



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: C 12 Q 1/70 C 07 H 21/00 C 12 Q 1/68 G 01 N 33/569

(21) Patentansøgning nr: PA 1987 00107

(22) Indleveringsdag: 1987-01-09

(24) Løbedag: 1987-01-09

(41) Alm. tilgængelig: 1987-07-11

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-01-19

(83) Deponering af mikroorganismer.

(30) Prioritet: 1986-01-10 US 818127 1986-11-26 US 935581 1986-11-26 US 934955

(73) Patenthaver: F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, CH-4002 Basel, Schweiz

(72) Opfinder: John Joseph Sninsky, 4924 Thunderhead Court, El Sobrante, California 94803, USA
David Henry Mack, 1458 Hopkins Street No. 1, Berkeley, California 94702, USA
Shirley Yee Kwok, 611 Lomond Circle, San Ramon, California 94563, USA

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S, Sundkrogsgade 9, 2100 København Ø, Danmark

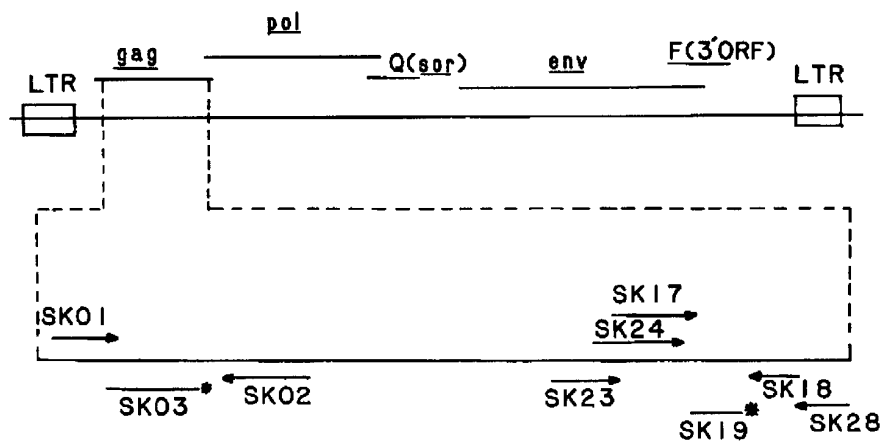
(54) Benævnelse: Fremgangsmåde til detektering eller undersøgelse af tilstedeværelse eller fravær af en nukleinsyresekvens, sammensætning indeholdende en amplificeret nukleinsyresekvens og kit til detektering af tilstedeværelse eller fravær af en nukleinsyresekvens

(56) Fremdragne publikationer:
DK A 1449/86

(57) Sammendrag:

Tilstedeværelse eller fravær af en nukleinsyresekvens associeret med en eller flere beslægtede vira i en prøve, som indeholder en eller flere nukleinsyrer, og som mistænkes for at indeholde en sådan sekvens, kan detekteres ved at amplificere sekvensen under anvendelse af primere til frembringelse af forlængelsesprodukter, som kan fungere som templater, og påvise det amplificerede produkt, hvis det er til stede. Dette kan opnås ved at tilsætte en mærket hybridiseringsprobe til det amplificerede produkt enten frit i opløsning eller efter immobilisering på et fast bæremateriale. Viruset er fortrinsvis AIDS-vira og hepadnavira.

FIG. 1



* = Mærke

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til detektering af tilstedeværelse eller fravær af en bevaret, identificerende nukleotidsekvens fra et virus. Opfindelsen angår også et kit til anvendelse ved en sådan detektering, hvilket kit indeholder primere og en mærket hybridiseringsprobe.

Erhvervet immundefektsyndrom (AIDS) er en overførbart sygdom i det cellulære immunsystem, som resulterer i ofte fatale opportunistiske infektioner eller neoplasmaer. Ydermere er AIDS ofte kompliceret ved funktionsfejl i centralnervesystemet. Det ætiologiske agens (de ætiologiske agenser), som er ansvarlig for denne sygdom, er blevet identificeret som et humant retrovirus og er blevet betegnet human T-celle leukæmivirus III (HTLV III), lymphadenopati-associeret virus (LAV eller LAVA) og AIDS-associeret virus (ARV-2). Senere er disse vira samlet blevet omtalt som human immundefektvirus (HIV). Isolaterne fra de forskellige laboratorier repræsenterer identiske eller nærtbeslægtede vira på baggrund af talrige kriterier (dvs. morfologi, immunologiske krydsreaktiviteter mellem hylster- og nukleokapsidproteiner, nukleotidsekvens og indtrængning i T-hjælpeceller under anvendelse af T4-antigenet). Et abevirus isoleret fra chimpanser og makak-aber, som lider af symptomer, der ikke kan skelnes fra AIDS hos mennesker, er ud fra disse samme kriterier også nært beslægtede. P.J.Kanki et al., Science, 230: 951-954 (1985).

En af de mere interessante observationer vedrørende de vira, der er associeret med AIDS, er deres lighed med det modne virion af subfamilien Lentiviridae. Medlemmer af denne patogene, men ikke oncogene, virusgruppe, inkluderer visnavirus og infektiøs hesteanæmi-virus. Lighederne mellem de AIDS-associerede vira og lentivira inkluderer virionmorfologi, immunologisk krydsreaktivitet, nukleotidsekvens, hjernelokalisering, replikation og udpræget heterogenitet.

De nuværende immunodiagnostiske undersøgelser til identificering af sera med antistoffer mod det AIDS-associerede virus (de AIDS-associerede vira) (se US patent nr. 4.520.113 til Gallo et al.) anvendes i blodbanker til at eliminere potentielt infektiøs blod. Se også WO 86/01834 publiceret 27. marts 1986 (University of California) vedrørende retrovirale polypeptider, der er brugbare ved fremstilling af monoklonale antistoffer til detektering af retrovira i HTLV-familien. Fordi lighederne mellem AIDS-associerede vira og lentivira i almindelighed eller specifikt visna kan strække sig til viraernes evne til at

forblive som en DNA-kopi uden at producere væsentlige mængder af virale partikler, kan en direkte immunologisk fremgangsmåde til detektering af AIDS-associerede vira vise sig ikke at lykkes hos en væsentlig del af vedvarende inficerede, asymptomatiske individer.

5 Fordi antallet af viruspartikler i de inficerede væv og i blodet kan være få (på grund af viral uvirksomhed), kan direkte detektering af virale partikler eller RNA/DNA være vanskelig, hvis ikke umulig, uden at dyrke de inficerede celler sammen med en permissiv T-cellelinie. Selv med denne samtidige dyrkning er antallet af individer,
10 som er inficeret med HIV indikeret med virusisolering, en under- vurdering af det sande antal inficerede individer; der blev kun isoleret virus fra 50% AIDS-patienter, 85% ARC og 30% sunde individer med risici for AIDS (Salahuddin et al., PNAS USA, 82, 5530-4 (1985)).

15 Saiki et al., Science, 230, 1350-1354 (1985) beskriver en fremgangsmåde til at amplificere nukleinsyresekvenser for at lette detektering heraf ved at anvende en mærket RNA- eller DNA-hybridiseringsprobe. Ved denne fremgangsmåde anvendes primere til at opnå primerforlængelsesprodukter, som anvendes som templatere til at syntetisere yderligere komplementære strenge i nærværelse af nukleotider.
20 I artiklen fra Saiki et al. omtales også en teknik, hvor der efter at proben er hybridiseret til den ønskede sekvens tilsættes et restriktionsenzym for at spalte hybrididen på et sted i den ønskede sekvens, og restriktionsfordøjelsen analyseres derefter for mærkede fragmenter. Saiki et al., Biotechnology, 3: 1008-1012 (1985) omtaler sidstnævnte teknik i større detaljer.

I en oversigtsartikel af Landry et al., Clin.Lab.Med. (1985) 5, 513-529 beskrives nukleinsyrehybridiseringsområdet hvad angår virusdetektering. I WO86/01535, publiceret 13. marts 1986 og i EP 173.529,
30 publiceret 5. marts 1986 omtales molekylær kloning af HTLV III og anvendelse af klonen som en probe til detektering af AIDS. Ydermere omtales i EP patentpublikation nr. 173.339, publiceret 5. marts 1986 en genetisk analyse under anvendelse af en DNA-probe til detektering af infektioner fra fremmede mikrober. I EP 185.444 publiceret 25. juni
35 1986, omtales et rekombineret peptid til anvendelse som en probe til påvisning af HTLV-III viruset i cellelysater. Oncor Inc. meddelte i september 1986, at de havde udviklet en radioaktiv blodundersøgelse til detektering af AIDS-viruset. I US patent nr. 4.591.552 omtales anvendelse af et mærket peptid til detektering af tilstedeværelse af et

antigen i en prøve, navnlig hepatitis B.

Anvendelsen af en hybridiseringsprobe til detektering af latente vira, såsom AIDS og andre vira, kan muliggøre identifikation af de individer, som er vedvarende inficeret, men som ikke producerer virus, eller
5 individer, som er antistofnegative, men kulturpositive, og gøre det muligt at detektere inficerede celler uden at det er nødvendigt at dyrke viruset. Forøgelse af virusets nukleinsyrekopiantal ved amplifikation vil gøre det lettere at identificere viral nukleinsyre i inficerede individer.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til detektering eller
10 undersøgelse af tilstedeværelse eller fravær af en nukleinsyresekvens, som i det væsentlige er bevaret blandt nukleinsyrerne i et virus, og som er specifikt for nukleinsyrerne i et sådan virus, og hvilken nukleinsyresekvens mistænkes for at være indeholdt i en prøve, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved:

15 (a) at prøven, uden at viruset først er blevet dyrket i prøven, samtidigt eller separat og under hybridiseringsbetingelser behandles med en oligonukleotidprimer for hver nukleinsyresekvensstreng, 4 forskellige nukleosidtriphosphater og et polymerisationsmiddel, således at der for hver nukleinsyresekvensstreng syntetiseres et forlængelsesprodukt af hver primer,
20 som er komplementær til hver nukleinsyrestreng, ved hvilken fremgangsmåde primeren (primerne) i det væsentlige er komplementære til hver nukleinsyresekvensstreng, som skal detekteres eller undersøges, således at det forlængelsesprodukt, der er syntetiseret fra én primer, kan, når det er separeret fra dets komplement, tjene som en template til syntese af
25 forlængelsesproduktet af den anden primer,

(b) at prøven behandles under denaturerende betingelser,

(c) at produktet fra trin (b) behandles med oligonukleotidprimere, således at der syntetiseres et primerforlængelsesprodukt under
30 anvendelse af hver af de enkeltstrenge, som er frembragt i trin (b), som en template, hvilket resulterer i amplifikation af den specifikke nukleinsyresekvens eller de specifikke nukleinsyresekvenser, hvis de er tilstede, og

(d) at det bestemmes, om den sekvens, der skal detekteres, er tilstede i prøven.

35 Sekvensen findes fortrinsvis i HIV (AIDS) og hepatitis B vira.

En måde at detektere produktet på er ved til produktet fra trin (c) at tilsætte en mærket probe, som er i stand til at hybridisere med den amplificerede nukleinsyresekvens, og bestemme, om proben har

hybridiseret med en amplificeret sekvens i nukleinsyreprøven. I én udførelsesform kan denne bestemmelse udføres ved:

(1) at den hybridiserede blanding fordøjes med et restriktionsenzym, som genkender et sted i sekvenserne i prøben, og

5 (2) at det påvises, om den restriktionsenzymbehandlede fordøjelse indeholder et restriktionsfragment, som korrelerer med tilstedeværelsen af den virussekvens, der skal påvises.

Før trin (a) kan nukleinsyrerne fra en patientprøve ekstraheres derfra, således at den prøve, som behandles, faktisk er en blanding af de ekstraherede nukleinsyrer. Ydermere behøver den prøve, 10 som behandles i trin (a), ikke på forhånd at være udsat for en fremgangsmåde, hvorved viruset i prøven dyrkes.

I en anden udførelsesform angår opfindelsen et kit til detektering eller undersøgelse for tilstedeværelse eller fravær af en nukleinsyresekvens, som i det væsentlige er bevaret blandt nukleinsyrerne 15 i et virus, og som er specifikt for nukleinsyrerne i et virus, og hvilken nukleinsyresekvens mistænkes at være indeholdt i en prøve, hvilket kit er ejendommelig ved:

(a) en oligonukleotidprimer for hver nukleinsyresekvensstreng, 20 som skal påvises, hvilken primer eller hvilke primere i det væsentlige er komplementære til hver streng i hver specifik nukleinsyresekvens, således at et forlængelsesprodukt, som syntetiseres fra én primer, kan, når det er separeret fra dets komplement, tjene som en template for syntesen af forlængelsesproduktet af den anden primer, 25 og

(b) en mærket probe, som er i stand til at hybridisere med nukleinsyresekvensen.

Kittet indeholder fortrinsvis også et polymerisationsmiddel, fire forskellige nukleotider og et middel til påvisning af hybrider mellem 30 prøben og sekvensen.

Det foreliggende undersøgelseskit kan anvendes ved forskningsundersøgelser, kliniske undersøgelser og til andre diagnostiske formål. Ydermere kan det anvendes til at detektere inficerede celler uden at dyrke viruset, et træk, som er nyttigt, når man undersøger patienter 35 behandlet med forskellige terapeutiske midler for at opløse infektionen.

Figur 1 viser en skematisk afbildning af hele AIDS-genomet, som omfatter de ikke-kodende, lange terminale gentagelsesområder

(LTR) og de kodende områder for gag, pol, env, Q (eller src) og F (eller 3'ORF), og som viser, fra hvilket område de i eksemplerne anvendte primere blev udvalgt.

Figur 2 viser en skematisk afbildning af 10 oligonukleotider af
5 AIDS-sekvensen, som blev ligeret sammen for at frembringe et 180 bp langt DNA-fragment til en hybridiseringsprobe, som skal anvendes i dot blot til detektering af amplificerede produkter.

Figur 3 viser et skematisk flowdiagram af hvordan to kloner, M13mp10W:C7 og M13mp10W:D6, som indeholder nukleotidsekvens-
10 ændringer, blev behandlet til opnåelse af en sekvens, som er identisk med AIDS-viruset. Den fremkomne klon, M-13-GAG, indeholder det 180 bp lange indføjede stykke til brug som en hybridiseringsprobe i dot blot. På figuren angiver X mutation i genet.

Som anvendt her refererer udtrykket "virus" til ethvert isolat
15 eller serier af beslægtede isolater, som har en sekvens, der i det væsentlige er bevaret blandt nukleinsyrerne og specifik for disse i viruset (viraerne). Eksempler på sådanne vira inkluderer HIV, hepatitis B virus, herpes vira, hepatitis A virus, rhinovirus, papillomavirus, Epstein-Barr virus osv. Her foretrukne vira er AIDS og hepatitis B.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde og et kit
20 til detektering eller undersøgelse for en nukleinsyresekvens, som er associeret med et virus i en prøve af nukleinsyre (nukleinsyrer), som mistænkes for at indeholde sekvensen. Den efterfølgende diskussion har navnlig relation til HIV-virus og hepatitis B virus, men kan anvendes på et hvilket som helst virus som her anført.

Fordi HIV er meget variabel er der behov for at finde en fælles-
nævner (et bevaret område med en længde, som gør det muligt for en specifik primer som defineret her at initiere polymerisering) blandt
30 varianterne af viruset til brug ved detektering af en signifikant fraktion af de vira, som er associeret med AIDS. En signifikant fraktion er det antal individer, som er tilstrækkelig til at gøre prøven diagnostisk eller kommercielt gennemførlig. For tiden er 4 HIV'er, ARV, HTLV-III, LAV og LAVA blevet sekventeret, og 5 humane hepatitis B vira såvel som beslægtede vira, som inficerer skovmurdyr, jord-
35 egern og ænder, er blevet sekventeret. De initiale 4 HIV'er og deres associerede varianter er her blevet betegnet som "AIDS-vira", og de 5 hepatitis B vira og de hepatitis B beslægtede vira, som inficerer skovmurdyr, jordegern og ænder, betegnes her som "hepadnavira". Den sekvens, som skal amplificeres, må også være specifik for AIDS-

viraerne eller for hepadnaviraerne, dvs. ikke reagere med HTLV-I eller HTLV-II eller andre ikke-AIDS-vira henholdsvis må ikke reagere med ikke-hepadnavira.

5 Hele genomet for de 4 HIV-isolater og deres varianter er angivet af Sanchez-Pescador et al., Science, 227, 484-492 (1985) for ARV; af Starcich et al., Science, 227, 538-540 (1985) for HTLV-III; af Wain-Hobson et al., Cell 40, 9-17 (1985) for LAV og af Muesing et al., Nature 313, 450-458 (1985) for LAVA. Der er almindelig enighed om, at disse vira alle er varianter af den samme stamme. De er
10 fuldstændigt bevarede i en art, dvs. de har ingen varianter.

Hele genomet for ande-hepatitis B-virus er angivet i J.Virol., 49, 782-792 (1984) og de humane virusgenomer og skovmurmeldyr-virusgenomer er angivet i de referencer, der er citeret i artiklen i J.Virol. Hele genomet for jordegernhepatitis B virus er angivet i
15 J.Virol, 41: 51-65 (1982).

Udtrykket "i det væsentlige bevaret" som anvendt på den sekvens, der skal detekteres, angiver, at sekvensen skal være i det væsentlige komplementær til nukleinsyrerne i det virus, som detekteres, til initiering af polymerisation ved mindst stuetemperatur i
20 nærværelse af et polymerisationsmiddel og de fire nukleosidphosphater.

De anvendte primere vil være oligonukleotider af en hvilken som helst længde og sekvens til tilvejebringelse af specifik polymerisations-initiering på et signifikant antal nukleinsyrer i viruset. Som anvendt her refererer udtrykket "primer" specifikt til et molekyle, som
25 består af to eller flere deoxyribonukleotider eller ribonukleotider, fortrinsvis mere end 3, som er i stand til at fungere som et initieringspunkt for syntese, når de anbringes under betingelser, i hvilke syntesen af et primerforlængelsesprodukt, som er i det væsentlige komplementært til en nukleinsyrestreng, induceres, dvs. i nærværelse af nukleosidtriphosphater og et polymerisationsmiddel, såsom
30 DNA-polymerase, og en egnet temperatur og pH-værdi. Primerne er fortrinsvis enkeltstrengede for maximal virkning ved amplifikation, men de kan alternativt være dobbeltstrengede. Hvis primeren er dobbeltstrengt skal den først behandles for at separere dens strenge, før den bliver anvendt til at frembringe forlængelsesprodukter.
35 Primeren er fortrinsvis et oligodeoxyribonukleotid. Primeren må være tilstrækkelig lang til at prime syntesen af forlængelsesprodukter i nærværelse af induceringsmidlet for polymerisation. De nøjagtige længder af primerne vil afhænge af mange faktorer, inklusiv tempe-

atur, puffer, nukleotidsammensætning og primerkilde. For det foreliggende formål indeholder oligonukleotidprimeren typisk 15-25 eller flere nukleotider, skønt den kan indeholde færre nukleotider. Hvis viruset udgør AIDS-viraerne er primerne fortrinsvis fra gag-området. Hvis viruset udgør hepadnavira, er primerne fortrinsvis fra polymerase- eller hylstergenerne hos disse vira.

De foreliggende primere udvælges til at være "i det væsentlige" komplementære til hver streng af den specifikke sekvens, som skal amplificeres. Dette betyder, at primerne skal være tilstrækkelig komplementære til at hybridisere med deres respektive strenge under betingelser, som tillader polymerisationsmidlet at fungere, dvs. at primerne skal have tilstrækkelig komplementaritet med sekvensen af den streng, som skal amplificeres, til at hybridisere hermed og dermed frembringe en template for syntese af forlængelsesproduktet af den anden primer. Primerne har fortrinsvis nøjagtig komplementaritet med strengen.

Man kan udvælge den sekvens, som skal amplificeres, fra de områder, som er i det væsentlige bevarede blandt de beslægtede vira, som har interesse. Primerne og proberne kan derfor identificeres ved hjælp af hvilke som helst egnede midler. Dette kan gøres manuelt ved at sammenligne områderne af de publicerede nukleinsyresekvenser for de relevante virale genomer, f.eks. de 4 AIDS-virusgenomer og de 4 hepatitis B-genomer.

En anden mere hensigtsmæssig metode er at anvende et computerprogram til at sammenligne sekvenserne. Til dette formål kan der hensigtsmæssigt anvendes et kommercielt program med den tilgrundlæggende computeralgoritme, som leveres af National Biomedical Research Foundation, og som anvender en prikmatrix. Dette program involverer, at nukleinsyresekvenserne for de forskellige, beslægtede vira af interesse indføres, og at der defineres en vinduestørrelse for baseparhomologi. Programmet anvender grafik for at sammenligne sekvenserne på forskellige akser, og der fremkommer en prik, når der er mindst væsentlig homologi. Vinduestørrelsen er fortrinsvis større end 6 baser.

For AIDS-viraerne afslører et prikmatrixprogram, at gag-området af genomet (se figur 1), også kendt som nukleokapsidgenet, er mest bevaret blandt de kodende områder i de 4 varianter. Det næstbedst bevarede kodeområde er pol-området, efterfulgt af env-området af genomet. Fordi gag er det mest bevarede blandt de kodende

områder, er det det foretrukne område, fra hvilket man udvælger primere og prober til detektering af sekvensen.

Områder af det virale genom, som ikke koder for proteiner, kan også anvendes til at bestemme en sekvens for de primere, der skal anvendes. For de foreliggende formål for at maximere følsomhed og specificitet er den sekvens, som detekteres, homolog med en sekvens, som har en tilstrækkelig længde til at tillade specifik priming, og som i det væsentlige er bevaret blandt beslægtede vira, navnlig ved restriktionsspaltningssstedet, hvis der anvendes en probe og en restriktionsenzym.

De metoder, som anvendes til amplificering og derefter til detektering af produktet er beskrevet i detaljer i Saiki et al., Biotechnology, se ovenfor, og Saiki et al., Science, se ovenfor. Generelt involverer amplifikationsprocessen en enzymatisk kædereaktion til i eksponentielle mængder i forhold til de involverede antal reaktionstrin at frembringe en specifik nukleinsyresekvens, forudsat at enderne af den ønskede sekvens er kendt i tilstrækkelige detaljer til, at der kan syntetiseres oligonukleotidprimere, som vil hybridisere med dem, og at en lille mængde af sekvensen er tilgængelig til at initiere kædereaktionen. Én primer er komplementær til den negative (-) streng, og den anden er komplementær til den positive (+) streng. Annealing af primerne til denatureret nukleinsyre efterfulgt af forlængelse med et enzym, såsom det store fragment fra DNA-polymerase I (Klenow), og nukleotiderne, resulterer i nyligt syntetiserede + og - strenge, som indeholder målsekvensen. Fordi disse nyligt syntetiserede sekvenser også er templat for primerne resulterer gentagne cyklusser med denaturering, primerannealing og forlængelse i eksponentiel akkumulering af de område, der afgrænses af primeren. Produktet af kædereaktionen vil være en særskilt nukleinsyreduplex med termini, som svarer til enderne af de specifikke primere, som anvendes.

Amplifikationsprocessen illustreres skematisk nedenfor, hvor dobbeltstrengt DNA, som indeholder den ønskede sekvens [S] bestående af de komplementære strenge [S^+] og [S^-] anvendes som nukleinsyren. Under den første og hver efterfølgende reaktionscyklus vil forlængelse af hver oligonukleotidprimer på den oprindelige template producere 1 nyt ssDNA-molekyleprodukt med ubestemt længde, som ender med kun den ene af primerne. Disse produkter, som herefter omtales som "lange produkter" vil akkumulere på linier måde, dvs. den mængde, som er til stede efter et hvilket som helst antal cykler, vil være proportional med antallet af cykler.

De således frembragte lange produkter vil fungere som templatere for den ene eller den anden af oligonukleotidprimerne under efterfølgende cyklusser og vil fremkalde molekyler af den ønskede sekvens $[S^+]$ eller $[S^-]$. Disse molekyler vil også fungere som templatere for den ene eller den anden af oligonukleotidprimerne, hvorved produceres yderligere $[S^+]$ og $[S^-]$, og der kan således opretholdes en kædereaktion, som vil resultere i akkumuleringen af $[S]$ med en eksponentiel hastighed i forhold til antallet af cykler.

Biprodukter, som dannes ved andre oligonukleotidhybridiseringer end de tilsigtede, er ikke selvkatalytiske og akkumulerer således med en linær hastighed.

Den specifikke sekvens, som skal amplificeres, $[S]$, kan skematisk afbildes som følger:

15 $[S^+]$ 5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCC 3'
 $[S^-]$ 3' TTTTTTTTTTYYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'

De hensigtsmæssige oligonukleotidprimere ville være:

Primer 1: 3' GGGGGGGGGG 5'
 20 Primer 2: 5' AAAAAAAAAA 3'

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

25zzzzzzzAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzz....
zzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYYGGGGGGGGGzzzzzzzz....

separeres i enkeltstreng, og de enkelte streng hybridiseres til primerne 1 og 2, kan nedenstående forlængelsesreaktioner katalyseres af DNA-polymerase i nærværelse af de 4 deoxyribonukleosidtriphosphater:

35

forlænges ←—————GGGGGGGGGG 5' Primer 1

5'...zzzzzzzAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzz...3'
oprindelig template-streng⁺

5

Primer 2 5' AAAAAAAAAA—————> forlænges

3'...zzzzzzzTTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGGzzzzzzz...5'
oprindelig template-streng⁻

10

forlænges ←—————GGGGGGGGGG 5' Primer 1
hertil

5' AAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzz...3'
nyligt syntetiseret, langt produkt 2

15

Hvis strengene af de 4 duplexer separeres findes følgende strenge:

5' AAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCC 3'
nyligt syntetiseret [S⁺]

20

3'...zzzzzzzTTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGG 5'
langt produkt 1 syntetiseret i første cyklus

25

3'...zzzzzzzTTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGG 5'
nyligt syntetiseret langt produkt 1

5'...zzzzzzzAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzz...3'
oprindelig template-streng⁺

30

5' AAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzz... 3'
nyligt syntetiseret langt produkt 2

3'...zzzzzzzTTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGGzzzzzzz...5'
oprindelig template-streng⁻

35

3' TTTTTTTTTTYYYYYYYYYYYGGGGGGGGGG 5'
nyligt syntetiseret [S⁻]

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzz....3'
5 langt produkt 2 syntetiseret i første cyklus

10 Det fremgår, at hver streng, som ender med oligonukleotid-
sekvensen for én primer og den komplementære sekvens for den
anden, er den specifikke nukleinsyresekvens [S], som man ønsker at
frembringe.

15 Trinnene i denne fremgangsmåde kan gentages ubegrænset, idet
de kun er begrænset af mængden af primerne 1 og 2, inducerings-
midlet og tilstedeværende nukleotider. Mængden af oprindelig nu-
kleinsyre forbliver konstant i hele processen, fordi den ikke bliver
replikeret. Mængden af de lange produkter forøges liniært, fordi de
kun produceres fra den oprindelige nukleinsyre. Mængden af den
20 specifikke sekvens forøges eksponentielt. Således vil den specifikke
sekvens blive den dominerende form. Dette illustreres i den efterføl-
gende tabel, som indikerer de relative mængder af de former, der
teoretisk er til stede efter n cykler, under antagelse af 100% effek-
tivitet i hver cyklus:

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

35 Når der anvendes en enkeltstrengt nukleinsyre som template dannes
der kun 1 langt produkt pr. cyklus.

Som anvendt her refererer udtrykkene "restriktionsendonuklea-
ser" og "restriktionsenzym" til bakterielle enzymer, som skærer
dobbeltstrengt DNA ved eller nær en specifik nukleotidsekvens.

Primeren (primerne) her kan udvælges efter følgende kriterier, som er faktorer, der skal overvejes, men som ikke er eksklusive eller bestemmende faktorer. For det første udvælges primerne fra bevarede områder af det virale genom. I tilfælde med AIDS-genomet er gag-området (nukleokapsid-genet) det mest bevarede af de kodende områder, efterfulgt af pol- og env-områderne, og derfor blev gag-området udvalgt til initiale undersøgelser. I tilfælde med hepatitis B-genomet er hele det kodende område af genomet bevaret i en enkelt art.

For det andet mangler primeren homologi med hvilke som helst sekvenser af virale genomer, som kunne forventes at forstyrre undersøgelsen. F.eks. ville de sekvenser for HTLV-I, som er publiceret af Seiki, M. et al., PNAS (USA) 80:3618-3622 (1983), forstyrre undersøgelsen for AIDS.

For det tredje mangler primeren fortrinsvis sekundær strukturdannelse i den amplificerede nukleinsyre, hvilket kan interferere med forlængelse ved hjælp af amplifikationsenzymet, såsom E.coli DNA-polymerase, fortrinsvis den del af DNA-polymerasen, som omtales som Klenow-fragmentet. Dette kan opnås ved at anvende op til ca. 15 vægt%, fortrinsvis 5-10 vægt%, dimethylsulfoxid (DMSO) i amplifikationsmediet og/eller forøge amplifikationstemperaturen til 30-40°C, fortrinsvis 35-40°C.

For det fjerde har primeren fortrinsvis et omtrentligt 50% indhold af guanin og cytosin og indeholder ikke multiple, på hinanden følgende adenin- og thyminrester ved 3'-enden af primeren, hvilket kan resultere i mindre stabile hybrider.

Til slut, hvis det amplificerede produkt skal detekteres under anvendelse af et restriktionsenzym, må proben have et internt (ikke-terminalt) restriktionssted.

Oligonukleotidprimerne kan fremstilles ved at anvende en hvilken som helst egnet metode, såsom f.eks. de ovenfor beskrevne phosphotriester- og phosphordiestermetoder eller automatiserede udførelsesformer heraf. I en sådan automatiseret udførelsesform anvendes diethylphosphoramiditer som udgangsmateriale, og de kan syntetiseres som beskrevet af Beaucage et al., Tetrahedron Letters (1981), 22: 1859-1862. En fremgangsmåde til syntetisering af oligonukleotider på et modificeret fast bæremateriale er beskrevet i US patent nr. 4.458.066. Det er også muligt at anvende en primer, som er blevet isoleret fra en biologisk kilde (såsom en restriktionsendonukleasefordøjelse).

En hvilken som helst nukleinsyrekilde kan i rensat eller ikke-
rensat form anvendes som udgangsnukleinsyren eller -syernerne,
forudsat at den indeholder eller formodes at indeholde den specifikke
nukleinsyresekvens, som er associeret med det virus, som skal på-
5 vises. Ved fremgangsmåden kan der således f.eks. anvendes DNA
eller RNA, inklusiv messenger-RNA, hvilket DNA eller RNA kan
være enkeltstrenget eller dobbeltstrenget. I det tilfælde, at RNA
anvendes som en template, skal der anvendes enzymer og/eller
betingelser, som er optimale for tilbagetranskribering af templaten til
10 DNA. Ydermere kan der anvendes en DNA-RNA-hybrid, som inde-
holder en streng af hver. Der kan også anvendes en blanding af
hver af disse nukleinsyrer, eller der kan anvendes nukleinsyrer,
som er frembragt ved en tidligere amplifikationsreaktion her under
anvendelse af de samme eller forskellige primere. Den specifikke
15 nukleinsyresekvens, som skal amplificeres, kan blot være en fraktion
af et større molekyle eller kan i begyndelsen være tilstede som et
særskilt molekyle, således at den specifikke sekvens udgør hele
nukleinsyren. Det er ikke nødvendigt, at den sekvens, som skal
amplificeres, i begyndelsen er tilstede i en ren form; det kan være
20 en mindre fraktion af en kompleks blanding, såsom en del af det
viruskodende gen indeholdt i hel human DNA. Udgangsnukleinsyren
kan indeholde mere end én ønsket specifik nukleinsyresekvens, som
kan være den samme eller en anden. Den foreliggende fremgangsmåde
er derfor ikke blot nyttig til frembringelse af store mængder af en
25 specifik nukleinsyresekvens, men også til samtidig amplificering af
flere end én forskellig, specifik nukleinsyresekvens lokaliseret på
det samme eller et andet nukleinsyremolekyle.

Nukleinsyren (nukleinsyrerne) kan opnås fra en hvilken som
helst kilde, f.eks. naturlig DNA eller RNA fra højere organismer,
30 såsom dyr. DNA eller RNA kan ekstraheres fra en legemsprøve,
såsom blod, vævsmateriale, såsom chorion villi, eller amnionceller ved
hjælp af en række metoder, såsom den der er beskrevet af Maniatis
et al., *Molecular cloning* (1982), 280-281.

Hvis prøven er uren, såsom plasma, serum eller blod, kan den
35 før amplifikation behandles med et reagens i en mængde, som effek-
tivt åbner cellerne, væskerne, vævene, de virale kapsider eller
animalske cellemembraner i prøven og frilægger og/eller separerer
nukleinsyrens (nukleinsyrernes) strenge. Dette lyserings- og nu-
kleinsyredenatureringstrin for at frilægge og separere strengene vil
muliggøre at amplifikation sker meget lettere. Ydermere er det ikke

nødvendigt, at AIDS-viruset dyrkes i prøven, før prøven behandles med amplifikationsreagenserne. Prøven kan centrifugeres til frembringelse af "buffy coats", som derefter føres gennem en søjle til opnåelse af leukocytter. Leukocytterne kan derefter behandles for at ekstrahere nukleinsyrerne herfra til brug som den prøve, der skal amplificeres.

Der kan frembringes en hvilken som helst specifik nukleinsyresekvens ved den foreliggende fremgangsmåde. Det er kun nødvendigt, at et tilstrækkeligt antal baser i begge ender af sekvensen er kendt i tilstrækkelige detaljer til at der kan fremstilles to oligonukleotidprimere, som vil hybridisere til forskellige strenge i den ønskede sekvens og ved relative positioner langs sekvensen, således at et forlængelsesprodukt, der syntetiseres fra en primer, kan, når det separeres fra dets template (komplement) tjene som en template for forlængelse af den anden primer til en nukleinsyre med en begrænset længde. Jo større viden man har om baserne i begge ender af sekvensen, jo større kan primernes specificitet for målnukleinsyresekvensen være og jo større er fremgangsmådens effektivitet. Det skal forstås, at ordet primer, som anvendes herefter, kan referere til mere end én primer, navnlig i det tilfælde, hvor der er nogen flertydighed i informationen vedrørende den terminale sekvens (de terminale sekvenser) af det fragment, som skal amplificeres. F.eks. vil der i det tilfælde, hvor en nukleinsyresekvens udledes fra proteinsekvensinformation, for hver streng blive anvendt en samling af primere, som indeholder sekvenser, der repræsenterer alle mulige codonvariationer baseret på den genetiske kodes degenerering. Én primer fra denne samling vil være i det væsentlige bevaret i forhold til den ønskede sekvens, som skal amplificeres.

Den specifikke nukleinsyresekvens frembringes ved at anvende den nukleinsyre, som indeholder denne sekvens, som en template. Hvis målnukleinsyresekvensen i prøven indeholder to strenge, er det nødvendigt at separere nukleinsyrens strenge, før den kan anvendes som template, enten i et separat trin eller samtidigt med syntesen af primerforlængelsesprodukterne. Denne strengseparation kan opnås ved at anvende egnede denatureringsbetingelser, inklusiv fysiske, kemiske eller enzymatiske midler, idet ordet "denaturering" som anvendt her inkludere alle sådanne midler. En fysisk metode til separering af nukleinsyrestrengene involverer opvarmning af nukleinsyren, indtil den er denatureret. Typisk varmedenaturering kan involvere temperaturer, som ligger i området fra ca. 80 til 105°C i

tider, som ligger fra ca. 1 til 10 minutter. Strengeseperation kan også induceres af et enzym fra klassen af enzymer, som er kendt som helicaser eller enzymet RecA, som har helicaseaktivitet, og som vides at denaturere DNA i nærværelse af riboATP. De reaktionsbetingelser, som er egnede til separering af nukleinsyrestrengene med helicaser, er beskrevet af Kuhn Hoffmann-Berling, CSH-Quantitative Biology, 43: 63 (1978) og metoder til anvendelse af RecA er opsummeret i C.Radding, Ann.Rev.Genetics, 16:405-37 (1982).

Hvis den oprindelige nukleinsyre, som indeholder den sekvens, der skal amplificeres, er enkeltstrenget, syntetiseres dets komplement ved at tilsætte en eller to oligonukleotidprimere hertil. Hvis der tilsættes en hensigtsmæssig enkelt primer syntetiseres et primerforlængelsesprodukt i nærværelse af primeren, et polymerisationsmiddel og de 4 nukleosidtriphosphater som beskrevet nedenfor. Produktet vil være delvis komplementært til den enkeltstrengede nukleinsyre og vil hybridisere med nukleinsyrestrengen til frembringelse af en duplex med ulige lange strenge, som kan separeres til enkeltstrenge som ovenfor beskrevet til frembringelse af to enkelte, separerede, komplementære strenge. Alternativt kan der tilsættes to hensigtsmæssige primere til den enkeltstrengede nukleinsyre, og reaktionen kan udføres.

Hvis den oprindelige nukleinsyre udgør den sekvens, som skal amplificeres, vil det frembragte primerforlængelsesprodukt (de frembragte primerforlængelsesprodukter) være fuldstændig eller i det væsentlige komplementære til strengene i den oprindelige nukleinsyre og vil hybridisere hermed til frembringelse af en duplex med lige lange strenge, som kan separeres til enkeltstrengede molekyler.

Når de komplementære strenge i nukleinsyren eller -syernerne separeres, hvad enten nukleinsyren oprindeligt var dobbeltstrenget eller enkeltstrenget, er strengene parat til at blive anvendt som en template til syntese af yderligere nukleinsyrestrengene. Denne syntese udføres under betingelser, der tillader, at hybridisering af primere til templater finder sted. Det finder generelt sted i en pufret vandig opløsning, fortrinsvis ved en pH-værdi på 7-9, mest fortrinsvis ca. 8. Fortrinsvis tilsættes et molært overskud (for genomisk nukleinsyre sædvanligvis ca. 10^8 :1 primer:template) af de to oligonukleotidprimere til den puffer, som indeholder de separerede templatestrengene. Det skal imidlertid forstås, at mængden af komplementær streng måske ikke er kendt, hvis den foreliggende fremgangsmåde anvendes til diagnostiske formål, således at mængden af primer i forhold til

mængden af den komplementære streng ikke kan bestemmes med sikkerhed. Som en praktisk forholdsregel vil den mængde primer, som tilsættes, imidlertid generelt være i molært overskud i forhold til mængden af komplementær streng (template), når den sekvens, der skal amplificeres, findes i en blanding af komplicerede, langkædede nukleinsyrestrengene. Der foretrækkes et stort molært overskud for at forbedre fremgangsmådens effektivitet.

Deoxyribonukleosidtriphosfaterne dATP, dCTP, dGTP og TTP tilsættes også til synteseblandingen, enten separat eller sammen med primerne, i passende mængder, og den fremkomne 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 til at afkøle til stuetemperatur, hvilket foretrækkes til primerhybridisering. Til den afkølede blanding tilsættes et hensigtsmæssigt middel til udførelse af primerforlængelsesreaktionen (her kaldet "polymerisationsmiddel"), og reaktionen får lov til at finde sted under betingelser, som er kendt inden for fagområdet. Polymerisationsmidlet kan også tilsættes sammen med de andre reagenser, hvis det er varmostabilt. Denne syntesereaktion kan finde sted ved en temperatur fra stuetemperatur op til en temperatur, over hvilken polymerisationsmidlet ikke længere fungerer. Hvis således f.eks. DNA-polymerase anvendes som midlet er temperaturen sædvanligvis ikke over ca. 40°C. Mest hensigtsmæssigt finder reaktionen sted ved stuetemperatur.

Polymerisationsmidlet kan være en hvilken som helst forbindelse eller et hvilket som helst system, som vil fungere til opnåelse af syntese af primerforlængelsesprodukter, inklusiv enzymer. Egnede enzymer til dette formål inkluderer f.eks. E.coli DNA polymerase I, Klenow fragment af E.coli DNA polymerase I, T4-DNA-polymerase, andre tilgængelige DNA-polymeraser, polymerasemuteiner, revers transkriptase og andre enzymer, inklusiv varmostabile enzymer (f.eks. de enzymer, som udfører primerforlængelse efter at være udsat for temperaturer, der er tilstrækkelig høje til at fremkalde denaturering), som vil lette kombineringen af nukleotiderne på den rette måde til frembringelse af de primerforlængelsesprodukter, som er komplementære til hver nukleinsyrestreng. Syntesen vil generelt blive påbegyndt ved 3'-enden af hver primer og forløbe i 5'-retningen langs templatestrengen, indtil syntesen stopper, hvorved der produceres molekyler af forskellig længde. Der kan imidlertid være polymerisationsmidler, som påbegynder syntesen i 5'-enden og for-

løber i den anden retning under anvendelse af den samme fremgangsmåde som ovenfor beskrevet.

Den nyligt syntetiserede streng og dens komplementære nukleinsyrestreng vil danne et dobbeltstrengt molekyle under de ovenfor beskrevne hybridiseringsbetingelser, hvis målsekvensen er tilstede, og denne hybrid anvendes i de efterfølgende trin i fremgangsmåden. I det næste trin udsættes den prøve, som er behandlet under hybridiseringsbetingelser, for denatureringsbetingelser under anvendelse af en hvilken som helst af de ovenfor beskrevne fremgangsmåder til frembringelse af enkeltstrengede molekyler, hvis målsekvensen er tilstede.

Der syntetiseres ny nukleinsyre på de enkeltstrengede molekyler. Der kan om nødvendigt tilsættes yderligere polymerisationsmiddel, nukleotider og primere for at reaktionen kan finde sted under de ovenfor beskrevne betingelser. Igen vil syntesen blive påbegyndt i én ende af hver af oligonukleotidprimerne og vil forløbe langs templatens enkelte strenge til frembringelse af yderligere nukleinsyre. Efter dette trin vil halvdelen af forlængelsesproduktet bestå af den specifikke nukleinsyresekvens omgivet af de to primere.

Trinnene med denaturering og syntese af forlængelsesprodukt kan gentages så ofte som der er behov for til at amplificere mål-nukleinsyresekvensen i den udstrækning, som det er nødvendigt til detektering. Som det vil blive beskrevet i yderligere detaljer nedenfor vil den mængde specifik nukleinsyresekvens, der produceres, akkumulere på en eksponentiel måde.

Når man ønsker at fremstille mere end én specifik nukleinsyresekvens fra den første nukleinsyre eller blanding af nukleinsyrer anvendes det hensigtsmæssige antal forskellige oligonukleotidprimere. Hvis der f.eks. skal produceres to forskellige specifikke nukleinsyresekvenser anvendes 4 primere. To af primerne er specifikke for den ene af de specifikke nukleinsyresekvenser, og de to andre primere er specifikke for den anden specifikke nukleinsyresekvens. På denne måde kan hver af de to forskellige specifikke sekvenser frembringes eksponentielt ved hjælp af den foreliggende fremgangsmåde.

Den foreliggende opfindelse kan udøves på en trinvis måde, hvor der efter hvert trin tilsættes nye reagenser, eller samtidigt, hvor alle reagenserne tilsættes i begyndelsestrinnet, eller delvis trinvis og delvis samtidigt, hvor der tilsættes frisk reagens efter

et bestemt antal trin. Hvis der anvendes en denatureringsmetode, såsom varme, som vil inaktivere polymerisationsmidlet, som er tilfældet med et varmelabilt enzym, er det nødvendigt at supplere midlet op efter hver strengseparationstrin. Den samtidige metode kan anvendes, når der anvendes et enzymatisk middel til strengseparations-
5 trinnet. I den samtidige fremgangsmåde kan reaktionsblandingen ud over den nukleinsyrestreng (de nukleinsyrestreng), som indeholder den ønskede sekvens, indeholde det strengseparerende enzym (f.eks. helicase), en hensigtsmæssig energikilde for det strengseparerende enzym, såsom rATP, de fire nukleosidtriphosphater, oligonukleotidprimerne i molært overskud og polymerisationsmidlet, f.eks. Klenow-fragmentet af E.coli DNA polymerase I.

Hvis varme anvendes til denaturering i en samtidig fremgangsmåde kan der anvendes et varmostabilt middel, såsom en termostabil polymerase, som vil fungere ved en hævet temperatur, fortrinsvis
15 50-105°C afhængig af midlet, ved hvilken temperatur nukleinsyren vil bestå af enkeltstreng og dobbeltstreng i ligevægt. For mindre nukleinsyrelængder kan lavere temperaturer på fra ca. 40 til 50°C anvendes. Den øvre temperatur vil afhænge af den temperatur, ved hvilken enzymet nedbrydes, eller den temperatur, over hvilken der vil ske et utilstrækkeligt niveau af primerhybridisering. Et sådant varmostabilt enzym beskrives f.eks. af A.S.Kaledin et al., Bio-
khimiya, 45, 644-651 (1980). For at denne reaktion ved konstant
20 temperatur kan forløbe har primerne deres 3'-ender inden for 6-8 basepar fra hinanden. Hvert trin i processen vil ske sekventielt uanset den initiale tilstedeværelse af alle reagenserne. Yderligere materiale kan tilsættes efter behov. Efter at en hensigtsmæssig tidsperiode er forløbet til frembringelse af den ønskede mængde af den specifikke nukleinsyresekvens, kan reaktionen stoppes ved at
25 inaktivere enzymerne på en kendt måde eller ved at separere reaktionskomponenterne.

Amplifikationen kan også udføres ved at anvende en reaktion med en temperaturcyklus, hvor temperaturen kontinuerligt forøges til 90-105°C for at tillade denaturering og derefter nedsættes til 35-65°C
35 eller mere for at tillade forlængelse og annealing under anvendelse af et varmostabilt enzym. I praksis hæves temperaturen simpelthen til ca. 95°C, sænkes til ca. 65°C eller til så lavt som 37°C og hæves igen til ca. 95°C, og cyklussen fortsættes i den ønskede periode.

I en anden udførelsesform for en automatiseret fremgangsmåde kan fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse udføres kontinuerligt ved at lade reaktionen forløbe i en cyklus gennem et denatureringsområde, et reagenstilsætningsområde og et reaktions-

5 område. I en anden udførelsesform kan det enzym, som anvendes til syntese af primerforlængelsesprodukterne, være immobiliseret på en søjle. De andre reaktionskomponenter kan kontinuerligt cirkuleres ved hjælp af en pumpe gennem søjlen og en varmespiral i serie, således at de producerede nukleinsyrer kan denatureres gentagne

10 gange uden at inaktivere enzymet.

Det amplificerede produkt kan undersøges ved at analysere det ved hjælp af Southern blot uden at anvende radioaktive prober. Ved en sådan fremgangsmåde amplificeres f.eks. en lille prøve af DNA fra f.eks. perifere blodlymfocytter, som indeholder et meget lavt niveau

15 af den sekvens, der er associeret med f.eks. AIDS, og analyseres via en Southern blot teknik. Anvendelsen af ikke-radioaktive prober gøres lettere på grund af det høje niveau af det amplificerede signal.

En anden detekteringsmetode involverer detektering under anvendelse af en mærket probe, som er i stand til at hybridisere med den amplificerede nukleinsyresekvens, og bestemmelse af, om proben har hybridiseret. En sådan probe indeholder nødvendigvis en i det væsentlige bevaret nukleinsyresekvens fra virusgenomet (for AIDS-

20 viruset, HTLV-III, ARV, LAV, LAVA eller en variant heraf) og udvælges som ovenfor beskrevet for primere og amplificerede sekvenser. For AIDS udvælges proben fortrinsvis fra gag-området i AIDS-genomet.

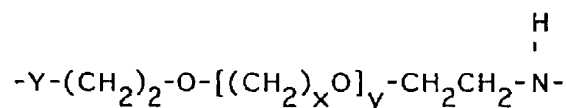
En sådan probemetode involverer oligomerrestriktionsteknikken beskrevet i EP patent publikation nr. 164.054, publiceret 11. dec.

30 1985. Ved denne fremgangsmåde denatureres den amplificerede nukleinsyre og hybridiseres i opløsning til en mærket oligonukleotidprobe, som specifikt hybridiserer til målsekvensen (strækker sig over det bestemte, bevarede område indeholdt i primerne) og strækker sig over mindst ét restriktionssted af interesse. Den duplex, der dannes mellem målsekvensen og proben, vil genoprette restriktions-

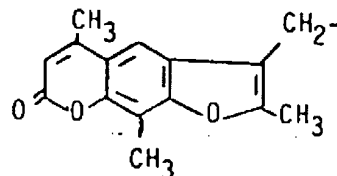
35 stedet, og når det spaltes med restriktionsenzym, såsom f.eks. BstNI, PvuII, DdeI eller DraI, frigøres et mærket probefragment, som kan skelnes fra fuld længdeproben ved gelelektroforese. Den fremkomne gel autoradiograferes derefter. Analyse af det amplifi-

cerede produkt ved hjælp af denne metode er hurtig, dvs. at man kan opnå resultater i løbet af få timer. Proben er fortrinsvis 30-50 baser lang og er mærket. Restriktionsenzymet er fortrinsvis også BstNI eller PvuII, hvis den sekvens, som skal påvises, er fra AIDS-viruset, og Ddel, hvis den sekvens, der skal påvises, er fra hepadnaviruset.

En anden metode, som kan anvendes til at analysere det amplificerede produkt, er dot blot metoden. Ved denne metode afsættes de amplificerede prøver direkte som en plet på en membran og hybridiseres med en mærket prøve. Mærkningen kan detekteres ved hjælp af spektroskopiske, kemiske eller biokemiske immunologiske eller kemiske midler. Eksempler inkluderer enzymer, såsom alkalisk phosphatase, en radioaktiv mærkning, såsom ^{32}P , en fluorescerende mærkning eller biotin. I én udførelsesform er proben en biotinyleret probe, hvor biotinen er fæstnet til en afstandsarm med formlen:



hvor Y betegner O, NH eller N-CHO, x er et tal på fra 1 til 4, og y er et tal på fra 2 til 4. Afstandsarmen er igen fastgjort til en psoralenenhed med formlen:



Psoralenenheden interkalierer i og tværbinder en "åben cirkel"-probe som beskrevet af Courage-Tebbe et al., Biochem. Biophys. Acta, 697, (1982) 1-5, hvor det enkeltstrengede hybridiseringsområde af den "åbne cirkel" strækker sig over området indeholdt mellem primerne. Detaljerne vedrørende denne biotinylerings- og dot blot procedure er beskrevet nærmere i fælles overdraget US patent nr. 4.582.789 og nr. 4.617.261. De biotinylerede prober eliminerer behovet for radioaktive isotoper.

Alternativt kan proben først afsættes som en plet på membranen, om nødvendigt under præhybridiseringsbetingelser, og derefter tilsættes det amplificerede produkt til den forbehandlede membran under hybridiseringsbetingelser, "i et omvendt" dot blot format.

Dot blot proceduren er mere tidskrævende end den ovenfor beskrevne oligomerrestriktionsmetode, fordi membranen først skal præhybridiseres og derefter hybridiseres med proben. Med hurtigt muterende vira har det imidlertid den fordel, at sekvenser, som indeholder begrænsede basefejlparinger, stadig kan påvises under hensigtsmæssig hybridiseringsbetingelser, hvorimod med oligomerrestriktionsmetoden vil ethvert virus, som rummer en mutation, der resulterer i ødelæggelse af restriktionsstedet, ikke blive påvist på grund af virusets variabilitet.

Den foreliggende opfindelse angår også et kitformat, som omfatter en emballeret multibeholderenhed med beholdere til hver primer og den anvendte probe. Kittet kan også indeholde en beholder til polymerisationsmiddel til syntese af primerforlængelsesprodukterne, såsom enzymer, en beholder med hver af de 4 nukleosidtriphosphater og en beholder med midler til påvisning af mærkningen (såsom et avidin-enzymkompleks, hvis mærkningen er biotin). Ydermere kan kittet indeholde en beholder, som inkluderer en positiv kontrol, der indeholder en eller flere nukleinsyrer med en sekvens af det virale genom af interesse, f.eks. AIDS, og/eller en beholder, som inkluderer en negativ kontrol uden sådanne nukleinsyrer. Ydermere kan kittet indeholde en beholder for hvert restriktionsenzym, som er i stand til at spalte en nukleinsyre, der indeholder målsekvensen, ved et sted, som er indeholdt i en sekvens i proben.

De efterfølgende eksempler illustrerer forskellige udførelsesformer for opfindelsen og har ikke til hensigt at være begrænsende på nogen måde. I eksemplerne er alle dele og procenter angivet efter vægt, hvis de er faste, og efter volumen, hvis de er flydende, og alle temperaturer er i °C med mindre andet angives.

30 Eksempel 1

De ønskede sekvenser, som skulle amplificeres, er indeholdt i 11 kodede DNA-prøver opnået fra dr. Bernard Poiesz fra Regional Oncology Center, SUNY Upstate Medical Center, Syracuse, New York 13210, identificeret som 194BK, 342, 367, 361, 368H, 207, 307, 308B, 35 323, 326 og 340. De sekvenser, som skal amplificeres, primerne og proberne blev identificeret ved det ovenfor beskrevne prikmatrix-program, hvor det valgte sekvensvindue var mindst 20 basepar langt, således at sekvenserne blev valgt inden i de bevarede områder af AIDS-viraerne.

De kodede prøver blev først dyrket i nærværelse af interleukin-2 af dr. Poesz for at teste for tilstedeværelse af virus. Derefter blev DNA ekstraheret fra prøverne ved hjælp af følgende fremgangsmåde:

5 1. $1-2 \times 10^8$ dyrkede celler blev lyseret i reagensglas med 20 ml natriumdodecylsulfatlyseringspuffer (1% SDS, 150 mM NaCl, 25 mM Na_2 EDTA).

 2. 400 μl af en 5 mg/ μl opløsning af proteinase K blev tilsat pr. reagensglas og inkuberet ved 37°C natten over.

10 3. DNA'et blev sekventielt ekstraheret med phenol og CHCl_3 : isoamylalkohol efterfulgt af præcipitering med ethanol.

 4. DNA'et blev spundet op på en glasstang og resuspenderet i $1 \times$ TE-puffer (10 mM Tris, 1 mM Na_2 EDTA, pH 7,5) og dialyseret indgående mod $1 \times$ TE-puffer.

15

I. Syntese af primere.

Følgende to oligodeoxyribonukleotidprimere, betegnet SK01 henholdsvis SK02, blev fremstillet ved den nedenfor beskrevne metode:

20 5'-CAGGGAGCTAGAACGAT-3' (SK01)

 5'-CTTCTGATCCTGTCTGA-3' (SK02)

(SK01 og SK02 blev udvalgt til at tilvejebringe amplifikation af 107 baser bellem nukleotider 900 og 1006 fra HTLV-III isolat BH10).

25 A. Automatiseret synteseprocedure: Diethylphosphoramidterne, syntetiseret ifølge Beaucage og Caruthers (Tetrahedron Letters (1981) 22: 1859-1862) blev sekventielt kondenseret til et nukleosidderivatiseret glasbæremateriale med styret porestørrelse under anvendelse af en Biosearch SAM-1. Fremgangsmåden inkluderede detritylering med trichloreddikesyre i dichlormethan, kondensering under anvendelse af benzotriazol som aktiverende protondonør og capping med eddikesyreanhydrid og dimethylaminopyridin i tetrahydrofuran og pyridin. Cyklustiden var ca. 30 minutter. Udbytteerne ved hvert trin var stort set kvantitative og blev bestemt ved opsamling og
30 spektroskopisk undersøgelse af dimethoxytritylalkohol frigjort under detritylering.

35

B. Oligodeoxyribonucleotidafdækning og oprensningprocedure: Det faste bæremateriale blev fjernet fra søjlen og behandlet med 1 ml koncentreret ammoniumhydroxid ved stuetemperatur i 4 timer i et

lukket reagensglas. Bærematerialet blev derefter fjernet ved filtrering, og opløsningen indeholdende det delvis beskyttede oligodeoxynukleotid blev bragt til 55°C i 5 timer. Ammoniak blev fjernet, og resten blev påsat en præparativ polyacrylamidgel. Der blev udført elektroforese ved 30 volt/cm i 90 minutter, hvorefter det bånd, som indeholdt produktet, blev identificeret ved UV-skygning af en fluorescerende plade. Båndet blev skåret ud og elueret med 1 ml destilleret vand natten over ved 4°C. Denne opløsning blev påsat en Altech RP18-søjle og blev elueret med en 7-13% gradient af acetonitril i 1% ammoniumacetatpuffer ved pH 6,0. Elueringen blev målt ved UV-absorbans ved 260 nm, og den korrekte fraktion blev opsamlet, kvantificeret ved UV-absorbans i et bestemt volumen og blev inddampet til tørhed ved stuetemperatur i en vakuumcentrifuge.

C. Karakterisering af oligodeoxyribonukleotider: Testdelprøver af de oprensede oligonukleotider blev mærket med ^{32}P med polynukleotidkinase og $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$. De mærkede forbindelser blev undersøgt ved autoradiografi af en 14-20% polyacrylamidgel efter elektroforese i 45 minutter ved 50 volt/cm. Denne procedure bekræftede molekylvægten. Basesammensætningen blev bestemt ved fordøjelse af oligodeoxyribonukleotid 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 mobil fase af 10% acetonitril, 1% ammoniumacetat.

25

II. Amplifikationsreaktion.

1 mikrogram DNA fra hver af de 11 kodede DNA-prøver fra dr. Poiesz blev tilsat til 100 μl puffer bestående af 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM natriumchlorid og 10 mM magnesiumchlorid og indeholdende 100 picomol Primer SK01, 100 picomol Primer SK02 og 150 nanomol af hver af dATP, dCTP, dGTP og TTP.

Den fremkomne opløsning blev opvarmet til 100°C i 10 minutter og fik lov til at afkøle til stuetemperatur i 2 minutter, hvorefter der tilsattes 2 μl indeholdende 1 enhed Klenow-fragment af E.coli DNA polymerase. Reaktionen fik lov til at forløbe i 2 minutter ved stuetemperatur, hvorefter enzymet blev inaktiveret ved at opvarme til 95°C i 2 minutter. Denatureringen, primerannealing, og forlængelse med Klenow, 2 minutter pr. trin, samt tilsætning af polymerase blev gentaget 19 gange.

III. Syntese og phosphorylering af oligodeoxyribonukleotidprobe.

En mærket DNA-probe, SK03, med sekvensen:

5-*AATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAG-3',

hvor * indikerer mærkningen, blev syntetiseret ifølge de i afsnit I
5 beskrevne fremgangsmåder. Proben blev mærket ved at kontakte 10
pmol heraf med 4 enheder T4-polynukleotidkinase og 50 pmol γ ³²P-
ATP (ca. 7200 Ci/mmol) i et reaktionsvolumen pr. 40 μ l indeholdende
70 mM Trispuffer (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 1,5 mM spermin og 2,5 mM
dithiothreitol i 90 minutter ved 37°C. Det totale volumen blev der-
10 efter indstillet til 100 μ l med 25 mM EDTA, og en delprøve blev
fjernet til bestemmelse af specifik aktivitet ved TCA-præcipitering.
Den mærkede probe blev koncentreret under anvendelse af et va-
kuumapparat og blev oprenset ved elektroforese på en 18% poly-
acrylamidgel i Tris-borsyre-EDTA-puffer (TBE-puffer) (89 mM Tris,
15 89 mM borsyre, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) i 500 v·timer. Efter lokali-
seing ved autoradiografi blev den del af gelen, som indeholdt den
mærkede prøve, udskåret, knust og elueret i 0,2 ml TE-puffer nat-
ten over ved 4°C. TCA-præcipitation af reaktionsproduktet indi-
kerede, at den specifikke aktivitet var 2 Ci/mmol, og slutkoncentra-
20 tionen var 20 pmol/ml.

IV. Hybridisering/fordøjelse af amplificeret genomisk DNA med probe og BstNI.

10 μ l amplificeret DNA (indeholdende præamplifikationsækvivalen-
25 tet af 71 ng genomisk DNA) blev overført til et 1,5 ml Microfugerør
og 20 μ l TE-puffer til et slutvolumen på 30 μ l. Prøven blev denature-
ret ved 95°C i 10 minutter. 10 μ l 0,6 M NaCl indeholdende 0,02 pmol
SK03-probe blev tilsat til røret, blandingen blev forsigtigt omblan-
det, overlagt med en mineralolie og straks overført til en 56°C
30 varmeblok i 1 time. 10 mikroliter 50 mM MgCl₂ og 1 μ l BstNI (10
enheder) blev tilsat, og det genannealede DNA blev fordøjet i 30
minutter ved 56°C. Reaktionen blev stoppet ved at tilsætte 4 μ l
75 mM EDTA og 6 μ l sporingsfarve til et slutvolumen på 60 μ l.

35 Mineralolien blev ekstraheret med 0,2 ml chloroform, og 13 μ l af
reaktionsblandingen (ca. 15 ng genomisk DNA) blev sat på en 30%
polyacrylamidminigel i et elektroforeseapparat. Gelen blev under-
kastet elektroforese ved ca. 300 volt i 1 time, indtil bromphenolblå-
farvefronten var vandret til 3,0 cm fra påsætningsstedet. De øverste
1,5 cm af gelen blev fjernet, og resten af gelen blev eksponeret
mindst natten over med 2 forstærkningsskærme ved -70°C.

V. Diskussion af resultater.

Autoradiogrammet viste, at AIDS-DNA-sekvensen kun var til stede i prøve 368 ·H, hvilket senere fandtes at være det eneste HTLV-III positive DNA. De andre 10 prøver var som følger: (a) 194BK = DNA fra leukæmipatient (intet virus isoleret), (b) 342 = HTLV-I, (c) 367 = HTLV-I, (d) 361 = HTLV-I, (e) 207 = patient med aggressiv leukæmi (hud involveret), (f) 307 = HTLV-I-prototype cellelinie (højeste viral DNA indtil dato), (g) 308B = HTLV-I, (h) 323 = HTLV-II, (i) 326 = HTLV-I og (j) 340 = patient med aggressiv leukæmi (forskellig fra (e)).

De anvendte primere var således i stand til at amplificere DNA'et og gøre det muligt at proben nøjagtigt detekterer sekvensen. De andre prøver forblev negative selv med yderligere 10 amplifikationscyklusser. Amplifikation i nærværelse af 10 % DMSO (formindsker dannelse af sekundær struktur) ved 37°C indikerede også, at HTLV-III prøven var den eneste positive prøve.

Eksempel 2

I dette eksempel anvendtes den samme fremgangsmåde som i eksempel 1 med undtagelse af, at de anvendte primere, betegnet SK24 og SK18, var som følger:

5'-ATCCCAGTAGGAGAA-3' (SK24)

5'-TTATGTCCAGAATGC-3' (SK18)

25

Et alternativ til SK24 var primeren SK25 med følgende sekvens:

5'-ATAATCCACCTATCCCAG-3' (SK25)

Den anvendte probe, SK19, havde sekvensen:

30 5'-*ATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTAC-3'
 hvor * indikerer mærkningen. Proben blev mærket som beskrevet i afsnit III. SK24 og SK18 blev udvalgt for at tilvejebringe amplifikation af et hydrofilt område af gag fra nukleotider 1552 til 1642 af HTLV-III. SK25 og SK18 blev udvalgt for at tilvejebringe amplifikation af et hydrofilt område af gag fra nukleotider 1541 til 1642 af HTLV-III. Når SK19 anneales til det amplificerede DNA genskabes et genkendelsessted for BstNI. Fordøjelse med dette enzym frigør en 4-mer.

Autoradiogrammet for hybridisering og restriktion ved 53°C viste som positiv kun den i eksempel 1 fundne HTLV-III-prøve. Et baggrundsbånd, som var synlig i alle prøver, forsvandt, når temperaturen for hybridisering og restriktion blev hævet fra 53°C til 60°C. Den forøgede temperatur formodes at have formindsket ikke-specifik hybridisering af proben.

Eksempel 3

Et 180 bp langt DNA-fragment, som koder for et hydrofilt område af gag (nukleotider 1470-1649 af HTLV-III-isolat BH10) med 186 basepar inklusiv BamHI-ender, blev konstrueret ved først at ligere 10 overlappende oligomerer under anvendelse af T4-DNA-ligase. Oligomererne er vist på figur 2. Det fremkomne fragment blev derefter klonet i genkendelsesstedet for BamHI i M13mp10w, som er kommercielt tilgængeligt. Ingen af de sekventerede kloner havde den nøjagtige ønskede sekvens. Ved imidlertid at anvende to kloner vist på figur 3 (hvor X betegner en mutation i genet) blev der konstrueret en klon med den korrekte sekvens ved at erstatte SpeI/BstXI-fragmentet i klon M13mp10W:C7 med SpeI/BstXI-fragmentet i klon M13mp10W:D6. DNA fra M13mp10W:C7 blev fordøjet med SpeI og BstXI, blev behandlet med alkalisk phosphatase, og det store vektorholdige fragment blev oprenset fra en agarosegel. SpeI/BstXI-DNA-fragmentet fra klon M13mp10W:D6 blev oprenset fra en polyacrylamidgel efter dobbeltfordøjelse med de samme enzymer. De oprensede fragmenter fra M13mp10W:C7 og M13mp10W:D6 blev ligeret og transformeret i E.coli stamme DG98, som er tilgængelig fra American Type Culture Collection. Den fremkomne klon, betegnet M-13-GAG, indeholder den korrekte sekvens og det blev deponeret hos ATCC 8. januar, 1986, med ATCC nr. 40.218.

Denne M-13-GAG kan anvendes til at konstruere en "åben cirkel" probe som ovenfor beskrevet til at evaluere en amplificeret prøve i et dot blot format uden isotoper.

Det amplificerede produkt kan fremstilles ud fra to primere, SK23 og SK28, som omgiver hele 180 meren i M-13-GAG og har følgende sekvens:

5'-ATGAGAGAACCAAGG-3' (SK23)

5'-CCTTGTCTTATGTCCAG-3' (SK28).

Disse primere, som blev udvalgt til at amplificere mellem nukleotider

1468 og 1649, var allerede blevet afprøvet med probe SK19 og fandtes at detektere HTLV-III prøven på vellykket måde.

Eksempel 4

5 71 kodede prøver, hvorfra DNA'et var blevet ekstraheret af dr. Poiesz under anvendelse af den i eksempel 2 beskrevne metode, blev initielt analyseret ved deres DNA under anvendelse af primerparret SK01 og SK02 fra eksempel 1 eller SK17 og SK18, hvor SK18 er angivet i eksempel 2 og SK17 har sekvensen:

10 5'-CCAGTAGGAGAAAT-3'

15 som udvælges til at amplificere det hydrofile område af gag fra nukleotider 1555 til 1642 af HTLV-III. Amplifikationen under anvendelse af primerparret SK17 og SK18 blev udført i nærværelse af 10 vægt% DMSO ved 37°C, men ellers ifølge den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde. Efter amplifikation blev fremgangsmåden ifølge eksempel 1 anvendt til at påvise DNA'et under anvendelse af proben SK03 (fra eksempel 1) eller SK19 (fra eksempel 2). Nogle af de flertydige prøver blev yderligere analyseret under anvendelse af primerparret SK24 og SK18 fra eksempel 2 og under anvendelse af proben SK19 ved stuetemperatur.

20 Resultaterne viste, at alle prøver, som blev identificeret som positive ved prøven her, var DNA'er isoleret fra AIDS- eller ARC-patienter, inklusiv et HTLV-III-isolat, et LAV-isolat og et AIDS-associeret virus (AAV) identificeret af dr. Poiesz. Ydermere blev en 25 antistofpositiv, revers transkriptase-negativ, sund homoseksuel, som havde mange kontakter med AIDS-ofre, også identificeret som positiv med begge sæt primerpar. SK17-SK18- og SK24-SK18-primerparrene syntes at påvise flere positive end SK01-SK02-primerparret.

30 Ingen af de negative kontrolprøver (normale T-celler, ikke-inficerede cellelinier eller HTLV-II) viste positivitet i analyserne her. Undersøgelsen her identificerede 10 inficerede prøver som positive, som var negative med revers transkriptase. På den anden side var 5 prøver, som var revers transkriptasepositive (3 ud af de 5 var ±) negative ved undersøgelsen her. Alle 71 prøver viste sig at være 35 ELISA-positive, hvilket viser, at ELISA ikke er en meget diskriminativ eller specifik undersøgelse for AIDS-viruset.

De ovennævnte eksempler viser, at AIDS-virus-DNA-sekvenser kan identificeres i cellelinier inficeret med blod, mononukleære sædceller og sædsupernatanter fra patienter med AIDS eller ARC.

Eksempel 5

5 Dette eksempel viser, at den foreliggende metode kan anvendes direkte til at identificere AIDS-virus-DNA-sekvenser i perifere mononukleære celler fra frisk blod uden at det er nødvendigt at dyrke viruset først.

10 Kodede blodprøver fra AIDS-patienter blev behandlet på følgende måde af dr. Poiesz. De blev først centrifugeret under anvendelse af centrifugering ved lav hastighed (ca. 3000 x g) for at pelletere alle cellerne, hvorved der opnåedes "buffy coats". Disse "buffy coats" blev ført gennem en Ficoll-Hypaque densitetssøjle, og leukocytterne blev opsamlet fra søjlen. DNA'et blev ekstraheret fra leukocytterne ved den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde.

15 DNA'et blev amplificeret under anvendelse af primerparrene SK17 og SK18 beskrevet i eksemplerne 2 henholdsvis 4 i nærværelse af 10 vægt% DMSO ved 37°C under anvendelse af den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde med 1 enhed, 2 enheder og 4 enheder Klenow-fragment. Efter amplifikation var de anvendte prøber, idet fremgangsmåden fra eksempel 1 blev anvendt, enten SK03 (fra eksempel 1) eller SK19 (fra eksempel 2). Nogle af de flertydige prøver blev yderligere analyseret under anvendelse af primerparret SK24 og SK18 fra eksempel 2 og proben SK19 ved stuetemperatur.

20 Resultaterne efter eksponering natten over viste, at DNA'erne isoleret fra nogle af AIDS- eller ARC-patienterne blev identificeret som positive.

25 Forsøget blev gentaget under anvendelse af primerparret SK23 og SK28 (beskrevet i eksempel 3) og proben SK19 (eksempel 2). Forsøget blev igen gentaget under anvendelse af primerparret SK32 og SK33 med følgende sekvenser:

5'-ACCTGCCACCTGTAGTAG-3' (SK32)

30 5'-GCCATATTCCTGGACTACAG-3' (SK33)

under anvendelse af proben SK34 med sekvensen:

5'-TAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAGAAGCC-3'
(SK34)

35 Restriktionsenzymet PvuII blev anvendt til at spalte restriktionsstedet i SK34.

Resultaterne fra begge forsøg viste efter en 6-dages eksponeringsperiode, at DNA'erne isoleret fra nogle af AIDS- eller ARC-patienterne blev identificeret som positive.

Eksempel 6

De ønskede sekvenser, som skulle amplificeres, fandtes i en skovmurmeldyr-hepatitis viral, molekylær klon fra Chuck Rogler fra Albert Einstein College of Medicine og en human hepatitis B klon af
 5 adw₂-subtypen med indføjelser pHBV1 i pBR322 opnået fra Stanford University og beskrevet af Sninsky et al., Nature, 279:346-348 (1979).

De sekvenser, der skulle amplificeres, primerne og proberne blev identificeret ved det ovenfor beskrevne prikmatrixprogram,
 10 hvor sekvensvinduet blev udvalgt mindst 20 basepar langt, således at sekvenserne blev udvalgt inden for de bevarede områder af hepadnaviraerne. Områder med 20 sammenhængende baser med homologi blev lokaliseret efter parvise sammenligninger af de sekventerede virale genomer og varianter heraf.

15

I. Syntese af primere.

Følgende to oligodeoxyribonukleotidprimere, betegnet MD03 henholdsvis MD06, blev fremstillet ved den i eksempel 1, afsnit I, beskrevne fremgangsmåde:

20

5'-CTCAAGCTTCATCATCCATATA-3' (MD03)

5'-CTTGGATCCTATGGGAGTGG-3' (MD06)

Disse primere blev udvalgt fra polymerasegenet i hepadnaviraerne.

25

II. Amplifikationsreaktion.

10 pmol af hvert plasmid blev tilsat til 100 µl puffer bestående af 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM natriumchlorid og 10 mM magnesiumchlorid og indeholdende 100 pmol Primer MD03, 100 pmol Primer MD06, 10 vægt% DMSO og 150 nmol af hver af dATP, dCTP, dGTP og
 30 TTP.

Behandlingen af den fremkomne opløsning blev udført som beskrevet i eksempel 1, afsnit II, under anvendelse af 25 cyklusser med undtagelse af, at der blev anvendt 37°C i stedet for stuetemperatur.

35

III. Syntese og phosphorylering af probe.

En mærket DNA-probe, MD09, med sekvensen:

5'-*GGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTG-TTC-3'

hvor * angiver mærkningen, blev syntetiseret ifølge de i eksempel 1, afsnit I, beskrevne fremgangsmåder. Proben blev mærket som beskrevet i eksempel I, afsnit III.

5 IV. Hybridisering/Fordøjelse med probe.

Fremgangsmåden fra eksempel 1, afsnit IV, blev fulgt for hybridisering og fordøjelse med undtagelse af, at der blev anvendt Ddel som restriktionsenzym til spaltning af proben.

10 V. Resultater

Autoradiogrammet viste, at der frembringes signaler under anvendelse af de foreliggende primere til sammenligning med en kontrol (SC-1, som blev deponeret hos ATCC 19.marts 1985 og en EBV-transformeret B-cellelinie, som er homozygot for seglcelleallelet uden hepatitisgenom), hvor amplifikation ikke fandt sted. Amplifikation af hepadnavira er derfor mulig under anvendelse af den foreliggende fremgangsmåde.

Resultaterne var de samme, når ovennævnte forsøg blev udført med primerne MD14 og MD13 i stedet for MD06 og MD03:

20 5'-GCGGGATCCCATCTTCTTATTGGTTCTTCTGG-3' (MD14) og
5'-GCCAAGCTTGTTAGGGTTTAAATGTATACCC-3' (MD13).

Disse primere blev udvalgt fra hylstergenet i hepadnavira.

25 Følgende deponering blev foretaget på den angivne dato:

<u>Stamme</u>	<u>Deponeringsdato</u>	<u>ATCC Nr.</u>
M13-GAG	8.januar 1986	40.218

30 Denne deponering blev foretaget under betingelserne ifølge Budapesttraktaten vedrørende international anerkendelse af deponering af mikroorganismer med henblik på patentbeskyttelse og regulativerne herunder (Budapesttraktaten).

35

Patentkrav

1. Fremgangsmåde til detektering eller undersøgelse af tilstedeværelse eller fravær af en nukleinsyresekvens, som i det væsentlige er bevaret blandt
5 isolater af et virus, og som er specifikke for nukleinsyrerne i viruset, hvilken nukleinsyresekvens formodes at være til stede i en prøve, k e n d e t e g n e t ved

(a) at prøven, uden at viruset først er blevet dyrket i prøven, samtidigt eller separat og under hybridiseringsbetingelser behandles med en
10 oligonukleotidprimer for hver nukleinsyresekvensstreng, 4 forskellige nukleosidtriphosphater og et polymerisationsmiddel, således at der for hver nukleinsyresekvensstreng syntetiseres et forlængelsesprodukt af hver primer, som i det væsentlige er komplementær til hver streng i den nukleinsyresekvens, som skal detekteres eller undersøges, således at
15 forlængelsesproduktet syntetiseret fra én primer, kan, når det er separeret fra dets komplement, tjene som en template for syntese af forlængelsesproduktet af den anden primer,

(b) at prøven behandles under denaturerende betingelser for at separere primerforlængelsesprodukterne fra deres templater, hvis den sekvens, der
20 skal detekteres, er til stede,

(c) at produktet fra trin (b) behandles med oligonukleotidprimere, således at der syntetiseres et primerforlængelsesprodukt under anvendelse af hver af enkeltstrengene frembragt i trin (b) som en template, hvilket resulterer i
amplifikation af den sekvens, som skal detekteres, hvis den er tilstede, og

25 (d) at det bestemmes, om den sekvens, der skal detekteres, er tilstede i prøven.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at trin (d) består af trinnene:

(1) at der til produktet fra trin (c) tilsættes en mærket probe, som er i
30 stand til at hybridisere med den amplificerede nukleinsyresekvens, og

(2) at det bestemmes, om proben har hybridiseret til en amplifieret sekvens i nukleinsyreprøven.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at
35 viruset er AIDS-vira, hepadnavira eller herpes virus.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at trinnene (b) og (c) gentages mindst én gang, og at primerne udvælges fra gag-området i AIDS-genomet eller fra polymerase- eller hylstergenerne i hepadnaviraerne.

5 5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, k e n- d e t e g n e t ved, at nukleinsyren er DNA.

6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, k e n- d e t e g n e t ved, at nukleinsyren er RNA.

10 7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-6, k e n- d e t e g n e t ved, at polymerisationsmidlet er et enzym udvalgt fra gruppen bestående af E.coli DNA-polymerase I, Klenowfragment af E.coli DNA polymerase I, revers transkriptase eller et enzym, som efter at det er blevet udsat for en temperatur, der er tilstrækkelig til at denaturere nukleinsyre, bevarer sin enzymatiske aktivitet til frembringelse af forlængelsesprodukterne ved reaktionstemperaturen i trinnene (a) og
15 (c).

8. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at trin (2) består af trinnene:

20 (1) at den hybridiserede blanding fra trin (d) fordøjes med et restriktionsenzym, der genkender et sted i sekvenserne i proben, og

(2) at det detekteres om restriktionsfordøjelsen indeholder et restriktionsfragment, der korrelerer med tilstedeværelse af den virussekvens, der skal påvises.

25 9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at viruset er AIDS-vira, og at der i trinnene (1) og (2) anvendes en positiv kontrol, som indeholder en eller flere nukleinsyrer med en sekvens fra AIDS-virusgenomet og/eller en negativ kontrol, som ikke indeholder nogen som helst nukleinsyre (nukleinsyrer) med en sekvens fra AIDS-isolaterne.

30 10. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at trinnet (1) består af trinnene:

(1) at produktet fra trin (c) afsættes som en plet på en membran, og

(2) at proben tilsættes til den med pletter forsynede membran.

35 11. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at trin (1) består af trinnene:

(1) at proben afsættes som en plet på en membran, og

(2) at produktet fra trin (c) tilsættes til den med pletter forsynede membran.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved at virus er et latent virus.

13. Sammensætning indeholdende en amplifieret nukleinsyresekvens, som i det væsentlige er bevaret blandt isolaterne af et virus, og som er specifikt for nukleinsyren i et virus, k e n d e t e g n e t ved, at den frembringes ved:

(a) at en prøve, som indeholder nukleinsyresekvensen i ikke-amplificeret form, samtidigt eller separat og under hybridiseringsbetingelser er behandlet med en oligonukleotidprimer for hver nukleinsyresekvensstreng, 4 forskellige nukleosidtriphosfater og et polymerisationsmiddel, således at der for hver nukleinsyresekvensstreng er syntetiseret et forlængelsesprodukt af hver primer, som i det væsentlige er komplementær til hver streng i den nukleinsyresekvens, som skal detekteres eller undersøges, således at forlængelsesproduktet syntetiseret fra én primer, kan, når det er separeret fra dets komplement, tjene som en template for syntese af forlængelsesproduktet af den anden primer,

(b) at primerforlængelsesprodukterne er separeret fra de templates, på hvilke de er syntetiseret, til frembringelse af enkeltstregede molekyler, og

(c) at produktet fra trin (b) er behandlet med oligonukleotidprimere, således at der er syntetiseret et primerforlængelsesprodukt. under anvendelse af hver af de i trin (b) frembragte enkeltstrengene som en template, hvilket har resulteret i amplifikation af nukleinsyresekvensen.

14. Sammensætning ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at viruset er AIDS-vira eller hepadnavira.

15. Kit til detektering eller undersøgelse af tilstedeværelse eller fravær af en nukleinsyresekvens, som i det væsentlige er bevaret blandt nukleinsyrerne i et virus, og som er specifik for nukleinsyrerne i et virus, og hvilken nukleinsyresekvens formodes at være til stede i en prøve, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter:

(a) en oligonukleotidprimer for hver streng af den nukleinsyresekvens, der skal detekteres, hvilken primer eller hvilke primere i det væsentlige er komplementære til hver streng af den specifikke nukleinsyresekvens, således at et forlængelsesprodukt syntetiseret fra én primer kan, når det er separeret fra dets komplement, tjene som en template for syntesen af forlængelsesproduktet af den anden primer, og

(b) en mærket probe, som er i stand til at hybridisere med nukleinsyresekvensen.

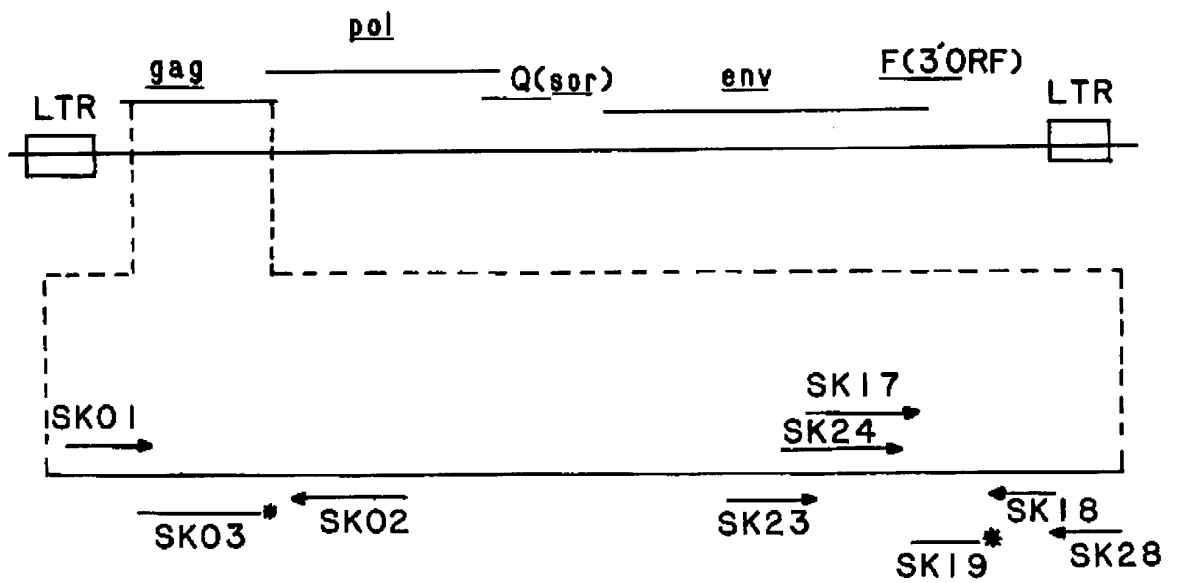
16. Kit ifølge krav 15, k e n d e t e g n e t ved, at viruset er AIDS-vira eller hepadnavira.

5 17. Kit ifølge krav 15 eller 16, k e n d e t e g n e t ved, at det yderligere indeholder et polymerisationsmiddel, hver af de 4 forskellige nukleosidtriphosphater og et middel til påvisning af hybrider mellem proben og sekvensen.

10 18. Kit ifølge et hvilket som helst af kravene 15 - 17, k e n d e t e g n e t ved, at viruset er AIDS-virus, og at kittet yderligere omfatter en positiv kontrol, som indeholder en eller flere nukleinsyrer med en sekvens fra AIDS-virusgenomet og/eller en negativ kontrol, som ikke indeholder nogen som helst nukleinsyre (nukleinsyrer) med en sekvens blandt AIDS-vira, samt et restriktionsenzym, som er i stand til at spalte en nukleinsyre, der indeholder den mistænkte sekvens, ved et specifikt restriktionssted i en sekvens i proben.

15

FIG. 1



* = Mærke

FIG. 2

SK07
 5' GATCCGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACTACTAGTACC
 GCTCTCTTGGTTCCCTTCACTGTATCGTCCTTGATGATCATGG
 SK16

SK08
 CTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACAAATAATCCACCTATCCCAGT
 GAAGTCCTTGTTTATCCTACCTACTGTTTATTAGGTGGATAGGGTCA
 SK15

SK09
 AGGAGAAATCTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAATAAAAATA
 TCCTCTTTAGATATTTTCTACCTATTAGGACCCTAATTTATTTTAT
 SK14

SK10 SK11
 GTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGG 3'
 CATTCTTACATATCGGGATGGTCGTAAGACCTGTATTCTGTTCCCCTAG
 SK13 SK12

FIG. 3

