



F1000106213B



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 106213 B

(45) Patenti myönnetty - Patent beviljats

15.12.2000

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12Q 1/68, C07H 21/00

(21) Patentihakemus - Patentansökning

923660

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

14.08.1992

(24) Alkupaiva - Löpdag

14.08.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

16.02.1993

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

15.08.1991 US 746704 P

17.07.1992 US 915922 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •F.Hoffmann-La Roche AG, 124 Grenzacherstrasse, 4002 Basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Young, Karen K. Y., 9943 Brunswick Court, San Ramon, CA 94583, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Mykobakteerien alukkeita ja koettimia
Mycobacterium-primers och sonder

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP B 395292 (C12Q 1/68),
Journal of general Microbiology 1990 vol. 136 p. 1915-1920, Nucleic Acids Research vol. 17 (1989) p. 7843-7853,
Journal of Clinical Microbiology vol. 28 (1990) p. 1751-1759

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee alukkeita ja koettimia, joita voidaan käyttää nukleiinihapon toteamiseen näytteessä olevasta mykobakteerista ja määrittämään laji, josta nukleiinihappo on peräisin. Alukkeet amplifioivat 16S ribosomaalisen RNA-geenin alueita ja hybridisoituvat alueisiin, jotka ovat konservoituneita lajien joukossa. Sukuspesifiset koettimet hybridisoituvat sekvenssiin amplifioidun alueen sisällä, joka alue on konservoitunut mykobakteerilajien joukossa, kun taas lajispesifiset koettimet hybridisoituvat vaihtelevaan alueeseen, niin että lajin identiteetti voidaan määrittää ainutkertaisesti. Keksintö koskee myös konsensuskoettimia mykobakteerien nukleiinihappojen osoittamista varren, jotka koettimet eivät ole identtisiä minkään mykobakteerilajin sekvenssien kanssa.

Uppfinningen avser primers och sonder, vilka kan användas för detektering av nukleinsyror från Mycobacterium i ett prov och för bestämning av arterna, från vilka nukleinsyran härstammar. Nämda primers förstärker regionerna hos den 16S-ribosomala RNA-genen och hybridiserar med regioner som konserverats bland arterna. Genus-specifika sonder hybridiserar med sekvenser inom den förstärkta regionen som konserverats hos mykobacteriella arter, medan igen de artspecifika sondersna hybridiserar med en variabel region så, att artidentiteten kan bestämmas på ett entydigt sätt. Uppfinningen avser även konsensussonder för detektering av mycobacteria-nukleinsyror, varvid dessa sonder ej är identiska med någon av sekvenserna hos mycobacteriella arter.

Mykobakteerien alukkeita ja koettimia

Tämä keksintö koskee reagensseja ja menetelmiä mykobakteerin nukleiinihapon läsnäolon havaitsemiseksi ja sen mykobakteerilajin, josta mykobakteerin nukleiinihappo näytteessä on peräisin, identifioimista. Erityisesti tämä keksintö koskee oligonukleotidialukkeiden paria, joka pysyy amplifioimaan mykobakteerilajin 16S ribosomaalisen RNA:n geenin tai vastaavan RNA:n kohdealueen, joka ensimmäisten aluke koostuu sekvenssistä KY18 (SEQ ID NO. 1) ja toinen aluke koostuu sekvenssistä KY75 (SEQ ID NO. 2). Erityisemmin tämä keksintö koskee menetelmää näytteen sisältämän mykobakteerin nukleiinihapon osoittamiseksi tai luokittelemiseksi amplifioimalla 16S ribosomaalisen RNA-geenin tai mykobakteerilajin vastaavan RNA:n kohdealue, sekoittamalla amplifioitu nukleiinihappo koettimen kanssa ja havaitsemalla tai identifioimalla mainitun nukleiinihapon ja mainitun koettimen välillä muodostuneet hybridit, ja jossa tarjotaan spesifisiä koettimia. Edelleen keksintö koskee testipakkausta näytteessä olevan mykobakteerin nukleiinihapon osoittamiseksi ja mahdolliseksi identifioimiseksi.

Mykobakteerit ovat hitaasti kasvavia, haponkestäviä, aerobisia basiljeja. Ainakin 19 Mycobacterium-lajia on tähän mennessä liitetty ihmisten sairauksiin, huomattavimmin *M. tuberculosis*, *M. bovis* ja *M. leprae*. Jotkut lajit, sellaiset kuten *M. avium*, *M. intracellulare* ja *M. kansasii*, vaikka normaalisti ne eivät ole patogeenisiä terveille yksilöille, voivat aiheuttaa sairauden yksilöissä, joiden immuniteetti on heikentynyt, kuten esimerkiksi sellaiset, jotka ovat infektoituneet AIDS-viruksella. Lisäksi useat lajit harvoin aiheuttavat sairautta ihmisissä, mutta voivat esiintyä kliinisisissä näytteissä saprofyytteinä. Menetelmät *Mycobacterium*-lajien havaitsemiseksi ja indentifioimiseksi käsittävät bakteeriviljelyn, vasta-ai-

neiden havaitsemisen ja viime aikoina rRNA:n havaitsemisen hybridisoimalla radioaktiivisesti merkityn nukleiinihappokoettimen kanssa. Jokaiseen näistä menetelmistä liittyy huomattavia ongelmia.

5 Osoittaminen basilleja viljelemällä on hidasta, vaatien jopa kaksi kuukautta, ja tyypillisesti se vaatii lisää biokemiallisia kokeita lajien identifioimiseksi. Vasta-aineiden osoittamiselta puuttuu spesifisyys mykobakteerilajien välisen ristireaktiivisuuden takia, ja siltä
10 puuttuu myös herkkyys. Edelleen, tämän hetkisen ja aikaisemmin olleen infektion erottaminen on vaikeaa. Havaitsemiselta käyttäen radioaktiivisesti merkittyjä DNA-fragmentteja koettimina, jotka hybridisoituvat pieneen ribosomaaliseen RNA-alayksikköön (16S RNA) puuttuu herkkyys ja
15 silti se vaatii vähintään usean päivän kestävän viljelyjakson (ks. PCT/WO 84/02 721).

 Polymeraasiketjureaktion (PCR), menetelmän spesifisten nukleiinihappojen sekvenssien amplifioimiseksi, keksiminen mahdollistaa soluissa olevien nukleiinihappojen
20 nopean osoittamisen määränä, joka oli aikaisemmin liian matala havaittavaksi. Käyttämällä PCR-amplifikaatiota voidaan havaita jopa kohdenukleiinihapon yksittäinen kopio. Suora osoittaminen hybridisoimalla havaittavissa olevalle tasolle amplifioidun nukleiinihapposekvenssin sekvenssi-
25 spesifisen oligonukleotidikoettimen kanssa mahdollistaa diagnostiset kokeet, jotka ovat tarpeeksi spesifisiä osoittamaan yksittäiset nukleotidimuutokset sekvenssissä. Kaikki alukeparit ja koettimet eivät kuitenkaan ole käytökelpoisia. Alukkeiden valinta, ja tästä johtuen amplifioitava alue, yhdessä koettimien valinnan kanssa, määrää
30 suurelta osalta saavutettavan spesifisyyden ja herkkyyden.

 Amplifikaatiota PCR:llä on käytetty mykobakteerin nukleiinihapon sekvensoinnissa, mykobakteerin nukleiinihappojen havaitsemisessa näytteessä ja mykobakteerilajien
35 identifioinnissa. Erilaisia bakteerigenomin alueita on

käytetty havaitsemaan ja identifioimaan mykobakteerin nukleinihappoja näytteissä. Useimmat näistä diagnostisista kokeista suunniteltiin havaitsemaan vain yksi laji tai pieni määrä lajeja, ja vain rajoittuneita spesifisyystarkistuksia, jos ollenkaan, suoritettiin ei-mykobakteeridna:ta vastaan.

Chia et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28(9):1877 - 1880; Brisson-Noel et al., 1989, Lancet 334:1069 - 1071; Hackel et al., 1990, Molecular and Cellular Probes 4:205 - 210; Woods ja Cole, 1989, FEMS Microbiology Letters 65:305 - 310 ja Hance et al., 1989, Molecular Microbiology 3(7):843 - 849 kuvasivat geenin sen alueen, joka koodittaa 65 kilodaltonin antigeeniä, osoittamisen. Ei enempää kuin kolme sarjaa mykobakteerilajeja erotettiin jokaisessa kokeessa, joka perustui 65 kilodaltonin antigeenin geeniin.

Thierry et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28(12):2668 - 2673 ja Eisenach et al., 1990, J. Infectious Disease 161:977 - 981 raportoivat toistuvan DNA-elementin, IS6110, amplifioimisen. IS6110:n amplifikaatio toimii pohjimmiltaan vain testattaessa tiettyjen mykobakteerilajien läsnäoloa, vaikka *M. tuberculosis* ja *M. bovis* voidaan erottaa kopiomäärän perusteella (Plikaytis et al., 1991, Molecular and Cellular Probes 5:215-219).

M. lepraen 36 kilodaltonin antigeeniä käytettiin diagnostisessa kokeessa, Hartskeerl et al., 1989, J. Gen. Microbiol. 135:2357 - 2364. Vaikka kokeen oli tarkoitus olla spesifinen *M. leprae*lle, havaittiin heikosta kohdalaiseen hybridisoitumista muista mykobakteereista peräisin olevaan DNA:han.

Sjoberg et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28(10):2200 - 2204, käyttivät proteiiniantigeeniä b koodittavaa geenisekvenssiä valmistaessaan koetta *M. tuberculosis/bovis*ille perustuen amplifioidun tuotteen läsnäoloon tai puuttumiseen.

Testin pelkästään *M. tuberculosisin* läsnäolon havaitsemiseen perustuen geenisekvenssiin, joka koodittaa MPB 64-proteiinia, kuvasivat Shankar et al., 1990, Lancet 335:423.

5 Patel et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28(3):513 -
518 ja Fries et al., 1990, Molecular and Cellular Probes
4:87 - 105 kuvasivat koettimia, jotka oli konstruoitu
kloonatuista DNA-fragmenteista. Koetinspesifisyys saatiin
aikaan valintamenetelmän kautta ennemmin kuin sekvenssi-
10 analyysillä koettimen suunnittelun aikana.

Eräs mykobakteerin genomien alueista, joka on ana-
lysoitu ja kohdistettu käytettäväksi diagnostisessa ko-
keessa, on ribosomaalisen RNA:n pieni alayksikkö (16S
rRNA). Edwards et al., (1989) Nucl. Ac. Res. 17, 19: 7843-
15 7853 kuuvaavat *Mycobacterium*in kansasiin 16S rRNA:ta koo-
daavan geenin eristämisen ja lähes täydellisen nukleoti-
dien määrittämisen käyttäen amplifiointi- ja sekvensoin-
tialukkeita, jotka oli valittu vastaamaan prokaryootti- ja
eukaryoottilajien fylogeettisesti konservoituneita aluei-
20 ta. EP 395 292 kuvaa menetelmän mykobakteerien väliseksi
tunnistamiseksi käyttäen *Mycobacterium bovisin* 16S ri-
bosomaalista RNA:ta koodaavan geenin varioivalla alueella
V2 sijaitsevista 73 nukleotidistä johdettua DNA-koetinta.

Bottger, 1989, FEMS Microbiology Letters 65:171 -
25 176 amplifioi 16S rRNA-geenejä erilaisista organismeista
käyttämällä "universaaleja" alukkeita, jotka oli suunni-
teltu amplifioimaan nukleiinihappoa laajasta joukosta or-
ganismeja, jonka jälkeen ne sekvensoitiin suoraan. Rogall
et al., 1990, J. Gen. Micro. 136:1915 - 1920 tutkivat my-
30 kobakteerilajien fylogeneettistä suhdetta vertaamalla 16S
rRNA-geenisekvenssejä. Boddington et al., 1990, J. Clin.
Microbiol. 28(8):1751 - 1759, esittivät todisteita koskien
määrityksiä, joita voidaan tehdä käyttämällä sekvenssi-
sifisiä oligonukleotidejä amplifioimiseksi ja hybridisoi-
35 miseksi 16S rRNA-sekvenssin alueisiin. Kolmesta mykobak-

teerilajista tutkittiin suuresti muuntelevaa 16S rRNA-sekvenssin aluetta. Suvulle spesifisiä alukkeita käytettiin amplifioimaan alue, joka sisälsi muuntelevan alueen, jota käytettiin lajispesifisen koettimen hybridisoimiseen.

5 Pientä rRNA-alayksikköä suuresta joukosta organismeja, jotka olivat sekä läheisesti että kaukaisemmin sukua mykobakteereille, on tutkittu ja sekvensoitu. Neefs et al., 1990, Nuc. Acids Res. Supplement 18:2237 - 2317, ovat esittäneet kokoelman pienen alayksikön rRNA-sekvensseistä

10 suuresta joukosta organismeja.

On yhä olemassa tarve nopealle ja herkälle testille, jolla identifioidaan mykobakteerin DNA:n läsnäolo ja laji, josta DNA on peräisin.

Tämä keksintö tarjoaa nopean ja herkän PCR:ään perustuvan kokeen mykobakteereiden havaitsemiseksi ja lajien identifioimiseksi. Tarjotaan alukkeita ja koettimia, jotka ovat spesifisiä 16S ribosomaalisille RNA-geenisekvensseille. Mykobakteerien osoittaminen suoritetaan amplifioimalla

15 suvulle spesifisillä alukkeilla, jota seuraa seulonta suvulle spesifisillä koettimilla "dot blot" -hybridisointikokeessa. Jos havaitaan mykobakteereita, lajien identifiointi määritetään amplifioidusta DNA:sta, tavallisesti samasta amplifikaatioreaktiosta, käyttämällä lajispesifisiä koettimia käänteis-"dot blot"-kokeessa.

20

25 16S ribosomaalista RNA:ta (RNA) koodittavien sekvenssien amplifikaatiolla on useita etuja. Tätä keksintöä voidaan käyttää osoittamaan ja erottamaan toisistaan enemmän kuin 30 mykobakteerilajia ja lukuisia muita organismeja, joita saattaisi olla kliinisessä näytteessä. Tässä keksinnössä käytettävät koettimet ja alukkeet tarjoavat

30 suurimman mahdollisen spesifisyyden minimoiden näin todennäköisyyden virheelliseen positiiviseen tulokseen, jonka läheisen organismin, jolla on samankaltainen sekvenssi, läsnäolo aiheuttaa. Keksinnön mukaiselle oligonukleotidialukkeiden parille, joka pystyy amplifioimaan mykobak-

35

teerilajin 16S ribosomaalisen RNA:n geenin tai vastaavan RNT:n kohdealueen, on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään. 16S RNA-geeni sisältää suuresti konservoituneita alueita. Tässä kuvatun suvulle spesifiset alukkeet ja koettimet hybridisoituvat tällaisiin konservoituneisiin alueisiin ja ne pystyvät hybridisoitumaan melkein kaikista suvun lajeista peräisin olevien sekvenssien kanssa; alukkeet amplifioivat nukleiinihappoa 14:sta 15:sta testatusta mykobakteerilajista ja näistä 14:sta amplifioidusta mykobakteeri-DNA-sekvenssistä suvulle spesifiset koettimet hybridisoituvat 12:ta. 16S rRNA sisältää myös suuresti muuntelevia alueita amplifioidun alueen sisällä. Tässä kuvatut lajispesifiset koettimet hybridisoituvat muuntelemaan alueeseen, jossa jokaisen mielenkiinnon kohteena olevan lajin sekvenssi on ainutlaatuinen.

Lisäetu alukkeiden ja koettimien valitsemisesta 16S rRNA:sta on se, että RNA on läsnä kasvavassa solussa korkeina kopiomäärinä ($10^3 - 10^4$). Geenisekvenssien lukumäärä RNA:n muodossa tietyssä kliinisessä näytteessä olisi tästä syystä jopa 10^4 kertaa suurempi kuin vastaavien DNA-sekvenssien lukumäärä. Jos tarvitaan lisää osoitusherkkyyttä, RNA:ta itsessään voidaan käyttää amplifikaatiokohteena.

Toisessa keksinnön näkökohdassa suoritetaan toinen amplifikaatioreaktio vahvistavana kokeena. Toinen amplifikaatioreaktio perustuu sellaisten kohdesekvenssien läsnäoloon, jotka eivät suoraan liity ensimmäiseen kohteeseen, eli 16S ribosomaalisiin RNA-nukleiinihappoihin. Sopivat kohdesekvenssit ovat edullisesti konservoituneita Mycobacterium-lajien joukossa, ja ne eivät liity ei-Mycobacterium-lajeihin. Sopiva kohdegeeni voi olla esimerkiksi geeni, joka koodittaa 65 kDa:n proteiinin geeniä. Pao et al., 1989, FEMS Micro. Letters 65:305 - 310, Hartskeerl et al., 1989, J. Gen. Micro. 135:2357 - 2364 ja Hackel et al., 1990, Mol. Cel. Probes 4:205 - 210. Samalla kun toisen kohdesekvenssin amplifikaatio on käyttökelpoinen ensimmäi-

1990, Mol. Cel. Probes 4:205 - 210. Samalla kun toisen kohdesekvenssin amplifikaatio on käyttökelpoinen ensimmäisen amplifikaatioreaktion tulosten vahvistamisessa, se on erityisen tarkoituksenmukainen selvitetessä ristiriitaisia tuloksia, joita voi aiheutua vertailukokeista, varsinkin PCR:n ja viljelymenetelmien vertailusta.

5 Tässä kuvataan myös uusia koostumuksia käytettäviksi positiivisina kontrolleina Mycobacteriumia osoitettaessa sellaisen kokeen tulosten vahvistamiseksi, jossa käytetään suvulle spesifisiä koettimia sekä lajispesifisiä Mycobacterium-koettimia.

10 Tässä kuvataan myös koettimia, jotka kykenevät osoittamaan Mycobacteriumin nukleiinihapon läsnäolon (suvulle spesifiset koettimet) ja määrittämään sen lajin identiteetin, josta nukleiinihappo on peräisin (lajis-

15 pesifiset koettimet).

Tässä kuvataan myös konsensuskoettimia Mycobacterium-isolaattien erilaisten lajien amplifioimiseksi ja osoittamiseksi. Konsensusoligonukleotidikoettimet eivät hybridisoidu ei-Mycobacterium-lajien kanssa, jotka ovat

20 läheisesti sukua mykobakteereille.

Konsensuskoettimet sopivat laajalti kohdespesifiseen havaitsemiseen käyttämällä yhtä oligonukleotidikoettinta. Konsensuskoetin, tässä käytettynä, on oligonukleotidikoetin, joka ei ole sekvenssiltään samanlainen min-

25 kään osoitettavan mykobakteerinukleiinihapposekvenssin kanssa. Konsensuskoettimet ovat hybridioligonukleotidikoostumuksia, jotka käsittävät ei-luonnollisia nukleiinihapposekvenssejä. Konsensuskoettimia, kuten niitä tässä

30 keksinnössä kuvataan, voidaan käyttää poistamaan sekä sisällyttämään valittuja lajeja osoituskokeeseen. Tässä kuvataan oligonukleotidikoettimia, jotka käsittävät uusia sekvenssejä. Samalla kun nämä koettimet laajasti havaitsevat mykobakteerilajeja, ne eivät havaitse läheisiä ei-my-

35 kobakteerilajeja, esimerkiksi Corynebacterista.

Keksintö koskee edellä kuvattua alukkeiden paria mykobakteerien nukleiinihapon spesifisen alueen amplifioimiseksi. Tämä alue sisältää sekä alueen, joka on konservoitunut Mycobacterium-lajien joukossa että muuntelevan alueen, jolla on riittävästi heterogeenisyyttä lajien joukossa, jotta kohdenukleiinihapon alkuperä on mahdollista määrittää käyttämällä sekvenssille spesifisiä oligonukleotidikoettimia.

Eräs keksinnön näkökohta koskee havaitsemismenetelmiä ja lajin identifioimismenetelmiä. Kohdenukleiinihapon amplifioiminen PCR:llä käyttämällä keksinnön mukaista alukkeiden paria mahdollistaa mykobakteerien nukleiinihapon läsnäolon havaitsemisen sekoittamalla amplifioitu nukleiinihappo suvulle spesifisten koettimien kanssa ja havaitsemalla, tapahtuuko hybridisoituminen, kun taas lajien identifiointi suoritetaan määrittämällä hybridisoitumista pa lajispesifisiin koettimiin. Menetelmälle näytteen sisältämän mykobakteerin nukleiinihapon osoittamiseksi on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 8 esitetään. Menetelmälle mykobakteerin luokittelemiseksi on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 10 esitetään.

Eräs keksinnön näkökohta koskee testipakkauksia. Testipakkaukselle näytteessä olevan mykobakteerin nukleiinihapon osoittamiseksi ja mahdolliseksi identifioimiseksi on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 2 esitetään. Näillä testipakkauksilla on useita erilaisia muotoja, ja ne käsittävät yhden tai useampia koettimia, sekä vaaditun alukkeiden parin ja, eräässä suoritusmuodossa, käsittävät koetinpaneelin, joka riittää määrittämään infektoivan Mycobacteriumin identiteetin lajitasolla, ja ohjeita testipakkauksen aineiden käyttämiseksi. Testipakkaukset voivat myös käsittää yhden tai useampia amplifiointireagensseja, esim. suvulle spesifisiä alukkeita, polymeeraasia, puskureita ja nukleosiditrifosfaatteja.

Vielä eräässä suoritusmuodossa testipakkaus voi myös käsittää positiivisia ja negatiivisia kontrolleja. Edullinen positiivinen kontrolli kuvataan tässä.

5 Keksinnön ymmärtämisen helpottamiseksi alla määritellään useita termejä.

Termi "oligonukleotidi" viittaa molekyyliin, joka muodostuu kahdesta tai tavallisesti useammasta deoksiribonukleotidistä tai ribonukleotidistä, sellaiset kuten alukkeet, koettimet, osoitettavat nukleiinihappofragmentit ja nukleiinihappokollit. Oligonukleotidin tarkka koko riippuu monista tekijöistä ja oligonukleotidin lopullisesta funktiosta tai käytöstä. Oligonukleotidejä voidaan valmistaa millä tahansa sopivalla menetelmällä, käsittäen esimerkiksi sopivien sekvenssien kloonauksen ja restriktion ja suoran kemiallisen synteessin sellaisella menetelmällä kuten Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90 - 99 fosfotriesterimenetelmä, Brown et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:109 - 151 fosfodiesterimenetelmä, Beaucage et al., 15 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859 - 1862 dietyylifosforamidiittimenetelmä ja US-patenttijulkaisun nro 4 458 066 mukainen kiinteän kantajan menetelmä.

Termi "aluke" viittaa oligonukleotidiin, olipa se luonnollinen tai synteettinen, joka kykenee toimimaan DNA-synteessin aloituskohtana olosuhteissa, joissa alukkeen pidennystuotteen, joka on komplementaarinen nukleiinihapposäikeelle, synteesi indusoituu, eli neljän erilaisen deoksiribonukleosiditrifosfaatin ja polymerisointiaineen (eli DNA-polymeraasin tai käänteistranskriptaasin) läsnäollessa sopivassa puskurissa ja sopivassa lämpötilassa. Aluke on edullisesti yksisäikeinen oligodeoksiribonukleotidi. Alukkeen sopiva pituus riippuu alukkeen tarkoituksesta käytöstä, mutta se on tavallisesti 15 - 25 nukleotidiä. Lyhyet alukemolekyylit vaativat tavallisesti viileämpiä lämpötiloja muodostaakseen riittävän stabiileja hybridi- 35 komplekseja templaatin kanssa. Alukkeen ei tarvitse ref-

lektoida templaatin tarkkaa sekvenssiä, mutta sen tulee olla riittävän komplementaarinen hybridisoitukseen templaatin kanssa ja toimimaan DNA-synteesin aloituksessa.

5 Keksinnön suoritusmuodoissa tarjotaan sekvenssiltään spesifisiä alukkeita, kuten edellä on kuvattu ja koettimia. Alan ammattimiehelle on ilmeistä mainittujen suoritusmuotojen pohjalta, että sekvenssiltään spesifisiä koettimia voidaan modifioida esimerkiksi lisäämällä nukleotidejä joko 5'- tai 3'-päihin, jotka nukleotidit ovat
10 komplementaarisia kohdesekvenssille tai ei-komplementaarisia kohdesekvenssille.

 Termi "aluke" voi viitata useampaan kuin yhteen alukkeeseen, erityisesti sellaisessa tapauksessa, jossa esiintyy hiukan epäselvyyttä informaatiossa, joka koskee
15 amplifioitavan kohdealueen toista tai kumpaakin päätä. Jos "konservoitunut" alue osoittaa merkittäviä polymorfismita-
soja populaatiossa, voidaan valmistaa alukeseoksia, jotka
amplifioivat tällaisia sekvenssejä, tai alukkeet voidaan
suunnitella amplifioimaan jopa sekvenssejä, jotka eivät
20 ole yhteensopivia. Aluke voidaan merkitä haluttaessa liittämällä spektroskopisesti, fotokemiallisesti, biokemiallisesti, immunokemiallisesti tai kemiallisesti osoitettavissa oleva merkki. Käyttökelpoiset merkit käsittävät esimerkiksi ³²P:n, fluoresoivat värit, elektronitiheät reagenssit, entsyymit (tavallisesti ELISA:ssa käytettävät), biotiinin tai hapterien ja proteiinit, joille on saatavilla antiseerumia tai monoklonaalisia vasta-aineita. Merkkiä
25 voidaan myös käyttää "sieppaamaan" aluke, näin helpottamaan joko alukkeen tai alukkeen pidennystuotteen, sellaisen kuten amplifioitavan DNA:n, immobilisointumista kiinteälle kantajalle.
30 le kantajalle.

 Termit "sekvenssille spesifinen oligonukleotidi" ja "SSO" viittavat oligonukleotideihin, joilla on sekvenssi, jota kutsutaan "hybridisoituvaksi alueeksi", joka on komplementaarinen osoitettavalle sekvenssille, ja joka "sek-
35 "

venssille spesifisissä, ankarissa hybridisointiolosuhteis-
sa" hybridisoituu vain siihen täysin komplementaariseen
kohdesekvenssiin. Hybridisaatio-olosuhteiden ankaruuden
lieventäminen sallii sekvenssien välisen epäparisuuden;
5 epäparisuusastetta, joka sallitaan, voidaan kontrolloida
hybridisointiolosuhteiden sopivalla säätelyllä. Termejä
"koetin" ja "SSO-koetin" käytetään vaihtelevasti SSO:n
kanssa.

Termi "kohdealue" viittaa analysoitavaan nukleiini-
10 happoalueeseen.

Termi "lämpöstabiili polymeraasientsyymi" viittaa
entsyymiin, joka on suhteellisen stabiili lämmölle ja ka-
talysoi nukleosiditrifosfaattien polymerisaatiota muodos-
tettaessa alukkeen pidennystuotteita, jotka ovat komple-
15 mentaarisia kohdesekvenssin toiselle nukleiinihapposäi-
keelle. Entsyymi aloittaa synteessin alukkeen 3'-päässä ja
etenee templaatin 5'-päästä kohti, kunnes synteesi päättyy.
Puhdistettu lämpöstabiili polymeraasientsyymi on kuvattu
täydellisemmin US-patenttijulkaisussa 4 889 818.

Termi "käänteistranskriptaasi" viittaa entsyymiin,
20 joka katalysoi nukleosiditrifosfaattien polymerisaatiota
muodostettaessa alukkeen pidennystuotteita, jotka ovat
komplementaarisia ribonukleiinihappotemplaatile. Entsyymi
aloittaa synteessin alukkeen 3'-päässä ja etenee templaatin
25 5'-päästä kohti, kunnes synteesi päättyy. Esimerkkejä sopi-
vista polymerisoivista aineista, jotka muuntavat RNA-koh-
desekvenssin komplementaariseksi, kopio-DNA-sekvenssiksi
(cDNA), ovat linnun myeloblastosisviruksen käänteistran-
skriptaasi ja Thermus thermophilus DNA-polymeraasi, lämpö-
30 stabiili DNA-polymeraasi, jolla on käänteistranskriptaasi-
aktiivisuutta.

Kuva 1 esittää hybridisaatiotestien tulokset, jois-
sa käytetään keksinnön mukaisia sekä suvulle spesifisiä
että lajispesifisiä koettimia. Koettimien spesifisyys tes-

tattiin DNA:lla kolmestatoista erilaisesta Mycobacterium-lajista.

Tämä keksintö tarjoaa nopean ja herkän PCR:ään perustuvan kokeen Mycobacteriumien osoittamiseksi ja lajien identifiointiksi. Tarjotaan alukkeita ja koettimia, jotka ovat spesifisiä mykobakteerien 16S ribosomaalisille RNA-geenisekvensseille. Mykobakteerien osoittaminen suoritetaan amplifioimalla suvulle spesifisillä alukkeilla, jota seuraa seulonta suvulle spesifisillä koettimilla "dot blot" -hybridisointikokeessa. Jos mykobakteereita havaitaan, lajien identifiointi suoritetaan samasta amplifikaatioreaktiosta peräisin olevasta DNA:sta käyttäen lajispezifisiä koettimia käänteis-"dot blot"-kokeessa. Sekä etenevät että käänteis-"dot blot"-kokeet voidaan suorittaa erittäin tarkoituksenmukaisesti mikrotiitterilevyllä.

Suvulle spesifiset alukkeet ja koettimet hybridisoituvat 16S rRNA-geenin konservoituneisiin alueisiin ja lajispezifiset koettimet hybridisoituvat 16S rRNA-geenin muunteleviin alueisiin. Koska synteesi alkaa alukseen 3'-päästä, epäparisuus 3'-päässä on kriitillisempää. Tymiidiini on kestävämpi epäparisuuden suhteen kuin muut emäkset; näin ollen suunniteltiin alukkeita välttämättä tyimidiniemästä 3'-päässä. Oligonukleotidin emäspitoisuus vaikuttaa denaturoitumislämpötilaan. Alukseen tai koettimen sitoutumisen ankuruus ja spesifisyys kasvaa lämpötilan noustessa. Koska kaikki koettimet kuitenkin hybridisoidaan samanaikaisesti käänteis-"dot blot"-formaattissa, optimaaliset koettimen hybridisointiolosuhteet ovat samanlaiset kaikille koettimille.

Keksinnön mukaiset alukeparit toimivat tehokkaasti kaikkien mielenkiinnonkohteena olevien mykobakteerilajien 16S rRNA-geenin sekvenssin amplifioinnissa, mutta ne eivät amplifioi useimmista muista lähteistä peräisin olevaa vastaavaa DNA:ta. Edelleen amplifikaatio-olosuhteet ja tehokkuus näille alukkeille ovat kohtalaisen samanlaiset lajien

välillä niin, että lähes kaikki mykobakteerilajit ovat havaittavissa käyttämällä yhtä koetta. Taulukossa 1 esitetään tämän keksinnön mukaisten alukkeiden hybridisoituvat sekvenssit.

5

Taulukko 1

Aluke	Sekvenssilistaus	Hybridisoituva sekvenssi
KY18	SEQ ID NO:1	5'CACATGCAAGTCGAACGGAAAGG3'
KY75	SEQ ID NO:2	5'GCCCGTATCGCCCGCACGCTCACA3'

10

Käyttämällä E. colin numerointijärjestelmää ylävirran aluke KY18 käsittää 16S rRNA-geenin emästen 52 - 74 välin ja alavirran aluke KY75 käsittää emästen 624 - 647 välin. Yhdessä nämä alukkeet spesifioivat pituudeltaan noin 583 emäsparin pituisen tuotteen synteesin; tarkka koko riippuu lajista.

15

Alkuseulonta mykobakteeri-DNA:n läsnäolon toteamiseksi suoritetaan kahdella suvulle spesifisellä koettimella, joita käytetään samanaikaisesti seoksena.

20

Taulukko 2

Koetin	Sekvenssilistaus	Hybridisoituva sekvenssi
KY101	SEQ ID NO:3	5'TCGCGTTGTTTCGTGAAATCTCACgGCTTAA3'
KY102	SEQ ID NO:4	5'TCGCGTTGTTTCGTGAAAaCTCACAGCTTAA3'
KY165	SEQ ID NO:13	5'TCGCGTTGTTTCGTGAAATCTCACAGCTTAA3'
KY166	SEQ ID NO:14	5'TCGCGTTGTTTCGTGgAATCTCACAGCTTAA3'
M.xenopi	SEQ ID NO:15	5'TCGCGTTGTTTCGTGgAATgcCACAGCTTAA3'

25

Syy koetinseoksille on se, että useimmat mykobakteerilajit voidaan jakaa kahteen ryhmään suhteessa sekvensseihin KY101:n (SEQ ID NO.3) ja KY102:n (SEQ ID NO.4) alueella. Nämä kaksi koetinta osoittavat DNA:n 12:ta testatun Mycobacterium-suvun 14:sta lajista.

30

Vaihtoehtoisessa suoritusmuodossa KY165 (SEQ ID NO. 13) korvaa koettimet KY101 (SEQ ID NO.3) ja KY102 (SEQ ID NO.4). Koettimien KY101 (SEQ ID NO.3), KY102 (SEQ ID

35

NO.4), KY165 (SEQ ID NO.13) ja KY166 (SEQ ID NO.14) sekvenssit on esitetty taulukossa 2. KY165 (SEQ ID NO.13) on konsensuskoetin käsittäen sekä KY101:n (SEQ ID NO.3) että KY102:n (SEQ ID NO.4) sekvenssit. KY101 (SEQ ID NO.3) ja KY102 (SEQ ID NO.4) eroavat toisistaan kahdella emäksellä. KY165 (SEQ ID NO.13) ei ole identtinen kummankaan KY101 (SEQ ID NO.3) tai KY102 (SEQ ID NO.4) kanssa, vaan eroaa kummastakin yhdellä emäksellä. Tämä konsensus saavutettiin "suosimalla" KY101:tä (SEQ ID NO. 3) yhdessä epäparisuus- asemista ja KY102:ta (SEQ ID NO.4) muissa epäparisuus- asemissa. KY165 (SEQ ID NO. 13) pystyy hybridisoitumaan riittävästi kaikkiin KY101- (SEQ ID NO.3) ja KY102-spesifisiin (SEQ ID NO.4) mykobakteerilajeihin. KY165 (SEQ ID NO.13) ei hybridisoidu *M. xenopi*in (SEQ ID NO.15) hyvin ankarissa olosuhteissa johtuen lisäepäparisuuden läsnäolosta.

KY166 (SEQ ID NO.14) on laajempi konsensuskoetin mykobakteerilajien, käsittäen *M. xenopi* (SEQ ID NO.15), osoittamiseksi. KY166:sta (SEQ ID NO.14) sekvenssi, kuten KY165:n (SEQ ID NO.13) sekvenssi, ei vastaa mitään ei-mykobakteerilajia. Koetin on suunniteltu olemaan yhtäläillä erilainen KY101:lle (SEQ ID NO.3), KY102:lle (SEQ ID NO.4) ja *M. xenopin* vastaavalle sekvenssille (SEQ ID NO.15) (GenBank hankintanumero X52929, saatavilla Intelligenticsin kautta). KY166 (SEQ ID NO.14) eroaa KY101:stä (SEQ ID NO.3), KY102:sta (SEQ ID NO.4) ja *M. xenopista* (SEQ ID NO.15) kahdella emäksellä jokaisesta. KY166 (SEQ ID NO.14) hybridisoi tehokkaasti kaikkiin KY101- (SEQ ID NO.3) ja KY102-spesifisiin (SEQ ID NO.4) lajeihin ja *M. xenopi*in (SEQ ID NO.15). Lisäksi KY166 (SEQ ID NO.14) ei hybridisoidu *Corynebacter pseudodiphtheriticumi*in tai *C. diphtheriaese*en, kahteen ei-mykobakteerilajiin, jotka ovat läheisesti sukua *Mycobacteriumille*. *M. xenopin* vastaava sekvenssi (SEQ ID NO.15) sisältyy taulukkoon 2. Taulukossa epäparisuus suhteessa KY166:een (SEQ ID NO.14) on allevii-

vattu. Epäparisuus suhteessa KY165:een (SEQ ID NO.13) on esitetty pienillä kirjaimilla.

5 Jos näyte sisältää mykobakteerinukleiinihappoa, se laji, josta nukleiinihappo on peräisin, voidaan määrittää hybridisoimalla lajispesifisten koettimien paneeliin. Lajien identifiointivaiheessa käytetyt koettimet on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3

Koetin	Sekvenssilistaus	Spesifisyys
5	KY21 5' ACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAGC 3'	SEQ ID NO: 5 <i>M. tuberculosis/bovis/tb</i>
	KY25 5' ACTTGGCGCATGCCTTGTGGTGGAAAGCTT 3'	SEQ ID NO: 6 <i>M. kansasii/gastri/scrofulaceum</i>
	KY26 5' TTAGGCGCATGTCTTTAGGTGGAAAGCTT	SEQ ID NO: 7 <i>M. intracellulare</i>
10	KY63 5' TCAAGACGCATGTCTTCTGGTGGAAAGCTTTTGC 3'	SEQ ID NO: 8 <i>M. avium/marinum/microti</i>
	KY151 5' TCCCGAAGTGCAGGCCAGATTGCCACCGTG 3'	SEQ ID NO: 9 <i>M. marinum/M. microti</i>
15	KY106 5' GAAGGCTCACTTTGTGGGTTGACGGTAGGT 3'	SEQ ID NO: 10 <i>M. scrofulaceum</i>
	KY126 5' GCAATCTGCCTGCACACCGGGATAAGCCTG 3'	SEQ ID NO: 11 <i>M. kansasii/gastri</i>
	KY139 5' GGGTCTAATACCGAATAGGACCACAGGACACATG 3'	SEQ ID NO: 12 <i>M. gordonae</i>
20	KY157 5' ATAGGACCATTCTGCGCATGTGGTGTGGTG 3'	SEQ ID NO: 16 <i>M. xenopi</i>
	KY167 5' ACCTCAAGACGCATGTCTTCTGGT 3'	SEQ ID NO: 17 <i>M. avium/marinum/microti</i>
25	KY168 5' CCGAATAGGACCACAGGACACATG 3'	SEQ ID NO: 18 <i>M. gordonae</i>
	KY169 5' ACCTTTAGGCGCATGTCTTTAGGT 3'	SEQ ID NO: 19 <i>M. intracellulare</i>
	KY170 5' AACACTTGGCGCATGCCTTGTGGT 3'	SEQ ID NO: 20 <i>M. kansasii/gastri/scrofulaceum</i>
30	KY171 5' GAAGGCTCACTTTGTGGGTTGACG 3'	SEQ ID NO: 21 <i>M. scrofulaceum</i>
	KY172 5' TGTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGT 3'	SEQ ID NO: 22 <i>M. bovis/tb</i>
35	KY173 5' AGGACCATTCTGCGCATGTGGTGT 3'	SEQ ID NO: 23 <i>M. xenopi</i>

Kliinisesti eniten kiinnostavat lajit ovat *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. intracellulare* ja *M. avium*. *M. gordonae* ei tavallisesti liity sairauteen, mutta se esiintyy säännöllisesti ihmisnäytteissä. Tästä johtuen mykobakteerinukleiinihapon havaitsemisen suvulle spesifisillä koettimilla oletetaan usein johtuvan kliinisesti merkityksettömästä *M. gordonaesta*. Esimerkki 6 sisältää lisätietoa lajispesifisten koettimien spesifisyydestä.

Tämän keksinnön tärkeä näkökohta on 16S rRNA-geenin alueen amplifiointi. Niiden, jotka käyttävät tätä keksintöä, tulisi huomata, että vaikka polymeraasiketjureaktio on edullinen amplifiointimenetelmä, näytteen kohdesekvenssien amplifiointi voidaan suorittaa millä tahansa tunnetulla menetelmällä, sellaisella kuten ligaasiketjureaktio (LCR), transkriptioamplifikaatio ja itsestään jatkuva sekvenssin replikaatio, joista jokainen tarjoaa riittävän amplifikaation, niin että kohdesekvenssi voidaan havaita nukleiinihapon hybridisoitumisena SSO-koettimeen. Vaihtoehtoisesti, menetelmiä, jotka amplifioivat koettimen havaittavissa oleville tasoille, voidaan käyttää, sellaisia kuten Q β -replikaasi-amplifikaatio. Termi "koetin" käsittää sekvenssille spesifiset oligonukleotidit, joita käytetään edellä esitetyissä menetelmissä; esimerkiksi LCR:ssä käytetyt kaksi tai useampi oligonukleotidi ovat "koettimia" tämän keksinnön tarkoituksiin, vaikka LCR tarvitsee vain koettimien ligaation osoittamaan sekvenssin läsnäolon.

Vaikka PCR-menetelmä tunnetaan alalla hyvin (ks. US-patenttijulkaisut nrot 4 683 195, 4 683 202 ja 4 965 188), alla esitetään jotakin yleistä informaatiota PCR:stä keksinnön selvyyden ja täyden ymmärtämisen vuoksi niille, jotka eivät tunne PCR-menetelmää.

Näytteen kohdenukleiinihapposekvenssin amplifioimiseksi PCR:llä sekvenssin tulee olla amplifikaatiojärjestelmän komponenttien saavutettavissa. Yleisesti tämä saa-

vutettavuus varmistetaan eristämällä nukleiinihapot näytteestä. Alalla tunnetaan useita erilaisia menetelmiä nukleiinihappojen uuttamiseksi biologisista näytteistä. Katso esimerkiksi sellaiset, jotka Higuchi et al., 1989, teoksessa PCR Technology (toim. Erlich, Stockton Press, New York) ovat kuvanneet. Vaihtoehtoisesti, jos näyte on kohdalaisen helposti hajotettavissa, nukleiinihappoa ei tarvitse puhdistaa ennen amplifiointia PCR-menetelmällä, eli jos näyte koostuu soluista, erityisesti ääreisverilymfosyyteistä tai aminiosyyteistä, solunsisäisten komponenttien lyysaus ja dispersoiminen voidaan suorittaa pelkääntään suspendoimalla solut hypotoniseen puskuriin.

PCR:n jokainen kierros käsittää alukkeen pidentämisellä muodostuneen nukleiinihappodupleksin erottamisen. PCR-menetelmän edullisessa suoritusmuodossa säikeen erottaminen saavutetaan kuumentamalla reaktioseosta riittävän korkeaan lämpötilaan vaikuttavaksi ajaksi dupleksin denaturoitumisen aikaansaamiseksi, mutta joka ei aiheuta polymeraasin irreversiibeliä denaturoitumista (ks. US-patenttijulkaisu nro 4 965 188). Tyypillinen lämpödenaturoiminen käsittää lämpötilat, jotka ovat välillä noin 80 - 105 °C, sellaisen ajanjakson ajan, joka on välillä sekunneista minuutteihin. Säikeen erottaminen voidaan kuitenkin suorittaa millä tahansa sopivalla denaturointimenetelmällä käsittäen fysikaaliset, kemialliset tai entsyymaattiset menetelmät. Säikeen erottaminen voidaan indusoida esimerkiksi helikaasilla tai entsyymillä, joka pystyy osoittamaan helikaasiaktiivisuutta. Esimerkiksi entsyymillä RecA on helikaasiaktiivisuutta ATP:n läsnäollessa. Säikeen erottamiseen helikaaseilla sopivat reaktio-olosuhteet tunnetaan alalla (ks. Kuhn Hoffmann-Berling, 1978, CSH-Quantitative Biology 43:63 - 67 ja Radding, 1982, Ann. Rev. Genetics 16:405 - 436).

Riippumatta siitä, kuinka säikeiden erottaminen on aikaansaatu, sen jälkeen kun säikeet on erotettu, seuraava

vaihe PCR:ssä kuitenkin käsittää erotettujen säikeiden hybridisoimisen sellaisten alukkeiden kanssa, jotka reu-
nustavat kohdesekvenssiä. Alukkeet pidennetään sitten muo-
dostamaan kohdesäikeille komplementaarisia kopioita. On-
5 nistunutta PCR-amplifikaatiota varten alukkeet suunnitel-
laan niin, että se kohta, johon kukin aluke hybridisoituu
dupleksisekvenssissä, on sellainen, että pidennystuote,
joka syntetisoidaan yhdestä alukkeesta, kun se on erotettu
templaattista (komplementista), toimii templaattina toisen
10 alukkeen pidennykselle. Denaturoinnin, hybridisoinnin ja
pidennyksen käsittävää sykliä toistetaan niin monta kertaa
kuin on tarpeen, jotta saadaan haluttu määrä amplifioitua
nukleiinihappoa.

Templaattista riippuvaista alukkeiden pidentämistä
15 PCR:ssä katalysoidaan polymerisoivalla aineella riittävien
määrien neljää deoksiribonukleosiditriposfaattia (dATP,
dGTP, dCTP ja dTTP; dUTP:tä käytetään dTTP:n tilalla tai
lisäksi, jos UNG-sterilointijärjestelmä, joka kuvataan
20 alla, käytetään) läsnäollessa reaktioväliaineessa, joka
muodostuu sopivista suoloista, metallikationeista ja
pH-puskurijärjestelmästä. Sopivia polymerointiaineita ovat
entsyymit, joiden tiedetään katalysoivan templaattista
riippuvaista DNA-synteesiä. Esimerkkejä polymeraaseista,
jotka sopivat käytettäväksi DNA-templaatin kanssa, kä-
sittävät E. coli-DNA-polymeraasi I:n tai sen entsyymin
25 Klenowin fragmentin, T₄-DNA-polymeraasin ja Taq-polymeraas-
sin, lämpöstabiilin DNA-polymeraasin, joka on eristetty
Thermus aquaticusista. Viimeksimainittua entsyymiä käyte-
tään laajalti nukleiinihappojen amplifioinnissa ja sekven-
soinnissa. Reaktio-olosuhteet Taq-polymeraasien käyttä-
miseksi tunnetaan alalla, ja Gelfand on kuvannut ne teok-
30 sessa PCR Technology, 1989, supra. Polymerointiaineet,
jotka sopivat komplementaarisen, kopio-DNA-sekvenssin
(cDNA) syntetisointiin RNA-templaattista, ovat käänteis-
35 transkriptaasi (RT), sellainen kuten linnun myeloblasto-

sisvirus-RT tai *Thermus thermophilus*-DNA-polymeraasi, lämpöstabili DNA-polymeraasi, jolla on käänteistranskriptiivisaaktiivisuutta. Tyypillisesti RNA-templaatti hajotetaan lämmöllä ensimmäisen denaturointivaiheen aikana alkukäänteistranskriptiovaiheen jälkeen jättäen vain DNA-templaatin sen jälkeen suoritettavaa amplifiointia varten.

Jos on tarkoitus amplifioida 16S rRNA:ta, alkukäänteistranskriptiovaihe (RT) suoritetaan muodostamaan RNA:nDNA-kopio (cDNA). PCT-patenttihakemusjulkaisu nro WO 91/09944 kuvaa korkeassa lämpötilassa tapahtuvan käänteistranskription lämpöstabiiililla polymeraasilla, joka myös toimii PCR-amplifikaatiossa. Korkean lämpötilan RT tarjoaa suuremman alukespesifisyyden ja parantuneen tehokkuuden. Samat alukkeet ja polymeraasi voivat toimia sekä käänteistranskriptio- että PCR-amplifikaatiovaiheissa, ja reaktio-olosuhteet optimoidaan niin, että molemmat reaktiot tapahtuvat ilman reagenssien vaihtamista. *Thermus thermophilus*-DNA-polymeraasia, lämpöstabili DNA-polymeraasia, joka voi toimia käänteistranskriptiina, käytetään kaikissa alukkeen pidennysvaiheissa, templaattista riippumatta. Molemmat menetelmät voidaan suorittaa ilman, että putkea tarvitsee aukaista reagenssien vaihtamisen tai lisäämisen takia; vain lämpötilaprofiilia säädetään ensimmäisen syklin (RNA-templaatti) ja muiden amplifikaatiosyklilien (DNA-templaatti) välillä.

PCR-menetelmä voidaan suorittaa vaiheittain, jossa jokaisen vaiheen jälkeen lisätään uudet reagenssit, tai tavalla, jossa kaikki reagenssit lisätään samanaikaisesti, tai osittain vaiheittaisella tavalla, jossa tuoreita tai erilaisia reagensseja lisätään tietyn vaiheiden määrän jälkeen. Esimerkiksi jos säikeiden erottaminen indusoidaan lämmöllä ja polymeraasi on lämmölle herkkä, polymeraasia täytyy tällöin lisätä jokaisen säikeen erottamiskierroksen jälkeen. Jos kuitenkin esimerkiksi käytetään helikaasia denaturointiin tai jos lämpöstabili polymeraasia käytetään

tään pidentämiseen, tällöin kaikki reagenssit voidaan lisätä alussa tai vaihtoehtoisesti, jos reagenssien molaarisilla suhteilla on merkitystä reaktiolle, reagensseja voidaan täydentää aika ajoin samalla kun niitä kuluu synteesireaktiossa.

5 Alan ammattimies tietää, että PCR-menetelmä suoritetaan tavallisimmin automatisoituna menetelmänä käyttäen lämpöstabiilia entsyymiä. Tässä menetelmässä reaktioseoksen lämpötilaa kierrätetään denaturointialueen, alukkeen
10 liittämisalueen ja reaktioalueen kautta. Laite, joka on erityisesti suunniteltu käytettäväksi lämpöstabiilin entsyymin kanssa, on kaupallisesti saatavana Perkin Elmeriltä.

Alan ammattimies on myös tietoinen edellisistä
15 reaktioista peräisin olevan amplifioidun nukleiinihapon aiheuttamasta PCR:n kontaminaatio-ongelmasta. Menetelmät tämän ongelman vähentämiseksi mahdollistavat minkä tahansa edellisistä reaktioista peräisin olevan amplifioidun DNA:n entsyymaattisen hajottamisen. PCR-amplifikaatio suoritetaan
20 dUTP:n läsnäollessa dTTP:n sijasta. Näin saatava kaksisäikeinen, urasiilia sisältävä tuote on altis hajoamiselle urasiili-N-glykosylaasilla (UNG), kun taas normaali tymidiiniä sisältävä DNA ei hajoa UNG:llä. UNG:n lisääminen amplifikaatioreaktioseokseen ennen amplifioinnin aloittamista
25 hajottaa kaikki urasiilia sisältävän DNA:n, joka saattaisi toimia kohteena. Koska ainoa urasiilia sisältävän DNA:n lähde on amplifioitu tuote edellisestä reaktiosta, tämä menetelmä puhdistaa tehokkaasti reaktioseoksen, eliminoiden edellisistä reaktioista peräisin olevan kontaminaatio-ongelman (carryover). UNG muutetaan väliaikaisesti
30 lämmöllä inaktiiviseksi, näin denaturointivaiheet amplifikaatiomenetelmässä toimivat myös inaktiivoiden UNG:n. Tästä syystä muodostuu uusia amplifikaatiotuotteita yhdistämällä urasiilia UNG-vapaassa ympäristössä, ja ne eivät
35 hajoa.

Sekvenssille spesifisen koettimen hybridisointi on tärkeä vaihe näiden menetelmien onnistuneessa suorittamisessa. Tämän keksinnön mukaiset sekvenssille spesifiset oligonukleotidikoettimet hybridisoituvat erityisesti mykobakteerigenomin tietyn segmentin kanssa, ja niiden emäksillä tapahtuu vääriä pariutumisia muista organismeista peräisin olevien sekvenssien kanssa suvulle spesifisten koettimien kyseessä ollessa, ja muiden mykobakteerilajien kanssa lajispesifisten koettimien kyseessä ollessa aiheuttaen epästabiiliutta. Voidaan valita ankarat hybridisointiolosuhteet, niin että koettimet hybridisoituvat spesifisesti vain täysin komplementaarisiin sekvensseihin. Amplifioidun tuotteen osoittaminen käyttää hyväksi tätä sekvenssispesifistä hybridisoitumista varmistamaan, että vain oikea amplifioitu kohde havaitaan, vähentäen virheellisen positiivisen tuloksen mahdollisuutta, jonka aiheuttaa läheisistä organismeista peräisin olevien homologisten sekvenssien läsnäolo.

SSO-koettimien ja nukleiinihapposekvenssien välille muodostuneiden hybridien osoittamista varten olevat koemenetelmät voivat edellyttää, että koettimet sisältävät lisäpiirteitä hybridisoituvan alueen lisäksi. Esimerkiksi "dot blot" -formaatissa koettimet tavallisesti merkitään. Jos koetin immobilisoidaan ensin, kuten alla kuvatussa : 25 "käänteis-dot blot"-formaatissa, koetin voi myös sisältää pitkiä poly-dT-pidennyksiä, jotka voidaan kiinnittää nylonkantajalle säteilyttämällä, menetelmällä, joka on kuvattu yksityiskohtaisemmin PCT-patenttihakemusjulkaisussa nro 89/11 548.

30 Tässä kuvatut koettimet voidaan syntetisoida ja merkitä edellä kuvattuja menetelmiä oligonukleotidien syntetisoimiseksi käyttäen. Koetin voidaan esimerkiksi merkitä 5'-päässä ³²P:llä inkuboimalla koetinta ³²P-ATP:llä ja kinaasilla. Sopiva ei-radioaktiivinen merkki SSO-koettimille on piparjuuriperoksidaasi (HPR). Menetelmiä tämän 35

merkin sisältävien koettimien valmistamiseksi ja osoittamiseksi on kuvattu US-patenttijulkaisuissa nrot 4 914 210 ja 496 202. Lisäinformaatioksi tällaisten merkittyjen koettimien käytöstä katso US-patenttijulkaisu nro 5 4 789 630, Saiki et al., 1988, N. Eng. J. Med. 319:537 - 541 ja Bugawan et al., 1988, Bio/Technology 6:943 - 947. Käyttökelpoiset kromogeenit käsittävät punavalkoväriin ja 3,3',5,5'-tetrametyylilibentsidiinin (TMB). Helmuth, PCT Protocols, San Diego, California, Academic Press, Inc., 10 1990, ss. 119 - 128, kuvaa menetelmiä PCR-tuotteiden ei-isotooppiseksi osoittamiseksi.

Tässä kuvattuja koettimia voidaan käyttää määrittäessä, onko näytteessä nukleiinihapposekvenssejä, määrittämällä, sitoutuvatko koettimet näytteessä oleviin sekvensseihin. Alalla tunnetaan sopivia koemenetelmiä tämän keksinnön tarkoituksia varten osoitettaessa hybridejä, 15 jotka ovat muodostuneet koettimien ja näytteessä olevien nukleiinihapposekvenssien välille. Esimerkiksi osoittaminen voidaan suorittaa käyttämällä "dot blot" -formaattia, kuten esimerkissä 4 on kuvattu. "Dot blot" -formaattissa 20 merkitsemätön amplifioitu näyte sidotaan kiinteälle kantajalle, sellaiselle kuten membraani, membraania inkuboidaan merkityn koettimen kanssa sopivissa hybridisointiolosuhteissa, hybridisoitumaton koetin poistetaan pesemällä ja suodatinta tutkitaan sitoutuneen koettimen läsnäolon havaitsemiseksi. Analysoitaessa useita näytteitä muutamalla 25 koettimella, kuten sellaisessa tapauksessa, jossa näytteitä seulotaan mykobakteerinukleiinihapon läsnäolon havaitsemiseksi käyttämällä suvulle spesifisiä koettimia, "dot blot"-formaatti on hyvin käyttökelpoinen. 30

Vaihtoehtoinen menetelmä on hyvin käyttökelpoinen silloin kun on määrä käyttää suurta määrää erilaisia koettimia. Tämä menetelmä on "käänteis-dot blot", jossa amplifioitu sekvenssi sisältää merkin ja koetin sidotaan kiinteään kantajaan. Tässä formaatissa merkitsemättömät koet- 35

timet sidotaan membraaniin ja altistetaan merkitylle näytteelle sopivissa ankarissa hybridisointiolosuhteissa. Hybridisoitumaton merkitty näyte poistetaan sitten pesemällä sopivissa ankarissa olosuhteissa, ja suodatin tutkitaan sen jälkeen sitoutuneiden sekvenssien läsnäolon havaitsemiseksi. Koska lajien määrittäminen vaatii useiden lajispesifisten koettimien käyttöä jokaista amplifioitua näytettä kohti, tämän vaiheen edullinen koeformaatti on käänteis-"dot blot"-formaatti.

10 Vaihtoehtoisesti voi olla toivottavaa käyttää osoitusmenetelmää, jossa on useita koettimen hybridisointipaikkoja tai -kuoppia. Esimerkiksi kiinteä kantaja, sellainen kuten mikrotiitterilevy, on erityisen käyttökelpoinen näiden menetelmien suuren mittakaavan kliinisissä sovellutuksissa. Menetelmiä PCR-amplifioidun DNA:n hybridisoimiseksi/sieppaamiseksi tai kiinteitä kantajia tunnetaan. Eräässä näiden menetelmien suoritusmuodossa amplifioitu kohde-DNA merkitään (esim. biotiinilla) amplifikaation aikana PCR-reaktiossa. Merkitty DNA siepataan spesifisesti hybridisoimalla PCR-tuote kohdespesifiseen oligonukleotidisieppauskoettimeen, joka on sidottu mikrotiitterilevyn kuoppaan. Sitoutunut tuote osoitetaan sopivasti käytetyn merkin tyyppin mukaisesti. Esimerkiksi käytettäessä biotiinia merkinä lisätään avidiini-HRP-kompleksia ja
25 saatetaan reagoimaan joko (a) vetyperoksidisubstraatin ja O-fenyleenidiamiinikromogeenin (OPD) tai (b) vetyperoksidisubstraatin ja tetrametyylibentsidiinikromogeenin (TMB) kanssa. Kehittyy kolorimetrinen signaali mahdollistaen PCR-amplifioidun DNA:n kvantitatiivisen osoittamisen.

30 Kuten kliinisissä biokemiallisissa laboratorioissa on tehty, osoitusmenetelmät, joissa käytetään mikrotiitterilevykokeita, voidaan standardisoida useille erilaisille kohteille. Voi olla edullista käyttää osoituskoettimia, joiden pituus on vähemmän kuin 25 nukleotidiä. Lyhyemmät
35 koettimet minimoivat ristireaktiivisuuden mahdollisuuden

ja ne ovat erityisen käyttökelpoisia suuren mittakaavan seulontamenetelmissä. Tämän mukaisesti esimerkissä 8 kuvataan edullinen menetelmä Mycobacterium-lajien osoittamiseksi mikrotiitterilevyformaatilla. Alan ammattimies huomaisi, että koettimet, jotka ovat pitempiä kuin 25 nukleotidiä, sopivat yhtä hyvin mikrotiitterilevyosoitusmenetelmiin; kuitenkin voi olla tarpeen yksilöllisesti määrittää sopivat hybridisointi- ja ankaruusolosuhteet maksimaalisen spesifisyyden varmistamiseksi.

10 Toisessa sopivassa koejärjestelyssä lisätään merkittyä koetinta PCR-amplifiointimenetelmän aikana. Mikä tahansa koetin, joka hybridisoituu kohde-DNA:han jokaisen synteesivaiheen aikana, hajotetaan sellaisen polymeraasin 5'-3'-eksonukleaasiaktiivisuudella, jota käytetään katalysoimaan alukkeen pidennystä. Koettimen hajoamistuote osoitetaan sitten. Näin ollen hajoamistuotteen läsnäolo osoittaa, että hybridisoituminen koettimen ja kohde-DNA:n välillä tapahtui.

20 Tämä keksintö koskee myös testipakkauksia, useasäiliöisiä yksikköjä, jotka käsittävät edellä kuvatun alukkeiden parin. Käyttökelpoinen testipakkaus voi sisältää SSO-koettimia mykobakteerinukleiinihapon osoittamiseksi. Joissakin tapauksissa SSO-koettimet voidaan kiinnittää sopivaan kantajamembraaniin. Testipakkaus voi myös sisältää alukkeita PCR-amplifikaatiota varten. Testipakkauksen
: muut mahdolliset komponentit käsittävät esimerkiksi käänteistranskriptaasia tai polymeraasia, substraattinukleosiditriposfaatteja, keinoja merkitä (esimerkiksi avidiini-entsyymikonjugaatti ja entsyymisubstraatti ja kromogeeni, jos leima on biotiini) tai havaita merkki sekä sopivia
30 puskureita PCR-, käänteistranskriptio- tai hybridisaatioreaktioille. Edellä esitettyjen komponenttien lisäksi testipakkaus voi myös sisältää ohjeet keksinnön mukaisten amplifikaatio- ja osoitusmenetelmien suorittamiseksi.

Keksinnön edullisessa suoritusmuodossa testipak-
kaukset mykobakteereiden osoittamiseksi voivat sisäl-
tää positiivisia ja negatiivisia kontrolleja. Edullisesti
positiivinen kontrolli käsittää nukleiinihapposekvenssin,
5 joka on amplifioitavissa käyttämällä samaa alukeparia,
jota käytetään amplifioimaan mykobakteerinukleiinihappoja
koenäytteessä. Sellaisia menetelmiä positiivisen kontrol-
lin käyttämiseksi tunnetaan, joissa sekä kohde, joka voi
olla läsnä tai puuttua, että positiivinen kontrolli käyt-
10 tävät samaa alukeparia. Edullisesti positiivinen kontrolli
on suunniteltu niin, että tuote-DNA on kooltaan erilainen,
helposti erotettavissa kohteen koosta.

Toisena näkökohtana tässä kuvataan positiivinen
kontrolli, joka kykynee hybridisoitumaan koettiin, su-
15 vulle spesifisten mykobakteerikoettimien sekä lajispesi-
fisten mykobakteerikoettimien osoittamiseksi. Esimerkissä
9 kuvataan positiivisen kontrollinukleiinihapon konstruoii-
minen.

Kuten tässä on kuvattu, voi olla toivottavaa käyt-
20 tää hyväksi toista amplifikaatiokohdetta, erityisesti sel-
vitettäessä epäselviä PCR- ja viljelmätietoja. Jos alan
ammattimiehelle esitetään tässä kuvatut tiedot sisäisen
positiivisen kontrollivektorin käytöstä, alan ammattimies
voisi helposti huomata, että sisäisiä positiivisia kont-
25 rolleja voitaisiin konstruoida lisää. Esimerkiksi positii-
vinen kontrolli voisi liittää alukekohtia sekä primääri-
seen (16S rRNA) että sekundääriseen kohteeseen (esim. 65
kDa:n proteiinigeeni) positiivisen kontrolli-DNA:n erilli-
sen segmentin hybridisoimiseksi ja sen jälkeiseksi ampli-
30 fioimiseksi.

Alla esitetyt tämän keksinnön mukaiset esimerkit on
tarkoitettu ainoastaan havainnollistamaan eikä rajoitta-
maan keksinnön suojapiiriä.

Esimerkki 1**Näytteen valmistus**

Nukleiinihapot eristetään yskösnäytteistä käyttäen IsoQuick™-järjestelmää, joka on kaupallisesti saatavilla MicroProbelta. Noin 10 ml yskösnäytettä nesteytetään/disinfektoidaan, pelletoidaan sentrifugoimalla ja suspendoidaan uudelleen noin 1 ml:aan puskuria BSA:n kanssa. Tästä näytteestä 200 - 500 µl sentrifugoidaan bakteerien pellettoimiseksi. Pelletit suspendoidaan uudelleen 100 µl:aan näytepuskuri A, liuotetaan sen jälkeen 100 µl:lla liuotusreagenssia 1. Lysaatit uutetaan sitten 7 tilavuudella reagensseja 2 ja 4 tilavuudella reagenssia 3 (reagenssit 1, 2 ja 3 yhdessä näytepuskurin A kanssa toimitetaan IsoQuick™-järjestelmän mukana). Näyte sentrifugoidaan ja jälkeempään lisätään 1/3 tilavuutta 10 M NH₄Ac:a vesifaasiin ja DNA saostetaan yhtä suurella tilavuudella isopropanolia. Pelletoitu DNA pestään 70-%:isella EtOH:lla, kuivataan ilmassa ja suspendoidaan uudelleen 100 µl:aan TE:tä, pH 8,0. 50 µl:n tilavuus kutakin DNA-valmistetta käytetään amplifikaatioreaktiossa.

Esimerkki 2**Mykobakteeri-DNA:n amplifikaatio**

Pääreagenssiseos valmistetaan niin, että jokainen reaktio sisältää seuraavat reagenssit: 25 pmol kutakin aluketta, 10 nmol kutakin dNTP:tä, 2X PCR-puskuria (10X puskuri = 500 mM KCl, 500 mM Tris-HCl, pH 8,9, 20 mM MgCl₂), 3 yksikköä Taq-polymeraasia, 2 yksikköä UNG:tä ja H₂O:tä, jotta saadaan 50 µl:n reaktioseos reaktiota kohditi. Tämä pääseos peitetään 50 µl:lla mineraaliöljyä, ja DNA-näyte lisätään reaktioseokseen öljykerroksen alle. Jos on tarpeen, lisätään H₂O:tä 100 µl:n kokonaisreaktiotilavuuden saamiseksi.

DNA amplifioidaan Perkin Elmer Thermal Cyclersissä. Thermal Cyclers ohjelmoidaan käymään läpi 37 kierrosta denaturointia, alukkeen liittämistä ja alukkeen pidentämistä.

tä, kaksi kierrosta 98 °C:ssa, 62 °C:ssa ja 72 °C:ssa kussakin yhden minuutin ajan, joita seuraa 35 kierrosta 94 °C:ssa, 62 °C:ssa ja 72 °C:ssa yhden minuutin ajan kussakin. Perkin Elmer Thermal Cycler ohjelmoidaan liuottamaan näytteitä 72 °C:ssa epämääräisen ajan viimeisen kierroksen jälkeen varmistamaan, että lopullinen pidentäminen on mennyt loppuun ja pitämään UNG-entsyymi inaktiivisena, jos käytetään UNG-puhdistusjärjestelmää. Amplifikaatiotuotteet voidaan sitten analysoida geelielektroforeesilla ja/tai "dot blot" -hybridisaatiolla. Jos suoritetaan analyysi geelielektroforeesilla, lisätään noin 10 µl 10X näy-
10 tepuskuria (0,25 % ksyleenisyanolia, 0,25 % bromifenolisinistä, 25 % Ficollia) ja mineraaliöljy uutetaan ja Taq-polymeraasi inaktivoidaan 100 µl:lla kloroformia.

15 **Esimerkki 3**

"Dot blot"-formaatti

Amplifioidun näytteen alkuseulonta osoittaa Mycobacteriumin nukleiinihapon läsnäolon. "Dot blot"-formaattissa pieni osa amplifioitua DNA:ta denaturoidaan, laitetaan
20 nailonsuodattimelle ja immobilisoidaan kuten alla kuvataan. Suodatin upotetaan sitten koetinliuokseen hybridisoitumisen yhteen merkityistä koettimista mahdollistamiseksi. Jokainen koettimista voidaan merkitä radioaktiivisesti, mutta voidaan myös käyttää koettimia, jotka on kovalenttisesti konjugoitu piparjuuriperoksidaasiin (HRP)
25 ei-isotooppisen osoittamistavan tarjoamiseksi kromogeenisen tai kemiluminesenssisubstraatin läsnäollessa. Immobilisoitu kohde-DNA hybridisoidaan kahden suvulle spesifisen koettimen KY101 ja KY102 seokseen. Koska tutkittavien
30 näytteiden lukumäärän oletetaan ylittävän suuresti koettimen lukumäärän (kahden koettimen yksi seos), "dot blot"-formaatti on tarkoituksenmukaisiin tätä alkuseulontaa varten. Suuri määrä erilaisia näytteitä voidaan hybridisoida erillisille kohdille yksittäisessä kiinteässä kantajassa

ja samanaikaisesti altistaa merkityille koettimille upottamalla kantaja koetinliuokseen.

Amplifikaatio suoritetaan kuten esimerkissä 2. PCR-tuote denaturoidaan sitten käsittelemällä alkalilla. 5 μ l:aan PCR-tuotetta lisätään 5 μ l 0,5 M EDTA:a, pH 8,0, 8 μ l 5 N NaOH:a ja 82 μ l H₂O:tä. Seoksen annetaan seisoa huoneenlämpötilassa 10 minuuttia täydellisen denaturoitumisen aikaansaamiseksi.

BioDyne™B-nailonsuodattimet (Pall Corp., Glen Cove, NY) valmistetaan upottamalla H₂O:een 5 - 10 minuutiksi ja edelleen huuhtelemalla 200 μ l:lla H₂O:tä sen jälkeen kun "dot blot"-monistaminen (Bio-Dot™ Bio Radilta, Richmond, CA) on suoritettu. Denaturoinnin jälkeen 100 μ l näyte-seosta laitetaan vakuumissa nailonmembraanille käyttäen "dot blot" -laitetta. Jokainen kuoppa huuhdellaan sitten 200 μ l:lla 0,4 N NaOH:a, sen jälkeen huuhdellaan nopeasti 2X SSC:llä ja kuivataan ilmassa kunnes jäljellä ei ole nestettä. DNA immobilisoidaan ja ristisidotaan nailonsuodattimelle ultraviolettisäteilytyksellä 1 200 mJ/cm²:n vuolla Stratalinker™-UV-valolaatikolla (Stratagene, La Jolla, CA) ("autoristisidonta"-asetuksella).

Suodattimet "esihybridisoidaan" upottamalla hybridisaatiopuskuriin (0,5X SSC, 5X Denhardtin liuosta, 0,1 % SDS, 50 μ g/ml lohensperman DNA:ta) lämmöllä suljettavissa pakkauksissa 60 °C:ssa (ilmaravistin) vähintään 30 minuutin ajan. Jos käytetään radioaktiivisesti merkittyjä koettimia, puskuri korvataan tällöin yhtäsuurella määrällä samaa liuosta, joka sisältää 1 x 10⁶ cpm koetinta, ja suodattimen annetaan hybridisoitua 2 tunnista yön yli 60 °C:ssa.

Hybridisoinnin jälkeen suodattimet pestään kolme kertaa 2X SSC/0,1 % SDS:ssa, kahdesti 20 minuutin ajan huoneenlämpötilassa ja sen jälkeen kerran 20 minuutin ajan ankarassa lämpötilassa 71 °C ravistettavassa vesihauteessa. Suodattimet kuivataan sen jälkeen imupaperilla kuivik-

si, kääritään muovikääreeseen ja valotetaan röntgenfilmille -70 °C:ssa yhden tai kahden vahvistuslevyn avulla.

Toinen mahdollinen tapa näkyväksi tekemiselle on hybridisoida piparjuuriperoksidaasilla konjugoitujen oligonukleotidikoettimien kanssa, jotka on valmistettu kuten Levenson ja Chang, 1989, teoksessa PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (toimittajat Innis et al., Academic Press. San Diego), sivut 92 - 112 ja Saiki et al., 1988, N. Eng. J. Med. 319:537 - 541 ovat kuvanneet. Hybridisointi suoritetaan 2 pmoollilla HRP-SSO-koetinta 5 ml:aa hybridisointiliuosta kohti.

Pesemisen jälkeen suodattimet, jotka on määrä kehittää kromogeenisella värisubstraatilla, huuhdellaan 100 mM natriumsitraatissa, pH 5,0, laitetaan sen jälkeen 100 mM natriumsitraattiin, pH 5,0, joka sisältää 0,1 mg/ml 3,3',5,5'-tetrametyyllibentsidiiniä millilitraa kohti (Fluka) ja 0,0015 prosentista vetyperoksidia, ja inkuboidaan varovasti sekoittaen 10 - 30 minuuttia huoneenlämpötilassa. Kehitetyt suodattimet huuhdellaan vedessä ja kuvataan välittömästi. TMB-osoitusjärjestelmä valmistetaan ja sitä käytetään olennaisesti kuten AmpliType® DQalpha DNA-tyypitys-testipakkauksessa on kuvattu, jonka on kehittänyt ja valmistanut Hoffman-La Roche ja joka on saatavilla Perkin Elmeriltä. Toisessa suoritusmuodossa suodattimet kehitetään kemiluminesenssiosoitusjärjestelmällä (ECL; Amersham; Arlington Heights, IL). Suodattimet huuhdellaan PBS:ssa 5 minuuttia ja laitetaan ECL-liuokseen 1 minuutiksi varovasti sekoittaen. Suodattimet valotetaan sitten röntgenfilmille huoneenlämpötilassa 1 - 5 minuuttia.

Esimerkki 4

Käänteis-"dot blot"-formaatti

Lajien identifiointi vaatii jokaisen näytteen altistamisen erilaisille lajispesifisille koettimille; identtisyys osoitetaan sillä, mitkä koettimista sitoutuvat näyte-DNA:han. Koska jokainen näyte altistetaan useille

koettimille, käänteis-"dot blot"-formaatti on tarkoituk-
senmukaisempi. Koettimet kiinnitetään erillisille paikoil-
le membraanilla ja sen jälkeen koko membraani upotetaan
liuokseen, joka sisältää amplifioidun kohde-DNA:n, jotta
5 hybridisoituminen membraaniin sitoutuneisiin koettimiin on
mahdollista. Käänteis-"dot blot"-menetelmä on kuvattu yh-
tä aikaa vireillä olevissa hakemuksissa nrot 197 000 ja
347 495, julkaisussa Proc. Natl. Acad. Sci. 86:6230 -
6234, 1989, Saiki et al. ja AmpliType^R DQalpha DNA-tyyppi-
10 tys-testipakkauksessa, jonka on kehittänyt ja valmistanut
Hoffmann-La Roche, ja joka on saatavana Perkin Elmerin
kautta. Amplifikaatioalukkeet biotinyloidaan, kuten Leven-
son ja Chang, 1989, supra, ovat kuvanneet, niin että mikä
tahansa amplifioitu DNA, joka hybridisoituu membraaniin
15 sidottuihin koettimiin, voidaan osoittaa helposti.

Eräässä suoritusmuodossa osoittaminen suoritetaan
saattamalla streptavidiniin konjugoitu piparjuuriperoksi-
daasi (SA-HRP) reagoimaan minkä tahansa biotinyloidun
(alukkeiden kautta), amplifioidun DNA:n kanssa, joka on
20 hybridisoitunut membraaniin sitoutuneeseen koettimeen.
Näin HRP sitoutuu SA-biotiinivuorovaikutuksen välityksellä
amplifioituun DNA:han, ja sitä voidaan käyttää muodosta-
maan signaali erilaisilla hyvin tunnetuilla menetelmillä,
sellaisilla kuten muodostamalla värillinen yhdiste, esim.
25 hapettamalla tetrametyylibentsidiini (ks. US-patenttijul-
kaisu nro 4 789 630).

Vaikka koetin voidaan kiinnittää membraaniin millä
tahansa menetelmällä, edullinen menetelmä käsittää oligo-
nukleotidikoettimen hybridisoituvan alueen "hännittämisen"
30 paljon pitemmällä poly-dT-sekvenssillä. Näin saatava poly-
dT-"häntä" voidaan sitten saattaa reagoimaan nailonmemb-
raanilla olevien amiiniryhmien kanssa koettimen kiinnittä-
miseksi kovalenttisesti membraaniin. Tätä reaktiota voi-
daan helpottaa UV-säteilytyksellä.

Terminaalista deoksiribonukleotidyylitransferaasia (TdT, Ratliff Biochemicals, alla esitettyihin reaktioihin käytetään konsentraatiossa, joka on noin 120 yksikköä/ μ l, joka on 100 pmoolia/ μ l) voidaan käyttää muodostamaan poly-dT-häntä koettimeen, vaikka hännitetty koetin voidaan myös syntetisoida kaupallisesti saatavalla DNA-syntetisaattorilla. Käytettäessä DNA-syntetisaattoria hännitetyn koettimen valmistamiseksi tulisi häntä kuitenkin liittää koettimen 5'-päähän, niin että ei-toivottu ennenaikainen ketjun päättyminen tapahtuu pääasiallisesti hännän alueella.

TdT-reaktiot tulisi suorittaa noin 100 μ l:n tilavuudessa sisältäen 1X TdT-suoloja, 200 pmoolia oligonukleotidia, 800 μ M DTT:tä ja 60 yksikköä TdT:tä. 10X TdT-suolat ovat 1 000 mM K-kakodylaattia, 10 mM CoCl_2 :a, 2 mM ditiotreitolia, 250 mM Tris-Cl:a, pH 7,6, ja se valmistetaan kuten Roychoudhury ja Wu-julkaisussa Meth. Enzymol. 65:43 - 62 ovat kuvanneet, ja johon tässä viitataan. Voidaan valmistaa 8 mM dTTP:n 10X-varastoliuos (neutraloitu pH:hon 7 NaOH:lla) mukavuuden vuoksi.

TdT-reaktio tulisi suorittaa 37 °C:ssa kaksi tuntia ja sen jälkeen pysäyttää lisäämällä 100 μ l 10 mM EDTA:a, pH 8. Hännitetyn oligonukleotidin lopullinen konsentraatio on 1 μ M (1 pmoolia/ μ l) ja homopolymeerihännän pituus on noin 400 tähdettä. Hännän pituutta voidaan muuttaa säätämällä dTTP:n molaarista suhdetta oligonukleotidiin. Hännitettyjä koettimia voidaan varastoida -20 °C:ssa käyttöön asti.

Eduellinen nailonmembraani käänteis-"dot blot"-formaattia varten on Biodyne™B-nailonmembraani, 0,45 mikronin huokoskoko, valmistaja Pall ja jota myös myy ICN BioTrans™-nailonmembraanina. Koettimet voidaan spotata membraanille erittäin tarkoituksenmukaisesti Bio-Dot™-"dot blot"-laitteella, jota valmistaa BioRad. Jokainen koetin spotataan ainutkertaiseen, erilliseen kohtaan membraanilla. Noin 2 -10 pikomoolia jokaista hännitettyä koetinta sekoi-

tetaan ensiksi 50 - 100 μ l:n kanssa TE-puskuria, ennen kuin sitä laitetaan "dot blot"-laitteeseen. "Dot blottauksen" jälkeen membraani laitetaan lyhyeksi aikaa absorbtio-paperille ylimääräisen liuoksen poisvetämiseksi. Sen jälkeen membraani laitetaan UV-valolaatikon sisälle, sellaisen kuten Stratalinker™-valolaatikko, jota valmistaa Stratagene, ja se altistetaan 50 - 60 millijoulea/cm²:n vuolle 254 nm:ssä kiinnittämään hännitetty koetin nailonmembraanille. Nopean huuhtomisen jälkeen (noin 15 minuuttia hybridisointiliuoksessa) sitoutumattoman koettimen poistamiseksi, membraani on valmis hybridisoitavaksi biotinyloidun PCR-tuotteen kanssa.

Amplifioidut PCR-tuotteet denaturoidaan kuumentamalla 95 °C:seen 3 - 10 minuutiksi, ja 40 μ l denaturoitunutta PCR-tuotetta lisätään jokaiseen koetinpaneeliin hybridisointia varten. Hybridisointi suoritetaan 57 °C:ssa 20 minuutin ajan ravistaen vesihauteessa hybridisointipuskurissa, joka muodostuu 0,5X SSC:stä, 0,25 % SDS:stä ja 5X Denhardtin liuoksesta. Hybridisointipuskuri korvataan 3 ml:lla liuosta, joka muodostuu 25 μ l:sta SAHRP:a, joka on kaupallisesti saatavana Perkin Elmeriltä, 3,1 ml:ssa hybridisointipuskuria, ja inkuboidaan 20 minuuttia 57 °C:ssa ravistaen vesihauteessa.

Peseminen suoritetaan pesupuskurissa, jossa on 2X SSC:tä ja 0,1 % SDS:ää. Membraanin nopean huuhtelemisen jälkeen 10 ml:ssa pesupuskuria suoritetaan 12 minuutin voimakas pesu 10 ml:ssa puskuria 57 °C:ssa. Toinen 5 minuutin pesu huoneenlämpötilassa suoritetaan sen jälkeen, jota seuraa 5 minuutin pesu 10 ml:ssa 0,1 M natriumsitraattia, pH 5,0.

Kromogeenin sitominen suoritetaan 5 ml:ssa kromogeeniliuosta, joka muodostuu 5 ml:sta 0,1 M natriumsitraattia, 5 μ l:sta 3-%:ista vetyperoksidia ja 0,25 ml:sta kromogeenia (TMB Perkin Elmeriltä) 25 - 30 minuuttia huoneenlämpötilassa. Kolme 10 minuutin pesua tislatussa ve-

dessä suoritetaan huoneenlämpötilassa. Jälkipesu 1X PBS:llä huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan voi voimistaa signaalin laatua. Niiden vaiheiden aikana, joissa kromogeenia on läsnä, membraanin tulisi olla suojattu valolta
5 alumiinikalvopäällyksellä. Kehitetty membraani tulisi valokuvata pysyväksi tallenteeksi.

Esimerkki 5

Mykobakteerien DNA:n osoittaminen

Mykobakteerien DNA:n osoittaminen suoritettiin amplifioimalla suvulle spesifisten alukkeiden KY18 (SEQ ID
10 NO:1) ja KY75 (SEQ ID NO:2) biotinyloitujen muotojen kanssa käyttämällä edellä esimerkissä 2 kuvattua menetelmää, jota seurasi hybridisointi suvulle spesifisiin koettimiin KY101 (SEQ ID NO:3) ja KY102 (SEQ ID NO:4) käyttämällä
15 edellä esimerkissä 3 kuvattua "dot blot"-koetta. Ylävirran alukseen KY18 (SEQ ID NO:1) ja alavirran alukseen KY75 (SEQ ID NO:2) hybridisoituvien alueiden sekvenssit on esitetty taulukossa 1 edellä. Suvulle spesifisten alukkeiden KY101 (SEQ ID NO: 3) ja KY102 (SEQ ID NO:4) hybridisoituvien alueiden sekvenssit on esitetty taulukossa 2 edellä.
20

Suvulle spesifisiä alukkeita KY18 (SEQ ID NO.1) ja KY75 (SEQ ID NO.2) käytettiin polymeraasiketjureaktioamplifikaatioissa (PCR) amplifioimaan nukleiinihappo 15:sta Mycobacterium-lajista. Tulokset on esitetty taulukossa 4.
25 Kuten oletettiin KY18 (SEQ ID NO. 1)/KY75 (SEQ ID NO. 2) amplifioi DNA:n kaikista muista Mycobacterium-lajeista paitsi M. simiaesta. M. simiaen tai M. chitaen DNA:n amplifioitumista ei odotettu, koska KY75:n (SEQ ID NO.2) 3'-pään emäksistä neljä viidestä eroaa M. simiaesta
30 ja 3'-pään emäksistä kaksi eroaa M. chitaesta. Koska M. simiaen liittyminen ihmisen sairauteen on kuitenkin raportoitu harvoin, osoittaminen ei ole kliinisesti tärkeää. Poikkeuksena M. xenopin ja M. terraen DNA, kaikki hybridisoitunut amplifioitu mykobakteerien DNA osoitettiin hyb-

ridisoimalla suvulle spesifisiin koettimiin KY101 (SEQ ID NO.3) ja KY102 (SEQ ID NO.4).

Taulukko 4

5 **Erilaisista mykobakteerilajeista peräisin olevan DNA:n
amplifikaatio ja hybridisointi suvulle spesifisiin koetti-
miin**

	Mykobakteeri	Amplifikaatio	Hybridisoituminen
10	<i>M. tuberculosis</i>	+	+
	<i>M. scrofulaceum</i>	+	+
	<i>M. fortuitum</i>	+	+
	<i>M. avium</i>	+	+
	<i>M. kansasii</i>	+	+
15	<i>M. intracellulare</i>	+	+
	<i>M. phlei</i>	+	+
	<i>M. smegmatis</i>	+	+
	<i>M. marinum</i>	+	+
	<i>M. favescens</i>	+	+
20	<i>M. xenopi</i>	+	-
	<i>M. simiae</i>	-	-
	<i>M. chelonae</i>	+	+
	<i>M. gordonae</i>	+	+
	<i>M. terrae</i>	+	-

25

Näiden alukkeiden spesifisyys testattiin yrittämällä amplifioida DNA 22 erilaisesta ei-mykobakteerilajista. Amplifikaatiotuotteita saatiin vain *Corynebacter Diphtheriae* ja *Corynebacter xerosis*in, *Nisseria sicca*in ja *Propionibacterium acnes*in DNA:sta. Nämä amplifikaatiotuotteet eivät kuitenkaan hybridisoituneet suvulle spesifisten koettimien kanssa, niin että ei saatu yhtään väärää positiivisia tuloksia. Testatut organismit on esitetty taulukossa 5 alla.

30

Taulukko 5

Ei-mykobakteeriorganismeista peräisin olevan DNA:n amplifikaatio

	Organismi	Amplifikaatio	Hybridisoituminen
5	<i>Bordatella pertussis</i>	-	-
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	-	-
	<i>Corynebacter diphtheriae</i>	+	-
	<i>Corynebacter xerosis</i>	+	-
10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
	<i>Legionella pneumophila</i>	-	-
15	<i>Neisseria gonorrhoea</i>	-	-
	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	-
	<i>Neisseria sicca</i>	+	-
	<i>Propionibacterium acnes</i>	+	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
20	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
	<i>Serratia marcescens</i>	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-
25	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	-	-
	<i>Streptomyces rubiginosis</i>	-	-
	<i>Treponema pallidum</i>	-	-

Esimerkki 6

30 **Lajien identifiointi**

Kun mykobakteerien nukleiinihappo on osoitettu kliinisessä näytteessä, se laji, josta nukleiinihappo on peräisin, voidaan määrittää hybridisaatiolla lajille spesifisten koettimien kanssa käyttäen esimerkin 4 mukaista käänteis-"dot blot"-formaattia. Kliinisesti mielenkiintoi-

35

set lajit, jotka on määrä osoittaa tällä järjestelyllä, ovat *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* ja *M. tuberculosis*. Lisäksi *M. gordonae*n osoittaminen on toivottavaa, koska tämä organismi löydetään usein klinisistä näytteistä.

Kuvassa 1 esitetään taulukossa 3 esitetyistä koettimista valittujen lajispesifisten koettimien spesifisyyskokeen tulokset. Jokaisen koettimen hybridisoituvan alueen sekvenssi yhdessä oletetun spesifisyyden kanssa on esitetty taulukossa 3 edellä. Amplifioituja tuotteita 13 erilaisten *Mycobacterium*-lajin puhdisteusta DNA:sta käytettiin testaamaan sekä suvulle spesifisten että lajispesifisten koettimien spesifisyyttä. Jokaiselle lajille amplifioitiin 1 pg DNA:ta, joka oli puhdistettu viljellyistä bakteereista (noin 300 bakteerigenomin ekvivalentti), kuten esimerkiksi 2, käyttäen biotinyloituja alukkeita. Koettimen hybridisoitumisen havaitseminen suoritettiin käyttäen esimerkkinä 4 mukaista käänteis-"dot blot"-formaattia. Amplifioitun DNA:n läsnäolon positiiviseksi kontrolliksi sisällytettiin suvulle spesifisiä koettimia koeliuskoille yhdessä lajispesifisten koettimien kanssa.

Esimerkki 7

Mykobakteerien 16S rRNA:n amplifikaatio

16S rRNA voidaan amplifioida ensin muodostamalla cDNA käänteistranskriptiolla ja amplifioimalla cDNA. Käytetään samoja alukkeita kuin esimerkissä 2 edellä. Tässä esimerkissä sekä korkeassa lämpötilassa tapahtuva käänteistranskriptio että PCR-amplifikaatio suoritetaan lämpöstabiilin *Tth*-polymeraasin kanssa.

Käänteistranskriptio suoritetaan 20 μ l:n tilavuudessa sisältäen seuraavat komponentit: 8 μ l H_2O :tä, 2 μ l 10X RT-reaktiopuskuria (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 ja 900 mM KCl), 2 μ l 10 mM $MnCl_2$:a, 2 μ l dNTP-liuosta (2 mM jokaista dATP, dCTP, dGTP ja dTTP H_2O :ssä, pH 7,0), 2 μ l "alavirran" aluketta (7,5 mM H_2O :ssä), 2 μ l 0,18 μ M *Tth*-polymeraasia

1X varastopuskurissa (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 % Tween 20 (Pierce Surfactants), 50 % (til./til.) glyseroli) ja 2 μ l templaatti-RNA-liuosta (<250 ng 10 mM Tris-HCl:ssa ja 1 mM EDTA:ssa).
5 Kaikki liuokset, jotka eivät sisällä Trisiä käsitellään dietyylipyrokarbonaatilla (DEPC) kaiken kontaminoivan ribonukleaasin poistamiseksi, kuten Maniatis et al. teoksessa Molecular Cloning, a Laboratory Manual (Cold Springs Harbor Laboratory, New York), 1982, sivulla 190 ovat kuvanneet. Käänteistranskriptio suoritetaan 72 °C:ssa 5 minuutin ajan termosyklarissa. Reaktio pysäytetään jäähdettämällä reaktioseos 4 °C:seen jäällä.

PCR-amplifikaatio suoritetaan seuraavilla lisätyillä reagensseilla: 2 μ l jäljellä olevaa aluketta (7,5 mM H₂O:ssä), 2 μ l dNTP-liuosta (10 mM jokaista dATP, dCTP, dGTP ja dTTP H₂O:ssä, pH 7,0), 8 μ l 10X PCR-reaktiopuskuria (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1 mM KCl, 18,75 mM MgCl₂, 7,5 mM EGTA ja 50 % (til./til.) glyseroli) ja 68 μ l DEPC:llä käsiteltyä H₂O:tä. Nukleinihappo amplifioidaan Perkin Elmer
15 Thermal Cyclerissä käyttäen samaa lämpöprofiilia kuin esimerkissä 2. Amplifioitu tuote analysoidaan kuten aikaisemmissa esimerkeissä.

Esimerkki 8

Mikrotiitterilevykoe Mycobacteriumien osoittamiseksi
25 **si**

Tässä keksinnön suoritusmuodossa koetin kiinnittää mikrotiitterilevyn kuoppaan. Amplifioitu kohde-DNA hybridisoidaan sidottuun koettimeen kuten edellä on kuvattu. Kuten edellisessä esimerkissä amplifikaatioalukkeet
30 biotinyloidaan sidottuihin koettiin hybridisoituvan amplifioidun DNA:n osoittamisen mahdollistamiseksi.

BSA:iin konjugoituneiden haluttujen koettimien annettiin ensin adsorboitua yksittäisten kuoppien muovipinnoille. Kuopat blokattiin sitten proteiinilla, sellaisella

kuten naudan seerumin albumiini. Edullisesti käytetään 96-kuoppaisia lyvyjä, joita saadaan Corningilta.

Sen jälkeen kun amplifikaatio on suoritettu loppuun, PCR-putket poistettiin termosykleristä (Perkin Elmer). 100 mikrolitraa denaturointiliuosta lisättiin jokaiseen PCR-putkeen. Kutakin putkea varten käytetään uutta pipetin kärkeä. Eräässä suoritussuorituksessa osoittamasta ei voida suorittaa heti. Siinä tapauksessa PCR-putkia säilytettiin yön yli 2 - 8 °C:ssa. Denaturoidut amplifikaatio-reaktioseokset muuttuvat viskooseiksi varastoitaessa 2 - 8 °C:ssa. Putkia lämmitettiin nopeasti 25 - 30 °C:ssa ennen niiden aukaisemista pipetoinnin helpottamiseksi.

Sopiva määrä kahdeksankuoppaisia mikrotiitterilevyliuskoja (vähintään 2 liuskaa) poistettiin ja asetettiin mikrotiitterilevykehukseen. 100 mikrolitraa hybridisointipuskuria pipetoitiin mikrotiitterilevyn jokaiseen kuoppaan.

Denaturointiliuos sisältää 0,4 M NaOH:a; 80 mM EDTA:a ja 0,005 % Thymol-sinistä. Hybridisointi/neutralointipuskuri sisältää: 3 M NaSCN:a; 80 mM NaH₂PO₄:a; 10 mM NaH₂PO₄:a ja 0,125 % Tween 20:tä. Ennen käyttöä pH:n tarkastetaan olevan 5,0+/-0,2.

Käyttäen päistään suljettavaa monikanavaista pipettiä 25 µl denaturoitunutta amplifikaatioreaktioseosta jokaisesta tarjottimella olevasta PCR-putkesta pipetoitiin vastaavaan kuoppakohtaan mikrotiitterilevyllä. Levy peitettiin mikrotiitterilevykannella ja sitä kopautettiin varovasti sivulta 10 - 15 kertaa. Ne kuopat, joihin on suoritettu oikea reagenssien pipetointi, muuttuvat väriltään vaalean keltaisiksi. Jollei havaita ollenkaan muutosta tai havaitaan vain yksittäinen muutos siniseen väriin, on lisätty ylimäärin amplikonin. Koetta jatketaan, niin kauan kuin positiiviset OD-arvot kasvavat, mutta negatiiviset OD-arvot eivät muutu. Levyä inkuboitiin 60 minuuttia 37 °C:ssa. Alkuhybridisaation jälkeen 37 °C:ssa yhden tun-

nin ajan hybridisaatio/neutralointipuskuri poistettiin ja korvattiin samalla puskurilla, ja levyä inkuboitiin lisää 15 minuuttia 37 °C:ssa.

5 Inkuboinnin jälkeen levyä pestiin viisi kertaa pesuliuksella. Levyn pesu voidaan suorittaa käsin tai automatisoidulla asianmukaisesti ohjelmoidulla mikrotiitterilevypesurilla. Pesua varten käytettiin 1X PCR-pesupuskuria. 10X PCR-pesupuskurikonsentraatti valmistettiin seuraavasti: 9,94 grammaa litraa kohti kaksiemäksistä natriumfosfaattia; 4,41 grammaa litraa kohti natriumfosfaattia (yksiemäksinen); 3,722 grammaa litraa kohti EDTA:a; 10 87,66 grammaa litraa kohti natriumkloridia; 13,7 grammaa litraa kohti Tween 20:tä ja 10 grammaa litraa kohti Pro Clin 300:aa (Rohm ja Haas; Philadelphia, PA). Liuoksen pH 15 säädetään fosforihapolla (pH 6,5 - 7,1 on edullinen).

Käsin suoritettavaa pesua varten levyn sisältö tyhjennettiin ja ravistettiin kuivaksi. 300 mikrolitraa pesuliuosta lisättiin levyn jokaiseen testattavaan kuoppaan ja levyn annettiin kuivua 15 - 30 sekuntia. Levy tyhjennettiin jälleen ja ravistettiin kuivaksi. Tätä pesuprosessia 20 toistettiin neljä kertaa lisää.

Automatisoidussa mikrolevypesurissa käytettiin seuraavaa menetelmää. Kuoppien sisältö ilmastettiin. Pesuri ohjelmoitiin lisäämään 350 mikrolitraa työpesuliuosta jokaiseen testattavaan levyn kuoppaan ja niitä liuotettiin 25 30 sekuntia ja ilmastettiin. Vaiheita toistettiin neljä kertaa lisää. Sen jälkeen levy ravistettiin kuivaksi.

100 mikrolitraa konjugaattia lisättiin jokaiseen testattavaan levyn kuoppaan. Avidiini-HRP-konjugaatti valmistetaan seuraavasti. Laimennettu aine sisältää 0,1 molaarista; 0,25 % Emulsit 25:tä (DKS International, Inc., 30 Tokio, Japani), 1,0 % Kathon CG:tä (Rohm ja Haas, Philadelphia, PA), 0,1 % fenolia, 1,0 % naudan gammaglobuliinia. Liuoksen pH säädettiin 7,3:een konsentroidulla 35 HCl:lla. Tähän laimennettuun aineeseen lisättiin 10 nM

konjugoitua avidiinia (Vector Labs, Burlingame, CA). Levy peitettiin sen jälkeen ja sitten sitä inkuboitiin 50 minuuttia 37 °C:ssa ja jälleen pestiin kuten edellä on kuvattu. Työsubstraatti valmistettiin sekoittamalla 2,0 ml substraattia A ja 0,5 ml substraattia B jokaista kahden 8-kuoppaisen mikrotiitterilevyliuskan monikertaa (16 koetta) varten. Substraatti A sisältää 3 mM vetyperoksidia, 6,5 mM sitraattia ja 0,1 % Kathon CG:tä. Substraatti B sisältää 4,2 mM 3,3',5,5'-tetrametyyllibentsidiiniä ja 40 % dimetyylliformamidia. Työsubstraatti valmistettiin aikaisintaan kolme tuntia ennen käyttöä ja sitä säilytettiin suojassa suoralta auringonvalolta.

100 mikrolitraa työsubstraattia (substraattien A ja B seos) lisättiin jokaiseen testattavaan levyn kuoppaan. Levy peitettiin sen jälkeen ja sitä inkuboitiin pimeässä 10 minuuttia huoneenlämpötilassa (20 - 25 °C). 100 mikrolitraa Stop-reagenssia (5 % H₂SO₄) lisättiin jokaiseen testattavaan kuoppaan. Jokaisen kuopan absorbanssi 450 nm:ssä luettiin yhden tunnin sisällä Stop-reagenssin lisäämisestä. Absorbanssiarvo rekisteröitiin näytteelle ja kontrollille.

Esimerkki 9

Mykobakteerien nukleiinihappojen amplifiointi- ja osoittamismenetelmissä käyttökelpoisen positiivisen kontrollivektorin konstruointi

Syntetisoitiin oligonukleotidejä, jotka sisältävät lajispesifisiä koettimeen sitoutuvia sekvenssejä sekä niiden komplementtejä (KY178[SEQ ID NO. 24]-KY181[SEQ ID NO. 27] alla). (Nämä oligonukleotidit sisältävät tunnistuskoh-
tia restriktioentsyymeille kummassakin päässä helpottamaan kloonausta.) Yksi mikrogramma kumpaakin KY178 (SEQ ID NO. 24) ja KY179 (SEQ ID NO. 25) tai KY180 (SEQ ID NO. 26) ja KY181 (SEQ ID NO. 27) yhdistettiin, kuumennettiin 5 minuuttia 98 °C:ssa, jonka jälkeen inkuboitiin yksi tunti 75 °C:ssa komplementaaristen säikeiden toisiinsa liitty-

misen mahdollistamiseksi. Toisiinsa liitetyt tuotteet erotettiin jäljelle jääneistä yksisäikeisistä oligonukleotideistä elektroforeesilla 3 % Nusieve (FMC Products)/1 % agarosigeelin läpi. Kaksisäikeisten tuotteiden vyöhykkeet
5 leikataan irti ja DNA eluoidaan. DNA-fragmentit pilkotaan sen jälkeen sopivilla restriktioentsyymeillä ja ligatoidaan toisiinsa. Ligaatiotuotteet eristetään Nusieve/agarosigeelistä kuten edellä on esitetty.

Valmistettiin vastaanottava vektori. Vastaanottava
10 vektori oli plasmidi, johon M. tb 16S rRNA-geenin fragmentti, joka sisälsi alukkeen ja koettimen sitomiskohdat, on insertoitu ja se valmistettiin seuraavasti.

50 pikogrammaa M. tuberculosisin DNA:ta amplifioitiin käyttäen alukkeita KY70 (SEQ ID NO. 28) ja CR01 (SEQ
15 ID NO. 29) 50 pmol:n CR01:tä (SEQ ID NO. 29), 80 pmol:n KY70:tä (SEQ ID NO. 28), 20 nmol:n kutakin dNTP:tä, 2,5 yksikön Taq-polymeraasia ja 1 X PCR-puskuria (50 mM Tris-HCl, pH 8,9; 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) läsnäollessa kokonaisreaktiotilavuudessa 100 mikrolitraa. Termiset
20 kierrätysolosuhteet ovat kuten esimerkissä 2 on esitetty. Amplifikaatiotuotteet uutettiin 100 mikrolitralla kloroformia.

Amplifikaatiotuotteet ja vektori pBS(+) (Stratagene) pilkottiin molemmat restriktioendonukleaasilla Pst I,
25 uutettiin kerran fenoli/kloroformilla ja sen jälkeen saostettiin etanolilla. (CR01 sisältää Pst I-kohdan 5'-päässä ja amplifikaatiotuote sisältää sisäisen Pst I-kohdan alavirtaan mykobakteereille spesifisten alukkeiden ja koettimien sitoutumiskohdista.) Pst I:llä pilkottu vektori de-
30 fosforyloitiin käsittelemällä vasikansuolifosfataasilla (Maniatis), uutettiin fenoli/kloroformilla ja saostettiin etanolilla. Valmistetut amplifikaatiotuotteet ligatoitiin vektoriin standardiolosuhteissa (Maniatis).

Ligatoitu DNA transformoitiin kompetenttiin E.
35 coliin. Pesäkkeet, jotka sisälsivät plasmideja, jotka si-

sältävät halutun insertin, identifioitiin pesäke-täplä-hybridisaatiolla tb-spesifiseen koettiin KY21 (SEQ ID NO. 5) seuraavasti. Bakteerit levitettiin nitroselluloosa-suodatinlevylle, joka oli laitettu ravintoagarlevylle, ja niiden annettiin kasvaa yön yli. Suodatin poistettiin ja laitettiin peräkkäin (bakteeripuoli ylöspäin) 3MM suodatinpapereille, jotka oli kostutettu 10 % SDS:lla (3 minuuttia), 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl:lla (5 minuuttia), 0,5 M Tris-HCl, pH 8/1,5 M NaCl:lla (5 minuuttia) ja 2X SSC:lla (5 minuuttia). Suodattimet kuivattiin ilmassa. DNA ristisidottiin suodattimelle UV-säteilytyksellä ja sen jälkeen hybridisoitiin KY21:een (SEQ ID NO. 5) ja pestiin kuten esimerkissä 3 on kuvattu.

15 **Oligonukleotidisekvenssit:**

KY70-SEQ ID NO. 28

5' GCGGTACCTG CACACAGGCC ACAAGGGAA

CR01-SEQ ID NO. 29

5' CGCCTGCAGT TAACACATGC AAGTCGAACG G

20

Tämä vektori, jota kutsutaan pKY5:ksi, pilkottiin restriktioentsyymeillä Sty I ja Xho I 174 emäsparin fragmentin poistamiseksi, joka sisälsi lajispesifisen koettimen sitoutumiskohdan, mutta jättäen alukkeen ja suvulle spesifisen koettimen sitoutumiskohdat koskemattomiksi. Pilkottu plasmidi erotettiin 174 emäsparin fragmentista elektroforeesilla 1,5-%:isen alhaisessa lämpötilassa sulavan agarosigeelin läpi. Vektorin sisältävä vyöhyke leikattiin irti geelistä ja puhdistettiin kromatografisesti NACS-pylvään läpi (Bethesda Research Lab) ja etanolilla saostamalla. Inserttifragmentti, joka sisältää tunnistuskohdat lajispesifisille koettimille, ligatoidaan valmistettuun vektoriin. Ligaatiotuotteet transformoidaan kompetentteihin isäntäbakteereihin.

30

Transformantit, jotka sisältävät sopivat insertit, identifioidaan PCR-amplifikaatiolla. Transformanttibakteeripesäkkeet suspensoidaan uudelleen 0,5 ml:aan TE-puskuria. 50 mikrolitraa bakteerisuspensiota laitetaan PCR-reaktioputkiin, jotka sisältävät mykobakteeri-DNA:n 5
amplifikaatioon tarvittavat komponentit, ja amplifikaatio suoritetaan, kuten edellä on esitetty. Bakteerit, jotka sisältävät halutun insertin sisältävät plasmidit, tuottavat 640 emäsparin PCR-tuotteita käyttäen alukeparia KY18
10 (SEQ ID NO. 1) ja KY75 (SEQ ID NO. 2). Bakteereiden, jotka sisältävät alkuperäisen pKY5-plasmidin, amplifikaatio tuottaa 584 emäsparin PCR-tuotteita.

Näin muodostetut amplikonit voidaan hybridisoida mykobakteereiden suvulle spesifisten ja lajispesifisten koettimien kanssa käänteis-"dot blot"-hybridisaatiolla, 15
kuten esimerkissä 4 on kuvattu, esimerkeissä kuvattujen suvulle spesifisten ja lajispesifisten koettimien hybridisaatiokohtien läsnäolon varmistamiseksi. Positiivinen kontrolliplasmidi voidaan valmistaa samalla tavalla hybridisoitavaksi sukukoettiin ja lajispesifisten koettimien valittuun alajoukkoon. Esimerkiksi testipakkauksen muodossa voi olla toivottavaa sisällyttää positiivinen kontrolliplasmidi tuberkuloosin erottamiseksi muista lajeista, sekvenssit KY178-KY181 (SEQ ID NOT 24-27) sisältävän positiivisen kontrolliplasmidin sisällyttämisen lisäksi. 25

Oligonukleotidisekvenssit:

30 KY178 - SEQ. ID NO. 24

5'	CCATCGATAG	GACCATTCTG	CGCATGTGGT
	TAGGACCACA	GGACACATGA	AGGCTCACTT
	CACTGGCGC	ATGCCTTGTG	GTGGAAAGCT

KY179 - SEQ. ID NO. 25

5'	TGCCTGGAA	GCTTCCACC	ACAAGGCATG
	CAACCCACAA	AGTGAGCCTT	CATGTGTCCT
5	ACCCACCACA	CCACATGCGC	AGAATGGTCC

KY180 - SEQ. ID NO. 26

5'	CCGCTCGAGA	CGGGATGCAT	GTCTTGTGGT
	CTTTAGGCGC	ATGTCTTTAG	GTGGAAAGCT
10	CTGGTGGAAA	GCTTTTGCAT	CGATGG 3'

KY181 - SEQ. ID NO. 27

5'	CCATCGATGC	AAAAGCTTTC	CACCAGAAGA
	TTCCACCTAA	AGACATGCGC	CTAAAGTTAC
15	CAAGACATGC	ATCCCGTCTC	GAGCGG 3'

Esimerkki 10**Positiivisen kontrolliplasmidin käyttö**

Positiivisen kontrolliplasmidin eräs käyttö on amp-

20 lifikaation tehokkuuden tarkkailussa missä tahansa spesi-

fisessä kokeessa. Tällaisissa sovellutuksissa valmistetaan

positiivisen kontrolliplasmidin sarjalaimennoksia. Plasmi-

din tunnettuja kopiomääriä voidaan käyttää templaatteina

amplifikaatioreaktioissa. Pienin määrä plasmidin DNA-mole-

25 kyylejä, joka voidaan amplifioida, antaa mitan amplifika-

tioreaktion tehokkuudelle. Toinen positiivisen kontrolli-

plasmidin käyttö on muodostaa tuotteita, joita voidaan

käyttää tarkkailtaessa tehokkuutta, jolla suvulle ja la-

jille spesifiset koettimet osoittavat mykobakteereiden

30 DNA:ta. Edellä kuvatulla tavalla muodostuneet amplifika-

tiotuotteet voivat toimia substraattina hybridisaatioreak-

tiossa. Sopivien hybridisaatiosignaalien muodostuminen

mahdollistaa sen arvioinnin, kuinka hyvin koettimet kykene-

vät osoittamaan mykobakteerien DNA:ta.

SEKVENSSILISTAUS

- SEQ ID NO:1:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

5

(A) PITUUS: 23 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:1:

10

CACATGCAAG TCGAACGGAA AGG 23

- SEQ ID NO:2:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

15

(A) PITUUS: 24 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:2:

20

GCCCCGTATCG CCCGCACGCT CACA 24

- SEQ ID NO:3:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

25

(A) PITUUS: 30 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:3:

30

TCGCGTTGTT CGTGAAATCT CACGGCTTAA 30

- (2) SEQ ID NO:4:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

35

(A) PITUUS: 30 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

- (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:4:
5 TCGCGTTGTT CGTGAAAAC TACAGCTTAA 30
- SEQ ID NO:5:N TIEDOT:
(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 36 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
10 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:5:
ACGGGATGCA TGTCTTGTGG TGGAAAGCGC TTTAGC 36
15
- SEQ ID NO:6:N TIEDOT:
(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 30 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
20 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:6:
ACTTGGCGCA TGCCTTGTGG TGGAAAGCTT 30
25
- (2) SEQ ID NO:7:N TIEDOT:
(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 30 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
30 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:7:
TTTAGGCGCA TGTCTTTAGG TGGAAAGCTT 30

- SEQ ID NO:8:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

- (A) PITUUS: 34 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:8:

TCAAGACGCA TGTCTTCTGG TGGAAAGCTT TTGC 34

- SEQ ID NO:9:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

- (A) PITUUS: 30 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:9:

TCCCGAAGTG CAGGCCAGAT TGCCACGTG 30

- (2) SEQ ID NO:10:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

- (A) PITUUS: 30 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:10:

GAAGGCTCAC TTTGTGGGTT GACGGTAGGT 30

- SEQ ID NO:11:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

- (A) PITUUS: 30 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:11:
GCAATCTGCC TGCACACCGG GATAAGCCTG 30

5 - SEQ ID NO:12:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 34 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

10 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:12:

GGGTCTAATA CCGAATAGGA CCACAGGACA CATG 34

15 - (2) SEQ ID NO:13:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 30 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

20 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:13:

TCGCGTTGTT CGTGAAATCT CACAGCTTAA 30

25 - SEQ ID NO:14:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 30 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

30 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:14:

TCGCGTTGTT CGTGGAATCT CACAGCTTAA 30

- SEQ ID NO:15:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 30 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

5 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:15:

TCGCGTTGTT CGTGGAATGC CACAGCTTAA 30

10

- SEQ ID NO:16:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 30 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

15 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:16:

ATAGGACCAT TCTGCGCATG TGGTGTGGTG 30

20

- SEQ ID NO:17:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 24 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

25 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:17:

ACCTCAAGAC GCATGTCTTC TGGT 24

30

- SEQ ID NO:18:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 24 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

35 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
(ix) SEKVENS SIN KUVAUS: SEQ ID NO:18:
CCGAATAGGA CCACAGGACA CATG 24

5 - SEQ ID NO:19:N TIEDOT:

(i) SEKVENS SIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 24 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

10 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENS SIN KUVAUS: SEQ ID NO:19:

ACCTTTAGGC GCATGTCTTT AGGT 24

15 - SEQ ID NO:20:N TIEDOT:

(i) SEKVENS SIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 24 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

20 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENS SIN KUVAUS: SEQ ID NO:20:

AACACTTGGC GCATGCCTTG TGGT 24

25 - SEQ ID NO:21:N TIEDOT:

(i) SEKVENS SIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 24 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

30 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENS SIN KUVAUS: SEQ ID NO:21:

GAAGGCTCAC TTTGTGGGTT GACG 24

- SEQ ID NO:22:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 24 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

5 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:22:

TGTGGTGGAA AGCGCTTTAG CGGT 24

10

- SEQ ID NO:23:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 24 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

15 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:23:

AGGACCATTC TGCGCATGTG GTGT 24

20

- SEQ ID NO:24:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 139 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

25 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:24:

CCATCGATAG GACCATTCTG CGCATGTGGT GTGGTGGGTC

30 TAATACCGAA TAGGACCACA GGACACATGA AGGCTCACTT TGTGGGTTGA 90

CGGTAGGTAA CACTTGCGCG ATGCCTTGTG GTGGAAAGCT TCCAAGGCA 139

- SEQ ID NO:25:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

35 (A) PITUUS: 139 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:25:

5 TGCCTTGAA GCTTCCACC ACAAGGCATG CGCCAAGTGT
TACCTACCGT CAACCCACAA AGTGAGCCTT CATGTGTCCT GTGGTCCTAT 90
TCGGTATTAG ACCCACCACA CCACATGCGC AGAATGGTCC TATCGATGG 139

- SEQ ID NO:26:N TIEDOT:

10 (i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 126 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

15 (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:26:

CCGCTCGAGA CGGGATGCAT GTCTTGTGGT GGAAAGCGCT
TTAGCGGTAA CTTTAGGCGC ATGTCTTTAG GTGGAAAGCT TAACTCAAGA 90
CGCATGTCTT CTGGTGGAAA GCTTTTGCAT CGATGG 126

20

- SEQ ID NO:27:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 126 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

25 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:27:

30 CCATCGATGC AAAAGCTTTC CACCAGAAGA CATGCGTCTT
GAGTTAAGCT TTCCACCTAA AGACATGCGC CTAAAGTTAC CGCTAAAGCG 90
CTTTCCACCA CAAGACATGC ATCCCGTCTC GAGCGG 126

- SEQ ID NO:28:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

35 (A) PITUUS: 29 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:28:

5

GCGGTACCTG CACACAGGCC ACAAGGGAA 29

- SEQ ID NO:29:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 31 emäsparia

10

(B) TYYPPI: nukleinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:29:

15

CGCCTGCAGT TAACACATGC AAGTCGAACG G 31

Patenttivaatimukset

1. Oligonukleotidialukkeiden pari, joka pystyy amp-
lificioimaan mykobakteerilajin 16S ribosomaalisen RNA:n gee-
5 nin tai vastaavan RNA:n kohdealueen, t u n n e t t u si-
ttä, että ensimmäinen aluke koostuu sekvenssistä KY18 (SEQ
ID NO. 1) ja toinen aluke koostuu sekvenssistä KY75 (SEQ ID
NO. 2).

2. Testipakkaus näytteessä olevan mykobakteerin
10 nukleiinihapon osoittamiseksi ja mahdolliseksi identifioi-
miseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patent-
tivaatimuksen 1 mukaisen alukeparin.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen testipakkaus,
t u n n e t t u siitä, että se lisäksi käsittää oligonu-
15 kleotidikoettimen, joka sisältää nukleiinihapposekvenssin,
joka kykenee hybridisoitumaan alukkeiden KY18 (SEQ ID NO.
1) ja KY75 (SEQ ID NO. 2) parilla amplifioidun 16S ribo-
somaalisen RNA:n geenin alueeseen.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen testipakkaus,
20 t u n n e t t u siitä, että mainittu koetin ei ole sek-
venssiltään identtinen minkään osoitettavan mykobakteerila-
jin sekvenssin kanssa.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 4 mukainen
testipakkaus, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi kä-
25 sittää vähintään yhden oligonukleotidikoettimen, joka on
valittu ryhmästä, joka koostuu alasekvenssistä, joka käsit-
tää vähintään 14 nukleotidiä sekvensseistä KY21 (SEQ ID NO.
5), KY25 (SEQ ID NO. 6), KY26 (SEQ ID NO. 7), KY63 (SEQ ID
NO. 8), KY151 (SEQ ID NO. 9), KY106 (SEQ ID NO. 10), KY126
30 (SEQ ID NO. 11), KY139 (SEQ ID NO. 12), KY157 (SEQ ID NO.
16), KY167 (SEQ ID NO. 17), KY168 (SEQ ID NO. 18), KY169
(SEQ ID NO. 19), KY170 (SEQ ID NO. 20), KY171 (SEQ ID NO.
21), KY172 (SEQ ID NO. 22) ja KY173 (SEQ ID NO. 23) ja
näille komplementaarisisistä sekvensseistä.

35 6. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 4 mukainen tes-
tipakkaus, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi käsit-

tää oligonukleotidikoetinpaneelin, joka käsittää vähintään kaksi oligonukleotidikoetinta, jotka on valittu ryhmästä, joka koostuu alasekvenssistä, joka käsittää vähintään 14 nukleotidiä sekvensseistä KY21 (SEQ ID NO. 5), KY25 (SEQ ID NO. 6), KY26 (SEQ ID NO. 7), KY63 (SEQ ID NO. 8), KY151 (SEQ ID NO. 9), KY106 (SEQ ID NO. 10), KY126 (SEQ ID NO. 11), KY139 (SEQ ID NO. 12), KY157 (SEQ ID NO. 16), KY167 (SEQ ID NO. 17), KY168 (SEQ ID NO. 18), KY169 (SEQ ID NO. 19), KY170 (SEQ ID NO. 20), KY171 (SEQ ID NO. 21), KY172 (SEQ ID NO. 22) ja KY173 (SEQ ID NO. 23) ja näille komplementaarisisista sekvensseistä.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 6 mukainen testipakkaus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi sisäisen kontrollioligonukleotidisekvenssin, jota reunustavat ylävirtaan ja alavirtaan sekvenssit, jotka ovat komplementaarisia alukkeille KY18 (SEQ ID NO. 1) ja KY75 (SEQ ID NO. 2).

8. Menetelmä näytteen sisältämän mykobakteerin nukleiinihapon osoittamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

(a) amplifioidaan 16S ribosomaalisen RNA:n geenin mainitun nukleiinihapon alue käyttäen patenttivaatimuksen 1 mukaista alukeparia,

(b) sekoitetaan vaiheessa (a) amplifioitu nukleii-
nihappo Mycobacterium-suvulle spesifisen koettimen kanssa,
ja

(c) osoitetaan nukleiinihapon ja koettimen välillä muodostuneet hybridit.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että Mycobacterium-suvulle spesifinen koetin, on koetin, jonka sekvenssi on valittu ryhmästä, joka koostuu sekvensseistä KY101 (SEQ ID NO. 3), KY102 (SEQ ID NO. 4), KY165 (SEQ ID NO. 13), KY166 (SEQ ID NO. 14) ja näille komplementaarisisista sekvensseistä.

10. Menetelmä mykobakteerin luokittelemiseksi,
t u n n e t t u siitä, että

(a) amplifioidaan mainitun mykobakteerin 16S ribosomaalisen RNA:n geenistä peräisin olevan nukleiinihapon alue käyttäen patenttivaatimuksen 1 mukaista alukeparia,

(b) sekoitetaan vaiheessa (a) amplifioitu nukleinihappo oligonukleotidikoettimien paneelin kanssa, joka sisältää ainakin kaksi oligonukleotidikoetinta, jotka on valittu ryhmästä, joka koostuu sekvensseistä KY21 (SEQ ID NO. 5), KY25 (SEQ ID NO. 6), KY26 (SEQ ID NO. 7), KY63 (SEQ ID NO. 8), KY151 (SEQ ID NO. 9), KY106 (SEQ ID NO. 10),
10 KY126 (SEQ ID NO. 11), KY139 (SEQ ID NO. 12), KY157 (SEQ ID NO. 16), KY167 (SEQ ID NO. 17), KY168 (SEQ ID NO. 18), KY169 (SEQ ID NO. 19), KY170 (SEQ ID NO. 20), KY171 (SEQ ID NO. 21), KY 172 (SEQ ID NO. 22) ja KY173 (SEQ ID NO. 23) ja näille komplementaarisisista sekvensseistä, ja

15 (c) osoitetaan nukleiinihapon ja koettimien välille muodostuneet hybridit.

11. Jonkin patenttivaatimuksista 8 - 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että amplifiointi suoritetaan polymeerasiketjureaktiolla.

Patentkrav

1. Oligonukleotidprimerpar med förmåga att amplifi-
era en målregion i 16S ribosomal RNA-gen eller motsvarande
5 RNA från en mykobakteriell art, k ä n n e t e c k n a t
av att den första primern består av sekvensen KY18 (Sekv.
ID nr. 1) och den andra primern består av sekvensen KY75
(Sekv. ID nr. 2).

2. Kit för detektion och valfritt identifiering av
10 en mykobakteriell nukleinsyra i ett prov, k ä n n e -
t e c k n a t av att det innefattar ett primerpar enligt
patentkrav 1.

3. Kit enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k -
n a t av att det vidare innefattar en oligonukleotidprob
15 innehållande en nukleinsyrasekvens som kan hybridisera
till regionen för 16S ribosomal RNA-gen amplifierad genom
primerparet KY18 (Sekv. ID nr. 1) och KY75 (Sekv. ID nr.
2).

4. Kit enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k -
20 n a t av att proben i sekvens inte är identisk med någon
av de mykobakteriella arter som skall detekteras.

5. Kit enligt patentkrav 2 till 4, k ä n n e -
t e c k n a t av att det vidare innefattar minst en oli-
gonukleotidprob vald från gruppen bestående av en sub-
25 sekvens innefattande minst 14 nukleotider av sekvenserna
KY21 (Sekv. ID nr. 5), KY25 (Sekv. ID nr. 6), KY26 (Sekv.
ID nr. 7), KY63 (Sekv. ID nr. 8), KY151 (Sekv. ID nr. 9),
KY106 (Sekv. ID nr. 10), KY126 (Sekv. ID nr. 11), KY139
(Sekv. ID nr. 12), KY157 (Sekv. ID nr. 16), KY167 (Sekv.
30 ID nr. 17), KY168 (Sekv. ID nr. 18), KY169 (Sekv. ID nr.
19), KY170 (Sekv. ID nr. 20), KY171 (Sekv. ID nr. 21),
KY172 (Sekv. ID nr. 22), KY173 (Sekv. ID nr. 23) och en
sekvens som är komplementär därtill.

6. Kit enligt något av patentkraven 2 till 4,
35 k ä n n e t e c k n a t av att det vidare innefattar en

panel av oligonukleotidprober innefattande minst två oligonukleotidprober valda från gruppen bestående av minst 14 nukleotider från sekvenserna KY21 (Sekv. ID nr. 5), KY25 (Sekv. ID nr. 6), KY26 (Sekv. ID nr. 7), KY63 (Sekv. ID nr. 8), KY151 (Sekv. ID nr. 9), KY106 (Sekv. ID nr. 10), KY126 (Sekv. ID nr. 11), KY139 (Sekv. ID nr. 12), KY157 (Sekv. ID nr. 16), KY167 (Sekv. ID nr. 17), KY168 (Sekv. ID nr. 18), KY169 (Sekv. ID nr. 19), KY170 (Sekv. ID nr. 20), KY171 (Sekv. ID nr. 21), KY172 (Sekv. ID nr. 22), KY173 (Sekv. ID nr. 23) och en sekvens som är komplementär därtill.

7. Kit enligt något av patentkraven 2 till 6, k ä n n e t e c k n a t av att det vidare innefattar en inre kontrolloligonukleotidsekvens flankerad av uppströms och nedströms sekvenser, vilka är komplementära till primrarna KY18 (Sekv. ID nr. 1) och KY75 (Sekv. ID nr. 2)

8. Förfarande för att detektera mykobakteriell nukleinsyra som finns i ett prov, k ä n n e t e c k n a t av att förfarandet innefattar:

(a) att amplifiera en region av nukleinsyran från en 16S ribosomal RNA-gen med hjälp av ett primerpar enligt patentkrav 1,

(b) att blanda nukleinsyran amplifierad i steg (a) med en probe som är specifik för Mycobacterium-släktet; och

(c) att detektera hybrider bildade mellan nukleinsyran och proben.

9. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k n a t av att proben som är specifik för Mycobacterium-släktet är en probe som har en sekvens vald från gruppen bestående av sekvensen KY101 (Sekv. ID nr. 3), KY102 (Sekv. ID nr. 4), KY165 (Sekv. ID nr. 13), KY166 (Sekv. ID nr. 14) och en sekvens som är komplementär därtill.

10. Förfarande för att klassificera en mykobakterie, k ä n n e t e c k n a t av att förfarandet innefattar

5 (a) att amplifiera en region av nukleinsyra från en 16S ribosomal RNA-gen från mykobakterien med hjälp av ett primerpar enligt patentkrav 1.

(b) att blanda nukleinsyran amplifierad i steg (a) med en panel av oligonukleotidprober som innefattar minst två oligonukleotidprober valda från gruppen bestående av
10 sekvenserna KY21 (Sekv. ID nr. 5), KY25 (Sekv. ID nr. 6), KY26 (Sekv. ID nr. 7), KY63 (Sekv. ID nr. 8), KY151 (Sekv. ID nr. 9), KY106 (Sekv. ID nr. 10), KY126 (Sekv. ID nr. 11), KY139 (Sekv. ID nr. 12), KY157 (Sekv. ID nr. 16), KY167 (Sekv. ID nr. 17), KY168 (Sekv. ID nr. 18), KY169
15 (Sekv. ID nr. 19), KY170 (Sekv. ID nr. 20), KY171 (Sekv. ID nr. 21), KY172 (Sekv. ID nr. 22), KY173 (Sekv. ID nr. 23) och en sekvens som är komplementär därtill, och

(c) att detektera hybrider bildade mellan nukleinsyran och proberna.

20 11. Förfarande enligt något av patentkraven 8 till 10, k ä n n e t e c k n a t av att amplifieringen åstadkoms genom en polymeraskedjereaktion.

FIG. 1

