NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **304655** (13) B1

(51) Int Cl[6] C 12 Q 1/68

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19923544	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	12.02.1991, PCT/US91/00841
(22) Inng. dag	11.09.1992	(85) Videreføringsdag	11.09.1992
(24) Løpedag	12.02.1991	(30) Prioritet	14.03.1990, US, 494258
(41) Alm. tilgj.	11.09.1992		
(45) Meddelt dato	25.01.1999		

(73) Patenthaver E.I. Du Pont de Nemours and Co, 1007 Market Street, Wilmington, DE 19898, US
(72) Oppfinner Kenneth James Livak, Wilmington, DE, US
Jan Antoni Rafalski, Wilmington, DE, US
Scott Valray Tingey, Elkton, MD, US
John Gregory Kelly Williams, Landenberg, PA, US
(74) Fullmektig Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for påvisning av polymorfisme på basis av nukleotidforskjeller**

(56) Anførte publikasjoner US 4879214
P.H. Dear et al, Nucleic Acids Research, 1989, Vol 17, no 17 side 6795-6807
C.S.Wesley et al, Nucleic Acids Research, 1990, Vol 18 No. 3, side 599-603
K.E. Noonan et al, Nucleic Acids Research, 1988, Vol 16, No 21, side 10336

(57) Sammendrag

En fremgangsmåte er tilveiebrakt for å skille mellom nukleinsyrer på basis av nukleotidforskjeller i vilkårlige segmenter av nukleinsyren ved å utføre en primerforlengelsesreaksjon på nukleinsyrene og sammenligne forlengelsesreaksjonsproduktene. Det vilkårlige nukleinsyresegment kan forsterkes ved først å dissosiere forlengelsesproduktet fra templatet og å bringe det dissosierte forlengelsesprodukt i kontakt med en primer under betingelser slik at et forsterkningsforlengelsesprodukt syntetiseres under anvendelse av det dissosierte forlengelsesprodukt som et templat. Forskjeller i forlengelsesproduktet er anvendbare som markører ved konstruksjon av genetiske kart og som markører for å skille mellom eller identifisere individer.

Oppfinnelsens område

Denne oppfinnelse angår en fremgangsmåte for påvisning av polymorfisme. Nærmere bestemt skilles det mellom vilkårlige nukleinsyresegmenter ved sammenligning av nukleotidforskjeller i forlengelsesreaksjonsprodukter.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Genetikkvitenskapen er basert på identifisering og karakterisering av mutasjoner som er forandringer i DNA (DNA-polymorfismer) på grunn av nukleotidsubstitusjon, innskudd eller delesjon. Mange teknikker er blitt utviklet for å sammenligne homologe segmenter av DNA for å bestemme om segmentene er identiske eller om de avviker med ett eller flere nukleotider. Praktiske anvendelser av disse teknikker innbefatter genetiske sykdomsdiagnoser, rettsvitenskapelige teknikker, human genomkartlegging og landbruksanvendelser.

Den mest bestemte metode for sammenligning av DNA-segmenter er å sammenligne den fullstendige nukleotidsekvens av hvert segment. Eksempler på hvordan sekvensering er blitt anvendt for å studere mutasjoner i humane gener, er innbefattet i publikasjonene av Engelke et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:544-548 (1988) og Wong et al., Nature 330:384-386 (1987). Hittil har det ikke vært praktisk å anvende utstrakt sekvensering for å sammenligne mer enn bare noen få DNA-segmenter fordi anstrengelsene som er nødvendige for å bestemme, fortolke og sammenligne sekvensinformasjon, er store.

For genetiske kartleggingsformål består den mest vanlig anvendte sortering med hensyn på DNA-polymorfismer som oppstår fra mutasjon, i kløyving av DNA med restriksjonsendonukleaser og analysering av de resulterende fragmenter, som beskrevet av Botstein et al., Am. J. Hum. Genet., 32:314-331 (1980); White et al., Sci. Am., 258:40-48 (1988). Mutasjoner som påvirker gjenkjennelsessekvensen av endonukleasen, vil utelukke enzymatisk spaltning ved dette sete og derved forandre spaltningsmønsteret av DNA. DNA sammenlignes ved å se på forskjeller i restriksjonsfragmentlengder. En hovedulempe ved denne metode (kjent som restriksjonsfragmentlengdepolymor-

fismekartlegging eller RFLP-kartlegging) er dens manglende evne til å påvise mutasjoner som ikke påvirker spaltning med en restriksjonsendonuklease. Således mistes mange mutasjoner med denne metode. Én studie av Jeffreys, Cell, 18:1-18 (1979), var bare i stand til å påvise 0,7% av de mutasjonsmessige varianter som ble antatt å være til stede i en 40.000 basepar region av humant DNA. En annen vanskelighet er at metodene anvendt for å påvise restriksjonsfragmentlengdepolymorfisme, er meget arbeidskrevende, i særdeleshet teknikken forbundet med Southern blot-analyse.

Primerforlengelsesprosessen beskrevet i Proudfoot et al., Science 209:1329-1336 (1980), er blitt vidt anvendt for å studere strukturen av RNA og er også blitt anvendt for å karakterisere DNA, se f.eks. Engelke et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:544-548 (1988). Denne fremgangsmåte består i hybridisering av en merket oligonukleotidprimer til et templat-RNA eller -DNA og deretter anvendelse av en DNA-polymerase og deoxynukleosidtrifosfater for å forlenge primeren til 5'-enden av templatet. Det merkede primerforlengelsesprodukt fraksjoneres deretter på basis av størrelsen, vanligvis ved elektroforese gjennom en denaturerende polyacrylamidgel. Anvendt for å sammenligne homologe DNA-segmenter, kan denne fremgangsmåte påvise forskjeller på grunn av nukleotidinnskudd eller delesjon. På grunn av at størrelsen er det eneste kriterium som anvendes for å karakterisere primerforlengelsesproduktet, kan denne metode ikke påvise forskjeller på grunn av nukleotidsubstitusjon.

Mullis et al., US patentskrift 4 683 195, og Mullis, US patentskrift nr. 4 683 202 beskriver polymerasekjedereaksjoner som kan anvendes for å forsterke ethvert spesifikt segment av en nukleinsyre. Disse analytiske metoder er blitt anvendt for å påvise polymorfisme gjennom amplifisering av valgte mål-DNA-segmenter fra testgenomer. En ulempe ved slike metoder er det krav at et tilstrekkelig antall baser ved begge ender av det spesifikke segment må være kjent i tilstrekkelig detalj slik at to oligonukleotidprimere kan utformes som vil hybridisere til forskjellige strenger av målsegmentet. Det er arbeidskrevende å oppnå den nødvendige sekvensinformasjon fra målgenomer for å utforme de nødvendige primere. M. H. Skolnic

og R. B. Wallace, Simultaneous Analysis of Multiple Polymorphic Loci Using Amplified Sequence Polymorphisms (ASPs), Genomics 2:273-278.

Amplifisering under anvendelse av oligonukleotider av vilkårlig sekvens er beskrevet i en teoretisk problemstilling for kartlegging av et genom av en høyere eukaryot i "Happy Mapping: a Proposal for Linkage Mapping the Human Genome", P. H. Dear og P. R. Cook, Nucleic Acids Research, vol. 17, nr. 17, 6795-6807 (1989). Forfatterne foreslår å identifisere forholdet mellom 5.000 forskjellige DNA-segmenter amplifisert fra humant, genomisk DNA ved utførelse av en polymerasekjedereaksjon (PCR) med forskjellige parvise kombinasjoner av arbitrærsekvensprimere. Templatet-DNA-et isoleres separat fra enkle haploidceller av en individuell organisme. Deres metode foreslår utvikling av et kart som beskriver den fysiske lokalisering av DNA-regioner som gir opphav til de amplifiserte produkter i en individuell organisme. Dette vil bli oppnådd ved identifisering av PCR-produkter som koforsterker fra den samme bit av DNA som således fastslår deres fysiske nærhet. I Dear og Cook-metoden vil polymorfismer ikke bli utelukket fra analysen. Deres idé krever identifisering av det samme DNA-segment i mange forskjellige haploidceller, og polymorfismene overvinner dette krav. Selv om den er effektiv til å beskrive det fysiske forhold mellom hvilke som helst av to PCR-produkter, kan "happy mapping" ikke beskrive lokaliseringen av ethvert genetisk trekk av interesse. Dette kan bare oppnås ved korrelering av segregasjonen av et genetisk trekk med mange forskjellige polymorfismer gjennom en seksuell krysning mellom to individer. Forfatterne angir at primerpar lengre enn 9-10 nukleotider, er nødvendig da primerpar på 9-10 nukleotider vil prime ineffektivt.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for påvisning av genetiske polymorfismer i vilkårlige, ikke-spesifikke nukleinsyresegmenter. Fremgangsmåten anvender en reaksjon primet av et oligonukleotid hensiktsmessig fremstilt uten noen kjennskap til basesekvensen av amplifiserte segmenter.

Sammendrag av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for påvisning av polymorfisme på basis av nukleotidforskjeller i vilkårlige segmenter av nukleinsyrer kjennetegnet ved at den omfatter:

(a) separat utførelse av en forlengelsesreaksjon på et vilkårlig segment av hver av minst to nukleinsyrer fra forskjellige kilder, hvilken reaksjon omfatter:

(i) å bringe hver av nukleinsyrene i kontakt med minst én ikke-spesifikk, målrettet, vilkårlig oligonukleotidprimer på mer enn 7 nukleotider og forlengelse av primeren i en forlengelsesreaksjon hvorved det for minst én nukleinsyre syntetiseres et vilkårlig forlengelsesprodukt av minst én primer; og

(b) resultatene av de separat utførte, vilkårlige forlengelsesreaksjoner sammenlignes med hensyn til forskjeller.

Etter trinn (i) og før trinn (b), er det tilveiebrakt ytterligere trinn for (ii) dissosiering av forlengelsesproduktet fra dets komplement; og (iii) amplifisering av det vilkårlige nukleinsyresegment ved å kontakte det dissosierte forlengelsesprodukt med en primer fra trinn (i) under betingelser slik at et amplifiseringsforlengelsesprodukt syntetiseres under anvendelse av det dissosierte forlengelsesprodukt som et templat.

Det anvendes enn videre en forskjell i forlengelsesproduktet som en markør for å konstruere et genetisk kart, og for å skille mellom eller identifisere individer.

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 illustrerer et fotografi av en gel som sammenligner amplifiseringsprodukter fra DNA isolert fra soyabønnene Glycine max (Bonus) (spor angitt med oddetall) og Glycine soja (PI 81762) (spor angitt med partall) hvor oligonukleotidprimere av et utall sekvenser ble anvendt.

Figur 2 illustrerer et fotografi av en gel som sammenligner amplifiseringsprodukter under anvendelse av primer 10b av 19 F2-avkom av en krysning mellom Bonus og PI 81762.

Figur 3 illustrerer et fotografi av en gel som sammenligner amplifiseringsprodukter fra Bonus (spor angitt med oddetall) og PI 81762 (spor angitt med partall). Primer AP8 og 10 andre primere som avviker i et enkelt nukleotid fra AP8, ble anvendt.

Figur 4 illustrerer et fotografi av en gel som sammenligner amplifiseringsprodukter under anvendelse av et utall primere på Zea mays (mais), Gossypium hirsutum (bomull), Saccharomyces cerevisiae (gjær) og Arabidopsis thaliana DNA.

Figur 5 illustrerer et fotografi av en gel som utviser amplifisering ved priming med primere med en lengde på 6 til 10 nukleotider.

Figur 6 illustrerer et fotografi av en gel som sammenligner amplifiseringsprodukter fra seks transformerte Homo sapiens (humane) lymfoblaster.

Figur 7 illustrerer densitometriske avsøkninger som viser F2-individer av en krysning mellom Bonus og PI 81762 homozygot (2 kopier) for en polymorfisme (felt A), heterozygot for en polymorfisme (felt B) og homozygot (0 kopier) for en polymorfisme (felt C).

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Uttrykket "oligonukleotid" som anvendt her, angir et molekyl omfattet av to eller flere deoxyribonukleotider eller ribonukleotider.

Uttrykket "primer" som anvendt her, angir et oligonukleotid av enhver arbitrær sekvens som enten forekommer naturlig som i en renset restriksjonskløyving, eller fremstilt syntetisk, som er i stand til å virke som et initieringspunkt av syntese når det anbringes under betingelser hvori syntese av et primerforlengelsesprodukt som er komplementært til en nukleinsyrestreng, fremkalles, dvs. i nærvær av nukleotider og et middel for polymerisering slik som DNA-polymerase og ved en egnet temperatur og pH. Det foretrekkes at primere er sekvenser som ikke danner en sekundærstruktur ved baseparing med andre kopier av primeren eller sekvenser som danner en "hårnåls"-konfigurasjon. Sekvensen kan hensiktsmessig utvikles av en datamaskin eller utvelges vilkårlig fra en genbank. Primeren er fortrinnsvis enkeltstrenget for maksimal effek-

tivitet ved amplifisering, men kan alternativt være dobbeltstrenget. Hvis den er dobbeltstrenget, behandles primeren først for å separere sine strenger før den anvendes for å fremstille forlengelsesprodukter. Fortrinnsvis er primeren et oligodeoxyribonukleotid.

Uttrykket "vilkårlig nukleinsyresegment" som anvendt her, angir ethvert templat, segmentet av nukleinsyre som skal behandles av primeren hvorav ingen sekvensinformasjon behøver å være kjent før forlengelse. Søkerne har funnet at det ikke er nødvendig, med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, at et tilstrekkelig antall baser ved begge ender av et templat må være kjent tilstrekkelig detaljert slik at primere kan utformes som vil hybridisere til forskjellige strenger av templatet.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen tilveiebringes minst én primer på mer enn 7 nukleotider. Primere med mindre enn 7 nukleotider primer ineffektivt. Primere kan syntetiseres ved standardteknikker kjent av fagmannen. I den foretrukne form av oppfinnelsen anvendes minst én primer med en lengde på 9 til 10 nukleotider. Hensiktsmessig anvendes en primer. Minst én anvendt primer kan være biotinylert. Det vil si at primeren kan være kovalent kjedet til et biotin eller en analog av biotin. Den anvendte, kjedende gruppe skal være valgt for å tillate forlengelse under de betingelser som er detaljert angitt her.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for å skille mellom nukleinsyrer, sammenligner forskjeller i produkter av en forlengelsesreaksjon separat utført på minst to vilkårlige segmenter av nukleinsyrer.

I det første trinn ved foreliggende fremgangsmåte utføres en forlengelsesreaksjon (a) separat på hver av minst to nukleinsyrer ved (i) å kontakte nukleinsyrene med minst én oligonukleotidprimer på mer enn 7 nukleotider under betingelser slik at for minst én nukleinsyre syntetiseres et forlengelsesprodukt av minst én primer som er komplementær til det vilkårlige nukleinsyresegment. En foretrukket utførelsesform av denne forlengelsesreaksjon utnytter evnen til de fleste DNA-polymeraser til å utføre primerforlengelsesreaksjoner. Utførelse av en primerforlengelsesreaksjon krever et nuklein-

syresubstrat bestående av en primer hybridisert til en templatstreng slik at 3'-enden av primeren er forsenket i forhold til 5'-enden av templatstrengen. Når primerforlengelsesmetoder vanligvis utøves, er primeren DNA, templatstrengen er enten DNA eller RNA, og en DNA-polymerase anvendes for å forlenge primeren. Hovedelementene som kreves for utførelse av primerforlengelsesreaksjoner, er angitt i Mullis et al., US patentskrift nr. 4 683 195 og Mullis, US patentskrift nr. 4 683 202.

De nukleinsyrer som skal analyseres ved denne fremgangsmåte, kan være DNA eller RNA, og DNA eller RNA kan være dobbeltstrenget eller enkeltstrenget. Enhver kilde for nukleinsyre i renset eller ikke-renset form kan anvendes som utgangsnukleinsyre. Eksempelvis kan nukleinsyren være fra et naturlig DNA eller RNA fra enhver kilde, innbefattende virus, bakterier og høyere organismer slik som planter, dyr og mikrober, eller fra klonet DNA eller RNA. I tillegg kan nukleinsyren utgjøre hele nukleinsyren eller kan være en fraksjon av en kompleks blanding av nukleinsyrer. Fortrinnsvis er nukleinsyren deoxyribonukleinsyre. Overraskende har søkerne funnet fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendbar til å skille mellom nukleinsyrer fra forskjellige individuelle organismer inneholdende lite, genomisk DNA slik som gjær-DNA (2×10^7 basepar pr. genom) så vel som forskjellige individuelle organismer inneholdende stort, genomisk DNA slik som humant DNA ($3{,}0 \times 10^9$ basepar pr. genom).

Valget av nukleinsyrepolymerase anvendt i forlengelsesreaksjonen, avhenger av arten av templatet. For DNA-templatstrenger inneholder egnet, kommersielt tilgjengelig DNA-polymerase DNA-polymerase erholdt fra den termofile bakterie Thermus aquaticus (Taq-polymerase) eller andre termostabile polymeraser. Strukturelle varianter og modifiserte former av denne og andre DNA-polymeraser vil også være forventet å være anvendbare i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. For RNA-templater er revers transkriptase et eksempel på en DNA-polymerase som også vil være forventet å være anvendbar. I nærvær av nukleosidtrifosfatsubstrater, naturlige eller analoge, forlenger polymerasen lengden av primeren i 3'-retningen. Sekvensen av forlengelsesproduktet vil generelt være komplementær til den tilsvarende sekvens av templatstrengen.

Nukleosidtrifosfatsubstratene anvendes som beskrevet i PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J.-J. Sninsky og T. J. White, red., s. 3-12, Academic Press (1989), som er inkorporert ved referanse, og US patentskrifter 4 683 195 og 4 683 204. Substratene kan være modifisert for et utall forsøksformål på kjent måte for fagfolk. Som et eksempel kan minst ett av de naturlige nukleosidtrifosfatsubstrater være erstattet med en mobilitets-skiftende analog som angitt i US patentskrift 4 879 214, hvilket patent er inkorporert ved referanse.

Etter at trinn (i) er utført, utføres de ytterligere trinn for (ii) dissosiering av forlengelsesproduktet fra dets komplement; og (iii) amplifisering av det vilkårlige nukleinsyresegment ved å bringe det dissosierte forlengelsesprodukt i kontakt med en primer fra trinn (i) under betingelser slik at et amplifiseringsforlengelsesprodukt syntetiseres under anvendelse av det dissosierte forlengelsesprodukt som et templat.

En amplifiseringsreaksjon er generelt beskrevet i Mullis et al., US patentskrift 4 683 195 og Mullis, US patentskrift 4 683 202, hvilke patenter er inkorporert ved referanse. Spesifikke betingelser for amplifisering av et nukleinsyretemplat er beskrevet i M. A. Innis og D. H. Gelfand, PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J.-J. Sninsky og T. J. White, red., s. 3-12, Academic Press (1989), som er inkorporert ved referanse.

Spesifikt er Mullis-publikasjonen rettet på en fremgangsmåte for amplifisering av enhver ønsket, spesifikk nukleinsyresekvens inneholdt i en nukleinsyre eller blanding derav. Fremgangsmåten ifølge Mullis omfatter å behandle separate, komplementære strenger av nukleinsyren med et molart overskudd av to oligonukleotidprimere, og å forlenge primerne under dannelse av komplementære primerforlengelsesprodukter som virker som templater for syntetisering av den ønskede nukleinsyresekvens. Primerne ifølge Mullis er utformet til å være tilstrekkelig komplementære til forskjellige strenger av hver spesifikk sekvens som skal forsterkes. Reaksjonstrinnene kan utføres trinnvis eller samtidig og kan gjentas så ofte som ønskelig.

I forlengelsesreaksjonene bringes en nukleinsyre i kontakt med minst én oligonukleotidprimer som her beskrevet. Forlengelsesproduktet dissosieres fra den komplementære, vilkårlige nukleinsyre på hvilken den ble syntetisert, under dannelse av et enkeltstrenget molekyl; og det vilkårlige nukleinsyresegment forsterkes ved å bringe det enkeltstrengede forlengelsesprodukt i kontakt med en primer erholdt ovenfor under betingelser slik som f.eks. beskrevet i PCR-protokollene og US patentskrift 4 683 202, slik at et amplifiserings-forlengelsesprodukt syntetiseres under anvendelse av den dannede enkle streng (dvs. det dissosierte forlengelses-produkt) som et templat.

Trinnene beskrevet her, kan utføres sekvensvis eller samtidig som beskrevet i US patentskrifter 4 683 195 og 4 683 202. I tillegg kan trinnene gjentas inntil den ønskede grad av sekvensamplifisering er erholdt, som angitt i US patentskrifter 4 683 195 og 4 683 202.

Etter forlengelse sammenlignes resultatene fra trinn (b) med hensyn på forskjeller. Generelt er resultatene produkter eller fravær av produkt. Spesifikt sammenlignes produktene for å bestemme om segmentene er identiske, eller med hensyn på forskjeller i ett eller flere nukleotider, ved nukleotid-substitusjon, innskudd eller delesjon. Forskjeller i produktene kan ta form av f.eks. forskjell i størrelse av hvert produkt, forskjell i sekvensen av hvert produkt, forskjell i kvantiteten av hvert fremstilt produkt, og forskjeller i antallet produkter.

Sammenligning av produktet kan utføres ved et utall teknikker velkjente innen faget. Eksempler innbefatter nukleotidsekvensbestemmelse av det amplifiserte segment og RFLP-analyse. Hensiktsmessig kan sammenligning foretas ved et størrelsesfraksjoneringsmedium. Hvis oppløsningen av størrelsesfraksjoneringsprosessen er tilstrekkelig, kan forskjeller på et enkelt nukleotid påvises. Den foretrukne fremgangsmåte for størrelsesfraksjonering er elektroforese gjennom en polyacrylamid- eller agarosegelmatriks.

Enkel inspeksjon av elektroforesegelen av produktet kan åpenbare polymorfisme som påvirker størrelsen og kvantiteten av det amplifiserte segment og polymorfisme som bes-

temmer hvorvidt et segment er amplifisert. Polymorfisme åpenbaret ved foreliggende oppfinnelse, kan kvantifiseres ved kjente densitometriske prosedyrer utført på det amplifiserte produkt i gelen. Kvantifisering er viktig i visse anvendelser hvor det er nødvendig å skille homozygot fra heterozygot polymorfisme. Søkerne har funnet at en homozygot med to kopier av polymorfismen danner to ganger så mye av produktet enn en heterozygot.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen har praktiske anvendelsesområder. Eksempler på slike anvendelser innbefatter genetisk kartlegging og skilling mellom og identifisering av individer.

Søkerne har funnet at polymorfismen eller forskjellene identifisert via fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, kan ha anvendelighet ved genetisk kartlegging. Vanligvis konstrueres et genetisk kart via RFLP-analyse. Et genetisk kart av en organisme kan konstrueres, f.eks. ved substituering av polymorfismer, identifisert under anvendelse av forskjellige primere på samme organisme, påvist ifølge foreliggende oppfinnelse for de RFLP-er som anvendes som genetiske markører som beskrevet i faget, f.eks. Botsein, D., "Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms", Am. J. Hum. Genet. 32:314-331 (1980), hvilken referanse er inkorporert her. Genetisk kartlegging under anvendelse av polymorfismen ifølge oppfinnelsen som markører, har viktige planteforedlingsanvendelser da søkerne har bestemt at polymorfismer påvist ved foreliggende oppfinnelse, er arvelige, genetiske markører. Disse markører, akkurat som RFLP-markører i Tanksley, S. D., "RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science", Bio/Technology, vol. 7, mars 1989, s. 257-264, kan anvendes som prober med hensyn på nærvær eller fravær av visse kromosomsegmenter da søkerne har funnet at polymorfismene påvist ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, kan kosegregere ved standard RFLP-markører.

Enn videre kan fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendes for å konstruere et nukleinsyre-"fingeravtrykk". Slike fingeravtrykk er spesifikke for individer og kan anvendes på problemer med hensyn på identifisering eller skilling mellom individer. Et slikt "fingeravtrykk" vil bli konstruert

under anvendelse av multiple polymorfismer dannet av forskjellige primere og påvist ved foreliggende oppfinnelse, akkurat som polymorfismene anvendes for å skape et fingeravtrykk i Jeffreys, A. J., "Individual-Specific 'Fingerprints' of Human DNA", Nature, vol. 316 4 juli 1985. Det vil si at genomer sammenlignes med hensyn til nærvær eller fravær av polymorfismer.

Eksempler

Eksempel 1 viser syntese og rensing av oligonukleotidprimere. Eksempel 2 viser at et utvalg på 10 nukleotidprimere er i stand til å forsterke vilkårlige nukleinsyresegmenter, og at polymorfismer kan påvises mellom genomiske DNA-prøver fra to soyabønnekulturer. Eksempel 3 illustrerer at polymorfismer åpenbaret ved foreliggende oppfinnelse, er arvet på normal måte av avkommet av en krysning mellom to soyabønnelinjer. Dette eksempel fastslår anvendeligheten av polymorfismene som genetiske markører. Eksempel 4 viser at mønsteret av amplifiserte bånd er spesifikt for en gitt primersekvens. De fleste forandringer innbefattende et enkelt nukleotid i primersekvensen forårsaker en fullstendig forandring i mønsteret av amplifiserte DNA-segmenter. Dette antyder at for det meste enkelt-nukleotidpolymorfismer ved tilsvarende primingsseter i individuelle genomer vil ses ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen som en forskjell i mønsteret av amplifiserte DNA-segmenter. Eksempel 5 illustrerer at 10 nukleotidprimere generelt forsterker ekvivalente antall av DNA-segmenter fra både små og store genomer. Eksempel 6 viser anvendeligheten av primere av fra 6 til 10 nukleotider i lengde. Eksempel 7 viser anvendelse av en 10 nukleotidprimer for å påvise en genetisk polymorfisme i humane DNA-prøver. Eksempel 8 viser at fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen påviser en polymorfisme som kan anvendes for å skille mellom humane DNA-prøver. Eksempel 9 viser kvantifisering av amplifiseringsproduktene.

Eksempel 1

Syntese og rensing av oligonukleotidprimere

Åtte oligonukleotidprimere (tabell I) ble syntetisert

med standard fastfase-metoder med fosforamidittkjemi i en "Du Pont Model Coder 300" automatisert DNA-syntetisator (E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE). De åtte primere var av arbitrær nukleotidsekvens. Hver primer ble valgt til å inneholde det samme forhold av basene A og T som basene G og C for generelt lik stabilitet når den ble festet til templatet.

Etter avbeskyttelse i ammoniumhydroxyd i henhold til standard praksis ble prøvene tørket under vakuum, oppløst i 0,2 ml TEN (10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1 mM NaEDTA, 10 mM NaCl) og renset ved gelfiltreringskromatografi på "Sephadex G25" i NAP-5-patroner (Pharmacia, Piscataway, N.J.) ekvilibrert i TEN. Gelfiltrering ble utført ved å anbringe 0,2 ml prøve; etterfulgt av 0,6 ml TEN, etterfulgt av 0,5 ml TEN påført på toppen av kolonnen og oppsamling av 0,5 ml elueringsmiddel. Konsentrasjonen av renset oligonukleotid ble beregnet ved absorbans ved 260 nm på et spektrofotometer. En absorbansverdi på 1 svarende til 33 µg/ml, var forutsatt.

TABELL I

Primer-sekvens	Primer-navn	Konsentrasjon av lagerløsning, µg
5'-AGCACTGTCA	10b	10
5'-TCGTAGCCAA	AP3	10
5'-TCACGATGCA	AP4	10
5'-CTGATGCTAC	AP5	10
5'-GCAAGTAGCT	AP6	10
5'-CTGATACGGA	AP7	10
5'-TGGTCACTGA	AP8	10
5'-ACGGTACACT	AP9	10

Eksempel 2

Primere (tabell I) påviser polymorfismer i soyabønne-DNA-templater

Genomisk DNA ble isolert fra soyabønnekulturene PI

81762 og Bonus ved sentrifugering i CsCl/ethidiumbromid som beskrevet i Murray, M.G. "Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA", Nucleic Acids Res., vol. 8 (1980), s. 4321-4326, hvilken referanse er inkorporert her. Kilden for soyabønnekulturene var professor Theodore Hymowitz, University of Illinois.

Åtte forskjellige oligonukleotider, hvert med en lengde på 10 nukleotider (tabell I), ble testet separat som primere i amplifiseringsreaksjonen angitt detaljert nedenfor, med hensyn på deres evne til å forsterke DNA-segmenter fra de to varianter av soyabønne-DNA.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen ble utført i et reaksjonsvolum på 50 µl inneholdende genomiske DNA-blandinger på 10 mM Tris-Cl, pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,001% gelatin (Sigma, St. Louis, MO, kat. (1990) nr. G-2500), 0,1 µg soyabønne-DNA, 20 pmol oligonukleotid, 200 µM hver av deoxynukleotidtrifosfatene dATP, dCTP, dGTP, dTTP og 1,25 enheter "Amplitaq" DNA-polymerase (Perkin-Elmer Cetus kat. nr. N801-0060, Norwalk, CN). Den genomiske DNA-blanding ble fremstilt ved blanding av bestanddeler 1-5 (tabell II) og oppvarming av denne blanding til 99°C i 4 minutter i varmeblokken av en DNA-termisk, syklisk anordning. Denne blanding ble deretter avkjølt til romtemperatur før tilsetning av bestanddelene 6 og 7 (tabell II).

Amplifisering ble utført i 0,6 ml mikrosentrifugerør (kat. nr. 1048-00-0 fra Robbins Scientific Corp., 1280 Space Park Way, Mtn. View, CA 94943 (1990)), og reaksjonen ble startet ved tilsetning av 48 µl av en genomisk DNA-blanding (tabell II) til 2 µl av hver primer fra tabell I og lagt over med 40 µl mineralolje (Sigma kat. nr. M3516).

TABELL II

		Volum	
Nr.	Genomiske DNA-blandinger	PI 81762 µl	Bonus µl
1	Avionisert vann	309,0	308,0
2	10x buffer*	45,0	45,0
3	$MgCl_2$, 200 mM	2,2	2,2
4	PI 81762 DNA, 672 µg/ml	1,3	-
5	Bonus DNA, 448 µg/ml	-	2,0
6	Blanding av dATP, dCTP, dGTP, TTP, 1,25 mM hver	72,0	72,0
7	"Amplitaq" polymerase, 5 enheter/µl	2,2	2,2

*10 x buffer består av 100 mM TrisCl (pH 8,3) 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$ og 0,01% gelatin som angitt i Perkin-Elmer Cetus kat. nr. N801-0060 "Amplitaq" DNA-polymerase.

Temperatursyklisering i amplifiseringsreaksjonen ble utført i en "DNA Thermal Cycler" (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CN) med 30 sykluser med parametere innstilt på: hold 94°C i 1 minutt, hold 35°C i 30 sekunder, hev til 72°C i 1:51 minutter, hold 72°C i 2 minutter.

Etter fullførelse av de 16 separate amplifiseringsreaksjoner utført ovenfor, ble 5 µl aliquoter av hver prøve analysert ved elektroforese på en 1,4% agarosegel ved 8,5 volt/cm i 60 minutter. Elektroforese ble utført i henhold til standard praksis som beskrevet i J. Sambrook, E. F. Fritsch og T. Maniatis, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring-Harbor Laboratory Press, s. 6.3-6.19 (1989), som er inkorporert her ved referanse. Gelen ble beiset med ethidiumbromid og fotografert.

Polymorfismer, dvs. forskjell i reaksjonsproduktet i

DNA-mønsterne, var tydelig for alle primere bortsett fra AP6 ved sammenligning av DNA-bånd amplifisert med en gitt primer fra både Bonus og PI 81762 (figur 1). Figur 1 er et fotografi av den beisede elektroforesegel. Spor O er en molekylvektstandard. Spor angitt med oddetall, er Bonus DNA-amplifiseringsproduktene fra de åtte primere (tabell I), og sporene angitt med partall, er PI 81762 DNA-amplifiseringsproduktene fra primerne. Det ses fra figuren at vilkårlige nukleinsyresegmenter kan skjelnes på basis av nukleotidforskjeller. Som et eksempel ble to bånd betegnet med "A" og "B", amplifisert med primer 10b sett i DNA fra PI 81762 (spor 2), men ikke fra Bonus (spor 1).

Eksempel 3

Amplifiserte polymorfismer er anvendbare for genetisk kartlegging

For å bestemme hvorvidt slike polymorfismer som ses i eksempel 2 har anvendelighet ved genetisk kartlegging, ble bånd A-polymorfismen påvist med primer 10b (figur 2), kartlagt i forhold til soyabønnegenomet. Dette ble utført ved bestemmelse av hver av 66 segregerende F_2-individer (T. Hymowitz, U. of Ill.), med hensyn på deres parentale arvemønster av bånd A-polymorfismen og korrelering av dette med segregasjonsdata fra de samme 66 individer for 430 RFLP-markører på forhånd kartlagt i forhold til soyabønnegenomet (J. A. Rafalski og S. V. Tingey, Abstract, Genome and Sequencing, 26.-30. april, 1989). Prøver av det F_2-genomiske DNA ble underkastet fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen med primer 10b under de betingelser som er beskrevet i eksempel 2, og ble analysert ved elektroforese i en 1,4% agarosegel. Spor O er en molekylvektstandard, og de gjenværende spor er reaksjonsproduktene av F_2-individene. Tabell 3 viser det parentale arvemønster for primer 10b bånd A-polymorfismen. Da bånd A er amplifisert fra PI 81762 og ikke Bonus (figur 2), indikerer nærvær av bånd A i en bestemt prøve at det mottok minst én kopi av dette DNA-segment fra PI 81762. Ved første inspeksjon er det vanskelig å skille mellom homozygoter som har mottatt to kopier av bånd A fra PI 81762 og heterozygoter som har mottatt bare én kopi av bånd A fra PI 81762. Derfor bedømmes denne polymorfisme som en dominant

markør (se tekst til tabell 3). Individer som ikke inneholder bånd A, har arvet dette segment av genomet fra Bonus.

For å bestemme stillingen til bånd A-stedet i soyabønnegenomet, var det nødvendig å korrelere arven av dette sted med den til flere RFLP-markører som tidligere er kartlagt i forhold til soyabønnegenomet (J. A. Rafalski og S. V. Tingey, Abstract, Genome Mapping and Sequencing, 26.-30. april, 1989). Dette genetiske kart (data ikke vist) ble konstruert ved standard RFLP-metodikk fra analyse av segregasjonsmønsterne av mange RFLP-markører i den samme F_2-populasjon som ble anvendt i dette eksempel (for standard RFLP-kartleggingsteknologi, se T. Helentjaris, M. Slocum, S. Wright, A. Schaefer og J. Nienhuis, 1986, Theor. Appl. Genet., 72:761-769 som er inkorporert her som referanse). Basisen for den genetiske kartleggingsanalyse er at markører lokalisert nær hverandre i genomet, er arvet sammen i F_2-avkommet, mens markører lokalisert lenger bort, medarves mindre hyppig. Segregasjonsanalyse og markørkartstillinger ble beregnet under anvendelse av MapMaker-programmet inkorporert her (E. S. Lander, P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, J. F. Daly, S. E. Lincoln og L. Newburg, 1987, Genomics 1:174-181). Resultatene indikerer at primer 10b bånd A-polymorfismen er kartlagt til den kjedende gruppe 17 mellom RFLP-markører 249 og 7315 i en distanse fra hver markør på 9,4 og 9,2 centimorganer. Sannsynligheten for at bånd A-polymorfismen segregerte rent tilfeldig i de observerte data, var bare ett tilfelle av $10^{-11,8}$, noe som indikerer styrken av denne kartstilling. Dette eksempel viser at polymorfismer som åpenbaret ved foreliggende oppfinnelse, har anvendelighet som genetiske markører.

TABELL III

	F_2 individer																														
Markørnavn	1	2	4	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	25	26	27	28	29	30	31	33	34	35	
RFLP Markør 249	B	A	H	H	H	H	A	H	B	H	H	H	A	H	H	H	A	H	A	H	m	H	A	H	A	B	A	B	A	H	
RFLP Markør 7315	B	A	H	m	H	A	H	H	B	B	H	A	H	H	H	H	A	H	H	m	H	m	m	H	A	B	A	B	H	H	
Primer 10b Bånd A	b	A	b	m	b	b	m	b	b	b	b	A	A	A	b	b	A	b	A	m	b	m	A	b	A	b	A	b	b	b	

	F_2 individer																														
Markørnavn	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	5	54	55	56	57	58	59	61	62	63	64	65	68	
RFLP Markør 249	H	B	a	H	A	A	m	A	B	B	H	B	H	A	B	A	H	B	H	B	A	A	B	m	m	m	m	m	m	H	
RFLP'Markør 7315	H	B	H	H	A	A	A	A	H	H	H	B	H	H	B	H	H	B	H	H	A	A	B	H	H	A	H	A	m	H	
Primer 10b Bånd A	b	b	b	b	A	A	A	A	b	b	b	b	b	b	b	A	b	b	b	b	A	A	b	b	b	m	m	A	m	b	

	F_2 individer																		
Markørnavn	70	71	72	73	74	75	76	77	78	80	82	83	84	85	86	88	90	91	96
RFLP Markør 249	A	H	B	A	A	H	B	B	H	H	A	B	A	A	B	m	m	m	m
RFLP Markør 7315	m	A	m	m	A	m	B	B	H	H	H	H	A	A	A	m	m	B	A
Primer 10b Bånd A	m	m	m	m	A	m	b	b	A	b	b	b	A	A	b	m	m	b	A

304655

Tekst til tabell III

DNA isolert fra 88 F_2-individer som segregerer fra en krysning mellom Bonus og PI 81762. Genotypen av hvert individ ved hvert av de ovenfor angitte markørsteder, ble bestemt ved enten RFLP-analyse eller ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen (se tekst). Individuelle bedømmelser indikerer den parentale genotype av markørstedet. En bedømmelse på "A" eller "B" angir at stedet var arvet fra Bonus eller PI 81762. En bedømmelse på "H" angir at stedet var arvet både fra Bonus og PI 81762. En bedømmelse på "a" angir at stedet var enten arvet bare fra Bonus eller at det var arvet fra både Bonus og PI 81762. En bedømmelse på "b" angir at stedet var enten arvet fra PI 81762 eller at det var arvet fra både Bonus og PI 81762. En bedømmelse på "m" angir manglende data.

Eksempel 4

Mønsteret av amplifiseringsprodukter av DNA-segmenter er følsomt overfor enkelt-nukleotidforandringer i primersekvensen

En serie av primere ble syntetisert basert på nukleotidprimeren AP8 ifølge eksempel 2 (tabell I). Hver variant avvek fra den anerkjente sekvens ved et enkelt nukleotid som forløp trinnvis gjennom primersekvensen. Nukleotidsammensetning i hver variant ble opprettholdt ved 50% A+T som i eksempel 2. I tabell IV er det nukleotidsete som avviker fra den anerkjente sekvens, vist med små bokstaver.

TABELL IV

Primer-sekvens	Primer-navn	Konsentrasjon av lagerløsning
5'-TGGTCACTGA	AP8(anerkjent)	10 µM
5'-aGGTCACTGA	AP8-a	10 µM
5'-TcGTCACTGA	AP8-b	10 µM
5'-TGcTCACTGA	AP8-c	10 µM
5'-TGGaCACTGA	AP8-d	10 µM
5'-TGGTgACTGA	AP8-e	10 µM
5'-TGGTCtCTGA	AP8-f	10 µM
5'-TGGTCAgTGA	AP8-g	10 µM
5'-TGGTCACaGA	AP8-h	10 µM
5'-TGGTCACTcA	AP8-i	10 µM
5'-TGGTCACTRGt	AP8-j	10 µM

Blandinger inneholdende genomisk DNA fra Bonus og PI 81762, ble fremstilt som beskrevet i eksempel 2 (tabell II). Istedenfor anvendelse av mikrosentrifugerør som reaksjonskar for amplifisering ble prøvene imidlertid anbrakt i brønnene av en polyvinylklorid- (PVC) 96-brønns mikrotiterplate (Falcon, 1989, 3911, Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA) og lagt over med 40 µl mineralolje (Sigma, St. Louis, MO, kat. nr. M3516 1990). Ubrukte brønner ble fylt med 50 µl vann pluss 40 µl olje. 96-brønnsplaten ble anbrakt uten lokk i en luftdreven sykliseringsovn ("BSC 1000" med temperatursonde "BSC-2005", Bios Corp., 291 Whitney Ave., New Haven, CT 06511) på toppen av et metalltestrørstativ med et 2,56 cm (1 inch) kvadratgitter. Stativet ble gjort 5,13 cm (2 inch), idet man klippet av toppetasjen av et treetasjes stativ 12,18 cm (4,75 inch) bredt x 29,5 cm (11,5 inch) langt x 10,3 cm (4 inch) høyt. Den frigjorte etasje ble lagt på toppen av 96-brønnsplaten. Ovnen var i et rom ved omgivende temperatur på 22°C og ble programmert for 35 sykluser med parametrene: hold 93°C i 1 minutt, hold 35°C i 1 minutt, hev til 72°C i 2 minutter, hold 72°C i 2 minutter. Temperaturtoleransen var satt til 2°C.

Etter at amplifiseringsreaksjonen ifølge oppfinnelsen

var fullført, ble 12 µl av hver prøve analysert ved elektroforese på en 1,4% agarosegel som beskrevet i eksempel 2.

Figur 3 er et fotografi av den beisede elektroforesegel. Spor O er en molekylvektstandard. DNA-amplifiseringsprodukter er vist for Bonus (spor nummerert med oddetall) og for PI 81762 (spor nummerert med partall). Piler markerer lokaliseringen i hver primer som avviker fra sekvensen av primer AP8. Hver primer utviklet meget forskjellige mønstre av amplifiserte DNA-segmenter med unntak av AP8 og AP8-a som syntes å avvike kvalitativt bare i ett bånd (se 250 bp bånd funnet bare med AP8-a; figur 3, spor 1-4). Mens det totale mønster av båndene avvek for hoveddelen av primere, var det i det minste enkelte bånd som kan være felles for forskjellige primere (bemerk polymorfe 1 kb bånd som synes å bli amplifisert av AP8, AP8-a og AP8-b; figur 3, spor 1-6). Bortsett fra primere AP8 og AP8-a ble forskjellige polymorfismer mellom Bonus og PI 81762 åpenbaret med hver primer. Blant mønstrene utviklet av alle 11 primere, var det ca. 22 distinkte polymorfismer som definert ved nærvær av et bånd i ett genom og tilsvarende fravær i det andre genom.

Til tross for noen få unntak, fremkalte en enkel nukleotidforandring i en primer generelt en signifikant forandring i mønsteret av amplifiserte bånd og åpenbarte nye polymorfismer. Dette antyder at betingelsene for dette forsøk er tilstrekkelige stringente til å kreve deltakelse av de fleste, om ikke alle, basene i en gitt primer.

Eksempel 5

Amplifisering av DNA fra forskjellige arter med 10 nukleotidprimere av arbitrær sekvens

I dette eksempel ble genomisk DNA testet fra bomull (linje nr. 315, Coker Seed Co., Hartsville, S.C. 29550), gjær (linje DBY931, E. I. du Pont de Nemours & Co., Wilmington, DE), Arabidopsis (linje W5, se K. A. Feldman et al., Science, (1989) 243:1351-1354) og mais (linje B73 University of Illinois). DNA-prøver ble fremstilt ved standardmetoder som følger: Gossypium hirsutum (bomull), R. Bernatzky og S. D. Tanksley 1986, Theor. Appl. Genet. 72, 314-321; Saccharomyces cerevisiae (gjær), R. W. Davis, M.-Thomas, J. Cameron, T. P.

St. John, S. Scherer og R.-A. Padget 1980, Methods Enzymol. 65, 404-411; Arabidopsis thaliana (Arabidopsis), Shure, Wessler, Fedoroff, 1983, Cell, 35, 225-233; og Zea mays (mais), Dellaporta, S. L. "Molecular Biology of Plants a Laboratory Course Manual", Cold Spring Harbor, N.Y., 11724 (1985), s. 36-37. Reaksjonsbestandelene ble anvendt ved de konsentrasjoner som er angitt i eksempel 2, og ble fremstilt som vist i tabell V.

TABELL V

Blanding	Volum µl
Avionisert vann	1837,0
10x buffer	550,0
$MgCl_2$, 1 M	5,5
Blanding av dATP, dCTP, dGTP, TTP, 1,25 mM hver	880,0
"Amplitaq" polymerase, 5 enheter/µl	27,0

Primere AP3, AP4, AP5, AP6, AP7 og AP8 (tabell I) ble fortynnet med vann til konsentrasjoner på 2 µM. Genomiske DNA-prøver ble fortynnet med vann til konsentrasjoner på 10 mg/ml, ble oppvarmet til 99°C i 4 minutter i Perkin-Elmer-sykliseringsanordningen og avkjølt til romtemperatur før bruk. Reaksjonsblandinger for amplifisering ble fremstilt i en PVC 96-brønnsplate ved blanding av 10 µl genomisk DNA, 10 µl primer, tabell I, og 30 µl blanding, tabell V. Alle prøvebrønner ble anvendt, og alle ble lagt over med en dråpe (40 µl) mineralolje. Termisk syklisering ble foretatt i sykliseringsovnen som beskrevet i eksempel 4. Anneleringstemperaturen ble programmert til 36°C.

Amplifiseringsreaksjonsprodukter ble analysert ved agarosegelelektroforese som i eksempel 3. Figur 4 illustrerer et fotografi av en beiset elektroforesegel. Spor 1-6 er DNA-amplifiseringsprodukter fra bomull, spor 7-12 fra gjær, spor 13-18 fra Arabidopsis og spor 19-20 fra mais. Resultatene viser at alle de genomiske DNA-prøvene med hell ble amplifisert av mesteparten av de testede primere. Dette er overras-

kende i lys av de små genomstørrelser av gjær og Arabidopsis i forhold til de av bomull, mais og soyabønne.

Eksempel 6

Primere større enn 7 nukleotider understøtter DNA-amplifisering

I dette eksempel ble seks forskjellige primere mellom 6 og 10 nukleotider i lengde (tabell VII) sammenlignet med hensyn på evnen til å fungere som primere i amplifiseringsreaksjonen. Reaksjonsbestanddeler var som beskrevet i eksempel 2 og ble fremstilt som vist i tabell VI.

TABELL VI

Genomisk DNA-blanding	Volum µl	
	Bonus	PI 81762
Avionisert vann	1240	1242
10x buffer	175	175
$MgCl_2$, 200 mM	3,5	3,5
Blanding av dATP, dCTP, dGTP, TTP, 1,25 mM hver	140	140
"Amplitaq" polymerase, 5 enheter/µl	9	9
Bonus DNA, 448 µg/ml	7,8	-
PI 81762 DNA, 670 µg/ml	-	7,8

TABELL VII

Primersekvens	Primernavn	Konsentrasjon av lagerløsning
5'-ATTGCGTCCA	AP13	4 µM
5'-TTGCGTCCA	AP13a	4 µM
5'-TGCGTCCA	AP13b	4 µM
5'-GCGTCCA	AP13c	4 µM
5'-CGTCCA	AP13d	4 µM
5'-CGCCCA	AP13e	4 µM

Primer AP13 var en arbitrær sekvens av 50% A pluss T som i eksempel 1. Primere AP13a-AP13e var utformet ved sekvensvis fjerning av nukleotider fra 5'-enden. Primer AP13c hadde en ytterligere T substituert med en C for å gi stabilitet.

Hver primer (2,5 µl) ble blandet separat i 0,6 ml mikrosentrifugerør som i eksempel 2 med 22,5 µl av hver blanding inneholdende templat-DNA fra enten Bonus eller PI 81762. Hver blanding ble lagt over med 40 µl mineralolje (eksempel 2). Temperatursyklisering ble utført i en "DNA Thermal Cycler" (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT) i 35 sykluser med parametere innstilt ved: hold 94°C i 1 minutt, hold 35°C i 1 minutt, hev til 72°C i 2 minutter, hold 72°C i 2 minutter. Etter at amplifiseringsreaksjonen ifølge oppfinnelsen var fullført, ble 12 µl av hver prøve analysert ved elektroforese på en 1,4% agarosegel som beskrevet i eksempel 2.

Figur 5 er et fotografi av en beiset elektroforesegel. Spor 0 er en molekylvektstandard. Resultatene indikerer at under de valgte betingelser for amplifisering understøttet ikke primere kortere enn 8 nukleotider, påvisbare nivåer av amplifisering.

Eksempel 7

Amplifisering av humant DNA med en 10 nukleotidprimer av arbitrær sekvens (AP9)

TABELL VIII

Blanding	Volum µl
Avionisert vann	103,5
10x buffer*	45,0
$MgCl_2$, 50 mM	9,0
Blanding av dATP, dCTP, dGTP, TTP, 2 mM hver	45,0
AP9-primer, 10 µM (se eksempel 2)	18,0
"AmpliTaq" polymerase, 5 enheter/µl	4,5

*(10x-bufferen anvendt her, besto av 100 mM Tris-HCl, pH

8,3; 500 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$; 50 µM EDTA; 0,1% gelatin).

25 µl av blanding (tabell VIII) ble utlevert til hvert av 7 reaksjonsrør. De genomiske DNA-prøver fremstilt fra transformerte lymfoblaster, var fra 6 anonyme individer og er betegnet Hu1-6. De genomiske DNA-prøver ble erholdt fra dr. John Gilbert og dr. Allen Roses, Duke Medical Center, Durham, NC. Hver genomisk DNA-prøve ble fremstilt ved tilsetning av 100 ng DNA (2-3 µl) til 25 µl H_2O, oppvarming i et kokende vannbad i 1 minutt og anbringelse på is. For hver amplifiseringsreaksjon ble 25 µl DNA tilsatt til reaksjonsblandingen. Også en blindreaksjon ble fremstilt ved tilsetning av 25 µl H_2O til et rør inneholdende reaksjonsblanding. Reaksjonsblandingene ble lagt over med en dråpe mineralolje. Temperatursyklisiseringen ble utført i en "DNA Thermal Cycler" i henhold til følgende program: en første 4-minutters inkubering ved 93°C; 30 sykluser på 1 minutt ved 93°C; 30 sekunder ved 35°C, 2 minutter og 10 sekunders heving til 72°C; 2 minutter ved 72°C etterfulgt av en sluttelig 5-minutters inkubering ved 72°C. Etter overføring til friske rør ble 50 µl 5 M ammoniumacetat og 250 µl ethanol tilsatt til hver prøve. Etter en 2-timers inkubering ved -20°C ble hver DNA-prøve oppsamlet ved sentrifugering, tørket og oppløst i 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA.

2 µl av hver prøve ble elektroforert på en 1,4% agarosegel (8,3 cm x 6 cm) i TAE-buffer (40 mM Tris-acetat, pH 7,8; 5 mM natriumacetat; 1 mM ESTA) ved 50 V i 160 minutter. Etter beising med ethidium ble gelen fotografert under anvendelse av ultrafiolett bestråling. Resultatene i figur 6 viser at prøver Hu1 og Hu2 hadde et fremtredende bånd ved ca. 1,3 kb som ikke er til stede i de fire andre prøvene. Således var amplifisering under anvendelse av 10 nukleotidprimeren AP9 i stand til å påvise en genetisk polymorfisme som kan anvendes for å skille mellom humane DNA-prøver.

Eksempel 8

Kvantifisering av PCR-produkter

I eksempel 3 ble fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendt for genetisk å kartlegge en polymorfisme. Dette ble utført ved bestemmelse av det parentale arvemønster av poly-

morfismen i flere segregerende individer. Som vist i eksempel 3, var forskeren ikke i stand til å skjelne individer heterozygote for en markør fra individer homozygote for den samme markør, og polymorfismen bedømmes som å være dominant. Et heterozygot individ inneholder to forskjellige kopier (alleler) av et bestemt DNA-segment ved en stilling (sted) i genomet. Et homozygot individ vil inneholde to identiske alleler ved et sted. På flere anvendelsesområder (f.eks. kvantitativ kartlegging av trekk) er det nødvendig å være i stand til å skille mellom heterozygote individer. I fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen forventes det at individer som arver to kopier av en enkel allele, vil ha to ganger mengden av amplifisert produkt i forhold til et individ som arver bare én kopi av samme allele. For å undersøke hvorvidt heterozygoter kan skjelnes fra homozygoter ved kvantifisering av resultatene av bestemmelsen, ble individer valgt som var kjent for å være homozygote for Bonus, heterozygote for både Bonus og PI 81762 eller homozygote for PI 81762 DNA-segmenter for den kromosomale region inneholdende bånd A-polymorfismen. Disse individer ble valgt på basis av genotypen av flankerende RFLP-markører (se eksempel 3 og tabell 3). De samme geler vist i eksempel 3, ble analysert ved densitometri for å bestemme mengden av amplifisert produkt svarende til bånd A (se tekst til figur 7). Felt A i figur 7 representerer en avsøkning av individ 30 (se eksempel 3) homozygot for PI 81762-allelen. Felt B i figur 7 representerer en avsøkning av individ 9 (se eksempel 3) heterozygot for Bonus og PI 81762-alleler. Felt C i figur 7 representerer en avsøkning av individ 57 (se eksempel 3) homozygot for Bonus-allelen. Topper svarende til bånd A-polymorfismen, er merket. Densitometrien viser at individer som er homozygote for PI 81762-alleler, inneholder to ganger mengden av DNA i bånd A-polymorfismen i forhold til individer som er heterozygote for PI 81762 og Bonus. Individer som er homozygote for Bonus-alleler, inneholder ikke noe DNA svarende til bånd A. Dette eksempel viser at amplifiseringsproduktene kan kvantifiseres for å identifisere heterozygote individer og åpenbare en kodominant polymorfisme. Dette vil ha anvendelighet i prosedyrer hvor det er nødvendig å skille mellom heterozygoter fra den tilsvarende homozygot.

Fotografier av gelseparasjonene vist i figur 2, ble digitalisert under anvendelse av et "Cohu Monochrome CCD" kamera (modell nr. 4815-5000, Cohu Inc., San Diego, CA) festet til en "Macintosh IIcx" datamaskin (Apple Computer Corp., Cupertino, CA). De analoge data ble omdannet til digitale inngangssignaler via et "QuickCapture"-kort (Data Translations Inc., Marlboro, MA). De individuelle spor ble avsøkt for kvantifisering med "Scan Analysis"-program (versjon 2.11, Biosoft Inc., Milltown, N.J.). X-akseverdier tilsvarer elektroforetisk distanse, og Y-akseverdier tilsvarer toppintensitet.

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for påvisning av polymorfisme på basis av nukleotidforskjeller i vilkårlige segmenter av nukleinsyrer,
karakterisert ved at den omfatter:

(a) separat utførelse av en forlengelsesreaksjon på et vilkårlig segment av hver av minst to nukleinsyrer fra forskjellige kilder, hvilken reaksjon omfatter:

(i) å bringe hver av nukleinsyrene i kontakt med minst én ikke-spesifikk, målrettet, vilkårlig oligonukleotidprimer på mer enn 7 nukleotider og forlengelse av primeren i en forlengelsesreaksjon hvorved det for minst én nukleinsyre syntetiseres et vilkårlig forlengelsesprodukt av minst én primer; og

(b) resultatene av de separat utførte, vilkårlige forlengelsesreaksjoner sammenlignes med hensyn til forskjeller.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at den etter trinn (i) og før trinn (b), omfatter ytterligere trinn for (ii) dissosiering av forlengelsesproduktet fra dets komplement; og (iii) amplifisering av det vilkårlige nukleinsyresegment ved å bringe det dissosierte forlengelsesprodukt i kontakt med en primer fra trinn (i) og forlengelse av primeren i en forlengelsesreaksjon hvorved et amplifiseringsforlengelsesprodukt syntetiseres under anvendelse av det dissosierte forlengelsesprodukt som et templat.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
karakterisert ved at trinnene (ii) og (iii) utføres minst to ganger.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1 (i) eller 2 (iii),
karakterisert ved at det anvendes en nukleinsyrepolymerase og nukleosidtrifosfatsubstrater eller deres analoger og blandinger derav.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at én primer anvendes.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at primeren er fra 9 til 10 nukleotider i lengde.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at minst én primer biotinyleres.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at nukleinsyrepolymerasen er en DNA-polymerase og nukleosidtrifosfatsubstratene er deoxyribonukleosidtrifosfatsubstrater.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at DNA-polymerasen er en termostabil polymerase.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at forskjellen i forlengelsesproduktet anvendes som en markør for å konstruere et genetisk kart.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at forskjellen i forlengelsesproduktet anvendes som en markør for å skille mellom eller identifisere individer.

FIG.1

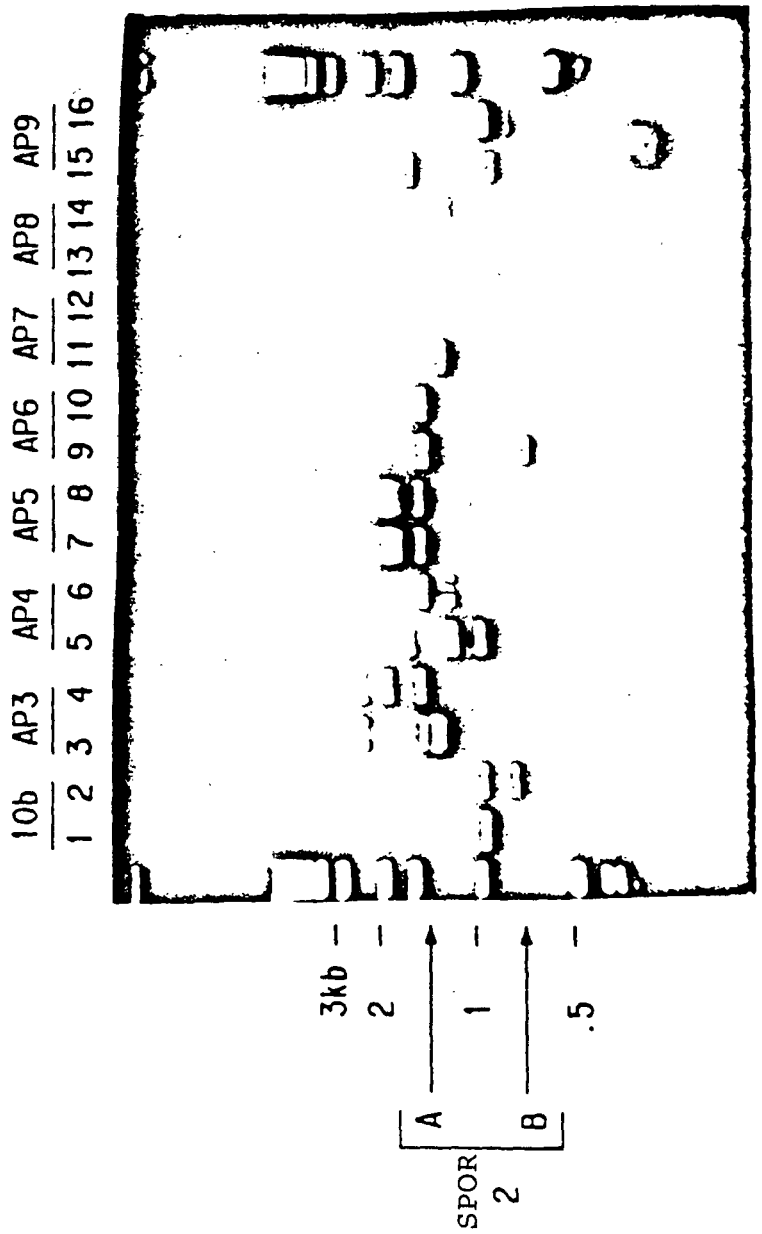
10b AP3 AP4 AP5 AP6 AP7 AP8 AP9
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
3kb
2
1
.5
A
B
SPOR
2

FIG.2A

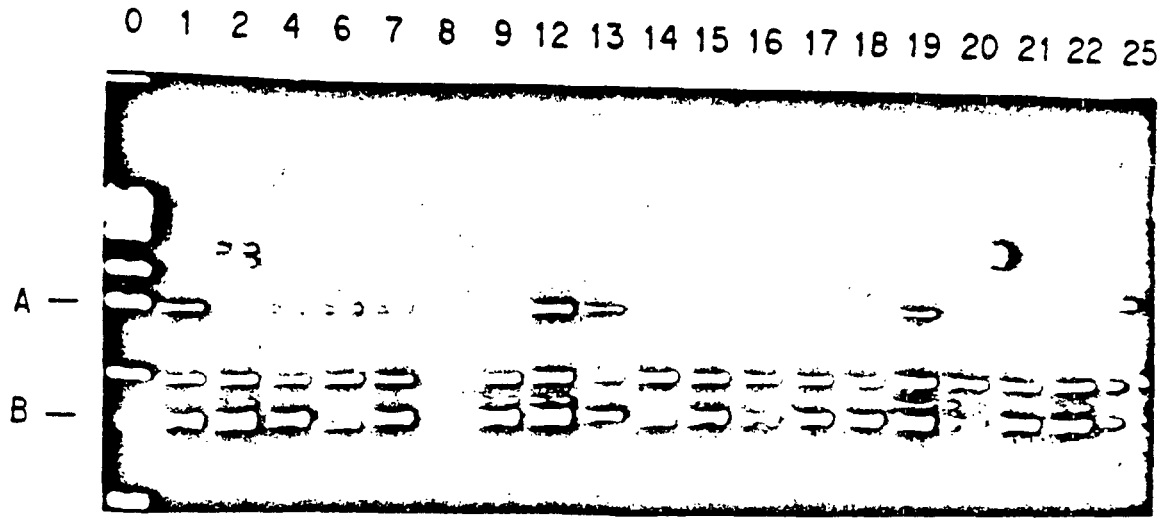
0 1 2 4 6 7 8 9 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 25
A
B

FIG.2B

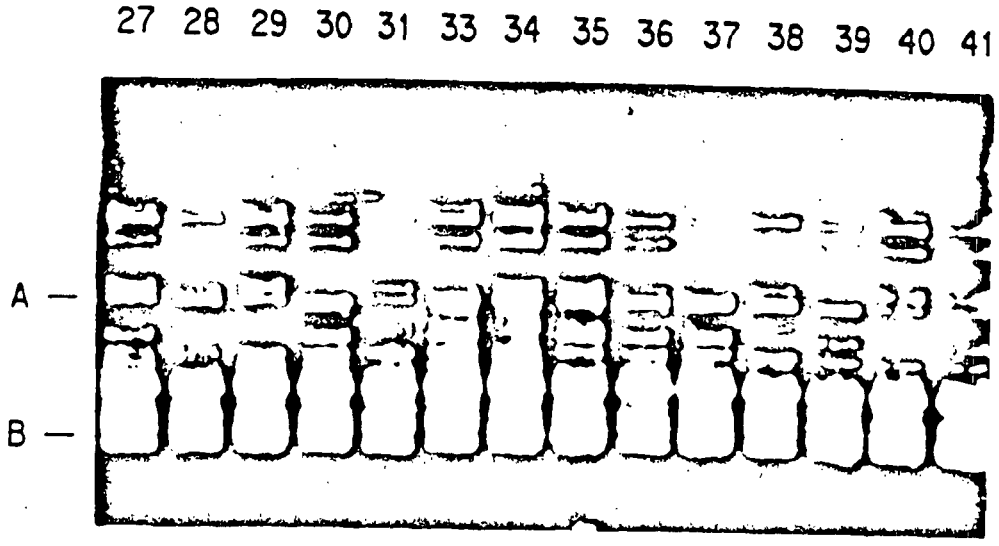
27 28 29 30 31 33 34 35 36 37 38 39 40 41
A
B

FIG.2C

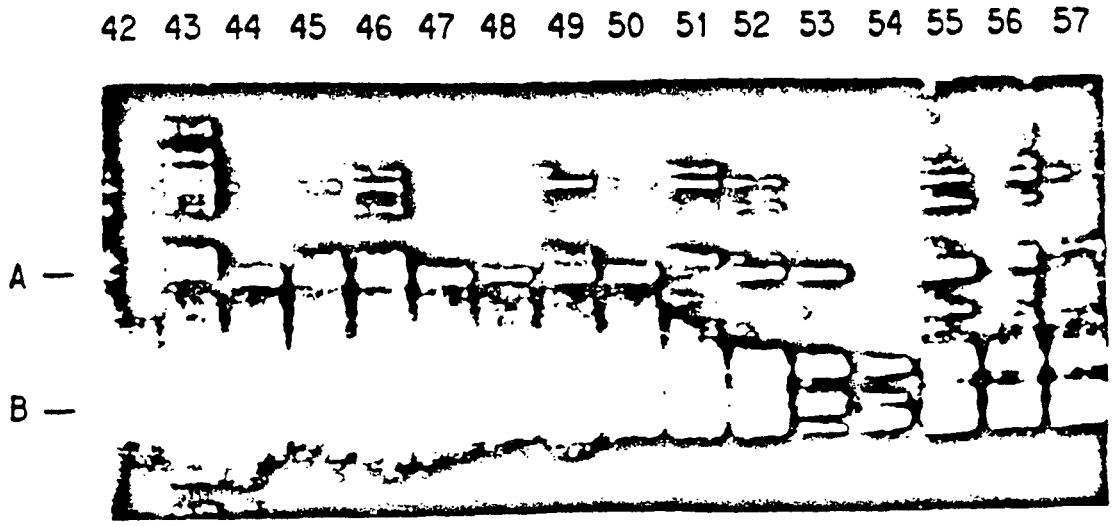
42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57
A
B

FIG.2D

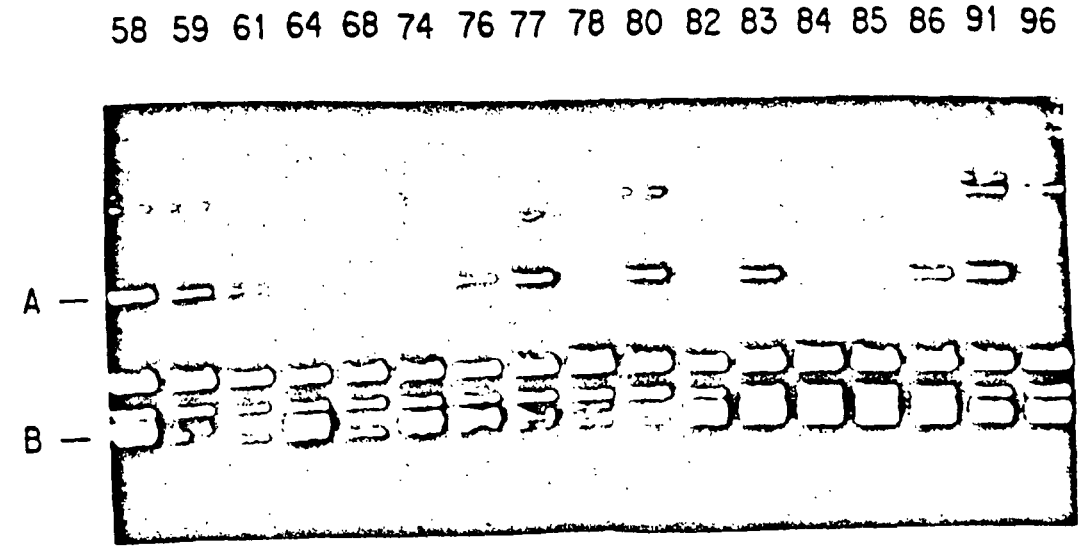
58 59 61 64 68 74 76 77 78 80 82 83 84 85 86 91 96
A
B

FIG.3A

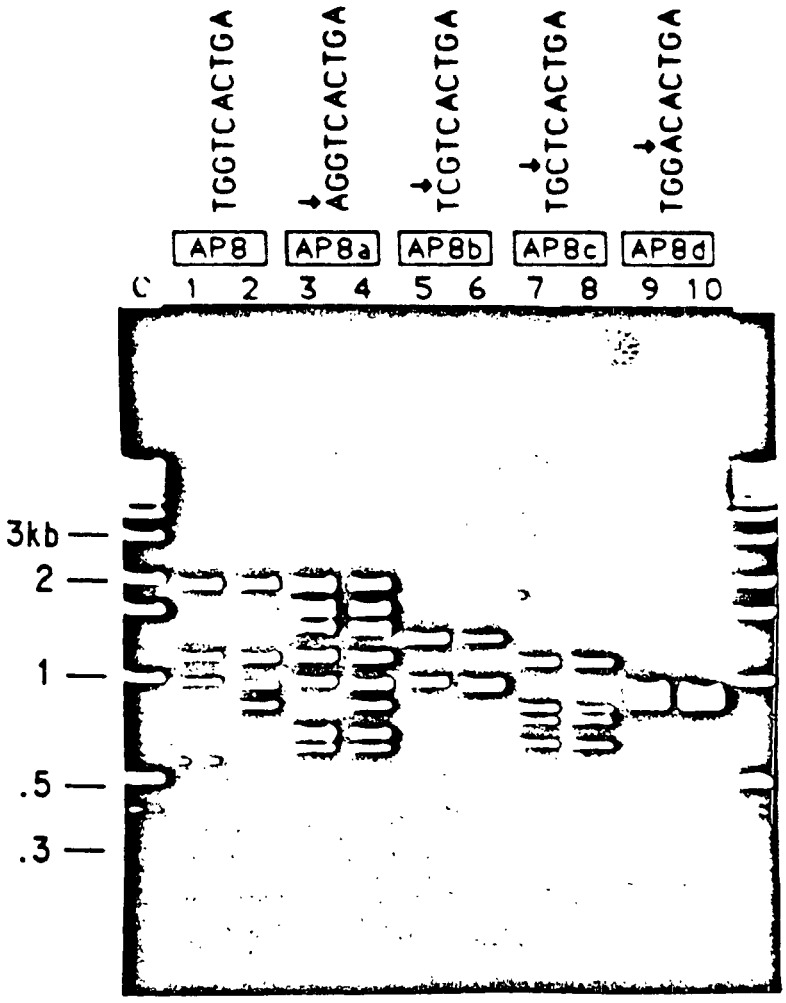
TGGTCACTGA
AGGTCACTGA
TCGTCACTGA
TGCTCACTGA
TGGACACTGA
AP8
AP8a
AP8b
AP8c
AP8d
C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
3kb
2
1
.5
.3

FIG.3B

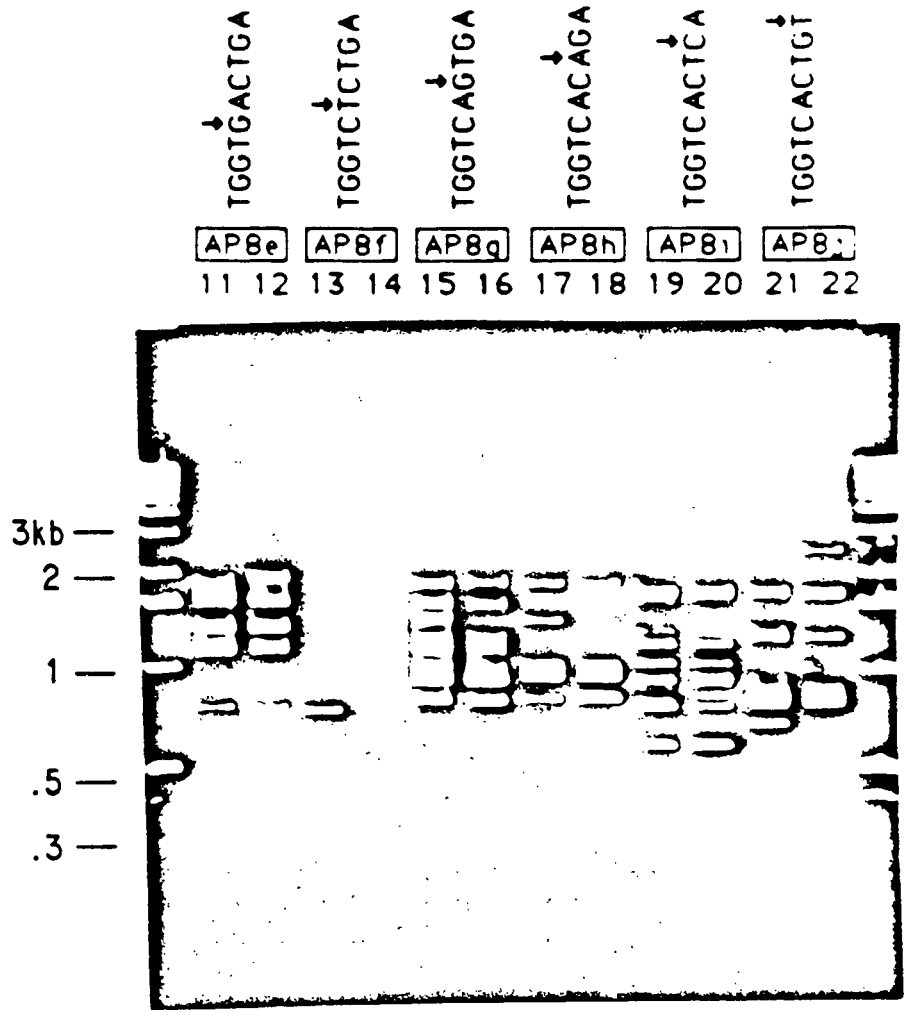
TGGTGACTGA
TGGTCTCTGA
TGGTCAGTGA
TGGTCACAGA
TGGTCACTCA
TGGTCACTGT
AP8e
AP8f
AP8g
AP8h
AP8i
AP8j
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
3kb
2
1
.5
.3

FIG.4

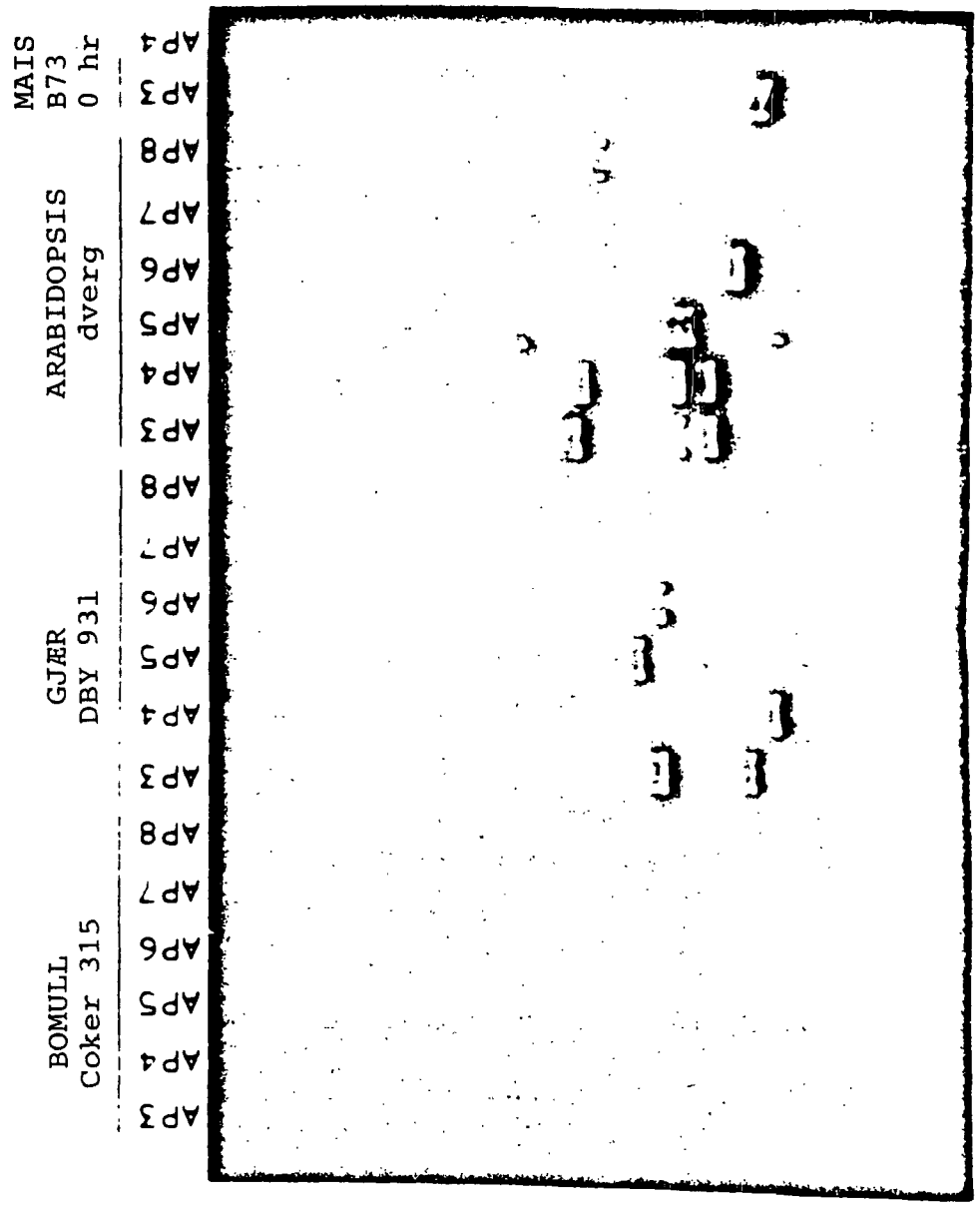
BOMULL
Coker 315
GJÆR
DBY 931
ARABIDOPSIS
dverg
MAIS
B73
0 hr
AP3
AP4
AP5
AP6
AP7
AP8

FIG.5

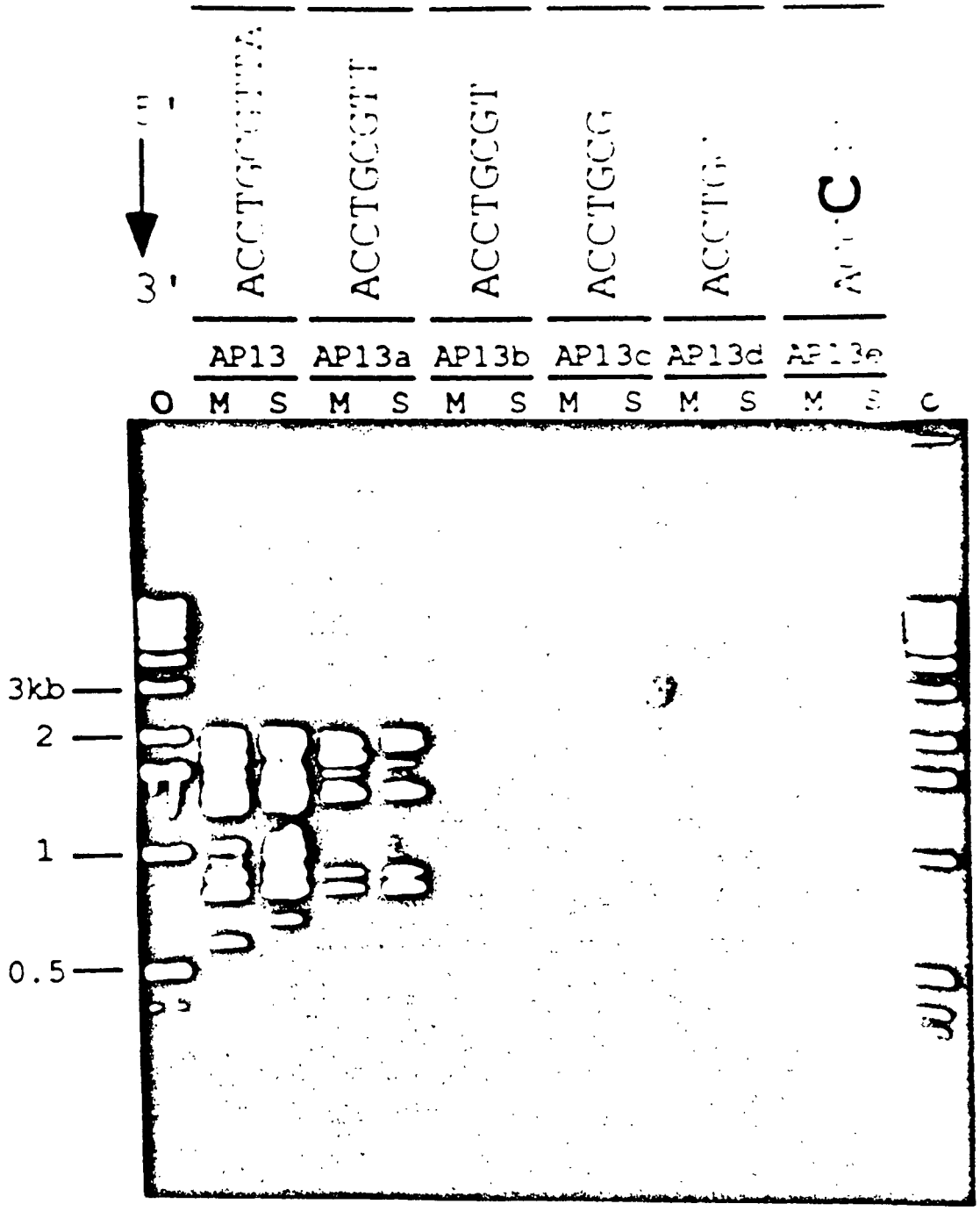

FIG.6

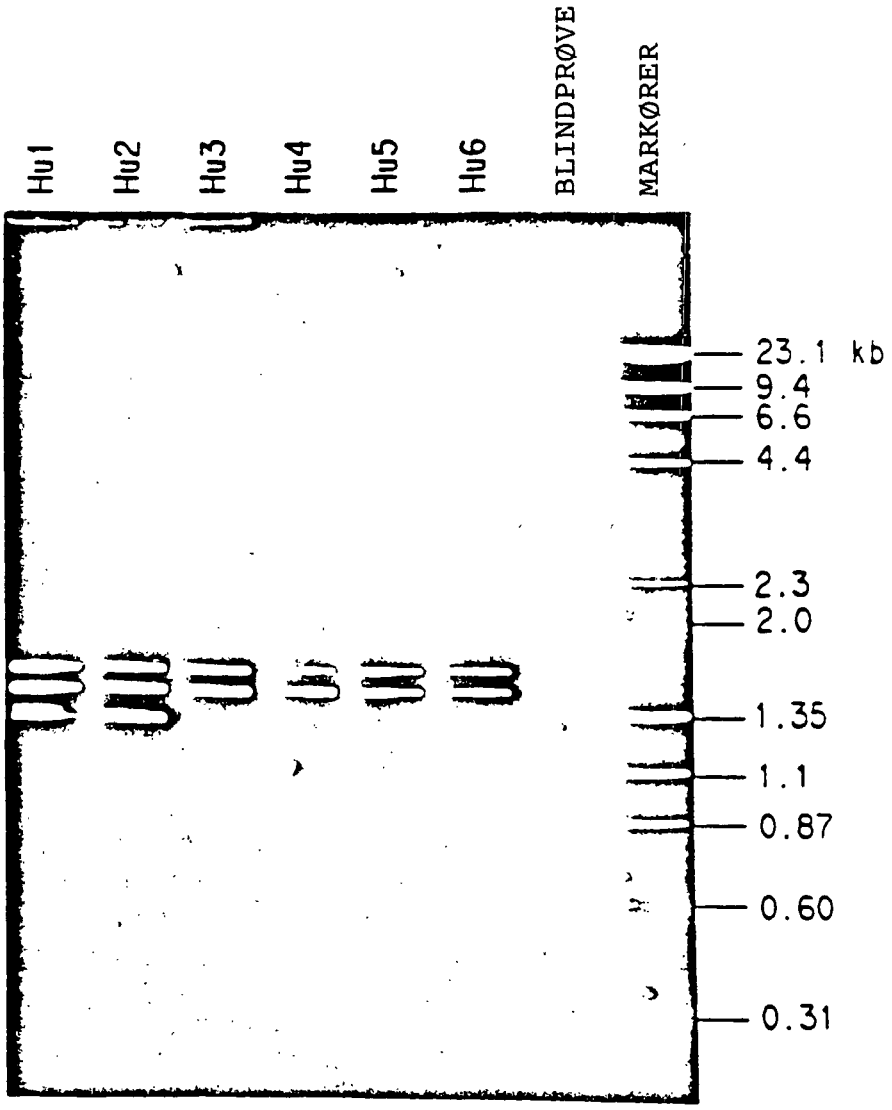
Hu1
Hu2
Hu3
Hu4
Hu5
Hu6
BLINDPRØVE
MARKØRER
23.1 kb
9.4
6.6
4.4
2.3
2.0
1.35
1.1
0.87
0.60
0.31

FIG. 7A

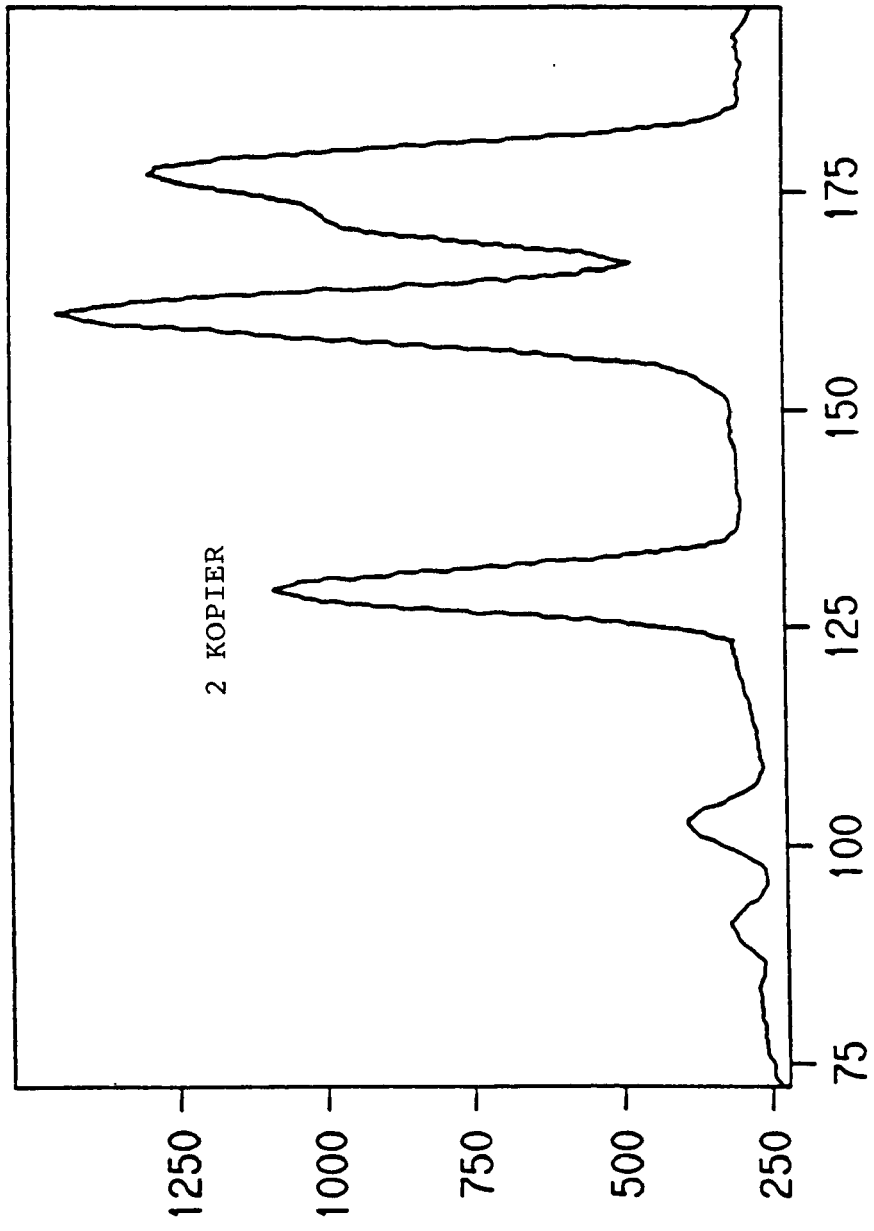

FIG.7B

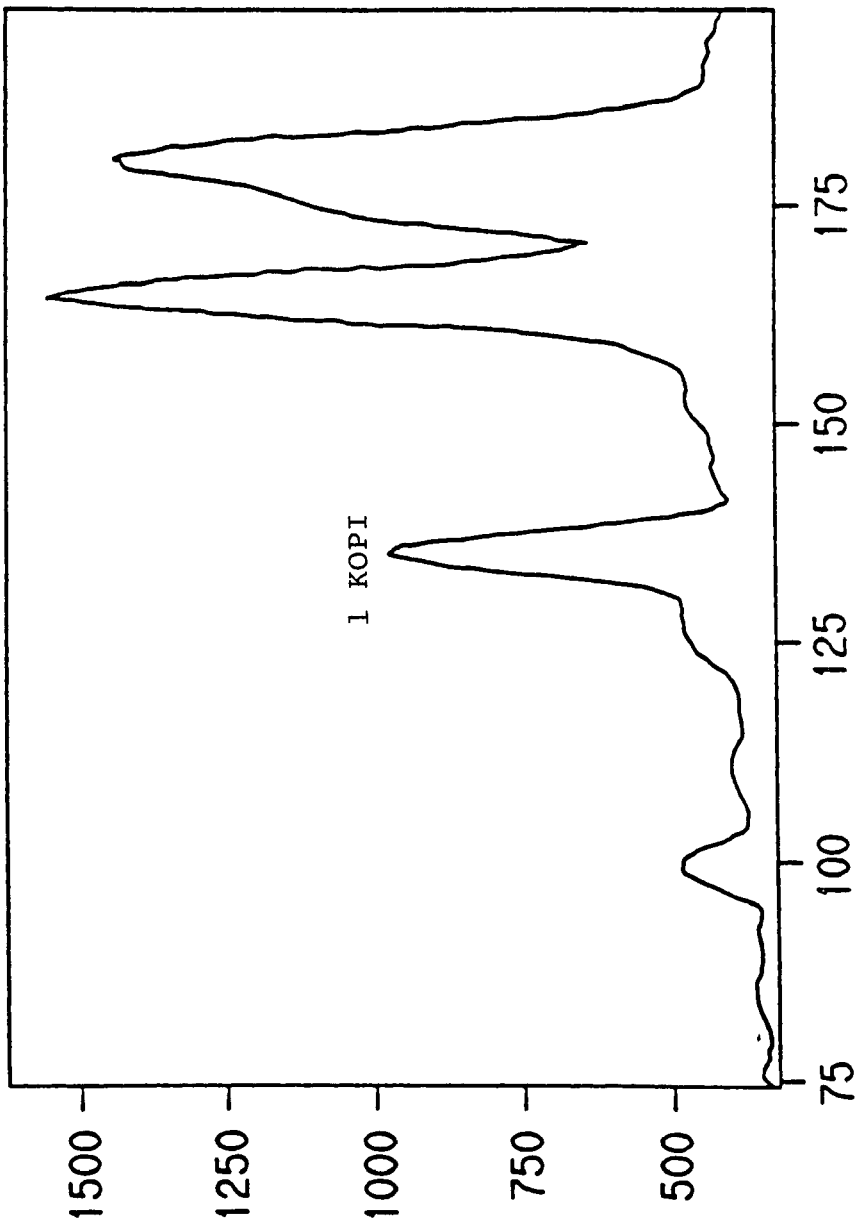

FIG.7C

