



FI 000100192B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 100192 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 15.10.97

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

C 12Q 1/68

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 920766

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 21.02.92

(24) Alkupäivä - Löpdag 23.08.90

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 21.02.92

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan PCT/US90/04733

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

23.08.89 US 397681 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Akzo Nobel N.V., Velperweg 76, 6824 BM Arnhem, Netherlands, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Malek, Lawrence T., 4 Sproule Drive, Brampton, Ontario L6V 4A5, Canada, (CA)
2. Davey, Cheryl, 35 Old Orchard Grove, Toronto, Ontario M5M 2C8, Canada, (CA)
3. Henderson, Graham, 1110 Walden Circle, Unit #906, Mississauga, Ontario L5G 4R3, Canada, (CA)
4. Sooknanan, Roy, 343 Cedervale Avenue, Toronto, Ontario M4C 4K5, Canada, (CA)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab, Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Parannettu nukleiinihappojen vahvistusmenetelmä ja siinä käytettävä reaktioväliaine
Förbättrat förfarande för förstärkning av nukleinsyror och i detta användbar
reaktionsmedium

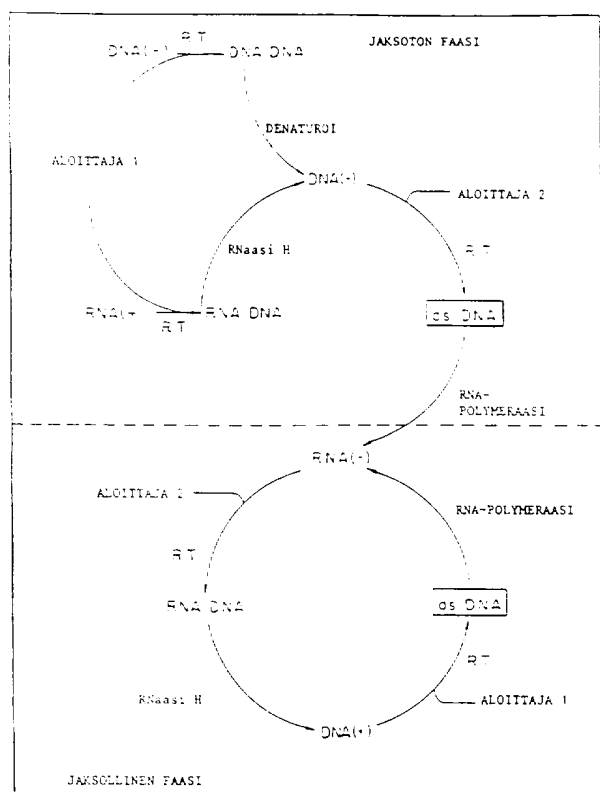
(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 911877 (C 12Q 1/68), FI A 912885 (C 12N 15/10), EP A 200362 (C 12Q 1/68),
 EP A 201184 (C 12P 19/34), EP A 272098 (C 12Q 1/68), EP A 303155 (C 12Q 1/68),
 EP A 310229 (C 12Q 1/68), WO A 88/10315 (C 12Q 1/68), WO A 89/06700 (C 12Q 1/68),
 The Journal of Biological Chemistry, vol. 254, nro 15, p. 7353-7359,
 Science, vol. 239, 1988, p. 491-494

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö kohdistuu parannettuun menetelmään spesifisen nukleiinihapposekvenssin vahvistamiseksi. Menetelmä käsittää yksijuosteisen RNA:n, yksijuosteisen DNA:n ja kaksijuosteisen DNA:n syntetoinen. Yksijuosteinen RNA on ensimmäisen aloittajan ensimmäinen templaatti, yksijuosteinen DNA on toisen aloittajan toinen templaatti ja kaksijuosteinen DNA on ensimmäisen templaatin useiden kopioiden synteessin kolmas templaatti. Ensimmäisen aloittajan tai toisen aloittajan sekvenssi on komplementaarinen spesifisen nukleiinihapon sekvenssin kanssa ja ensimmäisen aloittajan tai toisen aloittajan sekvenssi on homologinen spesifisen nukleiinihapon sekvenssin kanssa. Vahvistusmenetelmää voidaan käyttää spesifisen nukleiinihapon määrän lisäämiseksi havaitsemisen mahdollistamiseksi tai lisäämään spesifisen nukleiinihapposekvenssin puhtautta konventionaalisen kloonausmetodologian substituutina.

Uppfinningen avser ett förbättrat förfarande för förstärkning av en specifik nukleinsyrasekvens. Förfarandet innefattar syntetisering av entrådigt RNA, entrådigt DNA och dubbeltrådigt DNA. Entrådigt DNA är det första templat för den första primer, entrådigt DNA är det andra templat för den andra primer och dubbeltrådigt DNA är det tredje templat för syntes av flertal kopior av första templatet. En sekvens av den första primer eller den andra primer är komplementär med en sekvens av den specifika nukleinsyran och en sekvens av den första primer eller den andra primer är homolog med en sekvens av specifika nukleinsyran. Förstärkningsförfarandet kan användas för att öka mängden av en specifik nukleinsyrasekvens för att åstadkomma en låg detektion eller för att öka renhet av den specifika nukleinsyrasekvensen som substitut för konventionala kloneringsmetodologin.



Parannettu nukleiinihappojen vahvistusmenetelmä ja siinä
käytettävä reaktiiväliaine - Förbättrat förfarande för för-
stärkning av nukleinsyror och i detta användbar reaktions-
5 medium

Tämä keksintö kohdistuu parannettuun menetelmään spesifisen
nukleiinihapposekvenssin vahvistamiseksi.

10

Näytteessä olevan spesifisen nukleiinihapposekvenssin ha-
vaitseminen testaamalla näyte komplementaarisella nukleiini-
happojen sekvenssillä on tunnettu diagnostinen tekniikka.
Nukleiinihapot sitoutuvat erittäin spesifisesti komplemen-
15 taarisiin nukleiinihappoihin ja ne ovat siten käyttökelpoi-
sia sen määrittämiseksi, onko spesifistä nukleiinihappoa
näytteessä. Havaittavan spesifisen nukleiinihapon sekvenssi
täytyy tuntea ja konstruoida sitten koetin, jossa on spesi-
fisen nukleiinihapposekvenssin komplementaarinen nukleiini-
20 happosekvenssi.

Tässä hakemuksessa sanonta "spesifinen nukleiinihapposek-
venssi" tarkoittaa yksijuosteista tai kaksijuosteista nuk-
leiinihappoa, joka halutaan vahvistaa, "näyte" tarkoittaa
25 seosta, joka sisältää nukleiinihappoja, "riittävän komple-
mentaarinen" tarkoittaa, että kaksi nukleiinihappoa, aluke
ja templaatti, kykenevät spesifiseen vuorovaikutukseen, joka
mahdollistaa tehokkaan, alukkeesta riippuvan ja templaattiin
suunnatun DNA-synteesin annetuissa ionivahvuus- ja lämpöti-
30 laolosuhteissa. "DMSO" tarkoittaa dimetyylisulfoksidia, joka
on riittävän puhdas käytettäväksi molekyylisissä geneetti-
sissä reaktioissa ilman, että sillä on huonoa vaikutusta
käytettyihin substraatteihin tai entsyymeihin ja muita funk-
tionaalisesti ekvivalenttisia alkyylisulfoksideja voidaan
35 myös käyttää DMSO:n asemasta. "BSA" tarkoittaa naudan seeru-
min albumiinia, joka on laadultaan sopivaa käytettäväksi
molekyylisissä biologisissa reaktioissa ja tässä suhteessa
sen tulee olla vapaata kaikista DNAaseista, DNA:ta kaventa-
vasta toiminnasta, RNAaseista ja proteaaseista. Muita funk-

tionaalisesti ekvivalenttisia ja samalla tavalla sopivia "kantaja"-proteiineja voidaan käyttää BSA:n asemasta.

Koska nukleiinihaponäytteet ovat erittäin spesifisiä, on joissakin tilanteissa edullista testata itse nukleiinihapposekvenssi eikä nukleiinihapposekvenssillä tuotettu proteiini. Esimerkiksi pelkästään proteiinin havaitsemiseen perustuva diagnostinen menetelmä on epäluotettava havaittaessa hepatiitti B -viruksen infektiivien partikkelien läsnäoloa johtuen merkittävien tasojen ei-infektiivia antigeenipartikkeleita, joista puuttuu DNA-genomi, läsnäolosta. Toisena esimerkkinä ovat monet ihmisen papilloomaviruksen alatyypit, joita löydetään sekä syövän esi- tai hyvänlaatuisissa kohdunkaulan kasvaimissa ja jotka voidaan erottaa vain käyttämällä nukleiinihappokoetinhybridointia. Myös AIDS-viruksen spesifinen geneettinen muoto tekee varmaksi sen, että AIDS-virusspesifisen nukleiinihapposekvenssin läsnäoloon perustuva testi olisi parempi kuin diagnostinen.

Suurin vaikeus ja rajoitus käytettäessä olemassa olevaa nukleiinihappokoetinteknologiaa on kopiolukuongelma. Viruksessa tai solussa on esimerkiksi tavallisesti yksi erityisen geenin kopio. Tämä yksi kopio voi synnyttää geenituotteen, joko RNA:n tai proteiinin monia kopioita. Tästä syystä diagnostisiin tekniikoihin on usein liittynyt proteiinin testaaminen, koska havaittavan nukleiinihapon spesifinen sekvenssi voi synnyttää proteiinin tuhansia kopiota.

Ribosomaalisen RNA:n luontaisesti esiintyvää korkeaa lukumäärää 100000 kopiota solua kohti on käytetty GenProbessa tiettyjen bakteeripatogeenien, kuten Legionella ja Mycoplasma, diagnoosin helpottamiseksi käyttämällä nukleiinihappokoettimia. Tätä menetelmää ei voida kuitenkaan käyttää ei-solupatogeenien, kuten virusten, yhteydessä tai testattujen kopioluvultaan alhaisten nukleiinihappojen yhteydessä. Kopioluku on erityinen ongelma kehitettäessä nukleiinihappokoetinmenetelmää AIDS-viruksen havaitsemiseksi, kun inte-

groitunutta provirusta voi olla läsnä vähemmän kuin yksi kymmenestä tuhannesta perifeerisestä veren lymfosyytistä. Täten jos erityinen nukleiinihapposekvenssi, jonka edellytetään olevan läsnä näytteessä, voitaisiin vahvistaa, kopiolu-
5 kuongelma voitaisiin kiertää ja koetintestejä voitaisiin käyttää paljon helpommin.

Normaalissa biologisessa näytteessä, joka sisältää vain muutamia soluja, ja vastaavasti vain muutamia erityisen geenin
10 kopioita, on tarpeellista käyttää vahvistusmenetelmää kopiolukuongelman voittamiseksi.

Eräs vahvistusmenetelmä on "kasvattaa ulos" näyte, se on olosuhteiden järjestämistä siten, että näytteessä oleva elä-
15 vä biologinen materiaali voi replikoida itse. Replikaatio voi lisätä nukleiinihapposekvenssien määrää havaittaville tasoille. Elintarviketeollisuudessa esimerkiksi testattaessa jalostettua ruokaa elintarvikkeita myrkyttävien Salmonella-
bakteerien osalta ruokanäytteitä täytyy inkuboida useita
20 päiviä nukleiinihappokopiolukujen määrän lisäämiseksi. Kliinissä näytteissä patogeenien täytyy myös antaa lisääntyä lukumäärältään kasvattamalla huomattavan ajan.

US-patentti 4 683 195, myönnetty 28. heinäkuuta, 1987, Cetus
25 Corporation, ja US-patentti 4 684 202, myönnetty 28. heinäkuuta, 1987, Cetus Corporation, kohdistuvat kumpikin menetelmään näytteen sisältämän kohdenukleiinihapposekvenssin vahvistamiseksi. US-patentti 4 683 195 kohdistuu menetelmään, jossa näytettä, jonka odotetaan sisältävän kohde-DNA-
30 sekvenssin, käsitellään oligonukleotidialukkeilla siten, että alukelaajennustuote syntetisoituu, joka puolestaan toimii templaattina saaden aikaan kohteen DNA-sekvenssin vahvistumisen. Alukelaajennustuote erotetaan templaatista edullisessa suoritusmuodossa käyttämällä lämpödenaturointia.
35 Samaten US-patentti 4 683 202 kohdistuu menetelmään kohde-DNA-sekvenssin, jossa on kaksi erillistä komplementaarista juostetta, vahvistamiseen. Menetelmä käsittää juosteiden käsittelymisen alukkeilla laajennustuotteiden syntetisoimi-

seksi, alukelaaajennustuotteiden erottamisen templaateista ja alukelaaajennustuotteiden käyttämisen puolestaan templaateina.

5 Kummassakin edellä mainitussa US-patentissa vahvistusmenetelmässä tarvitaan käyttäjän joko manuaalista tai mekaanista osallistumista ja monivaiheisia operaatioita ja ne rajoittuvat pelkästään DNA:n vahvistamiseen. Näihin patentteihin kuuluvissa vaiheissa käyttäjän täytyy kuumentaa näyte, jäähdyttää näyte, lisätä sopivat entsyymit ja toistaa sitten
10 vaiheet. Lämpötilan muutokset aiheuttavat sen, että entsyymit kadottavat tehonsa. Käyttäjän tarvitsee toistuvasti täydentää vahvistusseosta sopivien entsyymien alikvooteilla vahvistusmenetelmän aikana.

15

Lisäksi US-patenteissa 4 683 195 ja 4 683 202 jokainen vahvistusmenetelmän jakso tapahtuu syntetisoimalla ensimmäisestä templaatista toinen templaatti, toista templaattia puolestaan käytetään ensimmäisen templaatin syntetisointiin.
20 Tämä menettely toistetaan, joten jokainen vahvistusmenetelmän jakso perustuu yhden tuotteen syntetisointiin yhdestä substraatista.

Huolimatta tekniikan tasolla selostetuista vahvistusmenetelmistä tarvitaan vahvistusmenetelmien parannuksia. Olisi edullista, jos käyttäjän tarvitsisi osallistua vähemmän ja manipuloida vähemmän eivätkä ne rajoittuisi DNA:han. Lisäksi olisi edullista, jos vahvistaminen tapahtuu suhteellisen vakaassa ympäristön lämpötilassa, niin ettei menetelmään
25 kuuluvien entsyymien toimintaan vaikutettaisi. Olisi edullisempaa, jos templaattia voitaisiin käyttää useamman kuin yhden tuotteen generoimiseksi yhdestä substraatista vahvistusmenetelmän jokaisen jakson aikana.

35 Tämä keksintö kohdistuu yksijuosteisen RNA:n (ssRNA), yksijuosteisen DNA:n (ssDNA) tai kaksoisjuosteisen DNA:n (dsDNA) vahvistusmenetelmään, joka on tarkoituksenmukainen ja johon menetelmän käyttäjän tarvitsee osallistua vähemmän ja mani-

puloida vähemmän kuin konventionaalisiin vahvistusmenetelmiin. Vahvistaminen tapahtuu suhteellisen vakaassa ympäristön lämpötilassa. Lisäksi menetelmän jokainen jakso generoi useita tuotteen kopioita yhdestä antisense-RNA-templaattista.

5 Tämän keksinnön mukaista vahvistusmenetelmää voidaan käyttää spesifisen nukleiinihapon määrän lisäämiseen, jolloin kiertetään kopiolukuongelma. Tällöin voidaan käyttää koetintestejä paljon helpommin. Vahvistusmenetelmää voidaan käyttää myös spesifisen nukleiinihapposekvenssin puhtauden lisäämiseen substituuttina konventionaaliselle kloonausmenetelmälle.

10

Keksinnön oleelliset tunnusmerkit on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

15

Keksinnön erään kohteen mukaisesti käytetään menetelmää spesifisen nukleiinihapposekvenssin vahvistamiseksi. Menetelmä käsittää yksijuosteisen RNA:n, yksijuosteisen DNA:n ja kaksijuosteisen DNA:n syntetisoimisen. Yksijuosteinen antisense-RNA on toisen alukkeen ensimmäinen templaatti. Yksijuosteinen DNA on ensimmäisen alukkeen toinen templaatti. Kaksijuosteinen DNA on ensimmäisen alukkeen useiden kopioiden synteessin kolmas templaatti. Ensimmäisen tai toisen alukkeen sekvenssi on riittävän komplementaarinen spesifisen nukleiinihapposekvenssin sekvenssille ja ensimmäisen tai toisen alukkeen sekvenssi on riittävän homologinen spesifisen nukleiinihapposekvenssin sekvenssin kanssa. Toinen aluke sitoutuu ensimmäisen RNA-templaatin 3'-päähän ja generoi toisen DNA-templaatin. Ensimmäisen alukkeen 3'-pää hybridoituu toisen DNA-templaatin 3'-päähän. Toinen templaatti poistetaan ensimmäisestä templaattista ja sitä käytetään komplementaarisen DNA-juosteen generoimiseen. Saatu duplexi-DNA toimii kolmantena templaattina useiden ensimmäisten templaattien syntetisoimiseksi, jotka puolestaan toistavat edellä kuvatun

20

25

30

35

Keksinnön toisen kohteen mukaan käytetään menetelmää spesifisen nukleiinihapposekvenssin vahvistamiseksi. Menetelmä käsittää:

- a) ensimmäisen alukkeen hybridoinen ensimmäiseen templaattiin. Ensimmäisessä alukkeessa on DNA-sekvenssi, joka on riittävän komplementaarinen ensimmäisen templaatin RNA-sekvenssin kanssa,
- b) ensimmäisen DNA-sekvenssin, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt ensimmäiseen alukkeeseen ja joka on komplementaarinen ensimmäisen templaatin RNA-sekvenssin kanssa, syntetisoimisen. Ensimmäinen DNA-sekvenssi ja ensimmäinen aluke käsittävät toisen templaatin,
- c) ensimmäisen templaatin erottamisen toisesta templaattista toisen alukkeen hybridisaation mahdollistamiseksi,
- d) toisen alukkeen hybridoinen toiseen templaattiin. Toisessa alukkeessa on DNA-sekvenssi, joka on riittävän komplementaarinen toisen templaatin DNA-sekvenssin kanssa. Toisessa alukkeessa on myös promoottorin komplementaarinen sekvenssi ja RNA-polymeraasin transkription aloituspaikan komplementaarinen sekvenssi,
- e) toisen DNA-sekvenssin, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt toiseen alukkeeseen ja joka on toisen templaatin kanssa komplementaarinen, syntetisoiminen ja kolmannen DNA-sekvenssin, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt toiseen templaattiin ja on komplementaarinen toisen alukkeen DNA-sekvenssin kanssa, syntetisoimisen. Toinen ja kolmas DNA-sekvenssi, toinen aluke ja toinen templaatti käsittävät kolmannen templaatin,
- f) ensimmäisen templaatin RNA-sekvenssin useiden kopioiden syntetisoiminen kolmannesta templaattista.

Vaihtoehtoisesti esillä olevan keksinnön mukainen vahvistusmenetelmä käsittää seuraavat vaiheet. Vaiheessa (A) saadaan yksi reaktioväliaine, joka sisältää ensimmäisen oligodeoksinukleotidialukkeen, ensimmäinen alukkeen käsittäessä sekvenssin, joka on funktionaalinen promoottori; toinen oligodeoksinukleotidialuke toisen alukkeen käsittäessä 5'-pään segmentin, jonka on komplementaarinen funktionaalisen pro-

moottorin kanssa; RNA-suunnattu DNA-polymeraasi; DNA-suunnattu DNA-polymeraasi; DNA-suunnattu RNA-polymeraasi; ribonukleaasi, joka poistaa RNA:n RNA/DNA-hybridistä hydrolysoimatta yksi- tai kaksijuosteista RNA:ta tai DNA:ta; ribonukleosidi- ja deoksiribonukleosiditrifosfaatit; ja vähintään yksi DMSO:sta tai BSA:sta. Vaiheessa (B) saadaan lisäämällä reaktioväliaineeseen yhtä tai useampaa seuraavista (i) yksijuosteista RNA-molekyyliä, joka käsittää (a) antisense-RNA-sekvenssin, joka hybridoituu 3'-päässään toisen alukkeen 3'-pään osaan, tai (b) antisense-RNA-sekvenssin, joka hybridoituu 3'-päässään ensimmäisellä alukkeella, (ii) yksijuosteinen DNA-molekyyli, joka käsittää (a) toiseen alukkeeseen sitoutuvan DNA-sekvenssin, joka hybridoituu 3'-päässään toisen alukkeen 3'-päähän, tai (b) promoottorikomplementaarisen DNA-sekvenssin, joka käsittää 5'-sekvenssin, joka on komplementaarinen funktionaalisen promoottorin kanssa, tai (c) ensimmäiseen alukkeeseen sitoutuvan DNA-sekvenssin, joka on 5'-päässään ensimmäisen alukkeen hybridioima, (ii) denaturoidun kaksijuosteisen DNA-molekyylin, joka käsittää vahvistettavissa olevan segmentin ja funktionaalisen promoottorin, funktionaalisen promoottorin ollessa segmentin vieressä ja suuntautunut segmentin transkription ohjaamiseen. Vaiheessa (c) saadaan vakiinnutusolosuhteet siten, että käytetään vähintään yhtä ryhmää, joka koostuu RNA-molekyylin osasta, yksijuosteisesta DNA-molekyylistä ja kaksijuosteisesta DNA-molekyylistä, templaattina yhden tai useamman antisense-RNA-segmentin kopion generoimiseksi ja jossa antisense-RNA-sekvenssi aloittaa reaktioväliaineen jakson, joka käsittää vaiheet: ensimmäisen alukkeen hybridioimisen antisense-RNA-sekvenssin 3'-päässä olevalle aluelle, (RNA/DNA-hybridin muodostamisen RNA-suunnatun DNA-polymeraasin toiminnalla, RNA/DNA-hybridin käsittäessä ensimmäisen DNA-segmentin, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt ensimmäisen alukkeen 3'-päähän toisen DNA-segmentin muodostamiseksi, ensimmäisen DNA-segmentin ollessa komplementaarinen antisense-RNA-sekvenssin vähintään osan kanssa, (iii) toisen DNA-segmentin vapauttamisen RNA/DNA-hybridistä ribonukleaasin toiminnalla antisense-RNA-sekvenssin vähintään jossain osassa, (iv) toisen DNA-

segmentin 3'-pään hybridoinnin toisen alukkeen 3'-päällä
dupleksin muodostamiseksi, johon vaikutetaan DNA-suunnatulla
DNA-polymeraasilla (a) kolmannen DNA-segmentin tuottamiseksi,
5 joka on kovalenttisesti kiinnittynyt toisen alukkeen 3'-
päähän ja joka on komplementaarinen ensimmäisen DNA-segmen-
tin kanssa, ja neljännen DNA-segmentin tuottamiseksi, joka
käsittää kolmannen DNA-segmentin ja ensimmäisen alukkeen, ja
viidennen DNA-segmentin tuottamiseksi, joka on kovalentti-
10 sesti kiinnittynyt toisen DNA-segmentin 3'-päähän ja on kom-
plementaarinen toisen alukkeen ei-dupleksoituneen 5'-pään
kanssa, ja (d) kuudennen DNA-segmentin tuottamiseksi, joka
käsittää toisen DNA-segmentin ja viidennen DNA-segmentin, ja
(a) useiden RNA-sekvenssien tuottamisen, jotka vastaavat
antisense-RNA-sekvenssiä, tuottamisen RNA-polymeraasin vai-
15 kutuksella duplexiin ja (b) useiden DNA-sekvenssien, jotka
vastaavat neljättä DNA-segmenttiä ja kuudetta DNA-segment-
tiä, tuottamisen.

Ensimmäisen tai toisen alukkeen sekvenssi on riittävän kom-
20 plementaarinen spesifisen nukleiinihapposekvenssin sekvens-
sin kanssa ja ensimmäisen tai toisen alukkeen sekvenssi on
riittävän homologinen spesifisen nukleiinihapposekvenssin
sekvenssin kanssa. Ensimmäisen alukkeen 3'-pää on suunnattu
kohti komplementaarisisissa juosteissa olevan toisen alukkeen
25 3'-päättä.

Keksinnön toisessa vaihtoehdossa DNA:n toisessa alukkeessa
on sekvenssi 3'-päässä, joka on riittävän komplementaarinen
toisen templaatin DNA-sekvenssin kanssa. Toisessa alukkeessa
30 on 5'-päässä promoottorin komplementaarinen sekvenssi ja
RNA-polymeraasin transkription aloituspaikan komplementaari-
nen sekvenssi.

Keksinnön eräässä toisessa vaihtoehdossa on toiseen tem-
35 plaattiin kovalenttisesti kiinnittynyt kolmas DNA-sekvenssi
komplementaarinen toisen alukkeen 5'-päässä olevan DNA-sek-
venssin kanssa.

Toisessa keksinnön vaihtoehdossa käytetään menetelmää spesifisen nukleiinihapposekvenssin vahvistamiseksi. Menetelmä käsittää ensimmäisen alukkeen, toisen alukkeen, ribonukleaa-
si H:n, RNA-suunnatun DNA-polymeraasin, DNA-suunnatun DNA-
5 polymeraasin, RNA-polymeraasin, ribonukleosiditriposfaattien ja deoksiribonukleotiditriposfaattien yhdistämisen näyttee-
seen. DNA:n ensimmäisellä alukkeella on sekvenssi, joka on
riittävän komplementaarinen RNA:n ensimmäisen templaatin
kanssa. DNA:n toisella alukkeella on sekvenssi, joka on
10 riittävän komplementaarinen DNA:n toisen templaatin kanssa,
ja promoottorin komplementaarinen sekvenssi ja transkription
aloituspaikan komplementaarinen sekvenssi, jonka RNA-polyme-
raasi tunnistaa substraattina. Ensimmäisen alukkeen tai toi-
sen alukkeen sekvenssi on riittävän komplementaarinen spesi-
15 fisen nukleiinihapposekvenssin sekvenssin kanssa ja ensim-
mäisen alukkeen sekvenssi tai toisen alukkeen sekvenssi on
riittävän homologinen spesifisen nukleiinihapon sekvenssin
kanssa. Ensimmäisen alukkeen 3'-pää on orientoitunut kohti
toisen alukkeen 3'-päästä komplementaarisisissa juosteissa.

20

Keksinnön toisessa vaihtoehdossa käytetään menetelmää spe-
sifisen nukleiinihapposekvenssin vahvistamiseksi. Menetelmä
käsittää ensimmäisen alukkeen, toisen alukkeen, avian myo-
blastosis -viruspolymeraasin, E. coli -ribonukleaaasi H:n,
25 bakteriofagi T7 RNA -polymeraasin, ribonukleosiditripos-
faattien ja deoksiribonukleotiditriposfaattien lisäämisen
näytteeeseen. DNA:n ensimmäisessä alukkeessa on sekvenssi,
joka on riittävän komplementaarinen RNA:n ensimmäisen tem-
plaatin kanssa. DNA:n toisessa alukkeessa on sekvenssi, joka
30 on riittävän komplementaarinen DNA:n toisen templaatin kans-
sa, ja promoottorin komplementaarinen sekvenssi ja trans-
kription aloituspaikan komplementaarinen sekvenssi, jotka T7
RNA -polymeraasi tunnistaa substraattina. Ensimmäisen aluk-
keen tai toisen alukkeen sekvenssi on riittävän komplemen-
35 taarinen spesifisen nukleiinihapposekvenssin sekvenssin
kanssa ja ensimmäisen alukkeen tai toisen alukkeen sekvenssi
on riittävän homologinen spesifisen nukleiinihapposekvenssin
sekvenssin kanssa. Ensimmäisen alukkeen 3'-pää on orientoi-

tunut kohti toisen alukkeen 3'-päättä komplementaarisisissa juosteissa.

Esillä olevan keksinnön eräs toinen kohde saa aikaan väli-
5 nesarjan nukleinihappomolekyylien vahvistamiseksi, joka käsittää kokoelman, jossa on (a) säiliö, joka sisältää ensimmäisen oligonukleotidialukkeen liuoksen, (b) säiliö, joka sisältää toisen oligonukleotidialukkeen liuoksen, (c) säiliö, joka sisältää ribonukleaasin liuoksen, joka hydrolysoi
10 RNA/DNA-hybridin RNA:n vahingoittamatta yksi- tai kaksijuosteista RNA:ta tai DNA:ta, (d) säiliö, joka sisältää RNA-suunnatun DNA-polymeraasin liuoksen, (e) säiliö, joka sisältää DNA-suunnatun RNA-polymeraasin liuoksen, (f) säiliö, joka sisältää DNA-suunnatun DNA-polymeraasin liuoksen, (g)
15 säiliö, joka sisältää ribonukleosiditriposfaattien liuoksen, (h) säiliö, joka sisältää deoksiribonukleotiditriposfaattien liuoksen, (i) säiliö, joka sisältää DMSO-liuoksen ja (j) säiliön, joka sisältää BSA-liuoksen.

20 Keksinnön erään kohteen mukaisesti saadaan aikaan nukleinihappojen vahvistusmenetelmä, jossa DMSO:ta on varustettu konsentraatiossa alueella 0-30 % ja BSA:ta on varustettu konsentraatiossa 5-2500 $\mu\text{g/ml}$. Vaihtoehtoisesti DMSO:ta on varustettu konsentraatiossa alueella 0 % - 30 % ja BSA:ta on
25 varustettu konsentraatiossa 50-500 $\mu\text{g/ml}$. Lisäksi DMSO:ta on varustettu konsentraatiossa alueella 15-25 % ja BSA:ta on varustettu konsentraatiossa alueella 50-500 $\mu\text{g/ml}$.

Keksinnön toisen kohteen mukaisesti DMSO:lla ja BSA:lla vahvistaminen lisääntyy verrattuna vahvistamiseen lisäämättä
30 DMSO:ta tai BSA:ta vähintään 10-kertaisesti. Toisessa kohteessa vahvistaminen lisääntyy 1000-kertaisesti enemmän kuin lisäämättä DMSO:ta tai BSA:ta. Vielä eräässä esillä olevan keksinnön kohteessa vahvistus lisääntyy verrattuna siihen
35 kun DMSO:ta tai BSA:ta ei lisätä vähintään 10^4 -kertaisesti. Toisessa esillä olevan keksinnön kohteessa vahvistus lisääntyy verrattuna siihen kun DMSO:ta tai BSA:ta ei lisätä vähintään 10^6 -kertaisesti. Vielä eräässä esillä olevan keksin-

nön toisessa kohteessa vahvistus lisääntyy verrattuna siihen kun DMSO:ta tai BSA:ta ei lisätä vähintään 10^8 -kertaisesti.

- Piirustuksissa, jotka valaisevat keksinnön suoritus-esimerk-
- 5 kejä
- kuvio 1 on nukleiinihappojen vahvistusmenetelmän yleisku-
- vaus,
- kuvio 1b on esimerkki nukleiinihappojen vahvistusmenetelmäs-
- tä, joka alkaa sense-(+)-RNA-molekyylistä,
- 10 kuvio 1c on esimerkki nukleiinihappojen vahvistusmenetelmäs-
- tä, joka alkaa dsDNA:sta, joka on leikattu restriktioendo-
- nukleasilla ja sitten denaturoitu,
- kuvio 1d on esimerkki nukleiinihappojen vahvistusmenetelmäs-
- tä, joka alkaa dsDNA:sta, joka on denaturoitu,
- 15 kuvio 2 esittää synteettisiä oligonukleotideja DNA-sekvens-
- sejä, joita käytetään vahvistusmenetelmän testaamiseen: ku-
- vio 2A gag-testisekvenssi: kuvio 2B gag2-testisekvenssi,
- kuvio 3 on vahvistusreaktioiden, joissa käytetään erilaisia
- alukekonsentraatiota, PAGE-analyysin autoradiogrammi,
- 20 kuvio 4 on vahvistusreaktioiden, joissa käytetään erilaisia
- templaattikonsentraatioita, PAGE-analyysin autoradiogrammi,
- kuvio 5 on dot-blot-hybridisaation autoradiogrammi vahvis-
- tusreaktioissa,
- kuvio 6 on vahvistusreaktion, jossa käytetään restriktio-
- 25 fragmentteja templaattina, autoradiogrammi,
- kuvio 7 on etidumbromidilla värjätty agaroosigeeli, joka on
- tarkoitettu vahvistusreaktioiden titraamiseen ilman HIV-koh-
- desekvenssiä (ei templaattia) käyttäen 0-20 % DMSO:ta, ja
- esittää vaikutuksen ei-spesifisiin tuotteisiin (NSP:t),
- 30 kuvio 8 on etidumbromidilla värjätty vahvistusreaktioiden
- agaroosigeeli ilman templaattia (nt) ja 10^4 templaatin ko-
- piota käyttäen 0 % (-) ja 15 % (+) DMSO (ei templaattia)
- käyttäen 0-20 % DMSO:ta eliminoiden NSP:t,
- kuvio 9 on vahvistusreaktioiden slot-blot-hybridointianalyy-
- 35 sin autoradiogrammi, joissa käytetään 0 % (-) ja 15 (+)
- DMSO:ta ilman templaattia (nt) ja 10^3 ja 10^4 templaattikopio-
- ta, ja esittää lisääntynyttä toistettavuutta ja herkkyyttä,

kuvio 10A on vahvistusreaktioiden etidiumbromidilla värjätty agarosegeeli ilman templaattia (nt) ja 10^4 kopiota templaattia käyttäen 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 0 % DMSO ja 0 % BSA, 15 % DMSO ja 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 15 % DMSO ja 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, ja 15 % DMSO ja osoittaa BSA:n ja DMSO:n yhdistelmän lisääntyneen herkkyuden vahvistetun templaatin havaitsemiseksi,

kuvio 10B on vahvistusreaktioiden slot-blot-hybridisaatioanalyysin autoradiogrammi ilman templaattia (nt) ja 10^4 kopiota templaattia käyttäen 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 0 % DMSO ja 0 % BSA, 15 % DMSO ja 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 15 % DMSO ja 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, ja 15 % DMSO ja osoittaa BSA:n ja DMSO:n yhdistelmän lisääntyneen herkkyuden vahvistetun templaatin havaitsemiseksi ja lisääntyntä toistettavuutta käytettäessä DMSO:ta yksinään, kuvio 11 on vahvistusreaktioiden slot-blot-hybridisaatioanalyysin autoradiogrammi ilman templaattia (nt) ja 10^3 ja 10^4 kopiota templaattia käyttäen 15 % DMSO yksinään ja 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, ja osoittaa BSA:n ja DMSO:n yhdistelmän lisääntyneen herkkyuden vahvistetun templaatin havaitsemiseksi ja lisääntyntä toistettavuutta käytettäessä DMSO:ta yksinään.

20

Tämä keksintö kohdistuu menetelmään spesifisen nukleiinihapposekvenssin vahvistamiseksi. Vahvistaminen käsittää DNA:n ja RNA:n vuorottaisen synteessin ja se on esitetty yleisesti ja spesifisesti kuvioissa 1a-1d. Tässä menetelmässä yksijuosteinen antisense-(-)-RNA muutetaan yksijuosteiseksi DNA:ksi, joka puolestaan muutetaan dsDNA:ksi ja siitä tulee funktionaalinen templaatti alkuperäisen yksijuosteisen RNA:n useiden kopioiden synteisiin. Vahvistusmenetelmässä käytetään ensimmäistä aluketta ja toista aluketta. Ensimmäisen alukkeen tai toisen alukkeen sekvenssi on riittävän komplementaarinen spesifisen nukleiinihapposekvenssin sekvenssin kanssa ja ensimmäisen tai toisen alukkeen sekvenssi on riittävän homologinen spesifisen nukleiinihapposekvenssin kanssa. Joissakin tapauksissa sekä ensimmäinen aluke että toinen aluke ovat riittävän komplementaarisia ja riittävän homologisia spesifisen nukleiinihapposekvenssin sekvenssin kanssa, esimerkiksi jos spesifinen nukleiinihapposekvenssi on kaksijuosteinen DNA.

35

(-)-RNA muutetaan yksijuosteiseksi DNA:ksi hybridoidamalla oligonukleotidialuke (ensimmäinen aluke) RNA:n (ensimmäinen templaatti) 3'-päähän ja syntetisoimalla DNA:n komplementaarinen juoste ensimmäisestä alukkeesta (ensimmäinen DNA-sekvenssi) käyttämällä RNA-suunnattua DNA-polymeraasia. Saatu yksijuosteinen DNA (toinen templaatti) erotetaan ensimmäisestä templaattista esimerkiksi hydrolysoimalla ensimmäinen templaatti käyttämällä ribonukleaasia, joka on spesifinen RNA-DNA-hybrideille (esimerkiksi ribonukleaasi H). Toinen templaatti muutetaan muotoon, joka kykenee RNA-synteesiin, hybridoidamalla synteettinen oligonukleotidi (toinen aluke), joka sisältää 3'-päässään sekvenssin, joka on riittävän komplementaarinen toisen templaatin 3-pään kanssa ja kohtisen 5'-päästä sekvenssi, joka sisältää promoottorin komplementaarisen juosteen ja transkription aloituspaikan antisense-sekvenssin, ja syntetisoimalla toinen DNA-sekvenssi, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt toisen alukkeen 3'-päähän, käyttämällä toista templaattia templaattina ja syntetisoimalla kolmas DNA-sekvenssi, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt toisen templaatin 3'-päähän, käyttämällä toista aluketta templaattina käyttäen DNA-suunnattua DNA-polymeraasia. Saatua toisen templaatin funktionaalista johdannaista, joka on kolmas templaatti, käytetään useiden RNA-kopioiden, ensimmäisen templaatin, synteesiin käyttämällä RNA-polymeraasia, joka on spesifinen promoottorille ja transkription aloituspaikalle, jonka määrittää toinen aluke. Jokainen nyt syntetisoitu ensimmäinen templaatti voidaan muuttaa toisen templaatin ja kolmannen templaatin lisäkopioiksi toistamalla jakso. Lisäksi jakson toistaminen ei edellytä käyttäjän osallistumista tai manipulointia.

Vahvistusmenetelmä alkaa lisäämällä sopiva templaattinukleiinihappo sopiviin entsyymeihin, alukkeisiin ja kofaktoreihin sopivissa reaktio-olosuhteissa. Tämä templaattinukleiinihappo on muodossa, joka kykenee homogeeniseen ja jatkuvaan vahvistumiseen ja voi toimia välituotteena jaksossa, joka on esitetty kuviossa 1a. Vahvistusmenetelmä käsittää prekursoreiden (alukkeiden, ribonukleosiditrifosfaattien ja deoksi-

ribonukleotiditriposfaattien) verkkokulutuksen ja tuotteiden (RNA ja DNA) verkkoakkumulaation. RNA- ja DNA-synteesin prosessit edistyvät asynkronisesti kunnes on syntetisoitu riittäviä tasoja nukleiinihappoja havaitsemisen mahdollistamiseksi. Vahvistusmenetelmää voidaan tarkkailla esimerkiksi merkitystä prekursorista peräisin olevalla merkityn tuotteen synteesillä.

On tarkoitettu, että vahvistaminen voi sisältää muita menetelmiä kuviossa 1a esitetyn tavallisen menetelmän lisäksi tai asemasta. Tietyt vastakkaistuottavat entsymaattiset reaktiot ovat mahdollisia, joita esiintyy sallitun alhaisina määrinä. Mahdollisiin ei-produktiivisiin sivureaktioihin sisältyy RNA:n ja/tai DNA:n synteesi lisätyn templaattinukleiinihapon puuttuessa. Tällaiset RNA- ja/tai DNA-tuotteet voidaan erottaa halutuista tuotteista määrittelemällä, onko erityinen sekvenssi, joka on löydettävissä ainoastaan spesifisen nukleiinihapposekvenssin kahden aloituspaikan välistä, läsnä.

20

Ensimmäinen aluke on oligodeoksiribonukleotidi, jonka 3'-päässä on sekvenssi, joka on riittävän komplementaarinen ensimmäisen templaatin 3'-pään kanssa. Ensimmäisen alukkeen 3'-päässä olevalla sekvenssillä on erityinen pituus ja emäskoostumus spesifisen ja tehokkaan ensimmäisen DNA-sekvenssin synteesin mahdollistamiseksi annetuissa ionivahvuus- ja lämpötilaolosuhteissa. Ensimmäinen aluke voi olla riittävän komplementaarinen alueen kanssa, joka on ensimmäisessä jaksossa olevan ensimmäisen templaatin 3'-pään sisäpuolella. Seuraavissa jaksoissa ensimmäisen alukkeen 5'-pää on komplementaarinen ensimmäisen templaatin 3'-pään kanssa. On tarkoitettu, että ensimmäinen aluke voi koostua osittain tai täydellisesti nukleotideistä tai nukleotidianalogeista, jotka ovat muita kuin luonnolliset deoksiribonukleotidit. Ensimmäisen alukkeen 5'-pää voi sisältää sekvenssejä, jotka eivät ole komplementaarisia ensimmäisessä jaksossa olevan ensimmäisen templaatin kanssa. Ei-komplementaariset sekvenssit voivat olla komplementaarisia nukleiinihapon kanssa,

35

joka voidaan immobilisoida, tai johon voidaan sitoa käyttökelppoinen ei-nukleiinihappokomponentti, kuten reportteri, havaitsemisen helpottamiseksi. Ei-komplementaariset sekvenssit voivat sisältää vaihtoehtoisesti promoottorin komplementaarisen sekvenssin ja transkription aloituspaikan komplementaarisen sekvenssin, joita voidaan käyttää RNA:n synteesiin. Tämä DNA on komplementaarinen ensimmäisen templaatin kanssa ja sitä voidaan käyttää välituotteena toisessa vahvistusjaksossa.

10

Toinen aluke on oligodeoksiribonukleotidi, joka sisältää 3'-päässä sekvenssin, joka on riittävän komplementaarinen toisen templaatin 3'-päähän kanssa. Toisella alukkeella on erityinen pituus ja emäskoostumus spesifisen ja tehokkaan toisen ja kolmannen DNA-sekvenssin synteesin mahdollistamiseksi annetuissa ionivahvuus- ja lämpötilaolosuhteissa. Lisäksi toinen aluke sisältää funktionaalisen promoottorin antisense-sekvenssin ja transkription aloituspaikan antisense-sekvenssin. Tämä sekvenssi, kun sitä käytetään templaattina kolmannen DNA-sekvenssin synteesissä, sisältää riittävästi tietoa RNA:n spesifisen ja tehokkaan sitoutumisen ja transkription aloituksen halutussa paikassa mahdollistamiseksi. Promoottorisekvenssi voidaan johtaa funktionaalisen promoottorin antisense-juosteesta. Transkription aloituspaikka voidaan johtaa luontaisen RNA-transkriptin 5'-terminaalista sekvenssistä. Toisen alukkeen 5'-terminaalinen sekvenssi on edullisessa suoritusmuodossa AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAG. Tämä sekvenssi sisältää promoottorin antisense-sekvenssin ja transkription aloituspaikan antisense-sekvenssin T7 RNA-polymeraasille. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muuta faagi-RNA-polymeraasin transkription aloituspaikkaa ja promoottoria. Lisäksi sekvenssejä, jotka eivät liity promoottoritoimintaan, voidaan sisällyttää toisen alukkeen 5'-päähän tai transkription aloituspaikan ja 3'-päässä olevan sekvenssin väliin, joka hybridoituu toiseksi templaatiksi. On tarkoitettu, että toinen aluke voi koostua osittain tai kokonaan nukleotideistä tai nukleotidianalogeista, jotka ovat muita kuin luontaisia deoksiribonukleotidejä.

35

Kaikkien tässä keksinnössä käytettyjen entsyymien tulee täyttää tietyt praktiset määrittelyt. Kunkin entsyymin tai entsyymivalmisteen tulee olla vapaata vahingollisista deoksiribonukleaasi (DNAasi) toiminnoista, kuten 5'- tai 3'-endonukleaasitoiminnoista, jotka liittyvät usein tiettyihin DNA-polymeraaseihin ja yksijuosteiseen tai kaksijuosteiseen spesifiseen eksonukleaasiin tai endonukleaaseihin. Jokaisen entsyymin tai entsyymivalmisteen tulee olla vapaata vahingollisista ribonukleaasi (RNAasi) toiminnoista poikkeuksena edullinen ribonukleaasitoiminnan lisäys, joka toiminta on RNA:n ja DNA:n hybrideille spesifinen (esimerkiksi ribonukleaasi H). Lisäksi jokaisen entsyymin tulee olla kohtalaisen aktiivinen yleisissä reaktio-olosuhteissa, joita käytetään muissa entsyymaattisissa menetelmissä ja ei-entsyymaattisissa menetelmissä, kuten hybridoidaessa oligonukleotidialukkeita RNA- tai DNA-templaatteihin.

DNA-suunnattu RNA-polymeraasi, jota käytetään tässä keksinnössä, voi olla mikä tahansa entsyymi, joka kykenee sitoutumaan erityiseen DNA-sekvenssiin, jota kutsutaan promoottoriksi, ja aloittamaan spesifisesti in vitro RNA-synteesin määrättyssä aloituspaikassa erittäin lähellä promoottoria. Promoottori ja aloituspaikka muodostavat toisen alukkeen osan. Lisäksi RNA-polymeraasin tulee kyetä syntetisoimaan useita RNA-kopioita templaatin funktionaalista kopiota kohti kohtuullisessa ajassa. Edullisessa suoritusmuodossa käytetään bakteriofagi-RNA-polymeraasia. Lisäksi voidaan käyttää muita bakteriofagi-RNA-polymeraaseja, kuten faagia T3, faagia XII, Salmonella-faagia sp6 tai Pseudomonas-faagia gh-1. Toisessa suoritusmuodossa voidaan käyttää muuta prokaryootista tai eukaryootista DNA-suunnattua RNA-polymeraasia. On ymmärrettävä, että jos käytetään vaihtoehtoisia RNA-polymeraaseja, niin toisen sekvenssin promoottoriin ja aloitussekvensseihin on tehtävä tarvittavat muutokset erityisen RNA-polymeraasin templaattispesifisyyden mukaisesti.

RNA-suunnattu DNA-polymeraasi, jota käytetään tässä keksinnössä, voi olla mikä tahansa entsyymi, joka kykenee synte-

tisoimaan DNA:ta oligodeoksiribonukleotidialukkeesta ja RNA-templaattista. Lisäksi tämä entsyymi voi sisältää DNA-suunnatun DNA-polymeraasin ja RNAasin toimintoja. Edullisessa suoritusmuodossa käytetään avian myoblastosis -viruspolymeraasia (AMV-käänteistranskriptaasi). Lisäksi RNA-suunnattu DNA-polymeraasi voi olla mistä tahansa muusta retroviruksesta, kuten Maloney-hiirenleukemiaviruksesta. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita eukaryoottisia RNA-suunnattuja DNA-polymeraaseja.

10

DNA-suunnattu DNA-polymeraasi, jota käytetään tässä keksinnössä, voi olla mikä tahansa entsyymi, joka kykenee syntetisoimaan DNA:ta oligodeoksiribonukleotidialukkeesta ja DNA-templaattista. Tämän entsyymin ei tule sisältää 5'- tai 3'-eksonukleaasitoimintoja, jotka liittyvät moniin DNA-polymeraasityyppeihin. Edullisessa suoritusmuodossa käytetään AMV-käänteistranskriptaasia. Kuitenkin voidaan käyttää muita DNA-suunnattuja DNA-polymeraaseja, joista puuttuu luonnollisesti 5'- tai 3'-eksonukleaasitoiminnat. Nämä voivat käsitellä tietyt eukaryoottiset DNA-polymeraasit, kuten DNA-polymeraasin tai ne DNA-polymeraasit, joita voidaan eristää nisäkkäiden kudoksesta, kuten vasikan kateenkorvasta. Muutoin sopimattomat DNA-polymeraasit voidaan tehdä käyttökelpoisiksi poistamalla ei-toivotut eksonukleaasitoiminnat joko muuttamalla DNA-polymeraasigeeni, mitä seuraa muutetun polymeraasin ilmentäminen sopivassa isäntäsolussa, tai modifioimalla kemiallisesti DNA-polymeraasiproteiini. DNA-polymeraasin muutetut versiot voidaan tehdä E. coli DNA-polymeraasi I:n Klenow-fragmentista tai bakteriofagi T7 DNA-polymeraasista. On ymmärrettävä, että tällaiset vaihtoehtoiset DNA-polymeraasiaktiivisuudet lisätään täydentämään aktiivisuutta, jonka antaa RNA-suunnattu DNA-polymeraasi, koska edullisessa suoritusmuodossa sekä sama entsyymi välittää sekä RNA-suunnattua että DNA-suunnattua DNA-polymeraasia.

35

RNAasi H, jota voidaan käyttää tässä keksinnössä, voi olla mikä tahansa entsyymi, joka kykenee hydrolysoimaan RNA:n, joka on liitetty lämmöllä komplementaariseen DNA:han. Tämän

entsyymien ei tule kyetä hydrolysoimaan yksi- tai kaksijuo-
steista RNA:ta tai mitään DNA:ta. Edullisessa suoritusmuodos-
sa käytetään E. coli RNAasi H:ta. Lisäksi voidaan käyttää
5 RNAasi H -entsyymeitä, kuten vasikan kateenkorvan
RNAasi H:ta. Koska RNAasi H on AMV-käänteistranskriptaasin
sisäinen toiminta, täydennetään E. coli RNAasi H:ta edulli-
sessa suoritusmuodossa AMV-käänteistranskriptaasin RNAasi
H:lla. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää mitä tahansa muuta
entsyymiä, joka kykenee erottamaan toisen templaatin ensim-
10 mäisestä templaatista.

Edellä mainitut entsyymit ja aluke sekoitetaan yhteen reak-
tiosastiassa, joka sisältää sekä DNA- että RNA-synteesiin
tarvittavat puskurit ja kofaktorit. Lisäksi tulee ioniolu-
15 suhteiden ja reaktiolämpötilan olla yhteensopivat alukkeiden
spesifiseksi hybridoinniksi DNA- ja RNA-templaatteihin,
kuten alan asiantuntija tietää. Reaktioseoksessa ei tule
olla sellaisia aineita, jotka interferoivat vahvistusmen-
telmän kanssa, erityisesti substansseja, jotka voivat inhi-
20 boida suuresti entsyymien toimintaa, interferoida alukkeiden
ja templaattien hybridointia tai hajottaa ei-produktiivises-
ti nukleinihappovälituotteita ja nukleinihappotuotteita.

Mahdollisten havaitsemiskaavioiden kuvaus voi olla käyttö-
25 kelpoista käytettäessä vahvistusmenetelmää. On ymmärrettävä,
että kaaviot, joita voidaan käyttää vahvistusmenetelmässä
syntetisoitujen nukleinihappojen havaitsemiseen, eivät ra-
joitu tässä kuvattuihin ja on tarkoitettu, että muita mene-
telmiä voidaan käyttää.

30 Eräässä suoritusmuodossa voidaan reaktioseokseen lisätä mer-
kitty prekursori. Vahvistus määritetään tekemällä kvantita-
tiivinen tai kvalitatiivinen analyysi merkityille tuotteil-
le, jotka voidaan erottaa merkitystä prekursorista käyttä-
35 mällä alalla tunnettuja menetelmiä. Merkitty prekursori voi
olla ribonukleosiditriposfaatti havaittaessa RNA-synteesiä
tai deoksinukleosiditriposfaatti tai oligonukleotidialuke
havaittaessa DNA-synteesiä. Merkkiaine voi olla tyypiltään

radioisotooppi tai käyttökelpoinen kemiallinen ryhmä, kuten biotiini, kromofobi, fluorofobi tai hapteeni, joka voi sitoutua vasta-aineeseen, tai mahdollisesti proteiini tai entsyymi. Merkityt tuotteet voidaan erottaa merkityistä prekursorista liukenevuuden, varauksen tai koon perusteella. Lisäksi merkitty DNA tai RNA voidaan hybridoida nukleiinihappoon, joka sisältää komplementaarisen sekvenssin ja joka voidaan immobilisoida.

10 Toisessa suoritusmuodossa voidaan vahvistusmenetelmän tuotteet sitoa immobilisoituun kannattimeen, hybridoida komplementaarisen sekvenssin sisältävään nukleiinihappokoettimeen ja erottaa hybridoitumattomasta nukleiinihappokoettimesta, joka jää liuokseen. Tuotteet DNA tai RNA voidaan sitoa suoraan kiinteään kantimeen millä tahansa vakaalla vuorovaikutuksella, kuten hydrofobisella, sähköstaattisella tai kovalenttisella vuorovaikutuksella. Lisäksi tuotteet voivat sisältää tiettyjä kemiallisia ryhmiä, esimerkiksi biotiiniä, joka voidaan sisällyttää tuotteisiin vahvistusmenetelmän aikana immobilisoituun proteiiniin, esimerkiksi avidiiniin tai streptavidiniin, sitoutumisen mahdollistamiseksi. Lisäksi tuotteet voidaan hybridoida nukleiinihappoon, joka sisältää komplementaarisen sekvenssin ja joka voidaan immobilisoida. Nukleiinihappokoetin sisältää komplementaarisen sekvenssin, joka muodostaa riittävän vakaan vuorovaikutuksen vahvistusmenetelmän tuotteen kanssa mahdollistaen sitoutumisen hybridointiolosuhteissa ja jatkuvan sitoutumisen hybridoitumattoman nukleiinihappokoettimen poistamiseen käytetyissä olosuhteissa. Edullisessa suoritusmuodossa komplementaarinen sekvenssi johdetaan siitä spesifisen nukleiinihapposekvenssin osasta, joka on ensimmäisen alukkeen ja toisen alukkeen sekvenssien välissä. Nukleiinihappokoetin voi olla yksijuosteinen DNA tai RNA tai kaksijuosteinen DNA tai RNA, jotka voi olla tehty yksijuosteisiksi, tai oligonukleotidi, joka voi koostua deoksiribonukleotideistä ja/tai ribonukleotideistä. Lisäksi nukleiinihappokoetin voi sisältää kemiallisen ryhmän, joka voi sitoutua kovalenttisesti tuote-DNA:han tai RNA:han sopivissa olosuhteissa. Nukleiinihappokoetin

- voi olla merkitty radioisotoopilla tai käyttökelpoisella kemiallisella ryhmällä, kuten biotiinilla, kromofobilla, fluorofobilla tai haptereilla, joka voi sitoutua vasta-aineeseen. Lisäksi nukleiinihappokoetin voidaan konjugoida proteiiniin tai entsyymiin, esimerkiksi fosfataasiin tai peroksidaasiin. Lisäksi nukleiinihappokoetin voi sisältää sekvenssejä, jotka mahdollistavat koettimen in vitro -replikaation.
- 10 On tarkoitettu, että vahvistusmenetelmän tuotteet voidaan analysoida menetelmillä, joita käytetään tavallisesti nukleiinihappojen yhteydessä, jotka on rikastutettu molekyylikloonaustekniikoilla, tai vaihtoehtoisesti spesifisen DNA-sekvenssin synteesi voidaan havaita hajottamalla syntetisoitu DNA restriktioendonukleasilla, mitä seuraa elektroforeettinen erottaminen ja havaitseminen käyttäen alalla tunnettuja menetelmiä. Toisessa vaihtoehdossa vahvistetun RNA:n sekvenssi voidaan määrittää DNA-synteesillä käyttämällä RNA-suunnattua DNA-polymeraasia, ensimmäistä aluketta ja dideoksinukleosiditriposfaatteja (Stoflet et al., 1988). Toisessa vaihtoehdossa vahvistetun kolmannen templaatin sekvenssi voidaan määrittää RNA-synteesillä käyttäen DNA-suunnattua RNA-polymeraasia, jota käytettiin vahvistusmenetelmässä, ja 3'-deoksiribonukleotiditriposfaatteja (Axelrod & Kramer, 1985). Toisessa vaihtoehdossa vahvistettu RNA voi koodittaa polypeptidin, joka voidaan translatoida in vitro. In vitro -translaation polypeptidituote voidaan analysoida käyttämällä vasta-ainetta.
- 30 Näyte, jonka oletetaan tai tiedetään sisältävän spesifisen nukleiinihapposekvenssin, lisätään reaktioseokseen templaatinukleiinihapon muodossa, joka kykenee vahvistumaan homogeenisesti ja jatkuvasti ja joka voi olla mikä tahansa kuviossa 1 esitetyn jakson välituote. Templaatinukleiinihappo voi olla yksijuosteinen RNA, joka sisältää 5'-päässä sekvenssin, joka on riittävän homologinen sen kanssa, joka on toisen alukkeen 3'-päässä, ja sisältää sekvenssin, joka on riittävän komplementaarinen ensimmäisen alukkeen kanssa.

Tämän muodon templaattinukleiinihappo toimii ensimmäisenä templaattina vahvistusmenetelmässä. Templaattinukleiinihappo voi olla vaihtoehtoisesti yksijuosteinen DNA, joka sisältää 3'-päässään sekvenssin, joka on riittävän komplementaarinen vähintään toisen alukkeen 3'-pään kanssa ja sisältää sekvenssin, joka on riittävän homologinen sen kanssa, joka on ensimmäisen alukkeen 3'-päässä. Tämän muodon templaattinukleiinihappo toimii toisena templaattina vahvistusmenetelmässä. Templaattinukleiinihappo voi olla vaihtoehtoisesti kaksijuosteinen DNA, jonka yksi juoste sisältää 5'-päässä toisen alukkeen koko sekvenssin ja sisältää sekvenssin, joka on riittävän komplementaarinen ensimmäisen alukkeen kanssa. Kaksijuosteinen DNA toimii kolmantena templaattina vahvistusmenetelmässä.

15

Vaikka templaattinukleiinihapon valmistaminen ei ole vahvistusmenetelmän osa, mahdollisten kaavioiden templaattinukleiinihappojen generoimiseksi kuvaaminen voi olla käyttökelpoista vahvistusmenetelmän soveltamiseksi. On ymmärrettävä, että kaaviot, joita voidaan käyttää templaattinukleiinihapon saamiseen, eivät rajoitu tässä kuvattuihin vaihtoehtoihin ja on tarkoitettu, että muita menetelmiä voidaan käyttää.

25 Eräässä vaihtoehdossa templaattinukleiinihappo, joka voi toimia ensimmäisenä templaattina, voi olla luonnollisesti esiintyvä RNA tai RNA-fragmentti, joka voidaan generoida suuremmasta RNA-molekyylistä käyttämällä alalla tunnettuja paikkaspesifisiä hydrolyysimenetelmiä (Shibahara et al., 30 1987).

Toisessa vaihtoehdossa templaattinukleiinihappo, joka voi toimia toisena templaattina, voidaan generoida kaksijuosteisesta DNA:sta hajottamalla restriktioendonukleaasilla, jossa on paikka, joka on välittämästi sekvenssin sivulla, joka on riittävän komplementaarinen toisen alukkeen 3'-pään kanssa. Saadut kaksijuosteiset DNA-fragmentit voidaan sitten tehdä

yksijuosteisiksi käyttämällä kemillisiä tai lämpödenaturointimenetelmiä.

Eräässä toisessa vaihtoehdossa templaattinukleiinihappo,
5 joka voi toimia toisena templaattina, voidaan generoida yksijuosteisesta DNA:sta tai RNA:sta, johon on hybridoitu oligonukleotidi, joka kykenee suojaamaan DNA-synteesiä. Tämä suojaava oligonukleotidi voi sisältää kemiallisen ryhmän, joka voi sitoutua kovalenttisesti templaattiin sopivissa
10 olosuhteissa. DNA-synteesillä tästä suojatusta templaattista käyttämällä ensimmäistä aluketta voidaan saada aikaan syntetisoitu DNA, jossa on sama 3'-pää kuin toisessa templaattissa. Jos alkuperäinen templaatti on RNA, niin saatua DNA-RNA-hybrididiä voidaan käyttää suoraan templaattinukleiinihappona.
15 Jos alkuperäinen templaatti on DNA, niin saatu toisen templaatin kopio voidaan sitten erottaa alkuperäisestä templaattista käyttämällä kemiallisiä tai lämpödenaturointimenetelmiä.

20 Eräässä toisessa vaihtoehdossa templaattinukleiinihappo, joka voi toimia kolmantena templaattina, voidaan generoida yksijuosteisesta DNA:sta tai RNA:sta DNA-synteesillä DNA- tai RNA-templaattista käyttämällä toista aluketta. Saatua syntetisoitu DNA voidaan sitten erottaa alkuperäisestä templaattista käyttämällä kemiallisiä tai lämpödenaturointimenetelmiä.
25 Lisäksi RNA-templaatti voidaan hydrolysoida käyttämällä kemiallisiä tai entsyymaattisia menetelmiä. Saadussa yksijuosteisessa DNA:ssa on toisen alukkeen sekvenssi kiinnittyneenä kovalenttisesti 5'-päähän ja se sisältää sekvenssin,
30 joka on riittävän komplementaarinen ensimmäisen alukkeen kanssa. Tämä yksijuosteinen DNA voidaan muuttaa transkriptionaalisesti funktionaaliseksi kaksijuosteiseksi DNA:ksi hybridoidamalla ensimmäinen aluke yksijuosteiseen DNA:han ja syntetisoimalla DNA-sekvenssi, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt ensimmäiseen alukkeeseen ja komplementaarinen yksijuosteisen DNA:n kanssa.
35

Toisessa vaihtoehdossa yksijuosteinen DNA- tai RNA-templaatti voidaan saada kaksijuosteisesta DNA:sta, kaksijuosteisesta RNA:sta tai DNA-RNA-hybridistä käyttämällä kemiallisia, termisiä tai mahdollisesti entsyymaattisia menetelmiä. Saatua yksijuosteista DNA:ta tai RNA:ta voidaan käyttää käyttämällä yhtä edellä esitettyä vaihtoehtoista kaavaa templaattinukleiinihapon generoimiseksi, joka voi toimia ensimmäisenä, toisena tai kolmantena templaattina. Lisäksi voidaan käyttää samanaikaisesti vaihtoehtoista kaavaa, johon kuuluu ensimmäinen aluke ja nukleiinihapon toinen juoste ja toista vaihtoehtoista kaavaa, johon kuuluu toinen aluke ja nukleiinihapon toinen (komplementaarinen) juoste, templaattinukleiinihappojen generoimiseksi.

15 On havaittu yllättäen, että sekä DMSO:n että BSA:n lisääminen reaktioväliaineeseen lisää merkittävästi edellä kuvatun vahvistusmenetelmän herkkyyttä ja toistettavuutta. Käytettäessä esillä olevaa keksintöä on havaittavissa sekä eristettävissä kohdekopioilukuja alueella $1-10^6$. DMSO loppukonsentraatiossa alueella 0 % -30 % ja BSA loppukonsentraatiossa alueella $5 \mu\text{g/ml} - 2500 \mu\text{g/ml}$ ovat käyttökelpoisia vahvistusmenetelmän herkkyyden ja toistettavuuden parantamiseksi. Edullisessa suoritusmuodossa käytetään BSA-konsentraatiota alueella $50 \mu\text{g/ml} - 500 \mu\text{g/ml}$ ja DMSO-konsentraatiota

25 alueella 15 % -25 %. Toisessa edullisessa suoritusmuodossa käytetään BSA-konsentraatiota alueella $100 \mu\text{g/ml} - 300 \mu\text{g/ml}$ ja DMSO-konsentraatiota alueella 15 % -25 %. DMSO:n ja BSA:n käyttö vahvistusreaktioväliaineessa saa aikaan parantuneen herkkyyden ja toistettavuuden verrattaessa reaktioväliaineeseen, jossa ei ole DMSO:ta ja BSA:ta, käyttöön, mutta kuitenkin pelkkä reaktioväliaine on riittävä kohdenukleiinihapposekvenssien havaitsemiseen ja eristämiseen. DMSO:n ja BSA:n käyttö reaktioväliaineessa on sopivaa vahvistustason nostamiseksi vähintään 10-kertaisesti verrattuna pelkkään

35 reaktioväliaineeseen. Eräässä edullisessa suoritusmuodossa vahvistus käyttämällä DMSO:ta ja BSA:ta esillä olevan keksinnön mukaisesti lisääntyy vähintään 100-kertaisesti. Toisessa edullisessa suoritusmuodossa vahvistaminen käyttämällä

DMSO:ta ja BSA:ta esillä olevan keksinnön mukaisesti lisääntyy vähintään 1000-kertaisesti. Toisessa edullisessa suoritussuodossa vahvistaminen käyttämällä DMSO:ta ja BSA:ta esillä olevan keksinnön mukaisesti lisääntyy vähintään 10000-kertaisesti. Toisessa edullisessa suoritussuodossa vahvistaminen käyttämällä DMSO:ta ja BSA:ta esillä olevan keksinnön mukaisesti lisääntyy vähintään 10^6 -kertaisesti. Toisessa edullisessa suoritussuodossa vahvistaminen käyttämällä DMSO:ta ja BSA:ta esillä olevan keksinnön mukaisesti lisääntyy vähintään 10^7 -kertaisesti. Toisessa edullisessa suoritussuodossa vahvistaminen käyttämällä DMSO:ta ja BSA:ta esillä olevan keksinnön mukaisesti lisääntyy vähintään 10^8 -kertaisesti.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää DMSO:n ja BSA:n lisäksi muita spesifisiä tehostuskemikaaleja (SPC) esillä olevan keksinnön mukaisesti, joilla saadaan vahvistustason lisääntyminen verrattuna reaktioväliaineisiin, joissa ei ole SPC:itä.

20

On myös havaittu odottamatta, että DMSO:n lisääminen alueella 2-20 % esillä olevan vahvistusmenetelmän reaktioväliaineeseen parantaa menetelmän toistettavuutta, kuten esitetään esimerkiksi kuviossa 3. Pelkän DMSO:n käytön on osoitettu myös vähentävän vahvistustasoa alkaen 15-20 % DMSO reaktioväliaineessa.

Materiaalit ja menetelmät

30 Materiaalit

Oligonukleotidit syntetisoitiin käyttämällä Applied Biosystems 380A DNA-syntetisoijaa. Oligonukleotidisynteesiin tarvittavat pylvää, fosforiamidiitit ja reagenssit saatiin Applied Biosystems, Inc.:stä Technical Marketing Associatesin kautta. Oligonukleotidit puhdistettiin polyakryyliamidigeelielektroforeesilla, mitä seurasi DEAE-selluloosakromatografia. Radioisotooppi [$-32p$] UTP (800 Ci/mmoolia) oli Amershamilta. DNA:n hajottamiseen ja ligatoimiseen tarvittavat

entsyymit hankittiin New England Biolabsilta ja niitä käytettiin toimittajan suositusten mukaisesti. Valmisteet, jotka sisälsivät DNA-polymeraasi 1 (Klenow) -fragmentin, hankittiin myös New England Biolabsista. Promega Biotecin RNAasi ja T7 RNA-polymeraasi hankittiin Bio/Can Scientific Inc.:n kautta. Käänteistranskriptaasi ja RNAasi H hankittiin Pharmaciasta. Proteinaasi K:n toimittaja oli Boehringer Mannheim Canada. Kaikkiin transformaatioihin käytettiin *E. coli* -lajia HB101 (ATCC 33694). Plasmidi pUC19 (Norrander et al., 1983) hankittiin Bethesda Research Laboratoriesilta.

DNA:n eristäminen ja sekvenointi

E. coli -transformantit viljeltiin YT-väliaineessa (Miller, 1972), joka sisältää 50 µg/ml ampicilliinia. Plasmidi-DNA puhdistettiin nopealla keittomenetelmällä (Homes ja Quigley, 1981). Kaikissa konstruktioissa käytetyt DNA-fragmentit ja -vektorit erotettiin elektroforeesilla alhaisen sulamispisteen agarosilla ja puhdistettiin sulaneesta agarosista fenoliuuttamisella ja etanolipresipitoinnilla (Maniatis et al., 1982). Plasmidi-DNA sekvennoitiin käyttämällä dideoksi-
menetelmän (Sanger et al., 1977) modifiointia (Hattori et al., 1985). Reaktiot ajettiin käyttämällä -20 universaalista aluketta (New England Biolabs).

25 TCA-presipitointi

Vahvistusreaktioiden alikvootit (5 ml) tukahdutettiin 20 ml:ssa 10 mM EDTA ja sijoitettiin jään päälle kunnes kaikki ajankohtanäytteet oli kerätty. Tukahdutetut näytteet levitettiin sitten lasisuodatinlevyille ja välittömästi tiputettiin jääkylmään 5 % trikloorietikkahappo (TCA) - 1 % natriumpyrofosfaattiin 10 min aikana sekoittamalla silloin tällöin. Kahta 5 min pesua jääkylmällä 5 % TCA:lla seurasi kaksi lisäpesua 95 % etanolilla ja kuivaksi lyofilisointi. Radioaktiivisuus määritettiin nestetuikelaskimessa.

35

Polyakryyligeelielektroforeesi

Näytteisiin (1-6 ml) sekoitettiin 4-5 ml formamidiväriä (90 % deionoitua formamidia, 10 mM TrisHCl (pH 8,0), 1 mM

EDTA, ksyleenisyanoli- ja bromifenolisiniä) ja levitettiin esijaon 12 cm pitkälle 7 % denaturointipolyakryyliamidigeelille. Geelit ajettiin 350 voltissa kunnes bromifenolisininen väri oli tavoittanut pohjan. Joissakin tapauksissa geelit kiinnitettiin ja kuvattiin ennen autoradiografiaa. Kiinnittäminen käsitti 15 min pesun 10 % metanoli - 7 % etikkahapossa. Tällä menetelmällä erotettujen RNA-tuotteiden profiilit visualisoitiin autoradiografialla huoneenlämpötilassa.

10

Esimerkki 1: Gag-testijärjestelmään tarkoitettujen oligonukleotidien rakentaminen ja synteesi

Synteettinen DNA-sekvenssi (kuvio 2A) tehtiin siten, että se sisältää EcoRI-paikan, T7-faagipromoottorin, sekvenssin, joka tarvitaan, että T7 RNA-polymeraasi aloittaa transkription, ja 19 bp hybridointialueen (hybridointialue 1). 47 b antisense-juosteinen oligonukleotidi (T7H1.GAG), joka osallistuu näiden elementtien kloonaukseen, toimii myös ensimmäisenä alukkeena. Hybridointialue 2 on 53 bp poispäin hybridointialueesta 1 ja on 20 bp pitkä. Tälle alueelle tehty aluke (H2.GAG) on sense-juosteen 20 b oligonukleotididuplikaatti ja sitä ei käytetä kloonaukseen. Sekvenssi, joka käsittää ja sisältää hybridointialueet, on HTLV-III-genomin gag-osan 92 bp segmentti, AIDS:n aiheuttaja. Tämä erityinen geenisegmentti valittiin, koska alukkeiden ennustettiin hybridoituvan tehokkaasti ja koska kahden hybridointialueen välinen ero on suhteellisen lyhyt. Lisäksi XbaI-paikka sijaitsi sekvenssin päässä kloonauksen helpottamiseksi. gag-testisekvenssi sisältää myös SphI- ja PstI-paikat, jotka voivat avustaa rekombinantteja seulottaessa.

Kaikkiaan käytettiin neljää oligonukleotidiä tämän fragmentin kloonaukseen. N1.GAG, jota käytetään sekä gag-testiä gag2-testisekvenssin konstruoimiseen, täydentää antisense-juosteen ja sitä käytetään vain kloonauksen menetelmässä. Samaten on T74.PRO T7-promoottorin sense-juosteen komponentti. Kuitenkin N2.GAG:tä käytettiin kummankin testifragmentin

konstruoimiseen ja sitä on myös käytetty välituotteena (toinen templaatti) vahvistusjakson kahdessa vaiheessa. Kokonainen kloonattu gag-testifragmentti voi olla myös vahvistusjakson välituote (kolmas templaatti). Kun gag-testi-DNA on kloonattu sopivaan vektoriin, se voidaan transkriboida T7 RNA-polymeraasilla RNA-fragmentin (ensimmäinen templaatti) tuottamiseksi, joka on käyttökelpoinen vahvistusvälituote kolmessa vaiheessa. Lisäksi T7H1.GAG ja H2.GAG toimivat alukkeina testausjärjestelmässä.

10

gag2-testi synteettinen DNA-fragmentti (kuvio 2B) ei sisällä T7-promoottoria vaan sekvenssin jäännös on identtinen gag-testisekvenssin kanssa ja siten N1-GAG ja N2.GAG kuuluvat sen konstruktion. Antisense-juosteen täydelliseksi tekemiseen tarvittava oligonukleotidi on nimeltään H1-GAG. gag2-testifragmenttia voidaan käyttää kloonauksen jälkeen templaattina testausvahvistuksessa käyttämällä DNA-restriktio-fragmenttia templaattinukleinihappona.

20 Esimerkki 2: Gag-testiplasmidien konstruktio

Oligonukleotidit T74.PRO ja N1.GAG (2 mg kumpaakin) fosforyloitiin erikseen 20 ml:n reaktioissa, jotka sisälsivät 70 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP ja 5 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia 37 °C:ssa 30 min. Fosforyloituun T74.PRO ja N1.GAG (10 ml kumpaakin) sekoitettiin 1 mg fosforyloimatonta T74H1.GAG ja N2.GAG ja 3 ml 100 mM Tris-HCl (pH 7,8) - 500 mM NaCl lopullisessa tilavuudessa 29 ml gag-testikokoonpanoa varten. Gag2-testiseos sisälsi 10 ml fosforyloitua N1.GAG, 1 mg fosforyloimatonta 1.GAG ja N2.GAG ja 1,8 ml 100 mM Tris-HCl (pH 7,8) - 500 mM NaCl lopullisessa tilavuudessa 18 µl. Oligonukleotidiseokset hybridointiin sijoittamalla ne 90 °C:een 10 minuutiksi, mitä seurasi hidas jäädyttäminen huoneenlämpötilaan 10-16 h, 60 ml reaktioita, jotka sisälsivät 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM ATP ja 50 µg/ml BSA, käytettiin hybridoitujen oligonukleotidien ligatoimiseksi yhteen. 400 yksikköä T4 DNA-ligaasia lisättiin gag-testireaktioon ja sitä

inkuboitiin 15 °C 2 tuntia kun taas gag2-reaktiota inkuboi-
ttiin 14-16 h 200 yksiköllä T4 DNA-ligaasia.

Eristettyihin ja puhdistettuihin DNA-segmentteihin sekoi-
5 tettiin plasmidia pUC19, joka oli linearisoitu hajottamalla
restriktioensyymipaikat polylinkkerialueella. T4 DNA-ligaa-
sia käytettiin gag-testisekvenssin ligatoimiseen pUC19:n
EcoRI-XbaI-fragmenttiin, kun taas gag2-testisekvenssi liga-
toitiin SmaI-XbaI-fragmenttiin. Näiden reaktioiden jälkeen
10 saaduista transformanteista peräisin olevaa plasmidi-DNA:ta
käytettiin E. colin transformoimiseen ja ne seulottiin re-
striktioanalyysillä ja lopulliset plasmidit (PGAG.TEST ja
pGAG2.TEST) määritettiin oikeiksi sekvenssianalyysillä.

15 Esimerkki 3: Alukekonsentraation vaikutus RNA-vahvistukseen

Reaktioseokset (25 ml), joita käytettiin RNA:n vahvistami-
seen, joka oli transkriboitu gag-testioligonukleotideistä,
sisälsivät 50 mM Tris-HCl (pH 8,45), 6 mM MgCl₂, 40 mM KCl,
20 10 mM ditiotreitolia, 0,5 mM NTP (ATP; CTP; GTP; UTP), 1 mM
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 yksikköä RNAsiinia, 10
yksikköä T7 RNA-polymeraasia, 10 yksikköä käänteistranskrip-
taasia, 0,4 yksikköä RNAasi H:ta ja 10 mCi [-32p] UTP. Kaksi
reaktioista sisälsi 0,5 ng (0,015 pmoolia) N2.GAG, kun muut
25 kaksi reaktiota eivät sisältäneet templaattia. Alukkeita
T7H1.GAG ja H2.GAG lisättiin kumpaakin lopullisissa pitoi-
suuksissa 3,4 mM tai 0,34 mM reaktioihin, jotka sisälsivät
joko N2.GAG tai eivät sisältäneet mitään templaattia. Reak-
tioita inkuboitiin 42 °C 2 H. RNA:n kokonaissynteesiä tark-
30 kailtiin määrittämällä TCA:n sisällyttäminen, joka on liu-
kenematon cpm, 30 min välein. Alukekonsentraation vaikutus
templaattista riippuvaan RNA-synteesiin on esitetty taulukos-
sa 1. Kunkin reaktion alikvootit, jotka sisälsivät yhtä suu-
ret määrät syntetisoitua RNA:ta, analysoitiin PAGE:lla ja
35 autoradiografialla (kuvio 3, kaista 1-4, numeroitu samoin
kuin reaktiot).

Taulukko 1

RNA-vahvistuminen N2.GAG:sta 2 h kuluttua

	Kunakin alukkeen	Templaatti	Syntetisoitunut	
5	<u>Reaktio</u>	<u>konsentraatio (mM)</u>	<u>RNA (mg)</u>	
	1	3,4	0,5	2,8
	2	3,4	-	2,1
	3	0,34	0,5	1,8
	4	0,34	-	0,7

10

Havaittiin, että joskin reaktio 1 tuotti suurimman isotoopin sisällyttämisen, ei-templaattikontrolli, reaktio 2, oli myös korkea (73 % reaktiosta 1) ja tuotti hyvin samanlaisen elektroforeettisen profiilin. Siten ilmenee, että korkeiden alukekonsentraatioiden läsnäollessa tuotetaan RNA-transkripti, jonka koko on identtinen sen kanssa, jota odotetaan vahvistuksessa, minkä tahansa templaatin poissaollessa. Tulokset käytettäessä näytteitä, joissa oli 10-kertainen alukepitoisuuden lasku, olivat dramaattisesti erilaisia. Reaktiossa 3 tuotetun RNA:n määrä oli 2,6 kertaa reaktion 4 määrä, kun taas todellisuudessa kaikki transkriptista löydettiin reaktiossa 3 yhdestä odotetun koon kaistasta eikä reaktiosta 4 löydetty fragmentteja, jotka ovat suurempia kuin 60-70 b. Täten alukekonsentraatiolla on suuri merkitys RNA-vahvistuksen tarkkuudessa ja tehokkuudessa.

25

Kontrolli-RNA-transkripti, jota käytettiin esittämään odotetun fragmentin kokoa, joka fragmentti generoidaan vahvistusjärjestelmällä (kuvion 3 kaista 0), valmistettiin testiplasmidista transkriptoimalla. pGAG.TEST linearisoitiin hajottamalla XbaI:llä, proteinaasilla K käsiteltynä (Maniatis et al., 1982), fenoliuutettuna ja etanolipresipitoituna. Sitten T7 RNA-polymeraasia käytettiin toimittajan suosituksen mukaisesti 0,5 mg:n saatua fragmenttia transkriboimiseksi 25 ml:ssa reaktioseosta, joka sisälsi 10 mCi [-32p] UTP.

35

Esimerkki 4: Templaattikonsentraation vaikutus RNA-vahvistukseen

Standardi 50 ml:n reaktioseos, jota käytettiin RNA:n vahvistamiseksi, joka oli transkriboitu gag-testioligonukleotideista, sisälsi 0,34 mM T7H1.GAG, 0,34 mM H2.GAG, 50 mM Tris-HCl (pH 8,45), 6 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 10 mM DTT, 0,5 mM NTP, 1 mM dNTP, 40 yksikköä RNasiinia, 20 yksikköä T7 RNA-polymeraasia, 20 yksikköä käänteistranskriptaasia, 0,8 yksikköä RNAasi H:ta ja 10-20 mCi [-32p] UTP. Reaktiot sisälsivät templaattimääriä (N2.GAG), jotka vaihtelivat 1 ng:sta 1 fg:aan. Yksi reaktioista ei sisältänyt mitään templaattia. Reaktioita inkuboitiin 42 °C:ssa 3 h, jonka aikana RNA:n kokonaissynteesiä tarkkailtiin määrittämällä TCA:n liittymisen, joka on liukenematon cpm, 30 min välein. Kuten taulukossa 2 esitetään, kokonais-RNA-synteesi oli suurempi kuin templaattiton kontrolli kaikille testatuille templaateille. Vaikkakin RNA:n kokonaissynteesi laski tavallisesti templaattikonsentraation laskiessa, tämä synteesin lasku ei ollut kvantitatiivinen. Täten RNA:n vahvistustaso lähtötemplaattia kohden nousi tavallisesti templaattikonsentraation laskiessa. 8 x 10⁸-kertainen vahvistus saavutettiin syntetisoimalla 0,8 mg RNA 1 fg:sta N2.GAG-templaattia. Yksi fg 102-b N2.GAG-oligonukleotidiä on suunnilleen 2 x 10⁴ molekyyliä.

Taulukko 2

RNA-vahvistus N2.GAG:sta 3 h kuluttua

		Syntetisoitunut	-kertainen	
30	<u>Reaktio</u>	<u>Templaatti</u>	<u>RNA (mg)</u>	<u>vahvistus</u>
	1	1 ng	3,5	3,5 x 10 ³
	2	100 pg	4,4	4,4 x 10 ⁴
	3	10 pg	4,1	4,1 x 10 ⁵
	4	1 pg	3,0	3,0 x 10 ⁶
35	5	100 fg	2,7	2,7 x 10 ⁷
	6	10 fg	1,9	1,9 x 10 ⁸
	7	1 fg	0,78	7,8 x 10 ⁸
	8	-	0,046	-

RBA, joka syntetisoitiin 3 h reaktioajan jälkeen, analysoitiin PAGE:lla kunkin templaattikonsentraation osalta (kuvio 4, kaistat 1-8, numeroitu samoin kuin reaktiot). Pääkaista, joka edustaa noin 100 b:n RNA:ta oli läsnä kaikissa reaktioissa paitsi niissä, jotka sisältävät 1 fg templaattia ja eivät sisällä templaattia. Reaktiossa, joka sisälsi 1 fg templaattia, ei ollut paljon tätä 100 b tuotetta 3 h:ssa mutta kaiken kaikkiaan RNA-synteesi oli suurempi ja kvalitatiivisesti erilainen kuin templaattittomassa reaktiossa.

10

Esimerkki 5: RNA-tuotteiden hybridointianalyysi

Vahvistusreaktiot, jotka sisälsivät N2.GAG-templaattimääriä 1 pg - 0,1 fg, suoritettiin esimerkin 4 opetusten mukaisesti paitsi että radiomerkitty UTP jätettiin pois. Reaktioita inkuboitiin 42 °C:ssa 3 h. Alikvootit poistettiin jokaisesta reaktiosta 30 min välein ja ne levitettiin nailonkalvolle (Amersham). Näihin reaktioaliquotteihin sisältyvät nukleinihapot kiinnitettiin altistamalla ultravioletivalolle.

Kalvoa esihybridointiin 50 °C:ssa 1 h esihybridointipuskurissa, joka sisälsi loppukonsentraation 50 til/til formamidia, 5 X SSC ja 5 X Denhardtin liuosta (Maniatis et al., 1982, Southern et al., 1975) tilavuudessa, joka on ekvivalenttinen 5 ml:n liuosta 100 cm² kohti kanssa ja hybridointiin radiomerkityllä koettimella hybridointiliuoksen 106 cpm/ml spesifisellä aktiivisuudella. Hybridointia suoritettiin 50 °C:ssa 16 h 50 % formamidissa, 5 X SSC ja 5 X Denhardtin liuoksessa (Maniatis et al., 1982, Southern et al., 1975). Radiomerkitty koetin oli synteettinen oligonukleotidi 5'GATCTGGGATAGAGTACATCCA 3', joka oli merkitty 5'-päässä käyttämällä T4-polynukleotidikinaasia ja (-32p) ATP. Sen jälkeen kalvo pestiin 50 °C:ssa 2, 3 min pesusarjoissa, jotka koostuivat 2 X SSC, 0,1 % til/til SDS ja 0,2 X SSC, 0,1 % til/til SDS (Southern et al., 1975, Maniatis et al., 1982, Szostak et al., 1979).

Kuvio 5 esittää vahvistusreaktioissa suoritettujen hybridointianalyysien tulokset, jotka reaktiot sisältävät erilai-

sia määriä N2.GAG-templaattia, jotka otettiin näytteenä erilaisina inkubointiaikoina.

Jokainen kuvion 5 pylväs esittää erilaista ajankohtaa (1, 30
5 min; 2, 60 min; 3, 90 min; 4, 120 min; 5, 150 min; 6, 180
min) ja jokainen rivi esittää lisätyn N2.GAG-templaatin eri-
laista määrää (1, 1 pg; 2, 100 fg; 3, 10 fg; 4, 1 fg; 5, 0,1
fg; 6, ei templaattia). Merkittyyyn koettimeen hybridoitujen
nukleinihappojen vahvistus havaittiin 1-3 osalta (1 pg - 10
10 fg), kuitenkin hybridointi spesifisiin nukleinihappoihin
riveillä 4-5 (1 fg, 0,1 fg) ei ollut suurempi kuin rivillä
6 (ei templaattia). Rivin 6 merkityn näytteen ilmeinen ei-
spesifinen sitoutuminen näyttää liittyvän DNA- tai RNA-syn-
teesiin, koska hybridointisignaali lisääntyy ajan lisäänty-
15 essä.

Esimerkki 6: DNA-restriktiofragmentin käyttö templaattina

Plasmidi pGAG2.TEST hajotettiin MspI:llä, käsiteltiin pro-
20 teinaasi K:lla, puhdistettiin fenoliuuttamisella ja etano-
lipresipitaatiolla ja denaturoitiin keittämällä 5 minuuttia.
Vahvistusreaktiot suoritettiin ja analysoitiin seuraten esi-
merkin 5 opetusta paitsi että templaattina käytettiin MspI-
hajotettua pGAG2.TESTiä N2.GAG-oligonukleotidin asemasta.
25 Kuhunkin reaktioon lisätyn plasmidin määrät vaihtelivat 55
ng:sta 5,5 pg:aan ja templaattittomaan. Kyseisessä näytteessä
olevan lisä-DNA:n simuloimiseksi vaihtoehtoiset reaktiot
sisälsivät 1 ng vasikan kateenkorvan DNA:ta, joka oli hajo-
tettu, puhdistettu ja denaturoitu samalla tavalla. 3 tunnin
30 42 °C:ssa inkuboinnin jälkeen RNA:n synteesi määritettiin
TCA-presipitoinnilla ja PAGE-analyysillä. Kuten taulukossa
3 esitetään, RNA:n kokonaissynteesi oli suurempi kuin tem-
plaatittomissa verrokeissa kaikkien testattujen templaatti-
konsentraatioiden osalta. Vahvistuksen taso laskettiin RNA-
35 synteesiin perustuen kyseisestä templaatista, joka oli 1,8 %
kokonaisplasmidi-DNA:sta.

RNA:n kokonaissynteesi (vahvistustaso) erityisestä alkuta-
sotemplaattikonsentraatiosta oli johdonmukaisesti alhaisempi
restriktiofragmentin osalta (taulukko 3) verrattuna synteet-
tisen oligonukleotiditemplaatin tasoon (taulukko 2). Tämä
5 voi johtua käytetyissä olosuhteissa esiintyvistä kilpailusta
restriktiofragmenttitemplaatin komplementaarisen juosteen
kanssa.

Taulukko 3

10 RNA-vahvistaminen MspI-hajotetusta pGAG2TESTistä

			-kertainen
<u>Reaktio</u>	<u>Templaatti*</u>	<u>Syntetisoitu RNA**</u>	<u>vahvistus**</u>
1	55,0 ng [1 ng]	3,65	3,7 x 10 ³
2		(4,05)	(4,1 x 10 ³)
15 3	5,5 ng [100 pg]	3,54	3,5 x 10 ⁴
4		(3,16)	(3,2 x 10 ⁴)
5	550,0 pg [10 pg]	2,29	2,3 x 10 ⁵
6		(2,79)	(2,8 x 10 ⁵)
7	55,0 pg [1 pg]	2,62	2,6 x 10 ⁶
20 8		(0,67)	(0,7 x 10 ⁶)
9	5,5 ng [100 pg]	1,37	1,4 x 10 ⁷
10		(2,26)	(2,3 x 10 ⁷)
11		1,25	
12		(0,08)	

25

* Hakasuluissa olevat luvut esittävät N2.GAG:n ekvivalent-
tisia määriä.

** Suluissa olevat luvut esittävät RNA-synteesiä 1 mg:n
MspI-hajotettua vasikan kateenkorvan DNA:n läsnäollessa.

30

RNA, joka syntetisoitui 3 h reaktioajan kuluttua, analysoi-
ttiin PAGE:lla (kuvio 6, kaistat 1-6, 11 ja 12 ja numeroitu
samoin kuin reaktiot). Pääkaista, joka osoittaa noin 100 b:n
RNA:ta, oli läsnä reaktioissa (kaistat) 1-6 mutta sitä ei
35 ollut templaattittomissa reaktioissa (kaista 11 ja 12). Kais-
tan 0 RNA on standardi, joka valmistettiin seuraten esimer-
kin 3 opetusta. Siinä ei ollut mitään kvalitatiivista eroa
syntetisoidussa RNA:ssa eikä MspI-hajotetun vasikan kateen-

korvan DNA:n lisä 1 mg yhteydessä (kaistat 2, 4 ja 6) tai ilman sitä (kaistat 1, 3 ja 5).

Esimerkki 7: RNA-fragmentin käyttö templaattina

5

Plasmidi pGAG.TEST hajotetaan XbaI:llä, käsitellään protei-
naasi K:lla ja puhdistetaan fenoliuuttamisella ja etanoli-
presipitoinnilla. N2.GAG:n kanssa komplementaarisen sek-
venssin RNA transkriboidaan linearisoidusta pGAG.TEST-plas-
10 midista käyttämällä T7 RNA-polymeraasia. Saatu RNA puhdis-
tetaan hajottamalla DNAasilla (ProMega BioTec, Madison, WI),
mitä seuraa fenoliuuttaminen ja etanolipresipitointi. Puh-
distettua RNA:ta käytetään templaattina esimerkin 5 mukai-
siin vahvistusreaktioihin. RNA-määrät lisätään kuhunkin
15 reaktioon ja ne vaihtelevat 55 ng:sta 5,5 pg:aan ja templaa-
tittomaan. 3 h inkuboinnin 42 °C jälkeen spesifisen RNA:n
synteesi määritetään hybridoidamalla merkittyyn oligonukleoti-
dikoettimeen esimerkin 5 mukaisesti.

20 Esimerkki 8: Ribosomaalisen RNA:n käyttö internaalisten sek-
venssien templaattivahvistuksena

Kahta aluketta käytetään RNA-sekvenssien vahvistamiseen,
jotka ovat komplementaarisia E. coli 16S ribosomaalisen
25 RNA:n (rRNA) osan kanssa. Toinen näistä alukkeista
T7HIRIB3.PR2 (AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGTATTACCGCGGCTGCTG)
sisältää T7-promoottorin antisense-juosteen ja aloituspaikan
ja sekvenssin, joka on komplementaarinen 16S rRNA:n kanssa.
Toinen RIB8.PR (AATACCTTTGCTCATTGACG) on komplementaarinen
30 DNA:n kanssa, joka on syntetisoitu käyttämällä
T7H1RIB3.PR2:a alukkeena ja 16S rRNA:ta templaattina. Kolmas
synteettinen oligonukleotidi RIB5.PR (AGAAGCACCGGCTAAC),
joka mahdollistaa vahvistuksen havainnoinnin, on komplemen-
taarinen vahvistusreaktion RNA-tuotteiden kanssa, jotka ovat
35 puolestaan komplementaarisia alkuperäisen RNA-templaatin
kanssa.

Reaktioseokset (25 ml) sisältävät 50 mM Tris-HCl (pH 8,45), 6 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 10 mM DTT, 0,5 mM NTP, 1 mM dNTP, 20 yksikköä RNasiinia, 10 yksikköä T7 RNA-polymeraasia, 10 yksikköä AMV-käänteistranskriptaasia, 0,4 yksikköä RNAasi H:ta, 0,34 μm T7H1RIB3.PR2 ja 0,34 μm RIB8.PR.

E. colin määrät, jotka vaihtelevat 50 ng:stä 50 fg:hen, lisätään reaktioihin. Yksi reaktio ei sisällä lisättyä rRNA:ta. Reaktioita inkuboidaan 42 °C:ssa 3 h, jona aikana alikvootit poistetaan 30, 60, 120 ja 180 minuutin kuluttua. Reaktioaliquootit tukahdutetaan, kiinnitetään nylonkalvoon ja hybridoidaan 32p 5'-pään merkittyyn RIB5.PR-koettimeen esimerkin 5 mukaisesti.

15 Esimerkki 9: Ribosomaalisen RNA:n käyttö 5'-terminaalisten sekvenssien templaattivahvistuksena

Kahta aluketta käytetään RNA-sekvenssien vahvistamiseen, jotka ovat komplementaarisia E. coli 16S rRNA:n osan kanssa. Toinen näistä alukkeista RIB12.PR (TTACTCACCCGTCCGCC) on komplementaarinen 16S rRNA:n kanssa. Toinen T78H1RIB5.PR (AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAATTGAAGAGTTTGATCAT) on komplementaarinen DNA:n 3'-pään kanssa, joka on syntetisoitu käyttämällä RIB12.PR alukkeena ja 16 S rRNA:ta templaattina. Kolmas synteettinen oligonukleotidi RIB11.PR (GTTCGACTTG-CATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCC), joka mahdollistaa vahvistuksen havainnoinnin, on komplementaarinen sekä vahvistusreaktion RNA-tuotteiden että alkuperäisen rRNA-templaatin kanssa. rRNA:n vahvistusreaktiot ja syntetisoidun RNA:n havaitseminen suoritetaan esimerkin 8 mukaisesti paitsi että T7H1RIB5.PR ja RIB12.PR käytetään alukkeina (T7H1RIB3.PR2 ja RIB8.PR asemasta) ja RIB11.PR käytetään oligonukleotidikoettimena (RIB5.PR asemasta).

35 Vaikka keksinnön edullisia suoritusmuotoja on kuvattu yksityiskohtaisesti, ymmärtää alan asiantuntija, että siihen voidaan tehdä muunnelmia poikkeamatta keksinnön hengestä tai oheisten patenttivaatimusten piiristä.

Esimerkki 10

Nukleiinihappovahvistuksen spesifinen parantaminen käyttämällä dimetyylisulfoksidia (DMSO) ja naudan seerumin albumiinia (BSA)

Edellä olevissa esimerkeissä esitettyä nukleiinihappojen vahvistusmenetelmää käytettiin yhdessä seuraavien bakteerilajien, plasmidien ja RNA-templaatin kanssa. pGEM-3-pol-plasmidi ja pUC-pol-plasmidi, jotka kukin sisälsivät HIV 1:stä (laji HxB2) peräisin olevan 1450 emäsparin restriktiofragmentin, konstruointiin BamH1EcoR1-alakloonista, joka saatiin lahjana Tri R. Gallolta (NCI, NIH, Bethesda, Maryland). Tämä restriktiofragmentti sisältää Hiv1 gag -geenin osan ja suurimman osan Hiv 1 pol -geenistä. E. coli -laji HB101 transformoitiin joko pGEM-3-pol-plasmidilla tai pUC-pol-plasmidilla. Plasmidi-DNA valmistettiin menetelmillä, jotka on kuvannut Maniatis et al. MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL, s. 86, Cold Spring Harbor Laboratory.

pol-DNA-templaatin saamiseksi pGEM-3-pol-plasmidi lineari-soitiin EcoR1:llä, uutettiin fenoli-kloroformilla ja presipitoitiin etanolissa. EcoR1 leikkaa ainutlaatuisesti inser-toidun pol DNA:n päässä. Puhdistettu DNA transkriboitiin käyttämällä SP6 RNA-polymeraasia (sopiva RNA-polymeraasi on saatavissa Promegasta, Madison, WI) Melton et al:n menetelmän, Nucleic Acids Res 12. 7035 (1984), mukaisesti. 5 yksikköä RNAasitonta DNAasi I:tä (sopiva DNAasi I on saatavissa myös Promegasta, Madison, WI) lisättiin ja seosta inkuboi-tiin 37 °C:ssa 15 minuuttia. RNA-tuote uutettiin fenoli-kloroformilla ja presipitoitiin etanolilla. RNA:n saanto määritettiin spektrofotometrisesti.

DMSO:n inklusion lopullinen konsentraatio 0 %-20 % reaktio-seokseen, joka on käytetty vahvistukseen, on kuten taulukossa 7 esitetään ja se aikaan ei-spesifisten tuotteiden (NSP) vähenemisen ei-tuottavista sivurektioista. Kuvio 8 esittää, että kaksi NSP-tyyppiä, jotka on nimetty P1:P1 ja P1:P2,

eliminoitiin ei-kohdesekvenssiä sisältävistä näytteistä käyttämällä 15 % DMSO:ta reaktioväliaineessa.

DMSO:n läsnäolo 15 %:na reaktioväliaineessa vaikuttaa lisäksi näyteajoon parantaen tuottavuutta esillä olevassa vahvistusmenetelmässä, kuten esitetään kuvion 9 rako-täplityksessä. Käytettiin 10^3 ja 10^4 kohdesekvenssin kopiota ja DMSO (esitetty "+") paransi toistettavuutta, kuten kunkin kaistan 5 aluetta osoittavat, sekä herkkyyttä, kuten "+" ja "-" -kaistojen vertailu esittää 10^3 kohdesekvenssin kopion osalta.

Kun sekä DMSO:ta että BSA:ta (sopiva BSA on saatavissa Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, molekyylibiologiaan tarkoitettuna erityislaatuina) käytettiin reaktioväliaineessa, parantuivat herkkyys ja toistettavuus merkittävästi, kuten kuviossa 10A ja 10B esitetään ja jotka osoittavat kohdesekvenssin 10^4 kopion vahvistumisen lisääystä sekä herkkyyden ja toistettavuuden lisääystä vastaavasti. BSA:n konsentraatioita 50 $\mu\text{g/ml}$ ja 100 $\mu\text{g/ml}$ käytettiin DMSO:n loppukonsentraatiossa 15 %. Saatiin vähintään 100-kertainen vahvistuksen lisäys verrattuna reaktioväliaineeseen, jossa ei ole DMSO:ta eikä BSA:ta ja suuremmat lisäykset osoittivat 10^8 -kertaisia vahvistuksia ja tulokset osoittivat, että niinkin alhainen kunkin kohteen kopioluku kuin yksi ainoa havaittiin ja eristettiin.

Sekä RNA:n että DNA:n vahvistaminen liittyen DMSO:n että BSA:n läsnäoloon tai poissaoloon ja liittyen kohdesekvenssin kopiolukuun on esitetty kuviossa 11 kuvatussa slot-blot-autoradiogrammissa. Sekä RNA että DNA vahvistettiin lisääntyneellä herkkyydellä sekä toistettavuudella käyttämällä DMSO:ta ja BSA:ta reaktioseoksessa.

Patenttivaatimukset

1. Yksittäinen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että se käsittää seuraavat reagenssit:
 - (i) ensimmäisen oligonukleotidialukkeen,
 - 5 (ii) toisen oligonukleotidialukkeen, joka käsittää RNA-polymeraasin tunnistaman promoottorin antisense-sekvenssin,
 - (iii) DNA-suunnatun RNA-polymeraasin, joka tunnistaa mainitun promoottorin,
 - (iv) yhden tai useamman entsyymin, jo(i)lla on DNA-polymeraasiaktiivisuutta ja aktiivisuutta, joka hydrolysoi RNA-DNA-hybridin RNA:n hydrolysoimatta yksi- tai kaksijuosteista RNA:ta tai DNA:ta,
 - (v) ribonukleosidi- ja deoksiribonukleosiditrifosfaatit, ja
 - 15 (vi) alkyylisulfoksidin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että alkyylisulfoksidi on dimetyylisulfoksidi (DMSO).
20

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että dimetyylisulfoksidia on 2-15 %.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että se käsittää lisäksi kantajaproteiinin.
25

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että kantajaproteiini käsittää naudan seerumin albumiinin (BSA) konsentraatiossa 5-2500 µg/ml.
30

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että ensimmäinen oligonukleotidialuke tai toinen oligonukleotidialuke on reversiibelisti sidottu
35 immobilisoituun kantajaan.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1-6 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että RNA-polymeraasi on bakteriofagi-RNA-polymeraasi.
- 5 8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että RNA-polymeraasi on valittu bakteriofagi T7 -RNA-polymeraasista, bakteriofagi T3 -polymeraasista, bakteriofagi ϕ II -polymeraasista, *Salmonella* bakteriofagi sp6 -polymeraasista ja *Pseudomonas* bakteriofagi gh-1 -polymeraasista.
10
9. Jonkin patenttivaatimuksen 1-8 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että toinen oligonukleotidialuke lisäksi käsittää, operatiivisesti liitettynä promoottorin antisense-sekvenssiin, RNA-polymeraasin transkription aloituskohdan antisense-sekvenssin.
15
10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että RNA-polymeraasi on bakteriofagi T7 -RNA-polymeraasi, ja että antisense-sekvenssit yhdessä käsittävät nukleotidisekvenssin
20
AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAG
11. Jonkin patenttivaatimuksen 1-10 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että reagenssi (iv) käsittää *Escherichia coli* -ribonukleaasi H:n tai vasikan kateenkorvan ribonukleaasi H:n.
25
12. Jonkin patenttivaatimuksen 1-10 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että reagenssi (iv) käsittää retroviruksen käänteistranskriptaasin.
30
13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että reagenssi (iv) käsittää Moloney-hiirileukemiaviruksen polymeraasin.
35

14. Patenttivaatimuksen 11 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että reagenssi (iv) käsittää lintumyeloblastosisviruksen polymeraasin.
- 5 15. Jonkin patenttivaatimuksen 1-10 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että reagenssi (iv) käsittää DNA-polymeraasi α :n tai DNA-polymeraasi β :n.
- 10 16. Jonkin patenttivaatimuksen 1-10 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että reagenssi (iv) käsittää vasikan kateenkorvan DNA-polymeraasin.
- 15 17. Jonkin patenttivaatimuksen 1-16 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että reagenssissa (iv) ei ole eksonukleaasiaktiivisuutta.
18. Jonkin patenttivaatimuksen 1-17 mukainen reaktioväliaine, **tunnettu** siitä, että reagenssissa (iv) ei ole eksonukleaasi- eikä DNA-endonukleaasiaktiivisuutta.
- 20 19. Määrittelyvälinesarja nukleiinihapposekvenssien vahvistamiseksi, **tunnettu** siitä, että se käsittää joukon säiliöitä, jotka sisältävät jossain patenttivaatimuksessa 1-18 kuvatut reagenssit.
- 25 20. Menetelmä spesifisen nukleiinihapposekvenssin vahvistamiseksi suhteellisen vakaassa lämpötilassa, **tunnettu** siitä, että se käsittää RNA:n käsittäen RNA:n ensimmäisen templaatin, joka käsittää spesifisen nukleiinihapposekvenssin tai spesifiselle nukleiinihapposekvenssille komplementaarisen sekvenssin, pitämisen vahvistamiselle riittävässä olosuhteissa ja riittävän ajan, jonkin patenttivaatimuksen 1-18 mukaisessa reaktioväliaineessa, siten että seuraa jakso, jossa:
- 30 (i) ensimmäinen oligonukleotidialuke hybridisoituu ensimmäiseen RNA-templaattiin,
- 35 (ii) reagenssi (iv) käyttää mainittua ensimmäistä RNA-templaattia toisen DNA-templaatin syntetisoimiseen pidentä-

mällä ensimmäistä oligonukleotidialuketta, ja muodostaa siten RNA-DNA-hybridivälituotteen, ja myöskin hydrolysoi RNA:n, joka käsittää sanotun RNA-DNA-hybridivälituotteen, (iii) toinen oligonukleotidialuke hybridisoituu mainittuun
5 toiseen DNA-templaattiin,
(iv) reagenssi (iv) käyttää mainittua toista oligonukleotidialuketta templaattina mainitun RNA-polymeraasin tunnistaman promoottorin syntetisoimiseksi pidentämällä toista DNA-templaattia, ja
10 (v) mainittu RNA-polymeraasi tunnistaa mainitun promoottorin ja transkriboi mainitun toisen DNA-templaatin saaden siten aikaan ensimmäisen RNA-templaatin kopioita.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, **tunnettu**
15 siitä, että ensimmäinen RNA-templaatti käsittää mainitun spesifisen nukleiinihapposekvenssin, ja että ensimmäinen RNA-templaatti saadaan aikaan saattamalla yksijuosteinen RNA reaktioväliaineeseen siten, että:

(i) ensimmäinen oligonukleotidialuke hybridisoituu yksijuosteiseen RNA:han,
20

(ii) reagenssi (iv) käyttää mainittua yksijuosteista RNA:ta templaattina toisen DNA-templaatin syntetisoimiseen pidentämällä ensimmäistä oligonukleotidialuketta, ja muodostaa siten RNA-DNA-hybridin, ja myöskin hydrolysoi RNA:n, joka
25 käsittää mainitun RNA-DNA-hybridin,

(iii) toinen oligonukleotidialuke hybridisoituu mainittuun toiseen DNA-templaattiin,

(iv) reagenssi (iv) käyttää mainittua toista oligonukleotidialuketta templaattina mainitun promoottorin syntetisoimiseksi pidentämällä mainittua toista DNA-templaattia, ja
30

(v) mainittu RNA-polymeraasi tunnistaa mainitun promoottorin ja transkriboi mainitun toisen DNA-templaatin.

22. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, **tunnettu**
35 siitä, että ensimmäinen RNA-templaatti käsittää mainitulle spesifiselle nukleiinihapposekvenssille komplementaarisen sekvenssin, ja että ensimmäinen RNA-templaatti saadaan ai-

kaan saattamalla yksijuosteinen RNA reaktioväliaineeseen siten, että:

- (i) toinen oligonukleotidialuke hybridisoituu yksijuosteiseen RNA:han,
- 5 (ii) reagenssi (iv) käyttää mainittua RNA:ta templaattina komplementaarisen DNA:n syntetisoimiseen pidentämällä mainittua toista oligonukleotidialuketta, ja muodostaa siten RNA-DNA-hybridin, ja myöskin hydrolysoi RNA:n, joka käsittää mainitun RNA-DNA-hybridin,
- 10 (iii) ensimmäinen oligonukleotidialuke hybridisoituu mainittuun komplementaariseen DNA:han,
 - (iv) reagenssi (iv) käyttää mainittua komplementaarista DNA:ta templaattina mainitun toisen DNA-templaatin ja promoottorin syntetisoimiseksi pidentämällä mainittua ensimmäistä oligonukleotidialuketta, ja
 - 15 (v) mainittu RNA-polymeraasi tunnistaa mainitun promoottorin ja transkriboi mainitun toisen DNA-templaatin.

23. Patenttivaatimuksen 21 tai 22 mukainen menetelmä,
20 **tunnettu** siitä, että se käsittää promoottorin käsittävän DNA:n lisäämisen reaktioväliaineeseen siten, että mainittu RNA-polymeraasi transkriboi DNA:n syntetisoiden siten yksijuosteisen RNA:n.

25 24. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäinen RNA-templaatti saadaan aikaan saattamalla yksijuosteinen DNA, joka käsittää promoottorin antisense-sekvenssin, reaktioväliaineeseen siten, että:

- (i) ensimmäinen oligonukleotidialuke hybridisoituu mainittuun yksijuosteiseen DNA:han,
- 30 (ii) reagenssi (iv) käyttää mainittua yksijuosteista DNA:ta templaattina toisen DNA-templaatin ja promoottorin syntetisoimiseen pidentämällä ensimmäistä oligonukleotidialuketta, ja
- 35 (iii) mainittu RNA-polymeraasi tunnistaa mainitun promoottorin ja transkriboi mainitun toisen DNA-templaatin.

25. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäinen RNA-templaatti saadaan aikaan saatamalla yksijuosteinen DNA, joka käsittää toisen DNA-templaatin, reaktioväliaineeseen siten, että:
- 5 (i) toinen oligonukleotidialuke hybridisoituu mainittuun yksijuosteiseen DNA:han,
(ii) reagenssi (iv) käyttää mainittua toista oligonukleotidialuketta templaattina promoottorin syntetisoimiseen pidentämällä toista DNA-templaattia, ja
- 10 (iii) mainittu RNA-polymeraasi tunnistaa mainitun promoottorin ja transkriboi mainitun toisen DNA-templaatin.
26. Patenttivaatimuksen 24 tai 25 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se käsittää yksijuosteisen DNA:n käsittävän RNA-DNA-hybridin lisäämisen reaktioväliaineeseen siten, että reagenssi (iv) hydrolysoi mainitun RNA-DNA-hybridin RNA:n.
27. Jonkin patenttivaatimuksen 20-26 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se edelleen käsittää mainitun reaktioväliaineen tarkkailemisen minkä tahansa mainituista reagensseista (i), (ii) ja (v) kulutuksen osalta, tai mainitun jakson minkä tahansa tuotteen akkumuloitumisen osalta.
- 25 28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että tarkkaileminen käsittää mainitun jakson nukleiinihappotuotteen havaitsemisen.
29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että havaitsemisessa käytetään nukleiinihappokoe-tinta tai restriktioendonukleaaseja ja elektroforeettista erottamista.
30. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että tarkkaillaan jotain seuraavista:
ensimmäisen RNA-templaatin akkumuloitumista,
toisen DNA-templaatin akkumuloitumista,
promoottorin sisältävää DNA:ta, tai

RNA-DNA-hybridivälituotteen akkumuloitumista.

31. Jonkin patenttivaatimuksen 27-30 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se edelleen käsittää kulutuksen tai akkumuloitumisen vertaamisen arvoon, joka edustaa kulutusta tai akkumulaatiota spesifisen nukleinihapposekvenssin ja sen kanssa komplementaarisen sekvenssin puuttuessa.

32. Jonkin patenttivaatimuksen 20-31 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että riittävä aika on välillä 30 minuuttia ja 4 tuntia.

33. Jonkin patenttivaatimuksen 20-32 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se käsittää lisäksi jakson mainitun DNA-tuotteen ligatoimisen kloonausvektoriin ja sen jälkeen DNA-tuotteen kloonamisen.

34. Patenttivaatimuksen 33 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se edelleen käsittää DNA-tuotteen koodaaman tuotteen ilmentämisen ilmentämisseemissä.

Patentkrav

1. Enskilt reaktionsmedium, **kännetecknat** av att det innehåller följande reagenser:

- 25 (i) en första oligonukleotidprimer,
- (ii) en andra oligonukleotidprimer innehållande en anti-sense-sekvens av en promotor identifierad av en RNA-polymeras,
- (iii) en DNA-riktad RNA-polymeras som identifierar nämnda
30 promotor,
- (iv) ett eller flera enzymer med DNA-polymerasaktivitet och aktivitet som hydrolyserar RNA i en RNA-DNA-hybrid utan att hydrolysera enkel- eller dubbelsträngad RNA eller DNA,
- (v) ribonukleosid och deoxyribonukleosidtrifosfater och
35 (vi) en alkylsulfoxid.

2. Reaktionsmedium enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att alkylsulfoxiden är dimetylsulfoxid (DMSO).

3. Reaktionsmedium enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att det innehåller 2-15 % dimetylsulfoxid.
4. Reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-3, **kännetecknat** av att det vidare innehåller ett bärarprotein.
5. Reaktionsmedium enligt patentkrav 4, **kännetecknat** av att bärarproteinet är serumalbumin av nöt (BSA) i en koncentration på 5-2500 $\mu\text{g/ml}$.
6. Reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-5, **kännetecknat** av att den första oligonukleotidprimern eller den andra oligonukleotidprimern är reversibelt bunden till en immobiliserad bärare.
7. Reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-6, **kännetecknat** av att RNA-polymerasen är en bakteriofag-RNA-polymeras.
8. Reaktionsmedium enligt patentkrav 7, **kännetecknat** av att RNA-polymerasen valts bland bakteriofag T7-RNA -polymeras, bakteriofag T3 -polymeras, bakteriofag ϕII -polymeras, *Salmonella* bakteriofag sp6 -polymeras och *Pseudomonas* bakteriofag gh-1 -polymeras.
9. Reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-8, **kännetecknat** av att den andra oligonukleotidprimern vidare innehåller, operativt bunden till promotorns antisense-sekvens, en antisense-sekvens för RNA-polymerasens transkriptionsbegränsningsställe.
10. Reaktionsmedium enligt patentkrav 9, **kännetecknat** av att RNA-polymerasen är en bakteriofag T7-RNA-polymeras, och att antisense-sekvenserna tillsammans innefattar nukleotidsekvensen

AATCTAATACGACTCACTATAGGGAG

11. Reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-10, **kännetecknat** av att reagensen (iv) innefattar *Escherichia coli* -ribonukleas H eller ribonukleas H av kalvtymuskörtel.
- 5 12. Reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-10, **kännetecknat** av att reagens (iv) innefattar en omvänd transkriptas av retrovirus.
13. Reaktionsmedium enligt patentkrav 11, **kännetecknat** av
10 att reagens (iv) innefattar Moloney-musleukemiviruspolymeras.
14. Reaktionsmedium enligt patentkrav 11, **kännetecknat** av
15 att reagens (iv) innefattar fågelmyeloblastosisviruspolymeras.
15. Reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-10, **kännetecknat** av att reagens (iv) innefattar DNA-polymeras α eller DNA-polymeras β .
- 20 16. Reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-10, **kännetecknat** av att reagens (iv) innehåller kalvtymuskörtel-DNA-polymeras.
- 25 17. Reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-16, **kännetecknat** av att reagens (iv) inte har exonukleasaktivitet.
- 30 18. Reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-17, **kännetecknat** av att reagens (iv) inte har exonukleas- och DNA-endonukleasaktivitet.
- 35 19. Uppsättning för att förstärka nukleinsyrasekvenserna, **kännetecknad** av att den innehåller en rad behållare innehållande reagenserna som definieras i något av patentkraven 1-18.

20. Förfarande för att förstärka en specifik nukleinsyra-sekvens vid relativt konstant temperatur, **kännetecknat** av att det omfattar upprätthållande, under tillräckliga förhållanden och tid för förstärkning, i ett reaktionsmedium enligt något av patentkraven 1-18, av ett RNA innehållande ett första RNA-templat som omfattar den specifika nukleinsyra-sekvensen eller en sekvens som kompletterar den specifika nukleinsyrasekvensen, så att det uppstår en cykel i vilken:

- (i) den första oligonukleotidprimern hybridiseras till
10 dett första RNA-templatet,
- (ii) reagens (iv) använder det första RNA-templatet för att syntetisera ett andra DNA-templat genom utvidgning av den första oligonukleotidprimern, varvid bildas en RNA-DNA-hybridmellanprodukt, och även hydrolyserar RNA som omfattar
15 nämnda RNA-DNA-hybridmellanprodukt,
- (iii) den andra oligonukleotidprimern hybridiseras till det andra DNA-templatet,
- (iv) reagens (iv) använder den andra oligonukleotidprimern som templat för att syntetisera promotorn som identifierats
20 av RNA-polymerasen genom utvidgning av det andra DNA-templatet och
- (v) RNA-polymerasen identifierar promotorn och transkriberar det andra DNA-templatet, varvid alstras kopior av det första RNA-templatet.

25

21. Förfarande enligt patentkrav 20, **kännetecknat** av att det första RNA-templatet innehåller den specifika nukleinsyrasekvensen, och att det första RNA-templatet alstras genom att åstadkomma enkelsträngad RNA i reaktionsmediet så
30 att:

- (i) den första oligonukleotidprimern hybridiseras till enkelsträngad RNA,
- (ii) reagens (iv) använder den enkelsträngade RNA som templat för att syntetisera ett andra DNA-templat genom ut-
35 vidgning av den första oligonukleotidprimern, varvid bildas en RNA-DNA-hybrid, och även hydrolyserar RNA innehållande nämnda RNA-DNA-hybrid,

(iii) den andra oligonukleotidprimern hybridiseras till nämnda andra DNA-templat,

(iv) reagens (iv) använder nämnda andra oligonukleotidprimer som templat för att syntetisera nämnda promotor genom utvidgning av nämnda andra DNA-templat; och

(v) nämnda RNA-polymeras identifierar nämnda promotor och transkriberar nämnda andra DNA-templat.

22. Förfarande enligt patentkrav 20, **kännetecknat** av att det första RNA-templatet innehåller en sekvens som kompletterar nämnda specifika nukleinsyrasekvens och det första RNA-templatet alstras genom att åstadkomma enkelsträngad RNA så att

(i) den andra oligonukleotidprimern hybridiseras till enkelsträngad RNA,

(ii) reagens (iv) använder nämnda RNA som templat för att syntetisera en komplementär DNA genom utvidgning av nämnda andra oligonukleotidprimer, varvid bildas en RNA-DNA-hybrid, och hydrolyserar även RNA omfattande nämnda RNA-DNA-hybrid,

(iii) den första oligonukleotidprimern hybridiseras till nämnda komplementära DNA,

(iv) reagens (iv) använder nämnda kompletterande DNA som templat för att syntetisera det andra DNA-templatet och promotorn genom utvidgning av nämnda första oligonukleotidprimer och

(v) nämnda RNA-polymeras identifierar nämnda promotor och transkriberar nämnda andra DNA-templat.

23. Förfarande enligt patentkrav 21 eller 22, **kännetecknat** av att det omfattar tillsats till reaktionsmediet av DNA innehållande promotorn så att RNA-polymerasen transkriberar DNA, varvid enkelsträngad RNA syntetiseras.

24. Förfarande enligt patentkrav 20, **kännetecknat** av att det första RNA-templat produceras genom att till reaktionsmediet tillsätta enkelsträngad DNA innehållande en antisense-sekvens av promotorn så att

- (i) den första oligonukleotidprimern hybridiseras till nämnda enkelsträngade DNA,
- (ii) reagens (iv) använder nämnda enkelsträngade DNA som templat för att syntetisera det andra DNA-templatet och pro-
5 motorn genom utvidgning av den första oligonukleotidprimern och
- (iii) nämnda RNA-polymeras identifierar nämnda promotor och transkriberar nämnda andra DNA-templat.
- 10 25. Förfarande enligt patentkrav 20, **kännetecknat** av att det första RNA-templatet produceras genom att i det första reaktionsmediet tillsätta enkelsträngad DNA innehållande det andra DNA-templatet så att
- (i) den andra oligonukleotidprimern hybridiseras till
15 nämnda enkelsträngade DNA,
- (ii) reagens (iv) använder nämnda andra oligonukleotidprimer som templat för att syntetisera promotorn genom utvidgning av det andra DNA-templatet och
- (iii) nämnda RNA-polymeras identifierar nämnda promotor och
20 transkriberar nämnda andra DNA-templat.
26. Förfarande enligt patentkrav 24 eller 25, **kännetecknat** av att det omfattar tillsats i reaktionsmediet av en RNA-DNA-hybrid omfattande enkelsträngad DNA så att reagens
25 (iv) hydrolyserar RNA av nämnda RNA-DNA-hybrid.
27. Förfarande enligt något av föregående patentkrav 20-26, **kännetecknat** av att det vidare omfattar övervakning av reaktionsmediet beträffande förbrukning av någon av de nämnda reagenserna (i), (ii) och (v) eller beträffande ackumulation av någon produkt i nämnda cykel.
30
28. Förfarande enligt patentkrav 27, **kännetecknat** av att övervakningen omfattar detektering av en nukleinsyraprodukt
35 i nämnda cykel.

29. Förfarande enligt patentkrav 28, **kännetecknat** av att vid detektering används en nukleinsyrasond eller restriktionsendonukleaser och elektroforesseparering.

5 30. Förfarande enligt patentkrav 27, **kännetecknat** av att övervakningen gäller något av följande:
ackumulation av det första RNA-templatet;
ackumulation av det andra DNA-templatet;
DNA innehållande promotorn; och
10 ackumulation av RNA-DNA-hybridmellanprodukten.

31. Förfarande enligt något av patentkraven 27-30, **kännetecknat** av att det vidare omfattar jämförelse av förbrukningen eller ackumulationen med ett värde som representerar
15 motsvarande förbrukning eller ackumulation i frånvaro av den specifika nukleinsyrasekvensen och dess komplementär sekvens.

32. Förfarande enligt något av föregående patentkrav 20-
20 31, **kännetecknat** av att den tillräckliga tiden är mellan 30 minuter och 4 timmar.

33. Förfarande enligt något av föregående patentkrav 20-
32, **kännetecknat** av att det vidare omfattar ligering av
25 nämnda DNA-produkt i cykeln till en klonande vektor och sedan kloning av DNA-produkten.

34. Förfarande enligt patentkrav 33, **kännetecknat** av att det vidare omfattar expression av en produkt kodad av DNA-
30 produkten i ett expressionssystem.

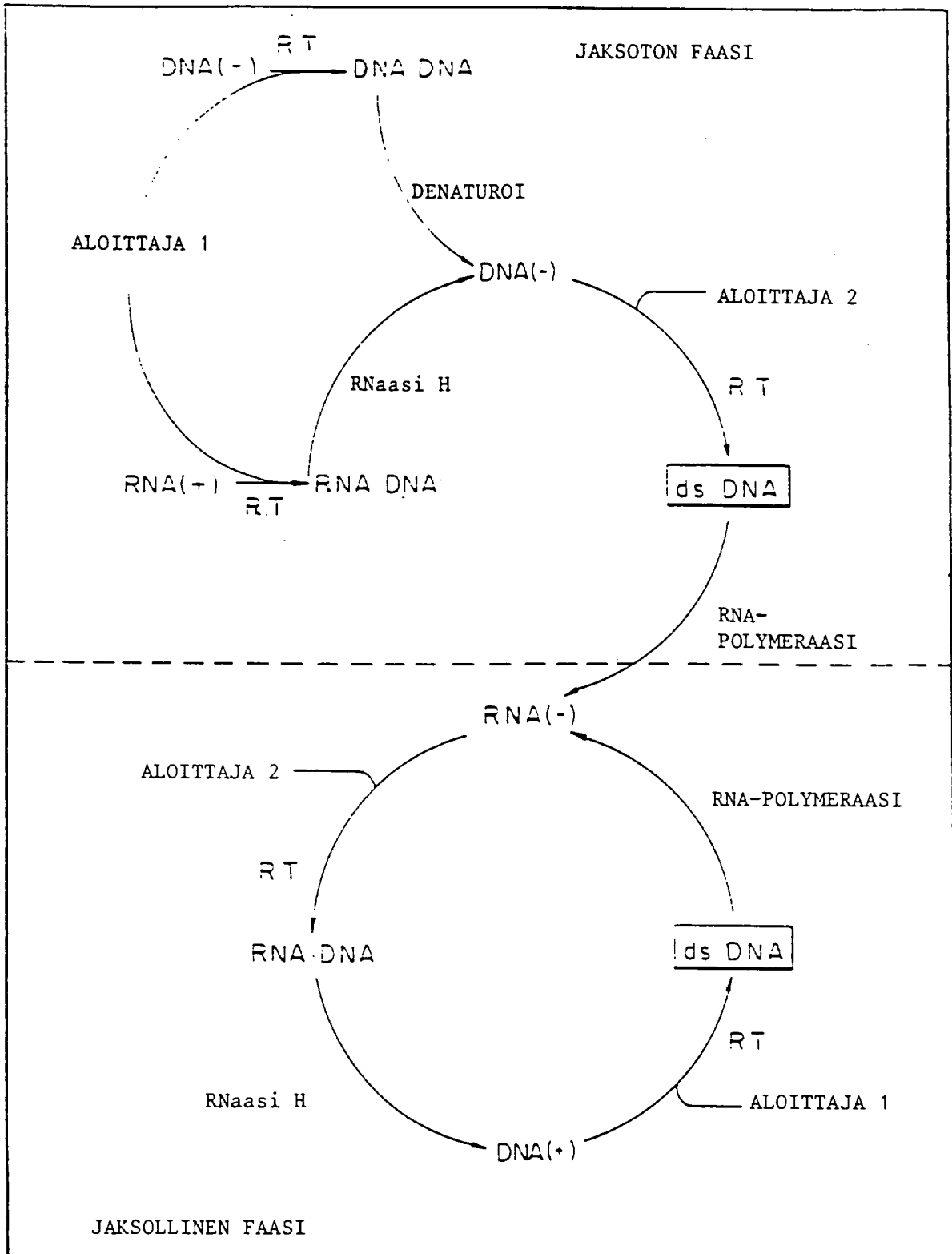
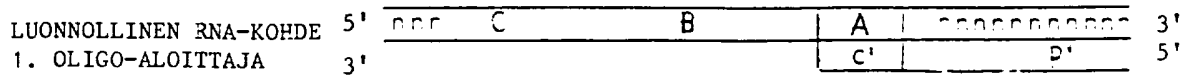
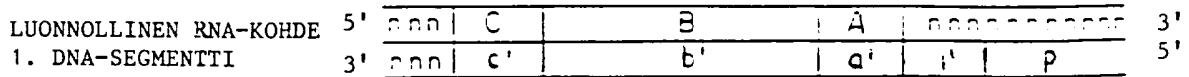


FIG. 1A

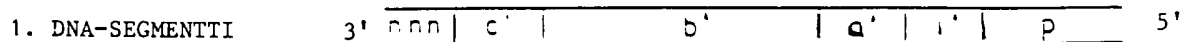
FIG. 1B



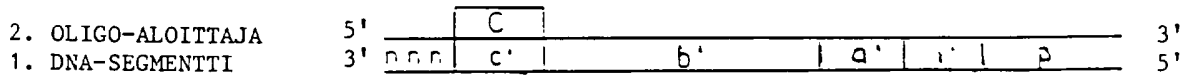
1. KÄÄNTEISTRANSKRIPTAASI + dNTP't



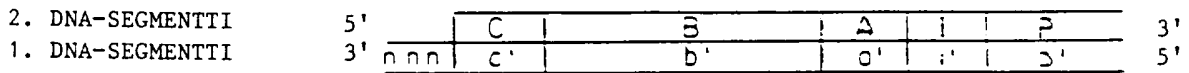
2. RIBONUKLEAASI H



3. ALOITUS



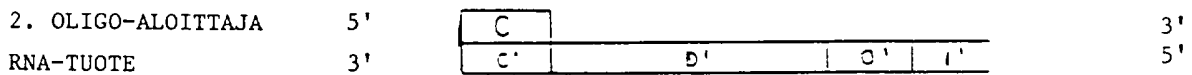
4. KÄÄNTEISTRANSKRIPTAASI + dNTP't



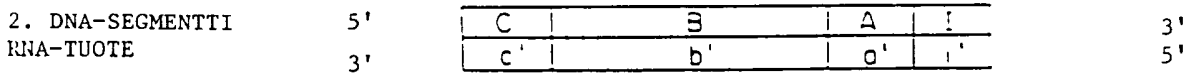
5. T 7 RNA-POLYMERAASI + NTP't



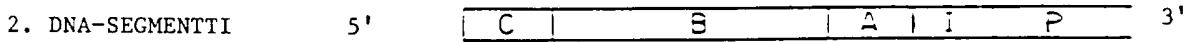
6. ALOITUS



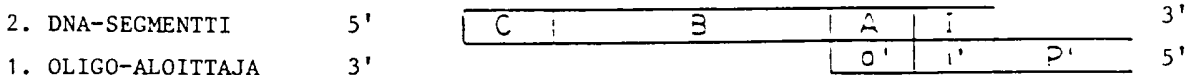
7. KÄÄNTEISTRANSKRIPTAASI + cNTP't



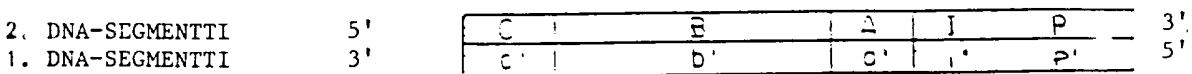
8. RIBONUKLEAASI H



9. ALOITUS



10. KÄÄNTEISTRANSKRIPTAASI + dNTP't



11. T 7 RNA-POLYMERAASI + NTP't

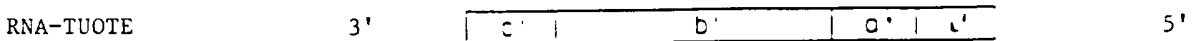
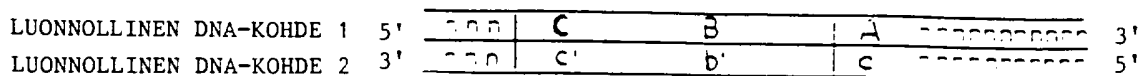
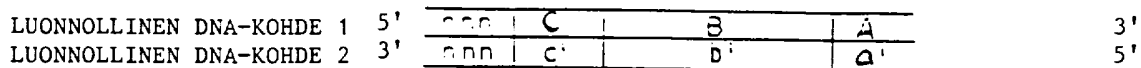


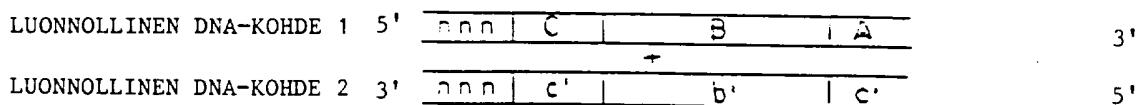
FIG. 1C



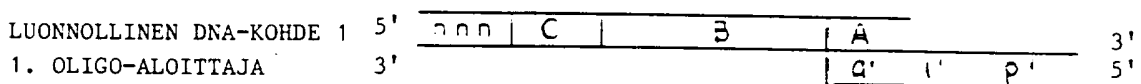
1. RESTRIKTIOENTSYMI



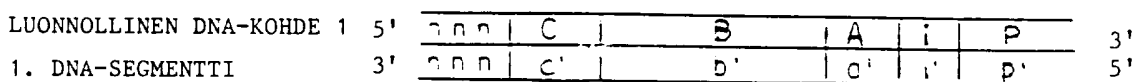
2. DENATUROI



3. ALOITUS



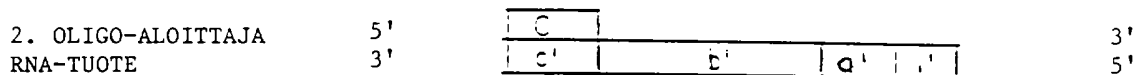
4. KÄÄNTEISTRANSKRIPTAASI + dNTP't



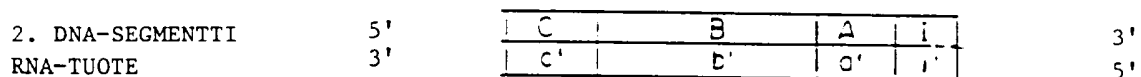
5. T 7 RNA-POLYMERAASI + NTP't



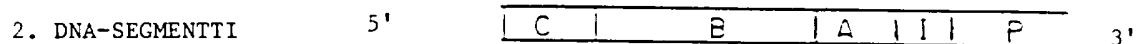
6. ALOITUS



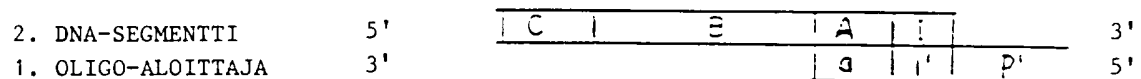
7. KÄÄNTEISTRANSKRIPTAASI + dNTP't



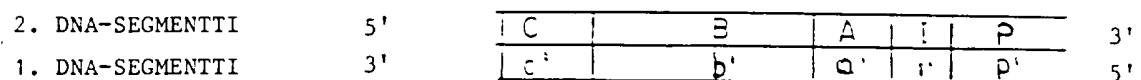
8. RIBONUKLEAASI H



9. ALOITUS



10. KÄÄNTEISTRANSKRIPTAASI + NTP't



11. T 7 RNA-POLYMERAARI + NTP't

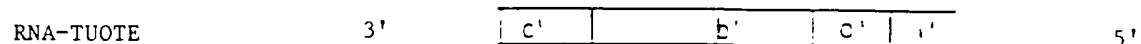


FIG. 1 D

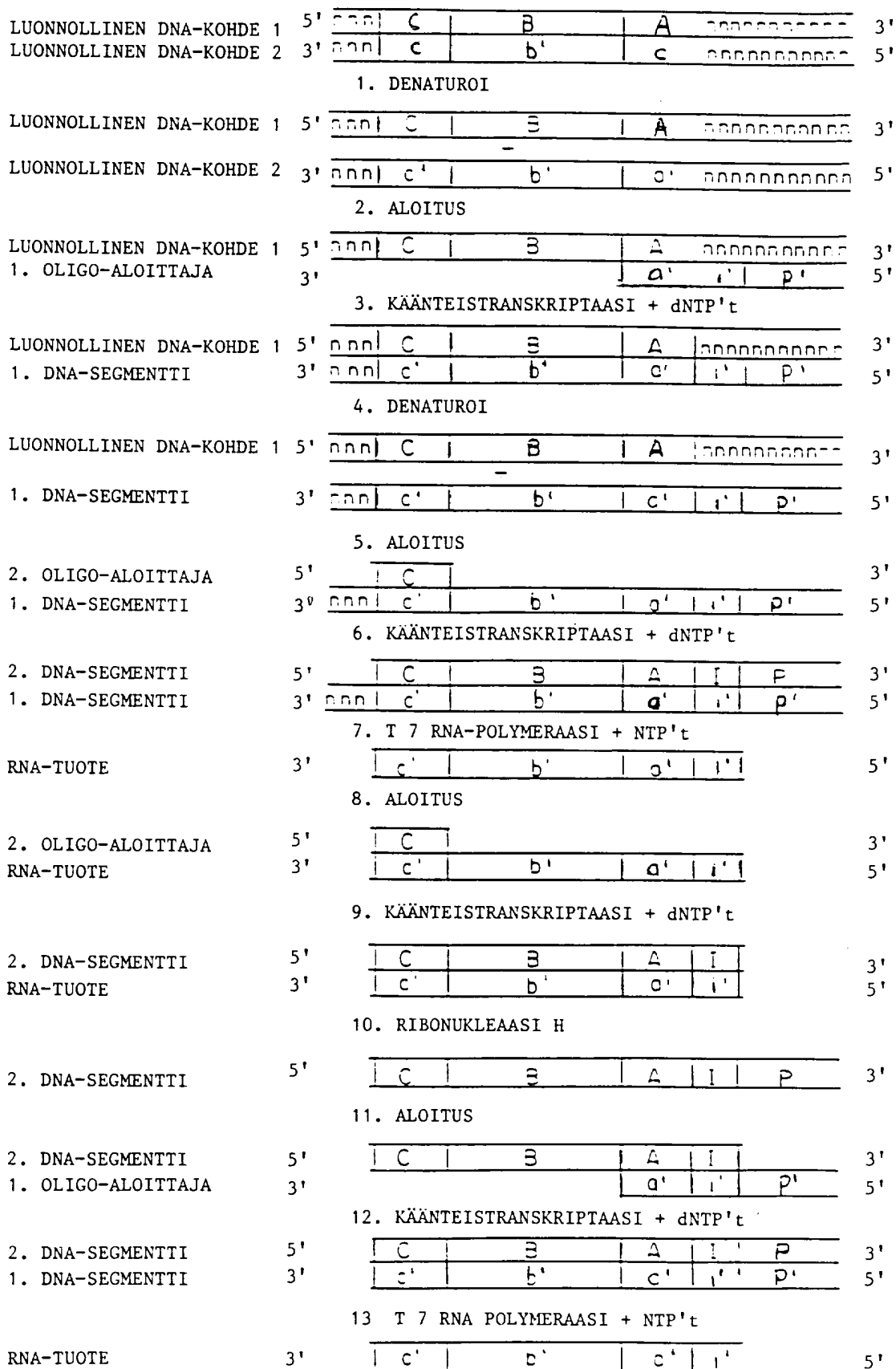


FIG. 2A

T7H1.GAG
 AATTCTAATACGACTCACATATAGGGAGACAAIAGGCCCTGCATGCACIIGGATGTACTCTATCCCAI

 GATTATGCTGAGTGAIAI¹CCICIGT IATCCGGGACGTACGI GACC IACAI GAGATAGGGTA
 T74.PRO

N1.GAG
 TCIGCAGCTTCCTCATTTGATGGICICTITTAACAATTGCCATGGCIGCIIIGATGT

 AGACGTC GAAGGAGTAACTAC CAGAGAAAAT TG IAAACG IACC GACGAAC TACAGAIC
 N2.GAG
 (H2.GAG)¹²⁴

FIG. 2B

H1.GAG
 GGGAGACAAIAGGCCCTGCATGCACIIGGATGTACTCTATCCCAI

 CCCCTCIGT IATCCGGGACGTACGT GACC TACATGAGATAGGGTA

N1.GAG
 TCIGCAGCTTCCTCATTTGATGGICICTITTAACAATTGCCAIGGCCIGCITIGATGT

 AGACGTC GAAGGAGTAACTAC CAGAGAAAAT TG IAAACG IACC GACGAAC TACAGAIC
 N2.GAG
 (H2.GAG)¹²⁴

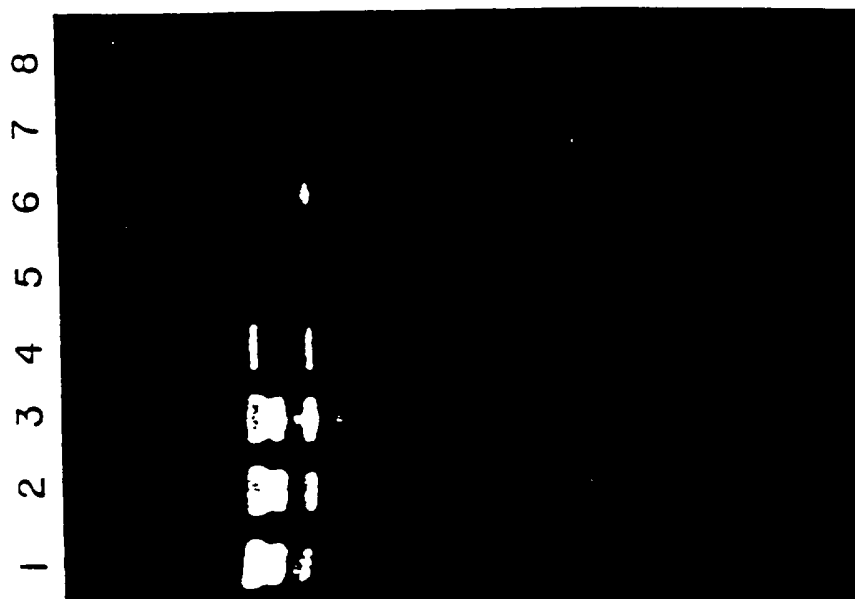


FIG. 4

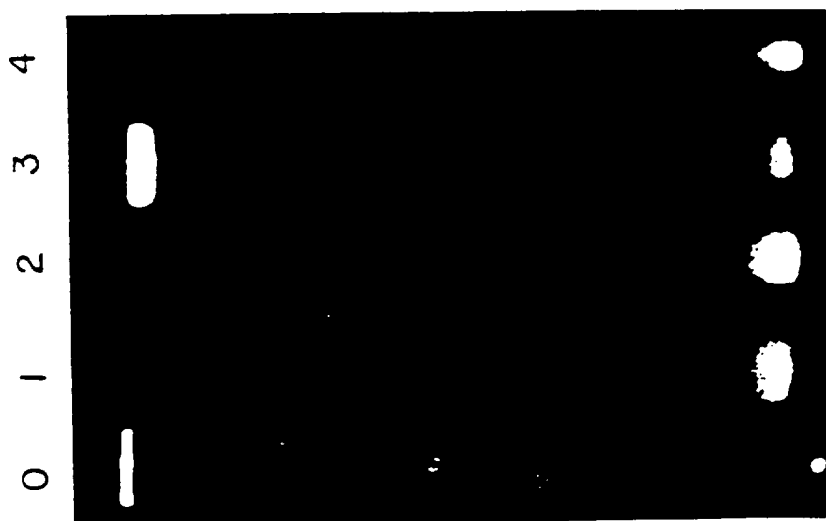


FIG. 3

FIG. 5

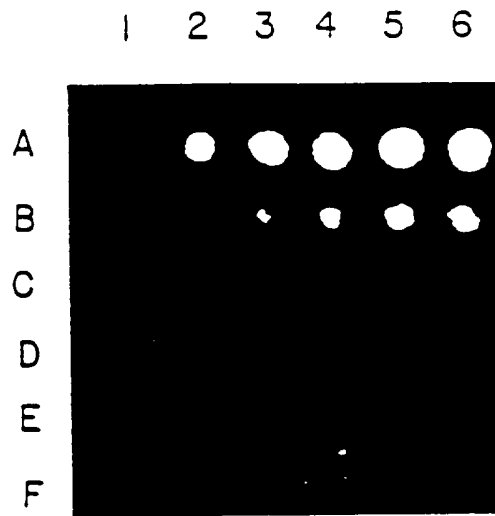
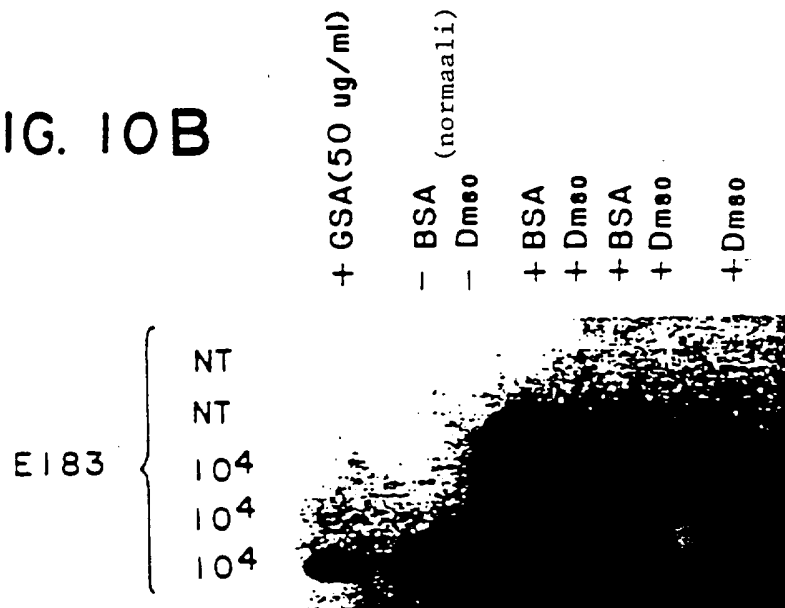


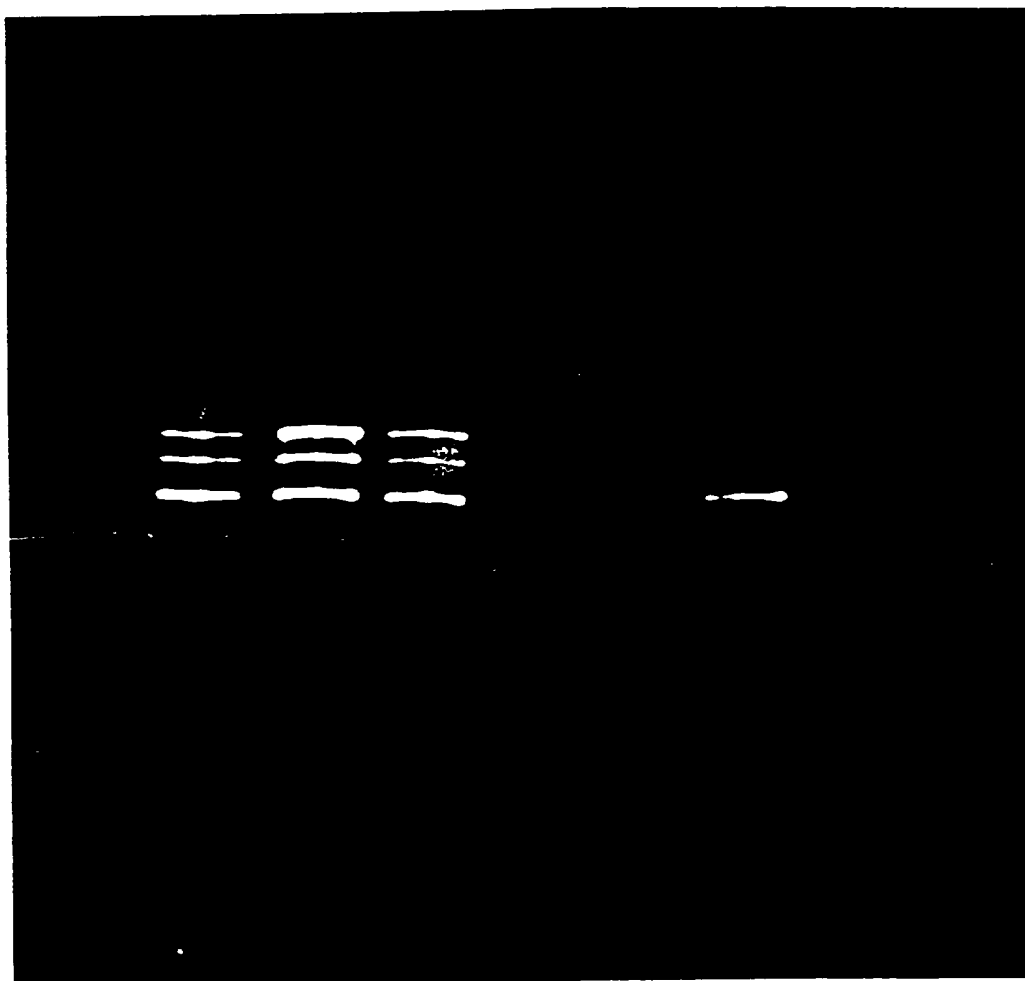
FIG. 10B



1	6	11	16	21
2	7	12	17	22
3	8	13	18	23
4	9	14	19	24
5	10	15	20	25

FIG. 6

0 1 2 3 4 5 6 11 12



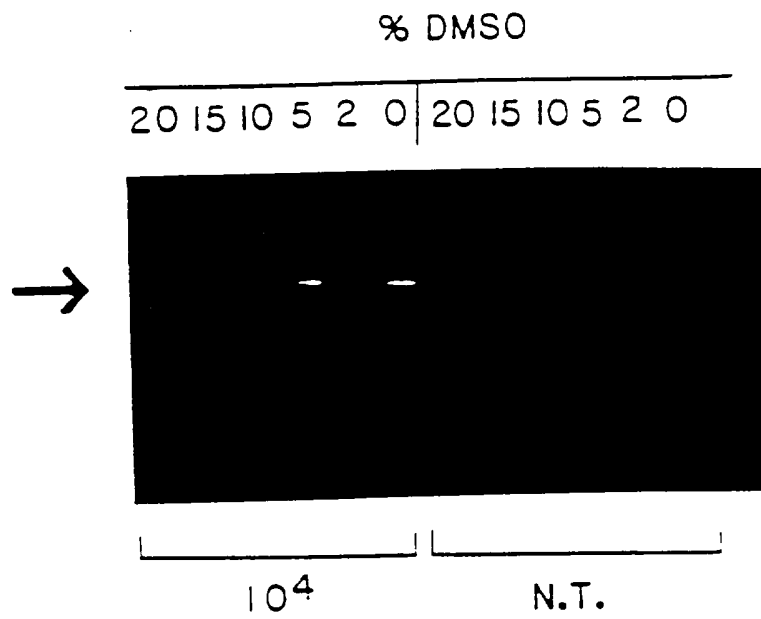


FIG. 7

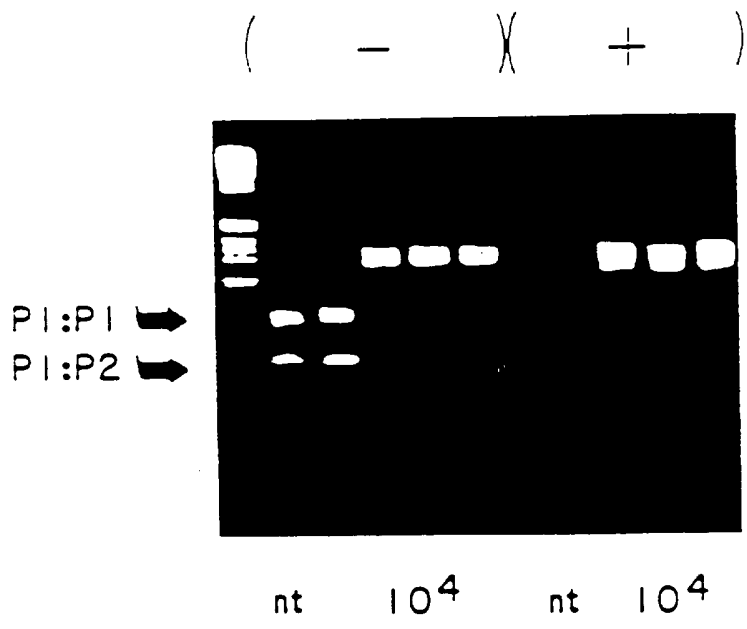


FIG. 8

FIG. 9

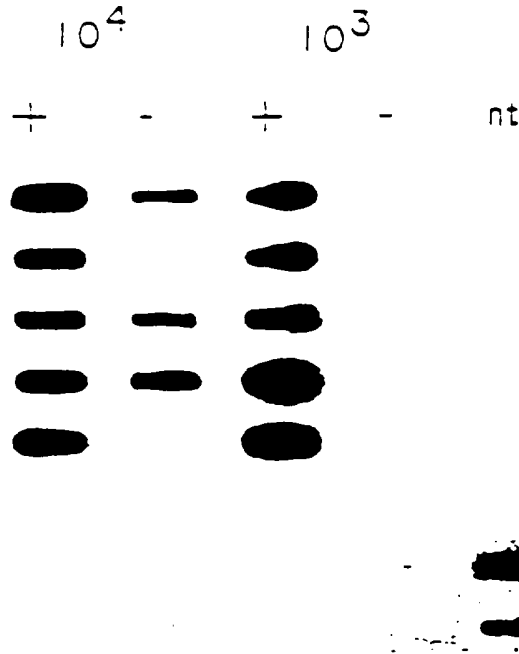


FIG. II

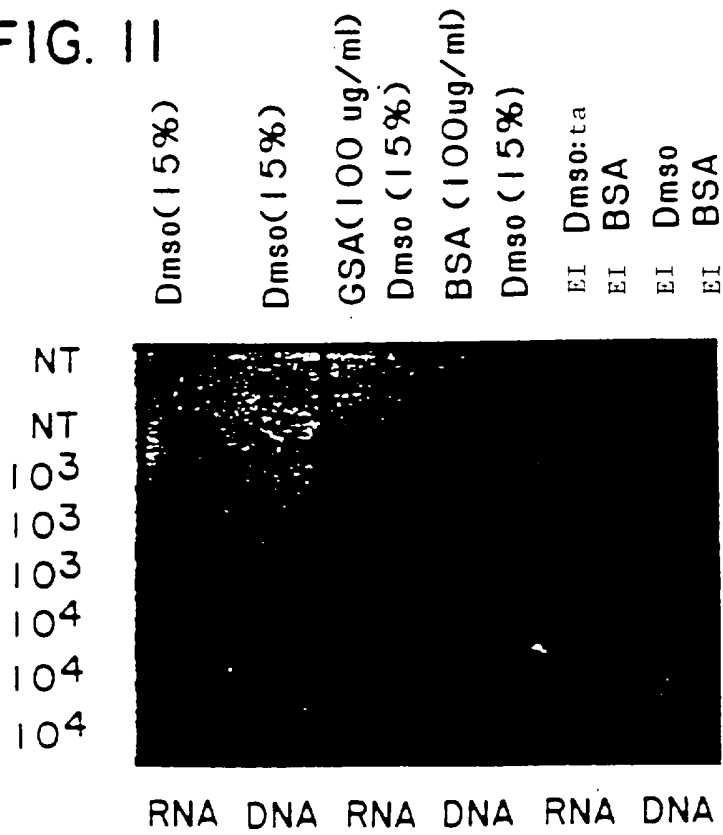


FIG. 10A

