



Patentdirektoratet
TAASTRUP

-
- (21) Patentansøgning nr.: 0265/95 (51) Int.Cl.6 C 12 Q 1/68
 (22) Indleveringsdag: 17 mår 1995 C 12 N 15/10
 (24) Løbedag: 26 mår 1986 C 12 N 15/63
 (41) Alm. tilgængelig: 17 mår 1995 C 12 P 19/34
 (45) Patentets meddelelse bkg. den: 21 jul 1997
 (86) International ansøgning nr.: -
 (62) Stamansøgning nr.: 1449/86
 (30) Prioritet: 28 mår 1985 US 716975 25 okt 1985 US 791308 07 feb 1986 US 828144
 (73) Patenthaver: *F. Hoffmann-La Roche AG; CH-4002 Basel, CH
 (72) Opfinder: Kary Banks *Mullis; US, Norman *Arnheim; US, Randall Keichi *Saiki; US, Henry Anthony *Erllich; US, Glenn Thomas *Horn; US, Stephen Joel *Scharf; US
 (83) Deponering af mikroorganismer Udlev.t.exp.

(74) Fuldmægtig: Plougmann, Vingtoft & Partners A/S

(54) Fremgangsmåder til kloning af vektor med en specifik nukleinsyresekvens, der er indeholdt i en nukleinsyre, og til syntetisering af et nukleinsyrefragment ud fra et eksisterende nukleinsyrefragment

(56) Fremdragne publikationer

J. Biol. Chem. 249 5213-5221 (1974)
 J. Mol. Biol. 56 341-361 (1971)

(57) Sammendrag:

265 - 95

En specifik nukleinsyresekvens, der er indeholdt i en nukleinsyre eller blanding af nukleinsyrer, klones i en vektor, idet nukleinsyresekvensen forinden multipliceres ved at behandle nukleinsyren eller blandingen af nukleinsyrer med en primer eller primere, som indeholder et restriktionssted i sin respektive deres 5'-ende, for hver nukleinsyrestreng, der indeholder den specifikke nukleinsyresekvens, som skal multipliceres, under sådanne betingelser, at der ud fra hver primer syntetiseres et forlængelsesprodukt, som er komplementært til den pågældende nukleinsyrestreng (templatet), hvorefter forlængelsesproduktet adskilles fra templatet, og produktet og templatet derefter tjener som templat for syntese af nye forlængelsesprodukter ud fra respektive primere med tilsvarende eller forskellige restriktionssteder. Multiplikationen gentages, indtil den ønskede mangfoldiggørelse af nukleinsyresekvens og hertil svarende komplement er opnået, hvorefter synteseprodukterne behandles med et restriktionsenzym, og et eller flere af de herved frembragte spaltningsprodukter liggeres ind i en eller flere kloningsvektorer.

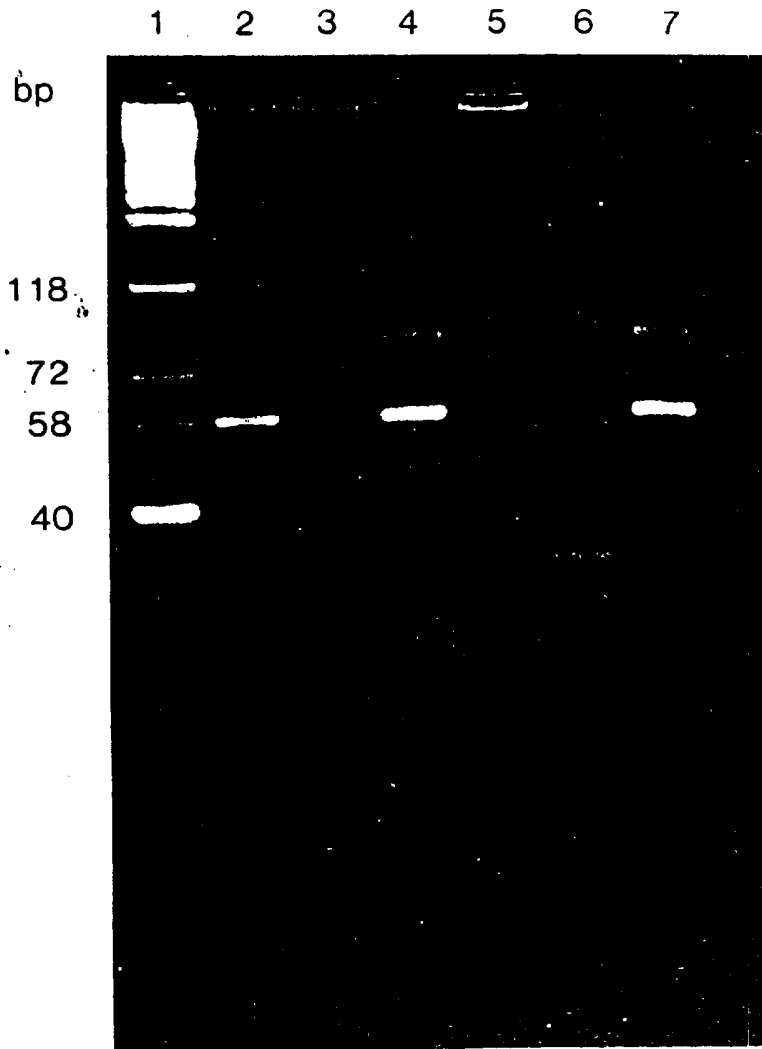
fortsættes

265-95

Et nukleinsyrefragment kan tilsvarende fremstilles ud fra et eksisterende, kortere fragment ved anvendelse af ovenanførte multiplikationsproces.

265-95

FIG. 10



Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til kloning i en vektor af en specifik nukleinsyresekvens samt en fremgangsmåde til syntetisering af et nukleinsyrefragment udfra et eksisterende, kortere nukleinsyrefragment. Opfindelsen bygger på en fremgangsmåde til multiplikation (amplifikation) af eksisterende nukleinsyresekvenser, hvis disse er til stede i en testprøve. Nærmere bestemt bygger opfindelsen på en fremgangsmåde til fremstilling af en hvilken som helst bestemt nukleinsyresekvens ud fra en given sekvens af DNA eller RNA i mængder, som er store sammenlignet med den oprindeligt tilstedeværende mængde. DNA'et og RNA'et kan være enkeltstrenget eller dobbeltstrenget og kan enten foreligge i relativt ren form eller som en komponent af en blanding af nukleinsyrer. Fremgangsmåderne ifølge opfindelsen anvender en gentagen omsætning til udførelse af multiplikationen af den ønskede nukleinsyresekvens.

Navnlig til diagnostiske anvendelser kan mål-nukleinsyresekvensen være blot en lille del af det pågældende DNA eller RNA, således at det kan være vanskeligt at påvise dets tilstedeværelse under anvendelse af ikke-isotopisk mærkede eller ende-mærkede oligonukleotidprober. Der bruges mange kræfter på at forøge sensitiviteten af probedetektionssystemerne, men der er ikke udført megen forskning på at multiplicere målsekvensen, således at den er til stede i mængder, der er tilstrækkelig til let at kunne påvises under anvendelse af de metoder, der for tiden er til rådighed.

Flere metoder er blevet beskrevet i litteraturen vedrørende de novo syntese af nukleinsyrer eller syntese af nukleinsyrer ud fra en eksisterende sekvens. Disse metoder er i stand til at frembringe store mængder af en given nukleinsyre med fuldstændig specificeret sekvens.

En kendt metode til de novo syntetisering af nukleinsyrer omfatter organisk syntese af en nukleinsyre ud fra nukleosidderivater. Denne syntese kan udføres i opløsning eller på et fast bæremateriale. En type af organisk syntese er phosphotriestermetoden, som er blevet anvendt til fremstilling af genfragmenter eller korte gener. I phosphotriestermetoden fremstilles oligonukleotider, som derefter kan sammenføjes

til dannelse af lange nukleinsyrer. For en beskrivelse af denne metode se Narang, S.A. et al., Meth. Enzymol., 68, 90 (1979) og US patent nr. 4.356.270. I patentet beskrives syntesen og kloningen af somatostatingenet.

5 En anden type af organisk syntese er phosphodiestermetoden, som er blevet anvendt til fremstilling af et tRNA-gen. Se Brown, E.L. et al., Meth. Enzymol., 68, 109 (1979) for en beskrivelse af denne metode. Som i phosphotriestermetoden omfatter phosphodiestermetoden syntese af oligonukleotider,
10 som efterfølgende sammenføjes til dannelse af den ønskede nukleinsyre.

Skønt ovennævnte fremgangsmåder for de novo syntese kan anvendes til syntese af lange strenge af nukleinsyre, er de ikke særligt praktiske at anvende til syntese af store mængder af en nukleinsyre. Begge fremgangsmåder er arbejdskrævende og tidsrøvende, kræver dyrt udstyr og dyre reagenser og har en lav samlet effektivitet. Den lave samlede effektivitet kan skyldes ineffektiviteter i syntesen af oligonukleotiderne og i sammenføjningsreaktionerne. I syntesen af en lang nukleinsyre eller endog i syntesen af en stor mængde af en kort
20 nukleinsyre vil det være nødvendigt at syntetisere mange oligonukleotider, og der vil være behov for mange sammenføjningsreaktioner. Som følge heraf vil disse metoder ikke være praktiske til syntese af store mængder af en hvilken som
25 helst ønsket nukleinsyre.

Der eksisterer også fremgangsmåder til fremstilling af nukleinsyrer i store mængder ud fra små mængder af den oprindeligt foreliggende nukleinsyre. Disse fremgangsmåder omfatter kloning af en nukleinsyre i et passende værtssystem,
30 hvor den ønskede nukleinsyre indsættes i en passende vektor, som anvendes til transformering af værten. Når værten dyrkes, replikeres vektoren, og således frembringes flere kopier af den ønskede nukleinsyre. For en kort beskrivelse af subkloning af nukleinsyrefragmenter se Maniatis T. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, s. 390-401 (1982). Se også teknikkerne beskrevet i US
35 patent nr. 4.416.988 og nr. 4.403.036.

En tredje fremgangsmåde til syntetisering af nukleinsyrer, som er beskrevet i US patent nr. 4.293.652, er en hybrid mellem den ovenfor beskrevne organiske syntese og metoder til molekylær kloning. I denne fremgangsmåde bliver et passende antal oligonukleotider til dannelse af den ønskede nukleinsyresekvens syntetiseret organisk og indsat sekventielt i en vektor, som multipliceres ved vækst forud for hver efterfølgende indsætning.

I Kleppe et al., J. Mol. Biol. 56: 341 (1971) beskrives en metode til syntetisering af DNA under anvendelse af primerinitieret, template-rettet "repair-replikation", og det foreslås, at replikationscykler kan gentages ved hver gang at tilsætte en ny dosis DNA-polymerase. Der er imidlertid ingen hentydning til, at primerforlængelsesprodukter skal være tilstrækkeligt komplette til at kunne indgå i stabile primer-template-komplekser for at kunne fungere som templatere for primere i efterfølgende runder af primerforlængelse, og at der kun kan opnås eksponentiel *in vitro* multiplicering ved dannelse af sådanne komplekser og ved at primerforlængelsesprodukter fungerer som templatere i efterfølgende runder.

I Panet A. og Khorana H. G., J. Biol. Chem. 249: 5213-5221 (1974) beskrives kobling af poly(dT) ved 3'-enden til cellulose, efterfulgt af kovalent binding mellem 5'-enden af den cellulosekoblede poly(dT)-kæde og et ved 3'-enden thymidinyleret E. coli-deriveret tRNA. Det derved fremkomne produkt (5'-C-C-C-C-A-C-C-poly(dT)-cellulose) anvendes derefter som template i en replikationsproces, hvor poly(dA) eller (rA)_n anvendes som primere. For hver cyklus af annealing og DNA-polymerisering fremstilles der enkeltstrengede komplementære strenge til af templatens, og der fremstilles hver gang maksimalt det samme antal komplementære strenge som det oprindelige antal templates. Der nævnes således intet om anvendelsen af flere end én primer, og der nævnes således intet om muligheden for eksponentiel multiplikation af nukleinsyresekvenser.

Den foreliggende opfindelse bærer nogen lighed med metoden til molekylær kloning, men den omfatter imidlertid ikke formering af nogen organisme og undgår derved de mulige farer

eller upraktiske forhold, som dette medfører. Den foreliggende opfindelse kræver heller ikke syntese af nukleinsyresekvenser, som er ubeslægtede med den ønskede sekvens, og derved undgår man med den foreliggende opfindelse behovet for
5 omfattende oprensning af produktet ud fra en kompliceret biologisk blanding.

Opfindelsen er baseret på en fremgangsmåde til multiplicering af en eller flere specifikke nukleinsyresekvenser, der er til stede i en nukleinsyre eller en blanding heraf
10 under anvendelse af primere og midler til polymerisering og derefter påvisning af den multiplicerede sekvens. Forlængelsesproduktet af én primer bliver, når den hybridiseres til den anden, en template for produktionen af den ønskede specifikke nukleinsyresekvens og vice versa, og fremgangsmåden kan
15 gentages så ofte som nødvendigt for at producere den ønskede mængde af sekvensen. Denne fremgangsmåde er mere effektiv end de ovenfor beskrevne metoder til dannelse af store mængder nukleinsyre ud fra en mål-sekvens og til produktion af sådanne nukleinsyrer på en ved sammenligning kort tid. Den foreliggende fremgangsmåde er navnlig nyttig til multiplicering
20 af sjældne nukleinsyrer, der er til stede i en blanding af nukleinsyrer, til effektiv påvisning af sådanne sjældne nukleinsyrer.

Nærmere bestemt tilvejebringer den foreliggende opfindelse
25 se en fremgangsmåde til kloning i en vektor af i det mindste én specifik nukleinsyresekvens indeholdt i en nukleinsyre eller i en blanding af nukleinsyrer, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved,

(a) at nukleinsyren (nukleinsyrerne) behandles med en
30 oligonukleotidprimer for hver streng af hver sekvens, der skal klones, og med andre nødvendige komponenter under sådanne betingelser, at der for hver streng af hver primer syntetiseres et forlængelsesprodukt, som er komplementært til hver streng, ved hvilken fremgangsmåde primeren eller primerne udvælges således,
35 at de i det væsentlige er komplementære til hver streng af hver specifik sekvens og afgrænser enderne af den nukleinsyresekvens, der skal klones, således

- at det forlængelsesprodukt, der syntetiseres fra én primer, når det er separeret fra dets komplement, kan tjene som en template for syntese af forlængelsesproduktet af den anden primer, og hvor primeren eller
- 5 primerne hver indeholder informationen for et restriktionssted i 5'-enden, som er identisk med eller forskellig fra restriktionsstedet (-stederne) på den anden primer (på de andre primere),
- (b) at primerforlængelsesprodukterne adskilles fra templatene, på hvilke de er syntetiseret, til frembringelse af enkeltstrengede molekyler,
- 10 (c) at de enkeltstrengede molekyler, der er frembragt i trin (b) behandles som i trin (a) med oligonukleotidprimere og andre nødvendige komponenter, således at der syntetiseres et primerforlængelsesprodukt under anvendelse af hver af enkeltstrengene, der er frembragt i trin (b), som en template, ved hvilken fremgangsmåde trinnene (a) og (c) afhængig af den bestemte sekvens, der skal multipliceres, udføres i
- 15 nærværelse af fra 0 og op til en effektiv mængde af dimethylsulfoxid eller ved en temperatur på op til ca. 45°C,
- (d) at der til produktet fra trin (c) tilsættes et restriktionsenzym for hvert af restriktionsstederne til opnåelse af spaltede produkter i en restriktionsfordøjelse, og
- 25 (e) at det spaltede produkt (de spaltede produkter) liggeres ind i én eller flere kloningsvektorer.

I en anden udførelsesform angår den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til syntetisering af et nukleinsyrefragment ud fra et eksisterende nukleinsyrefragment med færre nukleotider end det fragment, som bliver syntetiseret, og 2 oligonukleotidprimere, hvor det nukleinsyrefragment, der bliver syntetiseret, indeholder et venstresegment, et kerne-

35 segment og et højresegment, og hvor kernesegmentet i det mindste i alt væsentlig repræsenterer nukleinsyresekvensen af det eksisterende nukleinsyrefragment, og højre- og venstresegmenterne repræsenterer nukleinsyresekvensen, der er til

stede i 5'-enderne af de to primere, hvis 3'-ender er komplementære eller i alt væsentligt komplementære til 3'-enderne i de enkeltstrengene, der produceres ved at separere strengene af det eksisterende nukleinsyrefragment, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved,

- (a) at strengene fra det eksisterende fragment behandles med to oligonukleotidprimere og andre nødvendige komponenter under sådanne betingelser, at der af hver primer syntetiseres et forlængelsesprodukt, som er komplementært til hver nukleinsyrestreng, ved hvilken fremgangsmåde primerne udvælges således, at de i alt væsentligt er komplementære til 3'-enden af hver streng af det eksisterende fragment, således at det forlængelsesprodukt, som syntetiseres ud fra én primer, når det er separeret fra dets komplement, kan tjene som en template for syntesen af forlængelsesproduktet af den anden primer, og hvorved hver primer i 5'-enden indeholder en sekvens af nukleotider, som ikke er komplementære til det eksisterende fragment, og som svarer til de to ender af det nukleinsyrefragment, der bliver syntetiseret,
- (b) at primerforlængelsesprodukterne adskilles fra de templater, på hvilke de blev syntetiseret, til frembringelse af enkeltstrengede molekyler,
- (c) at de enkeltstrengede molekyler, der er frembragt i trin (b), behandles med primerne og de nødvendige komponenter fra trin (a) under sådanne betingelser, at der syntetiseres et primerforlængelsesprodukt under anvendelse af hver enkeltstreng, der er frembragt i trin (b), som en template, således at der produceres to intermediære dobbeltstrengede nukleinsyremolekyler, i hvilke der er blevet inkorporeret den nukleotidsekvens, som er til stede i 5'-enden af én af oligonukleotidprimerne, og to fuldlængde dobbeltstrengede nukleinsyremolekyler, i hvilke der er inkorporeret den nukleinsyresekvens, der er til stede i 5'-enderne af begge oligonukleotidprimerne, og

(d) at trinnene (b) og (c) gentages et tilstrækkeligt antal gange til at producere dobbeltstrengede molekyler i fuld længde i en effektiv mængde.

Eventuelt kan trinnene (a) - (d) gentages under anvendelse af produktet fra trin (d) som kernefragment og to yderligere oligonukleotidprimere, som er komplementære til eller i alt væsentligt komplementære til 3'-enderne af de enkeltstrengene, der frembringes ved at separere strengene fra produktet i trin (d).

10 Kernefragmentet kan opnås ved følgende trin:

(a) omsætning af to oligonukleotider, som hver ved deres 3'-ender indeholder en nukleotidsekvens, som er komplementær til den anden oligonukleotid ved dens 3'-ende, og som er ikke-komplementær til hinanden ved deres 5'-ender, med et
15 middel til polymerisering og 4 nukleotidtriphosphater under sådanne betingelser, at der syntetiseres et forlængelsesprodukt af hver oligonukleotid, som er komplementær til hver nukleinsyrestreng,

(b) separering af forlængelsesprodukterne fra de
20 templater, på hvilke de blev syntetiseret til dannelse af enkeltstrengede molekyler og

(c) behandling af de enkeltstrengede molekyler, der frembragtes i trin (b), med oligonukleotiderne i trin (a) under sådanne betingelser, at der syntetiseres et primerforlængelsesprodukt under anvendelse af hver af de i trin (b)
25 producerede enkeltstrengene som en template, hvorved der opnås en multiplikation af kernefragmentet.

Fig.1 viser en 94 basepar lang sekvens af human β -globin, der ønskes multipliceret. Enkelbasepar-ændringen, som følger
30 med seglcelleanæmi, er angivet under 94-meren.

Fig. 2 viser et fotografi af en ethidiumbromidfarvet polyacrylamidgel demonstrerende multiplikation af 94-meren, der indeholdes i human vildtype-DNA og i et plasmid, der indeholder et 1,9 kb BamHI fragment af det normale β -globin-
35 gen (betegnet pBR328:HbA).

Fig. 3 viser et fotografi af en ethidiumbromidfarvet polyacrylamidgel demonstrerende multiplikation af enhver af de specifikke 94-mere målsekvenser, der er til stede i

pBR328:HbA, et plasmid, der indeholder et 1,9 kb BamHI-fragment af seglcelleallelen af β -globin (betegnet pBR328:HbS), pBR328:HbA, hvor sekvensen, der skal multipliceres, er spaltet med MstII, og pBR328:HbS, hvor sekvensen, der skal multipliceres, er blevet behandlet med, men ikke spaltet med MstII.

Fig. 4 viser i detaljer trinnene og produkterne af polymerasekædereaktionen til multiplicering af den ønskede 94-mere sekvens af human β -globin i 3 cyklusser under anvendelse af to oligonukleotidprimere.

Fig. 5 viser et fotografi af en ethidiumbromidfarvet polyacrylamidgel demonstrerende multiplikation efter 4 cyklusser af en 240-mer sekvens i pBR328:HbA, hvor alikvoterne er fordøjet med NcoI (bane 3), MstII (bane 4) eller HinfI (bane 5). Bane 1 er molekylvægtsstandard, og bane 2 indeholder det intakte 240 bp lange produkt.

Fig. 6 viser sekvensen af de normale (β^A) og seglcelle (β^S) β -globingener i DdeI og HinfI restriktionsstedområdet, hvor de enkelte linier for β^A markerer positionen af DdeI-stedet (CTGAG) og dobbeltstregerne for β^A og β^S markerer positionen for HinfI-stedet (GACTC).

Fig. 7 viser resultaterne af sekventiel fordøjelse af normal β -globin under anvendelse af en 40-mer probe og DdeI-restriktionsenzymet efterfulgt af HinfI-restriktionsenzymet.

Fig. 8 viser resultaterne af sekventiel fordøjelse af seglcelle β -globin under anvendelse af den samme 40-mer probe som i fig. 7 og DdeI-restriktionsenzymet efterfulgt af HinfI-restriktionsenzymet.

Fig. 9 viser et fotografi af en ethidiumbromidfarvet polyacrylamidgel demonstrerende anvendelsen af den samme 40-mer probe som i fig. 7 til specifik karakterisering af tilstedeværende beta-globinalleler i prøven af hel human DNA, som er blevet udsat for multiplikation, hybridisering med proben og sekventiel fordøjelse med DdeI og HinfI.

Fig. 10 viser et fotografi af en 6% NuSieve agarosegel visualiseret ved anvendelse af ethidiumbromid og UV-lys. Dette fotografi demonstrerer multiplikationen af et sub-

fragment af et 110-bp multiplikationsprodukt, hvilket sub-fragment er en indre beliggende del af 110-bp fragmentet.

Udtrykket "oligonukleotid" som her anvendt under henvisning til primere, prober, oligomerfragmenter, der skal
5 påvises, oligomerkontroller og umærkede blokerende oligomerer, er defineret som et molekyle, der består af 2 eller flere deoxyribonukleotider eller ribonukleotider, fortrinsvis mere end tre. Dets eksakte størrelse vil afhænge af mange faktorer, som på sin side anghænger af den ultimative funktion
10 eller anvendelse af oligonukleotidet.

Udtrykket "primer" som her anvendt refererer til et oligonukleotid, hvad enten dette forekommer naturligt, som i en oprenset restriktionsfordøjelse, eller er produceret syntetisk, hvilken oligonukleotid er i stand til at virke som et
15 initieringspunkt for syntese, når den placeres under betingelser, i hvilke syntese af et primerforlængelsesprodukt, som er komplementært til en nukleinsyrestreng, er induceret, dvs. under tilstedeværelse af nukleotider og et middel for polymerisering, såsom DNA-polymerase, og ved en egnet temperatur og
20 pH. Primeren er for maximal effektivitet ved multiplikation fortrinsvis enkeltstrengt, men kan alternativt være dobbeltstrengt. Hvis den er dobbeltstrengt, behandles primeren først til separering af dets strenge, før den anvendes til dannelse af forlængelsesprodukter. Primeren er fortrinsvis et
25 oligodeoxyribonukleotid. Primeren må være tilstrækkelig lang til at prime syntesen af forlængelsesprodukterne under tilstedeværelse af polymerisationsmidlet. De eksakte længder af primerne vil afhænge af mange faktorer, inklusiv temperatur og primerkilden. Afhængig af kompleksiteten af målsekvensen
30 indeholder oligonukleotidprimeren f.eks. typisk 15-25 eller flere nukleotider, omend den kan indeholde færre nukleotider. Korte primermolekyler kræver generelt set lavere temperaturer for at danne tilstrækkeligt stabile hybridkomplekser med templaten.

35 De her omtalte primere udvælges til at være "i alt væsentligt" komplementære til de forskellige strenge af hver specifik sekvens, der skal multipliceres. Dette betyder, at primerne må være tilstrækkeligt komplementære til at hybrid-

sere med deres respektive strenge. Primersekvensen behøver derfor ikke at reflektere den eksakte sekvens af templatens. F.eks. kan et ikke-komplementært nukleotidfragment være tilhæftet til 5'-enden af primeren, medens resten af primersekvensen er komplementær til strengen. Alternativt kan ikke-komplementære baser eller længere sekvenser være anbragt spredt i primeren, forudsat at primersekvensen har tilstrækkelig komplementaritet med sekvensen af den streng, der skal multipliceres til at hybridisere dermed og derved danne en template for syntese af forlængelsesproduktet af den anden primer.

Som anvendt her betegner "restriktionsendonukleaser" og "restriktionsenzymmer" bakterieenzymmer, der hver skærer dobbeltstrenget DNA ved eller nær en specifik nukleotidsekvens.

Som anvendt her betegner "DNA-polymorfisme" det forhold, i hvilket to eller flere forskellige nukleotidsekvenser kan forekomme på et bestemt sted i DNA'et.

Betegnelsen "restriktionsfragmentlængdepolymerfi" ("RFLP") betegner forskellene hos forskellige individer i længderne af restriktionsfragmenter, der dannes ved fordøjelse med en speciel restriktionsendonuklease.

Den foreliggende opfindelse er baseret på en fremgangsmåde til multiplikation af enhver af en eller flere specifikke nukleinsyresekvenser, der mistænkes for at være i en nukleinsyre. Fordi store mængder af en specifik sekvens kan produceres ved denne fremgangsmåde, kan den foreliggende opfindelse anvendes til forbedring af effektiviteten af DNA- eller mRNA-kloning og til multiplikation af en målsekvens for at lette påvisningen heraf.

Generelt set omfatter den foreliggende fremgangsmåde en kædereaktion for i eksponentielle mængder i forhold til antallet af de involverede omsætningstrin at producere mindst én specifik nukleinsyresekvens under forudsætning af, at (a) enderne af den krævede sekvens er kendt i tilstrækkelige detaljer til at oligonukleotider, som vil hybridisere med dem, kan syntetiseres og (b) at en lille mængde af sekvensen er tilgængelige til initiering af kædereaktionen. Produktet fra kædereaktionen vil være en adskilt nukleinsyreduplex med

ender, der svarer til enderne af de anvendte specifikke primere.

Enhver kilde af nukleinsyre kan i oprenset eller ikke-oprenset form anvendes som udgangsnukleinsyre eller -syre, forudsat at den formodes at indeholde den ønskede, specifikke nukleinsyresekvens. Fremgangsmåden kan f.eks. således anvende DNA eller RNA, inklusiv mRNA, hvilket DNA eller RNA kan være enkeltstrenget eller dobbeltstrenget. Desuden kan en DNA-RNA-hybrid, som indeholder en streng af hver, anvendes. En blanding af enhver af disse nukleinsyrer kan også anvendes, eller nukleinsyrerne, der er produceret ud fra en heri tidligere anvendt multiplikationsreaktion, under anvendelse af den samme eller forskellige primere, kan anvendes således. Den specifikke nukleinsyresekvens, der skal multipliceres, kan være blot en fraktion af et større molekyle eller kan være initielt til stede som et særskilt molekyle, således at den specifikke sekvens udgør hele nukleinsyren. Det er ikke nødvendigt, at sekvensen, der skal multipliceres, i begyndelsen er til stede i ren form; det kan være en mindre fraktion af en kompleks blanding, såsom en del af β -globingenet, der findes i hel human DNA, eller en del af en nukleinsyresekvens på grund af en speciel mikroorganisme, hvilken organisme blot kan udgøre en meget lille del af en speciel biologisk prøve. Udgangsnukleinsyren kan indeholde mere end én ønsket specifik nukleinsyresekvens, som kan være den samme eller forskellig. Den foreliggende fremgangsmåde er derfor ikke blot anvendelig til produktion af store mængder af en specifik nukleinsyresekvens, men også til samtidig multiplicering af mere end én forskellig, specifik nukleinsyresekvens, der er lokaliseret på samme eller forskellige nukleinsyremolekyler.

Nukleinsyren eller -syrerne kan være opnået fra enhver kilde, f.eks. fra plasmider såsom pBR322, fra klonet DNA eller RNA, eller fra naturlig DNA eller RNA fra en hvilken som helst kilde, inklusiv bakterier, gær, vira eller højere organismer, såsom planter eller dyr. DNA eller RNA kan være ekstraheret fra blod, vævsmateriale, såsom chorion-villi eller amniumceller ved forskellige metoder, såsom den, der

beskrives af Maniatis et al., Molecular Cloning, (1982), 280-281.

En hvilket som helst specifik nukleinsyresekvens kan produceres ved den foreliggende fremgangsmåde. Det er kun
5 nødvendigt, at et tilstrækkeligt antal baser ved begge ender af sekvensen er kendt i tilstrækkelige detaljer, således at der kan fremstilles to oligonukleotidprimere, som vil hybridisere til forskellige strenge af den ønskede sekvens og på relative positioner langs sekvensen, således at et forlængelsesprodukt, der er syntetiseret fra en primer, kan tjene
10 som template, når den er separeret fra dens template (komplement), for forlængelse af den anden primer i en nukleinsyre af defineret længde. Jo større viden man har om baserne ved begge ender af sekvensen, jo mere specifik kan primeren for
15 målnukleinsyresekvensen gøres og jo mere effektiv kan fremgangsmåden derfor være. Det vil forstås, at betegnelsen "primer", som anvendt her, henviser til mere end én primer, navnlig i det tilfælde, hvor der er nogen tvetydighed i informationen vedrørende endesekvenserne af fragmentet, der
20 skal multipliceres. I tilfældet, hvor en nukleinsyresekvens f.eks. er udledt fra proteinsekvensinformation, vil en samling af primere, der indeholder sekvenser, som repræsenterer alle mulige codonvariationer baseret på degenereringen af den genetiske kode, anvendes for hver streng. Én primer fra denne
25 samling vil være homolog med enden af den ønskede sekvens, der skal multipliceres.

Oligonukleotidprimerne kan fremstilles under anvendelse af en hvilken som helst egnet fremgangsmåde, såsom f.eks. de ovenfor beskrevne phosphotriester- og phosphodiestermetoder,
30 eller automatiserede udførelsesformer deraf. I én således automatiseret udførelsesform er diethylphosphoramiditer anvendt som udgangsmateriale og kan syntetiseres som beskrevet af Beaucage et al., Tetrahedron Let- ters (1981), 22: 1859-1862. Én fremgangsmåde til syntetisering af oligonukleotider på et modificeret, fast bæremateriale er beskrevet i US
35 patent nr. 4.458.066. Det er også muligt at anvende en primer, som er blevet isoleret fra en biologisk kilde (såsom ved en restriktionsendonukleasefordøjelse).

Den specifikke nukleinsyresekvens produceres ved anvendelse af nukleinsyren, der indeholder denne sekvens som en template. Hvis nukleinsyren indeholder to strenge, er det nødvendigt at separere strengene af nukleinsyren, før den kan anvendes som template, enten ved et separat trin eller samtidigt med syntese af primerforlængelsesprodukterne. Denne strenge-separation kan udføres ved en hvilken som helst egnet denatureringsmetode, inklusiv fysiske, kemiske eller enzymatiske metoder. En fysisk metode til separering af strengene af nukleinsyren involverer opvarmning af nukleinsyren, til den er fuldstændig (>99%) denatureret. Typisk varmedenaturering kan omfatte temperaturer i området på fra 80 til 105°C i tidsperioder på fra ca. 1 til 10 minutter. Strenge-separation kan også induceres med et enzym fra den klasse af enzymer, der kendes som helicaser, eller enzymet RecA, som har helicaseaktivitet, og som ved tilstedeværelse af riboATP vides at denaturere DNA. De egnede omsætningsbetingelser for separering af nukleinsyrestrengene ved hjælp af helicaser er beskrevet af Kuhn Hoffmann-Berling, CSH-Quantitative Biology, 43: 63 (1978) og der gives en oversigt over metoderne ved anvendelse af RecA i C.Radding, Ann.Rev.Genetics., 16: 405-37 (1982).

Hvis den oprindelige nukleinsyre, der indeholder sekvensen, der skal multipliceres, er enkeltstrenget, syntetiseres dens komplementære streng ved at tilføre en eller to oligonukleotidprimerne dertil. Hvis en passende enkelt-primer tilsættes, syntetiseres et primerforlængelsesprodukt under tilstedeværelse af primeren, et polymeriseringsmiddel og de 4 nedenfor beskrevne nukleotider. Produktet vil være delvis komplementært til den enkeltstrengede nukleinsyre og vil hybridisere med nukleinsyrestrengen til dannelselse af en duplex af strenge med ulige længde, som derefter kan separeres til enkeltstrengene, som beskrevet ovenfor til dannelselse af to enkelte, separerede komplementære strenge. Alternativt kan to passende primere tilsættes til den enkeltstrengede nukleinsyre, og omsætningen udføres.

Hvis den oprindelige nukleinsyre udgør sekvensen, der skal multipliceres, vil det producerede primerforlængelses-

produkt (de producerede primerforlængelsesprodukter) være fuldstændig komplementært til strengene af den oprindelige nukleinsyre og vil hybridisere dermed til dannelse af en duplex af strenge med samme længde, som kan separeres til enkeltstrengede molekyler.

Når de komplementære strenge af nukleinsyren eller - syrerne er separeret - hvad enten nukleinsyren oprindelig var dobbeltstrenget eller enkeltstrenget - er strengene parate til at blive anvendt som en template for syntesen af yderligere nukleinsyrestrenge. Denne syntese kan udføres ved at anvende en hvilken som helst egnet metode. Generelt set foregår det i en puffret vandig opløsning, fortrinsvis ved et pH på 7-9, mest fortrinsvis ca. 8. Det foretrakkes, at et molært overskud (for klonet nukleinsyre almindeligvis 1000:1 primer: template, og for genomisk nukleinsyre almindeligvis 10^6 :1 primer: template) af de to oligonukleotidprimere tilsættes til pufferen, der indeholder de separerede templatestrengene. Det skal imidlertid forstås, at mængden af komplementær streng ikke nødvendigvis, hvis den her angivne fremgangsmåde anvendes til diagnostiske anvendelser, således at mængden af primer i forhold til mængden af komplementær streng ikke kan bestemmes med sikkerhed. Af praktiske grunde vil mængden af tilsat primer imidlertid generelt set være i molært overskud i forhold til mængden af komplementær streng (template), når sekvensen, der skal multipliceres, findes i en blanding af komplicerede, langkædede nukleinsyrestrenge. Et stort molært overskud foretrakkes til forbedring af fremgangsmådens effektivitet.

Deoxyribonukleosidtriphosphaterne dATP, dCTP, dGTP og TTP tilsættes også til synteseblandingen i tilstrækkelige mængder, og den resulterende opløsning opvarmes til ca. 90-100°C i fra ca. 1 til 10 minutter, fortrinsvis fra 1 til 4 minutter. Efter denne opvarmningsperiode får opløsningen lov at afkøle til 20-40°C, hvilket er foretrukket for primerhybridisering. Til den afkølede blanding tilsættes et polymeriseringsmiddel, og omsætningen får lov at foregå under betingelser, som er kendte inden for fagområdet. Denne synteseomsætning kan foregå ved fra stuetemperatur op til en tem-

peratur over hvilken polymeriseringsmidlet ikke længere fungerer effektivt. Hvis DNA-polymerasen således f.eks. anvendes som polymeriseringsmiddel, er temperaturen generelt set ikke højere end ca. 45°C. En mængde dimethylsulfoxid (DMSO) er fortrinsvis til stede, hvilket er effektivt til påvisning af signalet, eller temperaturen er 35-40°C. Mest foretrukket er tilstedeværelse af 5-10 volumenprocent DMSO, og temperaturen er 35-40°C. Til visse anvendelser, hvor sekvenserne, der skal multipliceres, er over 110 basepar lange fragmenter, såsom HLA DQ- α - eller - β -gener, tilsættes en effektiv mængde (f.eks. 10 volumenprocent) DMSO til multiplikationsblandingen, og omsætningen udføres ved 35-40°C for at opnå påviselige resultater eller for at muliggøre kloning.

Polymeriseringsmidlet kan være en hvilket som helst forbindelse eller system, som vil fungere til udførelse af syntese af primerforlængelsesprodukter, inklusiv enzymer. Egnede enzymer til dette formål indbefatter f.eks. E.coli DNA polymerase I, Klenow fragment af E.coli DNA polymerase I, T4 DNA polymerase, andre tilgængelige DNA-polymeraser, revers transkriptase og andre enzymer, inklusiv varmostabile enzymer, som vil lette kombinationen af nukleotiderne på en korrekt måde til dannelse af primerforlængelsesprodukter, som er komplementære til hver nukleinsyrestreng. Generelt set vil syntesen blive initieret ved 3'-enden af hver primer og forløbe i 5'-retningen langs templatestrengen, indtil syntesen ender, frembringende molekyler af forskellige længder. Der kan imidlertid være midler, som initierer syntesen ved 5'-enden og forløber i den anden retning under anvendelse af den samme fremgangsmåde som ovenfor beskrevet.

Den nysyntetiserede streng og dens komplementære nukleinsyrestreng danner et dobbeltstrengt molekyle, som anvendes i de efterfølgende trin af fremgangsmåden. I det næste trin separeres strengene af det dobbeltstrengede molekyle under anvendelse af et hvilket som helst af de ovenfor beskrevne procedurer til dannelse af enkeltstrengede molekyler.

Ny nukleinsyre syntetiseres på de enkeltstrengede molekyler. Yderligere inducerende middel, nukleotider og primere kan tilsættes, hvis det er nødvendigt, for at processen kan

forløbe under de ovenfor foreskrevne betingelser. Syntesen vil igen blive initieret ved én ende af oligonukleotidprimerne og vil forløbe langs templatens enkelte streng til frembringelse af yderligere nukleinsyre. Efter dette trin vil
5 halvdelen af forlængelsesproduktet bestå af den specifikke nukleinsyresekvens afgrænset af de to primere.

Trinnene vedrørende strengeseparation og forlængelsesproduksyntese kan gentages så ofte, som det behøves til frembringelse af en ønsket mængde af den specifikke nukleinsyresekvens. Som det vil blive beskevet i yderligere detaljer
10 nedenfor, vil mængden af den producerede specifikke nukleinsyresekvens akkumulere på eksponentiel måde.

Når det ønskes at producere mere end én specifik nukleinsyresekvens ud fra den første nukleinsyre eller blanding af
15 nukleinsyrer, anvendes et passende antal af forskellige oligonukleotidprimere. Hvis f.eks. to forskellige specifikke nukleinsyresekvenser skal produceres, anvendes 4 primere. To af primerne er specifikke for én af de specifikke nukleinsyresekvenser, og de to andre primere er specifikke for den
20 anden specifikke nukleinsyresekvens. På denne måde kan hver af de to forskellige specifikke sekvenser produceres eksponentielt ved den foreliggende fremgangsmåde.

Den foreliggende opfindelse kan udføres på trinvis måde, hvor nye reagenser tilsættes efter hvert trin, eller samtidigt,
25 igt, hvor alle reagenser tilsættes i begyndelsestrinnet, eller delvist trinvis og delvis samtidigt, hvor frisk reagens tilsættes efter et givent antal trin. Hvis der anvendes en fremgangsmåde til strengeseparation der, som f.eks. varme, vil inaktivere polymeriseringsmidlet, hvilket er tilfældet
30 med et varmelabilt enzym, er det nødvendigt at tilføre polymeriseringsmidlet igen efter hvert strengeseparationstrin. Den samtidige metode kan anvendes, når et antal oprensede komponenter, inklusiv et enzymatisk middel såsom helicase, anvendes til strengeseparationstrinnet. I den samtidige
35 fremgangsmåde kan reaktionsblandingen ud over nukleinsyrestrengen (-strengene), der indeholder den ønskede sekvens, også indeholde det strengeseparerende enzym (f.eks. helicase), en passende energikilde for det strengeseparerende

enzym, såsom rATP, de fire nukleotider, oligonukleotidprimerne i molært overskud og det inducerende middel, f.eks. Klenow-fragment af E.coli DNA polymerase I. Hvis varme anvendes til denaturering i en samtidig proces kan der anvendes et

5 varmostabilt, inducerende middel, såsom en termostabil polymerase, som vil fungere ved høvede temperaturer, fortrinsvis 65-90°C, afhængig af det inducerende middel, ved hvilken temperatur nukleinsyrer vil består af enkelt- og dobbeltstrengene i ligevægt. For mindre længder af nukleinsyre kan

10 lavere temperaturer på ca. 50°C anvendes. Den øvre temperatur vil afhænge af temperaturen, ved hvilken enzymet vil nedbrydes, eller den temperatur, over hvilken primerhybridisering vil ske i utilstrækkeligt omfang. Et sådant varmostabilt enzym er beskrevet, f.eks. af A.S.Kaledin et al., Biokhimiya,

15 45, 644-651 (1980). Hvert trin af processen vil foregå sekventielt uanset den initiale tilstedeværelse af alle reagenserne. Yderligere materialer kan tilsættes om nødvendigt. Efter at en passende tid er forløbet til dannelse af den ønskede mængde af den specifikke nukleinsyresekvens, kan

20 reaktionen standses ved inaktivering af enzymerne på en hvilken som helst kendt måde eller ved separering af komponenterne i reaktionen.

Multiplikationsfremgangsmåden kan udføres kontinuerligt. I én udførelsesform af en automatiseret proces kan reaktionen

25 føres i cyklus gennem et denaturerende område, et reagenstilsetningsområde og et omsætningsområde. I en anden udførelsesform kan enzymet, der anvendes til syntese af primerforlængelsesprodukterne, immobiliseres i en søjle. De andre omsætningskomponenter kan ved hjælp af en pumpe cirkuleres

30 kontinuerligt gennem søjlen og en varmespiral i serie, og de producerede nukleinsyrer kan således blive denatureret gentagne gange uden inaktivering af enzymet.

Den foreliggende opfindelse demonstreres skematisk nedenfor, hvor dobbeltstrengt DNA, der indeholder den ønskede

35 sekvens [S] bestående af komplementære strengene [S⁺] og [S⁻], anvendes som nukleinsyren. Under den første og hver efterfølgende omsætningscyklus vil forlængelse af hver oligonukleotidprimer på den oprindelige template producere ét nyt

ssDNA-molekyleprodukt af ikke nærmere bestemt længde, som terminerer med kun en af primerne. Disse produkter, der herefter henvises til som "lange produkter", vil akkumulere på liniær måde, dvs. at mængden, der er til stede efter et vilkårligt antal cyklusser, vil være proportional med antallet af cyklusser.

De lange produkter, der således er produceret, vil virke som templatere for den ene eller den anden af oligonukleotidprimerne i efterfølgende cyklusser og vil producere molekyler af den ønskede sekvens $[S^+]$ eller $[S^-]$. Disse molekyler vil også fungere som templatere for den ene eller den anden af oligonukleotidprimerne, frembringende yderligere $[S^+]$ og $[S^-]$, og en kædereaktion kan således vedligeholdes, som vil resultere i akkumuleringen af $[S]$ med en eksponentiel hastighed i forhold til antallet af cyklusser.

Biprodukter dannet ved andre oligonukleotidhybridiseringer end de tilsigtede er ikke selv-katalytiske (undtagen i sjældne tilfælde) og akkumulerer således med liniær hastighed.

Den specifikke sekvens, der skal multipliceres, $[S]$, kan angives skematisk som:

```
[S+]   5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCC   3'
[S-]   3' TTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG   5'
```

De passende oligonukleotidprimere ville være:

```
Primer 1:  GGGGGGGGGG
Primer 2:  AAAAAAAAAA
```

således at hvis DNA, der indeholder $[S]$

```
...zzzzzzzzzAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCCzzzzzzzzzz...
30 ...zzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGzzzzzzzzzz...
separeres i enkeltstreng og dets enkeltstreng hybridiseres til primere 1 og 2, kan de efterfølgende forlængelsesreaktioner katalyseres ved DNA-polymerase under tilstedeværelse af de fire deoxyribonukleosidtriphosfater:
```


forlængelse < _____GGGGGGGGG 5' primer 1
 5'zzzzzzzAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzz....3'
 oprindelig templatestreng⁺

Primer 2 5' AAAAAAAAAA _____> forlænges
 5 3' ...zzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGzzzzzzz....5'
 oprindelig templatestreng⁻

forlængelse her < _____GGGGGGGGG 5' primer 1
 5' AAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzz....3'
 nyligt syntetiseret langt produkt 2

10 Hvis strengene af de fire duplexer ovenfor separeres, findes følgende strenge:

5' AAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXCCCCCCCCC 3'
 nyligt syntetiseret [S⁺]

3'zzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'
 15 første-cyklus-syntetiseret langt produkt 1

3'zzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'
 nyligt syntetiseret langt produkt 1

5'zzzzzzzAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzz....3'
 oprindelig templatestreng⁺

20 5' AAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzz....3'
 nyligt syntetiseret langt produkt 2

3'zzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGzzzzzzz....5'
 oprindelig templatestreng⁻

25 3' TTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'
 nyligt syntetiseret [S⁻]

5' AAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzz....3'
 første-cyklus-syntetiseret langt produkt 2

Det ses, at hver streng, som ender med oligonukleotidsekvensen af én primer og den komplementære sekvens af den anden, er den specifikke nukleinsyresekvens [S], som det ønskes at producere.

5 Trinnene i denne fremgangsmåde kan gentages uendeligt, og er kun begrænset af mængden af primere 1 og 2, polymeriseringsmidlet og tilstedeværende nukleotider. Antallet af cyklusser anvendt til påvisning er de, der kræves til frembringelse af et påviseligt signal, en mængde, som f.eks. vil
10 afhænge af prøvens natur. Hvis f.eks. prøven er ren eller fortyndet, kan færre cyklusser være krævet, end hvis den er en kompleks blanding. Hvis prøven er human genomisk DNA er antallet af cyklusser fortrinsvis fra ca. 10 til 30.

Mængden af oprindelig nukleinsyre forbliver konstant i
15 hele fremgangsmåden, fordi den ikke replikeres. Mængden af de lange produkter forøges liniært, fordi de kun produceres ud fra den oprindelige nukleinsyre. Mængden af den specifikke sekvens forøges eksponentielt. Den specifikke sekvens vil således blive den dominerende. Dette vises i den følgende
20 tabel, som indicerer de relative mængder af de teoretiske typer, der er til stede efter n cyklusser, idet 100% effektivitet antages for hver cyklus:

Antal af dobbeltstreng <u>efter 0 til n cykler</u>				
25	<u>Cyklus antal</u>	<u>Template</u>	<u>Lange produkter</u>	Specifik <u>sekvens [S]</u>
	0	1	-	-
	1	1	1	0
	2	1	2	1
30	3	1	3	4
	5	1	5	26
	10	1	10	1013
	15	1	15	32.752
	20	1	20	1.048.555
35	n	1	n	$(2^n - n - 1)$

Når en enkeltstrenget nukleinsyre anvendes som template dannes kun 1 langt produkt pr. cyklus.

Den heri beskrevne fremgangsmåde kan ifølge opfindelsen anvendes til kloning af en speciel nukleinsyresekvens for
5 indføjelser i en egnet ekspressionsvektor. Vektoren kan derefter anvendes til transformering af en passende værtsorganisme til dannelse af genproduktet af sekvensen ved standardmetoder af rekombinant DNA teknologi.

Normalt vil sådan kloning enten involvere direkte ligering i en vektor eller tilsætningen af oligonukleotidlinkere
10 efterfulgt af restriktionsenzymspaltning. Begge disse metoder involverer imidlertid den ineffektive stump-endede ligeringsreaktion. Ingen af teknikkerne vil desuden styre orienteringen eller multipliceringen af indføjelsen af det multiplicerede produkt i kloningsvektoren.
15

Den heri beskrevne multiplikationsproces kan give en blanding af nukleinsyrer, hidrørende fra den oprindelige template-nukleinsyre, de forventede målmultiplikationsprodukter og forskellige ikke-mål-baggrundsprodukter. Det multiplicerede produkt kan også være en blanding, hvis den oprindelige template-DNA indeholder multiple målsekvenser,
20 såsom i et heterozygotisk diploidgenom, eller når der er en familie af beslægtede gener.

De heri beskrevne primere kan være modificeret til at
25 hjælpe til hurtig og specifik kloning af blandingen af DNA, der produceres ved multiplikationsreaktion. I en sådan modifikation er den samme eller forskellige restriktionssteder inkorporeret ved 5'-enderne af primerne, hvilket resulterer i restriktionssteder ved de to ender af det multiplicerede
30 produkt. Når det udskæres med de passende enzymer kan det multiplicerede produkt derefter let indsættes i plasmid- eller virusvektorer og klones. Denne kloning tillader analyse eller ekspression af individuelle multiplicerede produkter, ikke en blanding.

35 Skønt det samme restriktionssted kan anvendes for begge primere, tillader anvendelsen af forskellige restriktionssteder indsætning af produktet i vektoren med en specifik orientering og undertrykker multiple indsætninger såvel som

indsætninger, der stammer fra multiplikationer, der kun er baseret på en af de to primere. Den specifikke orientering er nyttig, når der klones i enkeltstrengsekventerende vektorer, når enkeltstrenghybridiseringsprober anvendes eller når det

5 klonede produkt udtrykkes.

En metode til fremstilling af primerne er at vælge en primersekvens, som adskiller sig minimalt fra målsekvensen. Områder, i hvilke hver af primerne skal placeres, bliver screenet for homologi til restriktionssteder, der er passende

10 for den ønskede vektor. Målsekvensen "CAGTATCCGA..." adskiller sig f.eks. med kun en base fra en, der indeholder et BamHI-sted. En primersekvens udvælges til at passe målet præcist ved dets 3' ende og at indeholde den ændrede sekvens og restriktionssted nær dets 5'-ende (f.eks. "CAGgATCCGA...",

15 hvor det lille bogstav symboliserer en enhed, der ikke passer med målsekvensen). Denne minimalt ændrede sekvens vil ikke interferere med primerens evne til at hybridisere til den originale målsekvens og til initiering af polymeriseringen. Efter den første multiplikationscyklus kopieres primeren,

20 bliver selv målet og parrer eksakt med nye primere. Efter multiplikationsprocessen spaltes produkterne med passende restriktionsenzym, der eventuelt er separeret fra ligationsinhibitorer, såsom nukleotidtriphosphater og salte ved passage over en afsaltende søjle eller molekylvægtkromato-

25 grafisøjle og indsættes ved ligering i en klonende vektor, såsom bakteriofag M13. Genet kan derefter sekventeres og/eller udtrykkes under anvendelse af kendte metoder.

Den anden metode til fremstilling af primerne involverer at tage 3'-enden af primerne fra målsekvensen og tilsætte det

30 ønskede restriktionssted (-steder) til 5'-enden af primeren. For det ovenfor anførte eksempel kunne et HindIII-sted tilsættes til dannelse af sekvensen "cgaagcttCAGTATCCGA...", hvor små bogstaver er som beskrevet ovenfor. De tilsatte baser ville ikke bidrage til hybridiseringen i den første

35 multiplikationscyklus, men ville passe i efterfølgende cyklusser. De endelige multiplicerede produkter udskæres derefter med restriktionsenzym (-enzym), klones og udtrykkes som beskrevet ovenfor. Genet, der multipliceres, kan f.eks.

være human β -hæmoglobin eller human HLA DQ, DR eller DP- α og - β -gener.

Fremgangsmåden heri kan desuden anvendes til in vitro mutagenisering. Oligodeoxyribonucleotidprimerne behøver ikke
5 at være præcis komplementære til DNA-sekvensen, som skal multipliceres. Det er blot nødvendigt, at de er i stand til at hybridisere tilstrækkeligt godt til sekvensen til at blive forlænget af polymeraseenzymet eller ved et hvilket som helst andet anvendt inducerende middel. Produktet af en polymerase-
10 kædereaktion, hvor de anvendte primere ikke er præcis komplementære til den oprindelige template vil indeholde sekvensen af primeren snarere end sekvensen af template, og derved indføre en in vitro mutation. I yderligere cyklusser vil denne mutation blive multipliceret med en ubegrænset effektivitet, fordi ingen yderligere ikke-parrede primerreaktioner
15 kræves. Den således fremstillede mutant kan indsættes i en passende vektor ved molekylærbiologiske standardteknikker og kan eventuelt overføre mutantegenskaber til denne vektor, såsom produktionspotentialitet af et ændret protein.

20 Fremgangsmåden til fremstilling af en ændret DNA-sekvens som beskrevet ovenfor kan gentages på det ændrede DNA under anvendelse af forskellige primere for således at inducere yderligere sekvensændringer. På denne måde kan en serie af muterede sekvenser gradvis produceres, hvori hver ny til-
25 føjelse til serierne kan adskille sig fra den forrige i ringe grad, men fra den oprindelige DNA-kildes sekvens i stadig større grad. På denne måde kan der i sidste ende laves ændringer, som ikke er mulige i et enkelt trin på grund af den manglende funktionsevne hos en meget alvorlig fejlparrende
30 primer.

Primeren kan desuden som en del af dens sekvens indeholde en ikke-komplementær sekvens, forudsat at en tilstrækkelig mængde af primeren indeholder en sekvens, som er komplementær til strengen, som skal multipliceres. En nukleotidsekvens,
35 som ikke er komplementær til templatesekvensen (såsom f.eks. en promotor, linker, kodende sekvens osv) kan f.eks. blive tilføjet til 5'-enden af en eller begge primerne og derved tilhæftet til produktet fra multiplikationsprocessen. Efter

at forlængelsesprimeren er tilsat gennemføres tilstrækkeligt mange cyklusser til opnåelse af den ønskede mængde af ny template, der indeholder den ikke-komplementære nukleotidindføjelse. Dette tillader produktion af store mængder af de
5 kombinerede fragmenter på relativ kort tid (f.eks. to timer eller mindre) under anvendelse af en simpel teknik.

Den her anførte fremgangsmåde kan ifølge opfindelsen desuden anvendes til at syntetisere et nukleinsyrefragment ud fra et eksisterende nukleinsyrefragment, som er kortere end
10 dets produkt (kaldet kernesegmentet) under anvendelse af visse primere, hvis 3'-ender er komplementære til eller i alt væsentligt komplementære til 3'-enderne af enkeltstrengene, som er frembragt ved at separere strengene af de oprindelige, kortere nukleinsyrefragmenter, og hvor 5'-enderne af primerne
15 indeholder sekvensinformation, som skal tilføjes til kernesegmentet. Fremgangsmåden omfatter:

- (a) at strengene fra det eksisterende fragment behandles med to oligonukleotidprimere og andre nødvendige komponenter under sådanne betingelser, at der af
20 hver primer syntetiseres et forlængelsesprodukt, som er komplementært til hver nukleinsyrestreng, ved hvilken fremgangsmåde primerne udvælges således, at de i alt væsentligt er komplementære til 3'-enden af hver streng af det eksisterende fragment, således at
25 det forlængelsesprodukt, som syntetiseres ud fra én primer, når det er separeret fra dets komplement, kan tjene som en template for syntesen af forlængelsesproduktet af den anden primer, og hvorved hver primer i 5'-enden indeholder en sekvens af nukleotider, som ikke er komplementære til det eksisterende fragment, og som svarer til de to ender af det nukleinsyrefragment, der bliver syntetiseret,
- (b) at primerforlængelsesprodukterne adskilles fra de
35 templater, på hvilke de blev syntetiseret, til frembringelse af enkeltstrengede molekyler,
- (c) at de enkeltstrengede molekyler, der er frembragt i trin (b), behandles med primerne og de nødvendige komponenter fra trin (a) under sådanne betingelser,

at der syntetiseres et primerforlængelsesprodukt under anvendelse af hver enkeltstreng, der er frembragt i trin (b), som en template, således at der produceres to intermediære dobbeltstrengede nukleinsyremolekyler, i hvilke der er blevet inkorporeret den nukleotidsekvens, som er til stede i 5'-enden af én af oligonukleotidprimerne, og to fuldlængde dobbeltstrengede nukleinsyremolekyler, i hvilke der er inkorporeret den nukleinsyresekvens, der er til stede i 5'-enderne af begge oligonukleotidprimerne, og

(d) at trinnene (b) og (c) gentages et tilstrækkeligt antal gange til at producere dobbeltstrengede molekyler i fuld længde i en effektiv mængde.

Eventuelt kan trinnene (a) - (d) gentages under anvendelse af produktet fra trin (d) som kernefragment og to yderligere oligonukleotidprimere, som er komplementære til eller i alt væsentligt komplementære til 3'-enderne af de enkeltstrengene, der frembringes ved at separere strengene fra produktet i trin (d).

Trinnene (b) og (c) gentages så ofte som nødvendigt, almindeligvis mindst 5 gange, til frembringelse af den krævede mængde af det dobbeltstrengede produkt af fuld længde til syntetisering af slutproduktet (dvs. den effektive mængde). Kernesegmentet kan yderligere opnås som produktet af en tidligere multiplikationscyklus. Produktet frembragt i trin (d) kan oprenses før en ny forlængelses- og multiplikationscyklus eller kan anvendes direkte ved at anvende reaktionsblandingen, der indeholder produktet.

Hvis 3'-enderne af primerne ikke er præcis komplementære til 3'-enderne af de enkelte strengene af den oprindelige, kortere nukleinsyre, vil kernefragmentet af produktet ikke være præcis det samme som sekvensinformationen, der er nedlagt i den oprindelige, kortere nukleinsyre. Mutanter af den oprindelige nukleinsyre kan derfor laves ved at anvende primere, som i alt væsentligt er komplementære ved deres 3'-ender til 3'-enderne af enkeltstrengene af den oprindelige, kortere nukleinsyre.

Hvis restriktionsstedlinkere inkorporeres i primerne, kan de multiplicerede, dobbeltstrengede produkter fordøjes med de passende restriktionsenzymmer og ligeres direkte i en M13-vektor til hurtig kloning og sekventering. M13-plaques, der indeholder de specifikke multiplicerede målsekvenser, kan identificeres ved at hybridisere plaque-løftefiltrere med en probe, som er specifik for målsekvensen.

De efterfølgende eksempler illustrerer opfindelsen nærmere. I disse eksempler er alle procenter angivet i vægtprocenter for faste stoffer og i volumenprocenter for væsker, og alle temperaturer er i grader Celcius med mindre andet angives.

Eksempel 1

En 25-baseparsekvens med nukletidsekvensen

15 5' CCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCT 3'
 3' GGAGCCGTGGCAGTGGGACCTACGA 5'

indeholdt på et 47 basepar FokI-restriktionsfragment af pBR322, som var opnået fra ATCC, blev fremstillet som følger. En FokI-fordøjelse af pBR322 indeholdende det 47 bp lange fragment blev fremstillet ved at fordøje pBR322 med FokI i overensstemmelse med betingelserne, som er foreslået af leverandøren, New England Biolabs Inc. Primerne, som blev anvendt, var 5' d(CCTCGGCACCG) 3' og 5' d(AGCATCCAGGGTG) 3' og blev fremstillet under anvendelse af traditionelle metoder. De efterfølgende ingredienser tilsattes til 33 µl puffer, som bestod af 25 mM kaliumphosphat, 10 mM magnesiumchlorid og 100 mM natriumchlorid ved pH 7,5: 2433 pmol af hver af de ovenfor beskrevne primere, 2,4 pmol af det FokI-fordøjede pBR322, 12 nmol dATP, 22 nmol dCTP, 19 nmol dGTP og 10 nmol TTP.

Blandingen blev opvarmet til 85°C i 5 minutter og fik lov at afkøle til omgivelsestemperatur. Fem enheder Klenow-fragment af E.coli DNA polymerase I tilsattes, og temperaturen blev holdt i 15 minutter. Efter denne tid blev blandingen igen opvarmet til 85°C i 5 minutter og fik lov at afkøle. Fem enheder Klenow-fragment blev igen tilsat, og reaktionen blev

udført i 15 minutter. Opvarmnings-, afkølings- og syntese-trinnene blev gentaget yderligere 11 gange.

Efter den sidste gentagelse blev en 5 μ l delprøve udtaget fra reaktionsblandingen. Denne blev opvarmet til 85°C i 3
5 minutter og fik lov at afkøle til omgivelsestemperatur. 12,5 pmol α -P³²-deoxycytidintriphosphat og 5 enheder Klenow-fragment blev tilsat, og reaktionen fik lov at forløbe i 15 minutter. De mærkede produkter blev undersøgt ved polyacrylamidgelelektroforese. FokI-fordøjelsen blev mærket på lignende måde og tjente som kontrol og molekylvægtmarkører. Det
10 eneste stærkt mærkede bånd, der var synligt efter de 13 cyklusser, var den tilsigtede 25-basepar lange sekvens.

Eksempel 2

Sekvensen, som ønskedes multipliceret, var en 94 basepar
15 lang sekvens, der var indeholdt i det humane β -globingen og spændte over MstII-stedet, der er involveret i seglcelleanæmi. Sekvensen har den i figur 1 viste nukleotidsekvens.

I. Syntese af primere

Følgende to oligodeoxyribonukleotidprimere fremstilledes
20 ved den nedenfor beskrevne metode:

5' CACAGGGCAGTAACG 3' Primer A

og

5' TTTGCTTCTGACACA 3' Primer B

Automatiseret synteseprocedure: Diethylphosphoramiditer,
25 der er syntetiseret ifølge Beaucage og Caruthers (Tetrahedron Letters (1981) 22:1859-1862) blev kondenseret sekventielt til et nukleosidderivatiseret styret poreglasbæremateriale under anvendelse af en Biosearch SAM-1. Fremgangsmåden inkluderede detritylering med trichloreddikesyre i dichlormethan, kondensering under anvendelse af benzotriazol som aktiverende
30 protondonor og afdækning (eng: capping) med eddikesyreanhydrid og dimethylaminopyridin i tetrahydrofuran og pyridin. Cyklustid var ca. 30 minutter. Udbytte ved hvert trin var i alt væsentligt kvantitativt og blev bestemt ved opsamling og
35 spektroskopisk undersøgelse af dimethoxytritylalkohol frigjort under detritylering.

Oligodeoxyribonukleotid-afbeskyttelses- og -oprensnings-procedurer: Den faste bæremateriale blev fjernet fra søjlen og eksponeret til 1 ml koncentreret ammoniumhydroxid ved stuetemperatur i 4 timer i et lukket rør. Bærematerialet blev derefter fjernet ved filtrering, og opløsningen, der indeholdt det delvis beskyttede oligodeoxynukleotid, blev opvarmet til 55°C i 5 timer. Ammoniak blev fjernet, og resten blev påsat en præparativ polyacrylamidgel. Elektroforese blev udført ved 30 volt/cm i 90 minutter, hvorefter båndet, der indeholdt produktet, blev identificeret ved UV-skygning af en fluorescensplade. Båndet blev udskåret og elueret med 1 ml destilleret vand natten over ved 4°C. Denne opløsning blev påført en Altech RP18 søjle og elueret med en 7-13% gradient af acetonitril i 1% ammoniumacetatbuffer ved pH 6,0. Eluatet blev målt ved UV-absorption ved 260 nm, og en passende fraktion opsamledes, kvantificeredes ved UV-absorbans i et fastlagt volumen og inddampedes til tørhed ved stuetemperatur i en vakuumcentrifuge.

Karakterisering af oligodeoxyribonukleotider: Testalikvoter af de oprensede oligonukleotider blev mærket med ^{32}P med polynukleotidkinase og γ - ^{32}P -ATP. De mærkede forbindelse blev undersøgt ved autoradiografi af 14-20% polyacrylamidgeler efter elektroforese i 45 minutter ved 50 volt/cm. Denne fremgangsmåde verificerer molekylvægten. Basesammensætningen blev bestemt ved fordøjelse af oligodeoxyribonukleotidet til nukleosider under anvendelse af gift-diesterase og bakteriel, alkalisk phosphatase og efterfølgende separation og kvantificering af de afledte nukleosider under anvendelse af en HPLC-søjle med omvendt fase og en 10% acetonitril, 1% ammoniumacetat mobil fase.

II. DNA-kilde.

A. Ekstraktion af hel, human vildtype-DNA

Human genomisk DNA, der er homozygotisk for normal β -globin, blev ekstraheret fra cellelinien Molt4 (opnået fra Human Genetic Mutant Cell Repository og identificeret som GM2219c) under anvendelse af teknikken beskrevet af Stetler et al., Proc.Natl.Acad.Sci. (1982), 79:5966-5970.

B. Konstruktion af klonede globingener

Et 1,9 kb langt BamHI-fragment af det normale β -globingen isoleredes fra cosmidet pFC11 og indsattes i BamHI-stedet af pBR328 (Soberon et al., Gene (1980) 9:287-305). Dette frag-
 5 ment, som omfatter regionen, som hybridiserer til den syntetiske 40-mer probe, inkluderer den første og anden exon, den første intron og de 5'-flankerende sekvenser af genet (Lawn et al., Cell (1978), 15:1157-1174). Denne klon betegnedes pBR328:HbA og blev deponeret under ATCC nr. 39.698 25.maj
 10 1984.

Det tilsvarende 1,9 kb lange BamHI-fragment af seglcelle-allelet af β -globin isoleredes fra cosmidet pFC12 og klonedes som ovenfor beskrevet. Denne klon blev betegnet pBR328:HbS og deponeredes under ATCC nr. 39.699 25. maj, 1984.

15 Hver rekombinantplasmid blev transformeret ind i og opformeret i E.coli MM294 (ATCC nr. 39.607).

C. Fordøjelse af klonede globingener med MstII

Et total på 100 μ g af hver af pBR328:HbA og pBR328:HbS blev individuelt fordøjet med 20 enheder MstII (New England
 20 Biolabs) i 16 timer ved 37°C i 200 μ l 150 mM NaCl, 12 mM Tris HCl (pH 7,5), 12 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT), og 100 μ g/ml bovinserumalbumin (BSA). Produkterne blev betegnet pBR328:HbA/MstII henholdsvis pBR328:HbS/MstII.

III. Polymerasekædereaktion

25 Til 100 μ l buffer bestående af 60 mM natriumacetat, 30 mM Trisacetat og 10 mM magnesiumacetat ved pH 8,0 tilsattes 2 μ l af en opløsning indeholdende 100 picomol Primer A (med sekvensen d(CACAGGGCACTAACG)), 100 picomol af Primer B (med sekvensen d(TTTGCTTCTGACACA)) og 1000 picomol af hver af
 30 dATP, dCTP, dGTP og TTP. Desuden tilsattes en af følgende ovenfor beskrevne DNA-kilder:

- 10 μ g hel, human, vildtype DNA (reaktion I)
- 0,1 picomol pBR328:HbA (reaktion II).
- 0,1 picomol pBR328:HbS (reaktion III).
- 35 0,1 picomol pBR328:HbA/MstII (reaktion IV).
- 0,1 picomol pBR328:HbS/MstII (reaktion V).

Intet mål-DNA (reaktion VI)

Hver resulterende opløsning opvarmedes til 100°C i 4 minutter og fik lov at afkøle til stuetemperatur i 2 minutter, hvorefter 1 µl indeholdende 4 enheder Klenow-fragment af E.coli DNA polymerase tilsattes. Hver reaktion fik lov at forløbe i 10 minutter, hvorefter cyklussen med tilsætning af primere, nukleotider og DNA, opvarmning, afkøling, tilsætning af polymerase og reaktion blev gentaget 19 gange for reaktion I og 4 gange for reaktionerne II-VI.

10 Alikvoter på 4 mikroliter af reaktionerne I og II, der var fjernet før den første cyklus og efter den sidste cyklus af hver reaktion, blev påsat en 12% polyacrylamidgel 0,089 M i Tris-borat-buffer ved pH 8,3 og 2,5 mM i EDTA. Gelen blev elektroforesebehandlet ved 25 volt/cm i 4 timer, overført til 15 en nylonmembran, der tjente som fast-fase-bæremateriale og probebehandlet med et syntetisk 5'-³²P-mærket 40 bp langt fragment, der var fremstillet ved standardteknik, med sekvensen:

5' d(TCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAG) 3'

20 i 30% formamid, 3 x SSPE, 5 x Denhardt's, 5% natriumdodecylsulfat ved pH 7,4. Figur 2 er et autoradiogram af den probebehandlede nylonmembran for reaktionerne I og II. Bane 1 er 0,1 picomol af en 58 bp langt syntetisk fragmentkontrol, hvor 1 streng er komplementær til den ovennævnte probe. Bane 2 er 25 4 µl af reaktion I forud for den første multiplikationscyklus. Bane 3 er 4 µl af reaktion I efter den 20. multiplikationscyklus. Bane 4 er 4 µl af reaktion II efter fem multiplikationscykluser. Bane 5 er en molekylvægtstandard, der består af en FokI (New England Biolabs) fordøjelse af pBR322 30 (New England Biolabs) mærket med α-³²P-dNTP'er og polymerase. Bane 3 viser, at efter 20 cykluser indeholdt reaktionsblanding I en stor mængde af den specifikke sekvens af den passende molekylvægt og ingen andre påviselige produkter. Reaktionsblanding II efter 5 cykluser indeholdt også dette 35 produkt, såvel som udgangsnukleinsyren og andre produkter, som vist ved bane 4.

Til 5,0 μ l alikvoter af reaktionerne II-VI efter den 4. cyklus tilsattes 5 pmol af hver af de ovenfor beskrevne primere. Opløsningerne blev opvarmet til 100°C i 4 minutter og fik lov at ækvilibrere til stuetemperatur. 3 pmol af hver af α -³²P-dATP, α -³²P-dCTP, α -³²P-dGTP, α -³²P-dTTP og 4 enheder Klenow-fragment blev tilsat. Reaktionen fik i et slutvolumen på 10 μ l og ved de ovenfor angivne saltkoncentrationer lov at forløbe i 10 minutter. Polymeraseaktiviteten blev afsluttet ved opvarmning i 20 minutter ved 60°C. Alikvoter på 4 μ l af reaktionerne II-VI blev ladet på en 12% polyacrylamidgel 0,089 M i Tris-borat-buffer ved pH 8,3 og 2,5 mM i EDTA. Gelen blev elektroforesebehandlet ved 25 volt/cm i 4 timer, hvorefter autoradiografi blev udført.

Figur 3 er et autoradiogram af elektroforesen. Bane 1 er en molekylvægtstandard, bane 2 er reaktion II, bane 3 er reaktion III, bane 4 er reaktion IV og bane 5 er reaktion V. En anden bane for reaktion VI som kontrol og uden tilsat DNA havde ingen markeringer i nogen af banerne. Det kan ses ud fra tegningen, at de 94 bp lange fragment, som var forudsagt ud fra mål-DNA, kun var til stede, hvor intakt β -globin-DNA-sekvenser var tilgængelige for multiplicering, dvs. pBR328:HbA (bane 2), pBR328:HbS (bane 3) og pBR328:HbS/MstII (bane 5). MstII-fordøjelse skærer pBR328:HbA i den 94-mere sekvens, og gør den derved ude af stand til at blive multipliceret, og det 94-mere bånd viser sig ikke i bane 4. I modsætning hertil udskæres den 94-mere sekvens i pBR328:AbS ikke, når plasmidet fordøjes med MstII, og er således tilgængelig for multiplicering som vist i bane 5.

Figur 4 viser kædereaktionen for 3 cyklusser i multiplicering af den 94 bp lange sekvens. PC01 og PC02 er primere A og B. Tallene på højre side indikerer cyklusserne, hvorimod tallene på venstre side indikerer cyklustallene, i hvilke et specielt molekyle blev produceret.

Eksempel 3

Dette eksempel viser multiplikationen af en 110 bp sekvens spændende over det allele MstII-sted i det humane hæmoglobingen.

Et total på 1,0 mikrogram hel, human DNA, 100 picomol
d(ACACAACGTGTGTTCACTAGC) og 100 picomol
d(CAACTTCATCCACGTTCCACC), hvor primerne var blevet fremstillet
ved metoden ifølge eksempel 2, blev opløst i 100 μ l af en
5 opløsning, som bestod af:
1,5 mM af hver af de fire deoxyribonukleosidtriphosfater
30 mM Trisacetatbuffer ved pH 7,9
60 mM natriumacetat
10 mM magnesiumacetat
10 0,25 mM dithiothreitol.

Opløsningen opvarmedes til 100°C i 1 minut og bragtes
hurtigt til 25°C i 1 minut, hvorefter der tilsattes 2,5
enheder Klenow-fragment af DNA-polymerase. Polymerasereak-
tionen fik lov at forløbe i 2 minutter ved 25°C, hvorefter
15 cyklussen bestående af opvarmning, afkøling, tilsætning af
Klenow-fragment og reaktion blev gentaget så ofte som ønsket.

Men en 70% effektivitet ved hver cyklus resulterede 15
cyklusser i syntese af 1,4 femtomol af det ønskede 110 bp
fragment af β -globingenet.

20 Eksempel 4

Dette eksempel viser multiplikationen af en 240 bp se-
kvens, der spænder over det allele MstII-sted i det humane
hæmoglobingen. Denne sekvens indeholder NcoI, HinfI og MstII
restriktionsstederne.

25 Til 100 μ l af en blanding af 60 mM natriumacetat, 30 mM
Tris-acetat og 10 mM magnesiumacetat ved pH 8,0 indeholdende
0,1 pmol pBR328:HbA tilsattes 2 μ l opløsning A, der inde-
holdt:

100 picomol d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) primer.
30 100 picomol d(TAACCTTGATACCAACCTGCCC) primer
1000 pmol af hver af dATP, dCTP, dGTP og TTP.

De to primere blev fremstillet ved metoden beskrevet i
eksempel 2. Opløsningen blev opvarmet til 100°C i 4 minutter
og fik lov at afkøle i omgivelsesluft i 2 minutter, hvorefter
35 der tilsattes 1 μ l indeholdende fire enheder Klenow fragment
af E.coli DNA polymerase. Reaktionen fik lov at forløbe i 10

minutter, hvorefter cyklussen bestående af tilsætning af opløsning A, opvarmning, afkøling, tilsætning af polymerase og reaktion blev gentaget 3 gange. Til en delmængde på 5,0 μ l af reaktionerne tilsattes 5 picomol af hver af ovennævnte

5 oligonukleotidprimere. Opløsningen blev opvarmet til 100°C i 4 minutter og fik lov at indstille sig til omgivelsestemperatur, hvorefter 3 picomol af hver af de α -³²P-mærkede deoxyribonukleosidtriphosphater og 4 enheder Klenow-fragment tilsattes. Reaktionen fik i et slutvolumen på 10 μ l og ved de

10 ovenfor givne saltkoncentrationer lov at forløbe i 10 minutter. Polymeraseaktiviteten blev afsluttet ved opvarmning i 20 minutter ved 60°C. 2 μ l alikvoter blev fordøjet med NcoI, MstI eller HinfI og sat på en 12% polyacrylamidgel 0,089 M i Tris-Borat-buffer ved pH 8,3 og 2,5 mM i EDTA. Gelen blev

15 elektroforesebehandlet ved 25 volt/cm i 4 timer, og autoradiografi blev udført. Figur 5 viser autoradiogrammet af elektroforesen, hvor bane 1 er den molekylvægtstandard, bane 2 er uden fordøjelse med enzym (240 bp intakt), bane 3 er fordøjelse med NcoI (131 og 109 bp), bane 4 er fordøjelse med

20 MstII (149 og 91 bp) og bane 5 er fordøjelse med HinfI (144 og 96 bp). Autoradiogrammet er i overensstemmelse med multiplikationen af den 240 bp lange sekvens.

Eksempel 5

25 Dette eksempel viser anvendelsen af fremgangsmåden beskrevet heri til påvisning af seglcelleanæmi ved sekventiel fordøjelse.

Syntese og phosphorylering af oligodeoxyribonukleotider

En mærket DNA-probe, RS06, med sekvensen:

5' *CTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGG 3'

30 hvor * indicerer mærkningen, og en umærket, blokerende oligomer, RS10, med sekvensen:

3' GACAGAGGTCACCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCC 5'

som har 3 basepar fejlparrede med RS06, blev syntetiseret ifølge fremgangsmåderne, som blev angivet i eksempel 2(I).

35 Proben RS06 blev mærket ved at kontakte 5 pmol heraf med 4 enheder T4 polynukleotidkinase (New England Biolabs) og 50

pmol γ - 32 P-ATP (New England Nuclear, ca. 7200 Ci/mmol) i et 40 μ l reaktionsvolumen indeholdende 70 mM Tris-buffer (pH 7,6), 10 mM MgCl_2 , 1,5 mM spermin og 2,5 mM dithiothreitol i 90 minutter ved 37°C. Det totale volumen blev derefter indstillet til 100 μ l med 25 mM EDTA og oprenset ifølge fremgangsmåden af Maniatis et al., Molecular Cloning (1982), 464-465 over en 1 ml Bio Gel P-4 spindialysesøjle fra BioRad ækvilibreret med Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-buffer, 0,1 mM EDTA, pH 8,0). Den mærkede probe blev yderligere oprenset ved elektroforese på en 18% polyacrylamidgel (19:1 acrylamid:BIS, BioRad) i Tris-borsyre-EDTA (TBE) buffer (89 mM Tris, 89 mM borsyre, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) i 500 vhr. Efter lokalisering ved autoradiografi blev den del af gelen, der indeholdt den mærkede probe, udskåret, knust og elueret i 0,2 ml TE puffer natten over ved 4°C. TCA-præcipitation af reaktionsproduktet viste, at den specifikke aktivitet var 4,9 Ci/mmol, og slutkoncentrationen var 20 pmol/ml.

Den umærkede RS10 blokerende oligomer blev anvendt ved en koncentration på 200 pmol/ml.

20 Isolering af human genomisk DNA fra cellelinier

Genomisk DNA med høj molekylvægt blev isoleret fra lymfoidcellelinierne Molt4, SC-1 og GM2064 under anvendelse af i alt væsentligt den metode, der beskrives af Stetler et al. i PNAS (1982) 79; 5966-5970 (for Molt4) og Maniatis et al. i Molecular Cloning (1982), 280-281.

Molt4 (Human Mutant Cell Repository, GM2219C) er en T-cellelinie, der er homozygot for normal β -globin, og SC-1, deponeret hos ATCC 19. marts 1985, er en EBV-transformeret B-cellelinie, der er homozygot for seglcelleallelet. GM2064 (Human Mutant Cell Repository, GM2064) blev oprindeligt isoleret fra en individuel homozygot med arvelig persistens af føtalhæmoglobin (HPFH) og indeholder ingen beta- eller deltaglobingensekvenser. Alle cellelinier blev opretholdt i RPMI-1640 med 10% føtal kalveserum.

Isolering af human genomisk DNA fra kliniske blodprøver

En klinisk blodprøve, betegnet CH12, fra en kendt segl-cellebærer (AS) blev opnået fra Dr. Bertram Lubin fra Children's Hospital i Oakland, Californien. Genomisk DNA blev fremstillet ud fra "buffy-coat"-fraktionen, som primært er sammensat af perifer blod-lymfocytter, under anvendelse af en modifikation af fremgangsmåden, som er beskrevet af Nunberg et al. i Proc.Nat.Acad.Sci. 75, 5553-5556 (1978).

Cellerne blev resuspenderet i 5 ml Tris-EDTA-NaCl (TEN) buffer (10 mM Tris buffer pH 8, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl) og indstillet til 0,2 mg/ml proteinase K, 0,5% SDS, og inkuberet natten over ved 37°C. Natriumperchlorat blev derefter tilsat til 0,7 M, og lysatet blev forsigtigt rystet i 1-2 timer ved stuetemperatur. Lysatet blev ekstraheret med 30 ml phenol/chloroform (1:1), derefter med 30 ml chloroform og efterfulgt af ethanolpræcipitering af nukleinsyrerne. Pelleten blev resuspenderet i 2 ml TE-buffer og RNase A blev tilsat til 0,005 mg/ml. Efter fordøjelse i 1 time ved 37°C blev DNA'et ekstraheret en gang med hver af lige volumener phenol, phenol/ chloroform og chloroform og blev ethanolpræcipiteret. DNA'et blev resuspenderet i 0,5 ml TE-puffer, og koncentrationen blev bestemt ved absorption ved 260 nm.

Polymeasekædereaktion til selektiv multiplicering af β -globinsekvenser

To mikrogram genomisk DNA blev multipliceret i et initielet 100 μ l reaktionsvolumen indeholdende 10 mM Tris-puffer (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 150 pmol Primer A med sekvensen d(CACAGGGCACTAACG) og 150 pmol af Primer B med sekvensen d(CTTTGCTTCTGACACA) og dækket med ca. 100 μ l mineralolie for at forhindre fordampning.

Hver DNA-prøve undergik 15 multiplikationscyklusser, hvor en cyklus er sammensat af 3 trin:

- 1) denaturering i et varmebloksæt ved 95°C i 2 minutter,
- 2) umiddelbar overføring til et varmebloksæt ved 30°C i 2 minutter for at tillade primere og genomisk DNA at anneale,
- 3) tilsætning af 2 μ l af en opløsning indeholdende 5 enheder Klenow-fragment af E.coli DNA-polymerase I (New

England Biolabs), 1 nmol af hver af dATP, dCTP, dGTP og TTP i en puffer, der er sammensat af 10 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ og 4 mM dithiothreitol. Denne forlængelsesreaktion fik lov at forløbe i 10 minutter ved 30°C.

- 5 Efter slutcyklussen blev reaktionen afsluttet ved opvarmning ved 95°C i 2 minutter. Mineralolien blev ekstraheret med 0,2 ml chloroform og bortkastet. Slutreaktionsvolumenet var 130 µl.

Hybridisering/fordøjelse af multipliceret, genomisk DNA med prober og DdeI/HinfI

- 10 45 µl af det multiplicerede, genomiske DNA blev ethanolpræcipiteret og resuspenderet i samme volumen TE-buffer. 10 µl (indeholdende den præ-multiplicerede ækvivalent til 154 ng af genomisk DNA) blev overført til et 1,5 ml Microfuge-rør og
15 20 µl TE-buffer til et slutvolumen på 30 µl. Prøven blev dækket med mineralsk olie og denatureret ved 95°C i 10 minutter. 10 µl 0,6 M NaCl indeholdende 0,02 pmol mærket R206-probe blev tilsat til røret, blandet let og straks overført til en 56°C varm varmeblok i 1 time. Fire mikroliter umærket
20 RS10-blokerende oligomer (0,8 pmol) blev tilsat, og hybridiseringen fortsattes i yderligere 10 minutter ved samme temperatur. 5 µl 60 mM MgCl₂/0,1% BSA og 1 µl DdeI (10 enheder, New England Biolabs) tilsattes, og det reannealede DNA blev fordøjet i 30 minutter ved 56°C. 1 µl HinfI (10 enheder, New
25 England Biolabs) blev derefter tilsat og inkuberet i yderligere 30 minutter. Reaktionen blev stoppet ved tilsætning af 4 µl 75 mM EDTA og 6 µl sporfarve til et slutvolumen på 61 µl.

- Mineralolien blev ekstraheret med 0,2 ml chloroform og 18 µl af reaktionsblandingen (45 ng genomisk DNA) blev sat på en
30 30% polyacrylamid-minigel (19:1, Bio Rad) i et Hoeffler SE200 apparat. Gelen blev elektroforesebehandlet ved ca. 300 volt i 1 time, indtil bromphenolblå-farvefronten var vandret 3,0 cm fra påsætningsstedet. De øverste 1,5 cm af gelen fjernedes, og den resterende gel blev eksponeret i 4 dage med en intensificeringsskærm ved -70°C.
35

Diskussion af fotografi (fig.9)

Hver bane indeholder 45 ng multipliceret, genomisk DNA. Bane A indeholder Molt4 DNA; bane B, CH12; bane C, SC-1 og bane D, GM2064. Molt4 repræsenterer genotypen af et normalt
5 individ med 2 kopier af β^A -genet pr. celle (AA), CH12 er en klinisk prøve fra en seglcellebærer med et β^A - og et β^S -gen pr. celle (AS), og SC1 repræsenterer genotypen for et seglcelleindivid med to kopier af β^S -genet pr. celle (SS). GM2064, som ikke indeholder beta- eller deltaglobinsekvenser,
10 er tilstede som en negativ kontrol.

Som det ses på fotografiet er den DdeI-spaltede, β^A -specifikke octamer kun tilstede i de DNA'er, der indeholder β^A -genet (baner A og B) og den HinfI-spaltede, β^S -specifikke trimer er kun tilstede i de DNA'er, der indeholder β^S -genet
15 (banerne B og C). Tilstedeværelsen af både trimer og octamer (bane B) er diagnostisk for en seglcellebærer og kan skelnes fra et normalt individ (bane A) med octameren alene og fra et seglcelleplaget individ (bane C) med trimer alene.

Gentagelsen af det ovenfor beskrevne forsøg under anvendelse af ikke-multipliceret, genomisk DNA viste til sammenligning at multiplikationen forøgede påvisningsfølsomheden
20 mindst 1000 gange.

Eksempel 6

Dette eksempel illustrerer direkte påvisning af et fuld-
25 stændigt uoprenset, enkeltkopigen i hel, human DNA på geler uden behov for en mærket probe.

Under anvendelse af den i eksempel 3 beskrevne metode blev et 110 bp langt fragment fra en sekvens i det første exonområde af betaglobingenet multipliceret ud fra 10 mikro-
30 gram hel, human DNA efter 20 cyklusser. Dette 110 bp fragment, der var frembragt efter 20 cyklusser, kunne let ses på geler, der var farvet med ethidiumbromid.

Sekvensen multipliceredes ikke, når det først var skåret med restriktionsenzymet DdeI, undtagen, som i beta-globin-S-
35 allelen, hvis sekvensen ikke indeholdt restriktionsstedet som enzymet genkender.

Eksempel 7

A. Et total på 100 fmol pBR328, der indeholdt et 1,9 kb langt indsat stykke fra det humane beta-globin A allel, 50 nmol af hver af α - ^{32}P -dNTP ved 500 Ci/mol og 1 nmol af hver af primerne, der anvendtes i eksempel 3, blev opløst i en opløsning indeholdende 100 μl 30 mM Tris-acetat ved pH 7,9, 60 mM natriumacetat, 100 mM dithiothreitol og 10 mM magnesiumacetat. Opløsningen bragtes til 100°C i 2 minutter og afkøledes til 25°C i 1 minut. Et total på 1 μl indeholdende 4,5 enheder Klenow-fragment af E.coli DNA polymerase I og 0,09 enheder uorganisk pyrophosphatase tilsattes for at forhindre den mulige ophobning af pyrophosphat i reaktionsblandingen, og reaktionen fik lov at forløbe i 2 minutter ved 25°C, hvorefter cyklussen med opvarmning, afkøling, enzymtilsætning og reaktion blev gentaget 9 gange. 10 μl delprøver udtoges og tilsattes til 1 μl 600 mM EDTA efter hver syntescyklus. Hver blev analyseret på en 14% polyacrylamidgel i 90 mM Tris-borat og 2,5 mM EDTA ved pH 8,3 og 24 volt/cm i 2,5 timer. Den færdige gel blev opblødet i 20 minutter i den samme puffer med tilsætning af 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ethidiumbromid, vasket med det oprindelige puffer og fotograferet i UV-lys under anvendelse af et rødt filter.

Det fremstillede 110 bp lange fragment blev udkåret fra gelen under ultraviolet lys, og det inkorporerede ^{32}P målt ved Cerenkov-bestråling. Et forsøg på at indpasse resultaterne i ligningen med formen: $\text{pmol}/10 \mu\text{l} = 0,01 [(1+y)^N - y^N - 1]$, hvor N angiver antallet af cyklusser og y er fraktionsudbyttet pr. cyklus, var optimal med $y = 0,619$. Dette indikerer, at en signifikant multiplicering opnåedes.

B. Det ovenfor angivne forsøg gentoges med undtagelse af, at 100 nmol af hver dNTP tilsattes til en 100 μl reaktion, ingen radioaktiv mærkning blev anvendt og delprøver blev ikke fjernet ved hver cyklus. Efter 10 cyklusser afsluttedes reaktionen ved kogning i 2 minutter og rehybridiseringen blev udført ved 57°C i 1 time. Sekvensen af det 110 bp lange produkt blev bekræftet ved at udsætte 8 μl delprøver for restriktionsanalyse ved tilsætning af 1 μl bovinserumalbumin (25 mg/ml) og 1 μl af det passende restriktionsenzym (HinfI,

MnlI, MstII, NcoI) og ved omsætning ved 37°C i 15 timer. PAGE blev udført som ovenfor beskrevet.

Eksempel 8

5 Dette eksempel illustrerer anvendelsen af forskellige primere til multiplicering af forskellige fragmenter af pBR328 og 322.

A. Forsøget, der er beskrevet i eksempel 7A, blev gentaget med undtagelse af, at der anvendtes følgende primere: d(TTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC) og
10 d(GCCTCACCACCAACTTCATCCACGTTACC) til fremstilling af et 130 bp langt fragment af pBR328.

B. Forsøget, der er beskrevet i eksempel 7A, blev gentaget med undtagelse af, at der anvendtes følgende primere: d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) og d(TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG)
15 til fremstilling af et 262 bp langt fragment af pBR328. Omsætningstiden var 20 minutter pr. cyklus.

C. Forsøget, der er beskrevet i eksempel 8A, blev gentaget med undtagelse af, at 100 fmol af en MstII-fordøjelse af pBR328 indeholdende et 1,9 kb langt indskud fra det
20 humane beta-globin S allel blev anvendt som initial template. Dette plasmid blev spaltet flere gange med MstII, men ikke indeni sekvensen, der skulle multipliceres. Desuden var de anvendte primere følgende:
d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) og d(TAACCTTGATACCAACCTGCCC) til
25 dannelse af et 240 bp langt fragment.

D. Forsøget, der er beskrevet i eksempel 7B, blev gentaget med undtagelse af, at 100 fmol af en NruI-fordøjelse af pBR328 blev anvendt som template, 200 nmol af hver dNTP blev anvendt i 100 µl omsætningen og primerne var:
30 d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) og d(CTTCCCCATCGGTGATGTCG) til dannelse af et 500 bp langt fragment fra pBR328. Omsætningstider var 20 minutter pr. cyklus ved 37°C. Slut-rehybridisering var 15 timer ved 57°C. Elektroforese var på en 4% agarosegel.

Eksempel 9

Dette eksempel illustrerer fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvorved en in vitro mutation introduceres i det multiplicerede segment.

5 A. Et total på 100 fmol pBR322 lineariseret med NruI, 1 nmol af hver af primerne: d(CGCATTAAGCTTATCGATG) og d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) udformet til frembringelse af et 75 bp langt fragment, 100 nmol af hver af dNTP, i 100 µl 40 mM Tris ved pH 8, 20 mM i MgCl₂, 5 mM i dithiothreitol og 5
10 mg/ml bovinserumalbumin blev kombineret. Blandingen blev bragt til 100°C i 1 minut, afkølet i 0,5 minutter i et vandbad ved 23°C, hvorefter 4,5 enheder Klenow-fragment og 0,09 enheder uorganisk pyrophosphatase blev tilsat, og en omsætning fik lov at forløbe i 3 minutter. Cyklussen med opvarm-

15 ning, afkøling, tilsætning af enzymer og omsætning blev gentaget 9 gange. Den 10. omsætningscyklus blev afsluttet ved nedfrysning og en 8 µl delprøve af reaktionsblandingen blev sat på en 4% agarosegel visualiseret med ethidiumbromid.

B. Forsøget som er beskrevet i eksempel 9A blev gentaget med undtagelse af, at de anvendte oligonukleotidprimere var:

d(CGCATTAAGCTTATCGATG) og

d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCACGAGGCCCT)

Disse primere er udformet til at producere et 101 bp
25 langt fragment, hvoraf 26 nucleotider (i den primer, der er angivet som nummer to), ikke er til stede i pBR322. Disse nukleotider repræsenterer sekvensen i T7-promotoren, som blev tilføjet til den 75 bp lange sekvens fra pBR322 ved at anvende primeren med 20 komplementære baser og en 26 base lang
30 5'-forlængelse. Proceduren krævede mindre end 2 timer og producerede to picomol af det relativt rene 101 bp lange fragment fra 100 fmol af pBR322.

T7-promotoren kan anvendes til at initiere RNA-transkription. T7-polymerase kan tilsættes til det 101 bp lange
35 fragment til frembringelse af enkeltstrenget RNA.

C. Forsøget som er beskrevet i eksempel 8D blev gentaget med undtagelse af, at de anvendte oligonukleotidprimere var som følger:

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) og
d(CCAGCAAGACGTAGCCCAGC)

til frembringelse af et 1000 bp langt fragment fra pBR322.

D. Forsøget som er beskrevet i eksempel 9C blev gentaget
5 med undtagelse af, at de anvendte oligonukleotidprimere var
som følger:

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) og
d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCACGAGGCCCT)

for således at frembringe et 1026 bp langt fragment, hvoraf
10 26 nukleotider (i den primer, der er angivet som nummer to)
ikke er til stede i pBR322 og repræsenterer den ovenfor
beskrevne T7-promotor. Promotoren er blevet indføjet nabolig-
gende til et 1000 bp langt fragment fra pBR322.

Resultaterne indicerer, at en primer, som ikke er en
15 perfekt parring til templatesekvensen, som ikke desto mindre
er i stand til at hybridisere tilstrækkeligt til at blive
enzymatisk forlænget, producerer et langt produkt, som inde-
holder sekvensen af primeren snarere end den tilsvarende
sekvens af den oprindelige template. Det lange produkt tjener
20 som template for den anden primer til introducering af en in
vitro mutation. Denne mutation multipliceres i yderligere
cyklusser med en uformindsket effektivitet, fordi ingen
yderligere fejlparrede priminger kræves. I dette tilfælde
blev en primer, som bærer en ikke-komplementær forlængelse på
25 dets 5'-ende anvendt til indføjelse af en ny sekvens i pro-
duktet, der er naboliggende til templatesekvensen, der kopi-
eres.

Eksempel 10

30 Dette eksempel illustrerer anvendelsen af indskudte sæt
af primere for at nedsætte baggrunden i multiplikationen af
enkeltkopigener.

Hel, human DNA, som er homozygotisk for vildtype β -glo-
binallelet, blev udsat for 20 multiplikationscyklusser på
følgende måde: Ialt 10 μ g DNA, 200 pmol af hver af primerne:
35 d(ACACAACTGTGTTCACTAGC) og d(CAACTTCATCCACGTTACC) og 100
nmol af hver dNTP i 100 μ l af 30 mM Tris-acetat pH 7,9, 60 mM
natriumacetat, 10 mM dithiothreitol og 10 mM magnesiumacetat

blev opvarmet til 100°C i 1 minut, afkølet til 25°C i 1 minut og behandlet med 2 enheder Klenow-fragment i 2 minutter.

Cyklussen med opvarmning, afkøling og tilsætning af Klenow-fragment blev gentaget 19 gange. En delprøve på 10 µl blev
5 fjernet fra reaktionsblandingen og udsat for yderligere 10 multiplikationscyklusser under anvendelse af hver af primerne:

d(CAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTG) og

d(CCCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCC), hvilket multiplicerer et
10 58 bp langt fragment indeholdt i det ovenfor fremstillede 100 bp lange fragment. Disse sidste 10 multiplikationscyklusser blev udført ved at fortynde 10 µl delprøven i 90 µl frisk Tris-acetatpuffer beskrevet ovenfor indeholdende 100 nmol af hver dNTP og 200 pmol af hver primer. Reaktionsbetingelserne
15 var som ovenfor anført. Efter 10 cyklusser blev en 10 µl delprøve (svarende til 100 ng af det oprindelige DNA) påsat en 6% NuSieve (FMC Corp.) agarosegel og blev visualiseret under anvendelse af ethidiumbromid.

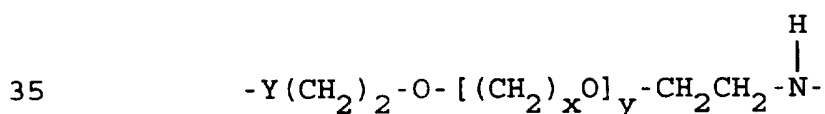
Figur 10 illustrerer denne gel belyst med UV-lys og
20 fotograferet gennem et rødt filter, hvilket er kendt inden for fagområdet. Bane 1 er molekylvægtsmarkører. Bane 2 er en delprøve af den ovenfor beskrevne reaktion. Bane 3 er en delprøve af en reaktion identisk med den ovenfor beskrevne med undtagelse af, at det oprindelige vildtype-DNA blev
25 spaltet med DdeI forud for multiplikationen. Bane 4 er en delprøve af en reaktion identisk med den ovenfor beskrevne med undtagelse af, at human DNA homozygot for seglcellebeta-globinallelet blev behandlet med DdeI før multiplikationen (seglcelleallelet indeholder ikke et DdeI-restriktionssted i
30 det fragment, som bliver multipliceret her). Bane 5 er en delprøve af en reaktion identisk med den ovenfor beskrevne med undtagelse af, at laksesperm-DNA blev anvendt i stedet for human DNA. Bane 6 er en delprøve af en reaktion identisk med den ovenfor beskrevne med undtagelse af, at delprøven
35 blev behandlet med DdeI efter multiplikation (DdeI skulle omdanne det 58 bp lange vildtypeprodukt til 27 og 31 bp lange fragmenter). Bane 7 er en delprøve af materialet fra bane 4

behandlet med DdeI efter multiplikation (det 58 bp lange seglcelleprodukt indeholder intet DdeI-restriktionssted).

Påvisning af et 58 bp langt fragment, som er repræsentativt for et enkeltkopigen, fra 1 mikrogram human DNA under anvendelse af udelukkende ethidiumbromidfarvning af en agarosegel kræver en multiplikation på ca. 500.000 gange. Dette blev opnået ved at anvende de to indskudte sæt af oligonukleotidprimere beskrevet her. Det første sæt multiplicerer det 110 bp lange fragment og det i det indre indskudte sæt multiplicerer et subfragment af dette produkt op til et niveau, som er hensigtsmæssigt til påvisning, som vist i figur 10. Denne fremgangsmåde med at anvende primere, som multiplicerer en lille sekvens indeholdt i den sekvens, som er multipliceret i den tidligere multiplikationsproces og som er indeholdt i forlængelsesprodukter af de andre primere, gør det muligt at skelne vildtypen fra seglcelleallelet ved β -globinlocusset uden at ty til hverken radioisotopiske eller ikke-radioisotopiske probehybridiseringsmetoder, såsom beskrevet af Conner et al., PNAS (USA), 80:278 (1983) og Leary et al., PNAS (USA), 80:4045 (1983).

Eksempel 11

Det forventes, at den foreliggende fremgangsmåde er nyttig til i en DNA-prøve fra en patient at påvise en specifik sekvens associeret med en infektiøs sygdom, såsom f.eks. Chlamydia under anvendelse af en biotinyleret hybridiseringsprobe, som spænder over den ønskede multiplicerede sekvens og under anvendelse af den i beskrivelsen til USA 4.358.535, se ovenfor, beskrevne fremgangsmåde. Den biotinylerede hybridiseringsprobe kan fremstilles ved interkelering og bestråling af et delvis dobbeltstrenget DNA med en 4'-methylensubstitueret 4,5'-8-trimethylpsoralen knyttet til biotin via en afstandsarm med formlen:



hvor Y er 0, NH eller N-CHO, x er et tal på fra 1 til 4 og y er et tal på fra 2 til 4. Påvisning af biotinyllgrupper på proben kan opnås ved at anvende et streptavidin - sur phosphatase - kompleks, som kan opnås kommercielt fra Enzo Biochem Inc., under anvendelse af de påvisningsmetoder, som foreslås af leverandøren i dennes brochure. Den hybridiserede prøve ses som en plet af udfældet farve på grund af bindingen af påvisningskomplekset og den efterfølgende reaktion katalyseret af sur phosphatase, hvilket frembringer en udfældelig farve.

Eksempel 12

I dette eksempel anvendes stort set den i eksempel 7 beskrevne fremgangsmåde til at multiplicere et 119 basepar langt fragment på det humane β -hæmoglobingen under anvendelse af primerne:

5'-CTTCTGcagCAACTGTGTTCACTAGC-3' (GH18)

5'-CACaAgCTTCATCCACGTTCCACC-3' (GH19)

hvor små bogstaver betegner fejlparringer i forhold til vildtypesekvensen for at frembringe restriktionsenzymsteder. Det fulde skema vises i tabel I. Tabel I illustrerer et diagram af primerne GH18 og GH19, som anvendes til kloning og sekventering af et 119-basepar langt fragment af det humane β -globingen, og som er udformet til at indeholde indre restriktionssteder. Startcodonnet ATG er understreget. GH18 er et 26 baser langt oligonukleotid, som er komplementær med den negative streng, og som indeholder et indre PstI-sted. GH19 er et 23 base langt oligonukleotid, som er komplementært til plusstrengen, og som indeholder en indre HindIII-genkendelsessekvens. Pile angiver forlængelsesretningen for DNA-polymerase I. De indrammede sekvenser angiver restriktionsenzymets genkendelsessekvenser på hver primer. Disse primere blev udvalgt ved først at screene områderne på genet for homologi til PstI og HindIII restriktionssteder i bakteriofag M13. Primerne blev derefter fremstillet som beskrevet i tidligere eksempler.

Tabel I

DdeI

←—————CCACTTGCACCTACTTCgAaCAC

CTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAAACAGACACCAATGGTGACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTTACTGCCCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG (+)
 GAAGACTGTGTTGACACAAGTGATCGTTGGAGTTTGTCTGTGGTACCACCGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCCCGTTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC (-)
 CTTCTGcagCAACTGTGTTCACTAGC —————>

GH18

5' CTTCTG cagCAA CTGTGTTCACTAGC 3' GH18 venstre linkerprimer

GH18

5' CAC aAgCTT CATCCAGTTCACC 3' GH19 højre linkerprimer

Multiplikation og kloning

Efter 20 multiplikationscyklusser med 1 mikrogram human genomisk DNA isoleret fra cellelinien Molt 4 som beskrevet i eksempel 2 blev 1/14 af reaktionsproduktet hybridiseret til den mærkede β -globin specifikke, oligonukleotid probe, RS06, med sekvensen 5'-CTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGG-3' under anvendelse af de ovenfor beskrevne metoder til oligomer restriktion. Efter opløsningshybridisering blev reaktionsblandingen behandlet med DdeI under restriktionsfordøjelsesbetingelser, som beskrevet ovenfor, til frembringelse af et 8-basepar langt oligonukleotid. Mængden af dette 8-basepar lange produkt er proportionalt med mængden af frembragt multipliceret produkt. Fordøjelsesprodukterne blev separeret på en 30% polyacrylamidgel og visualiseret ved autoradiografi.

Analyse af autoradiogrammet afslørede, at multiplikationen var sammenlignelig i effektivitet med multiplikationen af primeren PC03 (5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3') og PC04 (5'-CCACTTGACCTACTTCAAC-3'), som er komplementære med den negative henholdsvis den positive streng i vildtype β -globin.

Det multiplicerede produkt blev ethanolpræcipiteret for at afsalte og koncentrere prøven, blev genopløst i en restriktionspuffer af 10 mM Tris pH 8, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 100 mM NaCl og blev samtidig fordøjet med PstI og HindIII. Efter fordøjelsen blev prøven afsaltet med en Centricon 10 koncentrator og ligeret natten over ved 12°C ved 0,3 mikrogram af den PstI/HindIII-fordøjede vektor M13mp10w, som er offentlig tilgængelig fra Boehringer-Mannheim.

Hele ligeringsblandingen blev transformeret i E.coli stamme JM103, som er offentlig tilgængelige fra BRL i Bethesda, MD. Den fremgangsmåde, som blev fulgt til fremstilling af den transformerede stamme, er beskrevet i Messing, J. (1981) Third Cleveland Symposium on Macro-molecules: Recombinant DNA, red. A.Walton, Elsevier, Amsterdam, 143-153.

Transformationsblandingen blev udpladet på x-gal medie til screening ved hjælp af plaquehybridisering med nylon-filtre. Filtrene blev prøberet med en β -globinspecifik oligonukleotidprobe RS24 med sekvensen 5'-

CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCCTCAGGAGTCAG-3' for at bestemme antallet af β -globinindføjelser. Filtrene blev derefter reproberet med primeren PC04 for at bestemme det totale antal af indføjelser.

5 Udpladning og screening

Tabel II opsummerer udpladnings- og plaquehybridiseringsresultater. Filtrene blev proberet med primeren PC04 for at bestemme procent indføjelse resulterende fra multiplikationen og kloningen; 1206 klare plaque (90% af det totale antal klare plaque) hybridiserede med primeren. 15 plaque hybridiserede med den β -globinspecifikke probe RS24. Procentdelen af β -globinpositive plaques blandt de multiplicerede primerpositive plaques er ca. 1%.

Tabel II

15		Blå	Ingen		β -Globin-
	<u>Plade nr.</u>	<u>plaques</u>	<u>indføjelser*</u>	<u>Indføjelser**</u>	<u>indføjelser</u>
	1	28	25	246	1
	2	29	18	222	2
	3	11	26	180	0
20	4	24	20	192	5
	5	22	27	185	5
	6	39	21	181	3
	Total	158	132	1206	15

% plaque indeholdende multiplicerede sekvenser, som indeholder β -globinindføjelse = $15/1206 \times 100 = 1,24\%$.

% total plaque, som indeholder β -globinindføjelse = $15/1496 \times 100 = \text{ca. } 1\%$.

% total plaque, som indeholder multiplicerede sekvenser = $1206/1496 \times 100 = \text{ca. } 0,8\%$.

30 * Klare plaque, som ikke hybridiserer med primer PC04

** Klare plaque, som hybridiserer med primer PC04.

Restriktionsenzymanalyse og Southern Blot Analyse

DNA fra fag-DNA minipræparation af 3 β -globinpositive og 2 β -globinnegative (men PC04 primerpositive) plaques blev analyseret ved restriktionsenzymanalyse. MstII-fordøjelse af DNA fra M13-kloner indeholdende det multiplicerede β -globin-

fragment skulle frembringe et karakteristisk 283 bp langt fragment. Efter MstII-fordøjelse producerede de tre β -globin-positive kloner alle det forudsagte 283 bp lange fragment, medens de to kloner, som kun var positive med primeren,

5 producerede større fragmenter.

Gelen fra denne analyse blev overført til et MSI-nylon-filter og hybridiseret med en radioaktiv mærket, nick-translateret β -globinprobe fremstillet ved nicktranslationsstandardmetoder, som beskrevet af Rigby et al., J.Mol.Biol.

10 (1977), 113:237-51. De eneste bånd, som hybridiserede til β -globinproben, var de tre β -globinpositive kloner. De to andre kloner havde indføjelser, som ikke hybridiserede til β -globinproben.

Sekvensanalyse

15 10 β -globinpositive kloner, som ved restriktionsenzymanalyse blev vist at indeholde β -globinindføjelsen, blev sekventeret under anvendelse af M13-dideoxysekventeringsmetoden. Ud af de 10 kloner var 9 identiske med β -globinvildtypesekvensen. Den anden klon var identisk med μ -globingenet, som er

20 blevet vist at være multipliceret alene i en lille udstrækning af β -globinprimerne.

Som konklusion var de modificerede linkerprimere næsten lige så effektive som de ikke-modificerede primere til at multiplicere β -globinsekvensen. Primerne var i stand til at

25 lette indføjelsen af multipliceret DNA i kloningsvektorer. På grund af multipliceringen af andre segmenter af genomet indeholdt kun 1% af klonerne hæmoglobinsekvenser.

9 ud af de 10 kloner blev fundet at være identiske med den publicerede β -globinsekvens, hvilket viser, at metoden

30 multiplicerer genomisk DNA med stor nøjagtighed. En klon blev fundet at være identisk med den publicerede μ -globinsekvens, hvilket bekræfter, at primerne er specifikke for β -globingenet på trods af, at de har en signifikant sekvenshomologi med δ -globin.

35 Når kloningen blev udført med et 267 bp langt fragment af β -globin-genet, var kloningen kun effektiv, når dimethylsulf-

oxid var tilstede (10 volumen% ved 37°C) i multiplikations-proceduren.

Restriktionsstedmodificerede primere blev også anvendt til at multiplicere og klonere og delvis sekventere det humane N-ras oncogen og til at klonere de 240 bp lange segmenter af HLA DQ- α og DQ- β generne. Alle disse multiplikationer blev udført i nærværelse af 10 volumenprocent dimethylsulfoxid ved 37°C. Primerne til multiplikation af HLA DQ- α og DQ- β generne var meget mere specifikke for deres beregnede mål end β -globin- og DR- β -primerne, hvilket i stedet for at give adskilte bånd på en ethidiumbromidfarvet agarosegel blot gav et smear. Ydermere frembragte HLA DQ- α primerne op til 20% kloner med multiplicerede indføjelser, som indeholdt det ønskede HLA målfragment, hvorimod 1% af β -globinklonerne indeholdt målsekvensen. HLA DQ- α - og DQ- β -genkloneringen er kun effektiv, når DMSO var til stede, og temperaturen var hævet.

Eksempel 13

Dette eksempel illustrerer anvendelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen til at fremstille TNF-genet med 494 basepar startende fra 2 oligonukleotider på hver 74 basepar.

Primere

De anvendte primere blev fremstillet ved den i eksempel 2 beskrevne fremgangsmåde og er identificeret neden for som hver værende 74 merer.

(TN10) 5'-CCTCGTCTACTCCCAGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCGACTATGTGCTCCTCA-
CCCACACCGTCAGCC-3'

(TN11) 5'-GGCAGGGGCTCTTGACGGCAGAGAGGAGGTTGACCTTCTCCTGGTAGGAGATGGCGAAG-
CGGCTGACGGTGTGG-3'

(LL09) 5'-CCTGGCCAATGGCATGGATCTGAAAGATAACCAGCTGGTGGTGCCAGCAGATGGCCTGT-
ACCTCGTCTACTCCC-3'

(LL12) 5'-CTCCCTGATAGATGGGCTCATACCAGGGCTTGAGCTCAGCCCCCTCTGGGGTGTCTTC-
GGCAGGGGCTCTTG-3'

(TN08) 5'-TGTAGCAAACCATCAAGTTGAGGAGCAGCTCGAGTGGCTGAGCCAGCGGGCCAATGCC-
TCCTGGCCAATGGCA-3'

(TN13) 5'-GATACTTGGGCAGATTGACCTCAGCGCTGAGTTGGTCACCCTTCTCCAGCTGGAAGACC-
CCTCCCTGATAGATG-3'

(LL07) 5'-CCTTAAGCTTATGCTCAGATCATCTTCTCAAACCTCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATG-
TTGTAGCAAACCATC-3'

(TN14) 5'-GCTCGGATCCTTACAGGGCAATGACTCCAAAGTAGACCTGCCAGACTCGGCAAAGTCG-
AGATACTTGGGCAGA-3'

Samlet procedure

I. 10 cyklusser af den neden for anførte protokol blev udført under anvendelse af primerne TN10 og TN11, som vekselvirker som vist på diagrammet nedenfor, trin (a).

5 II. Et total på 2 μ l af reaktionsblandingen fra afsnit I ovenfor blev tilsat til primerne LL09 og LL12. Den nedenfor beskrevne protokol blev udført i 15 cyklusser, således at primerne vekselvirkede med produktet fra afsnit I som vist i diagrammet nedenfor, trin (b).

10 III. Ialt 2 mikroliter af reaktionsblandingen fra afsnit II ovenfor blev tilsat til primerne TN08 og TN13. Den nedenfor beskrevne protokol blev udført i 15 cyklusser, således at primerne vekselvirkede med produktet fra afsnit II, som vist i diagrammet nedenfor, trin (c).

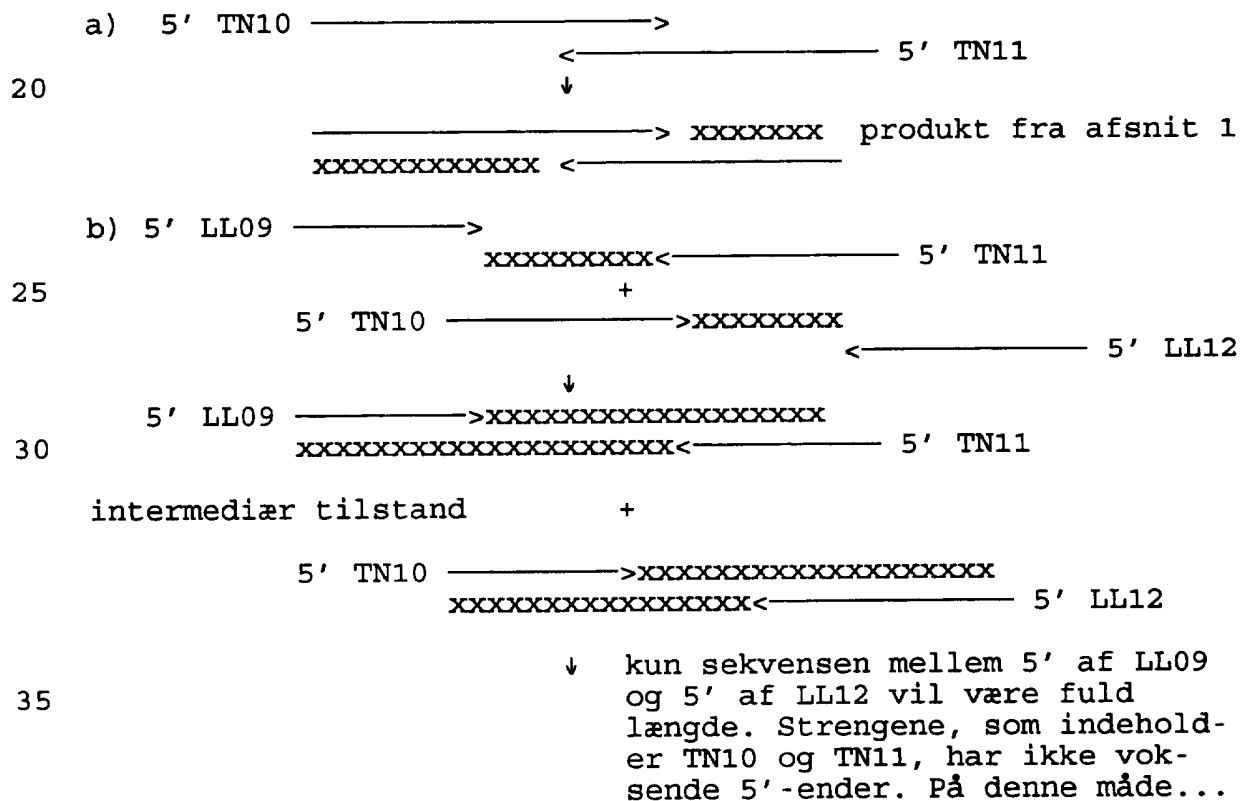
15 IV. Ialt 2 mikroliter af reaktionsblandingen fra afsnit III ovenfor blev tilsat til primerne LL07 og LL14. Den nedenfor beskrevne protokol blev udført i 15 cyklusser, således at

primerne vekselvirkede med produktet fra afsnit III som vist i diagrammet nedenfor, trin (d).

Protokol

- Hver reaktion indeholdt 100 µl af:
- 5 2 mM af hver af dATP, dCTP, dGTP og TTP
 - 3 µM af hver af primerne anvendt på dette trin
 - 1 x polymerasepuffer (30 mM Tris-acetat, 60 mM natrium-acetat, 10 mM Mg-acetat, 2,5 mM dithiothreitol).
- Hver cyklus bestod af:
- 10 1) 1 minut i kogende vand.
 - 2) 1 minut afkøling ved stuetemperatur
 - 3) tilsætning af 1 µl (5 enheder) af Klenow-fragmentet af DNA-polymerase
 - 4) mulighed for at polymeriseringsreaktionen forløb i 2
 - 15 minutter.
- For næste cyklus start igen ved trin 1.

Diagram



der er deponeret, dør eller går tabt eller bliver ødelagt, når den dyrkes under egnede betingelser, vil den straks ved notifikation blive erstattet med en levende kultur af den samme cellelinie.

5 PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til kloning i en vektor af i det mindste én specifik nukleinsyresekvens indeholdt i en nukleinsyre eller i en blanding af nukleinsyrer,
k e n d e t e g n e t ved,

- 10 (a) at nukleinsyren (nukleinsyrerne) behandles med en oligo-
nukleotidprimer for hver streng af hver sekvens, der
skal klones, og med andre nødvendige komponenter under
sådanne betingelser, at der for hver streng af hver
primer syntetiseres et forlængelsesprodukt, som er
15 komplementært til hver streng, ved hvilken fremgangsmåde
primeren eller primerne udvælges således, at de i det
væsentlige er komplementære til hver streng af hver
specifik sekvens og afgrænser enderne af den nuklein-
syresekvens, der skal klones, således at det forlæng-
20 elsesprodukt, der syntetiseres fra én primer, når det er
separeret fra dets komplement, kan tjene som en template
for syntese af forlængelsesproduktet af den anden pri-
mer, og hvor primeren eller primerne hver indeholder
informationen for et restriktionssted i 5'-enden, som er
25 identisk med eller forskellig fra restriktionsstedet
(-stederne) på den anden primer (på de andre primere),
- (b) at primerforlængelsesprodukterne adskilles fra tem-
platerne, på hvilke de er syntetiseret, til frembringel-
se af enkeltstrengede molekyler,
- 30 (c) at de enkeltstrengede molekyler, der er frembragt i trin
(b) behandles som i trin (a) med oligonukleotidprimere
og andre nødvendige komponenter, således at der synteti-
seres et primerforlængelsesprodukt under anvendelse af

hver af enkeltstrengene, der er frembragt i trin (b), som en template, ved hvilken fremgangsmåde trinnene (a) og (c) afhængig af den bestemte sekvens, der skal multipliceres, udføres i nærværelse af fra 0 og op til en effektiv mængde af dimethylsulfoxid eller ved en temperatur på op til ca. 45°C,

(d) at der til produktet fra trin (c) tilsættes et restriktionsenzym for hvert af restriktionsstederne til opnåelse af spaltede produkter i en restriktionsfordøjelse, og

(e) at det spaltede produkt (de spaltede produkter) ligeres ind i én eller flere kloningsvektorer.

2. Fremgangsmåde til syntetisering af et nukleinsyrefragment ud fra et eksisterende nukleinsyrefragment med færre nukleotider end det fragment, som bliver syntetiseret, og 2 oligonukleotidprimere, hvor det nukleinsyrefragment, der bliver syntetiseret, indeholder et venstresegment, et kernesegment og et højresegment, og hvor kernesegmentet i det mindste i alt væsentlig repræsenterer nukleinsyresekvensen af det eksisterende nukleinsyrefragment, og højre- og venstresegmenterne repræsenterer nukleinsyresekvensen, der er til stede i 5'-enderne af de to primere, hvis 3'-ender er komplementære eller i alt væsentligt komplementære til 3'-enderne i de enkeltstrengene, der produceres ved at separere strengene af det eksisterende nukleinsyrefragment, k e n d e t e g n e t ved,

(a) at strengene fra det eksisterende fragment behandles med to oligonukleotidprimere og andre nødvendige komponenter under sådanne betingelser, at der af hver primer syntetiseres et forlængelsesprodukt, som er komplementært til hver nukleinsyrestreng, ved hvilken fremgangsmåde primerne udvælges således, at de i alt væsentligt er komplementære til 3'-enden af hver streng af det eksisterende fragment, således at det forlængelsesprodukt,

som syntetiseres ud fra én primer, når det er separeret fra dets komplement, kan tjene som en template for syntesen af forlængelsesproduktet af den anden primer, og hvorved hver primer i 5'-enden indeholder en sekvens af nukleotider, som ikke er komplementære til det eksisterende fragment, og som svarer til de to ender af det nukleinsyrefragment, der bliver syntetiseret,

(b) at primerforlængelsesprodukterne adskilles fra de templatere, på hvilke de blev syntetiseret, til frembringelse af enkeltstrengede molekyler,

(c) at de enkeltstrengede molekyler, der er frembragt i trin (b), behandles med primerne og de nødvendige komponenter fra trin (a) under sådanne betingelser, at der syntetiseres et primerforlængelsesprodukt under anvendelse af hver enkeltstreng, der er frembragt i trin (b), som en template, således at der produceres to intermediære dobbeltstrengede nukleinsyremolekyler, i hvilke der er blevet inkorporeret den nukleotidsekvens, som er til stede i 5'-enden af én af oligonukleotidprimerne, og to fuldlængde dobbeltstrengede nukleinsyremolekyler, i hvilke der er inkorporeret den nukleinsyresekvens, der er til stede i 5'-enderne af begge oligonukleotidprimerne, og

(d) at trinnene (b) og (c) gentages et tilstrækkeligt antal gange til at producere dobbeltstrengede molekyler i fuld længde i en effektiv mængde.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, kendetegnet ved at følgende yderligere trin gennemføres:

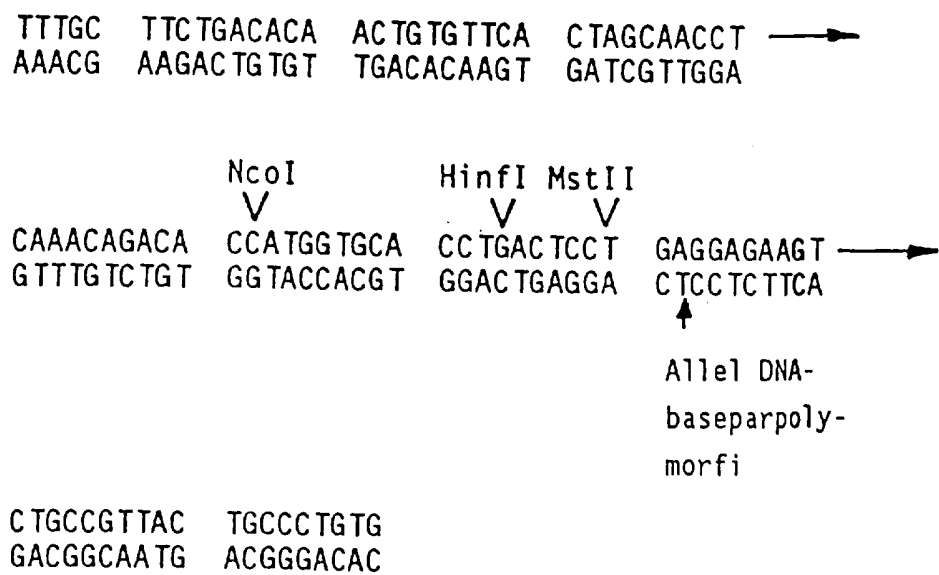
(e) trinnene (a) - (d) gentages under anvendelse af produktet fra trin (d) som kernefragment og to yderligere oligonukleotidprimere, som er komplementære til eller i alt væsentligt komplementære til 3'-enderne af de en-

keltstrengene, der frembringes ved at separere strengene fra produktet i trin (d).

4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav,
- 5 k e n d e t e g n e t ved, at trin (b) udføres ved varmedenaturering.
5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav,
- k e n d e t e g n e t ved, at de andre nødvendige komponenter omfatter et induceringsmiddel for polymerisering samt de
- 10 forskellige nukleotider.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 5,
- k e n d e t e g n e t ved, at induceringsmidlet for polymerisering er udvalgt blandt E. coli DNA-polymerase I, Klenow-fragmentet fra E. coli DNA-polymerase I, T4 DNA-polymerase,
- 15 varmostabilt enzym eller revers transcriptase.

FIG.1

Dobbeltstrenget 94-bp sekvens



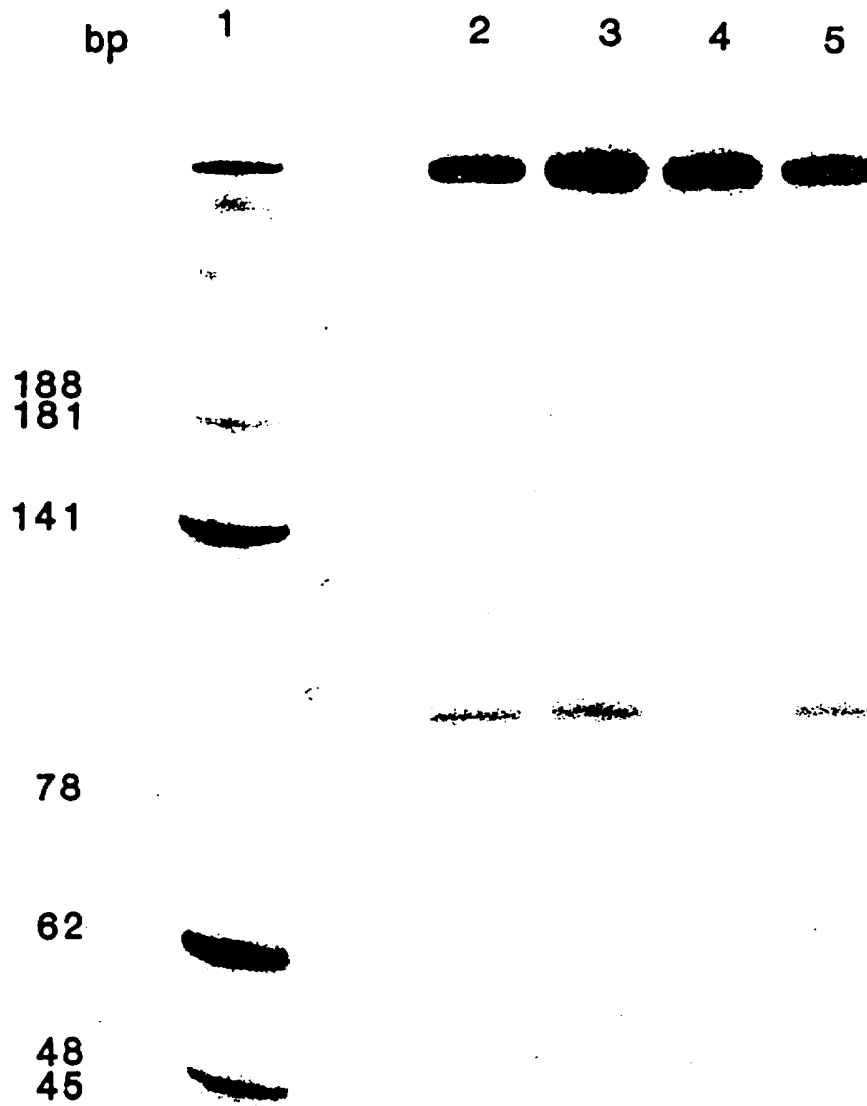


FIG.3

Human betaglobin FIG.4-1

```

0 ... CCATCTATTG CTTACATITG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG GGGCAAGGTO AAGTTGGTGG...
      101 111 121 131 *** 141 151 161 171 181 191 201 211 221
0 ... CCTACATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTG TTGACACAAAG TGATCGTTGG TGACTGAGG ACTCCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC CCGTTCAC TTCAGCCACC...
  
```

cyklusser

```

      CACAGGGCAOATAAC PCO1
      TTGCTTCTGACACA PCO2
  
```

! denaturering, re-annealing

```

0 ... CCATCTATTG CTTACATITG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG GGGCAAGGTO AAGTTGGTGG...
      101 111 121 131 *** 141 151 161 171 181 191 201 211 221
      forlængelse <---- GCAAT GACGGGACAC 3' PCO1
  
```

! polymerase, dNTP'er

```

0 ... CCATCTATTG CTTACATITG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG GGGCAAGGTO AAGTTGGTGG...
      101 111 121 131 *** 141 151 161 171 181 191 201 211 221
      forlængelse
  
```

! denaturering, re-annealing

```

0 ... CCATCTATTG CTTACATITG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG GGGCAAGGTO AAGTTGGTGG...
      101 111 121 131 *** 141 151 161 171 181 191 201 211 221
      forlængelse
  
```

! denaturering, re-annealing

```

0 ... CCACTATTG CTTACATITG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG GGGCAAGGTO AAGTTGGTGG...
      101 111 121 131 *** 141 151 161 171 181 191 201 211 221
      forlængelse <---- GCAAT GACGGGACAC 3' PCO1
  
```

! denaturering, re-annealing

```

0 ... CCACTATTG CTTACATITG CTTCTGACAC AACTGTGTTT ACTAGCAACC ACCTGACTCC TGAGGAGAAG TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG GGGCAAGGTO AAGTTGGTGG...
      101 111 121 131 *** 141 151 161 171 181 191 201 211 221
      forlængelse
  
```

! denaturering, re-annealing

```

0 ... CCTACATAAC GAATGTAAAC GAAGACTGTG TTGACACAAAG TGATCGTTGG TGACTGAGG ACTCCTCTTC AGACGGCAAT GACGGGACAC CCGTTCAC TTCAGCCACC...
      101 111 121 131 *** 141 151 161 171 181 191 201 211 221
      forlængelse
  
```

2

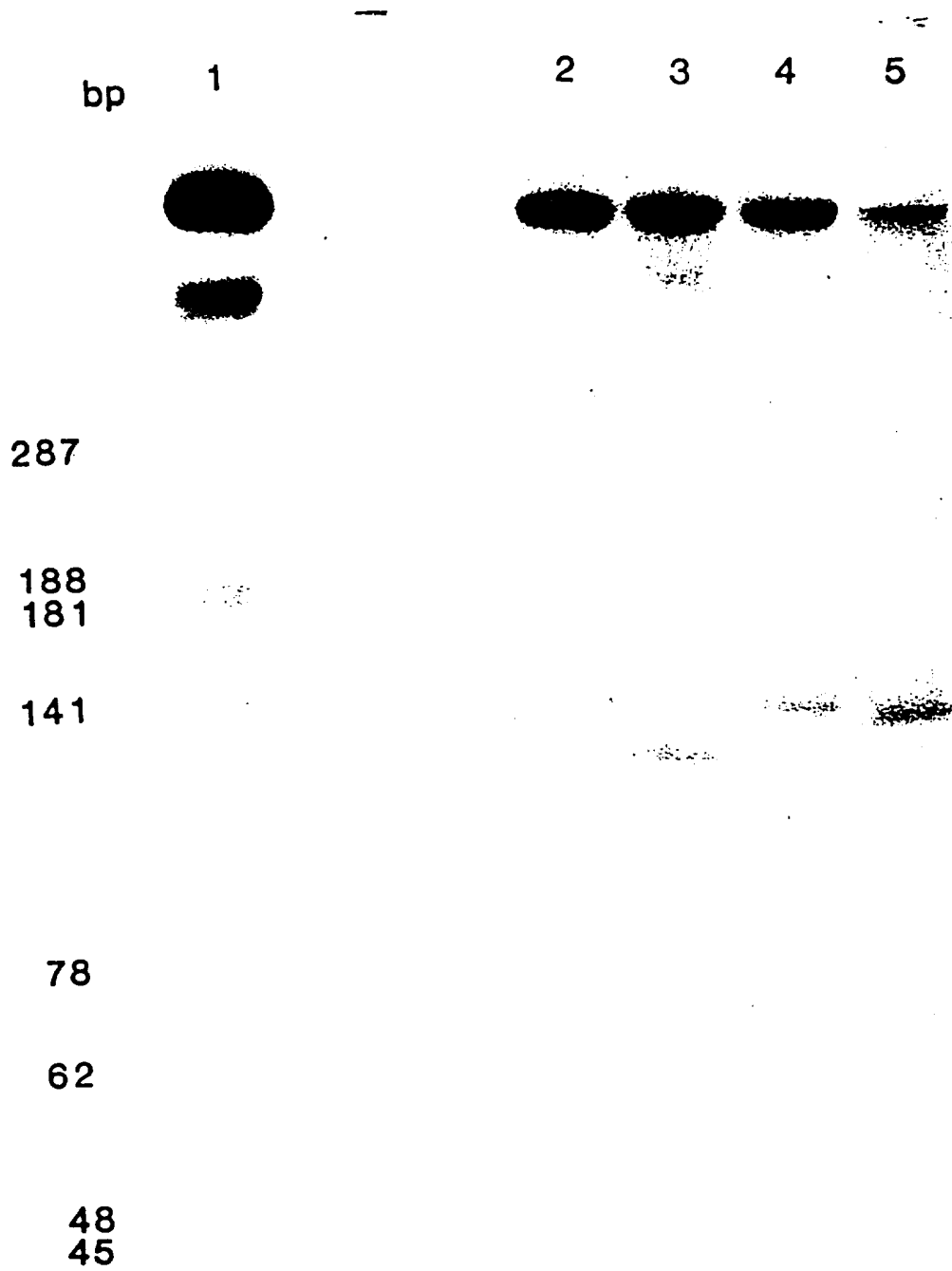
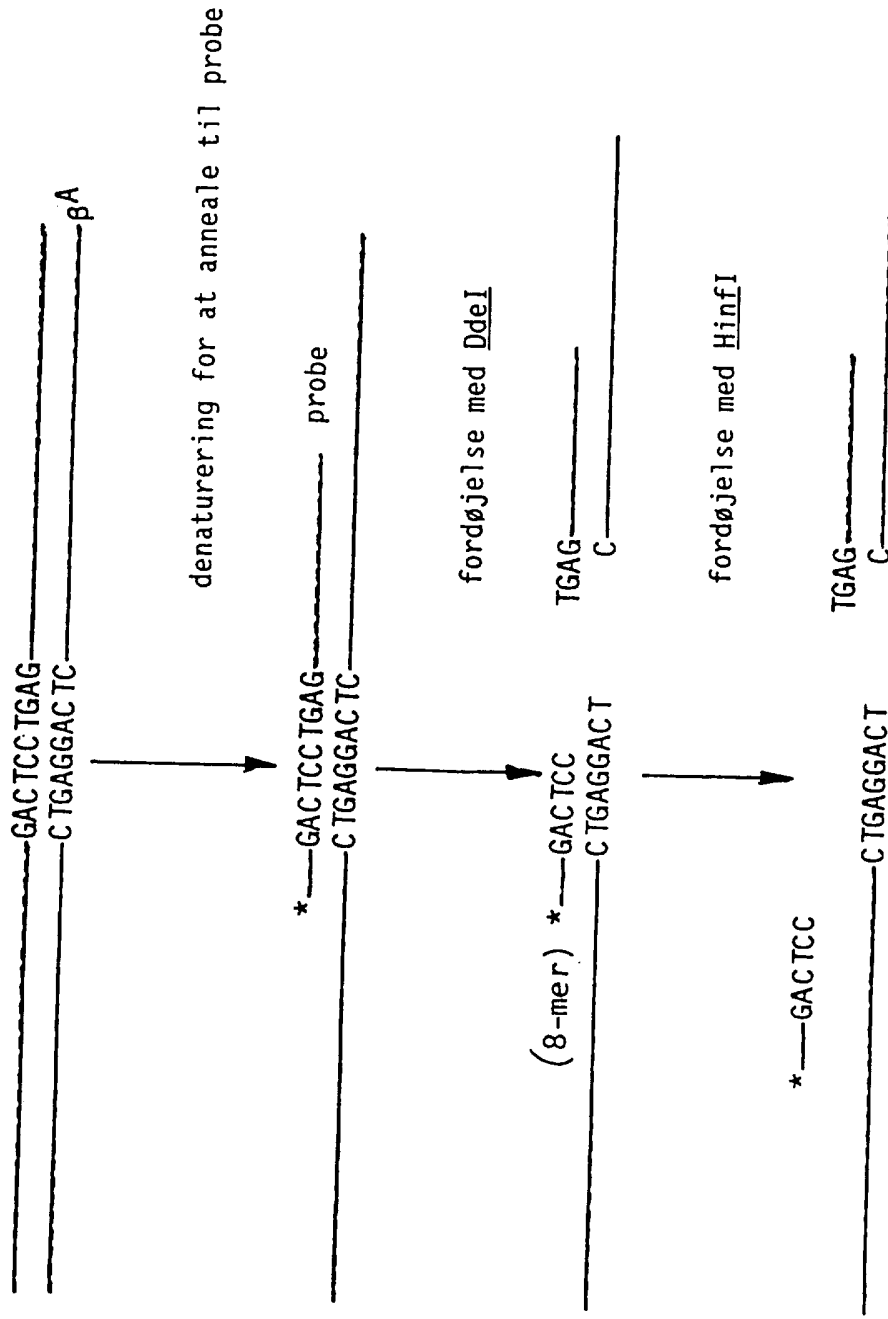


FIG.5



* er mærkning

FIG.7

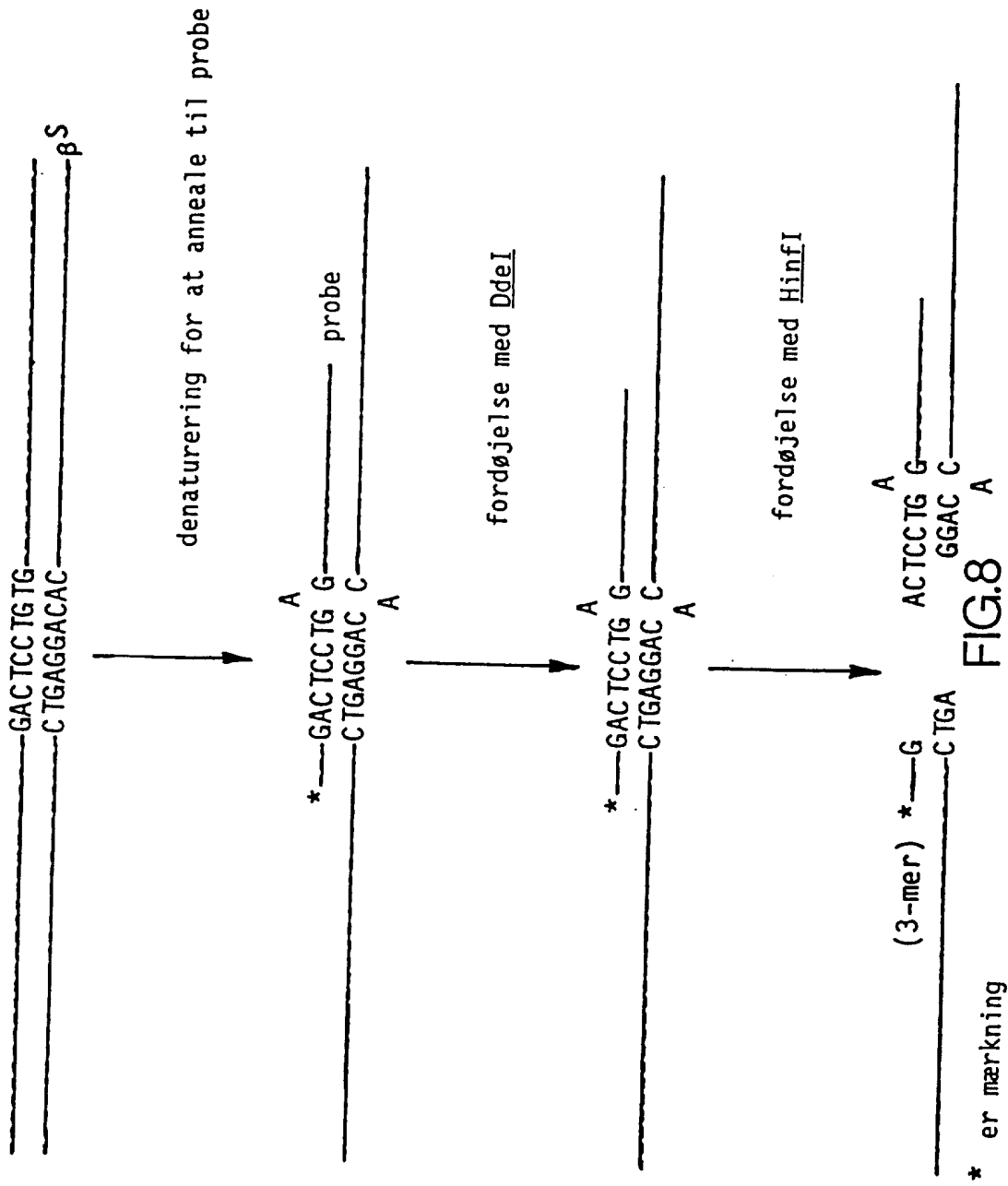


FIG.9

A B C D

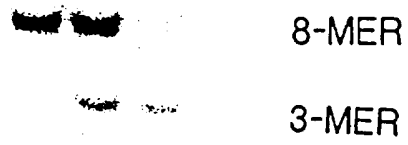


FIG. 10

