(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 964735 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 964735

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.05.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **27.11.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **27.01.1997**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **30.05.1995 PCT/GB1995/001237**

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

28.05.1994 GB 9410804 02.02.1995 GB 9502079

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Tepnel Medical Limited, Toft Hall, Knutsford Cheshire WA16 9PD, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Minter, Stephen John, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Nukleiinihappokopioiden tuottaminen
Produktion av kopior av nukleinsyror

Nukleiinihappokopioiden tuottaminen

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää valmistaa kopioita vähintään osasta nukleiinihappojuostetta.

Geeniteknologiassa on yleistä, että näytteessä on mukana vain hyvin pieni määrä nukleiinihappoa, mutta tutkimustarkoituksiin tai diagnostista testiä varten tarvitaan jonkin verran suurempi määrä kokonaista nukleotidijärjestystä tai nukelotidijärjestyksen osaa. Vaihtoehtoisesti voi olla tarpeellista tietää, onko tiettyä nukleiinihappoa mukana näytteessä lainkaan (esim. määritettäessä onko henkilö tietyn viruksen, joko DNA- tai RNA-, infektoima tai onko niiden nukleiinihapossa mukana tietty nukleotidijärjestys vai eikö ole). Koska nukleiinihapon määrä, mikäli sitä on mukana näytteessä, voi olla toteamisrajojen alapuolella, on tarpeen suorittaa näytteelle monistusreaktio, jolloin nukleiinihapon (mikäli sitä on mukana) määrä kasvaa. Sen jälkeen voidaan suorittaa koe, jolloin voidaan määrittää nukleiinihappo toteamalla sen läsnäolo tai muulla tavoin. Jos koe on positiivinen, se vahvistaa sen, että nukleiinihappoa on ollut mukana alkuperäisessä näytteessä. Kääntäen, jos koe on negatiivinen, se vahvistaa, ettei nukleiinihappoa ole ollut alkuperäisessä näytteessä.

Esillä oleva keksintö koskee erilaisia menetelmiä, joiden avulla voidaan valmistaa suurempia määriä nukleiinihappoja, joita on mukana tai on mahdollisesti mukana näytteessä.

Keksinnön ensimmäisen näkökohdan mukaisesti keksinnön avulla saadaan menetelmä, jolla valmistetaan kopioita vähintään osasta nukleiinihappojuostetta ("kohdejuoste"), jota on mukana tai on mahdollisesti mukana näytteessä, ja menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

(i) otetaan kiinteä alustasysteemi, johon on immobilisoitu useita yksisäikeisiä oligonukleotideja, jotka voivat hybridisoitua kohdejuosteisiin,

(ii) otetaan kohdejuosteita, jotka ovat yksisäikeisessä muodossa, ja hybridisoidaan kohdejuosteet alustalla oleviin oligonukleotideihin, ja oligonukleotidien lukumäärä on oleellisesti suurempi kuin kohdejuosteiden lukumäärä,

(ii) (a) pestään alustasysteemi ei-hybridisoituneen aineen poistamiseksi,

(iii) valmistetaan kohdejuostekopioita 1, jotka käsittävät immobilisoidut oligonukleotidit ja joissa nukleiinihappojärjestys on vastinnukleiinihappojärjestys ainakin kohdejuosteen osan suhteen, ja mainitut kohdejuostekopiot 1 valmistetaan ainakin osittain käyttäen mallina kohdejuostetta, jolloin muodostetaan vähintään osa kohdenukleotidijärjestyskopiota 1, ja tarvittaessa suoritetaan kohdenukleotidijärjestyskopion 1 muodostus loppuun,

(iv) denaturoidaan juosteet, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1, ja valinnaisesti uudelleenhybridisoidaan vähintään jotkut ensin mainituista juosteista alustalla oleviin oligonukleotideihin, joita ei ole muutettu kohdejuostekopioiksi 1,

(v) samanaikaisesti,

(a) käyttäen kiinteään alustaan immobilisoituja kohdejuostekopioita 1 malleina muodostetaan (alukkeista, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1) kohdejuostekopioita 2, jotka käsittävät halutun nukleiinihappojärjestyksen, ja

(b) käyttäen kohdejuosteita malleina, mikäli ne on hybridisoitu immobilisoituihin oligonukleotideihin, muodostetaan ainakin osa kohdejuostelisäkopioista 1, ja (tarvittaessa) saatetaan kohdejuostekopioiden 1 muodostus loppuun ja toistetaan vaiheet (iv) ja (v) riittävän monta kertaa, käyttäen kussakin vaiheiden (iv) ja (v) toistossa

kohdejuostekopioita 2 kohdejuosteiden 1 lisäkopioiden muodostamiseksi.

Kuten edellä on osoitettu, keksinnön menetelmä voidaan toteuttaa näytteellä, jossa voi olla tai jossa ei ole kyseessä olevaa nukleiinihappoa. Mikäli nukleiinihappoa ei ole mukana, on ymmärrettävää, että edellä olevat vaiheet (iii) - (vi) eivät johda kohdejuosteiden 1 ja kohdejuosteiden 2 kopioiden muodostumiseen. Huolimatta siitä, että kohdejuostekopioita 2 ei muodostu, saadaan arvokasta tietoa, sillä toteamismenetelmässä saatu negatiivinen tulos kohdejuostekopioiden 2 olemassaoloa määritettäessä vahvistaa sen, ettei kohdejuostetta ollut mukana alkuperäisessä näytteessä.

Pesuvaiheella (ii)(a) varmistetaan, että hybridisoitumaton aine poistetaan alustajärjestelmästä, jolloin kiinteällä alustalla on mukana puhdas näyte kohdejuostetta käytettäväksi seuraavassa vaiheessa (iii). Siten epäpuhtaudet, joita voi olla mukana alkuperäisessä näytteessä, eivät ota osaa keksinnön menetelmään.

Vaiheessa (iv) kohdejuosteet voidaan hybridisoida uudelleen pidentymättömiksi alustalla oleviksi oligonukleotideiksi. Vaihtoehtoisesti alkuperäiset kohdejuosteet voidaan poistaa kiinteältä alustalta ennen vaihetta (v).

On myös edullista, että kiinteää alustasysteemiä pestään ja/tai reagensseja poistetaan kunkin hybridisointireaktion ja/tai kunkin juostesynteesireaktion ja/tai yhdistämisreaktion jälkeen, joka reaktio suoritetaan vaiheiden (iii) - (vi) aikana. Siten esimerkiksi vaiheessa v(b) ylimäärin lisätyt alukkeet voidaan poistaa ennen (vähintään osan) kohdejuostekopioiden 1 muodostamista.

Oligonukleotidit ovat edullisesti sitoutuneet kovalenttisesti kiinteään alustaan. Edullisesti kiinteä alusta systeemi on partikkelisysteemi ja oligonukleotidit on immobilisoitu partikkeleihin. Partikkelialustasysteemin käyttö on sinällään tärkeä ominaisuus, ja siten keksinnön

toisen näkökohdan mukaisesti keksinnön avulla saadaan menetelmä kopioiden valmistamiseksi vähintään osasta nukleiinihappojuostetta ("kohdejuoste"), jota on mukana tai jota on mahdollisesti mukana näytteessä, ja menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

(i) otetaan kiinteä partikkelialustasysteemi, johon on immobilisoitu useita yksisäikeisiä oligonukleotideja, jotka pystyvät hybridisoitumaan kohdejuosteisiin,

(ii) otetaan kohdejuosteet yksisäikeisessä muodossa ja hybridisoidaan kohdejuosteet alustalla oleviin oligonukleotideihin, ja oligonukleotidien lukumäärä on oleellisesti suurempi kuin kohdejuosteiden lukumäärä,

(iii) valmistetaan kohdejuostekopioita 1, jotka käsittävät immobilisoidut oligonukleotidit ja joissa nukleiinihappojärjestys on vastinnukleiinihappojärjestys ainakin osan kohdejuosteen suhteen, ja mainitut kohdejuostekopiot 1 valmistetaan ainakin osittain käyttäen mallina kohdejuostetta ainakin osan kohdenukleotidijärjestyskopion 1 muodostamiseksi, ja tarvittaessa suoritetaan kohdenukleotidijärjestysksen 1 kopion muodostus loppuun,

(iv) denaturoidaan juosteet, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1, ja valinnaisesti uudelleenhybridisoidaan vähintään jotkut aikaisemmista juosteista alustalla oleviin oligonukleotideihin, joita ei ole muutettu kohdejuostekopioiksi 1,

(v) samanaikaisesti,

(a) käyttäen malleina kohdejuostekopioita 1, jotka on immobilisoitu kiinteään alustaan muodostetaan (alukkeista, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1) kohdejuostekopioita 2, jotka käsittävät halutun nukleiinihappojärjestyksen, ja

(b) käyttäen kohdejuosteita malleina, mikäli ne on hybridisoitu immobilisoituihin oligonukleotideihin, muodostetaan ainakin osa kohdejuostelisäkopioista 1, ja (tar-

vittaessa) saatetaan kohdejuostekopioiden 1 muodostus loppuun, ja

(vi) toistetaan vaiheet (iv) ja (v) riittävän monta kertaa, käyttäen kussakin vaiheiden (iv) ja (v) toistossa kohdejuostekopioita 2 kohdejuostelisäkopioiden 1 muodostamiseksi.

Keksinnön toisen näkökohdan edullisena piirteenä on se, että vaiheen (ii) jälkeen kiinteät partikkelialustat pestään hybridisoitumattoman aineen poistamiseksi ennen vaiheen (iii) suorittamista.

Partikkelit ovat edullisesti ei-huokoista piidioksidia, ja edullisesti niiden partikkelikoko on 50 - 200 (edullisemmin 100 - 200) mikronia. Näissä partikkeleissa voi olla ristisidoksellinen siloksaanimatriksi, jossa on reaktiivisia ryhmiä (esim. epoksiryhmiä), jotka voidaan saattaa reagoimaan oligonukleotidien kanssa näiden immobilisoimiseksi alustaan siloksaanimatriksin kautta. Sopivia partikkeleita on kuvattu julkaisussa WO-A-93/13 220 (Tepnel).

On erittäin edullista, että kiinteät alustat pakataan pylväsreaktoriin, johon nesteitä voidaan helposti lisätä ja poistaa. Käytettäessä tällaista pylväsreaktoria voidaan reagensseja (esim. hybridisointipuskureita, nukleotidi) helposti lisätä reaktiosysteemiin. Lisäksi kunkin vaiheen jälkeen tämä pylväsreaktori voidaan helposti pestä ylimääräisten reagenssien poistamiseksi jne., jolloin reaktoriin jää "puhdas" näyte käytettäväksi seuraavassa vaiheessa.

Sopiva pylväsreaktorijärjestely on tuotu esille julkaisussa WO-A-93/13 220.

Edellä olevassa menetelmässä kohdejuostekopiot 1 voidaan muodostaa monin eri tavoin. Ensinnäkin oligonukleotidin järjestyminen alustalla voi olla sellainen, että se toimii sinällään alukkeena, jota voidaan pidentää vaiheessa (v)(b) (käyttäen mallina kohdejuosteita tai siihen hyb-

ridisoitua kohdejuostekopiota 2), jolloin saadaan suoraan kohdejuosteekopio 1. Toiseksi oligonukleotidin järjestyminen voi olla sellainen, ettei sitä voida pidentää edellä olevassa kappaleessa kuvatulla tavalla. Tällaisessa tapauksessa on välttämätöntä lisätä erillinen aluke, joka hybridisoituu kohdejuostekopioon 2 tai kohdejuostekopioon 2, joka on hybridisoitu immobilisoituun oligonukleotidiin, ja sen jälkeen (käyttäen kohdetta mallina) pidentää tätä juostetta takaisin oligonukleotidia kohti, johon se sitten tämän jälkeen liitetään kohdejuostekopion 1 valmistuksen päätteeksi.

Keksinnön menetelmän ominaisuutena on, että vaiheessa (ii) kiinteässä alustasysteemissä on oleellisesti enemmän oligonukleotideja kuin siihen hybridisoituvissa kohdejuosteissa. Oleellisesti enemmällä tarkoitetaan sitä, että alustassa olevien oligonukleotidien kokonaismäärä on suurempi kuin vaiheessa (ii) lisättävien kohdejuosteiden lukumäärä, edullisesti kertoimen ollessa vähintään 10, edullisemmin vähintään 100 ja vielä edullisemmin vähintään 1 000.

Vaihe (v)(a) johtaa kohdejuostekopioiden 2 muodostumiseen, jotka juosteet käsittävät kyseessä olevan nukleiinihappojärjestyksen. Vaiheen (v) lopussa (jossa käytetään liuosfaasialukkeita alustaan immobilisoitujen oligonukleotidien lisäksi) kohdejuostekopiot 2 hybridisoidaan kohdejuostekopioihin 1, ja vaiheen (v) ensimmäisen suorituksen jälkeen kohdejuostekopioiden 2 määrä on suhteellisen alhainen verrattuna pidentymättömiin oligonukleotideihin. Siten vaiheen (iv) ensimmäisessä toistossa kohdejuostekopiot 2 (jotka on denaturoitu kohdejuostekopioista 1) pyrkivät hybridisoitumaan pidentymättömiksi oligonukleotideiksi sen sijaan, että ne hybridisoituisivat uudelleen kohdejuostekopioiksi 1. Siten toistettaessa vaihe (v)(b) kohdejuostekopioista 2, jotka on hybridisoitu oligonukleotideiksi, muodostuu lisää kohdejuostekopioita 1, kun taas

samanaikaisesti muodostuu lisää kohdejuostekopioita 2 (aikaisemmin muodostuneista kohdejuostekopioista 1) vaiheessa (v)(a).

Vaiheet (iv) ja (v) toistetaan riittävän monta kertaa. Ainakin menetelmän varhaisten kierrosten aikana kussakin vaiheen (v) toistossa muodostuu kasvava määrä kohdejuosteen 2 kopioita ja siten, luonnollisesti, vähenevä määrä pidentymättömiä oligonukleotideja. Näiden varhaisten vaiheiden aikana muodostuneiden kohdejuostekopioiden 2 kasvu on on geometrista. Kunkin seuraavan vaiheen (iv) toiston aikana mahdollisuus kohdejuostekopioiden 2 uudelleenhybridisoitumiseksi kohdejuostekopioiksi 1 kasvaa, ja näiden yhdistelmien seurauksena ei muodostu lisää kohdejuosteiden 1 tai kohdejuosteiden 2 kopioita. Edellyttäen, että vaiheet (iv) ja (v) toistetaan riittävän usein, tullaan pisteeseen, jossa kaikki tai lähes kaikki alustassa mukana olevat alkuperäiset oligonukleotidit ovat pidentyneet, jolloin muodostuu kohdejuostekopiooita 1. On edullista, että reaktio suoritetaan siten, että tähän pisteeseen päästään.

Vaiheen (f) tuote käsittää kiinteän alustasysteemin, johon kaksisäikeinen nukleiinihappo on immobilisoitu. Tarkemmin kukin kaksoissjuoste käsittää, toisena juosteena, kohdejuostekopion 1, joka sisältää alkuperäiset oligonukleotidit, jotka on immobilisoitu alustaan, ja siihen hybridisoituneena, toisena juosteena kohdejuostekopion 2, joka käsittää halutun nukleotidijärjestyskopion alkuperäisestä kohdejuosteesta. Se, kuinka paljon alkuperäistä nukleotidijärjestystä voidaan monistaa todellisuudessa, riippuu esimerkiksi (i) kohdejuosteen alueesta, joka hybridisoituu oligonukleotidiin vaiheessa (ii), sekä (ii) kohdejuostekopion 1 alueesta, johon aluke hybridisoituu vaiheessa e(i)).

Vaiheen (f) tuotetta voidaan käyttää monin eri tavoin. Ensinnäkin kohdejuosteiden 2 kopiot voidaan denatu-

roida immobilisoiduista kohdejuostekopioista 1, jolloin saadaan suurempi määrä (verrattuna alkuperäisen kohteen määrään) haluttua nukleotidijärjestystä talteen. Kun kohdejuostekopiot 2 on denaturoitu ja poistettu systeemistä, jäljelle jää kiinteä alustasysteemi, jota voidaan käyttää ainakin kerran halutun nukleotidijärjestyksen lisämäärien valmistamiseksi menetelmällä, joka käsittää seuraavat vaiheet:

(vii) hybridisoidaan alukkeet kohdejuostekopioihin 1 sellaisiin kohtiin, että alukkeiden jatketuotteet, käyttäen malleina kohdejuostekopioita 1, käsittävät halutun nukleotidijärjestyksen,

(viii) pidennetään alukkeita, käyttäen malleina kohdejuostekopioita 1, ja

(ix) denaturoidaan juostetuotteet kohdejuostekopioista 1 ja otetaan talteen juostetuotteet.

Vaiheet (vii) - (ix) toistetaan edullisesti vähintään kerran ja edullisesti useita kertoja. Kussakin vaiheiden (vii) - (ix) toistossa muodostuu suurin piirtein sama määrä juostetuotetta. Siten kumulatiivisuuten perustuen vaiheita (vii) - (ix) toistettaessa muodostuu lineaarisesti lisääntyvät määrät juostetuotetta. Saatavan juostetuotteiden määrän maksimoimiseksi on selvästi toivottavaa, että kaikki tai lähes kaikki alkuperäiset oligonukleotidit muutetaan kohdejuostekopioiksi 1.

Vaihtoehtoisesti vaiheesta (vi) saatua tuotetta (tai vaiheesta (viii) saatua tuotetta) käytetään restriktioentsyyminä lohkaisemaan kaksisäikeinen tuote alustasta. Kaksisäikeinen tuote voidaan kloonata vektoriksi tai sitä voidaan käyttää millä muulla tavalla tahansa.

Tulee ymmärtää, että keksinnön menetelmällä valmistetut nukleiinihapot voidaan todeta tunnetuin tavoin, esim. entsyymillä merkatulla oligonukleotidilla, joka pystyy hgbridisoitumaan nukleiinihappoon.

Keksinnön menetelmä voidaan suorittaa monin eri tavoin.

Ensimmäisessä suoritusmuodossa oligonukleotidit immobilisoidaan kiinteään alustasysteemiin siten järjestäytyneenä, että kun kohdejuoste hybridisoidaan siihen ja käytettäessä sopivaa entsyymisysteemiä, oligonukleotidit pidentyvät itse, jolloin muodostuu kohdejuostekopioita 1. Tämän seurauksena tavallisesti oligonukleotidit sitoutuvat niiden 5'-päiden välityksellä kiinteään alustasysteemiin siten, että oligonukleotidi kasvaa 5'-3'-suuntaan.

Tässä suoritusmuodossa alukkeet, joita käytetään vaiheessa (v)(a) kohdejuostekopioiden 2 valmistamiseksi, ovat liuosfaasialukkeita, jotka hybridisoituvat kohdejuostekopiossa 1 kohtiin, jotka ovat kaukana alustasta, ja jotka pitenevät kohti alustaa, jolloin muodostuu kohdejuostekopioita 2. Tulee luonnollisesti ymmärtää, että kohdejuostekopioiden 2 muodostumisen aikana muodostuu lisää kohdejuosteiden 1 (jotka on immobilisoitu alustaan) kopioita immobilisoitujen oligonukleotidien pidentyessä.

Yksinkertaisimpana seurauksena keksinnön ensimmäisessä suoritusmuodossa käytetään kiinteää alustasysteemiä, joka käsittää yhden tyyppisiä immobilisoituja oligonukleotideja (kaksisäikeisen nukleotidijärjestyksen toisen kohdejuosteen hybridisoimiseksi). Keksinnön ensimmäisen suoritusmuodon kehityksen tuloksena kiinteä alustasysteemi käsittää kaksi erilaista immobilisoitua oligonukleotidia, joista toinen oligonukleotidi on sellainen, että se hybridisoituu kaksisäikeisen nukleiinihapon toiseen juosteeseen, ja toinen oligonukleotidi on sellainen, että se hybridisoituu nukleiinihapon toiseen juosteeseen. Tulee ymmärtää, että tämän kehitystyön tuloksena on mahdollista valmistaa kahden tyyppisiä kohdejuostekopioita 2, jotka ovat vastinkappaleita toisilleen ja joista (kun ne hybridisoituvat yhteen) muodostuu vähintään osa alkuperäistä kaksisäikeistä nukleotidijärjestystä.

Keksinnön toisessa suoritusmuoudossa oligonukleotidit immobilisoidaan kiinteään alustasysteemiin siten järjestäytyneenä, että kun kohdejuoste hybridisoituu siihen, alukkeet voivat hybridisoitua kohdejuosteeseen ja (käyttäen sopivaa entsyymijärjestelmää) ja ne voivat pidentyä oligonukleotideja kohti. Tässä tapauksessa on välttämätöntä päättää kohdejuostekopioiden 1 valmistus yhdistämällä alukejatketuote oligonukleotidiin. Keksinnön tästä suoritusmuodosta on yleensä seurauksena se, että oligonukleotidit sitoutuvat niiden 3'-päiden välityksellä kiinteään alustasysteemiin siten, että aluke kasvaa 5' - 3'-suuntaan alustaa kohti.

Keksinnön toisessa suoritusmuodossa kiinteä alustasysteemi voi käsittää joko yksittäistyyppisen immobilisoidun oligonukleotidin tai kaksi immobilisoitua oligonukleotidityyppiä, jolloin voi muodostua vastinkohdenukleotidijärjestyskopioita 2.

On myös mahdollista (keksinnön kolmannen suoritusmuodon mukaan) yhdistää keksinnön ensimmäinen ja toinen suoritusmuoto siten, että kiinteä alustasysteemi käsittää kaksi immobilisoitua oligonukleotidia, nimittäin:

(i) ensimmäisen oligonukleotidin, joka voidaan itse pidentää, jolloin muodostuu kohdejuostekopio 1 (kuten keksinnön ensimmäisessä suoritusmuodossa), ja

(ii) toisen oligonukleotidin (kohdejuostekopion 1 valmistamiseksi), joka täytyy yhdistää kohdejuosteeseen hydridisoidun alukkeeen jatketuotteeseen.

Kuten edellä mainittiin, kiinteä alustasysteemi voi käsittää kaksi erilaista immobilisoitua oligonukleotidia, joista toinen nukleotidi on sellainen, että se hybridisoituu toiseen kaksisäikeisen nukleiinihapon juosteeseen, ja toinen oligonukleotidi on sellainen, että se hybridisoituu nukleiinihapon toiseen juosteeseen. Tämä on tärkeä ominaisuus sinällään, ja siten esillä olevan keksinnön kolmannen suoritusmuodon mukaan saadaan menetelmä kopioiden valmis-

tamiseksi vähintään osasta nukleiinihappojuostetta, joka on mukana tai jota on mahdollisesti mukana näytteessä, ja menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

(i) otetaan kiinteä alustasysteemi, johon on immobilisoitu useita kutakin kahta erilaista yksisäikeistä oligonukleotidia 0 ja 0^1, joista kukin pystyy hybridisoitumaan vastaavaan toiseen kahdesta kaksisäikeisen nukleiinihapon vastinjuosteesta, ja mainittujen vastinjuosteiden avulla saadaan kohdejuosteet 1 ja 1^1,

(ii) otetaan kohdejuosteet 1 ja 1^1 yksisäikeisessä muodossa ja hybridisoidaan kohdejuosteet alustalla oleviin oligonukleotideihin, ja oligonukleotidien määrä on oleellisesti suurempi kuin kohdejuosteiden lukumäärä,

(iii) valmistetaan kohdejuostekopiot 1 ja 1^1, joista kumpikin käsittää immobilisoidun oligonukleotidin 0 tai 0^1, tässä järjestyksessä, sekä nukleiinihappojärjestyksen, joka on vastinnukleiinihappojärjestys vähintään osalle kohdejuosteita 1 tai 1^1, tässä järjestyksessä, ja mainitut kohdejuostekopiot 1 ja 1^1 muodostetaan ainakin osittain käyttäen vastaavia kohdejuosteita malleina, jolloin muodostuu vähintään osa kohdenukleotidijärjestyskopiosta 1 tai 1^1, ja tarvittaessa, saatetaan loppuun kohdenukleotidijärjestyskopion 1 ja/tai kohdenukleotidijärjestyskopion 1^1 valmistus.

(iv) denaturoidaan juosteet, jotka ovat hybridisoituneet kohdejuoustekopioihin 1, ja valinnaisesti uudelleenhybridisoidaan vähintään jotkut aikaisemmista juosteista alustalla oleviin oligonukleotideihin, joita ei ole muutettu kohdejuostekopioiksi 1,

(v) samanaikaisesti

(a) käyttäen kohdejuostekopioita 1, jotka on immobilisoitu kiinteään alustaan, malleina, muoudostetaan (alukkeista, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1) kohdejuostekopioita 2, jotka käsittävät kyseessä olevan nukleiinihappojärjestyksen, ja

(b) käyttäen malleina kohdejuosteita, mikäli ne on hybridisoitu immobilisoituihin oligonukleotideihin, muodostetaan vähintään osa kohdejuostelisäkopioista 1, ja (tarvittaessa) saatetaan loppuun kohdejuostekopioiden 1 valmistus, ja

(vi) toistetaan vaiheet (iv) ja (v) riittävän monta kertaa, käyttäen kussakin vaiheen (iv) ja (v) toistossa kohdejuostekopioita 2 kohdejuosteen 1 lisäkopioiden muodostamiseksi.

Keksintöä kuvataan edelleen esimerkein, viitaten ainaostaan mukana oleviin piirroksiin, joissa:

Kuviossa 1 valaistaan erästä suoritusmuotoa laitteesta, jossa keksinnön menetelmä voidaan toteuttaa;

Kuviossa 2 valaistaan kaavion avulla keksinnön ensimmäisen suoritusmuodon mukaista menetelmää;

Kuviossa 3 valaistaan edelleen keksinnön ensimmäisen suoritusmuodon mukaista menetelmää;

Kuviossa 4 valaistaan kaavion avulla keksinnön toisen suoritusmuodon mukaista menetelmää;

Kuviossa 5 valaistaan kaavion avulla edelleen keksinnön toisen suoritusmuodon mukaista menetelmää;

Kuviossa 6 valaistaan kaavion avulla keksinnön kolmannen suoritusmuodon mukaista menetelmää;

Kuviossa 7 valaistaan kaavion avulla edelleen keksinnön kolmannen suoritusmuodon mukaista menetelmää;

Kuviot 8 ja 9 ovat kaaviokuvia, jotka valaisevat esimerkin 1 tuloksia; ja

Kuviot 10 ja 11 ovat kaaviokuvia, jotka valaisevat esimerkin 2 tuloksia.

Viitaten ensin kuvioon 1, esitetty laitteisto käsittää läpivirtauspylväsreaktorin 1, jonka keskellä on poikittainen väliseinä 2 ja jonka yläpuolisesta osasta saadaan partikkelialustat P_A ja alaosasta partikkelialustat P_B. Kuhunkin tällaiseen alustaan P_A ja P_B on immobilisoitu oligonukleotidit 3 ja 4 vastaavassa järjestyksessä edempä-

nä tarkemmin kuvatulla tavalla. Väliseinä 2 on sellainen, että nesteet voivat kulkeutua sen läpi mutta partikkelit P_A ja P_Y eivät. On kuitenkin yhtä mahdollista, että väliseinää 2 ei ole ja että alustat P_A ja P_B sekoittuvat keskenään.

Pylväsreaktoriin 2 liittyvät hybridisointipuskureiden, entsyymien, nukleotidien ja pesuliuoksiem syöttövirrat kuvatulla tavalla. Lisäksi pylväsreaktoriin 2 liittyy varastointijärjestelmä 5, johon tuote (joka on kuvattu edempänä) voidaan varastoida pylväsreaktorista ja josta tuote voidaan palauttaa pylväsreaktoriin. Kuumennuslaitetta 6 käytetään tarvittaessa reaktorin 1 kuumentamiseen. Lopuksi, laitteistossa on kuvatut venttiilit reagenssien lisäämiseksi pylväsreaktoriin ja niiden ottamiseksi sieltä pois kuvatulla tavalla. Nesteiden lisääminen pylväsreaktoriin ja niiden ottaminen sieltä pois vooidaan suorittaa ruiskujen avulla, esim. pakkosyöttöruiskuilla.

Alustat R_A ja P_B voivat olla julkaisussa WO-1-93/13 220 kuvatun kaltaisia. Siten alustat voivat olla kiinteää piidioksidia, joiden ulkopintana on siloksaanimatriksi, johon oligonukleotidit 3 ja 4 (tässä järjestyksessä) kiinnitetään sidoksella. Tapa, jolla oligonukleotidit kiinnitetään alustaan, voi tapahtua julkaisussa WO-A-93/13 220 kuvatulla tavalla.

Alustat P_A ja P_B eroavat toisistaan ainoastaan niihin sitoutuneiden oligonukleotidien suhteen. Voidaan tarkastella DNA-molekyyliä, joka käsittää vastinjuosteet, hybridisoituneet juosteet A ja B. Alustoihin P_A immobilisoidut oligonukleotidit ovat sellaisia, että juoste A (kun se on denaturoitu juosteesta B) hybridisoituu niihin, kun taas alustoihin P_B immobilisoidut oligonukleotidit pystyvät hybridisoitumaan B-juosteeseen.

Kuviossa 2 valaistaan keksinnön ensimmäisen suoritusmuodon mukaista käyttöä valmistettaessa kopioita kaksisäikeisestä kyseessä olevasta nukleotidijärjestyksestä, jossa on yksittäiset nukleotidijärjestykset X ja Y. Pyl-

väsreaktori sisältää kahden tyyppisiä partikkeleita, jotka on ilmoitettu kuviossa 2 P1:nä ja P2:na. Asian valaisemiseksi, juosteissa X ja Y oletetaan olevan esitetyt mielivaltaiset emäsjärjetykset niiden päätealueilla.

Mukaan kuuluvat seuraavat vaiheet:

1. DNA, joka sisältää kohdenukleotidijärjestyksen, on joko denaturoitu pylväsreaktorin ulkopuolella ja sitten lisätty reaktoriin, tai kaksisäikeinen DNA lisätään reaktoriin ja denaturoidaan in situ. Kummassakin tapauksessa DNA:ta käsitellään kohotetuissa lämpötiloissa tai geeniteknologiassa tunnetulla tavalla kemiallisesti DNA:n denaturoimiseksi. Kumpaakin tapausta varten denaturoitu DNA sekoitetaan pylväsreaktorissa olevan alustan kanssa. Reaktorin lämpötilaa lasketaan sitten lämpötilaan, jossa kohteen hybridisoituminen partikkeliin sitoutuvien oligonukleotidien kanssa on mahdollista. Tämä hybridisaatioreaktio tapahtuu hyvin tarkassa lämpötilassa, joka on spesifinen alustaan sitoutuneen nukleotidijärjestyksen ja kohdenukleotidijärjestyksen yhdistelmälle (ja se on Tm, reaktion sulamislämpötila). Tm:ää säätelee kohdenukleotidijärjestyksessä olevien emästen suhde. Korkean A-T-suhteen omaava DNA sulaa alemmissa lämpötiloissa kuin korkean G-C-suhteen omaava DNA (pätee kaikille suolakonsentraatioille).

Nukleotidijärjestyksen X (kohde) 3'-pää esitetään nukleotidijärjestyksenä AAAA. P1-partikkeleissa on immobilisoituneina (5'-päiden kautta) nukleotidijärjestyksen TTTT omaavia oligonukleotideja, ts. nukleotidijärjestys, joka hybridisoituu X-nukleotidijärjestyksen 3'-päähän, jolloin tämä juoste voidaan pyydystää (vaihe (b)).

Z-juoste (kohde) esitetään juosteena, jonka 3'-päässä on GGGG-nukleotidijärjestys. P2-partikkeleihin on immobilisoituneena (5'-päiden kautta) oligonukleotideja, joissa on CCCC-nukleotidijärjestys, joka hybridisoituu Y-juosteen 3'-alueelle, jolloin tämä juoste voidaan pyydystää (vaihe (b)).

2. Kun pylväsreaktori on pesty epäpuhtauksien poistamiseksi (joihin kuuluvat ei-kohde ja DNA, sekä proteiinit, jotka voivat olla estäviä), lipidit ja suolat, pylväsreaktorin pesua jatketaan puskurilla, joka on ideaalinen menetelmän seuraavaa vaihetta ajatellen. Polymeraasientsyymiä ja nukleotideja lisätään sitten pylväsreaktoriin sitoutuneiden oligonukleotidien pidentämiseksi, jotka oligonukleotidit voivat toimia alukkeina, jolloin ne kopioivat pyydystettyjä juosteita (vaihe (c)) alukkeesta ja muodostavat alustaan immobilisoituneita kohdejuostekopioita 1.

3. Kun tämä reaktio on päättynyt, pylväsreaktori voidaan pestä ei-toivottujen (käyttämättömien) reagenssien poistamiseksi.

4. Tämän jälkeen kohdejuosteet denaturoidaan immobilisoiduista kohdejuostekopioista 1 (vaihe (d)) ja sitten niiden annetaan hybridisoitua uudelleen ei-pidennettyihin oligonukleotideihin (vaihe (e)), joita on suhteellisesti ylimäärin verrattuna alkuperäisen kaksisäikeisen molekyylin määrään alussa.

5. Seuraavassa vaiheessa (vaihe (f)) vapaat (liuosfaasi-) alukkeet, joissa on TTTT- ja CCCC-nukleotidijärjestykset, lisätään ja hybridisoidaan kuvatulla tavalla juosteisiin, jotka ovat kiinnittyneet kovalenttisella sidoksella P1- tai P2-partikkeliin. Ylimäärä vapaita alukkeita poistetaan sitten reaktorista pesuvaihetta käyttäen.

6. Entsyymit ja nukleotidit lisätään (vaihe (g)) nyt siten, että kutakin P1- ja P2-partikkelia kohden tapahtuu samanaikaisesti kaksi pidennysreaktiota, nimittäin

(i) kovalenttisesti immobilisoitujen oligonukleotidien pidennys (esim. TTTT P1:lle), joihin nukleiinihappojuoste hybridisoituu, (tämä tapahtuu suuntaan, joka on poispäin P1- ja P2-alustoista), jolloin muodostuu kohdejuostekopioita 1, ja

(ii) lisättyjen "vapaiden" alukkeiden (esim. CCCC-aluke P1:lle) pidennys, jotka alukkeet hybridisoituvat kovalenttisesti immobilisoituihin juosteisiin (tämä tapahtuu suuntaan, joka on poispäin P1- ja P2-alustoista), jolloin muodostuu kohdejuostekopioita 2.

Vaiheessa (i) syntyy kovalenttisesti immobilisoituja Z-nukleotidijärjestyksiä, jotka ovat syntetisoituneet P1-partikkelilla, sekä kovalenttisesti immobilisoituneita X-nukleotidijärjestyksiä, jotka ovat syntetisoituneet P2-partikkeleilla. Vaiheessa (ii) syntetisoituu X-nukleotidijärjestyksiä P1-partikkeleilla ja Z-nukleotidijärjestyksiä P2-partikkeleilla. Tämä on kohde-DNA:n geometrisen kopioinnin alku.

7. Pylväsreaktori voidaan sitten pestä ei-toivottujen reagenssien poistamiseksi.

8. Vaiheiden (d) - (g) menetelmät voidaan toistaa riittävän monta kertaa.

Alussa alustoilla on suuri ylimäärä immobilisoituja oligonukleotideja. Siten ensimmäiset menetelmäkierrokset etenevät seuraavasti (koskien ainoastaan P1-partikkeleita). Oletetaan, että vaiheen (g) lopussa P1-partikkelissa on kaksi kovalenttisesti immobilisoitua Z-juostetta ja kaksi X-juostetta sitoutuneena hybridisaation kautta immobilisoituihin Z-juosteisiin. Kun vaiheet (d) - (g) on toistettu yhden kerran, vastaavat luvut ovat neljä kumpaakin Z ja X-juostetta. Seuraavan toiston jälkeen kumpaakin nukletidijärjestystä on kahdeksan kappaletta, ja niin edelleen. Tätä eksponentiaalityyppistä kasvua rajoittaa kuitenkin alustalla olevien immobilisoitujen oligonukleotidien lukumäärä. Siten vaiheessa (g) syntetisoituneiden hydridisoituneiden juosteiden määrä kasvaa lopulta siten, että seuraavien denaturointi- ja uudelleenhybridisointivaiheiden (vaiheet (d) ja (e)) aikana jotkut X-juosteet hybridisoituvat ei-pidentyneisiin oligonukleotideihin, mutta muut hybridisoituvat Z-juosteisiin, jotka ovat muo-

dostuneet immobilisoitujen alukkeiden jatkeina. Lopulta kaikki immobilisoidut alukkeet pidentyvät ja P1-partikkelit saturoituvat kaksisäikeisellä nukleiinihapolla. (Vastaavasti P2-partikkeleille).

Kaksisäikeinen happo voidaan "leikata" alustasta (käyttäen sopivaa restriktioentsyymiä). Vaihtoehtoisesti kohdekopiotuotteet 2 voidaan denaturoida alustasta, kuten vaiheessa (g), ja ne voidaan sen jälkeen käyttää valmistettaessa lineaarisesti kasvavia määriä kohdejuostekopioita 2, toistamalla seuraava reaktiovaihesarja.

(i) hybridisoidaan alukkeet CCCC ja TTTT immobilisoituihin kohdejuostekopioihin 1,

(ii) pidennetään alukkeet ja

(iii) denaturoidaan ja otetaan talteen jatketuotteet (se on kohdejuostekopiot 2).

Seuraavaksi viitataan kuvioon 3, jossa valaistaan kuviossa 2 esitetyn menetelmän muunnelmaa. Kuvion 3 menetelmä aloitetaan kaksisäikeisellä nukleiinihapolla, jossa yhdessä X-juosteista on esitetyt mielivaltaiset päätenukleotidijärjestykset A ja B, sen 5'- ja 3'-päätteissä, ja toisessa Y-juosteessa on mielivaltaiset päätenukleotidijärjestykset C ja D (A on C:n vastin ja B on D:n vastin). Nukleotidijärjestysten A ja B välissä osalla X-juostetta on L-nukleotidijärjestys, joka on vastinnukleotidijärjestys Y-juosteessa olevalle M-nukleotidijärjestykselle.

Käytetään kahdentyyppisiä partikkeleita, P1 ja P2. Partikkelissa P1 on useita M-nukleotidijärjestyksen omaavia oligonukleotideja immobilisoituna (P1-alustoihin) niiden 5'-päiden kautta. Partikkelissa P2 on useita L-nukleotidijärjestyksen omaavia oligonukleotideja immobilisoituina (P2-partikkelialustoille) niiden 5'-päiden kautta.

Kuvion 3 menetelmä käsittää samat reaktiovaiheet kuin kuviossa 2, josta syystä niitä ei kuvata yksityiskohtaisesti uudelleen. Seuraavat kohdat tulee kuitenkin huomata.

Kuvion 2 menetelmässä kaksi immobilisoitua oligonukleotidia (TTTT ja CCCC) olivat sellaisia, että syntetisoiduissa kohdejuostekopioissa 1 oli vastinemäsjärjestykset. Tämä johtui siitä, että toinen oligonukleotidi (CCCC) vastasi toisen X-nukleotidijärjestyksen päätä, ja toinen oligonukleotidi (TTTT) vastasi Z-nukleotidijärjestyksen vastakkaista päätä.

Päinvastaisesti kuvion 3 menetelmässä X-juoste hybridisoituu sen välialueen L kautta P1-partikkelilla olevaan oligonukleotidiin M, ja Z-juoste immobilisoidaan sen P2-partikkelilla olevan välinukleotidijärjestyksen L kautta. Seuraavan pidennysreaktion (vaihe (c)) aikana P1-partikkelilla muodostuneella kohdetuotekopiolla 1 on seuraava nukleotidijärjestys

5' M————————C 3'

kun taas P2-partikkelilla muodostuneella tuotteella on nukleotidijärjestys

5' L————————B 3'

Siten nämä kaksi kohdetuotekopiota eivät ole vastineita toisilleen.

Vaiheen (e) aikana P1-partikkelilla muodostuu kohdetuotekopio 2, jonka nukleotidijärjestys on

3' L————————A 5'

joka kuvaa kopiota osasta alkuperäistä X-juostetta, kun taas P2-partikkelilla muodostuu kohdetuotekopio 2, jonka nukleotidijärjestys on

3' M————————D 5'

se on kopio osasta alkuperäistä Z-juostetta.

Seuraavaksi viitataan kuvioon 4, jossa valaistaan keksinnön toista suoritusmuotoa.

Menetelmä alkaa kaksisäikeisestä DNA:sta, jossa on X ja Y-juosteet. Pylväsreaktorissa käytetään kahta partikkelityyppiä P3 ja P4.

Ensimmäiseen partikkelityyppiin P3 on immobilisoitu (3'-pään kautta) oligonukleotidi GGGG, joka hybridisoituu X-juosteen 5'-pään alueelle.

Toiseen partikkelityyppiin P4 on immobilisoitu (jälleen 3'-pään kautta) oligonukleotidi AAAA, joka immobilisoituu Z-juosteen 5'-pään alueelle.

Kun kaksisäikeinen kohde-DNA on denaturoitu ja hybridisoitu P3- ja P4-partikkeleihin, partikkelit pestään epäpuhtauksien poistamiseksi (kuten edellä). Hybridisaatioreaktiossa saadaan pyydystettyä halutut nukleotidijärjestykset.

Kaksi vapaata aluketta (CCCC ja TTTT) lisätään ja hybridisoidaan partikkeliin sitoutuneeseen DNA:han. Toinen tällainen aluke (TTTT) hybridisoituu X-juosteen 3'-pään alueelle. Toinen aluke (CCCC) hybridisoituu immobilisoidun Z-juosteen 3'-päähän (vaihe c).

Partikkelit pestään sitten reagenssiylimäärän poistamiseksi.

Entsyymejä ja nukleotideja lisätään pylväsreaktoriin (on mahdollista, että tämä voidaan suorittaa samanaikaisesti alukkeiden lisäämisen kanssa) ja tapahtuu pidennysreaktio, jolloin alukkeet pitenevät kohti alustoja immobilisoituhin oligonukleotideihin asti, mutta eivät liity niihin (vaihe d). Symboli "**" tarkoittaa vaiheen (d) tuotteessa sitä, että jatketuote ei ole liittynyt immobilisoituun oligonukleotidiin.

Lisätään DNA-ligaasia (alukkeiden) jatketuotteiden yhdistämiseksi immobilisoituihin oligonukleotideihin, jolloin muodostuu kohdejuostekopioita 1, jotka ovat immobilisoituneina alustoihin (vaihe e).

Denaturoinnin ja uudelleenhybridisoinnin (vaihe f) jälkeen lisätään jälleen alukkeet TTTT ja CCCC. Aluke TTTT

hybridisoituu P4-partikkelilla olevan kohdejuostekopion 1 3'-päähän sekä P3-partikkelilla olevan hybridisoituneen nukleiinihapon 3'-päähän.

Pylväsreaktori pestään sitten reagenssiylimäärän poistamiseksi. Lisätään polymeraasia ja nukleotideja ja suoritetaan sitten pidennysreaktio (vaiheet g ja h). Alukkeet pidennetään kuvatulla tavalla (jolloin muodostuu kohdejuostekopioita 2) ja (pylväsreaktorin pesun jälkeen) suoritetaan yhdistämisreaktio kohdejuostekopioiden valmistuksen loppuun saattamiseksi kummallakin P3- ja P4-alustalla.

Vaiheet (f) - (i) toistetaan riittävän monta kertaa halutun kohdejuostekopio- 1 ja kohdejuostekopio- 2 määrän valmistamiseksi. Viimeksi mainitut juosteet voidaan ottaa talteen tuotteena ja ensin mainittuja juosteita (jotka ovat immobilisoituneina niiden alustoihin) voidaan käyttää kohdejuostekopiotuotteiden 2 valmistamiseksi lisää aikaisemmin kuvatulla tavalla.

Seuraavaksi viitataan kuvioon 5, jossa valaistaan kuvion 4 menetelmän muunnelmaa.

Kuvion 5 menetelmä alkaa samalla kaksisäikeisellä nukleiinihapolla kuin kuvion 3 menetelmä. Lisäksi kuviossa 5 käytetään kahta partikkelityyppiä, nimittäin P3-partikkeleita, joissa M-nukleotidijärjestyksen mukaiset oligonukleotidit ovat immobilisoituina niiden 3'-päiden kautta, sekä P4-partikkeleita, joissa L-nukleotidijärjestyksen omaavat oligonukleotidit on immobilisoitu niiden 3'-päiden kautta.

Reaktiosarja kuviossa 5 on sama kuin kuvion 4 menetelmälle. Kuvion 5 menetelmän tuote käsittää alustoja, joissa on immobilisoituina kohdejuostekopioita, joiden nukleotidijärjestykset ovat

3' M————D 5'

ja

3' L————————A 5'

Näitä alustoja voidaan käyttää suurempien nukleotidijärjestysmäärien valmistamiseksi

5' L————————B 3'

ja

5' M————————C 3'

kuin joita on mukana alkuperäisessä kaksisäikeisessä nukleiinihapossa.

Seuraavaksi viitataan kuvioon 6, joka kuvaa keksinnön kolmannen suoritusmuodon mukaisen menetelmän, joka itse asiassa on kuvioissa 2 ja 4 kuvattujen menetelmien yhdistelmä. Kuvion 6 menetelmässä ensimmäinen partikkelityyppi P5 pyydystää (alkuperäisen kaksisäikeisen nukleiinihapon) X-nukleotidijärjestyksen sen 3'-pään kautta (vrt. P1-partikkeli kuviossa 2). Toisen tyypin partikkeli P6 pyydystää sen 5'-pään (vrt. P4-partikkeli kuviossa 4).

Kokonaisreaktiokaavio kuvataan kuviossa 6. Reaktiosarja, joka suoritetaan P5-partikkelilla, muistuttaa läheisesti P1-partikkelilla tapahtuvaa reaktiosarjaa. P6:lla tapahtuva reaktiosarja noudattaa P4-partikkelilla tapahtuvaa reaktiosarjaa. Vaikka partikkelit P5 ja P6 ovat samassa pylväsreaktorissa, P6:lla suoritettavilla yhdistämisreaktioilla ei ole mitään vaikutusta P5:een.

Kuvion 6 menetelmällä valmistetaan alusta, jota voidaan käyttää valmistettaessa suurempia määriä X- ja Y-nukleotidijärjestyksiä kuin mitä on mukana alkuperäisessä nukleiinihapossa.

Kuvion 6 menetelmää voidaan muunnella kuvion 7 osoittamalla tavalla, jossa aloitetaan nukleiinihappotyypillä, joka on esitetty kuviossa 3. Kuviossa 7 P5-partikkeleissa on oligonukleotideja, joilla on M-nukleotidijärjestys ja jotka on immobilisoitu niihin niiden 5'-päiden kau-

tta (vrt. P1-partikkeli kuviossa 3), kun taas P6-partikkeleissa on oligonukleotideja, joilla on L-nukleotidijärjestys ja jotka on immobilisoitu niihin niiden 3'-päiden kautta (vrt. P4-partikkelit kuviossa 5). Reaktiosarja kuviossa 7 on sama kuin kuviossa 5 tai 6. Tämän reaktiosarjan aikana P5-partikkelit toimivat samalla tavoin kuin P1-partikkelit kuviossa 3, kun taas P6-partikkelit toimivat samalla tavoin kuin P4-partikkelit kuviossa 5).

Kuvion 7 menetelmästä saadaan alustoja, joita voidaan käyttää valmistettaessa suurempia määriä nukleotidijärjestyksiä

3' M————————C 5'

ja

3' L————————A 5'

kuin mitä alkuperäisessä nukleiinihapponäytteessä on.

Keksintöä valaistaan esimerkein viitaten ainoastaan seuraaviin ei-rajoittaviin esimerkkeihin.

Esimerkki 1

Tässä esimerkissä termi "puskuri" tarkoittaa koostumusta, joka käsittää 10 mM Tris-HCl:a, pH 8,3, 50 mM KCl:a ja 1,5 mM $MgCl_2$:a.

24-meerinen oligonukleotidi, jolla on seuraava nukleotidijärjestys (I)

(I) 5' GGC GTA ATC ATG GTC ATA GCT GTT 3'

immobilisoitiin sen 5'-pään kautta partikkelialustoille (koko 105 µm), jota myy 3M kauppanimellä M-phase, siloksaanimatriksin kautta, käyttäen julkaisussa WO-A-93/13 220 (Tepnel) kuvattua menetelmää. Partikkelit käsittivät ylimäärän, 50 µmoolia (alustagrammaa kohden) nukleotidijärjestystä (I).

2 mg alustoja laitettiin kuhunkin viiteen läpivirtauspylväsreaktorijärjestelmään, joiden sisähalkaisija oli 2 mm. Alustoja piti paikoillaan kaksi pidikettä, jotka olivat 100 mm päässä toisistaan.

25 fmol 48-meeristä mallioligonukleotidia, jolla oli nukleotidijärjestys (II)

(II) 5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA AAC

AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC 3'

ja joka oli puskurissa, laitettiin sitten kuhunkin pylväsreaktoriin, joita pidettiin sitten aluksi 95 °C:ssa 10 minuuttia. Lämpötilaa alennettiin sitten 72 °C:seen. Tämä menetelmä johti nukleotidijärjestyksen (II) hybridisoitumiseen immobilisoituun nukleotidijärjestykseen (I).

Pylväsreaktori pestiin sitten puskurilla, lämpötilaa laskettiin 57 °C:seen ja lisättiin edelleen puskuria, joka sisälsi 0,2 mM kutakin neljää dNTP:tä, ja reaktoriin lisättiin 1,25 yksikköä polymeraasientsyymiä (Thermas aquaticus).

Reaktori pidettiin 57 °C:ssa kaksi minuuttia immobilisoitujen 24-meerisen nukleotidin (nukleotidijärjestys (I)) pidentämiseksi, käyttäen mallina hybridisoitua, 48-meeristä oligonukleotidia.

Pylväsreaktorin lämpötila nostettiin sitten 95 °C:seen kahdeksi minuutiksi 48-meerisen nukleotidijärjestyksen (II) denaturoimiseksi pidennetystä nukleotidijärjestyksestä (I).

Pylväsreaktori jäähdytettiin sitten 72 °C:seen ja sen jälkeen pylväsreaktoriin lisättiin puskuria, joka sisälsi 0,2 mM kutakin neljää dNTP:tä, 1,25 yksikköä polymeraasientsyymiä (Thermus aquaticus) ja 25 pmol biotinyloitua 24-meeristä oligonukleotidia, jolla oli nukleotidijärjestys (III)

(III) 5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA 3'

ja pylväsreaktoria pidettiin 72 °C:ssa kaksi minuuttia nukleotidijärjestysten II hybridisoimiseksi eipidennettyihin nukleotidijärjestyksiin (I) sekä nukleotidijärjestysten (III) hybridisoimiseksi pidennettyihin nukleotidijärjestyksiin (I). Pylväsreaktori jäähdytettiin sitten 57 °C:seen, joka lämpötila pidettiin kaksi minuuttia nukleotidijärjestysten (I) ja (III) pidentymisen mahdollistamiseksi.

Yhdessä pylväässä olevat alustat otettiin sitten talteen käytettäviksi alla kuvatussa toteamismenetelmässä.

Jäljellä olevissa pylväsreaktoreissa suoritettiin denaturointikierrokset 95 °C:ssa (kaksi minuuttia), lisättiin lisää nukleotidijärjestyksiä (II) ja uudelleenhybridisoitiin 72 °C:ssa (kaksi minuuttia) ja suoritettiin pidennysreaktio 57 °C:ssa (kaksi minuuttia) (joskin lyhyempiä aikoja voidaan käyttää), käyttäen edellä yksityiskohtaisemmin kuvattuja menetelmiä. Alustat kerättiin talteen neljän, yhdeksän, 19:n ja 29:n lisäkierroksen jälkeen. (Tällaiset näytteet oli siten saatettu yhteensä viiteen, kymmeneen, 20:een ja 30:een pidennysreaktioon, tässä järjestyksessä).

Suoritettiin myös nollakoe seuraavalla tavalla

(a) Yhdessä pylväsreaktorissa oli alustoja, joissa oli immobilisoituina nukleotidijärjestyksiä (I), sekä puskuria. Pylväsreaktorissa suoritettiin edellä olevien menetelmien mukaiset kierrokset lisäämättä lisää nukleiinihappoa tai reagensseja.

Kaikille kerätyille näytteille suoritettiin seuraava toteamismenetelmä.

Kerätyt partikkelit saatettiin reagoimaan streptavidiini-emäsfosfataasikonjugaatin kanssa. Ylimäärä konjugaattia poistettiin pesemällä ja partikkeleita käsiteltiin sitten kaupallisesti saatavalla emäksisen fosfataasin toteamissysteemillä (Ampak, ent. Dako). Tässä kehittyi väri, jota seurattiin 490 nm:ssa ajan funktiona. Tulokset esite-

tään kuviossa 8, joka on kaavio, joka kuvaa absorbanssin suhteessa monistimen inkubaatioaikaan. Kuvio 9 on kaavio, joka kuvaa absorbanssin muutoksen suhteessa pidennyskierrosten, jotka näyte on käynyt läpi, lukumäärään.

Tämän tiedon perusteella voidaan selvästi nähdä, että monistuminen on eksponentiaalista.

Esimerkki 2

Esimerkin 1 menetelmä toistettiin, mutta nukleotidijärjestykset (I), (II) ja (III) korvattiin seuraavilla nukleotidijärjestyksillä (Ia), (IIa) ja (IIIa), vastaavassa järjestyksessä

(Ia) 5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA 3'

(IIa) 5' GGC GTA ATC ATG GTC ATA GCT GTT TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT 3'

(IIIa) 5' GGC GTA ATC ATG GTC ATA GCT GTT 3'

Lisäseurantakokeet suoritettiin seuraavasti:

(b) Yhteen pylvääseen, joka sisälsi pidennettyä nukleotidijärjestystä (I), lisättiin koettimena ei-vastinnukleotidijärjestyksellistä (nukleotidijärjestyksen (I) suhteen), biotinyloitua 24-meeristä oligonukleotidia, jonka nukleotidijärjestys oli:

5' CGC CAT TCA GGC TGC GCA ACT GTT 3'

Pylväsreaktorissa suoritettiin 30 kierrosta.

(c) Yksi pylväsreaktori, jossa oli alustoja, joihin oli immobilisoituneena nukleotidijärjestyksiä (I), pidettiin 4 °C:ssa nollakierroksen kontrollina.

Tulokset esitetään kaaviona kuvioissa 10 ja 11, tässä järjestyksessä. Jälleen kerran voidaan selvästi havaita, että monistuminen on eksponentiaalista.

Tulee ymmärtää, että nukleotidijärjestykset (II) ja (IIa) ovat toistensa vastinnukleotidijärjestyksiä. Siksi

on mahdollista käyttää partikkelien yhdistelmiä, joissa on immobilisoituja nukleotidijärjestyksiä (I), sekä partikkeleita, joissa on immobilisoituja nukleotidijärjestyksiä (Ia) nukleotidijärjestyksien (II) ja (IIa) monistamisen aikaan saamiseksi.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kopioiden valmistamiseksi vähintään osasta nukleiinihappojuostetta ("kohdejuoste"), jota on mukana tai on mahdollisesti mukana näytteessä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

(i) otetaan kiinteä alustasysteemi, johon on immobilisoitu useita yksisäikeisiä oligonukleotideja, jotka voivat hybridisoitua kohdejuosteisiin,

(ii) otetaan kohdejuosteita, jotka ovat yksisäikeisessä muodossa, ja hybridisoidaan kohdejuosteet alustalla oleviin oligonukleotideihin, ja oligonukleotidien lukumäärä on oleellisesti suurempi kuin kohdejuosteiden lukumäärä,

(ii) (a) pestään alustasysteemi ei-hybridisoituneen aineen poistamiseksi,

(iii) valmistetaan kohdejuostekopioita 1, jotka käsittävät immobilisoidut oligonukleotidit ja joissa nukleiinihappojärjestys on vastinnukleiinihappojärjestys ainakin kohdejuosteen osan suhteen, ja mainitut kohdejuostekopiot 1 valmistetaan ainakin osittain käyttäen mallina kohdejuostetta, jolloin muodostetaan vähintään osa kohdenukleotidijärjestyskopiota 1, ja tarvittaessa suoritetaan kohdenukleotidijärjestyskopion 1 muodostus loppuun,

(iv) denaturoidaan juosteet, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1, ja joko uudelleenhybridisoidaan aikaisemmat juosteet alustalla oleviin oligonukleotideihin, joita ei ole muutettu kohdejuostekopioiksi 1, tai pestään alustasysteemiä mainittujen aikaisempien juosteiden poistamiseksi,

(v) samanaikaisesti,

(a) käyttäen kiinteään alustaan immobilisoituja kohdejuostekopioita 1 malleina muodostetaan (alukkeista, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1) kohdejuoste-

kopioita 2, jotka käsittävät halutun nukleiinihappojärjestyksen, ja

(b) käyttäen kohdejuosteita malleina, mikäli ne on hybridisoitu immobilisoituihin oligonukleotideihin, muodostetaan ainakin osa kohdejuostelisäkopioista 1, ja (tarvittaessa) saatetaan kohdejuostekopioiden 1 muodostus loppuun,

(vi) denaturoidaan kohdejuostekopiot 2, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1, ja uudelleenhybridisoidaan kohdejuostekopiot 2 alustalla oleviin oligonukleotideihin, joita ei ole muutettu kohdejuostekopioiksi 1,

(vii) samanaikaisesti,

(a) käyttäen malleina kohdejuostekopioita 1, jotka on immobilisoitu kiinteään alustaan, muodostetaan (alukkeista, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1) kohdejuostekopioita 2, jotka käsittävät halutun nukleiinihappojärjestyksen, ja

(b) käyttäen malleina kohdejuostekopioita 2, muodostetaan ainakin osa kohdejuosteiden 1 lisäkopioista, ja (tarvittaessa) suoritetaan loppuun kohdejuostekopioiden 1 valmistus, ja

(viii) toistetaan vaiheet (vi) ja (vii) riittävän monta kertaa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteä alustasysteemi on partikkelisysteemi ja oligonukleotidit on immobilisoitu partikkeleihin.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että partikkelit ovat ei-huokoista piidioksidia.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että partikkelit ovat kooltaan 50 - 200 mikronia.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että oligonukleotidit kiinnittyvät sidoksella alustaan siloksaanimatriksin kautta.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteä alusta on pylväsreaktorissa, johon voidaan lisätä ja josta voidaan poistaa nestettä helposti.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kaikki tai suurin piirtein kaikki alkuperäiset oligonukleotidit, jotka on immobilisoitu alustiin, muutetaan kohdejuostekopioiksi 1.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että alustalla olevat oligonukleotidit ovat järjestäytyneet siten, että niitä voidaan pidentää, käyttäen mallina kohdejuostetta tai kohdejuostekopiota 2, joka on hybridisoitu siihen, kohdejuostekopion 1 valmistamiseksi.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteä alustasysteemi käsittää kaksi erilaista immobilisoitua oligonukleotidia, jotka kumpikin ovat järjestäytyneet patenttivaatimuksen 8 mukaisesti, ja toinen oligonukleotidi on sellainen, että se hybridisoituu toiseen kaksisäikeisen nukleiinihapon juosteista ja toinen oligonukleotidi sellainen, että se hybridisoituu toiseen kaksisäikeisen nukleiinihapon juosteeseen.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdejuostekopiot 1 valmistetaan hybridisoimalla aluke kohdejuosteeseen tai kohdejuostekopioihin 2, jotka on hybridisoitu immobilisoituun oligonukleotidiin, sen jälkeen pidentämällä aluke vaiheissa (v)(b) ja (vi)(b) takaisin kohti oligonukleotidia, johon sen sitten yhdistetään kohdejuostekopion 1 valmistuksen loppuun saattamiseksi.

11. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteä alustasysteemi käsittää kaksi erilaista immobilisoitua oligonukleotidia, jotka kumpikin ovat järjestäytyneet patenttivaatimuksen 8 mukaisesti, ja toinen oligonukleotidi on sellainen, että se hybridisoituu toiseen kaksisäikeisen nukleiinihapon juosteista ja toinen oligonukleotidi sellainen, että se hybridisoituu toiseen kaksisäikeisen nukleiinihapon juosteeseen.

12. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteä alustasysteemi käsittää kaksi immobilisoitua oligonukleotidia, jotka käsittävät

(i) ensimmäisen oligonukleotidin, joka voidaan itse pidentää, jolloin muodostuu kohdejuostekopio 1, ja

(ii) toisen oligonukleotidin (kohdejuostekopion 1 valmistamiseksi), joka täytyy yhdistää kohdejuosteeseen hydridisoidun alukkeen jatketuotteeseen.

13. Menetelmä kopioiden valmistamiseksi vähintään osasta nukleiinihappojuostetta, jota on mukana tai on mahdollisesti mukana näytteessä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet

(i) otetaan kiinteä alustasysteemi, johon on immobilisoitu useita kutakin kahta erilaista yksisäikeistä oligonukleotidia 0 ja 0^1, joista kukin pystyy hybridisoitumaan vastaavaan toiseen kahdesta kaksisäikeisen nukleiinihapon vastinjuosteesta, ja mainittujen vastinjuosteiden avulla saadaan kohdejuosteet 1 ja 1^1,

(ii) otetaan kohdejuosteet 1 ja 1^1 yksisäikeisessä muodossa ja hybridisoidaan kohdejuosteet alustalla oleviin oligonukleotideihin, ja oligonukleotidien määrä on oleellisesti suurempi kuin kohdejuosteiden lukumäärä,

(ii) (a) pestään alustasysteemi ei-hybridisoituneen aineen poistamiseksi,

(iii) valmistetaan kohdejuostekopiot 1 ja 1^1, jotka kumpikin käsittävät immobilisoidun oligonukleotidin O ja O^1, tässä järjestyksessä, ja nukleiinihappojärjestksen, joka on vastinnukleiinihappojärjestys ainakin osalle kohdejuosteita 1 ja 1^1, tässä järjestyksessä, ja mainitut kohdejuostekopiot 1 ja 1^1 valmistetaan ainakin osittain käyttäen malleina vastaavia kohdejuosteita, jolloin muodostuu vähintään osa kohdenukleotidijärjestyskopioista 1 ja 1^1, ja tarvittaessa saatetaan kohdenukleotidijärjestyksen 1 kopion ja/tai kohdenukleotidijärjestyksen 1^1 kopion valmistus päätökseen,

(iv) denaturoidaan kohdejuosteet 1 ja 1^1, jotka ovat hybridisoituneet kohdejuosteisiin 1 ja 1^1, ja joko uudelleenhybridisoidaan kohdejuosteet 1 ja 1^1 alustalla oleviin oligonukleotideihin, joita ei ole muutettu kohdejuostekopioiksi 1 tai 1^1, tai pestään alustasysteemi kohdejuosteiden 1 ja 1^1 poistamiseksi,

(v) samanaikaisesti,

(a) käyttäen kiinteään alustaan immobilisoituja kohdejuostekopioita 1 ja 1^1 malleina muodostetaan (alukkeista, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1 ja 1^1) kohdejuostekopioita 2, tässä järjestyksessä, ja

(b) käyttäen kohdejuosteita 1 ja 1^1 malleina, mikäli ne on hybridisoitu immobilisoituihin oligonukleotideihin, muodostetaan ainakin osa kohdejuostelisäkopioista 1 ja 1^1, ja (tarvittaessa) saatetaan kohdejuostekopioiden 1 muodostus loppuun,

(vi) denaturoidaan kohdejuostekopiot 2 ja 2', jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1 ja 1', ja uudelleenhybridisoidaan kohdejuostekopiot 2 ja 2' alustalla oleviin oligonukleotideihin, joita ei ole muutettu kohdejuostekopioiksi,

(vii) samanaikaisesti,

(a) käyttäen malleina kohdejuostekopioita 1 ja 1', jotka on immobilisoitu kiinteään alustaan, muodostetaan (alukkeista, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1 ja 1') kohdejuostekopioita 2 ja 2', jotka käsittävät halutun nukleiinihappojärjestyksen, ja

(b) käyttäen malleina kohdejuostekopioita 2 ja 2', muodostetaan ainakin osa kohdejuosteiden 1 ja 1' lisäkopioista, ja (tarvittaessa) suoritetaan loppuun kohdejuostekopioiden 1 ja 1' valmistus, ja

(viii) toistetaan vaiheet (vi) ja (vii) riittävän monta kertaa.

14. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää edelleen seuraavat vaiheet

(vii) hybridisoidaan alukkeet kohdejuostekopioihin 1 sellaisiin kohtiin, että alukkeiden jatketuotteet, käyttäen malleina kohdejuostekopioita 1, käsittävät halutun nukleotidijärjestyksen,

(viii) pidennetään alukkeita, käyttäen malleina kohdejuostekopioita 1, ja

(ix) denaturoidaan juostetuotteet kohdejuostekopioista 1 ja otetaan talteen juostetuotteet.

15. Menetelmä kopioiden valmistamiseksi ainakin osasta nukleiinihappojuostetta ("kohdejuoste"), jota on mukana tai on mahdollisesti mukana näytteessä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

(i) otetaan kiinteä alustasysteemi, johon on immobilisoitu useita yksisäikeisiä oligonukleotideja, jotka voivat hybridisoitua kohdejuosteisiin,

(ii) otetaan kohdejuosteita, jotka ovat yksisäikeisessä muodossa, ja hybridisoidaan kohdejuosteet alustalla oleviin oligonukleotideihin, ja oligonukleotidien lukumäärä on oleellisesti suurempi kuin kohdejuosteiden lukumäärä,

(ii) (a) pestään alustasysteemi ei-hybridisoituneen aineen poistamiseksi,

(iii) valmistetaan kohdejuostekopioita 1, jotka käsittävät immobilisoidut oligonukleotidit ja joissa nukleiinihappojärjestys on vastinnukleiinihappojärjestys ainakin kohdejuosteen osan suhteen, ja mainitut kohdejuostekopiot 1 valmistetaan ainakin osittain käyttäen mallina kohdejuostetta, jolloin muodostetaan vähintään osa kohdenukleotidijärjestyskopiota 1, ja tarvittaessa suoritetaan kohdenukleotidijärjestyskopion 1 muodostus loppuun,

(iv) denaturoidaan juosteet, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1, ja joko uudelleenhybridisoidaan aikaisemmat juosteet alustalla oleviin oligonukleotideihin, joita ei ole muutettu kohdejuostekopioiksi 1, tai pestään alustasysteemiä mainittujen aikaisempien juosteiden poistamiseksi,

(v) samanaikaisesti,

(a) käyttäen kiinteään alustaan immobilisoituja kohdejuostekopioita 1 malleina muodostetaan (alukkeista, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1) kohdejuostekopioita 2, jotka käsittävät halutun nukleiinihappojärjestyksen, ja

(b) käyttäen kohdejuosteita malleina, mikäli ne on hybridisoitu immobilisoituihin oligonukleotideihin, muodostetaan ainakin osa kohdejuostelisäkopioista 1, ja (tarvittaessa) saatetaan kohdejuostekopioiden 1 muodostus loppuun,

(vi) denaturoidaan kohdejuostekopiot 2, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1, ja uudelleenhybridisoidaan kohdejuostekopiot 2 alustalla oleviin oligonukleotideihin, joita ei ole muutettu kohdejuostekopioiksi 1,

(vii) samanaikaisesti,

(a) käyttäen malleina kohdejuostekopioita 1, jotka on immobilisoitu kiinteään alustaan, muodostetaan (alukkeista, jotka on hybridisoitu kohdejuostekopioihin 1) koh-

dejuostekopioita 2, jotka käsittävät halutun nukleiinihappojärjestyksen, ja

(b) käyttäen malleina kohdejuostekopioita 2, muodostetaan ainakin osa kohdejuosteiden 1 lisäkopioista, ja (tarvittaessa) suoritetaan loppuun kohdejuostekopioiden 1 valmistus, ja

(viii) toistetaan vaiheet (vi) ja (vii) riittävän monta kertaa.

(ix) hybridisoidaan alukkeet kohdejuostekopioihin 1 sellaisiin kohtiin, että alukkeiden jatketuotteet, käyttäen malleina kohdejuostekopioita 1, käsittävät halutun nukleotidijärjestyksen,

(x) pidennetään alukkeita, käyttäen malleina kohdejuostekopioita 1, ja

(xi) denaturoidaan juostetuotteet kohdejuostekopioista 1 ja otetaan talteen juostetuotteet.

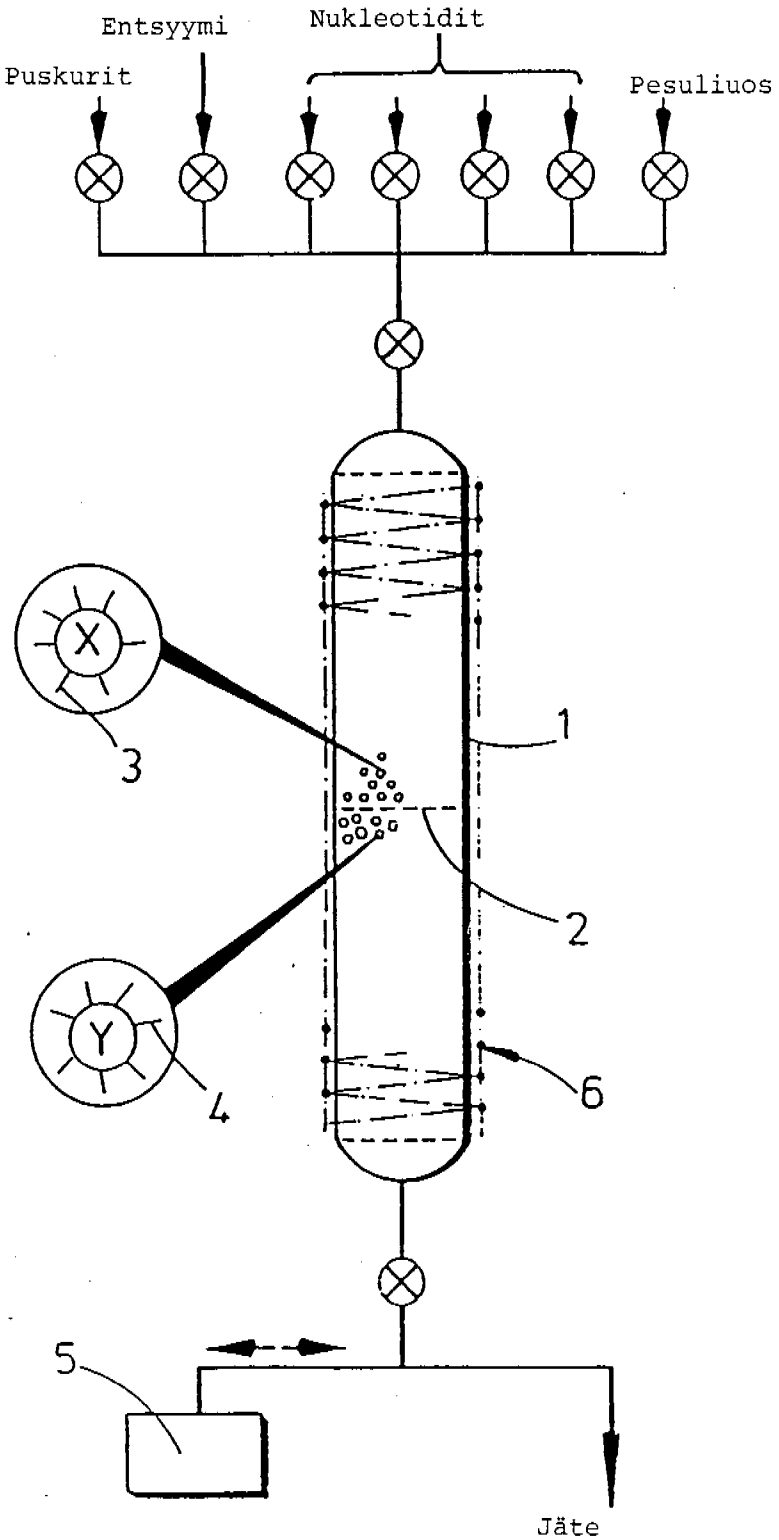


FIG. 1

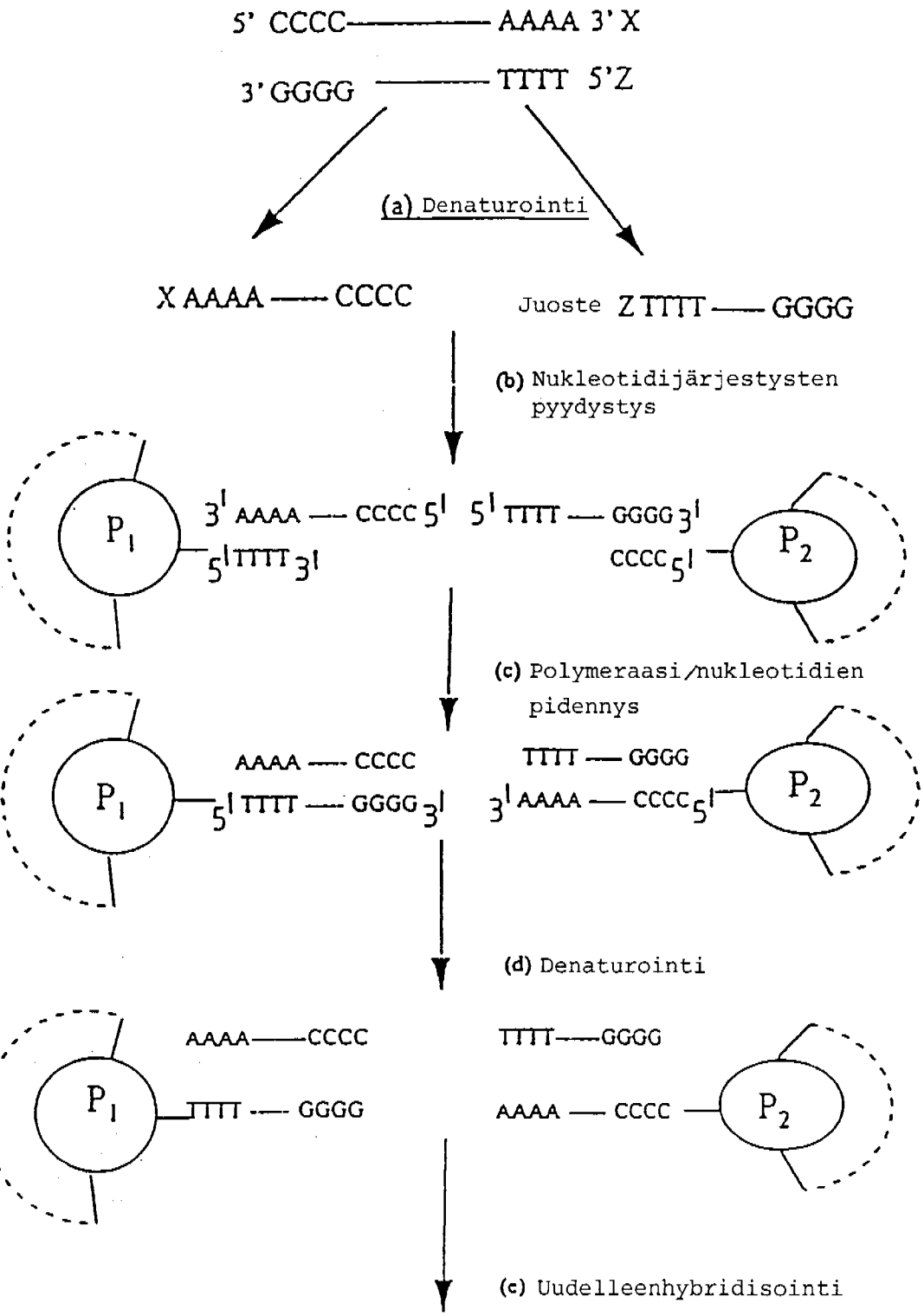

5' CCCC AAAA 3' X
3' GGGG TTTT 5' Z
(a) Denaturointi
X AAAA CCCC
Juoste Z TTTT GGGG
(b) Nukleotidijärjestysten pyydystys
P1
3' AAAA CCCC 5'
5' TTTT 3'
5' TTTT GGGG 3'
CCCC 5'
P2
(c) Polymeraasi/nukleotidien pidennys
AAAA CCCC
5' TTTT GGGG 3'
TTTT GGGG
3' AAAA CCCC 5'
(d) Denaturointi
AAAA CCCC
TTTT GGGG
TTTT GGGG
AAAA CCCC
(e) Uudelleenhybridisointi

FIG. 2

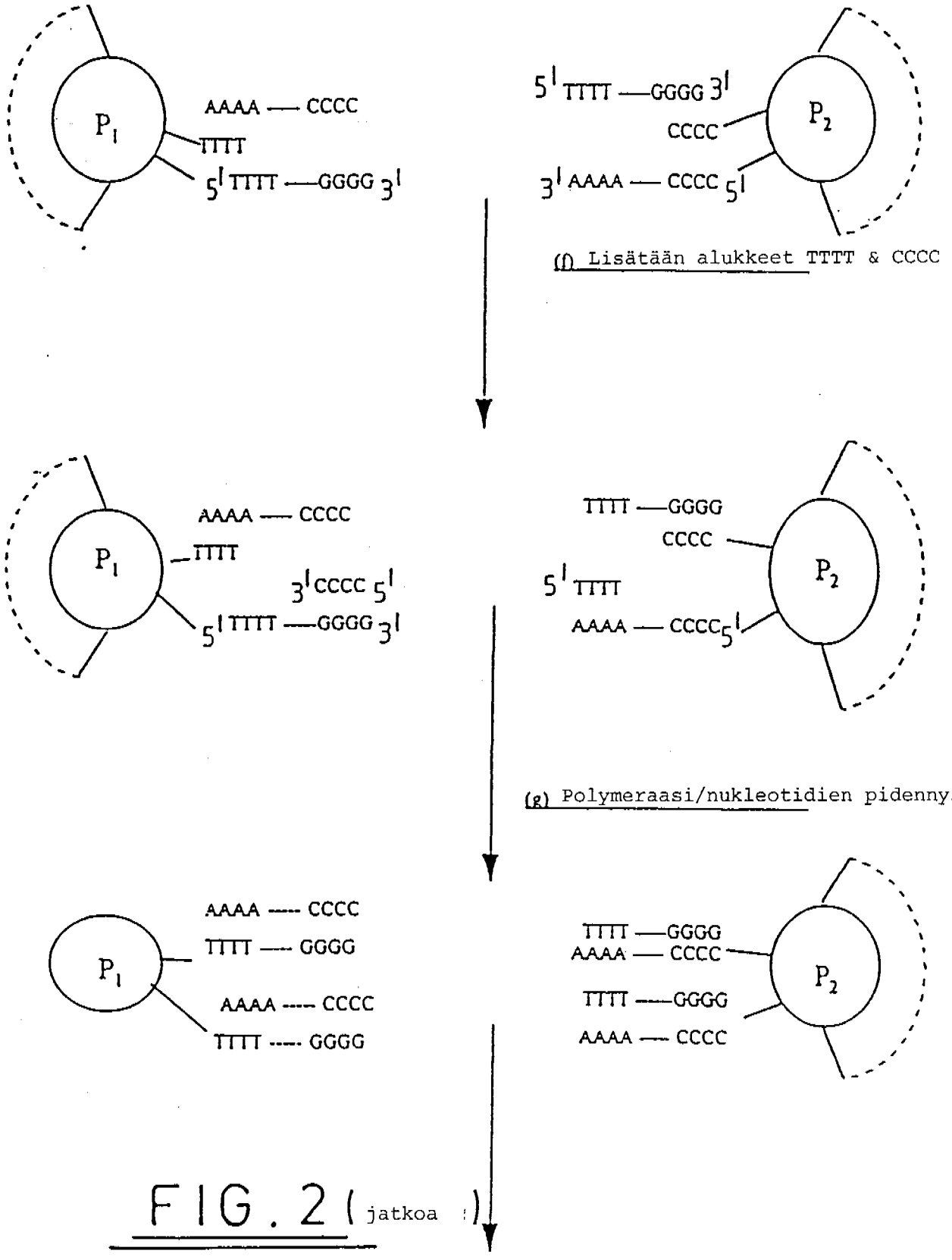


FIG. 2 (jatkoa)

Toistetaan vaiheet (d) - (g)

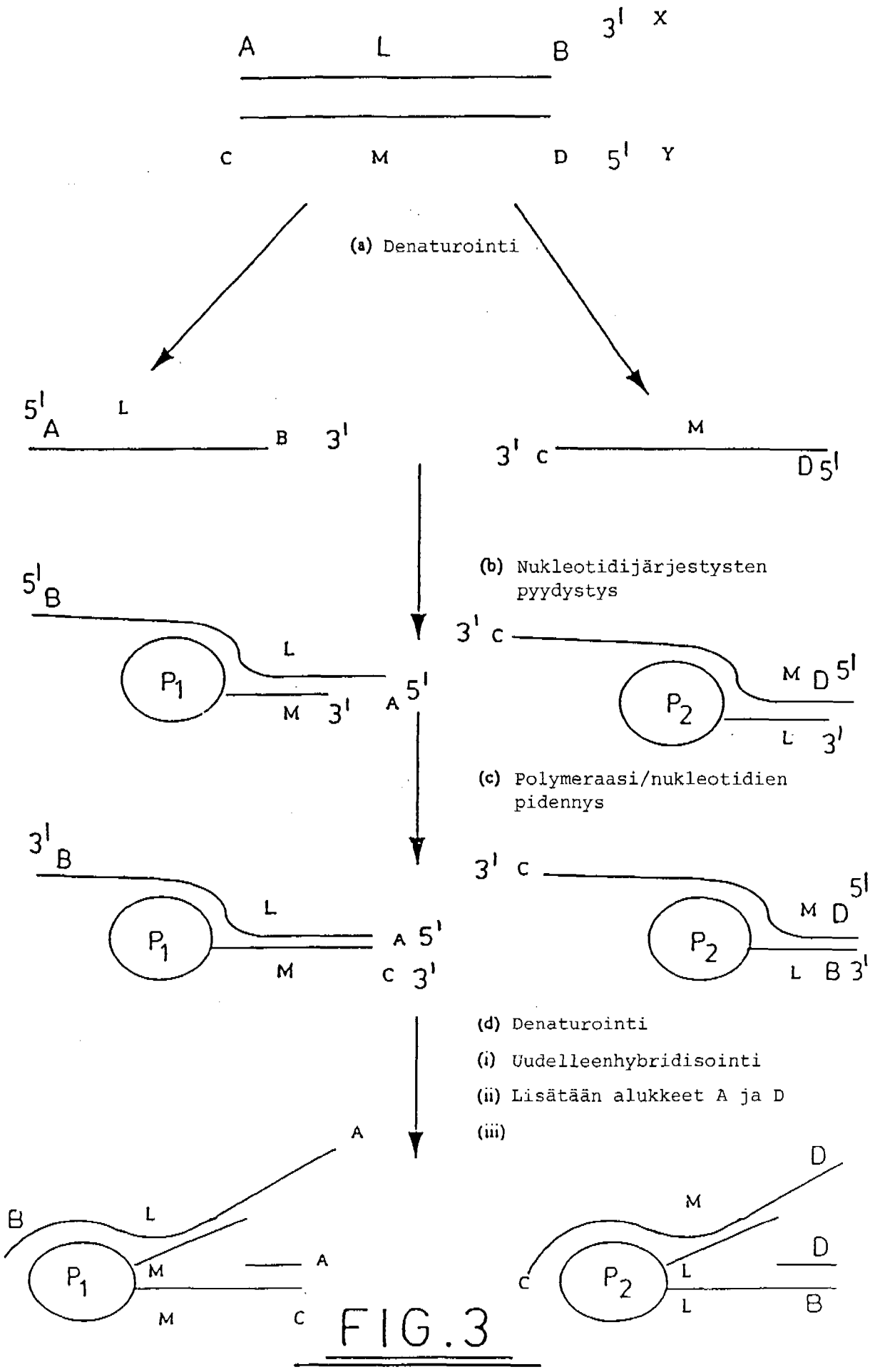

A L B 3' X
C M D 5' Y
(a) Denaturointi
5' A L B 3'
3' C M D 5'
(b) Nukleotidijärjestysten pyydystys
5' B L P1 M 3' A 5'
3' C M D 5' P2 L 3'
(c) Polymeraasi/nukleotidien pidennys
3' B L P1 M A 5' C 3'
3' C M D 5' P2 L B 3'
(d) Denaturointi
(i) Uudelleenhybridisointi
(ii) Lisätään alukkeet A ja D
(iii)
A B L P1 M M A C
D M C P2 L L D B

FIG. 3

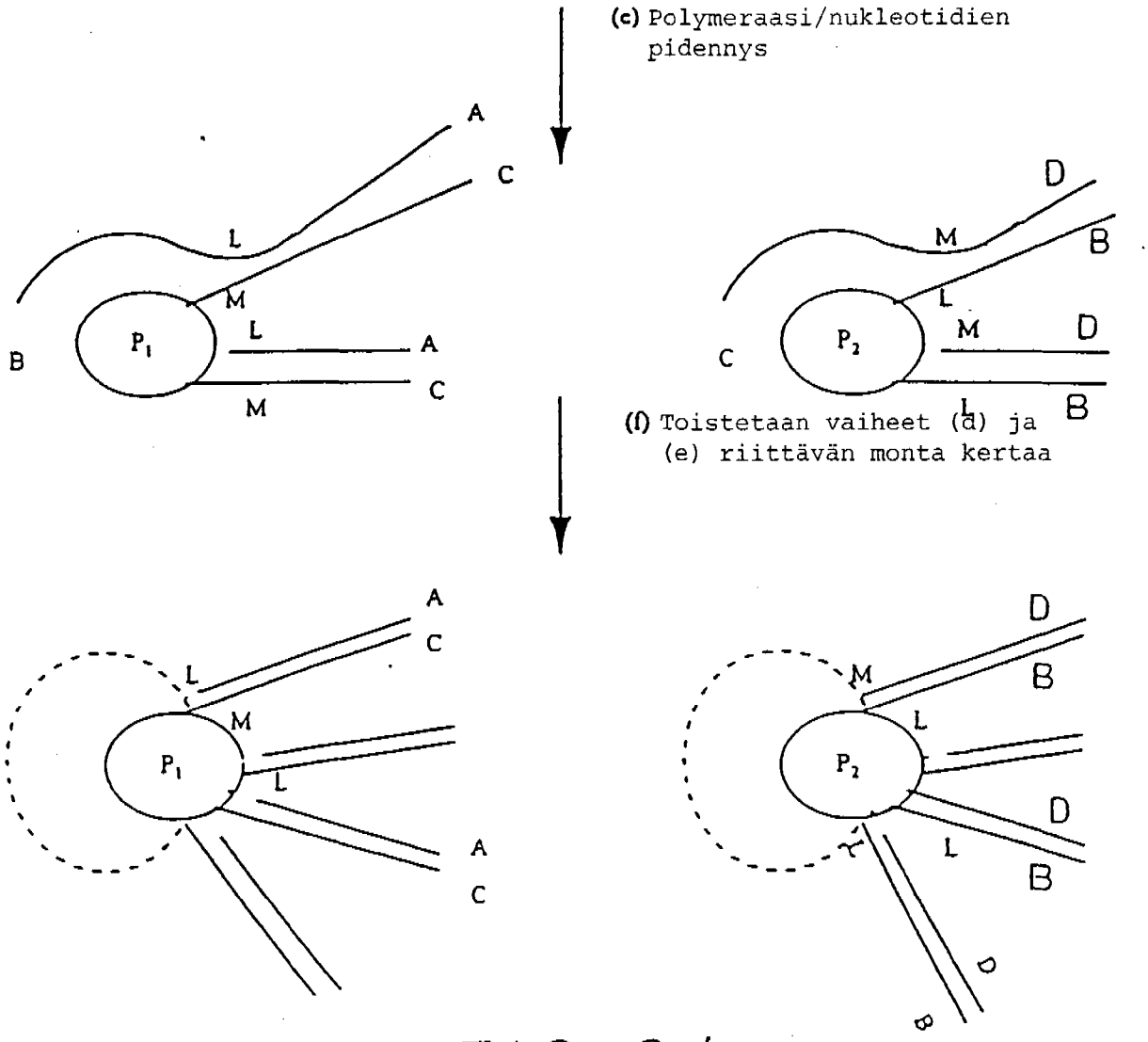

(c) Polymeraasi/nukleotidien pidennys
A
C
L
M
L
P1
B
A
C
M
D
B
M
L
P2
C
M
D
L
B
(f) Toistetaan vaiheet (d) ja (e) riittävän monta kertaa
A
C
L
M
P1
L
A
C
D
B
M
L
P2
D
L
B
D
B

FIG. 3 (jatkoa)

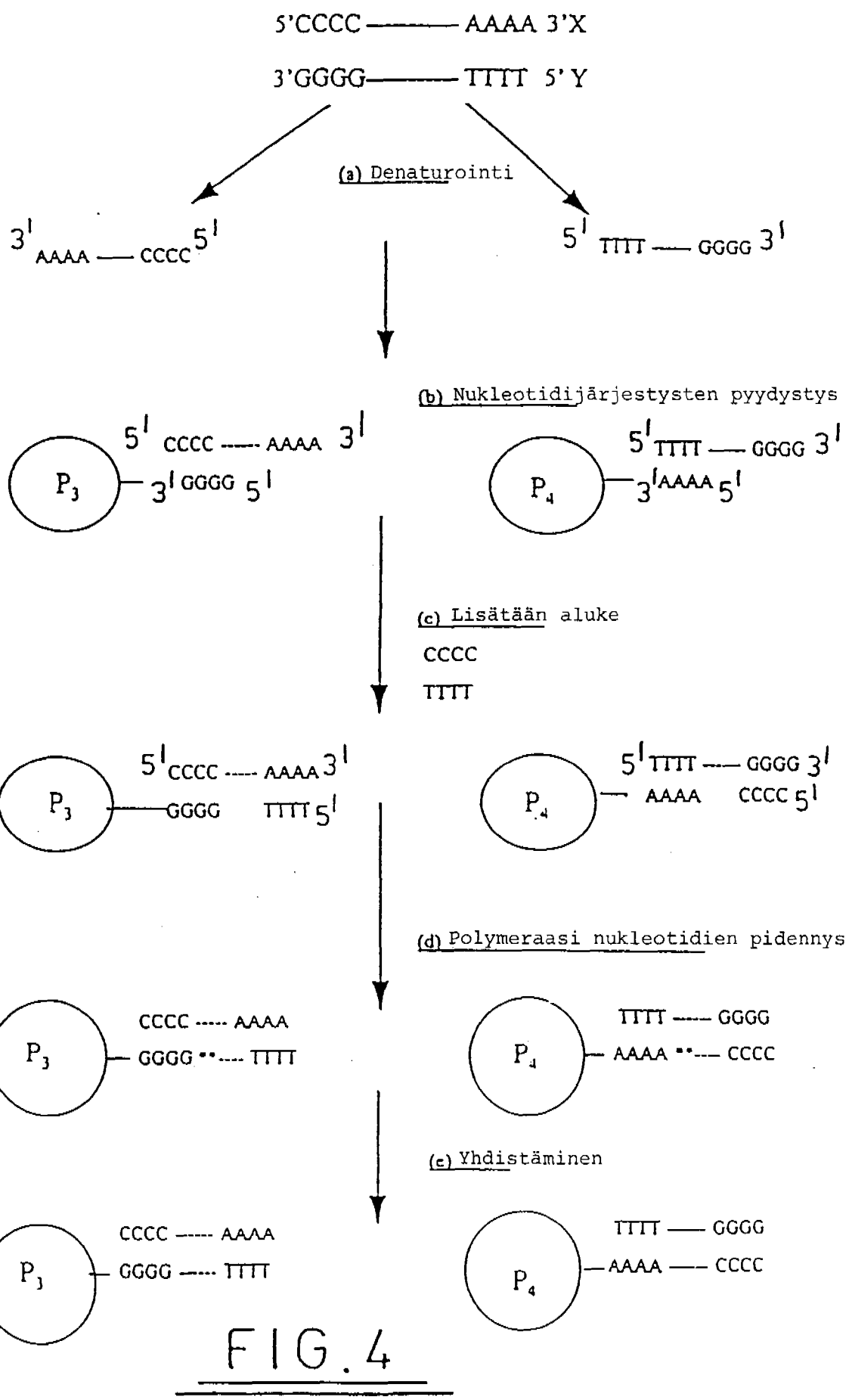

5'CCCC ——— AAAA 3'X
3'GGGG ——— TTTT 5'Y
(a) Denaturointi
3' AAAA — CCCC 5'
5' TTTT — GGGG 3'
(b) Nukleotidijärjestysten pyydystys
P3
5' CCCC ---- AAAA 3'
3' GGGG 5'
P4
5' TTTT — GGGG 3'
3' AAAA 5'
(c) Lisätään aluke
CCCC
TTTT
P3
5' CCCC ---- AAAA 3'
GGGG TTTT 5'
P4
5' TTTT — GGGG 3'
AAAA CCCC 5'
(d) Polymeraasi nukleotidien pidennys
P3
CCCC ----- AAAA
GGGG ••---- TTTT
P4
TTTT ----- GGGG
AAAA ••--- CCCC
(e) Yhdistäminen
P3
CCCC ----- AAAA
GGGG ----- TTTT
P4
TTTT —— GGGG
AAAA —— CCCC

FIG. 4

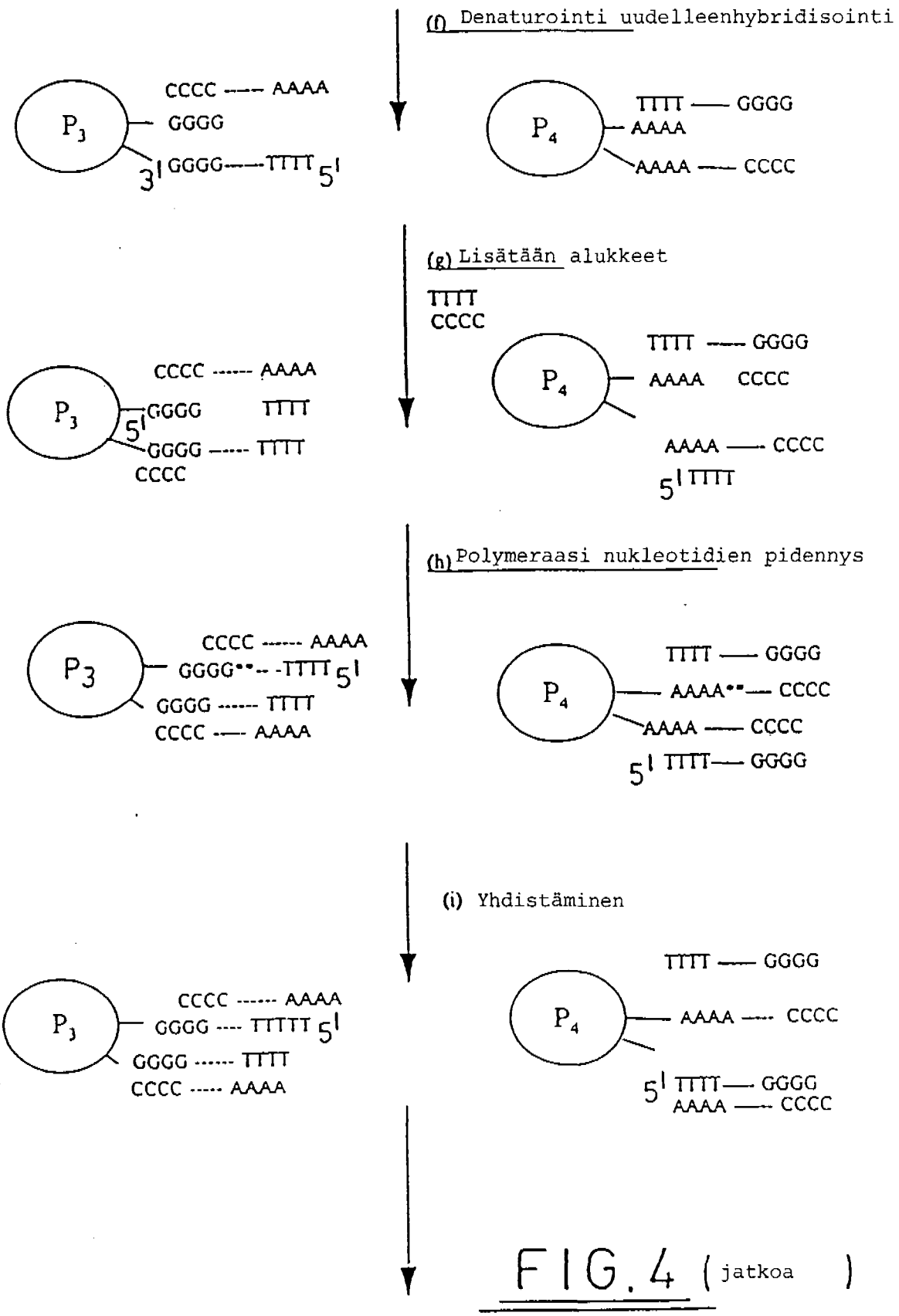


FIG. 4 (jatkoa)

Toistetaan vaiheet (f) - (i)

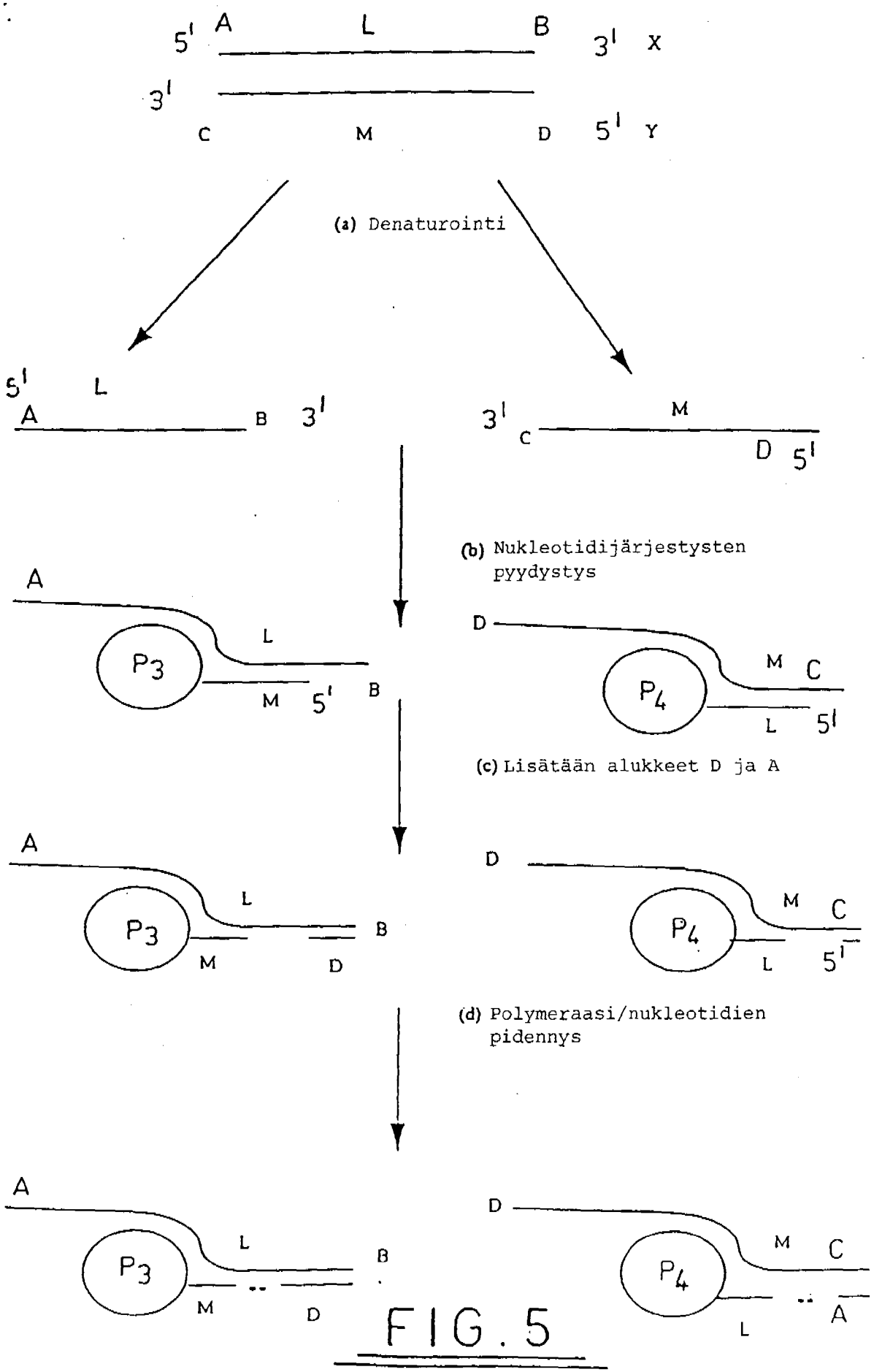

5' A L B 3' X
3'
C M D 5' Y
(a) Denaturointi
5' L
A B 3'
3' C M
D 5'
(b) Nukleotidijärjestysten pyydystys
A
P3
L
M 5' B
D
P4
M C
L 5'
(c) Lisätään alukkeet D ja A
A
P3
L
M D B
D
P4
M C
L 5'
(d) Polymeraasi/nukleotidien pidennys
A
P3
L
M D B
D
P4
M C
L A

FIG. 5

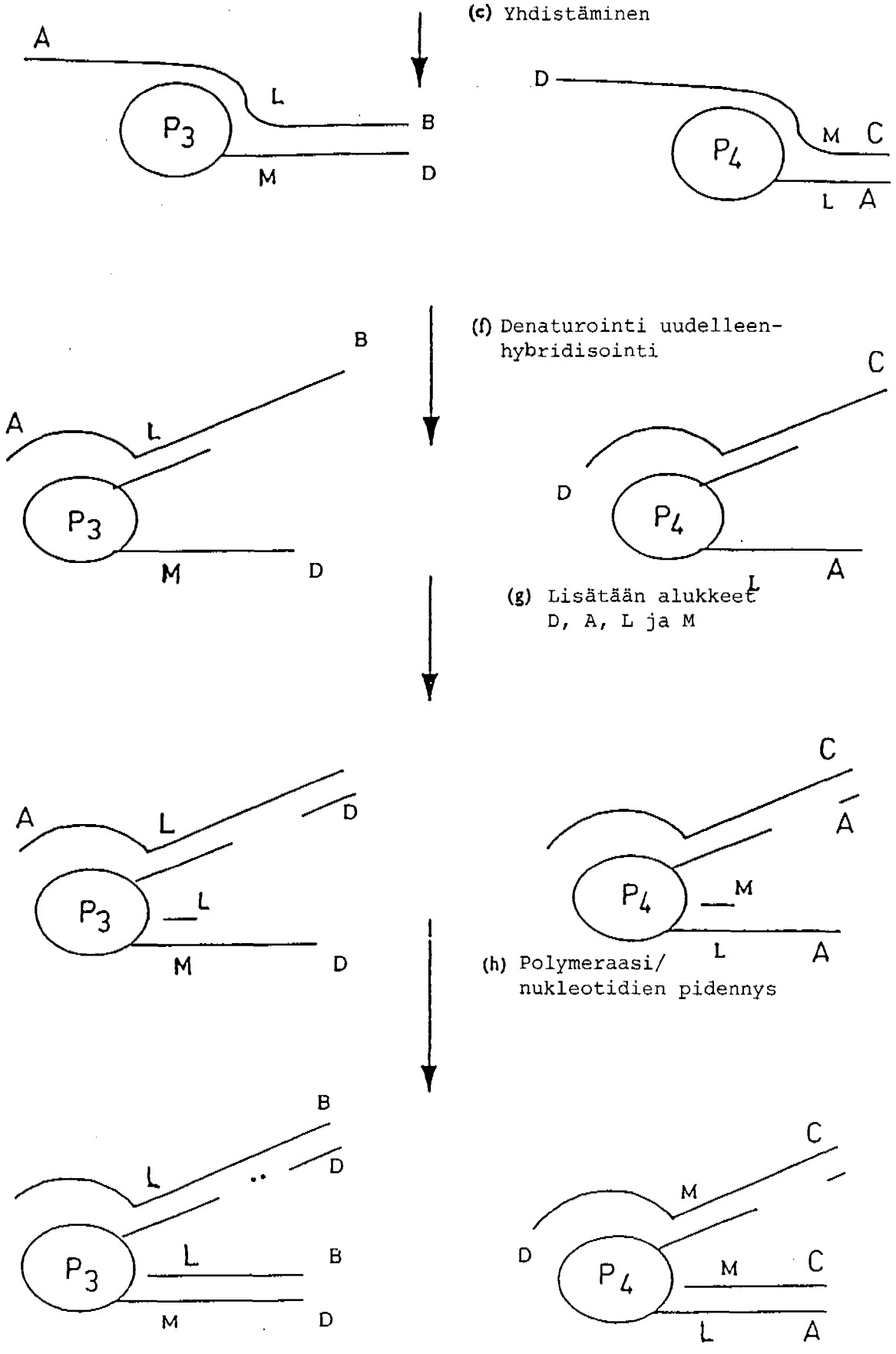

(c) Yhdistäminen
A
L
P3
B
M
D
D
M C
P4
L A
(f) Denaturointi uudelleen-
hybridisointi
B
A
L
P3
M
D
C
D
P4
L
A
(g) Lisätään alukkeet
D, A, L ja M
A
L
D
P3
L
M
D
C
A
P4
M
L
A
(h) Polymeraasi/
nukleotidien pidennys
B
L
D
P3
L
B
M
D
C
M
D
P4
M
C
L
A

FIG. 5 (jatkoa)

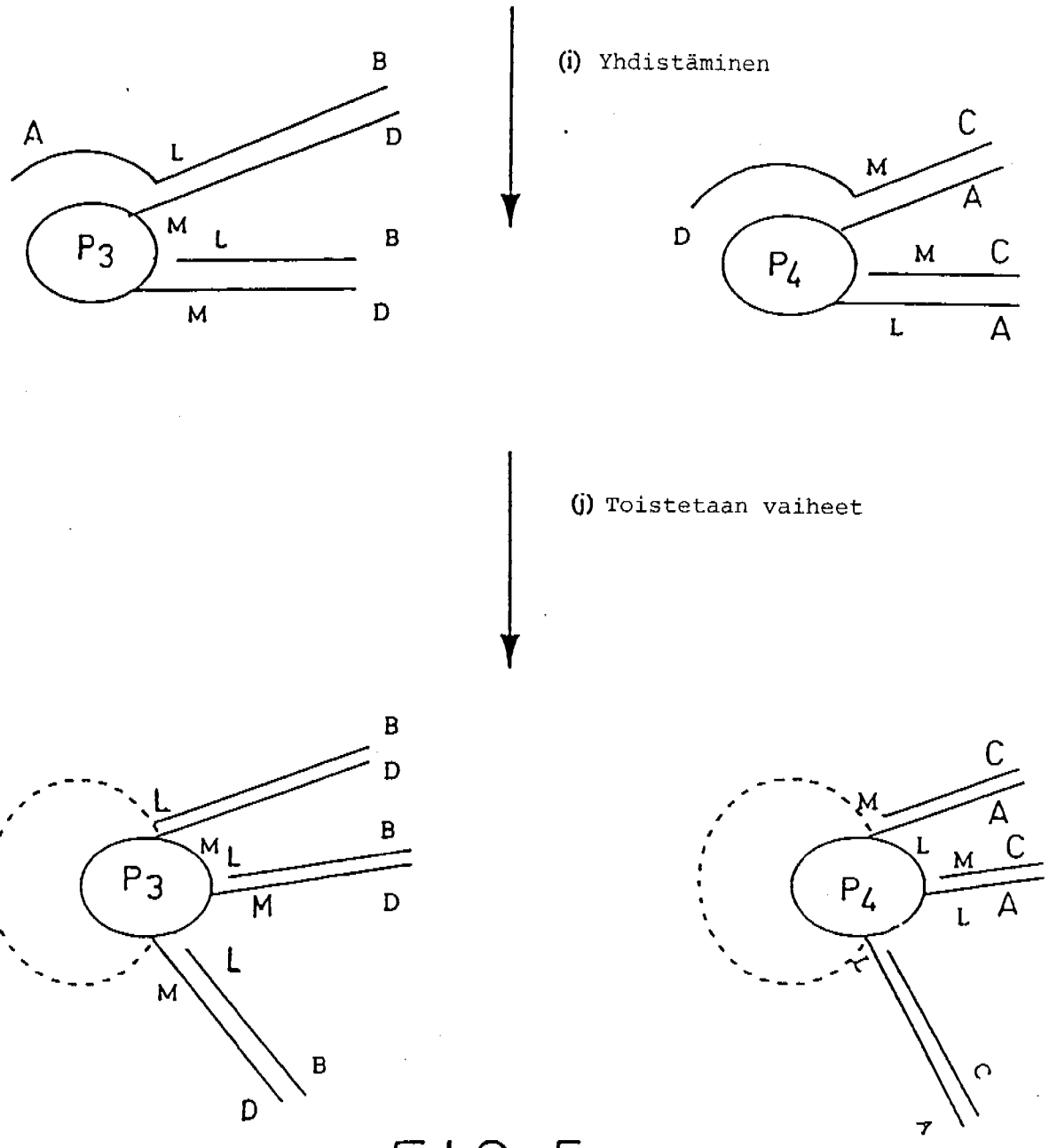

(i) Yhdistäminen
A
L
B
D
P3
M
L
B
M
D
C
M
A
D
P4
M
C
L
A
(j) Toistetaan vaiheet
L
B
D
P3
M
L
B
M
D
L
M
B
D
C
M
A
P4
L
M
C
L
A

FIG. 5 (jatkoa)

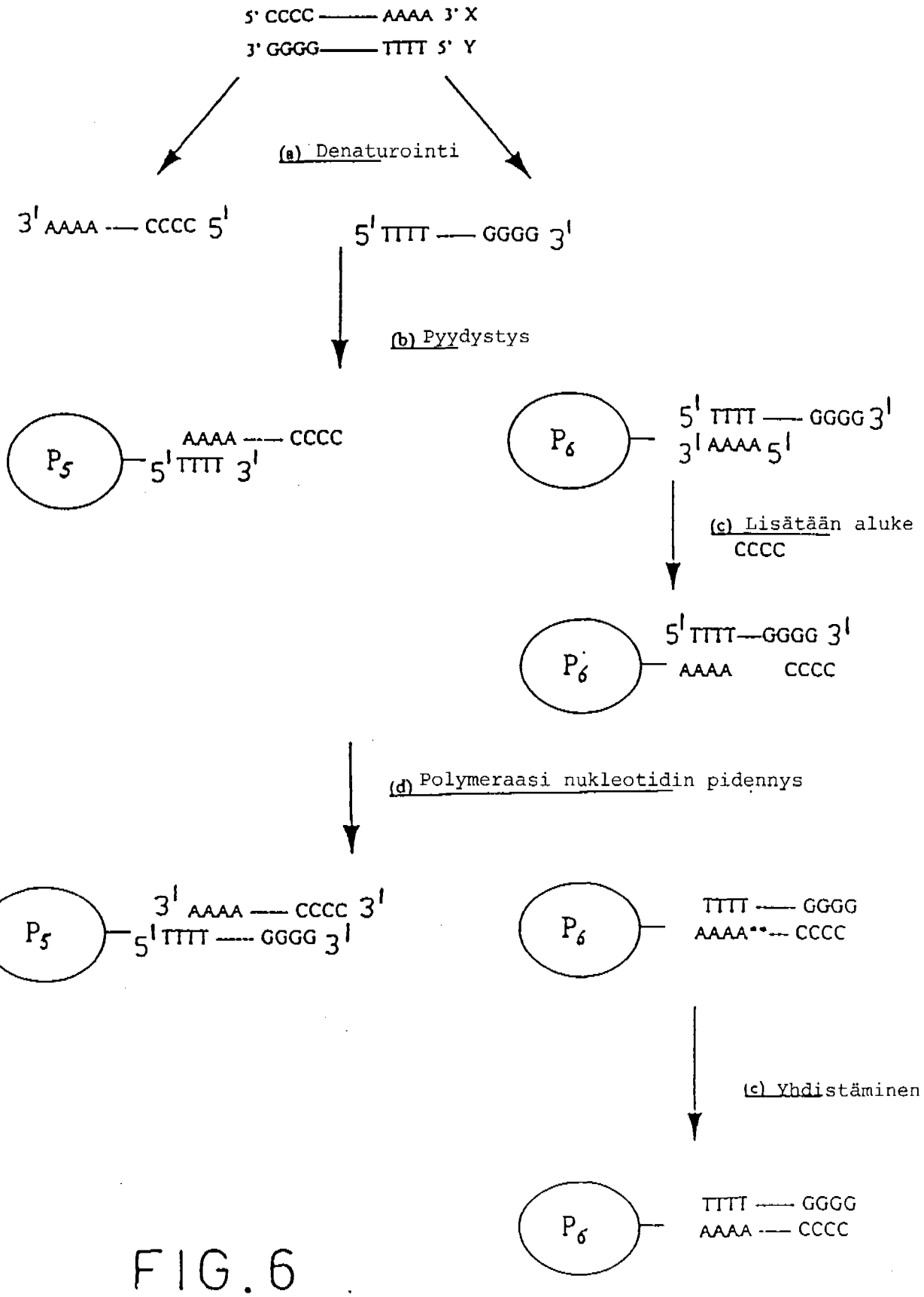
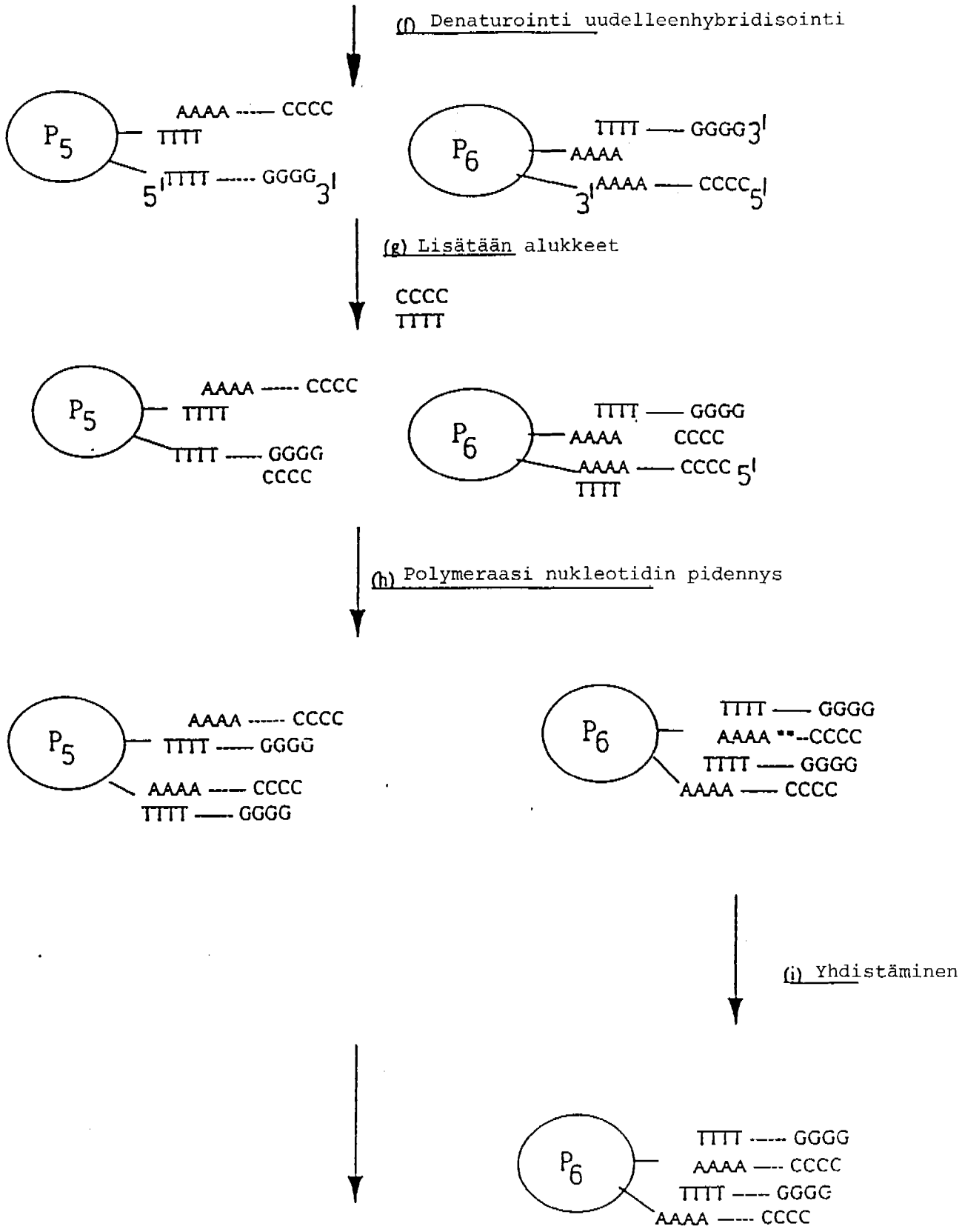

5' CCCC ——— AAAA 3' X
3' GGGG ——— TTTT 5' Y
(a) Denaturointi
3' AAAA — CCCC 5'
5' TTTT — GGGG 3'
(b) Pyydystys
P5
AAAA — CCCC
5' TTTT 3'
P6
5' TTTT — GGGG 3'
3' AAAA 5'
(c) Lisätään aluke
CCCC
P6
5' TTTT—GGGG 3'
AAAA CCCC
(d) Polymeraasi nukleotidin pidennys
P5
3' AAAA — CCCC 3'
5' TTTT — GGGG 3'
P6
TTTT — GGGG
AAAA — CCCC
(e) Yhdistäminen
P6
TTTT — GGGG
AAAA — CCCC

FIG. 6



Toistetaan vaiheet (f) ja (i) riittävän monta kertaa

FIG. 6 (jatkoa)

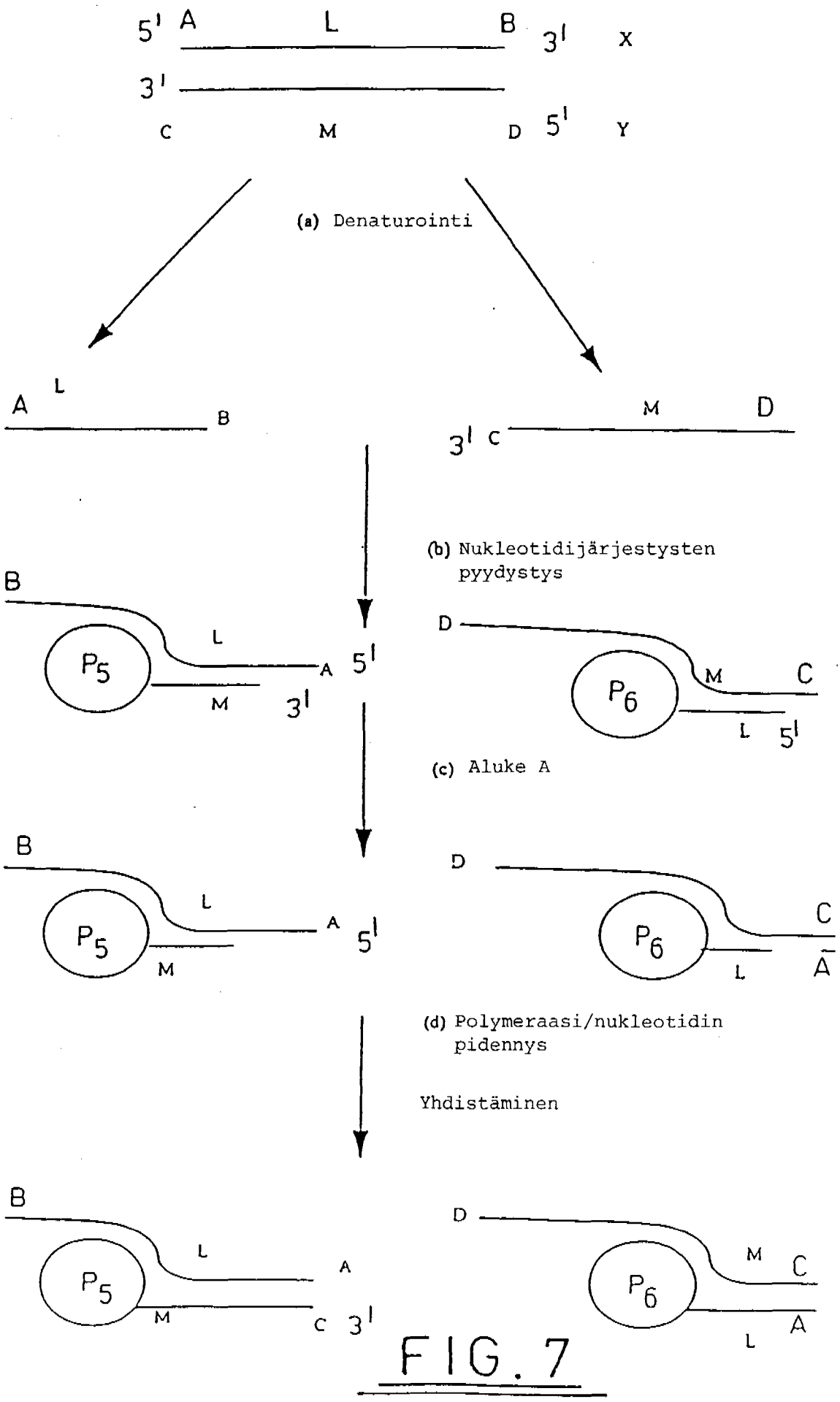

5' A L B 3' X
3'
C M D 5' Y
(a) Denaturointi
A L B
3' C M D
(b) Nukleotidijärjestysten pyydystys
B
P5
L
A
5'
M
3'
D
P6
M
C
L
5'
(c) Aluke A
B
P5
L
A
5'
M
D
P6
C
L
Ā
(d) Polymeraasi/nukleotidin pidennys
Yhdistäminen
B
P5
L
A
M
C
3'
D
P6
M
C
L
A

FIG. 7

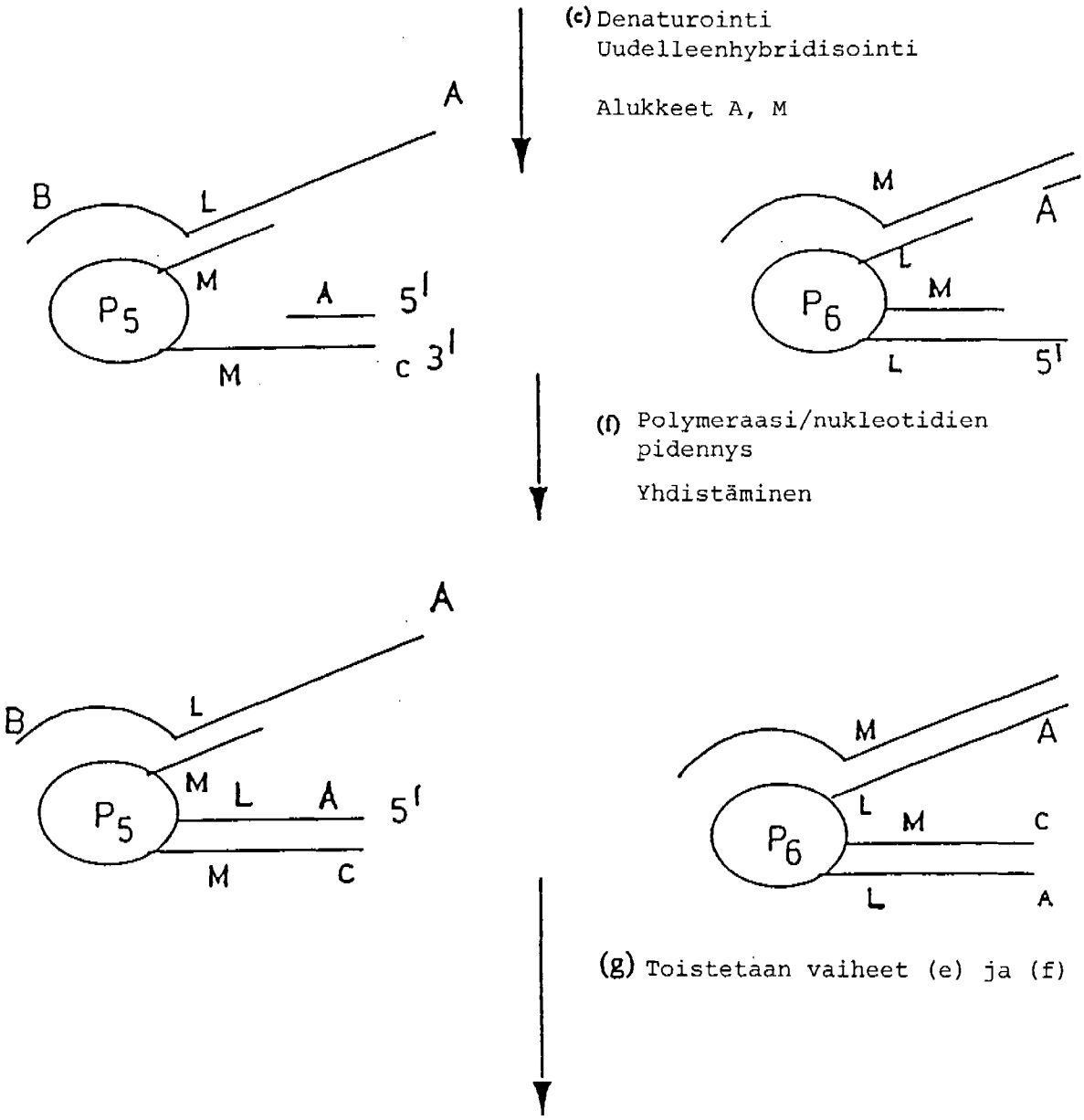

(c) Denaturointi
Uudelleenhybridisointi
Alukkeet A, M
A
B
L
M
P5
A
5'
M
C
3'
M
A
L
M
P6
L
5'
(f) Polymeraasi/nukleotidien pidennys
Yhdistäminen
A
B
L
M
L
A
5'
P5
M
C
M
A
L
M
C
P6
L
A
(g) Toistetaan vaiheet (e) ja (f)
A
C
L
A
M
L
P4
M
C
L
M
A
C
M
L
M
P6
L
C

FIG. 7 (jatkoa)

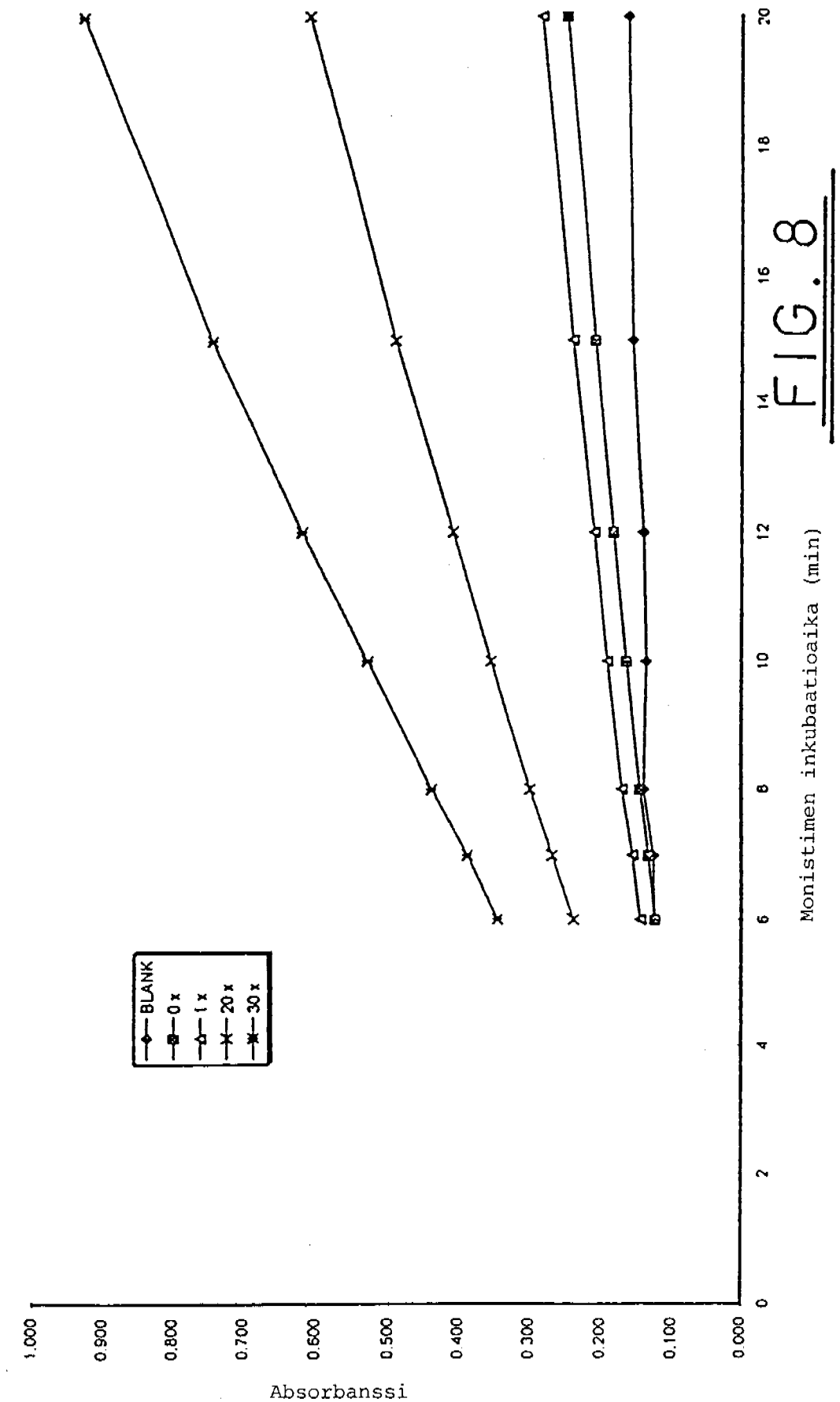

BLANK
0 x
1 x
20 x
30 x
Absorbanssi
1.000
0.900
0.800
0.700
0.600
0.500
0.400
0.300
0.200
0.100
0.000
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Monistimen inkubaatioaika (min)

FIG. 8

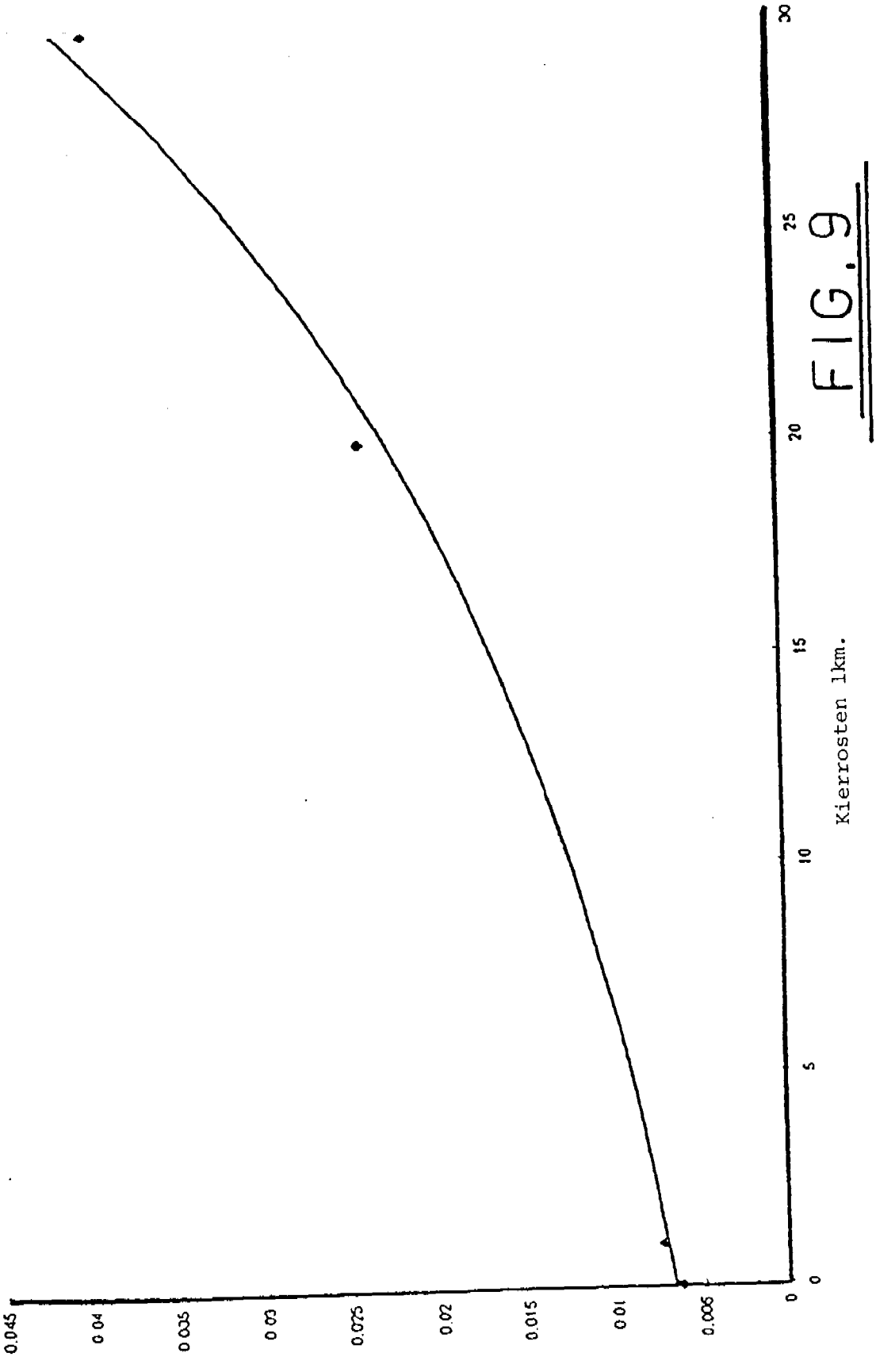

0.045
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
0
5
10
15
20
25
30
Kierrosten 1km.

FIG. 9

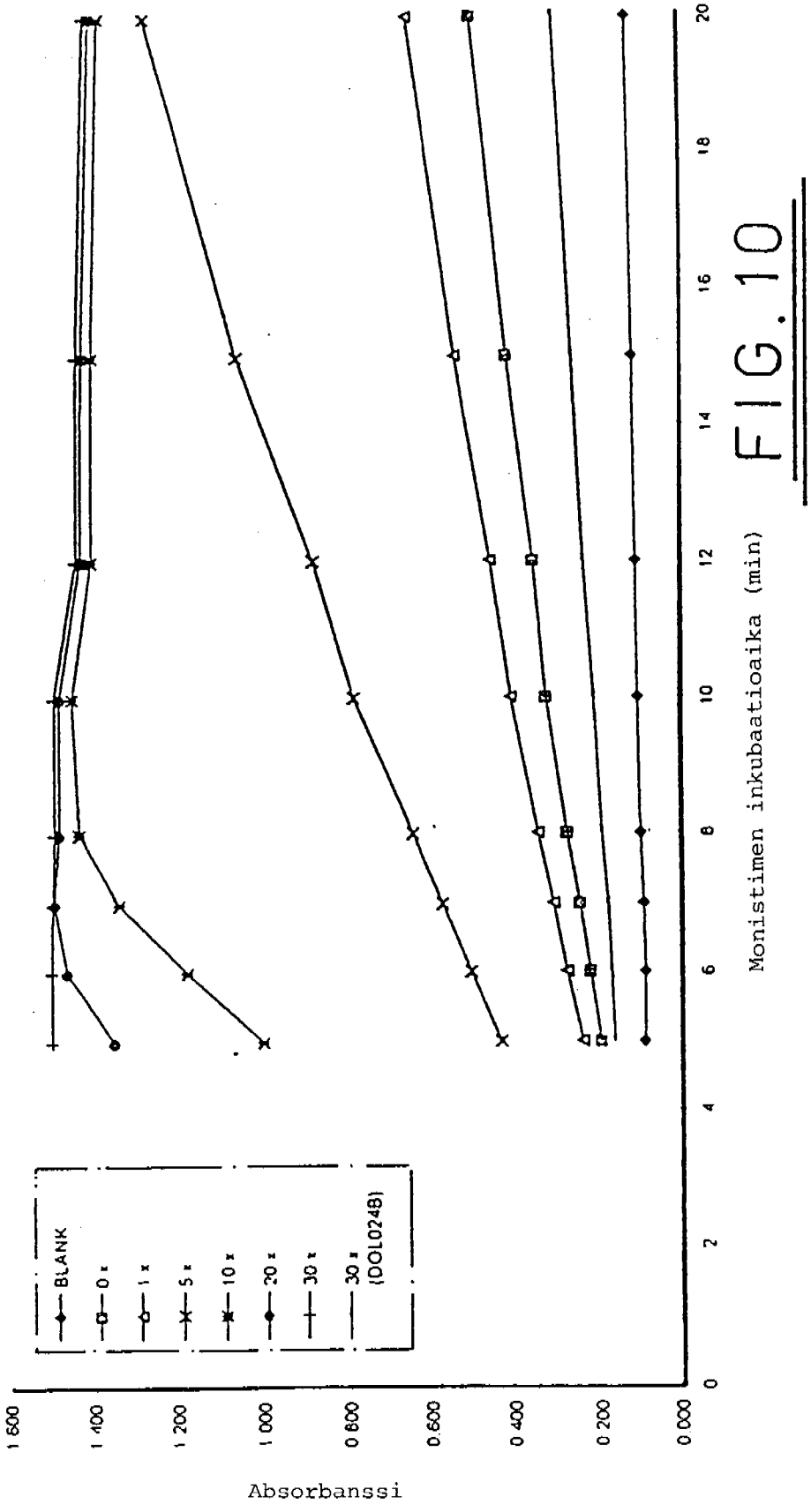

SPAS7 Chart 13
SPA (PLOT OF DATA 2)
BLANK
0 x
1 x
5 x
10 x
20 x
30 x
30 x (DOL0248)
1.600
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
Absorbanssi
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Monistimen inkubaatioaika (min)

FIG. 10

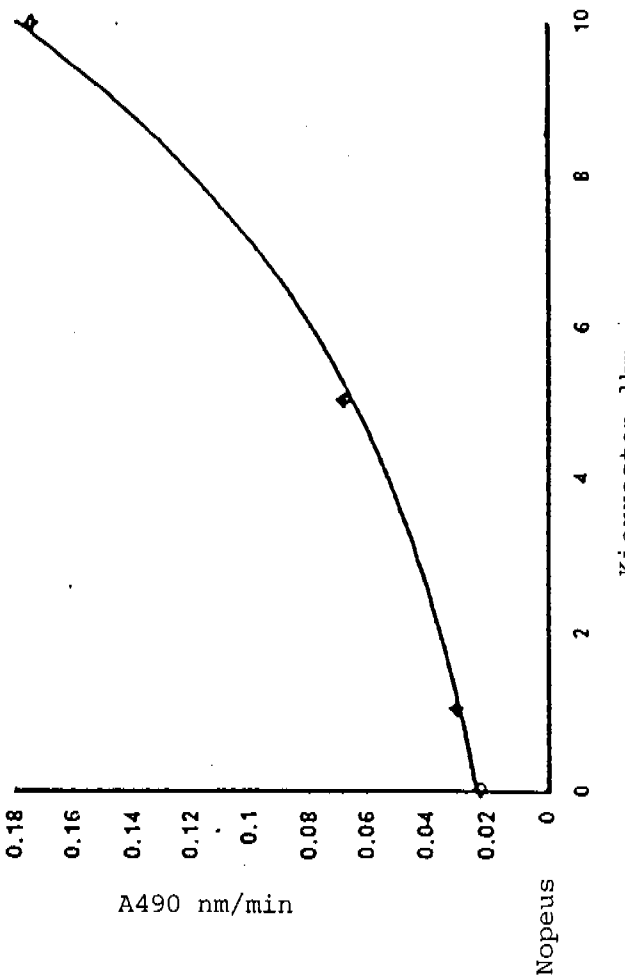

0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
A490 nm/min
0
2
4
6
8
10
Nopeus
Kierrosten lkm.

FIG.11