

03081

8

2cj



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UACPyP del CCH

DESARROLLO DE SONDAS DE RNA
RECOMBINANTE AMPLIFICABLES Y SU USO
EN ENSAYOS MODELO DE HIBRIDACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

M en I.B.B. HILDA MARIA LOMELI BUYOLI

CUERNAVACA

MEXICO, 1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	
OBJETIVO	- 1
INTRODUCCION	- 2
I. Sondas Moleculares	- 2
A) Generalidades	- 2
B) Propiedades	- 3
1. Afinidad y Especificidad	- 3
2. Sensibilidad	- 4
C) Sondas moleculares en el diagnóstico de agentes infecciosos	- 6
II. Amplificación de RNAs con la replicasa de Q-beta	- 7
A) La replicasa de Q-beta	- 8
B) Los templados de la replicasa de Q-beta	- 9
C) RNAs recombinantes	- 10
1. Vector pT7MDV-poly	- 11
2. RNAs recombinantes de <i>P.falciparum</i>	- 11
III. Retrovirus HIV-1	- 12
A) Detección del retrovirus HIV-1	- 13
B) Descripción molecular de HIV-1	- 14

RESULTADOS	- 16
A) Diseño de sondas	- 16
B) Construcción de RNAs heterólogo	- 16
C) Propiedades replicativas	- 17
D) Propiedades de la sonda HIV20	- 19
DISCUSION	- 21
BIBLIOGRAFIA	- 29

RESUMEN

Una estrategia que nos ha parecido atractiva para la detección de blancos que no son abundantes, ha sido el incluir detectores en moléculas replicables que pueden ser exponencialmente amplificadas después de un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos. Para demostrar la viabilidad de esta idea, construimos RNAs recombinantes que contienen insertos con secuencias detectoras presentes en P. falciparum y demostramos que estos RNAs pueden hibridar con un blanco del parásito e, igualmente ser replicados en forma exponencial con la replicasa del fago Q β . La replicasa del fago Q β reconoce templados de RNA en forma extremadamente específica y puede iniciar una reacción de replicación a partir de una sola molécula. Otro templado natural para la replicasa de Q β es el MDV-1 que consiste de 221 bases nucleotídicas.

La construcción de RNAs recombinantes se hizo posible por la disponibilidad de un plásmido que contiene la secuencia de cDNA de MDV-1, que sirve como templado para la síntesis del RNA de esta molécula cuando se incuba in vitro con la RNA polimerasa de T7. La inserción de secuencias detectoras dentro del plásmido descrito, llamado pT7MDV, dentro de la secuencia de MDV-1 crea templados que pueden ser usados para la síntesis de sondas de RNA replicables.

Nos hemos interesado posteriormente en la potencialidad de los RNAs recombinantes amplificables, para desarrollar un ensayo sensible que sea útil en la detección de retrovirus patógenos tales como el HIV-1, el cual presenta una infección con características tales que hacen importante la detección de sus genes o mensajeros. Para este fin, construimos 8 RNAs recombinantes que contienen diversas secuencias detectoras complementarias a una región conservada del gene pol del mRNA del virus HIV-1. Estos RNAs fueron estudiados en cuanto a sus propiedades replicativas utilizando la replicasa de Q β . Varios de ellos mostraron ser buenas moléculas replicantes con propiedades cinéticas similares a las de MDV-1, algunas otros mostraron

propiedades deletogénicas y otros no replicaron. Con base en los resultados obtenidos de este estudio, hicimos un análisis comparativo de los distintos RNAs recombinantes, con la ayuda de programas de computadora, con el fin de encontrar las características que son determinantes en la replicabilidad. Con los enfoques utilizados no pudimos elucidar tales características.

De entre los RNAs recombinantes obtenidos, elegimos aquel que pudo ser replicado con mayor eficiencia para usarlo como sonda en un ensayo de detección. Este RNA se denominó HIV20. Utilizando HIV20 llevamos a cabo un ensayo de hibridación en solución: Se prepararon muestras conteniendo diferentes cantidades de blanco (RNA de HIV-1) en forma de dilución seriada. Las concentraciones que se incluyeron fluctuaron entre 10^7 y 10^9 .

Una vez que se hubieron formado los complejos híbridos blanco-sonda, éstos pudieron separarse de la sonda no hibridada mediante el uso de partículas paramagnéticas unidas covalentemente a una sonda de captura, la cual es capaz de formar un híbrido débil con otra región del blanco. Posteriormente la sonda unida al blanco fue separada de este y amplificada por incubación con la replicasa de Q β . La cantidad de RNA sintetizado en cada reacción fue suficiente para ser medido sin el uso de radioisótopos. Un análisis cinético demostró que el número de blancos (moléculas) que estaban originalmente presentes en cada muestra, podían ser estimados a partir del tiempo que transcurrió para que una determinada cantidad de RNA pudiera sintetizarse. Hemos estimado que el límite de sensibilidad logrado corresponde a 10,000 moléculas de blanco.

Los resultados descritos sugieren que las sondas de hibridación replicables harán posible el desarrollo de ensayos clínicos simples, exactos, sensibles y automatizables.

OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo consiste en buscar una forma de acopiar la extraordinaria amplificación de RNA por la replicasa de $\phi\beta$ a bioensayos de detección altamente específicos, tales como la hibridación de ácidos nucleicos. La finalidad que se persigue con ello es la de incrementar cualitativamente la sensibilidad de este tipo de ensayos. Concretamente se desea la construcción de sondas que una vez unidas a su blanco, generen una señal en forma de RNA replicable que pueda amplificarse de manera exponencial.

Aunque se han considerado varios esquemas para este fin, este trabajo contempla específicamente los siguientes objetivos particulares:

- Construir moléculas de RNA recombinante que sean bifuncionales, ya que por una parte serán sondas de hibridación y por otra parte serán templados susceptibles de replicación con la replicasa del fago $\phi\beta$.
- Demostrar la viabilidad de utilizar sondas de hibridación replicables para detectar pequeñas cantidades de un mRNA de HIV-1.

Cabe mencionar que las moléculas heterólogas de RNA pueden ser un modelo interesante para el estudio de las interacciones de la replicasa con sus templados. Particularmente en cuanto al estudio de los aspectos de estructura secundaria y terciaria del RNA como requisitos para el reconocimiento por la enzima. Si bien este no es un objetivo planteado para el presente trabajo, necesariamente se hará un análisis de las propiedades replicativas de algunas recombinantes. El resultado de este análisis podría ser útil para correlacionar las propiedades replicativas de cada molécula con su correspondiente estructura secundaria predicha en forma teórica, utilizando programas de computación. Posiblemente este enfoque nos permita obtener conclusiones en relación a los aspectos mencionados.

INTRODUCCION

I SONDAS MOLECULARES

A) Generalidades

En la biología molecular se presentan muchas situaciones en las cuales hay la necesidad de determinar la presencia o ausencia de una molécula específica entre una gran cantidad de moléculas no relacionadas. Para este fin las sondas de ácidos nucleicos han tenido un papel esencial. Un sonda de DNA (o RNA) sirve en términos generales para demostrar la presencia de una secuencia homóloga en una muestra dada conteniendo otros ácidos nucleicos. Posteriormente a los reportes de Gillespie y Spiegelman (Gillespie et al, 1965) y al de Southern (Southern et al, 1975), el uso de sondas se ha extendido para diversos propósitos hacia todas las ramas de la biología. El uso más generalizado de las sondas de DNA en la experimentación básica ha sido en la detección y aislamiento de secuencias genómicas y seguimiento de RNAs mensajeros. Se han usado también para estudios de clasificación taxonómica, para estudios de evolución molecular, mapeo de genes, mutagenesis, etc; y han tenido aplicaciones biotecnológicas en el área de genética humana y estudios epidemiológicos en parasitología y microbiología.

Un ensayo de hibridación, tal como lo reportaron primeramente Gillespie y Spiegelman involucra los siguientes pasos: a) fijación del DNA de una muestra, previamente separadas sus cadenas, en una membrana de nitrocelulosa; b) introducción de una secuencia probadora o sonda, que es específicamente afín a una secuencia única presente en el material usado como muestra. Esta secuencia única es denominada blanco. La afinidad específica que la sonda presenta por el blanco es debida a que las secuencias blanco y sonda son complementarias; c) incubación para permitir la hibridación de la sonda con el blanco; d) separación de las moléculas de sonda no hibridadas a través de técnicas de lavado y; e) detección de la sonda unida al blanco mediante el uso de diversas técnicas de generación de señales, las cuales

influyen de una manera importante en la sensibilidad del ensayo. Algunas de estas técnicas se describen mas adelante.

B) Propiedades

1. Afinidad y Especificidad

Es evidente que el éxito de las sondas de ácidos nucleicos depende de su alta afinidad por su blanco, de su gran especificidad, la cual además puede controlarse por medio de criterios de astringencia y de la facilidad con la que pueden prepararse sondas únicas utilizando métodos recombinantes o de síntesis química.

La afinidad y especificidad de formación de una doble hélice por dos cadenas de DNA son superiores a las de cualquier otro tipo de complejo formado por la asociación de moléculas biológicas (Lerman, 1986). La alta afinidad de formación de un híbrido causa una unión estable que persiste aun en un medio en el cual hay muy baja concentración de sonda. Un híbrido de ácidos nucleicos tiene una afinidad, que expresada como constante de disociación, resulta mayor que la de las otras uniones no covalentes que se han caracterizado. Si bien no se han hecho estimaciones experimentales de las constantes de disociación de cadenas de DNA para moléculas con las características de una sonda molecular típica, a través de cálculos teóricos se ha determinado que bajo las condiciones de temperatura y concentración de sal de un experimento de hibridación, los valores de disociación son cercanos a 10^{-23} M a 5 C por debajo de la T.M. de una molécula de 272 pares de bases (un fragmento de la β -globina humana). Este valor es mucho mayor que el del rango de reacciones típicas antígeno anticuerpo (10^{-5} a 10^{-9} M) y es mayor que el de las mas altas afinidades que se han reportado para interacciones específicas de proteínas, p. ej. para la asociación de biotina-avidina (10^{-15} M), la unión del represor de lambda al operador O_R (3×10^{-9} M) (Fischer et al, 1980).

Una propiedad aun mas atractiva de los probadores de DNA y RNA es su alta especificidad, particularmente cuando se piensa en su uso para diagnóstico clínico, en donde un alto nivel discriminatorio es requerido. Ademas las sondas moleculares ofrecen tambien la interesante posibilidad de ajustar la especificidad para satisfacer las necesidades particulares de un experimento. Cálculos teóricos para el fragmento de β -globina sugieren que la constante de disociación de las dos cadenas se incrementa aproximadamente 40 veces para cada base distinta en una secuencia de 272 p.b.. De acuerdo a esto, se esperaría para 10 bases diferentes un incremento en la constante de disociación hasta 10^{-7} M. Lo anterior descarta totalmente la posibilidad de que a un criterio estricto, dos cadenas que difieran en esa magnitud puedan hibridar (Fischer et al, 1980).

2. Sensibilidad

La sensibilidad de un ensayo de hibridación depende de un grupo indicador que es incorporado a la sonda. El indicador que mas se utiliza en el laboratorio es el fosfato radioactivo, el cual se introduce a la molécula sonda mediante alguna reacción bioquímica in vitro. Este método de detección ofrece un límite de sensibilidad que permite la detección de 200,000 blancos.

Por la conveniencia de utilizar métodos no radioactivos, se ha implementado también el uso de enzimas o de moléculas orgánicas fluorescentes. En estos esquemas de detección no radioactivos se ha logrado incrementar la sensibilidad por medio de la incorporación de un grupo de biotina en el probador (Larger et al, 1981). Una vez que el probador se ha unido al blanco, una enzima es unida via la interacción biotina-avidina (Leary et al, 1983). Este procedimiento permite la acumulación de un gran número de moléculas de producto para cada complejo enzima-probador. Las enzimas que se utilizan en este tipo de detección son la fosfatasa y la peroxidasa, ya que existen ensayos colorimétricos sensibles para su detección. Los límites de

detección en los esquemas que emplean amplificación lineal es del orden de 1,000,000 de moléculas de blanco.

Se han concebido también sistemas de generación de señal basados en amplificación exponencial. Este concepto significaría un aumento cualitativo de la sensibilidad. Un enfoque de este tipo que ya se utiliza, consiste en hacer copias del blanco utilizando un sistema de amplificación in vitro llamado "polymerase chain reaction" (PCR). Esta técnica fué reportada por Saiki et al (Saiki et al, 1985. Erlich et al, 1988. Saiki et al, 1988) y consiste en utilizar dos sondas que son complementarias solo a los extremos de la secuencia blanco, pero que a través de un proceso enzimático, sirven como primero para la replicación de todo el blanco. Cada vez que se repite el proceso se obtiene una duplicación del número de secuencias blanco, hasta que se genera un número alto, superior a un millón de copias. Tal cantidad de moléculas puede detectarse utilizando sondas marcadas radioactivamente. Este método es muy sensible, sin embargo presenta el inconveniente de que en ocasiones se generan señales falsas positivas, es decir se replican segmentos que no son copias verdaderas del blanco. Otra limitación de este procedimiento es que requiere al menos dos sondas de ácidos nucleicos e involucra tres pasos para cada ciclo, lo cual no es muy práctico.

Otro sistema de amplificación exponencial de señal que podría ser superior, ya que sería más directo, es el de amplificar la sonda. Una forma de hacer esto es unir la sonda a un RNA, el cual a su vez puede ser copiado en forma exponencial por una RNA polimerasa RNA-dirigida. Una polimerasa de este tipo es la replicasa del bacteriófago Q β , la cual puede utilizarse in vitro para sintetizar grandes cantidades del RNA que se utilice como templado, en poco tiempo. Las características de esta polimerasa y los templados se reconocen se describen en la sección II en donde se mencionan las ventajas que presenta esta técnica de amplificación.

C) Sondas moleculares en el diagnóstico de agentes infecciosos.

El uso de probadores de DNA para el diagnóstico de agentes infecciosos, se basa en la premisa de que en todo organismo existe información que es única de la especie y que sirve para diferenciarlo de organismos muy relacionados. Convenientemente para este tipo de ensayos, las secuencias que mas rápidamente evolucionan en los organismos eucariotas frecuentemente son de DNA repetitivo o satélite. Es decir, es muy común que las secuencias que se utilizan para identificar especies, se encuentren ademas altamente repetidas en el organismo y por lo tanto, hagan posible el desarrollo de ensayos sensibles.

Por las propiedades ya antes discutidas de las sondas moleculares, los ensayos de detección de agentes infecciosos por hibridación, tienen la precisión que frecuentemente constituye un problema cuando se utilizan métodos convencionales (p.ej visualización al microscopio). Ademas hay que destacar que los sondas moleculares constituyen un método de detección directa. En la tabla 1 se presenta una síntesis de las ventajas que tiene el uso de sondas moleculares para ensayos diagnósticos en comparación con otro método actual de detección directa, como es el uso de anticuerpos monoclonales.

Hasta ahora se ha reportado el aislamiento de varias secuencias repetitivas especie específicas y su uso para la identificación de un parásito. Ejemplos típicos son el de detección de P. falciparum (Franzen et al, 1984), el de T. cruzi (Gonzalez et al, 1984), etc. Sin embargo en la actualidad, la utilización de estos ensayos esta restringido unicamente al laboratorio de investigación.

El uso futuro de sondas de DNA o RNA en el laboratorio clínico dependera de que se satisfagan dos condiciones esenciales, entre otras. Estas son: un formato práctico y un sistema de detección, que eventualmente permita prescindir del uso de radioactividad. Un formato práctico incluiría las siguientes características:

	SONDAS DE DNA o RNA	ANTICUERPOS MONOCLONALES
ESPECIFICIDAD	ABSOLUTA	VARIABLE
AFINIDAD	MUY ALTA	ALTA .
POTENCIALIDAD DE CUANTIFICACION DE ORGANISMOS	BUENA A EXCELENTE	POBRE
CAPACIDAD DE DETECCION DE 1-10 CELULAS BACTERIANAS	FACTIBLE	IMPOSIBLE
CAPACIDAD DE DESARROLLAR ENSAYOS NO ISOTOPICOS	EXCELENTE (EN DESARROLLO)	EXCELENTE (EN EL MERCADO)
POTENCIALIDAD DE PRODUCIR SONDAS CON ESPECIFICIDAD VARIABLE (AMPLIA O ESTRECHA)	ABSOLUTA	POBRE

TABLA 1 COMPARACION DEL USO DE SONDAS MOLECULARES Y ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA ENSAYOS DE DETECCION DIRECTA DE AGENTES INFECCIOSOS Y ENFERMEDADES GENETICAS.

- 1) Un proceso muy simple de preparación de la muestra tal que no involucre purificación del DNA ni inmovilización de la muestra.
- 2) Resultados obtenibles como valores numéricos con una distinción clara entre positivo y negativo
- 3) Resultados convertibles a número de agentes infecciosos
- 4) Reproducibilidad sin interferencia de las impurezas de la muestra

Un esquema que se ha desarrollado con estos objetivos en mente ha sido el de la hibridación en sandwich (Ranki et al, 1983), en el cual se utilizan dos regiones diferentes de la secuencia blanco. Una de estas regiones hibrida con la sonda de detección y la otra hibrida con una sonda llamada "de captura", que a su vez está unida a una fase sólida y de esta manera permite el aislamiento del complejo de hibridación. Dentro de este mismo contexto algunas entidades comerciales se han interesado en el desarrollo de "kits" que de una u otra forma logran algunas de las características arriba mencionadas. Para la elaboración de este trabajo se ha elegido un formato desarrollado por la compañía Gentrak Systems denominado "target cycling" (vease artículo). La combinación del procedimiento de Gentrak Systems y un sistema de detección que se basa en amplificación exponencial de señal, cuyas bases se describen mas adelante, nos ha permitido llevar a la práctica un ejemplo de un ensayo de detección con potencialidad de tener aplicación general.

II AMPLIFICACION DE RNAs CON LA REPLICASA de Q β .

Las ventajas que presenta la técnica de amplificación de RNA con la replicasa de Q β se pueden resumir de la siguiente manera :

- La replicasa de Q β es altamente específica para sus propios templados de RNA (Haruna et al, 1965a).
- Una sola molécula de RNA puede, en principio iniciar la reacción de replicación (Levishon et al, 1968).
- Debido a que las dos cadenas de RNA sirven como templado para la replicación, mientras haya un exceso de enzima la reacción

ocurre en forma exponencial y por lo tanto la síntesis de RNA es muy rápida (Haruna et al, 1965b).

- La cantidad de RNA sintetizada (típicamente, 200 ng en 50 ul en 15 min) es tan grande que puede ser medida con ayuda de técnicas colorimétricas simples (Haruna et al, 1965b).

Hasta el momento, la reacción de replicación con la replicasa de Q β y las características esenciales para el reconocimiento de sus templados por la enzima, han sido ampliamente estudiadas. Han sido los grupos de Kramer y Mills los que han trabajado en ello por algunos años. Los estudios al respecto se han centrado en propiedades tales como la forma en que el templado controla la unión a la polimerasa, la iniciación de la replicación, la velocidad y fidelidad de polimerización, la separación del producto y templado y la terminación de la síntesis. Algunas de las conclusiones más importantes al respecto se describen brevemente a continuación.

A) La replicasa de Q β .

La replicasa de Q β puede aislarse de bacterias infectadas con el fago Q β el cual es su templado natural. Esta enzima esta constituida de cuatro polipeptidos de los cuales solo uno es codificado por el virus, siendo los otros tres codificados por E.coli (Kamen, 1970). El polipéptido que codifica el virus esta evidentemente involucrado en el reconocimiento del templado. Actualmente ya se ha clonado en plásmido este gene viral y por lo tanto, ya es posible purificar la enzima de bacterias transformadas con el plásmido que lo contiene (Mills, 1988). Una propiedad sobresaliente de esta RNA-polimerasa es que tiene una altísima especificidad por sus templados (Haruna et al, 1965a).

El proceso replicativo natural que se lleva a cabo por la replicasa de Q β utilizando como templado el fago mencionado precede de la siguiente manera: La replicasa usa la cadena viral (+) como templado para dirigir la síntesis de la cadena complementaria (-). Ambas cadenas sirven como templado para la síntesis de cadenas adicionales. Se observa un incremento

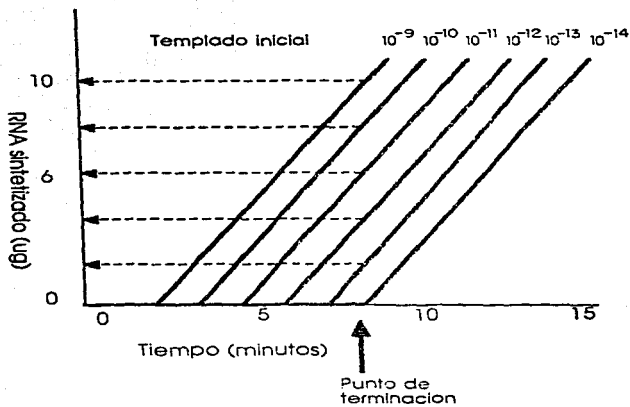


Figura 1. Relacion entre la cantidad de RNA sintetizado en la fase lineal y la cantidad inicial de templado de RNA. Cada incremento geométrico en la cantidad inicial de templado resulta en un incremento lineal en la cantidad de producto cuando las reacciones son terminadas (Kramer et al., 1974).

exponencial en el número de RNAs presentes. Eventualmente, hay suficientes cadenas de RNA para saturar la cantidad de moléculas de enzima disponibles, a partir de este momento las cadenas de RNA se incrementan en forma lineal (Haruna et al, 1965b). El proceso descrito puede llevarse a cabo in vitro. Sin embargo, con las concentraciones de enzima que se utilizan en el laboratorio para una reacción de replicación típica (25 ul), no es posible detectar la fase exponencial ya que corresponde a un número muy bajo de cadenas de RNA. Como consecuencia de esto en una grafica que represente la cinética de esta reacción, la fase exponencial se observa como un "lag" después del cual se observa un incremento lineal. El "lag" es mayor o menor dependiendo del número inicial de cadenas de templado. Esta situación se ilustra en la figura 1.

B) Los templados de la replicasa de Q β .

Además del fago Q β existen otros templados naturales que la replicasa puede reconocer y copiar con las características descritas. Estos templados se aislaron a través de reacciones de replicación hechas in vitro con la replicasa y en ausencia de un templado exógeno. Se desconoce el origen y función de estos RNAs. Algunos de ellos se han podido secuenciar. Estos son el microvariante (MDV-1) (Kacian et al, 1972), el microvariante (MCV) (Mills et al, 1975) y el nanovariante (Schaffner et al, 1977). Sus tamaños fluctúan de 77 a 221 bases. Características notorias de estos templados son su alto contenido de bases G y C, así como la aparente presencia de mucha estructura secundaria. De entre estos RNAs el que ha sido más profundamente estudiado es el MDV-1, el cual, por ser más pequeño que el fago Q β , ha sido un modelo idóneo para el estudio del mecanismo de replicación.

Utilizando agentes químicos y ribonucleasas se llevaron a cabo estudios de doblamiento secundario y terciario de MDV-1. Se comprobó que la molécula es muy estructurada y se determinaron las estructuras más expuestas (Mills et al, 1976). En la figura 2 se presenta la estructura secundaria propuesta para el MDV-1.

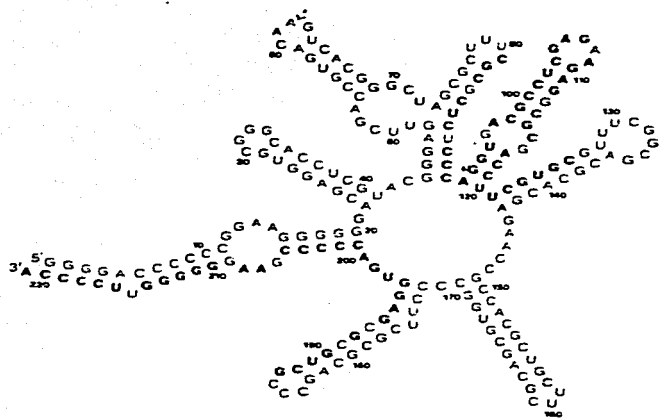


Figura 2. Estructura secundaria del RNA MDV-1 (+) predicha por el programa Zuker. Las letras oscuras muestran las regiones homólogas con el RNA(-) de Q β (Nishihara et al., 1983).

Otros experimentos de replicación in vitro hechos con este templado indicaron que una sola cadena de RNA unida a una sola molécula de la enzima basta para que se complete un ciclo sintético (Dobkin et al, 1979). Por otra parte, a través de la caracterización de mutantes de MDV-1, obtenidas por experimentos de replicación y transferencia seriada, en presencia de una presión de selección, se concluyó que la estructura secundaria que asume esta molécula es necesaria para que pueda replicarse (Kramer et al, 1974). Así mismo, por medio de experimentos de deleciones en el RNA, se identificó un tallo-y-asa como sitio de unión a la enzima (Nishihara et al, 1981). Con estos experimentos se determinó también que las tres G's presentes en el extremo 5' de MDV-1, que igualmente se encuentran en los otros templados secuenciados, así como en el fago Q β , son esenciales para que la replicación inicie, de donde se concluye que las tres C's presentes en el extremo 3' son indispensables para que la síntesis ocurra de manera exponencial (Mills et al, 1980).

C) RNAs recombinantes.

Con el fin de explotar la cinética exponencial característica de la reacción de la replicasa de Q β para la obtención de grandes cantidades de RNA de utilidad, y aprovechando los conocimientos que han derivado del estudio de MDV-1, el grupo de Kramer y Mills decidió construir una molécula de RNA recombinante y probar sus propiedades replicativas. Para este fin se insertó un fragmento de RNA (ácido decaadenílico) en el interior de MDV-1. El sitio elegido para la inserción se ubicó en una región que se sabía que aceptaba mutaciones sin que hubiera consecuencias durante la replicación y de la cual se conocía también que no era el sitio de unión a la replicasa. La molécula recombinante construida mostró propiedades replicativas similares a las de MDV-1 (Miele et al, 1983).

Posteriormente en el mismo laboratorio se obtuvo el cDNA de MDV-1, el cual se insertó en el plásmido pT7, constituyéndose así el pT7MDV. En el pT7MDV la secuencia de MDV-1 se encuentra

inmediatamente hacia abajo del promotor reconocido por la RNA-polimerasa DNA-dirigida del fagoT7. Por otra parte en este plásmido se presenta un sitio único para la endonucleasa de restricción SmaI que permite cortarlo exactamente en el extremo 3' de la secuencia de MDV-1. La construcción descrita hace posible la obtención por transcripción in vitro de un RNA idéntico a MDV-1.

1) Vector pT7MDV-poly.

En el plásmido pT7MDV se introdujo un sitio de restricción para XbaI el cual se ubicó en el mismo sitio en el que anteriormente se había insertado el ácido decaadenílico. En el sitio XbaI de pT7MDV se insertó un oligonucleótido sintético de 17 pares de bases, cuya secuencia se muestra en el artículo de Biotechnology que se incluye en este trabajo. En el interior de este oligonucleótido hay sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción BglII, XhoI y StuI. Aunque los extremos del oligonucleótido son cohesivos con extremos de XbaI, su diseño es tal que solo en un extremo se regenera el sitio XbaI y por lo tanto se conserva como sitio único. De esta forma por clonación se obtuvieron dos plásmidos que contienen el oligonucleótido descrito insertado en las dos orientaciones posibles. Estos son el pT7MDV-poly9 en el cual el orden de los sitios de restricción es XbaI, BglII, XhoI y StuI (figura 3) y el pT7MDV-poly4 en el que el orden de los sitios de restricción es el inverso.

Los RNAs obtenidos por transcripción a partir de pT7MDV-poly4 y pT7MDV-poly9 mostraron ser susceptibles de replicación con la replicasa de C β con propiedades muy similares a MDV-1. El vector pT7MDV generó la posibilidad de obtener por medio de metodología de DNA recombinante, una variedad de RNAs heterólogos para ser usados con diversos fines.

2) RNAs recombinantes de *P. falciparum*.

Para empezar a explorar la factibilidad de replicar RNAs recombinantes con secuencias heterólogas de propiedades distintas, construí cuatro plásmidos derivados de pT7MDV que

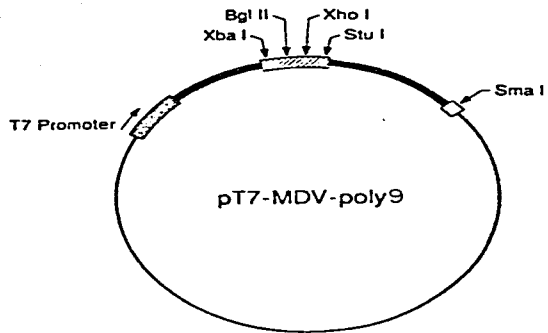


Figura 3. Plásmido pT7-MDV-poly. La línea oscura representa el cDNA de MDV-1. Los sitios de restricción contenidos en el poliíinker son únicos. Existe un plásmido equivalente que tiene el poliíinker en la orientación opuesta (no se muestra).

contenían secuencias presentes en el genoma de *P. falciparum*. Estas secuencias se introdujeron en el plásmido mediante la inserción de oligonucleótidos sintéticos en el sitio para XhoI. El diseño de estos oligonucleótidos fue tal que conservando el mayor parecido posible entre sí (en composición de bases y secuencia), uno de ellos (fal-st) presentara la posibilidad de formar una estructura de tallo y asa (por tener secuencia palindrómica) y otro (fal-un) no la presentara. El objetivo de diseñar los oligonucleótidos descritos de esta manera, fue el de comparar la variante estructural mencionada en función de la replicabilidad de los RNAs que se obtendrían por transcripción a partir de los plásmidos construídos.

Se obtuvieron cuatro construcciones que contenían los dos oligonucleótidos descritos en las dos orientaciones posibles, todas ellas en pT7MDV-poly9. En la figura 4 se ilustran todas estas construcciones. Los cuatro plásmidos obtenidos fueron secuenciados confirmandose que la secuencia del inserto era correcta.

Las propiedades replicativas de los RNAs MDV-fal-un (+) y MDV-fal-st (+) obtenidos por transcripción a partir de dos de los plásmidos descritos fueron estudiadas con detalle y se describen en unos de los artículos que se anexan a este trabajo (Biotechnology). El resultado obtenido indicó, en términos generales que los dos RNAs podían ser replicados con eficiencia relativamente igual sin importar la diferencia estructural contenida en el inserto.

El RNA MDV-fal-un será utilizado en nuestro laboratorio como sonda molecular para el desarrollo de ensayos de detección.

III Retrovirus HIV-1

Lo que a continuación se describe tiene como finalidad justificar el uso de HIV-1 como un modelo idóneo para desarrollar un ensayo de detección clínica. El HIV-1 es el virus asociado al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Debido a que el SIDA es un problema de salud cuya relevancia es indiscutible, la información existente al respecto es amplísima, en este contexto me limitaré a dar la información que considero pertinente para el entendimiento de este trabajo.

A) Detección del retrovirus HIV-1

El virus asociado al SIDA, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), es un miembro de la familia *Lentivirinae* (prototipo visna virus). Al igual que otros virus de esta familia, HIV puede establecer una infección persistente sin producir partículas virales activamente (Kwok et al, 1987). Consecuentemente los ensayos inmunológicos dirigidos a antígenos virales no pueden detectar al virus durante los primeros estadios de la infección. Así mismo, aunque se pueden identificar personas que se han expuesto al virus HIV-1 a través de ensayos serológicos, no es posible confirmar la presencia de una infección activa si no se hace el aislamiento del virus del paciente seropositivo (Ou et al, 1988).

El aislamiento del HIV-1 de muestras de sangre involucra un cocultivo de células mononucleares de sangre periférica con linfocitos de un donador no infectado estimulados con fitohemaglutinina. El procedimiento descrito toma de tres a cuatro semanas, además de que no es muy sensible y no siempre es exitoso (Ou et al, 1988).

La detección directa del virus del SIDA sería deseable en diversas situaciones, p.ej la diagnóstico de pacientes infectados que aun no expresan anticuerpos; la diagnóstico de bebés cuyas madres son seropositivas; la diagnóstico de pacientes debilmente infectados, etc.

Debido a las características de la infección del HIV-1, se presentan varias dificultades para poder detectarlo directamente:

- 1) Solo un pequeño número de células están infectadas (de 1 en 10^4 a 1 en 10^6) (Harper et al, 1986).

- 2) Las células infectadas tienen pocas copias de RNA mensajero (aprox 30 copias por virus y 6000 moléculas de RNA por célula infectada) (Pelligrino et al, 1987).
- 3) La infección puede ser latente, es decir sin que se produzcan RNAs o proteínas.
- 4) Distintos miembros de onco y lentivirus muy relacionados complican la detección específica de un virus particular.

Todo lo anterior señala la urgente necesidad de ensayos muy sensibles que detecten componentes específicos del virus, tales como su genoma. Si bien pueden mencionarse algunos antecedentes en relación a este objetivo, como es el uso de sondas radioactivas, o la amplificación de regiones del genoma utilizando la metodología de PCR antes descrita, en ninguno de los casos existentes se propone la amplificación directa de la sonda de una manera altamente eficiente y específica. Esta alternativa podría lograr superar la sensibilidad y especificidad de los métodos mencionados lo cual sería de gran utilidad para el diagnóstico de esta enfermedad.

Por la importancia del SIDA y las características señaladas anteriormente, el virus HIV-1 nos ha parecido un modelo idóneo para demostrar la viabilidad de un ensayo de detección basado en el uso de probadores de RNA susceptibles de amplificación exponencial.

B) Descripción molecular de HIV-1

El HIV-1 es un retrovirus cuya información genética esta contenida en un RNA de aproximadamente 10,000 bases nucleotídicas en las cuales se codifican tanto para las proteínas que estructuran al virus, como para aquellas que regulan la producción de viriones. Los genes que codifican para las proteínas estructurales y enzimas son tres y se han llamado: GAG, POL, y ENV. El gene POL codifica para la transcriptasa reversa y otras enzimas involucradas en la conversión del genoma a DNA y su integración al genoma celular. El gene ENV codifica para las

proteínas de envoltura y la región GAG codifica para las proteínas que rodean al RNA formando una nucleocápside (Haseltine et al, 1983).

Dentro de las regiones que contienen estos genes se codifica para otras proteínas pequeñas tales como tat, rev y nef, que, en coordinación determinan la producción del virión.

El mecanismo regulatorio que controla el que un virus se mantenga integrado en el cromosoma del huésped en forma latente (sin reproducirse), o que se dispare su producción a niveles muy variables, es complejo y aun no está totalmente dilucidado. Se sabe que algunos factores celulares intervienen en este mecanismo en combinación con las proteínas reguladoras mencionadas, estas últimas interaccionan en trans con secuencias específicas del genoma viral (Cullen et al, 1989).

La información genética del HIV-1 es muy variable, ya que la transcriptasa reversa de este virus tiene una alta frecuencia de errores de síntesis. Este fenómeno es común a varios retrovirus, así por ejemplo se ha determinado que para el retrovirus de origen aviar la frecuencia de mutación es de una base nucleotídica por cada dos ciclos de replicación. Sin embargo existen regiones codificantes cuya integridad de secuencia es indispensable y por lo tanto se mantienen conservadas por selección natural. El genoma del virus HIV-1 ha sido totalmente secuenciado y su secuencia se ha comparado con la de otros retrovirus que causan SIDA en humanos, tales como el HIV-2 y HTLV y la de otros que infectan especies de primates como el SIV y el STLV. Los genomas de todos estos retrovirus presentan alta homología, sin embargo todos ellos tienen regiones cuya especificidad permite que se les distinga por hibridación con sondas de ácidos nucleicos. Por otra parte dentro de estas regiones específicas hay secuencias muy conservadas tales como las del gene POL, las cuales permiten diseñar sondas que garantizan la detección específica de un retrovirus específico (Haseltine et al, 1988).

RESULTADOS

Los resultados con los que se cumplen los objetivos de este trabajo se describen en los artículos. En este espacio se detallan algunos datos que pueden ser de interés para la discusión. Así mismo, con el fin de presentar una idea más clara del procedimiento general que se utilizó en el presente ensayo, a reserva de la exposición más detallada que se incluye en los artículos, se muestra en la figura 5, un esquema que ilustra el uso de sondas de RNA amplificables en ensayos de detección.

A) Diseño de sondas

Las secuencias de los oligonucleótidos se diseñaron con los siguientes criterios: 1) que su complemento estuviera presente en las regiones más conservadas del gene pol; 2) que no presentara posibilidades de una fuerte estructura secundaria, ya que esto último podría impedir la hibridación con el blanco; 3) que en la vecindad de la región elegida existieran secuencias también altamente conservadas y no estructuradas para que en función de ellas se diseñaran sondas de captura. En la figura 6 se muestra la ubicación de las secuencias elegidas dentro del genoma de HIV1.

B) Construcción de RNAs heterólogos

Además de los RNAs que tienen las características requeridas para ser utilizados como sondas replicables en bioensayos, hemos construido otros RNAs heterólogos algunos de los cuales no presentan propiedades replicativas similares a MDV-1. En el caso particular de HIV-1, cuatro secuencias oligonucleotídicas fueron insertadas en dos vectores (pT7MDV-poly) en sitios de XhoI y BclII. Los vectores difieren únicamente en la orientación del polilinker. En la figura 7 se ilustran las 8 construcciones obtenidas con cuatro insertos distintos en las dos orientaciones posibles. Por transcripción pudieron obtenerse ocho RNAs recombinantes con secuencias diferentes complementarias a alguna región de HIV1.

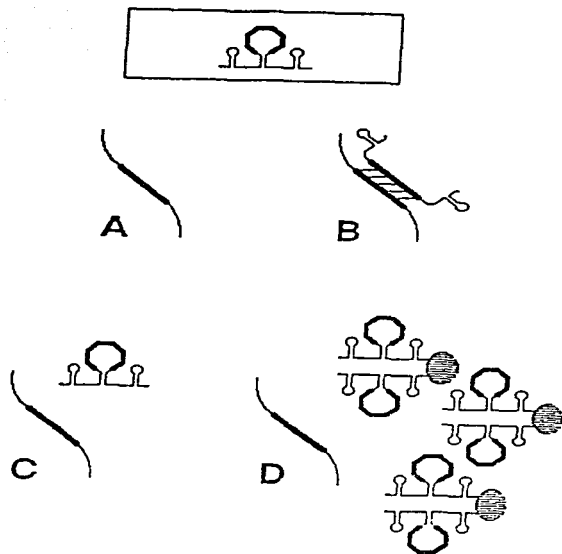
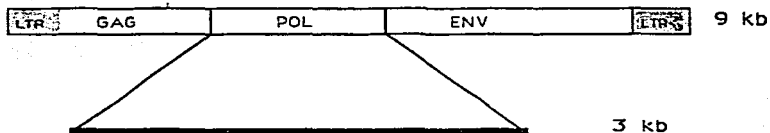


Figura 5. Uso de sondas de RNA recombinante. El símbolo para la sonda de RNA consiste del RNA MDV-1 (representado por una línea doblada en tres tallos y asas) dentro de la cual se ha insertado una secuencia detectora (se muestra como una línea octagonal gruesa). La secuencia blanco se muestra en el panel A. La sonda de RNA se hibrida a este blanco (el cual puede ser RNA o DNA) según se muestra en el panel B. Después de lavar la sonda de RNA no unida, las sondas hibridadas se liberan de su blanco por calor (panel C). Las sondas de RNA recombinante liberadas son amplificadas exponencialmente por incubación con la replicasa de QB (panel D).

FIGURA . 6

HIV-1



TODOS LOS OLIGONUCLEOTIDOS EMPLEADOS PARA LA CONSTRUCCION DE SONDAS.
SE UBICAN DENTRO DE LA REGION POL.

33mer

TCGAAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGC probe HIV30 Y HIV2
TCGAGCCTGATCTCTTACCTGTCTATAATTT mRNA (nt 4749-4777)

34mer

TCGAAAGCGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGC probe HIV43 Y HIV15
TCGAGCTCTGAAGAAAATTCCCTGGCCTTCCCTT mRNA (nt 2110-2139)

39mer

TCGAATTCCTGCTTGATTCCCGCCCAACAACAGGCGGC probe HIV34 Y HIV10
TCGAGGCGCCTGTTGGTGGGCGGAATCAAGCAGGA.AT mRNA (nt 4643-4677)

35mer BglII

TCAATGGCAGCAATTCACCAGTGCTACGGTGATC probe HIV20 Y HIV4S
GATCACCGTAGCACTGGTGAATTCCTGCCATTGA mRNA (4622-4651)

* La posición nucleotídica se refiere a el genoma
completo de HIV-1.

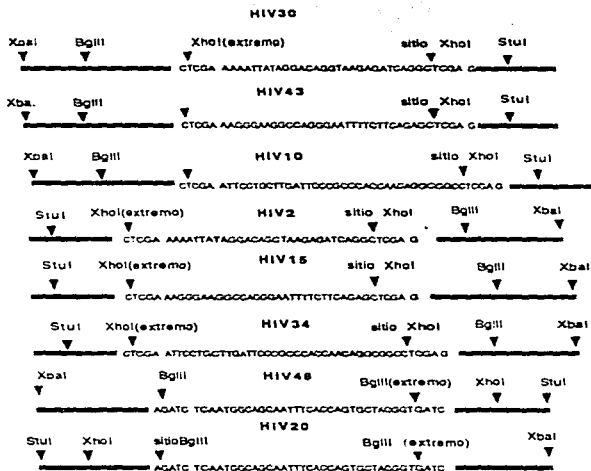


Figura 7. RNAs heterólogos construidos con pT7MDV. Se muestra la secuencia completa de los oligonucleótidos usados en cada caso. Con una línea gruesa se simboliza el polilinker. Cuando el orden de los sitios de restricción empieza en XbaI el polilinker usado es poly9; cuando empieza con StuI el polilinker es poly4. El nombre de cada construcción se indica arriba de cada esquema. La cadena cuya secuencia se escribe es la que es transcrita en MDV-1.

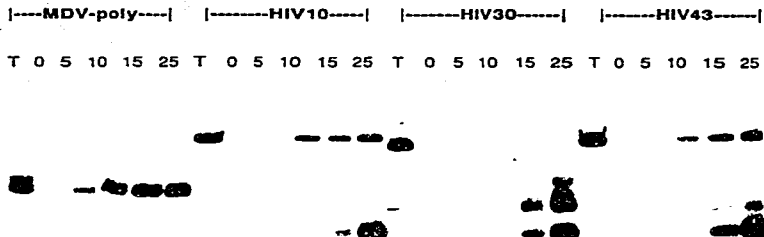
C) Propiedades replicativas

Hicimos un análisis de las propiedades replicativas de los RNAs y encontramos que en términos generales se observan tres tipos de comportamiento: algunas recombinantes replican exponencialmente y de manera eficiente, al igual que MDV-1; otras presentan deleciones que al ocurrir producen RNAs mas pequeños cuya replicación es favorecida por sobre la de la recombinante original. Debido a ello no es posible obtener cantidades significativas de templado original; el tercer comportamiento observado consiste simplemente en que el templado no es replicado por la replicasa, o al menos no con una eficiencia que permita observarlo en 30 minutos (tiempo necesario para amplificar 10^9 veces).

En las figuras 8 y 9 se muestran fotografías de geles que contienen el producto de replicación obtenido en distintas reacciones, iniciadas con cada uno de los recombinantes construidos. En cada caso se incluye un carril que contiene el templado inicial correspondiente al que se utilizó en la reacción, como un marcador de peso. La banda de mayor movilidad que se observa en varias de las reacciones, corresponde a MDV-1. Al respecto de la presencia de este RNA como producto de reacción, se hace una explicación posterior en esta misma sección.

En algunas de las replicaciones, se puede observar el comportamiento de deletogénesis descrito anteriormente. Así, por ejemplo en las reacciones iniciadas con los templados HIV30 y HIV43, se observan bandas de menor tamaño que la que tiene el templado original y de mayor tamaño que MDV-1. Se ha demostrado que la deletogénesis es un fenómeno específico para cada recombinante, es decir, la región deletada siempre es la misma para la misma molécula en distintas reacciones de replicación (David Zhang, comunicación personal). En la tabla 2 se presenta una síntesis de los resultados obtenidos con cada una de las recombinantes cuya replicación fue estudiada.

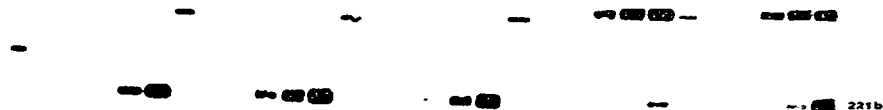
Al extender el análisis a las diversas recombinantes que han construido otros miembros del laboratorio, encontramos que



* Figura 8. Replicación de distintos RNAs recombinantes con la replicasa de Q β . En el extremo superior se indica el nombre de la molécula recombinante que se utilizó en la reacción de replicación correspondiente. Cada reacción de replicación se llevo a cabo durante 25 minutos, tomándose alicuotas a diferentes tiempos. La T al inicio de cada grupo señala el carril en el que se muestra el RNA templado usado en la reacción. Los números sobre cada carril indican el tiempo al que se tomaron muestras en la reacción de replicación y los carriles correspondientes contienen el producto obtenido al tiempo dado.

|---MDV poly4---| |-----HIV2-----| |----HIV15-----| |----HIV20-----| |----HIV34-----|

T 0 5 10 15 25 T 0 5 10 15 25 T 0 5 10 15 25 T 0 5 10 15 25 T 0 5 10 15 25



* Figura 9. Replicación de distintos RNAs recombinantes con la replicasa de OB. En el extremo superior se indica el nombre de la molécula recombinante que se utilizó en la reacción de replicación correspondiente. Una descripción detallada se encuentra en el texto y en la figura anterior.

RNA	LONGITUD DE INSERTO P.B.	REPLICABILIDAD CON Q8	POLILINKER PRESENTE EN MDV1	SITO DE INSERCIÓN EN POLILINKER
MDV-1	0	AMPLIFICA $\sim 10^9$ VECES EN 20 MIN.	NINGUNO	—
POL19	22	A	9	XbaI
POL4	22	A	4	XbaI
MDV-fa-un	33	A	9	XhoI
HIV2C	35	A	4	BglII
HIV4b	35	B	9	BglII
HIV43	34	B	9	XhoI
HIV15	34	C	4	XhoI
HIV2	33	C	4	XhoI
HIV30	33	C	9	XhoI
HIV34	39	A	4	XhoI
HIV10	39	B	9	XhoI

TABLA 2 Resultados de replicabilidad de todas las sondas construidas. La longitud del inserto indicada en cada caso no incluye la longitud del polilinker. Polilinker 9 y 4 provienen de un mismo oligonucleótido que fué insertado en el vector pT7MDV en las dos orientaciones posibles. Polilinker 9 tiene los sitios de restricción en el orden Xba-Bgl-Xho-Stu. Polilinker 4 los tiene en el orden opuesto. El comportamiento A significa que la replicación es exponencial y con eficiencia similar a MDV-1. B significa que la eficiencia de síntesis de producto completo es muy baja (no exponencial) y el producto principal es de menor tamaño (deletogénesis). Comportamiento C significa que no hay replicación en absoluto.

alrededor del 50% replican eficientemente. Estas recombinantes incluyen RNAs que contienen secuencias presentes en P. falciparum, en T. cruzi, en el virus R17, una secuencia codificante para un tRNA, la secuencia del gene para angiotensina y la secuencia de un virus que infecta a la papa llamado PSTV.

Un problema que frecuentemente afecta las reacciones de replicación es la presencia de unas cuantas moléculas de MDV-1 que se encuentran contaminando las preparaciones de enzima. Aunque la cantidad de MDV-1 contaminante que puede estar presente en una reacción de replicación es numericamente insignificante, debido a que la reacción es exponencial, al cabo de un tiempo (aprox. 30 a 45 min) se observa la presencia de MDV-1 como un producto adicional. Este hecho pareció constituir una limitante para el diseño de sondas recombinantes. Sin embargo actualmente sabemos que puede inhibirse específicamente la replicación de las moléculas contaminantes por mayor tiempo (mas de 45 min.), si se disminuye la concentración de magnesio presente en la reacción de replicación. En las reacciones de replicación que aquí se muestran no se disminuyó la concentración de magnesio. Por otra parte no puede descartarse que la banda correspondiente al tamaño de MDV-1, presente en algunas de las replications de los RNAs recombinantes, sea parcialmente contribuida por el fenómeno de deletogénesis descrito anteriormente.

Hasta ahora no han podido dilucidarse las propiedades que determinan los diferentes comportamientos observados en distintas moléculas recombinantes. Si bien se supone que esto debe estar estrechamente relacionado con la estructura secundaria y terciaria que adoptan las recombinantes, los principios estructurales que rigen este comportamiento no están claros. Otras propiedades moleculares que probablemente estén involucradas son el tamaño de los insertos y su composición de bases, pero tampoco hay una correlación clara que pueda evidenciarse con facilidad. Al respecto de lo observado se hará una discusión posterior en esta tesis.

D) Propiedades de la sonda HIV20

A partir de los datos de replicación de las moléculas recombinantes de HIV1, se decidió que la mejor candidata para ser utilizada en un ensayo de detección sería HIV20. Por medio de secuenciación en el plásmido derivado de pT7MDV conteniendo el DNA de HIV20 en la región correspondiente al inserto, se corroboró que la secuencia de la sonda era correcta.

En la figura 10 se muestra un experimento de replicación utilizando HIV20 como templado. Se hicieron varias reacciones, cada una iniciada con una concentración distinta de RNA templado. Las cantidades utilizadas al inicio varían en forma logarítmica entre las distintas reacciones. Es importante hacer notar que en este experimento en particular, la reacción iniciada sin templado sufrió una contaminación (exógena) de algunas moléculas de HIV20. Por la intensidad de la banda correspondiente a HIV20 que se observa a los 25 minutos de esta reacción, puede inferirse que la cantidad de moléculas contaminantes es mucho menor de 1000, lo cual es indicativo de la alta sensibilidad a contaminación de este sistema.

Con los resultados del experimento descrito se elaboró la gráfica de la cual se concluye que la replicación de HIV20 tiene una cinética exponencial. Lo anterior se observa porque el tiempo en que una reacción permanece en fase exponencial (en la gráfica apreciable como un lag anterior a la fase lineal) es mayor, cuando la cantidad de templado usada al inicio de la reacción es menor. Así mismo, la diferencial de tiempo en la fase exponencial, entre dos reacciones iniciadas con cantidades de templado que difieren en un orden de magnitud, es relativamente igual en todo el rango de concentraciones. Esto último es consecuencia de que el tiempo que requiere una población de RNA para duplicarse es constante bajo condiciones definidas. En la gráfica esta situación solo se aprecia para las tres concentraciones más altas, ya que en las concentraciones bajas el efecto de síntesis de MDV-1 contaminante es más evidente.

La ecuación que describe la cinética exponencial característica de la replicación con la replicasa de $\Phi\beta$ y que

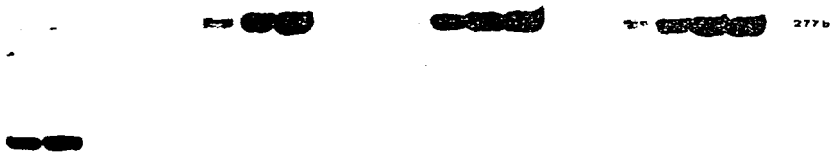
Número de
moléculas 0

10^4

10^6

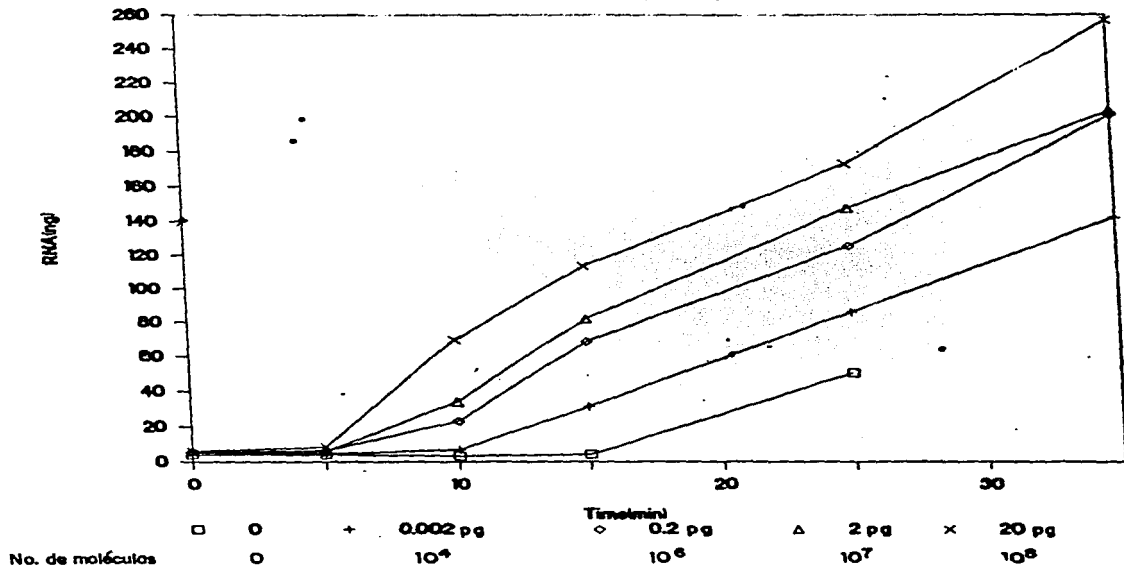
10^7

15 25 35 0 5 10 15 25 35 0 5 10 15 25 35 0 5 10 15 25 35



* Figura 10 Replicación de HIV20. Los números arriba de cada carril indican el tiempo al que se paró la reacción. El número de moléculas que se indica es el que se utilizó al inicio de cada reacción.

■ GRAFICA 1. EFECTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE RNA TEMPLADO EN LA CINETICA DE SINTESIS DE HIV20. EXPLICACION EN EL TEXTO



igualmente puede aplicarse a la cinética de replicación de HIV20 es la siguiente:

$$N = N_0 2^{t/d}$$

donde N_0 es el número inicial de moléculas de RNA; t es el tiempo de incubación; d es la constante de tiempo que toma a una población de RNA duplicarse; y N es el número de moléculas de RNA presentes al tiempo t . De esta ecuación puede concluirse que si se determinan la cantidad de moléculas presentes a un tiempo dado de reacción y se conoce la constante de duplicación de HIV20, puede calcularse el número de moléculas con que se inició la reacción.

DISCUSION

Hemos implementado un ensayo de hibridación para detectar mensajeros de HIV1 en pequeñas cantidades. El límite de detección logrado con este sistema está entre 10,000 y 50,000 moléculas de blanco, lo cual significa un aumento de 20 veces respecto a lo que la radioactividad permite detectar sin amplificación. No obstante este incremento, la sensibilidad que hemos conseguido esta aun muy por debajo de lo que potencialmente ofrecen las sondas replicables. El límite que encontramos actualmente no es debido a falta de detectabilidad, sino a la persistencia de sondas no hibridadas, cuyo número una vez que iguala al número de sondas hibridadas no permite ir mas lejos.

Considero que los incrementos de sensibilidad que podrían lograrse optimizando el uso del sistema de "target cycling" no harían posible un aumento logarítmico. Sin embargo, el concepto de sondas replicables de RNA contempla otros esquemas con los cuales se puede contender con los límites actuales de "background". De estos esquemas se darán ejemplos mas adelante. Por otra parte, es importante hacer énfasis en que esta es una implementación preliminar del concepto, cuyo objetivo esencial es demostrar que una sonda puede hibridar con su blanco y ser posteriormente amplificada exponencialmente; y además que la masa generada al cabo de la amplificación es proporcional al número de blancos.

Nuestro método de detección no es aun un ensayo clínico comparable a los que se emplean para el diagnóstico del SIDA, ya que su utilidad tiene que demostrarse para muestras infectadas. Respecto a ello, cabe señalar que el procedimiento que se ha usado en este trabajo ha sido utilizado por investigadores en el laboratorio del Dr. David Gillespie con muestras celulares (Pelligrino et al, 1987). En este laboratorio se ha demostrado que el tiocianato de guanidinio 5M es capaz de lisar células de sangre y liberar nucléicos desnaturalizados (Thompson et al, 1987); así mismo han visto que la hibridación de estos nucléicos con sondas moleculares ocurre con eficiencias comparables a las

que se obtienen utilizando blancos sintéticos (Collins et al, 1987). Si esto es cierto para el caso de nuestra sonda, estaríamos en un rango de sensibilidad que permitiría la detección de 2 células infectadas, ya que un linfocito infectado activamente tiene un promedio de 6000 copias del mRNA blanco (Pelligrino et al, 1987). Si se considera que en infecciones de huéspedes asintomáticos puede haber una célula infectada por cada 100,000 estaríamos en posibilidades de detectar una infección de esta intensidad con una muestra de 25 ul de sangre.

Independientemente de estos datos, creo que la principal aportación del ensayo es su cuantitatividad, la cual además se observa en un amplio rango. Al respecto de la cuantitatividad ya se ha hecho una extensa discusión en el artículo. La combinación de cuantitatividad y amplio rango hacen posible conocer la intensidad de una infección y de seguir la evolución de una enfermedad, así como determinar la respuesta al uso de un fármaco, a través de la cuantificación directa de un componente viral. Una vez que la sensibilidad actual se supere permitirá también distinguir entre un provirus (virus en fase latente) y un virus que se está transcribiendo. Esto último dado que la sonda puede amplificarse directamente tanto si hibrida con DNA como con RNA. Todo lo anterior tendrá repercusiones a nivel de investigación epidemiológica.

Por otra parte cabe hacer notar que el ensayo se lleva a cabo con rapidez (aproximadamente dos horas después de que la hibridación ha concluido), y que la señal obtenida después de la replicación hubiera podido detectarse sin el uso de radioactividad, pues la masa de RNA fluctúa entre 25 ng y 250 ng.

El método de amplificación exponencial de blanco con PCR que se describió en la introducción, se ha implementado también para la detección de HIV-1 (Ou et al 1988). La sensibilidad que ofrece este sistema es por el momento superior a la del ensayo de Q β que se describe en esta tesis, sin embargo solo permite la detección de DNA, a menos de que se introduzca un paso adicional de transcripción reversa. Por otra parte este ensayo no es

cuantitativo y además tiene mayores probabilidades de resultar en falsos positivos.

Con respecto a la generalidad del uso de las sondas de hibridación replicables para la detección de agentes infecciosos, es importante analizar algunos aspectos. Uno de ellos es el hecho de que no todos los RNAs recombinantes derivados de MDV-1 son susceptibles de replicación con la replicasa de Q β . Aunque esto no constituirá un problema desde el punto de vista del diseño de señales replicables, es claro que es esencial el conocer los factores involucrados en la replicabilidad. Tal conocimiento permitiría el diseño racional de sondas moleculares y además es por sí mismo un problema de interés básico.

En relación a esa pregunta podemos decir que el uso de programas que predicen una estructura secundaria óptima en función de la secuencia, tales como el que Zuker diseñó en 1981 (Zuker et al, 1981.), no han sido de gran utilidad para el identificación de componentes estructurales que tengan alguna función. Así por ejemplo en la figuras 11 y 12 se ilustra como las dos mejores replicantes que contienen insertos de HIV-1 (HIV20 y HIV34), presentan estructuras predichas por este programa que son aparentemente muy diferentes, incluyendo la ausencia de formación del sitio de unión a la replicasa determinado por el grupo de Kramer y Mills (Nishihara et al, 1983), en una de ellas (HIV34). En la figura 13 se presentan las mismas predicciones para el RNA HIV2 que no replicó en absoluto, encontrándose que presenta un aspecto mucho más similar al de HIV20. Estas observaciones muestran que probablemente la estructura que produce el programa mencionado no representa a la o las estructuras que existen en solución. Aunque la utilidad del "Zuker" ha sido demostrada para tRNAs, es posible que debido a que el MDV-1 y sus derivados tienen muchas alternativas de doblamiento, existan diversas estructuras en un rango estrecho de energía óptima.

Alternativamente podría ser que las diferencias de replicabilidad entre recombinantes estén determinadas a nivel de

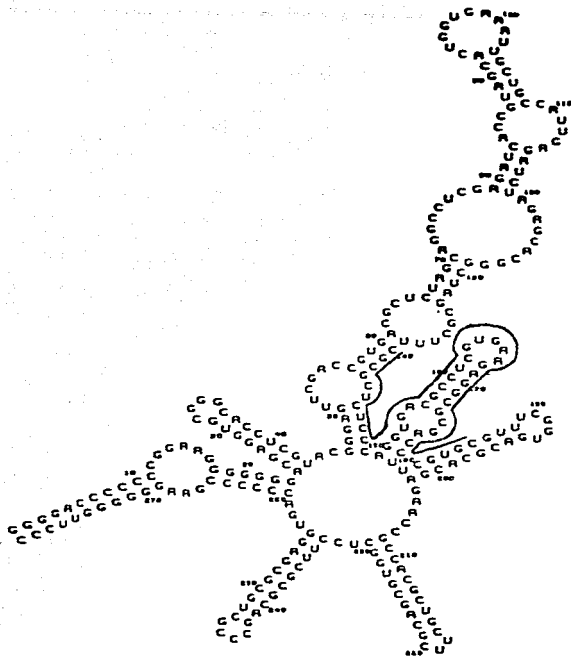


Figura 11. Estructura secundaria óptima predicha para el RNA HIV20 que se usó como sonda de replicación. La predicción se hizo utilizando el programa computacional de Zuker (Zuker y Stiegler, 1981). El sitio de unión a la replicasa de Q β se indica con una línea sobre las bases que lo toman.

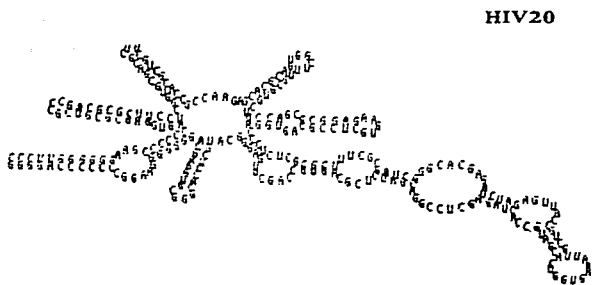
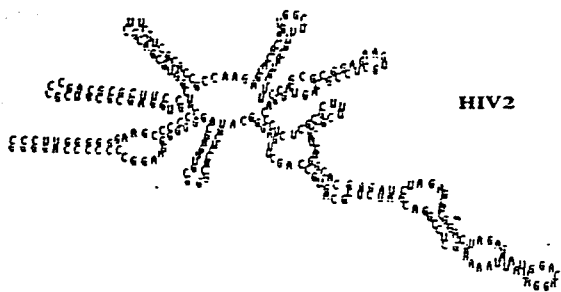


Figura 13 Comparación entre las estructuras secundarias óptimas predichas para los RNAs recombinantes HIV20 y HIV2. La predicción se hizo con el programa "Zuker" (Zuker et al, 1981). El RNA HIV20 es replicado con alta eficiencia por la replicasa de QB, el HIV2 no es replicado en absoluto por esta enzima.

estructura terciaria, la cual por el momento no es posible predecir.

Consideramos que los programas de computadora que predicen estructuras secundarias, pueden ser de mayor utilidad, en la medida que permitan un análisis estadístico que incluya un conjunto de doblamientos alternativos óptimos. Este tipo de análisis tendría la ventaja de que permitiría avocarse al estudio de subestructuras específicas de la molécula o bien a la comparación de conjuntos de estructuras bajo criterios que signifiquen hipótesis distintas respecto a la replicación. En relación a este punto, recientemente se ha publicado una versión del programa "Zuker" (Zuker et al. 1989) que predice doblamientos subóptimos dentro de rangos de energía seleccionables. Con este programa, hemos podido predecir un conjunto de estructuras subóptimas existentes dentro de un rango establecido de energía para todas las recombinantes de HIV, así como para MDV-1, MDV-fal-un, poli4 y poli9. Una vez obtenidas las poblaciones de estructuras subóptimas representantes de cada una de las moléculas de RNA mencionadas, los resultados se interpretaron en función de la presencia o ausencia de la subestructura que representa al sitio de unión a la replicasa, en cada una de las estructuras subóptimas de las poblaciones generadas. Este análisis se pudo llevar a cabo en forma automática y relativamente rápida por medio de un programa para una computadora VAX que hicimos en nuestro laboratorio con comandos del sistema operativo UNIX. El resultado de este programa nos dice dos tipos de datos:

- 1) Con que frecuencia aparece la subestructura que representa al sitio de unión a la replicasa en un conjunto dado de estructuras subóptimas.
- 2) Que fracción de esa subestructura está presente en cada una de las estructuras subóptimas. Este resultado es indicado por medio de la asignación de un número que va de 0 a 1, en donde el 1 significa 100% de similitud con el sitio de unión y 0 significa 0% de similitud con esta misma subestructura.

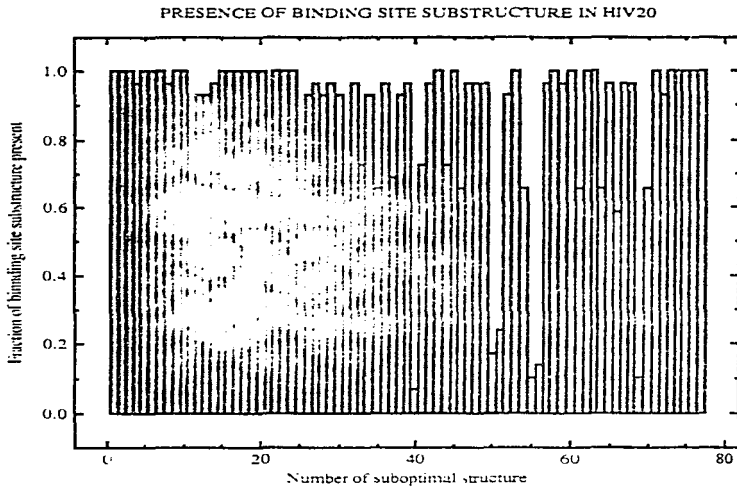
Con estos datos elaboramos histogramas, algunos de los cuales se muestran en la sección de gráficas de esta tesis.

Los resultados obtenidos a través del análisis descrito nuevamente no son de utilidad para entender los factores determinantes en la replicabilidad de RNAs, ya que, si bien no podíamos predecir los resultados que habrían de obtenerse con este enfoque, no se puede apreciar ninguna tendencia particular común a los RNAs que son susceptibles de replicación, comparados con los que no son replicados. Para ilustrar este resultado se muestran las gráficas obtenidas con las mismas moléculas de las cuales se presentan predicciones de estructura secundaria, en las figuras 11, 12 y 13 de este trabajo. Estas son HIV20 (gráfica 2), HIV34 (gráfica 3) y HIV2 (gráfica 4). Igualmente se muestran las gráficas de los RNAs cuya replicación se ha estudiado con más detalle como son: MDV-1 (gráfica 5), MDV-fal-un (gráfica 6), poli4 (gráfica 7) y poli9 (gráfica 8). Nótese que en todos estos histogramas el sitio de unión a la replicasa, que en la gráfica se aprecia como la barra mas alta (valor = 1), se encuentra presente con relativamente igual frecuencia y que los patrones de distribución de las barras son también muy similares. Estas observaciones indican que no existen diferencias asociables a las propiedades replicativas bajo el criterio de frecuencia de formación del sitio de unión en estructuras subóptimas.

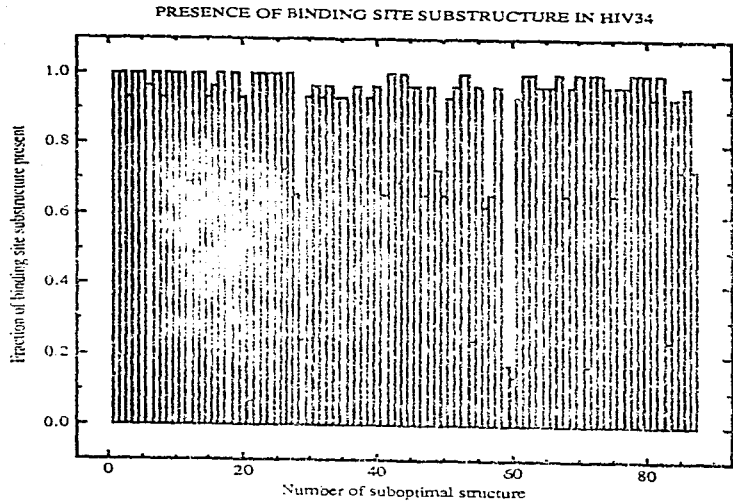
Si bien no hemos sido capaces de llegar a una conclusión interesante utilizando métodos de predicción en computadora, cabe señalar que existen otras formas de interpretar y graficar los resultados que generó el programa descrito y por lo tanto es probable, que planteándose otras hipótesis respecto a los factores que podrían influir sobre la replicabilidad de RNAs recombinantes se puedan obtener resultados más significativos.

En nuestro grupo de trabajo se han propuesto diseños adicionales que redundan en una mayor aplicabilidad de la idea de señales replicables. Todos ellos disminuirían significativamente las fuentes de "background" y algunos no requerirían que la sonda esté insertada dentro de la molécula que constituye la señal. La mayoría de estas ideas se refieren a la construcción o síntesis

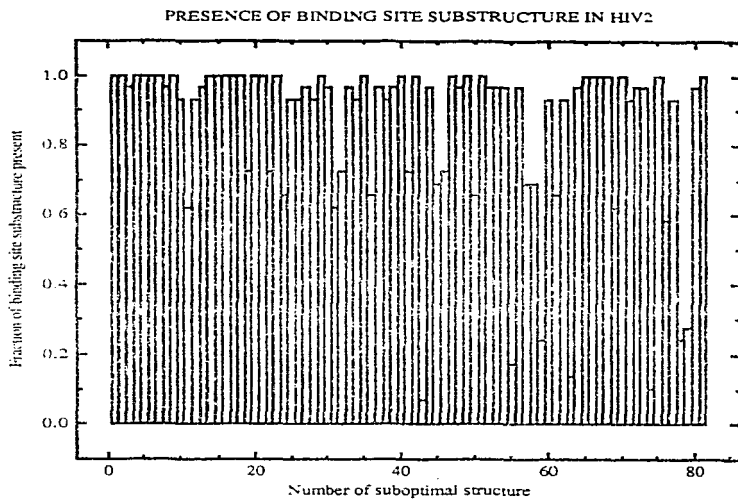
Gráfica 2



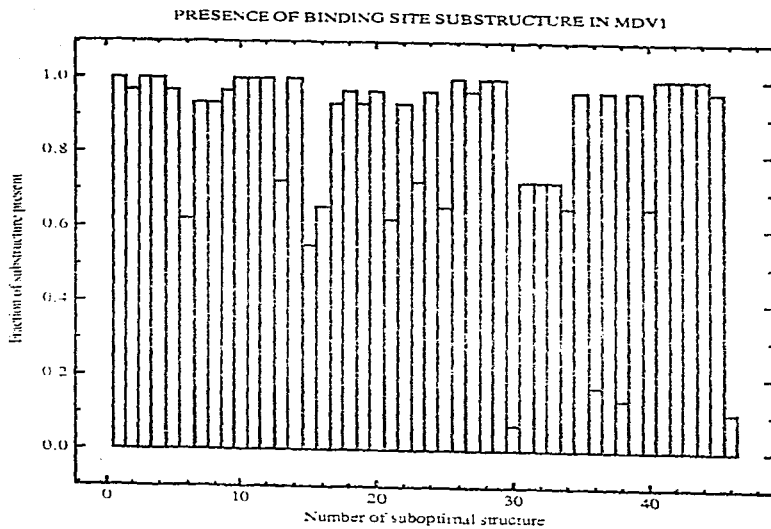
Gráfica 3



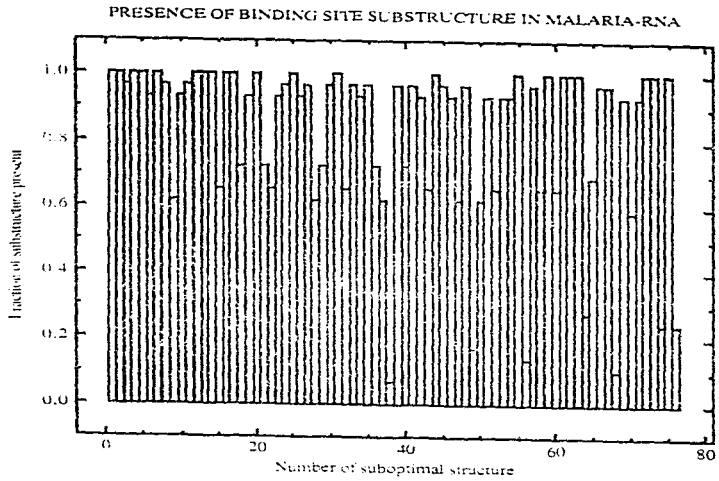
Gráfica 4



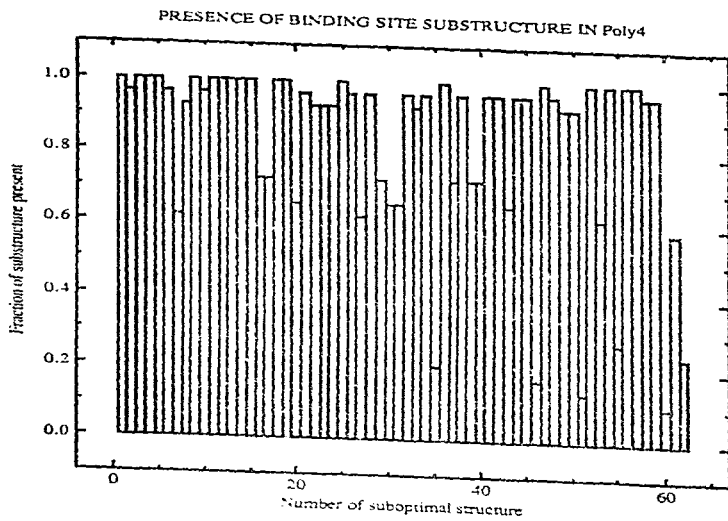
Gráfica 5



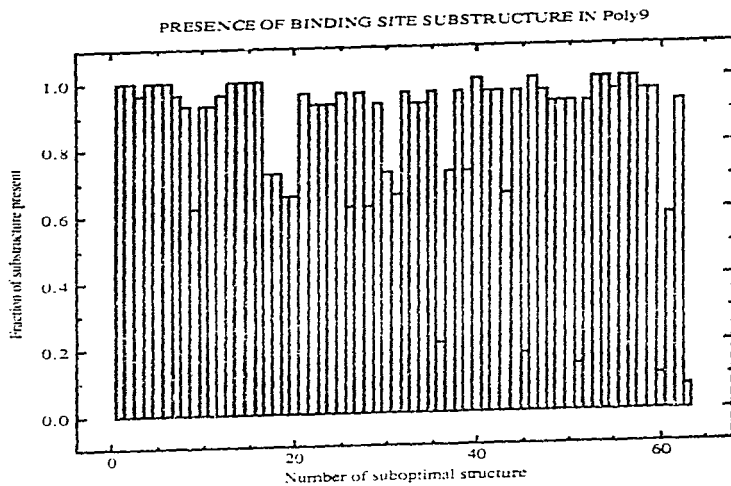
Gráfica 6



Gráfica 7



Gráfica 8



de moléculas que se comportan como "switches" moleculares, es decir moléculas-sondas que asumen dos estructuras diferentes dependiendo de su condición de hibridación o no hibridación con su blanco. Cuando el "switch" molecular asume la estructura correspondiente a la hibridación con su blanco se genera una señal replicable, la otra estructura que adopta tiene como consecuencia que no se pueda replicar la señal generada. Lo anterior implica que aquellas sondas que persistan unidas al blanco sin estar específicamente hibridando con el o unidas a la superficie de los materiales utilizados en el ensayo, no generarán señal.

Un ejemplo simple que ilustra esta idea y que es actualmente un proyecto del grupo con el que colaboramos se describe a continuación. La sonda es un oligonucleótido de cadena sencilla de DNA que se compone de las siguientes partes: una secuencia detectora de aproximadamente 34 bases; una primera secuencia "switch" de aproximadamente 17 bases inmediatamente adyacente al extremo 5' de la secuencia detectora; y una segunda secuencia "switch" de 17 nucleótidos inmediatamente adyacente al extremo 3' de la secuencia detectora. Las secuencias "switch" están diseñadas de tal manera que son complementarias entre sí y la conformación que adoptan en solución es tal que están formando un híbrido. Estas secuencias juntas contienen la secuencia del promotor para la polimerasa de T7. En este contexto llamaremos a la primera secuencia "switch" "secuencia promotora" y a la segunda "complementaria del promotor".

La secuencia detectora puede usarse para detectar un blanco de RNA o DNA y puede utilizarse en muestras conteniendo material no relacionado. La hibridación de una secuencia detectora con su blanco causa la separación de las secuencias "switch" debido a un requisito de rigidez (Bhattacharyya et al 1989) y por lo tanto el "switch" queda en posición abierta. Las sondas que no hayan hibridado con el blanco permanecerán en posición cerrada (formando un híbrido entre secuencias "switch"). Estas posibilidades se ilustran en la figura 14.

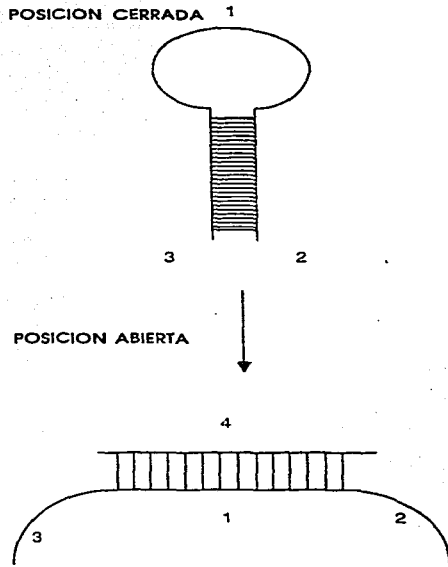


Figura 14 Switch Molecular

1. Secuencia detectora
2. Secuencia promotora
3. Complementaria del promotor
4. Secuencia blanco

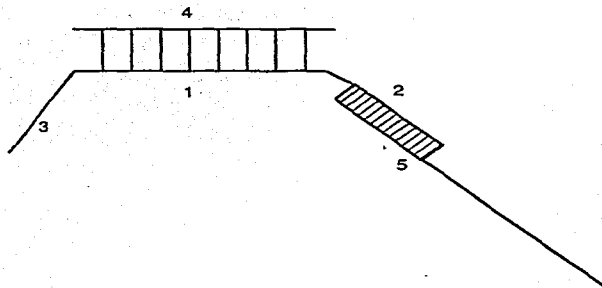


Figura 15. Switch molecular en posición abierta.

1. Secuencia detectora
2. Secuencia promotora
3. Complementaria del promotor
4. Secuencia blanco
5. DNA templado para MDV-1

Se ha diseñado un método para detectar específicamente a las moléculas en posición abierta. De acuerdo a este método, después de la hibridación de la sonda con su blanco, se adiciona un tercer componente, el cual consiste de un DNA de cadena sencilla que contiene exactamente la secuencia complementaria al promotor de T7 en su extremo 3,' y la secuencia templado para un RNA replicable inmediatamente después. La secuencia complementaria al promotor de T7 formaría un híbrido con la "secuencia promotora" de la molécula switch cuando ésta se encuentre en posición abierta. Cuando el "switch" esté en posición cerrada la "secuencia promotora" estará obstruida por la "complementaria al promotor" y por lo tanto no formará un híbrido con el templado descrito. La figura 15 facilitará la comprensión de este modelo. Subsecuentemente se incuba la muestra con la polimerasa del fago T7 y demás reactivos necesarios para transcripción in vitro produciéndose así RNAs replicables por la replicasa de $\phi\beta$. Finalmente se amplifica esta señal a través de una replicación in vitro con esta última enzima. La detección del RNA producido puede hacerse de diversas formas tales como tinción con bromuro de etidio.

Se han diseñado otros modelos que prescindien del requisito de tener RNAs recombinantes replicables. Estos modelos implican la utilización de sondas que tienen la secuencia detectora en un extremo del RNA replicable. Después de que la secuencia detectora se une a su blanco, se utiliza uno de varios mecanismos para separarlo del RNA replicable y proceder a la amplificación de este último. Los mecanismos para separarlo de la señal replicable dependen evidentemente de la forma en que se encuentra unido a ella. Una posibilidad es que la sonda y el RNA sean moléculas independientes que se unan por medio de reacciones químicas e igualmente sean separadas. Un ejemplo de este tipo ya se ha puesto en práctica en el grupo de Kramer (Chu et al, 1986).

Un ensayo que utilice señales de RNA replicables del tipo que se describe para la detección de HIV-1 puede ser implementado para la detección de otros agentes infecciosos, pero en este momento esto no resultaría tan inmediato, ya que tal como

actualmente se lleva a cabo, se requeriría la síntesis de algunos oligonucleótidos (para las sondas de captura y la sonda de detección) y la construcción de plásmidos (para la preparación de la sonda replicativa y del blanco). A este respecto cabe señalar que un modelo de sonda replicable como el "switch" molecular que se ha detallado, de resultar exitoso, involucraría únicamente la síntesis de un nuevo oligonucleótido para cada nuevo ensayo que se quisiera implementar. Por otra parte, al eliminar las fuentes de "background" los límites de sensibilidad se superarían hasta poderse explotar todas las posibilidades de la extraordinaria amplificación con la replicasa de Q β .

ESTA BIBLIOTECA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA.

Bhattacharyya, A., and Lilley, D.M.J. (1989). The Contrasting Structures of Mismatched DNA Sequences Containing looped-out (bulges) and multiple mismatches (bubbles). Nucleic Acid Research. Vol17. No.17:6821-6840.

Chu, B.C.F., Kramer, F.R., and Orgel, L.E. (1986). Synthesis of an Amplifiable Reporter RNA for Bicassays. Nucleic Acid Research. 14,

Collins, M.L., Hunsaker, W.R., Badri, H., and Groody, P. (1987). Use of reversible target capture to detect one attomole of nucleic acid target nonisotopically in biological specimens in one hour. (En prensa).

Cullen, B.R., and Greene, W.C. (1989). Regulatory Pathways Governing HIV-1 Replication. Cell. 58:423-426.

DNA Probes. Applications in Genetic and Infectious Disease and Cancer. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor (1986)., edited by Leonard S. Lerman.

Dobkin, C., Mills, D.R., Kramer, F.R., and Spiegelman, S. (1979). RNA Replication: Required Intermediates and the Dissociation of Template, Product, and Q-beta Replicase.

Erlich, H.A., Gelfand, D.H., and Saiki, R.K., (1988) Specific DNA Amplification. Nature 331:461-462.

Fischer, S. G. and Lerman, L.S., (1980). Separation of Random Fragments of DNA according to Properties of their Sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:4420.

Franzen, L., Westin, G., Shabo, R., Aslund, L., Perlmann, H., Persson, T., Wigzell, H., and Pettersson, U. (1984). Analysis of Clinical Specimens by Hybridization with Probe Containing

Repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. A Novel Approach to Malaria Diagnosis. *Lancet* 1:525-528.

Gillespie, D. and Spiegelman, S., (1965). A Quantitative Assay for DNA-RNA Hybrids with DNA Immobilized on a Membrane. *J.Mol. Biol.* 12: 829-842.

Gonzalez A., Prediger, E., Huecas, M., Nogueira, N., and Lizardi, P.M. (1984) Mini chromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a High-sensitivity Detection Assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:3356-3360.

Harper, M.E., Marselle, L.M., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1986). Detection of Lymphocytes Expressing Human T-lymphotropic Virus Type III in Lymph Nodes and Peripheral Blood from Infected Individuals by *in situ* Hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:772-776.

Haruna, I., and Spiegelman, S. (1965a). Recognition of Size and Sequence by an RNA Replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54:1189-1193.

Haruna, I., and Spiegelman, S. (1965b). Autocatalytic Synthesis of a Viral RNA *in vitro*. *Science* 150:884-886.

Haseltine, W.A. and Wong-Staal, F. (1988). *Biologia Molecular del Virus del SIDA*. *Scientific American* (edición en español) 147:22-31

Kacian, D.L., Mills, D.R., Kramer, F.R., and Spiegelman, S. (1972). A Replicating RNA Molecule Suitable for a Detailed Analysis of Extracellular Evolution and Replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:3038-3042.

Kamen, R. (1970). Characterization of the Subunits of Q-beta Replicase. *Nature* 228, 527-533.

Kramer, F.R., Mills, D.R., Cole, P.E, Nishihara, T and Spiegelman, S. (1974). Evolution *in vitro*: Sequence and Phenotype

of a Mutant RNA Resistant to Ethidium Bromide. *J. Mol. Biol.* (1974) 83, 719-736.

Kramer, F.R. and Lizardi, P. (1989). Replicable RNA reporters *Nature* 339:401-402.

Kwok, S., Mack, D.H., Mullis, K.B., Poiesz, B., Erlich, G., Blair, D., Friedman-Kien, A., and Sninsky, J.J. (1987). Identification of Human Immunodeficiency Virus Sequences by Using In Vitro Enzymatic Amplification and Oligomer Cleavage Detection. *J. Virol.* 61(5):1690-1694.

Langer, P.P., Waldrop, A.A. and Ward, D.C., (1981). Enzymatic Synthesis of Biotin-Labeled Polynucleotides: Novel Nucleic Acid Affinity Probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:6633-6637.

Leary, J. J., Brigati, and Ward, D.C. (1983). Rapid and Sensitive Colorimetric Method for Visualizing Biotin-Labeled DNA Probes Hybridized to DNA or RNA Immobilized on Nitrocellulose Bio-Blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4045-4099.

Levisohn, R., and Spiegelman, S. (1968). The Cloning of a Self Replicating RNA Molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60: 866-872.

Mc Laughlin, G. L., Edlind, T.D., Campbell, G.H., Eller, R.F, and Ihler G.M. (1983). Detection of *Plasmodium falciparum* using Synthetic DNA Probe. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34 (5):837-840

Miele, E.A., Mills, D.R., and Kramer, F.R. (1983). Autocatalytic Replication of a Recombinant RNA. *J. Mol. Biol.* 171:281-295.

Mills, D.R., Kramer, F.R., Dobkin, C., Nishihara, T., and Spiegelman, S. (1975). Nucleotide Sequence of Microvariant RNA: Another Small Replicating Molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:4252-4256.

- Mills, D.R., Dobkin, C., and Kramer, F.R. (1978). Template-determined, Variable Rate of RNA Chain Elongation. *Cell* 15:541-550.
- Mills, D.R., Kramer, F.R., Nishihara, T., and Cole, P.E. (1980) Modification of Cytidines in a Q-beta Replicase Template: Analysis of Conformation and Localization of Lethal Nucleotide Substitutions. *Biochemistry* 19:228-236.
- Mills, D.R. (1988). Engineered Recombinant Messenger RNA can be Replicated and Expressed Inside Bacterial Cells by an RNA Bacteriophage Replicase. *J. Mol. Biol.* 200:489-500.
- Nishihara, T., Mills, D.R., Kramer, F.R. (1983). Localization of the Q-beta Replicase Recognition Site in MDV-1 RNA. *J. Biochem.* 93:669-674.
- Ou, C.Y., Kwok, S., Mitchell, S., Mack, D., Sninsky, J.J., Krebs, J.W., Feorino, P., Warfield, D. and Schochetman, G. (1988). DNA Amplification for Direct Detection of HIV-1 in DNA of Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Science* 239:295-297.
- Pellegrino, M.G., Lewin, M., Meyer, W.A., Lanciotti, L., Bhaduri-Hauack, D.J., Volsky, K., Sakai, T.M., Folks, T.M. and Gillespie, D. (1987). A Sensitive Solution Hybridization Technique for Detecting RNA in Cells: Application to HIV in Blood Cells. *BioTechniques* 5(5):153-159.
- Pellegrino M.G., Lewin M., Meyer III W.A., et al. A Sensitive Solution Hybridization Technique for Detecting RNA in Cells: Application to HIV in Blood Cells. *Biotechniques* 1987; 5:452-9.
- Ranki, M., Paalva, A., Virtanen M., Laaksonen, M., and Soderlund, H., (1983). Sandwich Hybridization as a Convenient Method for the Detection of Nucleic Acids in Crude Samples. *Gene* 21:77-85.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A., (1988) Primer-

Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science 239:487-491.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Aunheim, N., (1985). Enzymatic Amplification of Beta-globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. Science. 230:1350-1354.

Schaffner, W., Ruegg, K.J., and Weissmann, C. (1977). Nanovariant RNAs: Nucleotide Sequence and Interaction with Bacteriophage Q-beta Replicase.

Southern, E., (1975) Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503.

Thompson, J., and Gillespie, D. (1987). Molecular Hybridization with RNA Probes in Concentrated Solutions of Guanidine Thiocyanate. Analytical Biochemistry 163:281-291.

Zuker, M. and Stiegler, P. (1981). Optimal Computer Folding of Large RNA Sequences using Thermodynamics and Auxiliary Information. Nucleic Acid Research 9:133-148.

Zuker, M. (1989). On Finding All Suboptimal Foldings of an RNA Molecule. Science 244:48-52.

RESEARCH PAPERS/

EXPONENTIAL AMPLIFICATION OF RECOMBINANT-RNA HYBRIDIZATION PROBES

Paul M. Lizardi, Cesar E. Guerra, Hilda Lemelli, Isabel Tussie-Luna, and Fred Russell Kramer¹

Centro de Investigaciones Científicas, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 703, México, D.F., México; Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente, Toluca, México; and ¹Department of Biology, University of California, San Diego, La Jolla, California 92037

We have synthesized recombinant RNA molecules that function both as hybridization probes and as templates for exponential amplification by Q β replicase. Each recombinant consists of a sequence specific for the protozoan parasite, *Plasmodium falciparum*, embedded within the sequence of MDV-1 RNA, which is a natural template for Q β replicase. The probe sequence was inserted within a hairpin loop that occurs on the exterior of MDV-1 RNA. The recombinant RNAs hybridize specifically to complementary DNA, despite topological constraints on the probe domain, are replicated at the same rate as MDV-1 RNA, despite their additional length, and are able to serve as templates for the synthesis of a large number of RNA copies. A Q β replicase reaction initiated with only 0.14 femtograms of recombinant RNA (1,000 molecules) can produce 120 paragraphs of recombinant RNA product in 30 minutes. This report presents a one-billion fold amplification. Our results demonstrate the feasibility of employing exponentially replicatable RNAs in bioassays, where they would serve the dual role of specific probe and amplifiable reporter.

The very high specificity inherent in nucleic acid hybridization has given it potential as a critical tool for molecular biologists. There has been considerable interest in ways to improve that permit the amplification of hybridization signals to achieve levels of sensitivity that exceed those obtained with radioisotope assays. We have been working on the design and synthesis of replicatable probes that combine in a single molecule the dual functions of hybridization probe and amplifiable reporter. These novel molecules are recombinant RNAs that contain a probe sequence embedded within the sequence of a naturally occurring RNA that serves as a template for the RNA-directed RNA

synthesis (1) (2) (3) (4) (5). The structural and topological requirements for the recombinant RNAs are as follows: the presence of the probe does not interfere with replication, and must not be a major determinant of hybridization to its target, despite the presence of the sequences required for replication. Various conditions are met, in that these recombinant RNAs are able to function as templates for synthesis, which require the natural Q β proteins, are amplified by incubation with replicase, and are carrying a relatively large mass of recombinant RNA that would serve as a signal that hybridizes to the target.

The essential condition for the synthesis of new recombinant RNAs is the ability of the Q β replicase to synthesize a small number of template strands that initiate the synthesis of a large number of additional strands. Similar to the process in the case of the natural RNA, synthesis of the template strand of an exponential reaction requires that the template strand of the recombinant RNA be synthesized from the synthesis of a small number of template strands. Synthesis of complementary strands is dependent primarily upon the completion of the template strand, and not the presence of the 5' and 3' ends. Both strands are free to serve as templates in the next round of synthesis. Consequently, as long as there is an excess of template strands of recombinant RNA strands, it replicates exponentially. After the number of RNA strands equals the number of active template molecules, RNA synthesis ceases. In our work, we have achieved advantages by using the amplification of RNA by Q β replicase as the



FIGURE 1. Structure of plasmid pT⁺MDV-1 RNA. The heavy line indicates recombinant MDV-1 DNA. The restriction sites contained within the plasmid are represented by segments and dots along the circle. When the plasmid is cleaved with endonuclease *Hind* III and ligated in situ with T⁺ RNA polymerase, the resulting transcript, MDV-1 RNA, consists of an RNA copy of the plasmid embedded within the sequence of MDV-1 (+) RNA. The plasmid serves as a vector for the synthesis of recombinant RNAs.

basis of a signal-generating system; QB replicase is highly specific for its own template RNAs¹¹; as little as one molecule of template RNA can, in principle, initiate replication¹²; and the amount of RNA synthesized (typically, 200 ng in 50 μ l in 3 minutes) is large that it can be measured with the aid of simple colorimetric techniques.

Two developments led to the current work: the discovery that oligonucleotides can be inserted within the sequence of a small, naturally occurring template for QB replicase, MDV-1 RNA¹³, without interfering with its replicability¹⁴; and the availability of a plasmid that serves as a template for the synthesis of MDV-1 (+) RNA when the plasmid is introduced *in vivo* with bacteriophage T7 RNA polymerase. Moreover, in preparations we modified this plasmid by inserting a polylinker within the MDV-1 gDNA sequence. The subsequent insertion of probe sequences within the polylinker created plasmids that served as templates for the transcription of recombinant RNAs. In this report, we demonstrate that these novel recombinant RNA molecules fulfill the design goals, serving as both specific hybridization probes and as amplifiable reporters. The use of these molecules in actual bioassays will be reported elsewhere.

RESULTS

Synthesis of recombinant RNAs by transcription from plasmids. We set out to construct an RNA molecule that would serve both as a specific probe and as a template for QB replicase. We chose MDV-1 RNA as the parent molecule because modified MDV-1 RNAs can be synthesized by transcription from recombinant plasmids. Plasmid p17-MDV serves as a template for the synthesis of replicative MDV-1 RNA. We inserted a synthetic polylinker into the MDV-1 gDNA sequence of this plasmid, creating plasmid p17-MDV-poly (Fig. 1). Recombinant RNAs can be generated by inserting an heterogeneous DNA sequence into one of the unique restriction sites in the polylinker of p17-MDV-poly, and then using the resulting plasmid as a template for transcription by T7 RNA polymerase.

Design of the replicable probes. MDV-1 RNA contains many stem-loop secondary structures^{15,16} and the available evidence suggests that these structures are required for replication^{17,18}. The site that we chose for inserting potential probe sequences into MDV-1 RNA was known to be on the exterior of the molecule¹⁵, where the insert was less likely to disturb these structures. A repetitive DNA sequence from the bacteriophage *Phi*-median factor (*pho*)^{19,20} was chosen as a model probe. We had two main concerns when choosing the sequence of the probe: the inserted sequence must have to assume a single-stranded conformation for it to hybridize to its target sequence, and the inserted sequence must have to form secondary structures, the same as the product, and the template must form a nonreplicable duplex²¹. Since these two concerns imposed contradictory constraints on the design of the inserted sequence, we prepared two recombinant RNAs with inserts expected to assume different structures. The first recombinant, MDV-1alst RNA, was likely to possess an unstructured probe region, according to a computer analysis of its sequence²². The second recombinant, MDV-1alst RNA, differed from MDV-1alst RNA in a 5-nucleotide insertion, which was expected to form a more stable secondary structure in the region containing the probe. Figure 2 shows the nucleotide sequence and predicted secondary structure of MDV-1alst RNA, MDV-1alst RNA, and MDV-1poly RNA.

Replication of the recombinant RNAs. Four different RNAs were prepared by transcription *in vitro*. MDV-1

MDV-1poly, MDV-1alst, and MDV-1alst. Electrophoretic analysis of these transcripts (left panel of Fig. 3) demonstrated that the recombinants that contained probe sequences could easily be distinguished from the other

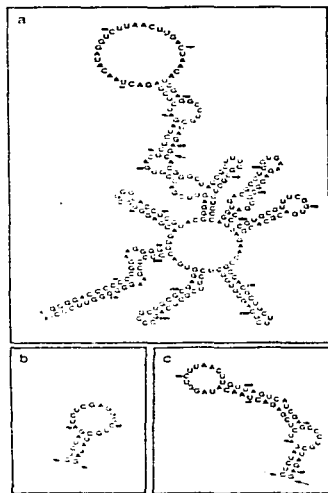


FIGURE 2. Nucleotide sequences of the recombinant transcripts folded into the most stable secondary structures predicted by a computer program to be most stable. MDV-1alst (+) RNA (a) contains a 5-nucleotide insert (shown below the arrow) in place of the 3-nucleotide segment. A site that occurs in natural MDV-1 (+) RNAs. The secondary structures that the computer program predicts in the region of the recombinant outside the insert are different from the secondary structures that were experimentally identified in MDV-1 RNA^{15,16}, suggesting that the probe sequence would have little effect on the topology of the MDV-1 domain. Bold letters indicate the nucleotides that are complementary to *Phi* phage DNA. The lower panels show the predicted secondary structure of the inserts present in MDV-1poly (+) RNA (b) and MDV-1alst (+) RNA (c).

transcripts by their relative mobility. The transcripts were then isolated from the reaction mixture and used as templates for the synthesis of additional RNA by Q β replicase. Kinetic analysis of the amount of RNA synthesized in the Q β replicase reaction in either panel of Fig. 3 demonstrated that both the structured and the unstructured recombinant RNAs were excellent templates for exogenous replication. Furthermore, kinetic kinetic analysis of the RNA synthesis in each Q β replicase reaction (right panel of Fig. 3) showed that the products were homogeneous as judged by the standard 10^4 ratio.

To compare the rate of replication of recombinant RNA in the rate of replication of MDV-1 RNA, Q β replicase reactions were initiated with mixtures of MDV-1 and (-) RNA and MDV-1 and RNA. The reactions were incubated for 20 minutes, permitting the synthesis of approximately ten million copies of each RNA. The RNA products of the reactions were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The results (Table I) indicate that despite recombinant RNA being 10% of the total, from that the MDV-1 RNA from which it was derived it is amplified at essentially the same rate as Q β replicase.

Exponential amplification when serial dilutions of a series of Q β replicase reactions were initiated with increasing amounts of MDV-1 and RNA. The results (Fig. 4) demonstrate that a reaction initiated with as few as 1000 molecules of recombinant RNA will give a product of 10⁹ molecules of recombinant RNA after 1 hour of incubation. Virtually identical kinetic results were obtained in parallel series of reactions initiated with MDV-1 and RNA, indicating that the relative lack of secondary structure of the products of MDV-1 and RNA had no effect on their rate of replication.

Electrophoretic analysis showed that the product of the recombinant RNA was a single complete band identified as MDV-1 RNA (see inset, Fig. 4). This was expected since the method used was for isolating Q β replicase products in a mixture with exogenous MDV-1 RNA. A method designed to remove RNA from the replicase has been published¹⁰ and was not employed in this work. Based on the time of incubation for the control reaction, an accurate estimation of the number of RNA molecules

equals the number of active replicase molecules, we estimate that only 40 molecules of MDV-1 RNA were present initially. This was confirmed by the following results: when a reaction was initiated with 200 molecules of MDV-1 and RNA, the 25-minute product contained 30% MDV-1 RNA, and a reaction initiated with only 10 molecules of MDV-1 and RNA contained mostly MDV-1 RNA.

The results also demonstrate a unique kinetic characteristic of Q β replicase synthesis of a set of reactions is incubated long enough to insure that all substrates have achieved saturation, that the amount of RNA present in each reaction will be directly proportional to the logarithm of the amount of RNA that was present initially. Fig. 5 studies the data shown in Fig. 4 to illustrate this relationship: the amount of RNA synthesized in 25 minutes is plotted against the logarithm of the number of recombinant molecules initially. The results demonstrate that the amount of recombinant RNA product which can be detected in our assay ranges over an accurate measure of the amount of RNA that was present initially over a range of at least six orders of magnitude.

Hybridization of the recombinant RNAs. Each of the recombinant RNAs was shown to bind specifically to denatured plasmids containing a known quantity of *P. falciparum* large subunit gene (Fig. 6). Neither recombinant RNA bound to control plasmids that lacked *P. falciparum* sequences. Furthermore, MDV-1 and RNA, which does not contain a protein gene, did not bind to either plasmid. Taken together, these results demonstrate that both recombinant RNAs bind specifically to their targets and that, under the hybridization conditions employed, the presence of structure in the probe protein has little effect on hybridization.

In another experiment, fragment versions of each recombinant probe were prepared by transcription from plasmids that had been digested with *Sma*I instead of *Sac*I. These reactions were only 10 nucleotides long and contained 10 nucleotides from the 3' end of MDV-1 and RNA and 10 nucleotides from the insert region, including the start codon sequence. Under the hybridization conditions employed, no difference could be observed between the hybridization of the truncated

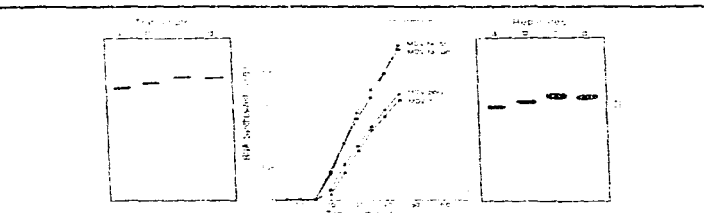


FIGURE 3. Replication of the recombinant RNAs. The left panel shows gel electrophoresis results which showed the relative mobilities of different transcripts. MDV-1 and RNA were the MDV-1 and RNA and MDV-1 and RNA. The numbers on the side of the panel indicate the length of each transcript in nucleotides. Q β replicase reactions were initiated with 200 fg of each transcript. Kinetic analysis (center panel) showed that approxi-

mately 100,000 copies of each transcript were synthesized in 20 minutes. The right panel shows analysis of the RNA prepared after 25 minutes against partially sheared DNA. The products were replicates of the transcripts. The products were probably one nucleotide longer than the transcripts since a nucleoside 5'-terminal adenosine is usually added during replication.¹⁰

MDV-1 and 2, and truncated versions of each transcribed from plasmids cleaved at the Sal I sites. After hybridization, the membranes were washed three times (15 min each) at 25°C with a solution containing 4x SSPE, 2 mg/ml sodium dodecyl sulfate, and 10% formamide, followed by two 15-min washes at 25°C in 1x SSPE, and a 15-min wash at 57°C in 1x SSPE. The hybridized RNA was detected by autoradiography.

Replication of recombinant RNAs after hybridization. To study the relative efficiency of the two methods for the synthesis of dsRNA, a 100- μ l aliquot of the hybridized RNA was extracted by boiling in 200 μ l of water for 30 min. The integrity of the original RNA was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The relative amounts of the original RNA was determined by measuring a Q β replicase fragment internal to the cistron. These reactions were followed and monitored in all three identities of the product RNA determined by polyacrylamide gel electrophoresis.

Acknowledgments

We are indebted to Donald Miller and A. M. S. for their contribution of plasmid pT7-M23. We thank William Barrett for providing a preparation of RSV RNA. Thanks to Nancy Sorenson and James Martin for their advice on immunological analysis. Georgia Fiala and Donna Lee, M.D., for their expert technical assistance. We thank a postdoctoral fellow for his excellent teaching of the theory and John Mack for his contribution of the illustrations. We gratefully acknowledge the primary support received for this project from the National Science Foundation (DMB 86-10129), the American Cancer Society (SCA 87-01), and the John D. and Catherine T. MacArthur Foundation. Contributions from Patents Disease Research, the National Institute of Health (NIH 35344), and the H. K. Muller Foundation (acknowledged in a letter of 1/1/88) are gratefully acknowledged. This project was in part supported by NSF Grant IBN 87-12427.

Received 25 July 1988; accepted 1 August 1988.

References

1. Gagnier, D. L., Sorenson, N. S., and Miller, D. R. 1978. RNA synthesis with RNA polymerase in a bacteriophage T7 DNA-RNA replicase system. *J. Mol. Biol.* 115:27-37.
2. Nish, K., Saito, D., Iwano, Y., Miyazaki, H., Iwano, T., Ishii, H., and Kuroki, M. 1983. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
3. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
4. Ishii, H., Iwano, T., and Nish, K. 1985. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
5. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
6. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
7. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
8. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
9. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
10. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
11. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
12. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
13. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
14. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
15. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
16. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
17. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.
18. Nish, K., Saito, D., Iwano, T., Miyazaki, H., Ishii, H., and Kuroki, M. 1984. Synthesis of a double-stranded genome sequence and its replication in the presence of a double-stranded replicase. *J. Virol.* 53:1076-1079.

19. Mills, D. R., Doherty, C., and Kramer, J. R. 1976. Temperature-dependent stability of RNA-RNA interactions. *J. Biol. Chem.* 251:1010-1014.
20. Nishikawa, T., Miki, D. R., and Kramer, J. R. 1979. Kinetics of the Q β replicase system in MDV-1 RNA. *J. Virol.* 31:1010-1014.
21. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
22. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
23. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
24. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
25. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
26. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
27. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
28. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
29. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
30. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
31. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
32. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
33. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
34. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
35. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
36. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
37. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
38. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
39. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
40. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
41. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
42. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
43. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
44. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
45. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
46. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
47. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
48. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
49. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
50. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
51. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
52. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
53. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
54. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
55. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
56. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
57. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
58. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
59. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
60. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
61. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
62. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
63. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
64. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.
65. Pringle, C., Kramer, J. R., and Mills, D. R. 1977. Evolution of the RNA replicase gene of a bacteriophage that encodes RNA replication. *J. Virol.* 22:1010-1014.

Quantitative Assays Based on the Use of Replicable Hybridization Probes

Hilda Lomeli,¹ Sanjay Tyagi,¹ Cynthia G. Pritchard,² Paul M. Lizarci,¹ and Fred Russell Kramer^{1,2}

Amplifiable hybridization probes—molecules with a probe sequence embedded within the sequence of a replicatable RNA—will promote the development of sensitive clinical assays. To demonstrate their utility, we prepared a recombinant RNA that contained a 30-nucleotide-long probe complementary to a conserved region of the *pol* gene in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mRNA. Test samples were prepared each containing a different number of HIV-1 transcripts that served as simulated HIV-1 mRNA targets. Hybridizations were carried out in a solution containing the chaotropic salt, guanidine thiocyanate. Probe-target hybrids were isolated by reversible target capture on paramagnetic particles. The probes were then released from their targets and amplified by incubation with the RNA-directed RNA polymerase, Q β replicase (EC 2.7.7.48). The replicase copied the probes in an exponential manner; after each round of copying, the number of RNA molecules doubled. The amount of RNA synthesized in each reaction (~50 ng) was sufficient to measure without using radioisotopes. Kinetic analysis of the reactions demonstrated that the number of HIV-1 targets originally present in each sample could be determined by measuring the time it took to synthesize a particular amount of RNA (the longer the synthesis took, the fewer the number of targets originally present). The results suggest that clinical assays involving replicatable hybridization probes will be simple, accurate, sensitive and automatable.

Additional Keyphrases: recombinant RNA • reversible target capture • paramagnetic particles • exponential amplification • Q β replicase • guanidine thiocyanate

Infectious agents may be quite rare in asymptomatic individuals who are infectious to others. For example, an asymptomatic individual may have as few as one in 100 000 peripheral blood mononuclear cells infected with the pathogenic retrovirus, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1),¹ or detected blood from that person will readily infect others (1). It is thus imperative that very sensitive clinical assays be developed for detecting HIV-1, across donated blood and to identify asymptomatic carriers. Suitable assays would make use of a macromolecular probe having extremely high affinity for a particular component of the infectious agent and very low affinity for all the other components of the sample. The highest specificities and most stable interactions known occur when a single-stranded oligonucleotide probe hybridizes to a complementary oligonucleotide target (2). For example, oligo-

nucleotide probes can seek out and bind to the integrated HIV-1 DNA, or the retroviral messenger RNA, present in a single infected cell.

However, the use of oligonucleotide probes is not sufficient to assure detection. An infected cell contains only about 6000 molecules of retroviral messenger RNA (3), so the problem becomes how to detect the probes once they are bound to such a small number of targets. The classic detection strategy is to attach reporter groups to the probes, such as fluorescent organic molecules or radioactive phosphate groups. More recently, protein groups have been incorporated into probes (4). After the probes have bound to their targets, enzymes such as peroxidase or phosphatase are linked to the biotin, then incubated with a colorless substrate, leading to the accumulation of a large number of colored product molecules for each enzyme-probe adduct (5). However, the practical limit of detection of these schemes is about 10³ target molecules. Clearly, they cannot be used to detect a single cell in a sample that contains only 6000 retroviral messenger RNAs.

A particularly attractive strategy for detecting rare targets is to link each probe to a replicatable reporter, which can be exponentially amplified after hybridization to reveal the presence of the probe (6). We recently described a novel version of this approach, in which a probe sequence was embedded within the sequence of a replicatable RNA (7). The resulting recombinant RNAs hybridize to their target sequences the same way as ordinary hybridization probes do and, as in a classical hybridization assay, nonhybridized probes are then washed away. The hybridized probes are then freed from their targets and released into solution. What makes these recombinant-RNA probes particularly useful is that they can then be exponentially amplified by incubation with the RNA-directed RNA polymerase, Q β replicase (8). We have demonstrated that as many as 10³ copies of each replicatable probe can be synthesized in a single 30-min incubation (7). Furthermore, the extreme specificity of Q β replicase for its own template RNA (9) assures that only the replicatable probe will be amplified. The large number of copies synthesized can easily be quantitated by incorporating radioactive nucleotides or by measuring the fluorescence of an intercalating dye such as ethidium bromide. Because as little as a single molecule of RNA can initiate exponential amplification (10), this approach offers the prospect of developing sensitive diagnostic assays.

Two developments led to our current work: the discovery that oligonucleotides can be inserted within the sequence of a small, naturally occurring template for Q β replicase, MDV-1 RNA (11), without interfering with its replicability (12); and the availability of a plasmid that serves as a template for the synthesis of MDV-1 mRNA when the plasmid is incubated in vitro with bacteriophage T7 RNA polymerase. We modified this plasmid by inserting a polylinker into the MDV-1 cDNA sequence. The subsequent insertion of a probe sequence within the polylinker creates a plasmid that serves as a template for transcription of recombinant-RNA probes (7). The site that we

¹ Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, 62270 Cuernavaca, Morelos, México.

² Department of Molecular Genetics, Public Health Research Institute, 435 First Avenue, New York, NY 10016.

³ Gene-Trak Systems, 31 New York Avenue, Framingham, MA 01701.

Address correspondence to this author.

Received May 15, 1989; accepted June 28, 1989.

those for inserting the polylinker and probe into MDV-1 RNA was known to be on the extent of the molecule, where the presence of the inserted sequence was less likely to interfere with replication, and where the remainder of the molecule was less likely to interfere with the hybridization of the probe sequence to its target. In our previous report (7), we demonstrated that these recombinant RNAs are bifunctional, that they hybridize specifically to complementary target sequences and retain the ability to be exponentially amplified by Q β replicase.

Here, we demonstrate the use of replicatable hybridization probes in a model assay designed to detect very small amounts of HIV-1 mRNA. We had two main concerns in selecting the assay format: (a) because of the dearth of developing a method that can screen a large number of samples, the selected format had to be fast and simple, thus precluding the fractionation of cells or the isolation of nucleic acids, and (b) because only hybrid probes are amplified by Q β replicase along with hybridized probes, we needed an extremely efficient means of removing the non-hybridized probes. Our first problem was solved by the dual discovery that hybridization is extremely efficient in solutions of the chaperone salt guanidinium thiocyanate (8), and that concentrated solutions of guanidine thiocyanate with lysozyme denature all proteins including nucleases, liberate nucleic acids from cellular matrices, and unwind DNA molecules, permitting hybridization to occur without interference from cellular debris (9). Our second problem was solved by the development of the "sandwich target capture" procedure (10). In this improved "sandwich hybridization" technique (15, 16), probe-target hybrids are bound to the surface of paramagnetic particles. After the particles are washed to remove non-hybridized probes, the hybrids are released from the particles and then bound to a new set of particles for another washing. Repeating this procedure several times dramatically reduces the number of non-hybridized probes (11).

We prepared recombinant RNAs containing a 30-nucleotide-long probe sequence complementary to a conserved region of the HIV-1 *pol* gene. We also prepared a set of serial dilutions of a stock solution of transcripts of the region of the HIV-1 genome that contains the *pol* gene to simulate different amounts of HIV-1 mRNA that might be present in clinical samples. An excess of replicatable HIV-1 probes was added to each sample. After hybridization in the presence of guanidine thiocyanate, the probe-target hybrids were isolated by the sandwich target capture in paramagnetic particles. The probes were then released from their targets and exponentially amplified by incubation with Q β replicase. Samples of each reaction were taken every minute during replication. The amount of RNA in each sample was then measured. The results demonstrate how kinetic data can be used for quantitative determination of the number of target molecules in a sample.

Materials and Methods

Enzymes and Deoxyribonucleosides

Bacteriophage T7 RNA polymerase (EC 2.7.7.8) was purchased from New England Biolabs, Beverly, MA, and calf thymus terminal deoxynucleotidyltransferase (EC 2.7.7.31) was obtained from Superfos, Bethesda, MD. Q β replicase (EC 2.7.7.49) was isolated from bacteriophage Q β -infected *Escherichia coli* Q13 by the procedure of Eoyang and August (17), with the hydroxylapatite step omitted. Q β replicase is stable when stored in a glycerol

solution at -20°C ; its activity remains unchanged after five years of storage. Single-stranded DNA fragments were prepared by using β -cyanoethyl phosphoramidite chemistry on a 380A synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Replicatable HIV-1 Probes

Recombinant MDV-1 RNA containing an inserted HIV-1 probe sequence was synthesized by transcription from a recombinant plasmid. The plasmid was constructed by inserting a synthetic probe sequence (prepared by annealing 5'-GGATCACCCTAGCAGCTGGTGAATAATTCGGCCATGCA-3' to 3'-GGATCTCTAAATGGCAGCAATTCACCAAGTCCGTCACGGT-5' into the Bcl I site of a plasmid that is identical to plasmid pTT-MDV-poly (7), except that the polylinker sequence is in the opposite orientation. The nucleotide sequence in the recombinant region of the cloned plasmid was confirmed by the chain termination procedure (18). The synthesis of replicatable probes by transcription from linearized recombinant plasmids with T7 RNA polymerase is described in detail elsewhere (7). The resulting transcripts were recombinant MDV-1 + RNAs containing a 30-nucleotide-long probe sequence that is complementary to nucleotides 622-653 in the *pol* gene of HIV-1 genomic RNA (20). Figure 1 shows the nucleotide sequence and predicted secondary structure of the transcribed RNA, MDV-hiv-1 RNA, which serves as an excellent template for exponential amplification by Q β replicase.

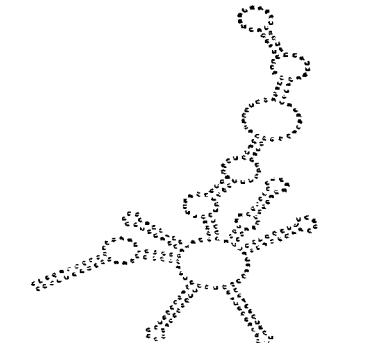


Fig. 1. Replicatable HIV-1 hybridization probe. The nucleotide sequence of MDV-hiv-1 RNA was folded into the secondary structure predicted by the most stable by a computer program (20). The probe sequence (bold letters) is located on the surface of the molecule, where it is free to hybridize to its target, and where it is less likely to interfere with the sequence and structure required for replication (21).

Capture Probes

Single-stranded DNAs containing 3'-poly(dA) tails were synthesized for use in binding probe-target hybrids to oligo(dT) groups on the surface of paramagnetic particles.

Four different oligodeoxyribonucleotides (of lengths 24, 40, 46, and 43 nucleotides) were prepared by automated synthesis. Each probe was representative to a different region of the HIV-1 *pol* gene near to the target of the replicatable probe. A poly(dA) tail was added to the 3' end of each probe by incubation with terminal deoxyribonucleosyltransferase (22).

Hybridization

Simulated HIV-1 mRNA targets were purchased from Gene-Trak Systems, Framingham, MA. These transcripts included a complete copy of the HIV-1 *pol* gene. Seven reaction tubes were prepared. Each contained simulated HIV-1 mRNA targets, MDV-1001-1 RNA, replicatable probes, and capture probes, dissolved in 10 μ l of 2.0 mol/L guanidine thiocyanate (GusCn) (Sigma), Hauppauge, NY, and placed in a polypropylene microtube (Eppendorf, Richmond, CA). Each tube contained 2×10^6 molecules of MDV-1001-1 RNA, 10^6 molecules of each capture probe, and a different number of target molecules. The number of HIV-1 transcripts in each tube was 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , and 10^{10} . The tubes were incubated at 37 $^\circ$ C for 12 h.

Reversible Target Capture

After the completion of hybridization, the probe-target hybrids were isolated from the reaction mixture by binding them to oligo(dT) groups on the surface of paramagnetic particles (14). These ferric oxide particles (1 μ m in diameter), purchased from Gene-Trak Systems, possess highly convoluted surfaces coated with oligo(dT) tails to which numerous oligo(dT) "hairs" have been covalently linked. We added 50 μ l of a suspension of paramagnetic particles to each reaction tube, reducing the guanidine thiocyanate (GusCn) concentration to 1.6 mol/L. The tubes were incubated at 37 $^\circ$ C for 10 min to allow the 3'-poly(dA) tails of the capture probes to hybridize to the oligo(dT) groups on the surface of the particles. The number of oligo(dT) groups available on the surface of the particles far exceeded the number of capture probes in the reaction. Because the target molecules are hybridized to the 5' end of the capture probes, the probe-target hybrids become linked to the surface of the particles (see Figure 2). If these had been actual clinical assays, and polyadenylated mRNAs had been present in the samples, the mRNAs would not have bound to the particles, because the poly(A) on the end of an mRNA forms a much weaker bond with oligo(dT) in concentrated GusCn solutions than does the poly(dA) on the end of a capture probe (14).

Because the particles are paramagnetic, they do not act as magnets, and they do not cling to each other. However, when placed in a magnetic field, they are drawn to the magnetic source. Accordingly, the paramagnetic particles, with the probe-target hybrids bound to their surface, were drawn to the walls of the microtubes by placing the tubes in the presence of the strong magnetic field provided by a magnetic separation device (purchased from Gene-Trak Systems). The supernates, which contained the nonhybridized probes, were then withdrawn from each tube by aspiration, and replaced by 200 μ l of a wash solution containing GusCn at 1.5 mol/L. The tubes were then withdrawn from the magnetic field, and the probe-target

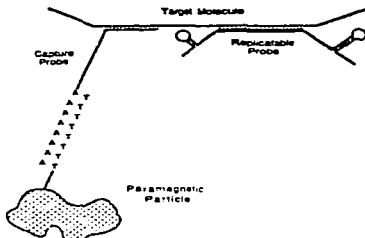


Fig. 2. Schematic representation of the complex formed when a capture probe links a probe-target hybrid to an oligo(dT) group on the surface of a paramagnetic particle.

The replicatable probe is a single-stranded RNA containing a target sequence (in green) preceded with the sequence of a replicatable RNA, indicated by the "A" in parentheses. The replicatable probe is joined by hydrogen bonds (indicated by lines) to its complementary target sequence, which the target molecule is. The target molecule contains a 3' poly(dA) tail. The capture probe is a single-stranded DNA that contains a 3' poly(dA) tail hybridized to a complementary sequence. Upon exposure to the target molecule, the target sequence of the capture probe is forced to leave the target molecule and hybridize to the 3' poly(dA) tail of the capture probe. The capture probe, on the surface of the paramagnetic particle, is hybridized to an oligo(dT) group on the surface of the paramagnetic particle. The hybrid formed by the 3' poly(dA) tail of the capture probe and the target sequence, forming the more stable probe-target hybrid, is released from the particle at higher concentrations of guanidine thiocyanate (14).

hybrids attached to the resuspended particles were washed by vigorous agitation on a multi-tube vortex-type mixer (American Hospital Supply, McGaw Park, Ill). The particles were again drawn to the walls of the tubes, the supernates were aspirated, another 200 μ l of 1.5 mol/L GusCn wash solution was added, and the particles were again agitated and drawn to the walls of the tubes. The supernates were again withdrawn by aspiration, but this time they were replaced with 50 μ l of a release solution containing 3.0 mol/L GusCn per liter.

The tubes were again removed from the magnetic field, agitated to resuspend the particles, and then incubated at 37 $^\circ$ C for 5 min in this more-concentrated GusCn solution, the relatively weak hybrids formed between the 3'-poly(dA) tails of the capture probes and the oligo(dT) groups on the surface of the particles came apart, releasing the probe-target hybrids back into solution. However, the much stronger hybrids formed between the capture probe and the target (and between the replicatable probe and the target) remained intact (14). The stripped particles were then drawn to the sides of the tubes, and the supernates (containing the released probe-target hybrids) were transferred to new tubes. The stripped particles were discarded and 50 μ l of a suspension of fresh particles was added to each new tube, reducing the GusCn concentration to 1.62 mol/L. The tubes were incubated at 37 $^\circ$ C for 10 min to allow the probe-target hybrids to be recaptured by the hybridization of the 3'-poly(dA) tails of the capture probes

to the oligo(dT) groups on the surface of the new particles. Transferring the probe-target hybrids from one set of solid surfaces to a new set of solid surfaces effectively removed any nonhybridized probes that adhere to surfaces. The entire process was repeated three times, which markedly reduced the number of nonhybridized probes.¹⁴ After the probe-target hybrids were captured onto the surface of particles for the third time, we washed them once in 200 μ L of 1.5 mol/L GuSCN solution and then twice in 200 μ L of a solution containing 100 mmol/L KCl in a nonchaotropic salt that preserves the hybrids per liter. To wash away the GuSCN. After removing the supernate from the last 100 mmol/L KCl wash by aspiration, we resuspended the particles in 50 μ L of 10 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 1 mmol of EDTA per liter. The resuspended particles were then incubated in this salt-free buffer at 37 $^{\circ}$ C for 10 min, which completely dissociated the probe-target hybrids. The particles were then grown to the walls of the tubes, leaving in each tube a supernate that contained an amount of MDV-1 hiv-1 RNA proportional to the number of target molecules originally present.

Exponential Amplification

We prepared seven replication reactions (23), each containing 35 μ L of the final supernate from the corresponding hybridization reaction. These MDV-1 hiv-1 RNA molecules were then amplified by incubation with 5.76 μ L of Q β replicase at 37 $^{\circ}$ C in 195 μ L of a solution containing, per liter, 100 μ mol of ATP, 40 μ mol of UTP, 100 μ mol of GTP, 420 μ mol of TTP, 7.5 mmol of MgCl₂, and 15 mmol of Tris-HCl (pH 7.5). The reactions were incubated in parallel, and 4- μ L aliquots were withdrawn from each of the seven reactions at 1-min intervals between 0 and 29 min of incubation and mixed with 35 μ L of an ice-cold solution containing 120 mmol/L NaCl and 20 mmol of EDTA-NaOH (pH 8) per liter. The EDTA in this solution chelated the magnesium in the sample, preventing further replication.

The size and homogeneity of the [³²P]RNA products in 5- μ L aliquots of each of the 147 samples were determined by electrophoresis through 8% polyacrylamide slab gels in the presence of urea, 7 mol/L (24). Finally, the [³²P]RNA products in a 10- μ L aliquot of each of the 147 samples were precipitated by the addition of 190 μ L of an ice-cold solution containing 350 mmol of phosphoric acid, 20 mmol of sodium pyrophosphate, and 2 mmol of EDTA per liter. The precipitated RNA in each sample was then electrostatically bound to a "Zeta-Probe" quaternary-amine-derivatized nylon

membrane (Bio-Rad) in a dot-blot vacuum filtering manifold (Bio-Rad). Each bound sample was washed 10 times with 200 μ L of the ice-cold precipitation solution to remove unincorporated [³²P]CTP. The membrane was then air-dried, and the amount of [³²P]RNA present in each sample on the membrane was made visible by autoradiography. After the autoradiograph was prepared, the amount of RNA present in each dot-blot was measured in a scintillation counter.

Results

We carried out model assays in which replicatable HIV-1 probes were hybridized to serial dilutions of simulated HIV-1 mRNA target molecules in the presence of guanidine thiocyanate (23). After hybridization, the resulting probe-target hybrids were isolated by three cycles of reversible target capture (24) on paramagnetic particles. The hybridized probes were then released from their targets and exponentially amplified by incubation with Q β replicase (75) with samples of each reaction being taken at 1-min intervals. Electrophoretic analysis of the size and homogeneity of the RNA in each sample indicated that only MDV-1 hiv-1 RNA was synthesized.

An aliquot of each sample was bound to a nylon membrane in a dot blot filtration apparatus and the [³²P]MDV-1 hiv-1 RNA in each aliquot was made visible by autoradiography. In the resulting autoradiogram (Figure 3), the density of each spot indicated the amount of RNA present at each time point. After the autoradiogram was prepared, the amount of RNA in each sample was measured with a scintillation counter. Although no RNA was apparent in the early time points, this was the period in which the RNA population increased exponentially (8). The RNA became visible in the autoradiogram at about the same time that the number of RNA molecules equaled the number of active replicase molecules (the "saturation point"). From that time on, the RNA population increased linearly (23). Thus, at those times when the RNA was visible in each reaction, the RNA population was increasing linearly.

The results demonstrate that the time at which the saturation point occurs in each amplification reaction is a function of the number of target molecules originally present in the corresponding hybridization reaction. The fewer target molecules that were originally present, the fewer the replicatable probes that were bound to targets, and thus the fewer replicatable probes available for amplification in the amplification reaction. Because amplification reactions initiated with fewer replicatable probes must undergo more

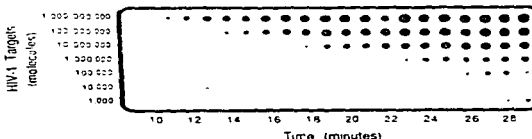


Fig 3. Kinetic analysis of amplification reactions initiated with replicatable probes isolated from hybridization reactions. Approximately 50 ng of MDV-1 hiv-1 RNA was synthesized in each amplification reaction. This amount of RNA is sufficient to have been accurately measured by the appearance of an increasing dye, such as ethidium bromide.

doublings of the RNA population before there are enough RNA molecules to achieve saturation, the kinetic data can be used to calculate the number of replicatable probes that were present at the beginning of the reaction. If known standards are included among the unknown samples to be tested, then these data can be used to determine the number of target molecules originally present in each unknown sample.

The results also indicate the limit of detection. The amplification reaction corresponding to the sample containing 10^7 targets achieved saturation at an earlier time than did the amplification reaction corresponding to the sample containing 10^8 targets. However, there was no significant difference in the amplification reactions corresponding to the samples containing 10^8 and 10^9 targets. Accordingly, the limit of detection was about 10 000 target molecules. Because electrophoretic analysis of the amplified RNA in each sample indicated that only recombinant RNA was synthesized, the limit of detection was determined by the level of persistence of nonhybridized replicatable probes. It is important to note that these were only preliminary assays, designed to demonstrate how replicatable probes might be used. Further experiments should lead to alterations in the assay format that will improve the sensitivity.

Discussion

During exponential synthesis, the time it takes for the RNA population to double is a constant for a given set of reaction conditions (27). If we know how many replicatable probes were initially present in a reaction, and if we know how long that reaction was incubated, then we can predict how many doublings have occurred and how many RNA molecules have been synthesized. Conversely, if we know how long it takes for a particular number of RNA molecules to be synthesized, then we can calculate how many molecules of replicatable probe were present initially. This relationship is summarized by the following equation:

$$N_t = N_0 2^{t/d}$$

where N_0 is the initial number of RNA molecules, t is the time of incubation, d is the characteristic time it takes for the RNA population to double, and N_t is the number of RNA molecules present at time t . Taking the logarithm of each side of the equation and rearranging algebraically:

$$\log N_t = \left(\frac{-\log 2}{d} \right) t + \log N_0$$

where $(-\log 2)/d$ is a constant. If we consider the situation that occurs when we determine the time it takes for each reaction to synthesize a particular number of RNA molecules, then $\log N_t$ will also be a constant and t will represent the time it takes for the RNA population to grow to N_t molecules. There will then be an inverse linear relationship between t and $\log N_0$. Therefore, if we have a reliable method for determining the time it takes for an exponentially replicating RNA population to grow to a particular (though arbitrary) number of molecules, then we can accurately determine the initial number of replicatable probes.

There is a good method for determining how long it takes for a particular number of RNA molecules to be synthesized. An intercalating fluorescent dye, such as ethidium bromide, can be included in the RNA amplification reaction mix-

ture. Ethidium bromide becomes fluorescent when it interacts with the secondary structures present in replicatable probes. An ethidium bromide concentration of about 1 μ mol/L would give a good signal, without significantly inhibiting replication (23). A simple instrument could periodically monitor the fluorescence of the ethidium bromide in an entire set of amplification reactions. Initially, the number of RNA molecules would be too low to produce an appreciable fluorescence. However, as exponential synthesis proceeds, the fluorescence would increase. The instrument would be programmed to store the kinetic data and to use these data to determine the time for each reaction at which the fluorescence corresponds to the presence of a particular number of RNA molecules, the "endpoint".

The necessary standards in the hybridization reaction, each containing a known number of target molecules, would permit the establishing of a "standard curve" in which the absorbance of the standard target molecules would be inversely proportional to the time at which the endpoint is reached, as depicted in the second equation. The number of target molecules in each of the unknown samples would then be determined by comparing their endpoints with those on the standard curve. This method is readily automatable; it would not require a radioactive compound, the fluorimetry of the fluorescent signal at the endpoint would be simpler than the reactions and would be well above the fluorescence background; the assay would be accurate, and the quantitative nature of the standard curve would permit the determination of the number of targets in a sample over an extremely wide range of target concentrations.

There is an alternative method for analyzing the data once the saturation point is reached in an amplification reaction: the number of RNA molecules increases linearly with time. For example, in Figure 3, by the time the reactions had been incubated for 28 min, they had all passed the saturation point and were in the linear phase of synthesis. A comparison of the amounts of RNA present in each sample at 28 min shows that the most RNA is present in those samples that correspond to the hybridization reactions that contained the most targets. Because these reactions were initiated with the greatest number of replicatable probes, they reached the saturation point sooner and had the longest period of time to synthesize RNA in the linear phase. We can analyze the data by using the direct linear relationship between the amount of RNA present at a particular (though arbitrary) time in the linear phase and the logarithm of the number of replicatable probes that initiate a reaction (7). If known standards are included among the unknown samples to be tested, then this method can be used to determine the number of target molecules present in each unknown sample. Because it is relatively simple to design an assay to measure the amount of RNA synthesized in a reaction that is incubated for a fixed length of time, this alternative analytical approach would be an inexpensive method for detecting infectious agents in the field.

The model assay we have described demonstrates that replicatable hybridization probes can be used in quantitative assays designed to detect rare targets. Further experiments will be needed to develop actual clinical assays for measuring the number of HIV-1 RNA molecules in blood samples. However, it is clear that these assays will be simple, accurate, sensitive, and automatable.

We thank our colleagues, Mark Collins, Robert DiFrancesco, Cesar Guerrero, Donald Mahan, Leslie Orgel, Donna Lee Regei, James Stefano, Isabel Tunes-Luna, and David Zhang, for many of their intellectual and experimental contributions to the assay. This work was supported by the National Science Foundation (DMB-86-16429), the John D. and Catherine T. MacArthur Foundation, and Gene-Trak Systems. H. L. is the recipient of a predoctoral fellowship from el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT).

References

1. Harper ME, Marselle LM, Gallo RC, Wine-Saal F. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by *in situ* hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:772-6.
2. Gillespie D, Spiegelman S. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immunized on a membrane. *J Mol Biol* 1983;13:209-42.
3. Pellegino MG, Lewin M, Meyer III WA, et al. A sensitive solution hybridization technique for detecting RNA in cells: application to HIV in blood cells. *Biochemistry* 1987;5:452-9.
4. Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:6633-7.
5. Leary JJ, Briggs DJ, Ward DC. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: bio-blot. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:4045-5.
6. Chu BCF, Kramer FR, Orgel LE. Synthesis of an amplifiable reporter RNA for biosensors. *Nucleic Acids Res* 1986;14:509-673.
7. Lizardi PM, Guerrero CE, Lomeli H, Tunes-Luna I, Kramer FR. Exponential amplification of recombinant RNA hybridization probes. *Biochemistry* 1987;6:1187-200.
8. Haruna I, Spiegelman S. Autocatalytic synthesis of a viral RNA in *in vitro* systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:404-9.
9. Haruna I, Spiegelman S. Determination of size and sequence by an RNA replicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:1189-93.
10. Lizardi PM, Spiegelman S. The cloning of a self-replicating RNA molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:696-70.
11. Kacoun OL, Mills DR, Kramer FR, Spiegelman S. A replicating RNA molecule suitable for a detailed analysis of extracellular evolution and replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:3036-42.
12. Mills EA, Mills DR, Kramer FR. Autocatalytic replication of a recombinant RNA. *J Mol Biol* 1983;171:281-95.
13. Thompson J. G. Molecular hybridization with RNA probes in concentrated solutions of guanidine thiocyanate. *Anal Biochem* 1987;161:281-91.
14. Morassey DV, Lombardo M, Eldredge JK, Kearney KR, Groody EP, Collins ML. Nucleic acid hybridization assays employing DNA-tailed capture probes. I. Multiple capture methods. *Anal Biochem* 1989;81:245-59.
15. Ranki M, Palva A, Virzeman M, Laakkonen M, Soderlund H. Sandwich hybridization as a convenient method for detection of nucleic acids in crude samples. *Gene* 1983;21:77-85.
16. Svavén A-C, Laakkonen M, Soderlund H. Fast quantification of nucleic acid hybrids by affinity-based hybrid collection. *Nucleic Acids Res* 1986;14:5037-46.
17. Eovang L, Aisac JT. Q β RNA polymerase from phage Q β infected *E. coli*. In: Cantoni GL, Davis DR, eds. *Procedures in nucleic acid research*, Vol 2. New York: Harper and Row, 1971:829-39.
18. Sawyer F, Nicklen S, Coulson AJC. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3703-7.
19. Musing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benson CV, Laaky LA, Carson DJ. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS lymphadenopathy retrovirus. *Nature (London)* 1983;313:460-4.
20. Zuker M, Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamic and auxiliary information. *Nucleic Acids Res* 1981;9:135-48.
21. Nishihara T, Mills DR, Kramer FR. Localization of the Q β replicase recognition site in MDV1 RNA. *J Biol Chem* 1983;258:9209-24.
22. Nelson T, Brattig D. Addition of homopolymers to the 3' ends of duplex DNA with terminal transferase. *Methods Enzymol* 1979;68:41-50.
23. Kramer FR, Mills DM, Cole EE, Nishihara T, Spiegelman S. Evolution *in vitro* sequence and phenotype of a mutant RNA resistant to riboflavin bromide. *J Mol Biol* 1974;89:11-26.
24. Matsuda T, Jeffrey A, van derLinde H. Chain-length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polycrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 1975;14:3747-54.