekvensointi. Jonkin tietyn alukkeen aivojen eri alueilta otettujen näytteiden vyöhykkeiden välillä oli vain pientä eroa, vaikka vyöhykkeiden intensiteetit vaihtelivat jonkin verran.

NSE:tä vastaava vyöhyke, suhteellisen vallitseva mRNA-laji, esiintyi kaikissa aivonäytteissä, muttei maksanäytteissä, eikä sitä ollut havaittavissa kun joku kolmesta viimeisestä yksittäisestä nukleotidista neljän emäksen 3'-terminaalisekvenssissä -N-N-N-N muutettiin synteettisessä 5'-alukkeessa. Kun ensimmä-

mäinen N vaihdettiin, havaittiin vähäistä vuotoa. Tunnetuilla lajeilla autoradiografiasignaalin intensiteetti oli karkeasti ottaen verrannollinen mRNA-prevanlenssiin, ja mRNA:t joiden pitoisuus oli yksi osa 10^5 tai sitä enemmän poly(A)⁺-RNA:sta
 5 olivat tavalliseen tapaan näkyviä, ajoittaisena ongelmana se, että intensiteetiltään suurempia vyöhykkeitä kohti migratoituvat cDNA:t muuttuivat epäselviksi.

Otos tiedoista on esitetty kuviossa 2. Vasemmalla viidellä
 10 geelikaistalla korteksi-cRNA oli substraattina käänteistrans-
 kiptaasille alukkeella A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N (SEQ ID NO: 3), jossa -N-N on -C-T (aluke 118), -G-T (aluke 116) tai -C-G (aluke 106). PCR-monistuksessa käytettiin alukkeita A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N-N-N (SEQ ID NO: 6), jossa -N-N-
 15 N-N on -C-T-A-C (aluke 128), -C-T-G-A (aluke 127), -C-T-G-C (aluke 111), -G-T-G-C (aluke 134) ja -C-G-G-C (aluke 130), kuten kuviossa 2 on esitetty. Alukkeet 118 ja 111 täsmäävät kahden ja neljän nukleotidin sekvenssien kanssa alavirtaan MspI-kohdasta, joka sijaitsee lähinnä NSE-mRNA-sekvenssin 3'-
 20 päätä. Auke 127 ei täsmää NSE-sekvenssin kanssa viimeisen (-1) aseman osalta, aluke 128 toiseksi viimeisessä asemassa (-2), alukkeet 106 ja 130 asemassa -3, ja alukkeet 116 ja 134 asemassa -4. Auke 134 jatkui kaksi nukleotidia pidemmälle ylävirtaan kuin muut tässä esitetyt, sillä sen PCR-tuotteet
 25 ovat kaksi nukleotidia pitempiä suhteessa muiden kaistojen tuotteisiin.

Kaikilla kaistoilla nähdään 50-100 vyöhykettä 15 minuutin altistuksen jälkeen merkittäessä tuotteet ³²P-dCTP radioaktiivisella leimalla. Nämä vyöhykkeet olivat selvästi erilaiset
 30 jokaisella alukeparilla, sillä poikkeuksella, että vyöhykkeet 118-111 näkyivät heikommin kaistalla 116-134 ollen kaksi nukleotidia jäljessä ja osoittaen vuotoa asemassa neljä.

35 Alukeryhmää 118-111 käyettiin uudestaan erillisille korteksi- (CX) ja maksa- (LV) cRNA:ille. Korteksimalli oli identtinen

kaistan 118-111 kanssa osoittaen onnistunutta toistamista. Maksamalli erosi CX:stä useimpien lajien kohdalla. Asteriski osoittaa NSE-tuotteen aseman. Analogiset alukeryhmät havaittiin RC3 ja somatostatiini (SOMAT) -tuotteiden kohdalla (asteriskit) CX-, muttei LV-kaistoilla. Tietyn PCR-tuotteen suhteellisia vyöhykkeiden intensiteettejä voidaan verrata kais-
 5 toihin käyttämällä samaa alukeryhmää, muttei eri ryhmiä.

Tämä esimerkki demonstroi esillä olevan keksinnön mukaisen
 10 menetelmän toteutuskelpoisuutta ja toistettavuutta ja sen kykyä erotella erilaisia mRNA:ita. Se myöskin demonstroi, että jonkun tietyn mRNA-lajin prevalenssi voidaan arvioida autordiografiasignaalin intensiteetin perusteella. Menetelmän avulla saadaan havaittua samanaikaisesti läsnä olevat mRNA:t,
 15 joiden prevalenssi on suuri, sekä mRNA:t, joiden prevalenssi on pieni.

ESILLÄ OLEVAN KEKSINNÖN EDUT

Esillä olevaa menetelmää voidaan käyttää geenien, joiden eks-
 20 pressio muuttuu neuronaalisen kehityksen aikana, identifioimiseksi plastisuus- ja regeneraatiomalleilla, vasteena kemiallisille tai elektrofysiologisille altistuksille kuten neurotoksisuudelle tai pitkäaikaiselle altistumiselle, sekä vasteena käyttäymiseen liittyville, viraalisille, huumausaine/alkoholi-
 25 paradigmoille, solukuoleman eli apoptoosin ilmenemiselle, ikääntymiselle, patologisille tiloille ja muille tiloille, jotka vaikuttavat mRNA-ekspressioon. Vaikka menetelmä on erityisen käyttökelpoinen geeniekspression tutkimiseksi keskushermostossa, se ei rajoitu hermojärjestelmään, vaan sitä
 30 voidaan käyttää mRNA-ekspression tutkimiseen missä tahansa kudoksessa. Menetelmällä saadaan visualisoitua lähes kaikki kudoksen ekspressoimat mRNA:t erillisinä vyöhykkeinä geelillä intensiteetin vastatessa karkeasti ottaen mRNA:n pitoisuutta.

35 Menetelmän etuja on, ettei se riipu potentiaalisesti ei toistettavissa olevasta täsmäämättömyyssatunnaisalukkeistamisesta,

joten sillä päästään erittäin suureen tarkkuuteen ja toistettavuuteen. Lisäksi se vähentää eri alukkeistusvaiheissa muodostuvien saman mRNA-lajin kilpailevien erimittaisten vyöhykkeiden läsnäolosta johtuvia vaikeuksia ja epätarkkuutta. Menetelmis-

5 sä, joissa käytetään satunnaisalukkeistamista tällaisia kilpailevia vyöhykkeitä saattaa ilmetä, ja todennäköisemmin ne ilmenevät mRNA-lajeilla, joiden prevalenssi on suuri. Esillä olevassa menetelmällä tällaiset kilpailevat vyöhykkeet pysytään välttämään.

10

Menetelmällä saadaan sekvenssispesifistä tietoa mRNA-lajeista, ja sitä voidaan käyttää alukkeiden, koettimien ja muiden spesifisten sekvenssien luomiseen.

15 Vaikka esillä olevaa keksintöä on kuvattu huomattavan yksityiskohtaisesti tiettyjen suositeltavien versioiden valossa, muitakin versiot ovat mahdollisia. Oheisten patenttivaatimusten ajatus ja suojapiiri eivät siis rajoitu tässä esitettyihin suositeltaviin versioihin.

SEKVENSSILISTAUS

(1) YLEISTÄ TIETOA:

(i) HAKIJA:

(A) NIMI: The Scripps Research Institute
(B) KATU: 10666 North Torrey Pines Road
(C) KAUPUNKI: La Jolla
(D) OSAVALTIO: CA
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 92037
(G) PUHELIN: (619) 455-9100
(H) TELEFAX: (619) 554-6612

(A) NIMI: ERLANDER, Mark G.
(B) KATU: 1352 Via Terrassa
(C) KAUPUNKI: Encinitas
(D) OSAVALTIO: CA
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 92024

(A) NIMI: SUTCLIFFE, Gregor J.
(B) KATU: 2253 Via Tiempo
(C) KAUPUNKI: Cardiff
(D) OSAVALTIO: CA
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 92007

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Menetelmä erikseen ekspressoituvien mRNA:iden identifioimiseksi samanaikaisesti sekä suhteellisten pitoisuuksien mittaamiseksi

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 6

(iv) KONEKOODIMUOTO

(A) VÄLINETYYPPI: Disketti, 5 tuumaa,

- (B) TIETOKONE: IBM PC -yhteensopiva
- (C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS/DOS
- (D) OHJELMISTO: PatenIn Release #1.0, Version # 1.25

- (vi) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT:
 - (A) HAKEMUSNUMERO: PCT US94/
 - (B) JÄTTÖPÄIVÄ: 14.11.1994
 - (C) LUOKITUS:

- (vii) ETUOIKEUSHAKEMUKSEN TIEDOT:
 - (A) HAKEMUSNUMERO: US 08/152482
 - (B) JÄTTÖPÄIVÄ: 12.11.1993
 - (C) LUOKITUS: 435

(2) SEKVENSSIN ID NO: 1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 14 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(vi) ALKUPERÄ:

- (A) ORGANISMI: synteettinen aluke

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO: 1

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 47 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(VI) ALKUPERÄ:

- (A) ORGANISMI: synteettinen alue

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:2

AACTGGAAGA ATTCGCGGCC GCAGGAATTT TTTTTTTTTT TTTTTVN 47

(2) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 18 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(VI) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: synteettinen aluke

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:3

AGGTCGACGG TATCGGNN

18

(2) SEKVENSSIN ID NO:4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 24 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(VI) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: synteettinen aluke

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:4

GAACAAAAGC TGGAGCTCCA CCGC

24

(2) SEKVENSSIN ID NO:5 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 19 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(VI) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: synteettinen aluke

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:5

AGGTCGACGG TATCGGNNN

19

(2) SEKVENSSIN ID NO:6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 20 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(VI) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: synteettinen aluke

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:6

AGGTCGACGG TATCGGNNN

20

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä mRNA:iden samanaikaiseksi sekvenssispesifiseksi identifioimiseksi mRNA-populaatiosta, t u n n e t t u siitä, että sen vaiheita ovat:

5

a) valmistetaan kaksijuosteisia cDNA:ita mRNA-populaatiosta käyttämällä 12 ankkurialukkeen seosta, jokaisessa ankkurialukkeessa: i) 7-40 T-tähteen alue, ii) pilkkoutumiskohta, jossa käytetään yli kuusi emästä tunnistavaa restriktioendonukleaasia
 10 pilkkoutumiskohdan sijaitessa T-tähteen alueen 5'-puolella, iii) 4-40 nukleotidin täytesegmetti, joka sijaitsee ensimmäisen restriktioendonukleaasin pilkkomiskohdasta 5'-puolella, ja iv) kaikkien ankkurialukkeiden 3'-päässä vaiheistustähteet -V-N, jossa V on deoksiribonukleotidi valittuna ryhmästä A, C ja G,
 15 ja N on deoksiribonukleotidi valittuna ryhmästä A, C, G ja T, seoksen sisältäessä ankkurialukkeita, joihin sisältyvät kaikki V:n ja N:n mahdollisuudet,

b) tuotetaan kloonattuja inserttejä sopivasta isäntäsolusta,
 20 joka on transformoitu vektorilla vektorin sisältäessä cDNA-näytteen, joka on pilkottu toisella restriktioendonukleaasilla, ja vektoriin on insertoitu ensimmäinen restriktioendonukleaasi pilkotun cDNA-näytteen ollessa insertoitu vektoriin antisense-suunnassa suhteessa vektorissa olevaan bakteriofagispesifiseen
 25 promoottoriin toisen restriktioendonukleaasin tunnistuessa neljän nukleotidin sekvenssin ja ensimmäisen restriktioendonukleaasin aikaansaadessa pilkkoutumisen ankkurialukeseoksen jokaisen jäsenen yhdessä kohdassa,

30 c) luodaan kloonatuista inserteistä linearisoituja fragmentteja suorittamalla hajotus vähintään yhdellä restriktioendonukleaasilla, joka on erilainen kuin ensimmäinen ja toinen restriktioendonukleaasi,

35 d) luodaan antisense-cRNA-transkripteista cRNA-valmiste inkuboimalla linearisoituja fragmentteja bakteriofagispesifisellä

RNA-polymeraasilla, joka pystyy käynnistämään transkription bakteriofagispesifisestä promoottorista,

e) jaetaan cRNA-valmiste kuudeksitoista alapooliksi, ja tran-
 5 skriptoidaan ensimmäisen juosteen cDNA jokaisesta alapoolista käyttämällä lämpöstabiilia käänteistranskriptiaasia ja yhtä kuudestatoista alukkeesta, joissa kaikissa on 5'- ja 3'-terminaali sanotun 3'-terminaalin ollessa -N-N, jossa N on yksi neljästä deoksiribonukleotidista A, C, G tai T, ja sanottu 3'-
 10 terminaali on komplementaarinen cRNA:n kahdelle kahdelle nukleotidille alavirtaan lähinnä cRNA:n sekvenssin yhden säikeen 3'-päättä sijaitsevasta toisen restriktioendonukleaasin kohdasta, alukkeen ollessa vähintään 15 nukleotidin pituinen, jossa sanottu 5'-terminaali on komplementaarinen toisen restriktio-
 15 endonukleaasikohdan yli jatkuvalle vektorisekvenssin yhdelle säikeelle, ja kaikkiin alapooleihin käytetään eri aluketta,

f) käytetään kaikkien kuudentoista alapoolin transkriptio-
 tuotetta templaattina polymeraasiketjureaktiossa 3'-alukkeel-
 20 la, joka on komplementaarinen vektorin yhdelle säikeelle, joka sijaitsee vektorin cDNA-näytteen insertointikohdan vieressä, ja 5'-aluketta, joka valitaan ryhmästä: i) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä alapoolia varten, ii) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä
 25 alapoolia varten jatkettuna 3'-terminaalistaan lisätähteellä -N, jossa N voi olla joko A, C G tai T, ja iii) aluke, jota käytettiin syntetetoitaessa ensimmäisen juosteen cDNA tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-terminaalistaan kahdella lisätähteellä -N-N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T, ja iv) aluke,
 30 jota käytettiin syntetetoitaessa ensimmäisen juosteen cDNA tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-terminaalistaan kolmella lisätähteellä -N-N-N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T, polymeraasiketjureaktion avulla monistettujen fragmenttien tuottamiseksi, ja

g) erotellaan polymeraasiketjureaktion avulla monistetut fragmentit elektroforeettisesti esittämään näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavat vyöhykkeet.

5 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että kaikissa ankkurialukkeissa on T-tähdealueella 18 T-
tähdettä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
10 siitä, että ankkurialukkeiden täytesegmentti on 14 tähteen
pituinen.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että täytesegmentin sekvenssi on A-A-C-T-G-G-A-A-G-A-A-
15 T-T-C (SEQ ID NO: 1).

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yli kuusi emästä tunnistavalla restriktioendonukleasilla pilkottava kohta on NotI-pilkkoutumiskohta.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ankkurialukkeiden sekvenssi on A-A-C-T-G-G-A-A-G-A-A-T-T-C-G-C-G-G-C-C-G-C-A-G-G-A-A-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-V-N (SEQ ID NO: 2).

25

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteriofagispesifinen promoottori valitaan ryhmästä T3-promoottori ja T7-promoottori.

30 8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että bakteriofagispesifinen promoottori on T3-promootto-
ri.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
35 siitä, että cDNA:n cRNA:sta transkriptoinnin alukkeistamiseen

käytettävien kuudentoista alukkeen sekvenssi on A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N (SEQ ID NO: 3).

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
5 siitä, että vektori on plasmidi pBC SK⁺ pilkottuna ClaI:llä ja NotI:llä ja vaiheen f) 3'-aluke on G-A-A-C-A-A-A-A-G-C-T-G-G-A-G-C-T-C-C-A-C-C-G-C (SEQ ID NO: 4).

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
10 siitä, että toinen neljän nukleotidin sekvenssin tunnistava restriktioendonukleaasi on MspI.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
15 siitä, että toinen neljän nukleotidin sekvenssin tunnistava restriktioendonukleaasi valitaan ryhmästä TaqI ja HinPII.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että vain yhdessä kohdassa ankkurialukeseoksista pilkko-
va restriktioendonukleaasi on NotI.
20

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että vaihe, jossa luodaan kloonattujen inserttien li-
nearisoituja fragmentteja käsittää seuraavat kohdat:

25 i) jaetaan insertin sisältämä vektori kahdeksi fraktioksi,
ensimmäinen fraktio pilkottuna restriktioendonukleaasilla XhoI
ja toinen fraktio pilkottuna restriktioendonukleaasilla SalI,

ii) yhdistetään ensimmäinen ja toinen fraktio pilkkomisen
30 jälkeen,

iii) jaetaan yhdistetyt fraktiot kolmeen osaan ja pilkotaan
ensimmäinen kolmannes restriktioendonukleaasilla HindIII,
toinen kolmannes restriktioendonukleaasilla BamHI ja kolmas
35 kolmannes restriktioendonukleaasilla EcoRI, ja

iv) yhdistetään kolmasosat hajottamisen jälkeen, niin että saadaan linearisoitujen fragmenttien populaatio, josta noin yksi kuudesosa vastaa pilkkoutumistuotetta kaikilla mahdollisilla vaihtoehtoina olevilla entsyymiyhdistemillä.

5

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mRNA-populaatio on rikastettu polyadenyloiduille mRNA-lajeille.

10 16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että elektroforeesin jälkeen esiin saatavien vyöhykkeiden intensiteetti on suurin piirtein verrannollinen mRNA:-iden esiintymisrunsautteen alkuperäisseoksen vyöhykkeissä.

15 17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä on lisäksi vaihe, jossa määritetään alkuperäisseoksen jokaisen mRNA:n suhteellinen esiintymisrunsaus tämän mRNA:n vyöhykkeen intensiteetistä elektroforeesin jälkeen.

20

18. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaihe, jossa erotellaan polymeraasiketjureaktiolla monistetut fragmentit elektroforeettisesti, käsittää fragmenttien elektroforesoinnin vähintään kahdelle geelille.

25

19. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sopiva isäntäsolu on Escherichia coli.

20. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
30 siitä, että siinä on lisäksi vaiheet:

h) eluoidaan vähintään yksi mRNA:ta vastaava cDNA elektroferogrammista, jossa näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavat vyöhykkeet ovat esitettynä,

35

i) monistetaan eluoitu cDNA polymeraasiketjureaktiolla,

j) kloonataan monistettu cDNA plasmidiin,

k) tuotetaan kloonattua DNA:ta vastaavaa DNA plasmidista, ja

5 l) sekvensoidaan kloonattu cDNA.

21. Menetelmä mRNA:iden samanaikaiseksi sekvenssispesifiseksi identifioimiseksi mRNA-populaatiosta, t u n n e t t u siitä, että sen vaiheet ovat:

10

a) eristetään mRNA-populaatio

b) valmistetaan kaksisäikeisiä cDNA:ita mRNA-populaatiosta käyttämällä seoksena 12 ankkurialuketta, joiden sekvenssi on

15 A-A-C-T-G-G-A-A-G-A-A-T-T-C-G-C-G-G-C-C-G-C-A-G-G-A-A-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-V-N (SEQ ID NO: 2), jossa V on deoksiribonukleotidi valittuna ryhmästä A, C ja G, ja N on deoksiribonukleotidi valittuna ryhmästä A, C, G ja T, seoksen sisältäessä ankkurialukkeet, joihin sisältyvät kaikki V:n ja
20 N:n mahdollisuudet, cDNA-näytteen luomiseksi,

c) cDNA-näyte pilkotaan kahdella restriktioendonukleaaasilla, ensimmäinen restriktioendonukleaaasi on MspI ja toinen restriktioendonukleaaasi NotI,

25

d) insertoidaan ensimmäisellä ja toisella restriktioendonukleaaasilla pilkottu cDNA-näyte insertoidaan vektoriin, pilkottu cDNA insertoituna suunnassa, joka on antisense-suuntainen suhteessa vektorin T3-promoottoriin vektorin ollessa plasmidi
30 pBC SK⁺, joka on pilkottu ClaI:llä ja NotI:llä.

e) transformoidaan Escherichia coli vektorilla, johon pilkottu cDNA on insertoitu kloonattujen inserttien luomiseksi,

35 f) luodaan kloonattujen inserttien linearisoituja fragmentteja suorittamalla hajotus vähintään yhdellä resktriktioendonukleaa-

silla, joka on erilainen kuin ensimmäinen ja toinen restriktio-
endonukleaasi,

g) luodaan cRNA-valmiste antisense-cRNA-transkripteistä inku-
5 boimalla linearisoituja fragmentteja T3-RNA-polymeraasilla,
joka pystyy käynnistämään transkriptoitumisen T3-spesifisestä
promoottorista,

h) jaetaan cRNA-valmiste kuudeksitoista alapooliksi, ja tran-
10 skriptoidaan ensimmäisen juosteen cDNA jokaisesta alapoolista
käyttämällä lämpöstabiilia käänteistranskriptaasia ja yhtä
kuudestatoista alukkeesta A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N
(SEQ ID NO: 3), jossa N on yksi neljästä deoksiribonukleotidis-
ta A, C, G, ja T, kaikissa alapooleissa käytetään eri aluketta,
15

i) käytetään kaikkien kuudentoista alapoolin transkrip-
tiotuotetta templaattina polymeraasiketjureaktiossa, jossa
käytetään 3'-aluketta G-A-A-C-A-A-A-A-G-C-T-G-G-A-G-C-T-C-C-A-
C-C-G-C (SEQ ID NO: 4) ja 5'-aluketta, joka valitaan ryhmästä:
20 1) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä
alapoolia varten, 2) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA
valmistettiin tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-terminaalis-
taan lisätähteellä -N, jossa N voi olla joko A, C G tai T, ja
3) aluke, jota käytettiin syntetoitaessa ensimmäisen juosteen
25 cDNA tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-terminaalistaan kah-
della lisätähteellä -N-N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T,
ja 4) aluke, jota käytettiin syntetoitaessa ensimmäisen juos-
teen cDNA tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-terminaalistaan
kolmella lisätähteellä -N-N-N, jossa N voi olla joko A, C, G
30 tai T, polymeraasiketjureaktion avulla monistettujen fragment-
tien tuottamiseksi, ja

j) erotellaan polymeraasiketjureaktiolla monistetut fragmentit
elektroforeettisesti esittämään näytteessä läsnä olevien mRNA:-
35 iden 3'-päitä edustavat vyöhykkeet.

22. Menetelmä, jolla identifioidaan samanaikaisesti sekvenssispesifisesti mRNA:ita, jotka vastaavat antisense-cRNA-poolin jäseniä edustaen mRNA-populaation 3'-päitä, antisense-cRNA-pooliin kuuluvien antisense-cRNA:iden päättyessä 5'-päässään
- 5 bakteriofagispesifisen vektorin yhdelle säikeelle komplementaariseen alukesekvenssiin ja 3'-päässään vektorin yhdelle säikeelle komplementaariseen sekvenssiin menetelmän ollessa t u n n e t t u siitä, että siinä:
- 10 a) jaetaan antisense-cRNA-poolin jäsenet kuudeksitoista alapooliksi ja transkriptoidaan ensimmäisen juosteen cDNA jokaisesta alapoolista käyttämällä lämpöstabiilia käänteistranskriptaasia ja yhtä kuudestatoista alukkeesta, joissa kaikissa on 5'- ja 3'-terminaali sanotun 3'-terminaalin ollessa -N-N, jossa N on
- 15 yksi neljästä deoksiribonukleotidista A, C, G tai T, ja sanottu 3'-terminaali on komplementaarinen cRNA:n kahdelle kahdelle nukleotidille alavirtaan lähinnä cRNA:n sekvenssin yhden säikeen 3'-päästä sijaitsevasta toisen restriktioendonukleaasin kohdasta alukkeen ollessa vähintään 15 nukleotidin pituinen, ja
- 20 sanottu 5'-terminaali on komplementaarinen toisen restriktioendonukleaasikohdan yli jatkuvalle vektorisekvenssin yhdelle säikeelle, ja kaikkiin alapooleihin käytetään eri aluketta,
- b) käytetään kaikkien kuudentoista alapoolin transkriptiotuotetta templaattina polymeraasiketjureaktiossa, jossa käytetään 3'-aluketta, joka on komplementaarinen vektorin yhdelle säikeelle, joka sijaitsee vektorin cDNA-näytteen insertointikohdan vieressä, ja 5'-aluketta, joka valitaan ryhmästä: i) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä
- 30 alapoolia varten, ii) aluke, josta ensimmäisen juosteen cDNA valmistettiin tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-terminaalistaan lisätähteellä -N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T, ja iii) aluke, jota käytettiin syntetisoitaessa ensimmäisen juosteen cDNA tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-terminaalistaan kah-
- 35 della lisätähteellä -N-N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T, ja iv) aluke, jota käytettiin syntetisoitaessa ensimmäisen juos-

teen cDNA tätä alapoolia varten jatkettuna 3'-terminaalistaan kolmella lisätähteellä -N-N-N, jossa N voi olla joko A, C, G tai T, polymeraasiketjureaktion avulla monistettujen fragmenttien tuottamiseksi, ja

5

c) erotellaan polymeraasiketjureaktion avulla monistetut fragmentit elektroforeettisesti esittämään näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavat vyöhykkeet.

10 23. Menetelmä, jolla havaitaan muutos mRNA:n ekspressoitumis-
mallissa kudoksessa, johon liittyy fysiologinen tai patologinen
muutos, t u n n e t t u siitä, että sen vaiheet ovat:

a) otetaan ensimmäinen näyte kudoksesta, jossa fysiologisia tai
15 patologisia muutoksia ei ole tapahtunut,

b) määritetään mRNA-ekspressiomalli ensimmäisestä kudoksenäyt-
teestä suorittamalla patenttivaatimuksen 22 vaiheet a)-c), niin
että saadaan ensimmäinen esitys ensimmäisessä näytteessä läsnä
20 olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavista vyöhykkeistä,

c) otetaan toinen näyte kudoksesta, jossa on tapahtunut fysio-
loginen tai patologinen muutos,

25 d) määritetään mRNA-ekspressiomalli toisesta kudoksenäytteestä
suorittamalla patenttivaatimuksen 22 vaiheet a)-c), niin että
saadaan toinen esitys toisessa näytteessä läsnä olevien mRNA:-
iden 3'-päitä edustavista vyöhykkeistä,

30 e) verrataan ensimmäistä ja toista esitystä ja määritetään mikä
vaikutus fysiologisella tai patologisella muutoksella on mRNA-
ekspressiomalliin kudoksessa.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
35 siitä, että kudos on keskushermostoperäistä.

25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fysiologinen tai patologinen muutos on Alzheimerin tauti, Parkinsonin tauti, iskemia, alkoholiriippuvuus, huumeriippuvuus, skitsofrenia, amyotrofinen lateraaliskleroosi, 5 multippeli skleroosi, depressio tai bipolaarinen maanis-depressiivinen häiriö.

26. Patenttivaatimuksen 24 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fysiologinen tai patologinen muutos liittyy oppimi- 10 seen tai muistamiseen, emootioihin, glutamaattineurotoksisuuteen, syömiskäyttäytymiseen, haistamiseen, näkemiseen, liikuntahäiriöihin, virusinfektioihin, sähköshokkiterapiaan tai lääkkeen tai toksiinin antoon.

15 27. Patenttivaatimuksen 24 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fysiologinen tai patologinen muutos kuuluu ryhmään sirkadiaaniset vaihtelut, ikääntyminen ja pitkäaikainen potentiaatio.

20 28. Patenttivaatimuksen 24 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kudος on peräisin keskushermostoon kuuluvasta rakenteesta, jotka kuuluvat ryhmään verkkokalvo, aivokuori, hajukäämi, talamus, hypotalamus, aivolisäkkeen etulohko ja takalohko, hippokampus, nucleus accumbens, amygdala, striatum, 25 pikkuaivot, aivorunko, suprakiasmaattinen nukleus ja selkäydin.

29. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kudος on peräisin elimestä tai elinjärjestelmästä, 30 joka kuuluu ryhmään sydän- ja verisuonijärjestelmä, hengitysjärjestelmä, ruoansulatusjärjestelmä, ääreishermostojärjestelmä, maksa, munuaiset, luuston lihakset ja lisääntymisjärjestelmä.

30. Menetelmä tutkittavan lääkkeen ja tunnetun yhdisteen vaikutusten erojen havaisemiseksi, t u n n e t t u siitä, että sen vaihteita ovat:

- 5 a) otetaan ensimmäinen näyte kudoksesta, jota on käsitelty yhdisteellä, jonka fysiologinen vaikutus tunnetaan,
- b) määritetään mRNA-ekspressiomalli ensimmäisestä kudoksenäytteestä suorittamalla patenttivaatimuksen 22 vaiheet a)-c), niin
10 että saadaan ensimmäinen esitys ensimmäisessä näytteessä läsnä olevien mRNA:iden 3'-päitä edustavista vyöhykkeistä,
- c) otetaan toinen kudoksenäyte elimestä, jota on käsitelty lääkkeellä, tutkittavan lääkkeen ja tunnetun yhdisteen vaikutusten
15 erojen havaisemiseksi,
- d) määritetään mRNA-ekspressiomalli toisesta kudoksenäytteestä suorittamalla patenttivaatimuksen 22 vaiheet a)-c), niin että saadaan toinen esitys toisessa näytteessä läsnä olevien mRNA:-
20 iden 3'-päitä edustavista vyöhykkeistä,
- e) verrataan ensimmäistä ja toista esitystä, niin että saadaan havaittua sellaisten mRNA-lajien läsnäolo, joiden ekspressioon tunnetulla yhdisteellä ei ole ollut vaikutusta, mutta johon
25 tutkittava lääke on vaikuttanut, jolloin selviää mikä on tutkittavan lääkeaineen vaikutuksen ja tunnetun yhdisteen vaikutuksen ero.

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
30 siitä, että tutkittava lääkeaine valitaan ryhmästä antidepressiivit, neuroleptit, rauhoittavat lääkkeet, kouristuksia estävät lääkkeet, monoamiinioksidaasi-inhibiittorit ja stimulantit.

35 32. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tutkittava lääkeaine valitaan ryhmästä Parkinsonin

taudin lääkkeit, luuston lihaksiston relaksantit, analgeetit, paikallisanesteetit, kolinergiset aineet, antiviraaliset aineet, kouristusta estävät aineet, steroidiset ja ei-steroidiset anti-inflammatoriset lääkkeet.

5

33. Alukepaneli, t u n n e t t u siitä, että se käsittää 16 eri oligonukleotidia, joiden sekvenssi on A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N (SEQ ID NO: 3), jossa N on yksi neljästä deoksiribonukleotidistä, A, C, G tai T.

10

34. Alukepaneli, t u n n e t t u siitä, että käsittää 64 eri oligonukleotidia, joiden sekvenssi on A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N-N (SEQ ID NO: 5), jossa N on yksi neljästä deoksi-ribonukleotidista, A, C, G tai T.

15

35. Alukepaneli, t u n n e t t u siitä, että se käsittää 256 eri oligonukleotidia, joiden sekvenssi on A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N-N-N (SEQ ID NO: 6), jossa N on yksi neljästä deoksiribonukleotidistä, A, C, G tai T.

20

36. Alukepaneli, t u n n e t t u siitä, että se käsittää 12 eri oligonukleotidia, joiden sekvenssi on A-A-C-T-G-G-A-A-G-A-A-T-T-C-G-C-G-G-C-C-G-C-A-G-G-A-A-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-V-N (SEQ ID NO: 2), jossa V on deoksiribonukleotidi,
25 joka valitaan ryhmästä A, C ja G, ja N on deoksiribonukleotidi, joka valitaan ryhmästä A, C, G ja T.

37. Alukedegeneraattiseos, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seoksena 12 eri oligonukleotidia, joiden sekvenssi on
30 A-A-C-T-G-G-A-A-G-A-A-T-T-C-G-C-G-G-C-C-G-C-A-G-G-A-A-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-V-N (SEQ ID NO: 2), jossa V on deoksiribonukleotidi, joka valitaan ryhmästä A, C ja G, ja N on deoksiribonukleotidi, joka valitaan ryhmästä A, C, G ja T, kaikkia kahtatoista aluketta on läsnä suurin piirtein ekvimo-
35 laarinen määrä.

1/2

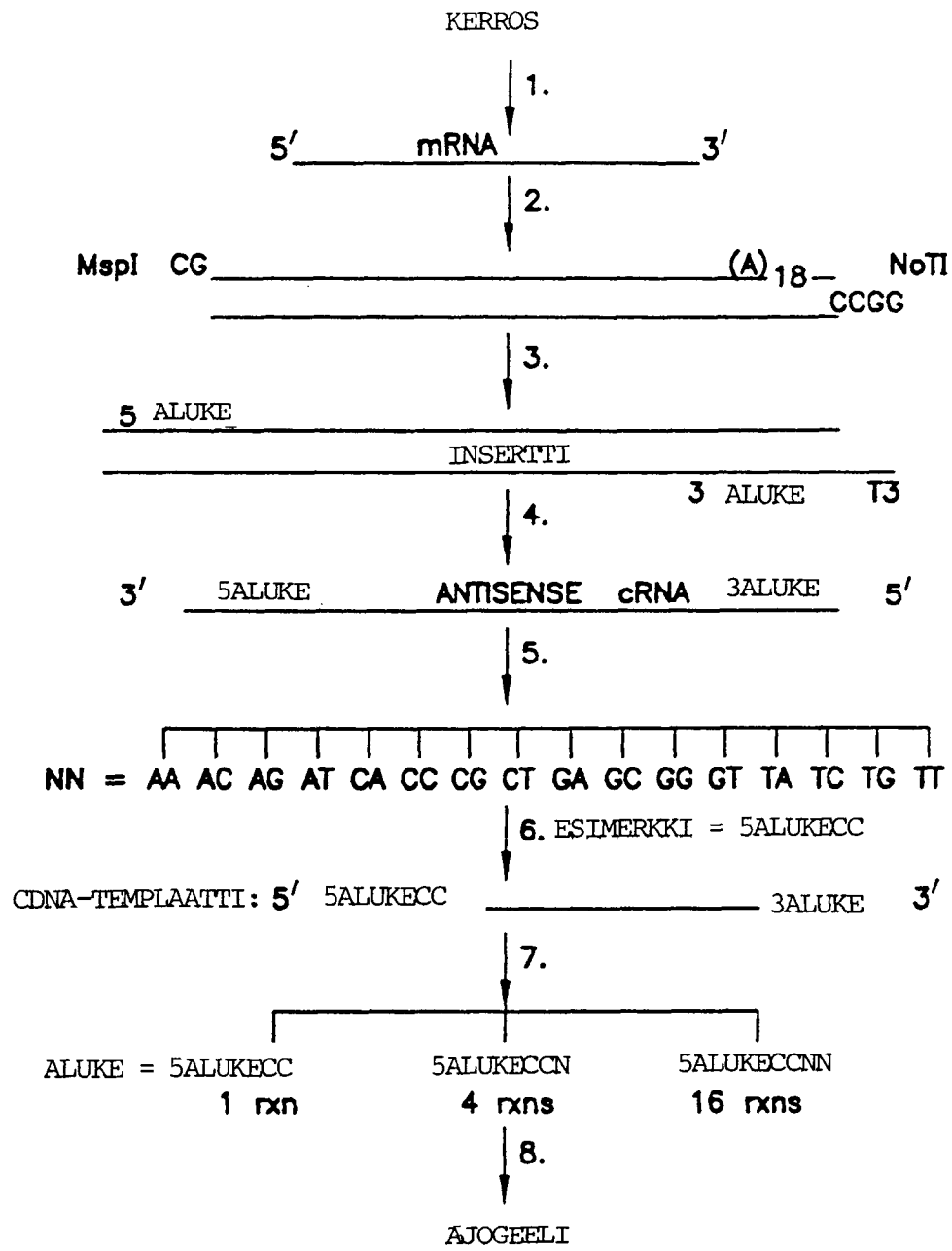


FIG. 1

2/2

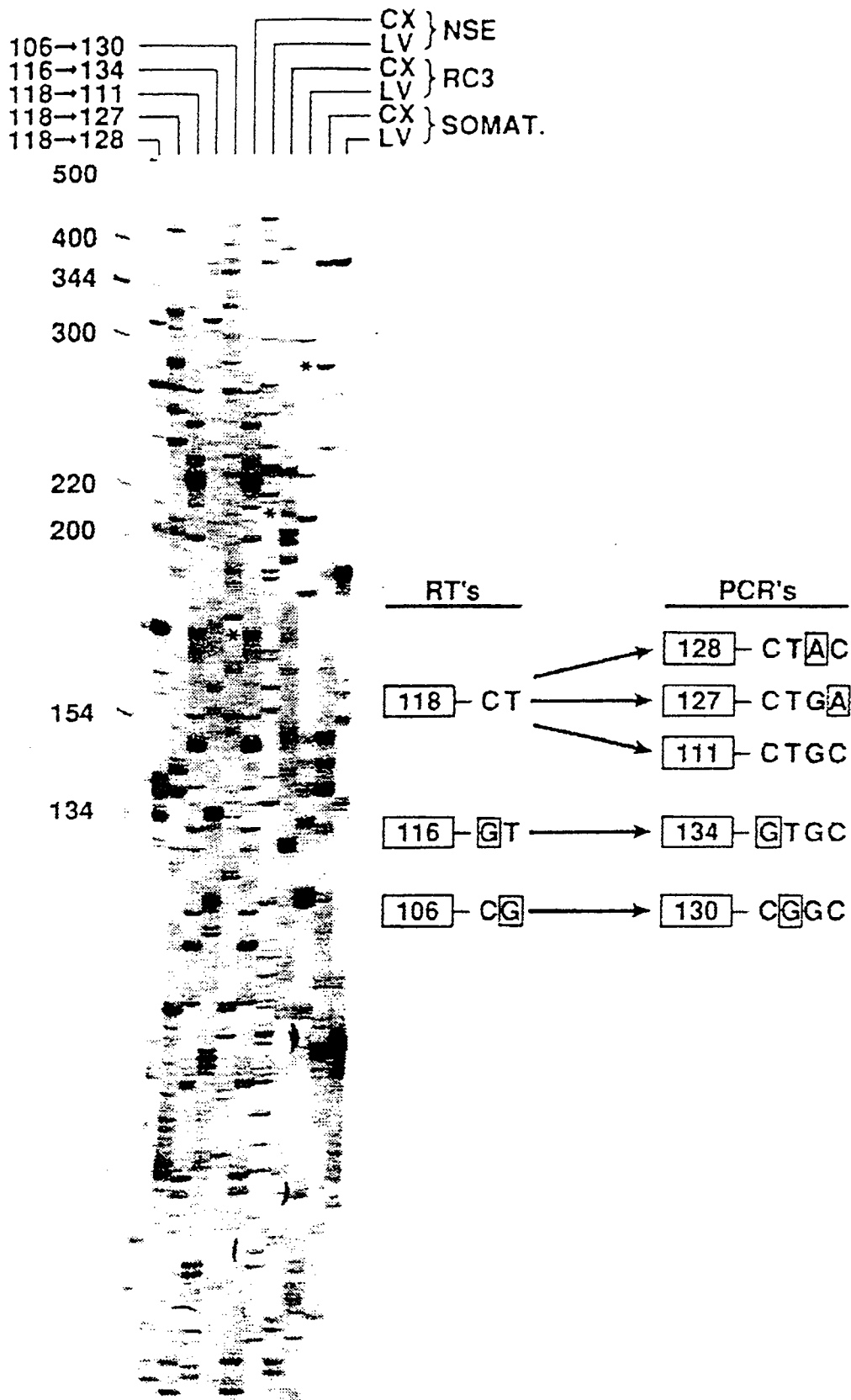


FIG. 2