NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **302204** (13) B1

(51) Int Cl[6] G 01 N 33/571, C 12 Q 1/68, C 07 H 21/04

Patentstyret

(21) Søknadsnr	904240	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	28.09.90		
(24) Løpedag	28.09.90	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	02.04.91	(30) Prioritet	29.09.89, US, 414542
(45) Meddelt dato	02.02.98		

(73) Patenthaver F. Hoffmann-La Roche AG, 124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basel, CH
(72) Oppfinner Mathew Longiaru, West Orange, NJ, US
Sheryl Beth Silver, Fort Lee, NJ, US
Michael Anthony Sulzinski, Spring Valley, NY, US
(74) Fullmektig Oslo Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) Benevnelse **Diagnostisk sett for påvisning av nukleinsyresekvenser fra Chlamydia trachomatis**

(56) Anførte publikasjoner NO B 172909
A.F. Cook et al, Nucleic Acids Research, 1988, Vol 16, Nr. 9, side 4077-4095
R.K. Saiki et al, National Academy of Sciences, Proceedings, Aug. 1989, Vol 86, side 6230-6234
D.R. Pollard et al, Molecular and Cellular Probes, 1989, Vol 3, side 383-389

(57) Sammendrag

Et format for hybridiseringsinnfangning av PCR-amplifisert DNA på en fast bærersubstans beskrives. Etter å ha merket det amplifiserte mål-DNA med biotin under amplifiseringen, innfanges det merkede DNA spesifikt ved baseparhybridisering til en amplikonspesifikk oligonukleotid-innfangningsprobe som er bundet til en fast bærersubstans, og det merkede DNA påvises med et biotinavhengig kromogent påvisningsassay. I et spesielt format beskrives utvalgte primere og prober som muliggjør påvisning av Chlamydia trachomatis.

Foreliggende oppfinnelse angår diagnose av infeksjon med Chlamydia tranchomatis ved påvisning av tilstedeværelse av spesielle DNA-sekvenser som karakteriserer mikroorganismen som forårsaker sykdommen.

Oppfinnelsen angår fremskaffelsen av et diagnostisk sett for DNA-sekvenspåvisning, som omfatter fast polystyren støttemateriale og fortrinnsvis et sett av PCR-reagenser, innbefattende spesifikke primere og prober som angitt i krav 1.

US patenter nr. 4.683.195 og 4.683.202 omtaler fremgangsmåter for å amplifisere DNA-sekvenser ved en fremgangsmåte som nå er kjent i faget somn "polymerase chain reaction" (PCR). PCR er en fremgangsmåte hvor DNA spesifikt amplifiseres ved mangfoldig primer-forlengelses-synteser av komplementære kjeder (Saiki et al., Science, 230: 1350-1354 og 239: 487-491; 1985, 1988). PCR-produktet, amplifisert opp til 10^6 - 10^7 ganger, er et DNA-fragment av spesiell størrelse (amplikon) som kan påvises ved gelelektroforese eller på annen måte som beskrevet heri. Kort fortalt innebærer PCR fremstilling av korte oligonukleotidprimere som tilsvarer motsatte ender av en kjent "mål"-sekvens som man ønsker å amplifisere og deretter påvise. Ved denne feremgangsmåte ekstraheres DNA eller RNA fra celler, vev, kroppsvæsker og lignende. Nukleinsyren denatureres, og oligonukleotidprimerene tilsettes i molart overskudd, sammen med dNTPs (deoksyribonukleotid-trifosfater) og et DNA-polymeraseenzym, såsom fortrinnsvis varmestabil Taq-polymerase. Etter påfølgende varmedenaturering, kjøling for å oppnå sammenkobling til primere og primerforlengelse ved DNA-polymerase produseres to "lange produkter", som begynner med de respektive primere, komplementært til de to opprinnelige kjeder. Denne fremgangsmnåte gjentas, og etter en andre cyklus produseres to opprinnelige kjeder, to lange produkter fra cyklus 1, to nye "lange produkter" og

to "korte produkter". Lengden på disse korte produkter (amplikoner) er lik antallet nukleotider mellom og inklusive begge primere. Med ytterligere cykluser produseres ytterligere "lange produkter", og de øker lineært med hver cyklus. Dannelsen av ampliconer øker immidlertid med eksponensiell hastighet for hver cyklus, og ved hjelp av denne amplifisering er det mulig å påvise ytterst små mengder av DNA.

Ved hjelp av PCR-teknikk er det mulig å påvise spesifikke DNA-sekvenser som forefinnes i minimale mengder. Flere av disse teknikker innebærer bruk av forskjellige hybridiserte prober som er bundet til visse materialer.

Cook et al., Nucleic Acids Research, 16: 4077-4095 (1988), immobiliserte bakteriofag M13-mål-DNA i mikrotiterbrønner på Immulon¿-2-plater ved å inkubere mål-DNA i 1 M ammoniumacetat i 1,5-2 timer ved 37°C. Det immobiliserte mål-DNA ble påvist etter hybridisering til terminal-biotin-merkede eller internal-biotin-merkede oligonukleotidprober, etterfulgt av tilsetning av streptavidin-HRP-kompleks og hydrogen-peroksyd/o-fenylendiamin (OPD) for kolorimetrisk påvisning av hydbridisering.

Nagata et al., FEBS Lett., 183: 370-382 (1985) immobiliserte lambda-mål-DNA i mikrotiterbrønner i PBS inneholdende 00,1 M $MgCl_2$. Etter inkubering over natten ved værelsestemperatur, etterfulgt av fjerning av løsningen, ble platen bestrålt med ultraviolett lys. Hybridisering med en biotinylert (hakk-translatert) lambda DNA-probe ble etter- fulgt av kompleksdannelse med avidin-beta-galaktosidase. Fluorescensen ble målt etter tilsetning av substratet, 4-metylumbelliferyl-beta-D-galaktosid.

Hevey et al., U.S. patent No. 4.228.237 beskriver en fremgangsmåte som anvender biotin som reagerer til avidin (kovalent bundet til et enzym) for å påvise en ligand i

flytende medium. Foreliggende fremgangsmåte adskiller seg ved det at liganden er direkte merket med biotin, ikke mellomliggende biotinmerket anti-ligande. Videre beskriver forskjellige andre tidligere publikasjoner spesifikke hybridiseringsprober og diagnostisk anvendelse derav; f.eks. U.S. pat. nr. 4.358.535 (Falkow et al.) og europeisk patentsøknad nr. 82301804.9 (publikasjon nr. 63.879; Yale University). Sistnevnte beskriver bruk av biotinmerkede DNA-prober påvist ved enzymer som er bundet til avidin- eller biotinspesifikke antistoffer.

Ranki et al., US patent nr. 4.486.539, beskriver anvendelse av to ikke overlappende nukleinsyrereagenser (en bundet til et fast bærerstoff og den andre merket) for å påvise og identifisere mikrober ved DNA-hybridisering. Foreliggende oppfinnelse adskiller seg ved at målnukleinsyren i seg selv er merket og krever ikke anvendelse av en ytterligere merket nukleinsyreprobe for påvisning.

Stabinsky, US patent nr. 4.751.177, beskriver en DNA-påvisningsmetode hvor mål-DNAet hybridiseres til et mediator-polunukleotid og til et merket probe-polynukleotid. Mediator-polynukleotidet er i sin tur komplementært til et polynukleotid som er immoibilisert på et fast bærermateriale. Foreliggende oppfinnnelse adskiller seg ved at (a) mål-DNAet merkes under amplifikasjonen; ingen merket reportergruppe er nødvendig for påvisning, og (b) innfangningsproben er bundet direkte til et fast bærermateriale uten bruk av et mediator-polynukleotid.

Guanidin tiocyanat (GuSCN) er blitt brukt i celleekstraksjon og påfølgende nukleinsyrehybridisering. For eksempel frem- stilte Thomson and Gillespie, Anal. Biochem. 163: 281-191 (1987) isotopmerkede RNA-prober for å påvise mål-DNA eller -RNA. I "dot-blot"-format ble den ^{32}P-merkede probe hybridisert i 5 M GuSCN/0,1 M etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), dinatriumsalt, pH 8,0. Pellegrino et al.,

BioTechniques, 5: 452-459 (1987), beskrev en hybridisering i oppløsning for å påvise HIV-RNA i blodceller. Blodceller ble oppløst i 5 M GuSCN/0,1 M EDTA og hybridisert med en isotopmerket RNA-probe i samme løsning ved værelsestemperatur. TCA-felte hybrider ble oppsamlet på membraner, og radioaktiviteten ble bestemt ved scintillasjontelling. Gillespie, International Patent Application nr. PCT/US87/-01023 (International Publication nr. WO 87/06621) beskrev anvendelse av guanidin-tiocyanat for molekylærhybridisering ved hjelp av en merket probe for å påvise mål-DNA bundet til et fast bærerstoff. Patentet beskriver anvendelse av GuSCN for molekylær hybridisering over et konsentrasjonsområde på 3 M - 6,5 M ved værelsestemperatur. Formatet for slik hybridisering omfatter å binde målnukleinsyrer til nitro-cellulose eller en nylonmembran ("dot-blot" eller "Southern blot"), prehybridisering, hybridisering til en isotopmerket probe i GuSCN, vasking og påvisning ved autoradiografi.

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 viser fremstillng av en kjemisk forbindelsesarm som ble modifisert for å muliggjøre biotinylering av oligonukleotid-PCR-primere.

Figur 2 viser resultatene av et autoradiogram av PCR-produkter bundet til en Nytran¿-membran.

Figur 3 viser resultatene av oligonukleotidhybridiserings-(OH)-assay med PCR-produkter fra eksempel 6.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Uttrykkene "oligonukleotid" og "primer" som er brukt heri, har den betydning som er definert i det tidligere nevnte US patent nr. 4.683.202. Uttrykket "innfangningsprobe" som er brukt heri, kan defineres som et oligonukleotid som er ufullstendig eller i alt vesentlig komplementær til sekvensen av amplikonet innen grensene for primerene. I forelig-

gende foretrukne utførelsesform har innfangningsproben ikke endeelement, men kan utstyres med endeelement med deoksyribonukleotider eller ribonukleotider.

Ved utførelse av foreliggende oppfinnelse velges primerne og proben slik et de er "substansielt" komplementære til de forskjellig kjeder av målsekvensen som skal amplifiseres.

For en av de spesielle utførelsesformer som er beskrevet her, ble det valgt to sett av PCR-primere og innfangningsprober fra nukleotidsekvensen av den kryptiske plasmid av Chlamydia trachomatis Ll serovar (Hatt et al., Nucleic Acids Research, 16: 4053-4067, 1988. Dette muliggjorde den spesifikke amplifisering og påvisning av C. tracomatis.

Det amplifikerbare materiale som i tidligere nevnte US patent nr. 4.683.202, tilsettes deoksyribonukleotid-trifosfatene dATP, dCTP, dGTP og TTP til synteseblandingen i passende mengder, og den resulterende løsning oppvarmes til ca. 90-100°C i ca. 0,5 - 10 minutter for å adskille templatkjeder. Etter denne oppvarmingsperiode avkjøles løsningen raskt til den tempe- ratur som er foretrukket for sammenkobling av templatprimeren. Til denne løsning tilsettes et egnet middel for å indusere eller katalysere primerforlengelsesreaksjonen, og reaksjonen kan foregå under betingelser som er kjent i faget. Induksjonsmidlet kan være enhver forbindelse eller system som kan fungere for å oppnå syntese av primerforlengelsesproduktet, inklusive enzymer. Passende enzymer for dette formål omfatter f.eks. Escherichia coli (E. coli) DNA-polymerase I, Klenow-fragment av E. coli DNA-polymer-aser, reverstranskriptase, og andre enzymer, inklusive fortrinnsvis varmestabile enzymer (f.eks, Taq DNA-polymerase) som vil underlette innlemmelse av nukleotidene på egnet måte for å danne primer-forlengelsesproduktene som er komplementære til enhver nukleinsyrekjede.

Den nylig syntetiserte kjede og dens komplementære nukleinsyrekjede danner et dobbeltkjedet molekyl, hvis kjeder skilles ved enhver denaturert prosess som gir enkeltkjedede molekyler, fortrinnsvis varme.

Nye nukleinsyrer syntetiseres på de enkeltkjedede templatmolekyler. Ytterligere enzym, nukleotider og primere kan tilsettes hvis nødvendig for å få reaksjonen til å gå under de betingelser som er beskrevet ovenfor. Igjen vil syntesen begynne ved én ende av oligonukleotid-primerne og vil fortsette langs de enkelte kjeder av templatet for å fremkalle ytterligere komplmentære nukleinsyrer ved primerforlengelse.

Trinnene for kjedeseparering og forlengelsesproduktsyntese kan gjentas så ofte som nødvendig for å fremstille den ønskede mengde av den amplifiserte nukleinsyresekvens.

Fast støttemateriale av polystyren

Oppfangningsplaten eller bæreren som anvendes i foreliggende oppfinnelse, kan være et fast støttemateriale av polystyren. Forskjellige behandlinger av slikt støttemateriale for å oppnå slik forsterkning er kjent i faget (f.eks. bestråling med ^{60}Co).

Støttrematerialet for polystyren som anvendes i foreliggende oppfinnelse vil være en mikrotiter-plate med et stort antall brønner, og de mest foretrukne av slike mikrotiterplater er de som er kjent som "Dynatech Immulon¿ 2" (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA, produsert av Fisher Scientific).

Generelle hybridiseringsteknikker

I en foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse bindes en amplikon-spesifikk oligonukleotid-oppfangningsprobe passivt til brønner på en Immulon¿ 2 polystyrenmikrotiterplate med en konsentrasjon på 25 ng DNA/brønn, i

en løsning av 1M ammoniumacetat. Slike mikrotiterplater har en stort antall brønner og gir således både høy overflate og muliggjør et stort antall av samtidige assays, f.eks. 96).

Hybridiseringstrinnet ifølge foreliggende oppfinnelse, nærmere bestemt "innfangningshybridiseringen", oppnås fortrinnsvis i nærvær av 1 M guanidin-tiocyanat, 20 mM etylen-diamintetraeddiksyre (EDTA)-dinatriumsalt, pH 8,0. Konsentrasjonsområdet for å oppnå innfangningshybridisering på miktrotiterplate er fortrinnsvis 0,5 til 2,0 molar GuSCN og mest foretrukket 1,0 til 2,0 M.

Andre reagenser kan også anvendes for å oppnå innfangnings-hybridisering. For eksempel kan en løsning av ammonium-tiocyanat (0,5 til 5,0 M, mest foretrukket 5,0 M) anvendes i stedet for guanidin-tiocyanat.

Andre mulige erstatninger for guanidin-tiocyanat er et reagens som består av: 30% (v/v) deionisert formamid; 3 x SSPE [1 x SSPE= 0,18 M NaCl; 10 mM $NaPO_4$, pH 7,7; 1 mM EDTA]; 5% (w/v) dekstransulfat; 0,1% Triton X-100 (oktyl-fenoksypolyetoksyetanol; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Formatet for slik hybridisering omfatter følgende trinn:

1. Fremstilling av innfangningsproben
2. Fremstilling av mikrotiterinnfangningsplater
3. Fortynning og denaturering av amplifisert, merket DNA
4. Innfangningshybridisering
5. Vasking
6. Blokkering
7. Tilsetning av avidin:pepperrot-peroksidase
8. Vasking
9. Tilsetning av substrat og kromogen; farvefremkalling
10. Plateavlesning (kvantifisering)

Disse trinn skal nå beskrives i detalj.

1. Fremstilling av innfangningsprobe

Innfangningsprobene heri velges slik at de er "substansielt" komplementære til sekvenser at amplikonet innenfor grensene for primerne. Derfor må innfangningsprobene være tilstrekkelig kompleentære for spesifikt å hybridisere til amplikonet under innfangningshybridiserings-betingelsene. I den utførelsesform som for tiden er foretrukket, inneholder innfangningsproben vanligvis 20-200 nukleotider.

Videre kan mer enn en innfangningsprobe anvendes, og ytterligere innfangningsprober kan anvendes for å innfange den samme eller motstatte kjede av det merkede amplikon.

Foreliggende innfangningprober og PCR-primere er blitt syntetisert i en MilliGen 7500 DNA Synthesizer (MilliGen/-Biosearch, Inc. Burlington, MA) ved hjelp av normal beta-cyanoetylfosforamaditt-kjemi, skjønt andre fremgangsmåter som er kjent av fagmannen er mulige. Før anvendelse ble oppfangningsprobene og PCR-primerne delvis renset, enten ved elektroforese gjennom 15% (w/v) polyakrylamidgeler eller ved rotasjonskolonne (se eksempel 3). De sluttelige delvis rensede innfangningsprober og primere ble suspendert i vann, konsentrasjonen ble bestemt spektrofotometrisk, og løsningen ble lagret ved 4°C inntil bruk.

2. Fremtilling av oppsamligsplaten

Oleonukleotidoppsamlingsproben festes fortrinnsvis til brønnen på en Dynatech Immulon¿ 2 - mikrotiterplate (Dynatech Laboratories, Inc., Chatilly, VA, produsert av Fusher Scientific). Immulon¿ 2 - platen er en anordning med 96 miniatyr-polystyrenprøverør (brønner) i en eneste plastplate, fremstilt for generell bruk i fastfase-immunoassay fremgangsmåter for mikrovolum. I den foretrukne utførelse-

sform ifølge foreliggende oppfinnelse anvendes plater med flate brønnbunner (400 µl volumkapasitet), men det antas at U-formede brønnbunner også kan anvendes (300 µl volumkapasitet).

Som en annen foretrukken utførelsesform kan proben også festes til Immulon¿ 2 Removawell¿ - strimler (/Dynatech), som er fjernbare strimler på tolv Immunolon¿ polystyrenprøverør (brønner) som er anpasset til Removawell¿-strimmelholderne (Dynatech) i et mikrotiterplateformat.

Oligonukleotid-innfangningsproben fortynnes slik at den gir 25 ng pr. mikrotiterbrønn i 50 µl M ammoniumacetat (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). "Blinde brønner" fremstilles også ved å tilsette 1 M ammoniumacetat (Uten oligonukleotid-innfangningsprobe) til visse brønner (til hvilke merkede PCR-produkter vil bli tilsatt senere for narrehybridisering). Disse blinde brønner er indikasjon på ikkespesifikk binding av biotinylert DNA til brønner i mikrotiterplater og anvendes for å kalibrere avlesningsinstrumentet for platene
(spektrofotometer) (se nedenunder, trinn 10).

Platen forsegles med mylarplateforsegler (Dynatech) og inkuberes ved 37°C over natten for passiv fiksering av oligonukleotidinnfangningsproben til polystyrenoverflaten. Hvis platene ikke anvendes med en gang, lagres de ved 4°C inntil bruk. Plater som var lagret på denne måte i opptil 6 uker, viste ingen signifikant forskjell når det gjaldt deres evne til å innfange DNA.

Like før hybridiseringen vaskes brønnene i platene to ganger med 200 µl 2 x SSC [1 x SSC= 0,15 M NaCl; 15 mM natriumcitratbuffer, pH 7,0] og en gang med 200 µl 2 x SSC, 0,1%
(v/v) Triton X-100. All platevask som er beskrevet her, gjøres med en pipetteanordning med mange kanaler (f.eks.

Titertek¿), eller kan gjøres med en egnet automatisk mikrotiterplate-vasker.

3. Fortynning og denaturerintg av amplifisert, merket DNA

De biotinylerte PCR-produkter fortynnes (i området fra 1:10 til 1:100 eller mer) i 1 M GuSCN (Ultra-pure grade; Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN), 20 mM EDTA (Sigma), pH 8,0 (fremstilt fra en 5 x sterkere stamløsning), oppvarmes ved 100°C i 5 min og avkjøles raskt i et isvannbad. (Oppvarmingstrinnet medfører varmedenaturering av PCR-produktene, og den raske avkjøling hemmer sammenkobling på nytt av amplikonkjedene, og begunstiger hybridisereing til oligonukleotid-innfangningsproben).
Alikvoter på 100 µl overføres til hver brønn, inklusive brønnene som er bestemt som blindprøver (ingen innfangningsprobe) som beskrevet ovenfor (trinn 2).

4. Innfangningshybridisering

Spesifikk innfangning av amplifisert, merket DNA ved en oligonukkleotidinnfangningsprobe oppnås ved inkubering ved værelsestemperatur i 1-3 timer. I løpet av denne tid innfanges PCR-amplikoner spesifikt av oligonukleotidinnfangningsproben, basert på sekvenskomplementaritet mellom innfangningsproben og merket amplikon.

5. Platevasking

Etter hybridiseringen fjernes innholdet i alle mikrotiterbrønner, og brønnene vaskes to ganger med 200 µl 2 x SSC. 0,1% (v/v) Triton X-100; og fire ganger med 200 µl 0,2 x SSC, 0,1% (v/v) Triton X-100, som tidligere er blitt oppvarmet til 37°C. Disse vaskinger utføres for å fjerne ubundne biotinylerte produkter fra mikrotiterbrønnene.

6. Blokkering

Etter platevaskingen "blokkeres" brønnene i platen i minst 15-30 minutter med 200 µl av en løsning av PBS, (PBS= 0,13 M NaCL, 7 mM Na_2HPO_4, 3 mM NaH_2PO_4, pH 7,0), 2% (w/v) serumalbumin fra okse (BSA) (Sigma), 0,1% (v/v) Triton X-100. Dette "blokkerings"-trinn er nødvendig for å minimalisere ikke-spesifikk binding av avidin:HRP til mikrotiterbrønnene.

7. Avidin:pepperrotperoksidase

Avidin:pepperrotperoksidase (HRP)-kompleks (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) fortynnes 1:2000 i PBS, 0,1% (v/v) Triton X-100 til en sluttkonsentrasjon på 2,5 µg avidin:HRP/ml. 50 mikroliter fortynnet avidin:HRP tilsettes til hver brønn og inkuberes i 30 minutter ved værelsestemperatur. I løpet av dette trinn bindes avidin:HRP-kompolekset tett til innfangede biotinylerte porodukter i brønnen. Mens avidin:HRP anvendes i foreliggende oppfinnelse, kan et kompleks av streptavidin:HRP anvendes i stedet. Likeledes kan andre forbindelser i kompleksform med avidin (eller streptavidin) anvendes, inklusive: alkalisk fosfatase, beta-galaktosidase, luciferase, fluorscein, Texas Red eller et annet middel som er i stand til å fremkalle et kolorimetrisk, fluoriserende eller luminiserende signal.

8. Vasking

Brønnene i mikrotiterplaten vaskes deretter fire ganger med 200 µl PBS, 0,1% Triton X-100, og en gang med 100µl PBS, 1 mM EDTA og inkuberes med den siste vaskeløsning ved værelsestemperatur i 1-10 minutter. Disse vaskinger utføres for å fjerne ubundet avidin:HRP fra mikrotiterbrønnene før tilsetning av kromogen.

9. Farvefremkalling

Farvefremkalling, i den foretrukne utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse, utføres med ett av de to kromogene systemer: (a) hydrogenperoksyd/OPD og (b) hydrogenperoksyd/TMB.

(a) Hydrogenperoksyd/OPD. Etter at vaskebufferen (beskrevet i trinn 8) er blitt fjernet, tilsettes 150 µl OPD-reagens [1,6 mg/ml o-fenylen-diamin-dinatriumsalt (Sigma), 0,0125% (v/v) hydrogenperoksyd (Fisher Scientific) i 0,15 M natriumfosfat/citrat-buffer, pH 6,0], og farvefremkallingen får fortsette i mørke i 1-30 minutter. Farvefremkallingen stoppes ved tilsetning av 50 µl 4 N H_2SO_4.

(b) Hydrogen-peroksyd/TMB. Etter at siste vaskebuffer (beskrevet i trinn 8) er blitt fjernet, tilsettes 100 µl TMB farvereagens til hver brønn. [TMB-farvereagens består av friskt blandende like volumer TMB-peroksydasesubstrat (3,3', 5,5'-tetrametylbenzidin i en konsentrasjon på 0,4 g/l i en organisk base; i handelen fra Kirkegaard and Perry, Inc., Gaithersburg, MD) og hydrogenperoksydløsning [0,02% (v/v) hydrogenperoksyd i sitronacetatbuffer, i handelen fra Kirkegaard og Perry, Inc.]. Reaksjonen får pågå ved værelsestemperatur i mørke i 1-30 minutter, hvoretter farvefremkallingen stoppes ved tilsetning av 100 µl 1M fosforsyre (H_3PO_4).

TMB-substratet fremkaller en felning med blå farve. Ved tilsetning av fosforsyre fremkommer en farveforandring til gult, med en optisk tetthet som måles ved 450 nm (see nedenfor, trinn 10). I tillegg til HRP-substrater, OPD og TMB, omfatter andre løselige substrater: 2,2-azino-di (3-etylbenztiazolin-sulfonsyre)(ABTS) og 5-aminosalisylsyre (ASA). Uløseige substrater omfatter 3-amino-9-etylkarbazol (AEC) og 3,3-diaminobenziden (DAB).

10. Plateavlesning (kvantifisering)

Etter at farvefremkallingen er stoppet, bestemmes den optiske tetthet (OD) i prøvene i hver brønn ved avlesingen i en automatisk mikrotiterplate-avleser som er i stand til spektrofotometrisk bestemmelse (f.eks. InterMed Immuno-reader¿ NJ-2000) ved bølgelengder som er spesifikke for den anvendte kromogen (se nedenfor).

Den optiske tetthet i de blinde brønner [biotynilerte PCR-produkter tilsatt til brønnen uten innfangningsprobe, som beskrevet i trinn 2] bestemmes også. Dette signal (vanligvis meget lavt) er en indikasjon på falsk "ikke-spesifikk" binding av biotynilerte produkter til prøve-brønnene, og ikke signaler som er resultat av ekte innfangning av biotynilerte amplikoner ved hybridisering med en innfangningsprobe. Derfor subtraheres den optiske tetthet av de blinde brønner fra den optiske tetthet av prøvebrønnene for å gi en nøyaktig kvantifisering av ekte innfangningshybridisering.

Den egnede bølgelengdeinnstilling for spektrofotometeret (plateavleser) er avhengig av det spesifikke kromogen som anvendes for den kolorimetriske reaksjon. Hvis man anvender hydrogenperoksyd/OPD, er den korrekte bølgelengdeinnstilling således 490 nm; hvis man anvender hydrogenperoksyd/TMB er den korrekte bølgelengdeinnstilling 450 nm.

De følgende eksempler beskrives for å illustrere oppfinnelsen.

Eksempel 1

Syntese av biotin-11-dUTP

Biotin-11-dUTP ble kjemisk syntetisert ved fremgangsmåten beskrevet av Langer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78:6633-6637 (1981) og ble suspendert i en konsentrasjon av 0,4 mM i 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,4 mM EDTA. Forholdet

biotin-11-dUTP:TTP ble optimalisert, og det høyeste signal ble oppnådd med et forhold på 4:1 (biotin-11-dUTP:TTP).

Eksempel 2

Fremstilling av 5'-biotinylerte primere

Alle oligonukleotider som ble anvendt som PCR-primere ble syntetisert i en MilliGen 7500 automatisert DNA-syntetiserer ved normal beta-cyanoetyl-fosforamaditt-kjemi, med fremgangsmåter som er kjent i faget.

Oligonukleotidene som ble fremstilt for anvendelse som biotinylerte primere, ble modifisert som vist i fig. 1. De syntetiske oligonukleotider på fast støttemateriale ble derivatisert ved 5'-enden ved omsetning med det beskyttede heksylaminofosforamaditt [struktur 1], etterfulgt av oksydasjon og deblokkering i henhold til standard fremgangsmåter (McBride and Caruthers, Tetrahedron Letters, 24: 245-248, 1983) for å gi 5'-amino-merkede oligomerer [struktur 2]. Reaksjonen avv [2] med N-hydroksysuccinimidylestere av biotinderivater ga 5'-biotinylerte oligonukleotider [struktur 3] med godt utbytte, som ble renset ved polyakrylamidgelelektroforese. (Se nedenfor, eksempel 3).

Eksempel 3

Rensing av oligonukleotider

Oligonuklotidene som ble anvendt som PCR-primere eller innfangingsprober ble renset på en av to måter: (a) polyakrylamid-gelelektroforese eller (b) rotasjonskolonne.

(a) Polyakrylamid-gelelektroforese. Alikvoter på 100-250 µg av hvert oligonukleotid ble tørket i vakuum, suspendert på nytt i et lite volum gelladningsbuffer [TBE (89 mM Tris-borat, 89 mM borsyre, 2 mM EDTA); 90% (v/v) deionisert formamid; 0,02% (/w/v) bromfenol-blått], oppvarmet ved 100°C i 5 min og raskt avkjølt i et isvannbad. Prøvene ble

overført til et denaturerende polyakrylamidgel [25% (w/v) akrylamid (akrylamid:bis-akrylamid, 29:1) (IBI, New Haven, CT), 7 M urea (IBI) i TBE] og elektroforesert ved 650 Volt i fire timer. DNA'et ble gjort synlig ved UV-belysning over en tynnsjiktskromatografi-plate (Eastman Kodak #13254 cellulose), fotografert og gelbåndet med oligonukleotidet i full lengde ble fjernet. Geldelen ble knust, og DNA'et ble eluert i vann over natten ved 37°C. DNA'et ble ytterligere renset ved å la det passere over en C_{18} Sep-Pak¿-patron (Waters Associates, Milford, MA), og eluert i 40% (v/v) acetonitril (Fisher). Etter inndampning til tørrhet i vakuum ble DNA'et suspendert i vann, og dets konsentrasjon ble bestemt spektrofotometrisk. Stamkonsentrasjoner ble innstilt med vann og lagret ved 4°C inntil bruk.

(b) Rotasjonskolonne. Noen oligonukleotid-innfangningsprober og primere ble delvis renset med Bio-Spin™ 6-kolonne (Bio-Rad, Inc., Richmond, CA) i en svingende skovlrotor ved lav sentrifugalkraft, ifølge produsentens instruksjoner for rotasjonskolonnen. Etter delvis rensing ble konsentrasjonen av oligonukleotidene bestemt spektrofotometrisk, og stam- løsninger ble fremstilt med vann og lagret ved 4°C inntil bruk.

Eksempel 4
PCR-betingelser

De fleste primerpar ble undersøkt empirisk for å bestemme deres optimale temperaturbetingelser for PCR-amplifisering, spesielt med hensyn til tilkoblingstemperaturen.

Med aktuelle primerpar for Chlamydia trachomatis besto en hundre µl PCR-reaksjonsblanding av: 1 x reaksjonsbuffer (RB) [10 x RB= 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 25 mM $MgCl_2$]; 200 µM av hver av dATP, dCTP, dGTP og TTP; 50 pmol hver av SK43 og SK44 og 2 enheter rekombinant Taq-DNA-polymerase (RecombiTaq¿, Cetus Perkin Elmer, Norwalk, CT).

For eksperimenter hvor biotin-11-dUTP var innlemmet, var reaksjonsblandingene som ovenfor unntatt at 200 μM TTP var erstattet med 160 M biotin-11-dUTP, 40 μM TTP.

For det aktuelle primersett begynte PCR-temperatursystemet med en innledende utstrakt denaturering ved 94°C i 5 minutter, etterfulgt av et tilkoblingstrinn ved 50°C i 25 sekunder, og et forlengelsestrinn ved 72°C i 1 minutt. For de neste 28 cykler besto temperatursystemet av: Denaturering ved 94°C i 25 sek, tilkobling ved 50°C i 25 sek og forlengelse ved 72°C i 1 min. Den avsluttende (trettiende) cyklus var: Denaturering ved 94°C i 25 sek, tilkobling ved 50°C i 25 sek og en øket forlengelse ved 72°C i 10 min. Etter PCR-amplifisering ble 90 μl av reaksjonsblandingen fjernet fra under mineraloljen og lagret ved 4°C til analysen av PCR-produktene fant sted.

Eksempel 5

Fremstilling av positive og negative kontroll-plasmid-templater

Et plasmid som inneholdt hele den aktuelle gensekvens fra Chlamydia tranchomatis ble brukt som positivt kontrolltemplat. Konsentrasjonen av plasmid-DNA ble bestemt spektrofotometrisk, og fortynninger ble gjort i vann for å få kjente kopimengder av mål-DNA for PCR-reaksjoner. På denne måte ble det fremstilt et positivt kontrolltemplat.

Eksempel 6

Påvisning av Chlamydia trachomatis-sekvenser

To sett av primere og innfangningsprober ble syntetisert for å spesifikt påvise Chlamydia trachomatis. Oligonukleotidsekvensene ble valgt fra det kryptiske plasmid av C. trachomatis L1 seroval (Hatt et al., Nucleic Acids Research, 16:4053-4067, 1988).

Primersett A genererte et 208 bp spesifikt amplicon ved hjelp av følgende primere:

CP-24 (25-mer, + polaritet, base 195-219)

5' GGG ATT CCT GTA ACA ACA AGT CAG G 3'

dvs. primeren er ethvert oligonukleotid som vil bindes til eller forårsake forlenging ved følgende sekvens:

5' C CTG ACT TGT TGT TAC AGG AAT CCC 3'

CP-27 (26-mer, - polaritet, base 377-402)

5' CCT CTT CCC CAG AAC AAT AAG AAC AC 3'

dvs. primeren er ethvert oligonukleotid som vil bindes til eller forårsake forlengning ved følgende sekvens:

5' GT GTT CTT ATT GTT CTG GGG AAG AGG 3'

Primersett A 208 bp-spesifikt amplikon ble påvist med innfangningsprobe CP-35:

CP-35 (26-mer, - polaritet, base 235-260)

5' CAT AGC ACT ATA GAA CTC TGC AAG CC 3'

dvs. proben er ethvert oligonukleotid som vil bindes til følgende sekvens:

5' GG CTT GCA GAG TTC TAT AGT GCT ATG 3'

Chlamydiaprimersett B genererte et 173 bp-spesifikt amplikon ved hjelp av følgende primere:

CP-37 (23-mer, + polaritet, base 678-700)

5' GTC CTG CTT GAG AGA ACG TGC GG 3'

dvs. primeren er ethvert oligonukleotid som vil bindes til eller forårsake forlengning ved følgende sekvens:

5' CC GCA CGT TCT CTC AAG CAG GAC 3'

CP-38 (24-mer, - polaritet, base 827-850)

5' CTC CCA GCT TAA GAA CCG TCA GAC 3'

dvs. primeren er ethvert oligonukleotid som vil bindes til eller forårsake forlengning ved følgende sekvens:

5' GTC TGA CGG TTC TTA AGC TGG GAG 3'

Primersett B 173 bp-amplikon ble påvist med innfangnings-probe CP-39:

CP-39 (23-mer, - polaritet, 726-748)

5' TGT CTT CGT AAC TCG CTC CGG AA 3'

dvs. primeren er ethvert oligonukleotid som vil bindes til følgende sekvens:

5' TT CCG GAG CGA GTT ACG AAG ACA 3'

Primersett B ble anvendt for å amplifisere målplasmid pCHL-1. Ved hjelp av 5'-biotinylerte primere ble målsubstansen amplifisert med 30 cykluser i PCR, og de biotinylerte produkter ble undersøkt ved innfangsningshybridisering (tabell 2). Etter ti minutters fremkalling (TMB/H_2O_2) var så få som 20 utgangskopier av pCHL-1 påvisbare (1:25 fortynning, OD_{450} = 0.140), med ubetydelig bakgrunns-signal (OD_{450} = 0.009 for 1:25 fortynning).

Tabell 2

	OD_{490} 1:25	OD_{490} 1:100
10^4 kopier pCHL-1	>1.500	>1.500
10^4 kopier pCHL-1	>1.500	>1.286
10^2 kopier pCHL-1	0.686	0.170
50 kopier pCHL-1	0.215	0.050
20 kopier pCHL-1	0.140	0.035
Negative kontroller		
Intet templat	0.009	0.000

Eksempel 7

Påvisning av McCoy-celler og kliniske isolater infisert med Chlamydia trachomatis

McCoy-celler, enten uinokulert eller infisert med C. tracho-matis, ble lysert i 2SP (20 mM natriumfosfatbuffer, pH 7,2, 2M sukrose) som inneholder 100 µg/ml Proteinase K, 1% Tween-20 og ble inkubert ved 55°C i 1 time, etterfukgt av inkubering ved 95°C i 10 min. Primersett A (eksempel 12) ble anvendt i en PCR-amplifisering på 30 cykluser, og produktene ble undersøkt ved plateassay som beskrevet i eksempel 8. Etter ti minutters farvefremkalling ga både 10 og 100 infiserte McCoy-celler, når de var innblandet i 10^5 uinfi- serte McCoy-celler, OD_{450}-verdier >2.000 (for både 1/25- og 1/100-fortynninger av produktet i GuSCN). Ekstra-herte og amplifiserte uinfiserte celler alene (10^5-celler) ga OD_{450}-verdier på <0,050.

Kliniske prøver som tidligere var klassifisert etter sin grad av cytopatiske effekter (CPE) [i området fra "negativ" (ingen CPE) til 4+ (mest fremtredende CPE)], ble likeledes ekstrahert og amplifisert i 30 cykluser i CPC, idet man anvendte primersett A. Resultatene av dette assay er vist i tabell 3.

Tabell 3

Bedømmelse av kulturen	Volum av lysert prøve	OD_{450} 1/25-for-tynning i GuSCN	OD_{450} 1/100-for-tynning i GuSCN
4+	90 µl	> 2.000	1.686
1+	90 µl	0.145	0.086
Negativ	90 µl	< 0.050	< 0.050
4+	10 µl	> 2.000	1.417
1+	10 µl	< 0.050	< 0.050
Negativ	10 µl	< 0.050	< 0.050

Sammenfattet er nye måter å merke og påvise amplifiserings-produkter fra Chlamydia trachomatis ved PCR beskrevet heri. Disse merkings- og innfangningsmåter tilveiebringer flere fordeler over konvensjonelle påvisningsmetoder:

1. Biotinyleringen og innfangningen av PCR-produkter på mikrotiterplater er et raskere assay. Plateassayet ifølge foreliggende oppfinnelse kan utføres i løpet av 2 timer, sammenlignet med ca. 6 -24 timer for OH-assay, og så mye som 48 timer for Southern blotting og hybridisering.

2. Plateassay-formatet er mindre arbeidskrevende og kan automatiseres for analyse av store prøveantall.

3. Til forskjell fra de andre to assay-formatene som ble undersøkt, krever plateassay-formatet ikke preparering, rensing eller håndtering av farlige radioaktive prober med høy spesifikk aktivitet.

4. Innfangningen av biotinylerte produkter via plateassay tilveiebringer en objektiv, kvantitativ hybridiserings-bestemmelse; beregning av et statistisk grensepunkt for positivitet i prøvene og kvantitativ beregning av assayets

"støysignal"-andel.

P a t e n t k r a v

1. Diagnostisk sett for påvisning av en målnukleinsyre-sekvens fra Chlamydia trachomatis, k a r a k t e r i s e r t v e d at settet omfatter PCR-primere, hvor nevnte primere er oligonukleotider som vil binde til eller forårsake forlengelse via sekvens-settene

$^{5'}$CCTGACTTGTTGTTACAGGAATCCC$^{3'}$ og
$^{5'}$GTGTTCTTATTGTTCTGGGGAAGAGG$^{3'}$

som utgjør sett A, eller

$^{5'}$CCGCACGTTCTCTCAAGCAGGAC$^{3'}$ og
$^{5'}$GTCTGACGGTTCTTAAGCTGGGAG$^{3'}$

som utgjør sett B,

samt en mikrotiterplate som har et antall brønner og som har bundet til seg en oligonukleotid-innfangningsprobe med en nukleinsyresekvens som i hovedsak er komplementær til nevnte målsekvens.

2. Diagnostisk sett ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere omfatter reagenser for å utføre PCR-amplifikasjon og hybridisering av nevnte innfangningsprobe og nevnte målsekvens.

3. Diagnostisk sett ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere omfatter Taq-polymerase samt dNTP'er.

4. Diagnostisk sett ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at en eller flere av nevnte dNTP'er omfatter en markør.

5. Diagnostosk sett ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at minst én av nevnte PCR-primere er biotinylert via en tilknytningsarm-modifisering ved 5' ende.

6. Diagnostisk sett ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte mikrotiterplate omfatter polystyren med øket proteinbindende kapasitet.

7. Diagnostisk sett ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte probe er et oligonukleotid som vil binde til den følgende sekvens

$^{5'}$GGCTTGCAGAGTTCTATAGTGCTATG$^{3'}$

for sett A, eller

$^{5'}$TTCCGGAGCGAGTTACGAAGACA$^{3'}$

for sett B.

8. Primere til bruk i PCR-amplifikering av Chlamydia trachomatis nukleinsyre-sekvenser, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte primere er oligonukleotider som vil binde seg til eller forårsake forlengelse via de følgende sekvenser:

$^{5'}$CCTGACTTGTTGTTACAGGAATCCC$^{3'}$ og
$^{5'}$GTGTTCTTATTGTTCTGGGGAAGAGG$^{3'}$

9. Prober som er anvendelige ved hybridiseringsassays av DNA-sekvenser amplifikert med primere ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at probene er oligonukleotider som vil binde til følgende sekvens:

$^{5'}$GGCTTGCAGAGTTCTATAGTGCTATG$^{3'}$

10. Primere for anvendelse ved PCR-amplifikering av Clamydia trachomatis nukleinsyre målsekvenser, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte primere er oligonukleotider som vil binde seg til eller forårsake forlengelse via de følgende sekvenser:

$^{5'}$CCGCACGTTCTCTCAAGCAGGAC$^{3'}$ og
$^{5'}$GTCTGACGGTTCTTAAGCTGGGAG$^{3'}$

11. Prober som er anvendelige i hybridiseringsassays av DNA-sekvenser amplifikert med primere ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at proben er et oligonukleotid som vil binde til den følgende sekvens:

$^{5'}$TTCCGGAGCGAGTTACGAAGACA$^{3'}$

12. Anvendelse av diagnostisk sett ifølge ethvert av kravene 1 til 7 ved påvisning av Chlamydia trachomatis.

FIG 1

OLIGODEOKSYNUKLEOTIDER MERKET VED 5'-ENDEN

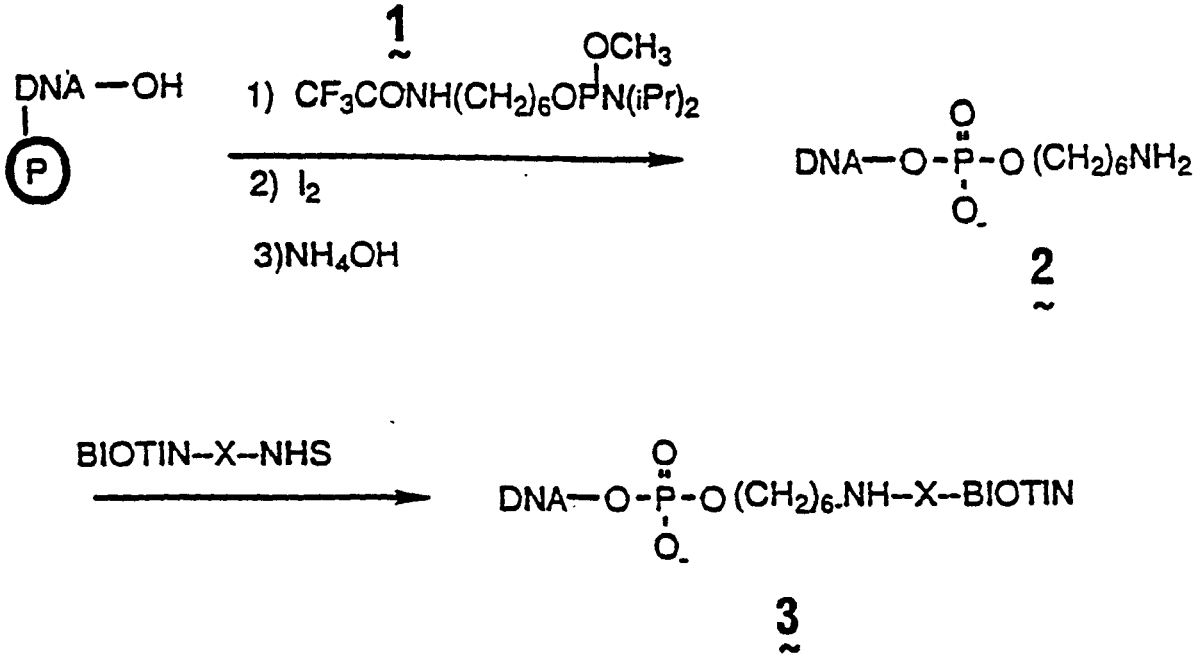

FIG 2

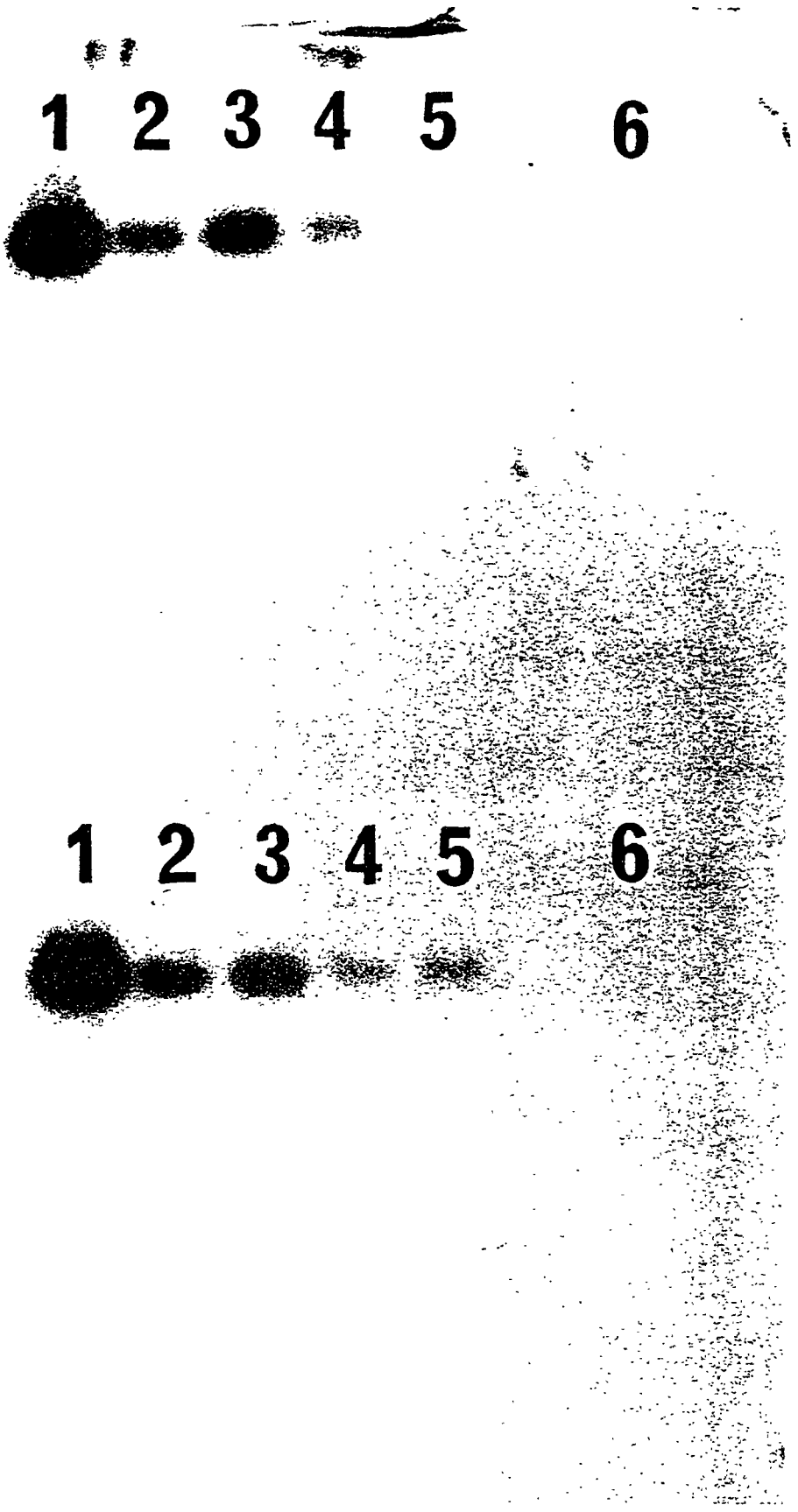

FIG 3