

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/07885 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Februar 1999 (18.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04877 (22) Internationales Anmeldedatum: 5. August 1998 (05.08.98) (30) Prioritätsdaten: 97113601.5 6. August 1997 (06.08.97) EP (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ROHDE, Wolfgang [DE/DE]; Untergasse 29, D-35418 Busek (DE). BECKER, Dieter [DE/DE]; Stuppstrasse 14, D-50823 Köln (DE). SALAMINI, Francesco [IT/DE]; Carl-von-Linné-Weg 1, D-50829 Köln (DE). (74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: THE USE OF PRIMERS FOR UNIVERSAL FINGERPRINT ANALYSIS (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON PRIMERN FÜR UNIVERSELLE FINGERPRINT-ANALYSEN (57) Abstract The invention relates to the use of primers and primer pairs for DNA fingerprint analysis. According to the invention, finger prints can be obtained from people, animals, plants and micro-organisms with the primers and primer pairs. The invention also relates to the primers or primer pairs used for this purpose, and to kits containing the primers or primer pairs. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft die Verwendung von Primern oder Primerpaaren zur DNA-Fingerprint-Analyse, wobei mit den Primern oder Primerpaaren Fingerprints sowohl vom Menschen, als auch von Tieren, also auch von Pflanzen als auch von Mikroorganismen erhältlich sind. Die Erfindung betrifft ferner Primer oder Primerpaare zur vorstehend genannten Verwendung sowie Kits, die die Primer bzw. Primerpaare enthalten.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von Primern für universelle Fingerprint-Analysen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Primern oder Primerpaaren zur DNA-Fingerprint-Analyse, wobei mit den Primern oder Primerpaaren Fingerprints sowohl vom Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen als auch von Mikroorganismen erhältlich sind. Die Erfindung betrifft ferner Primer oder Primerpaare zur vorstehend genannten Verwendung sowie Kits, die die Primer bzw. Primerpaare enthalten.

Nachfolgend werden Dokumente aus dem Stand der Technik zitiert, deren Offenbarungsgehalt hiermit durch Bezugnahme in dieser Anmeldung enthalten ist.

Es ist allgemein bekannt, daß die Anwesenheit polymorpher und heterogen verteilter repetitiver Sequenzen wie Mikrosatelliten für genetische Analysen Verwendung findet.

Es ist auch allgemein bekannt, daß Retrotransposons wie die copia-Elemente aus *Drosophila* und copia-ähnliche Elemente in anderen Spezies des Tier- und Pflanzenreichs in der Regel als Mehrfach-Kopien in Genomen enthalten sind. Repetitive Genomsequenzen dieser Art sind am Beispiel copia-ähnlicher Elemente in *Pisum* (Erbse) zur genetischen Analyse dieser Pflanzenspezies benutzt worden (Lee u.a., *Plant Mol. Biol.* 15: 707-722, 1990). Diese von den Autoren als OFLP bezeichnete Methode basiert auf einem copia-spezifischen Primer und als zweitem Primer für die PCR-Amplifikation einer Sequenz aus dem diese Retrotransposons flankierenden Erbsengenom. Damit ist es möglich geworden, Erbsensorten durch PCR-Amplifikation bestimmter Elemente der Erbsen-copia-Familie zu amplifizieren und durch Auftrennung der nicht-radioaktiv markierten PCR-Produkte im Agarosegel auf Polymorphismen zu testen und genetische

Verwandtschaften zu bestimmen. Auch andere Retrotransposons, z.B. Tos1-1, Tos2-1 und Tos3-1 aus Reis haben als molekulare genetische Marker zur Differenzierung und Identifizierung von Reis-Kultivaren durch RFLP-Analyse Verwendung gefunden (Fukuchi u.a., Jap. J. Genetics, 68: 195-204, 1993), wobei aber auch hier postuliert wurde, daß für andere Pflanzenspezies deren endogene Retrotransposons als molekulare Marker isoliert werden. Eine andere Arbeit (Purugganan und Wessler, Mol. Ecology 4: 265-269, 1995) benutzt eine auf PCR basierende Methode, welche die Variation in Spaltstellen für Restriktionsenzyme auf transponierbaren Elementen für eine Fingerprint-Analyse ausnutzt. Allen diesen im Stand der Technik beschriebenen Verfahren ist jedoch gemeinsam, daß die dort beschriebenen genetischen Marker bzw. Primer nicht universell bei Menschen, Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen einsetzbar sind. Es liegt auf der Hand, daß die Bereitstellung derartiger genetischer Marker oder Primer in vielen Bereichen der modernen Biologie oder Medizin wesentliche Vorteile mit sich bringen würde. Ein entscheidender Schritt in diese Richtung wurde mit der bislang nicht veröffentlichten internationalen Patentanmeldung PCT/EP97/00442 getan. Dort wird die Verwendung von Primern zur Fingerprint-Analyse beschrieben, wobei die Primer an das copia-ähnliche Element aus der Kokusnuß hybridisieren. Erstmals konnten mit dieser Anmeldung Primer bzw. Primerpaare bereitgestellt werden, die sich zur Fingerprint-Analyse sowohl im Menschen, als auch in Tieren, wie auch in Pflanzen und Mikroorganismen eignen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war, die vorstehend beschriebenen Nachteile aus dem publizierten Stand der Technik zu überwinden und Wege und Mittel bereitzustellen, die eine möglichst universelle Anwendbarkeit von Primern bzw. genetischen Markern bei der Fingerprintanalyse von Arten sowohl aus dem Tier- als auch aus dem Pflanzenreich wie auch beim Menschen und bei Mikroorganismen gestatten. Hinsichtlich der PCT/EP97/00472 sollten weitere Bereiche innerhalb der copia-ähnlichen Elemente identifiziert werden, die eine besonders vorteilhafte Ableitung der Primer gestatten bzw. sollten weitere vorteilhafte Primer identifiziert werden.

Die Lösung dieser Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

Vom publizierten Stand der Technik aus gesehen wurde nämlich überraschenderweise gefunden, daß Primer, die mit dem nachstehend näher

gekennzeichneten Bereichen aus dem copia-ähnlichen Element aus der Kokosnuß (*Cocos nucifera* L.) hybridisieren, und dort eine Fingerprint-Analyse ermöglichen, auch bei vielen anderen Spezies aus dem Tier- und Pflanzenreich einschließlich der Hefe wie auch beim Menschen und sogar Mikroorganismen mit Erfolg eingesetzt werden können. Dieser Befund erlaubt die universelle Anwendbarkeit der genannten Primer zur Fingerprint-Analyse im gesamten Tier- und Pflanzenreich sowie beim Menschen und bei Mikroorganismen.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung eines Primers oder Primerpaares zur DNA-Fingerprint-Analyse, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint sowohl von Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen als auch von Mikroorganismen erhältlich ist, und wobei der Primer oder das Primerpaar an DNA, die die Endonuclease, die Reverse Transcriptase oder die RNase H eines copia- oder copia-ähnlichen Elements insbesondere aus der Kokosnuß (*Cocos nucifera* L.) codiert, hybridisiert.

Erfindungsgemäß hybridisiert der Primer/das Primerpaar mit Organismen aus mindestens einer Spezies der vorstehend genannten taxonomischen Gruppen.

Dabei werden die in dieser Erfindung beschriebenen überraschenden Ergebnisse sowohl mit beliebigen Kombinationen unterschiedlicher Primer gegenläufiger Orientierung erreicht, die nur die Bedingung erfüllen müssen, daß sie an die vorstehend genannten DNAs hybridisieren, als auch unter Einsatz eines einzigen Primers, der aufgrund der Repetition des copia- oder copia-ähnlichen Elements, allerdings in 5'→3'/3'→5' Orientierung zweier benachbarter Elemente und nicht wie in Figur 2B dargestellt, in 5'→3'/5'→3'-Orientierung, ebenfalls die hochpolymorphen Fingerprints bereitstellt. Die vorstehend gewählte Begriffsbestimmung für die Primer schließt selbstverständlich ein, daß diese auch an DNAs anderer Organismen hybridisieren, sofern diese DNA-Sequenzen enthalten, die DNA-Sequenzen aus dem vorstehend genannten copia- oder copia-ähnlichen Element entsprechen.

Die Bedingungen, unter denen eine Hybridisierung der Primer und nachfolgende Amplifikation erfolgt, ist für den Fachmann ohne erfinderisches Bemühen aus dem Stand der Technik und dem nachfolgenden Beispielen ableitbar. Geeignete Bedingungen für die Hybridisierung der Primer und/oder der nachfolgenden Amplifikation können beispielsweise dem Lehrbuch Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989 (hiermit durch Bezugnahme enthalten) entnommen werden oder auch den nachfolgenden Beispielen.

Der Begriff "an DNA, die die Endonuclease, die Reverse Transcriptase oder die RNase H eines copia- oder copia-ähnlichen Elements insbesondere aus der Kokosnuß (*Cocos nucifera* L.) codiert, hybridisiert", bedeutet im Sinne dieser Erfindung, nicht nur, daß der Primer vollständig und in seiner gesamten Länge an diese DNA hybridisiert. Er bedeutet vielmehr auch, daß er an eine DNA hybridisiert, die mit der vorstehend definierten codierenden DNA überlappt. Dabei umfaßt der Überlappungsbereich mindestens 1 Nukleotid, vorzugsweise mindestens 5 Nukleotide und besonders bevorzugt mindestens 10 Nukleotide.

Die Länge der in dieser Erfindung verwendeten Primer beträgt vorzugsweise 15 bis 30 Nucleotide. Allerdings ist die Erfindung auch mit kürzeren oder mit längeren Primern durchführbar.

Der vorliegende Befund ist umso überraschender, als in der Regel im Stand der Technik davon ausgegangen worden ist, daß Primer lediglich in taxonomisch eng gesteckten Grenzen eingesetzt werden können, wenn aussagekräftige Fingerprints erhalten werden sollen.

Im Stand der Technik wurde von Rohde u.a. (J. Genet. & Breed., 46: 391-394, 1992) beschrieben, daß im Genom der Kokosnuß (*Cocos nucifera* L.) hochrepetitive Sequenzen mit Homologie zu auch in anderen Spezies beschriebenen copia-Elementen vorhanden sind, die nach Restriktion isolierter genomischer DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI und Auftrennung im Agarosegel als zwei, jeweils 1.3 und 1.4 Kilobasen große DNA-Banden sichtbar sind. Drei dieser "Ecorep" genannten DNA-Fragmente wurden nach Subklonierung sequenziert, und es konnten Sequenzunterschiede festgestellt werden. Versuche, diese Unterschiede für die genetische Analyse verschiedener Kokosnuß-Typen durch die Verwendung von Ecorep-Sequenzen als molekulare Sonde in RFLP-Analysen oder durch sequenzspezifische PCR-Primer auszunutzen, waren nicht erfolgreich (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 46: 391-394, 1992; Rohde, in: "La Recherche Europeenne au Service du Cocotier - Actes du Seminaire - 8-10 septembre 1993, Montpellier". CIRAD (Collection: Colloques du CIRAD), Montpellier, S. 41-52).

Es wurde kürzlich für drei Kokosnuß-Typen gefunden, daß Subfamilien dieser 1.3 bzw. 1.4 Kilobasen großen Ecorep-Sequenzen existieren, in denen diese Elemente auf dem Kokosnuß-Genom nahe beieinander liegen d.h. in tandem wiederholt sind, und in denen in der Regel zumindest eine der beiden von den früher

identifizierten Elementen (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 46: 391-394, 1992) zu erwartenden EcoRI-Spaltstellen an den Enden der zunächst als "Spacer-Region" bezeichneten Sequenz fehlt (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995). Diese Spacer-Region zeigt hohe Homologie zu dem copia-ähnlichen BARE-1-Element aus Gerste (Fig. 1A; Manninen und Schulman, Plant. Mol. Biol., 22: 829-846, 1993). Bei dieser Subfamilie copia-ähnlicher Sequenzen im Kokosnuß-Genom handelt es sich daher um in tandem wiederholte Sequenzen, die Homologie zur Endonuclease- und Reversen Transkriptase/RNaseH-Region eines copia- bzw. copia-ähnlichen Elements aufweisen (siehe Fig. 1B). Die beobachteten Sequenzunterschiede in den Elementen dieser Subfamilie ließen sich jetzt - im Gegensatz zu den oben beschriebenen Versuchen für die Ecorep-Sequenzen - mit dem vorstehend beschriebenen, geeigneten PCR-Primern für die genetische Analyse in Kokosnuß ausnutzen. Dieses Verfahren zur Genomanalyse in Kokosnuß wurde als ISTR(inverse sequence-tagged repeat)-Analyse bezeichnet.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß diese Subfamilie mit hoher Sequenzkonservierung offensichtlich ubiquitär in der Pflanzen- und Tierwelt sowie beim Menschen und in Mikroorganismen vertreten ist, da die Verwendung der identischen ISTR-Primer (siehe auch Tabellen 1 und 2), wie sie auf der Basis der erfindungsgemäß ermittelten Kokosnußsequenzen entwickelt wurden, sowohl für andere Pflanzenspezies als auch für Tiere und den Menschen sowie den Mikroorganismen hochpolymorphe DNA-Fingerprints ergibt. Dabei lassen sich nicht nur eine Vielzahl von polymorphen Markern entdecken, die in der Nachkommenschaft segregieren ("single locus/multiple allele"-Marker), sondern es entstehen auch neue polymorphe Marker (Individuum-spezifische Marker), die z.B. in kontrollierten Kreuzungen (Beispiele Rind, Schaf) weder im Vater noch in der Mutter vorhanden sind und möglicherweise auf Rekombinationsereignisse oder die Amplifikation bestimmter genomischer Bereiche zurückzuführen sind. Jeder Fingerprint ist folglich einzigartig für den individuellen Nachkommen bei identischen Eltern. Im Humanbereich konnte gezeigt werden, daß dies sogar für eineiige Zwillinge gilt, die für mehrere der verwendeten ISTR-Primer-Paare voneinander verschiedene Fingerprints zeigten (siehe Fig. 8).

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist somit dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint mit DNAs aus dem gesamten Mikroorganismen-, Tier- und Pflanzenreich, umfassend

- (a) das Tierreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die Metazoen, darin enthalten die Unterstämme der Vertebraten, dabei vorzugsweise die Klasse der Säugetiere, darin enthalten insbesondere die Familie der Hominiden und die Familie der Bovidae, darin enthalten die Spezies *Bovis taurus* und *Ovis aries*, sowie alle Rassen und Varietäten, die sich aus den entsprechenden Spezies ableiten lassen;
 - (b) das Pflanzenreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die der Mycobionta und Cormobionta, bei letzterer vorzugsweise die Abteilung der Spermatophyten, darin vorzugsweise die Klasse der Monocotyledonae mit ihren Familien der Areaceae und ihren Vertretern der Spezies *Cocos nucifera* oder der Familie der Poaceae mit ihren Vertretern der Spezies *Hordeum vulgare* und *Zea mays*, außerdem besonders bevorzugt die Klasse der Dicotyledonae mit ihren Familien, z.B. der Solaneceae und ihrem Vertreter der Spezies *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida*, oder z.B. die Familie der Brassicaceae mit ihrem Vertreter der Spezies *Brassica napus* oder die Familie der Chenopodiaceae mit ihrem Vertreter *Beta vulgaris* sowie alle Varietäten und Sorten, die sich von der entsprechenden Spezies ableiten lassen;
 - (c) den Menschen; und
 - (d) Mikroorganismen umfassend prokaryotische Mikroorganismen, dabei vorzugsweise Gram-positive Bakterien wie z.B. Milchsäurebakterien, *Sarcina* und Coryneforme Bakterien und Gram-negative Bakterien wie z.B. *Neisseria* und Enterobakterien, und eukaryotische Mikroorganismen umfassend Pilze, dabei vorzugsweise Phycomyceten wie z.B. *Phytophthora* und Ascomyceten wie z.B. Hefen
- erhältlich ist.

Besonders vorteilhaft im Sinne der erfindungsgemäßen Verwendung ist, daß Fingerprints vergleichbarer Auflösung und Sensitivität mit DIG-markierten PCR-Produkten direkt im Gel ohne die generell in bekannter Weise vorgenommene Übertragung der DNA-Fragmente auf Membranen (Southern Blot) sichtbar gemacht wurden. Damit ist die Erstellung derartiger Fingerprints in einfachster Weise (Auftrennung der PCR-Fragmente im Sequenzgel, direkter Nachweis im Gel, Computer-unterstützte Datenanalyse durch direktes Einscannen der Sequenzgele) ohne die Verwendung von Radioaktivität ermöglicht worden.

Somit ist eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung dadurch gekennzeichnet, daß die zu analysierenden DNAs mit dem Primer oder dem Primerpaar durch PCR amplifiziert und nachfolgend der Größe nach auf einem Gel aufgetrennt werden.

Der Fachmann weiß aus dem Stand der Technik, wie er die Bedingungen für eine geeignete PCR auszuwählen hat. Auch Verfahren zur Auftrennung von PCR-amplifizierten DNAs auf einem Elektrophorese-Gel, das vorzugsweise ein Polyacrylamidgel ist, ist dem Stand der Technik zu entnehmen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Gel ein Sequenzgel. Die Herstellung von Sequenzgelen ist ebenfalls im Stand der Technik bekannt und beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet, daß als weiterer Schritt ein Southern Blot durchgeführt wird, und die auf die Membran übertragenen DNAs durch Hybridisierung mit einer Sonde sichtbar gemacht werden.

Diese Ausführungsform ist als Alternative zu den vorstehend beschriebenen beiden Ausführungsformen zu sehen. Sie erfordert zwar mehr Aufwand und den Umgang mit Radioaktivität, ist jedoch durchaus für Labors geeignet, die eine weniger aufwendige Laboreinrichtung betreiben, so z.B. keinen Scanner mit daran angeschlossenen Computer besitzen. Die Durchführung von Southern Blots sowie die Hybridisierungen mit einer geeigneten Sonde sind ebenfalls im Stand der Technik bekannt und beispielsweise in Sambrook et al., a.a.O., beschrieben.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist die Sonde der erfindungsgemäße Primer bzw. das erfindungsgemäße Primerpaar.

Da die Primer Bestandteil der amplifizierten DNA sind, ist durch sie in einfacher Weise auch ein Nachweis der Banden auf der für den Southern Blot verwendeten Membran möglich.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung trägt der Primer oder das Primerpaar eine Markierung.

In einer besonders bevorzugten Verwendung ist die Markierung eine nicht-radioaktive Markierung, insbesondere Digoxigenin, Biotin oder ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Farbstoff oder eine radioaktive Markierung, insbesondere ^{32}P .

Insbesondere die Markierung der Primer mit Digoxigenin und die Anfärbung nach Amplifikation der DNA und gelelektrophoretischer Auftrennung direkt im Gel kann von allen Labors oder interessierten Züchtern unter Einsatz eines geringen Geräteaufwands (PCR-Reaktion, Elektrophorese auf Sequenzgelen) und Verzicht auf Radioaktivität verwendet werden. Die Speicherung und Verarbeitung der Daten geschieht vorzugsweise durch direktes Einlesen des gefärbten und getrockneten Gels mittels Scanner in einen Computer. Weiterhin ist die Möglichkeit gegeben, durch Reisolierung von PCR-Produkten aus dem Sequenz-Gel, Reamplifikation und Sequenzierung spezifische Primer zu entwickeln, die allel-spezifische Amplifizierungsprodukte ergeben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der Primer eine der in Tabelle 2 angegebenen Sequenzen auf.

Diese Primer sind bevorzugte Beispiele der von den Erfindern in bisherigen DNA-Fingerprint-Analysen angewendeten Primer.

Ferner ist in der erfindungsgemäßen Verwendung besonders bevorzugt, daß der Primer eine Sequenz aufweist, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt. Dabei umfaßt der Überlappungsbereich mindestens 1 Nukleotid, vorzugsweise mindestens 5 Nukleotide und besonders bevorzugt mindestens 10 Nukleotide.

Die Sequenz dieser in der erfindungsgemäßen Verwendung einsetzbaren Primer kann nach Standardverfahren ermittelt werden, beispielsweise durch Sequenzierung der Sequenzen, die den in den Tabellen 1 und 2 dargestellten Oligonukleotidsequenzen in den copia- oder copia-ähnlichen Elementen benachbart sind.

Der Begriff "überlappende Sequenzen" umfaßt erfindungsgemäß auch Sequenzen, von denen die eine von einer anderen vollständig umfaßt ist. Zur Erläuterung sei dabei auf Tabelle 2 sowie Beispiel 9 verwiesen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet, daß die Fingerprint-Analyse für Biodiversitätsstudien, Studien zur genetischen Verwandtschaft, taxonomische Studien, und insbesondere in der Rechtsmedizin, der Züchtung, im Sortenschutz, im Genbank-

Management, in der Populationsgenetik und für Evolutionsstudien eingesetzt wird.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung Primer zur erfindungsgemäßen Verwendung, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Primer eine der in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen aufweisen oder eine Sequenz, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt.

Ferner betrifft die Erfindung Kits, die mindestens 1 Primer und vorzugsweise mindestens 1 Primerpaar enthalten, der bzw. das an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisiert bzw. die vorstehend beschrieben wurden. Die Primer weisen vorzugsweise die in den Tabellen 1 und/oder 2 dargestellten Sequenzen oder damit überlappende Sequenzen auf. Die vorstehend Primer können in dem erfindungsgemäßen Kit in Behältern verpackt sein, beispielsweise in Gefäßen, gegebenenfalls in Puffern und/oder Lösungen. Falls angebracht können ein oder mehrere der Primer in ein und demselben Behälter verpackt werden. Die erfindungsgemäßen Kits können vielseitig eingesetzt werden. Beispielhafte Anwendungsbereiche wie die Züchtung wurden vorstehend angegeben.

Auch betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Primer zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kits. Die Herstellung der Kits selbst erfolgt vorzugsweise nach Standardverfahren.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung von Primern, die an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisieren, wobei die Primer vorzugsweise zu einer der vorstehend näher definierten Gruppen gehören, zu Nachweis von Rekombinationsereignissen bei Kreuzungen, insbesondere in der Tier- und Pflanzenzucht.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1: Bereich eines im Gerstengenom vorkommenden copia-ähnlichen Elements Bare-1 (Fig. 1A, aus Manninen und Schulman, Plant. Mol. Biol., 22: 829-846, 1993), der als in tandem wiederholte copia-ähnliche Sequenz (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995) im Genom der Kokosnuß (*Cocos nucifera* L.) gefunden wurde (Fig. 1B).

(A) Schematische Darstellung des copia-ähnlichen BARE-1-Elements aus Gerste.

ED: Endonuklease; RT: Reverse Transkriptase; RH: RNase H).

(B) Lage von repetitiven copia-ähnlichen Sequenzen aus der Kokosnuß relativ zu homologen Sequenzen auf dem Gersten-BARE-1-Element. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Position der kürzlich gefundenen "Spacer-Region" (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995).

Fig. 2: Amplifikation der "Spacer-Region" zwischen benachbarten copia-ähnlichen Sequenzen im Kokosnuß-Genom (A) und ungefähre Position bisher verwendeter Primer für die ISTR-Analyse (B).

(A) Für die Amplifikation zur Klonierung und Sequenzierung der Regionen zwischen zwei benachbarten copia-ähnlichen Elementen der Kokosnuß wurden die Primerpaare ISTR5/ISTR-1 und ISTR5/ISTR-2 verwendet. Die Richtung der Pfeile symbolisiert die 5'→3'-Orientierung der verwendeten Oligodeoxynukleotide.

(B) Die einzelnen Primer sind in der Regel zwischen 18 und 20 Nukleotiden lang und wurden analog zur Sequenz des Ecorep1-Elements synthetisiert (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995). Die mit "-" versehenen Primer sind komplementär zur kodierenden Sequenz des copia-Elementes und können mit jedem beliebigen Primer der "plus"-Serie für die ISTR-Analyse kombiniert werden.

Fig. 3: ISTR-Analyse von Populationen am Beispiel der Kokosnuß (aus Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995).

(A) In den Spuren 1 bis 7 wurden einzelne Palmen einer East African Tall (EAT) Population durch ISTR-Analyse mit den Primerpaaren ISTR5/ISTR-2 (links) bzw. ISTR5/ISTR-1 (rechts) charakterisiert. In den Spuren 8 und 9 sind Kontrollanalysen einer einzelnen Rennell Island Tall(RLT)- oder Pemba Red Dwarf(PRD)-Palme aufgetragen.

(B) ISTR-Analyse zweier Malayan Yellow Dwarf(MYD)-Populationen aus Tanzania und den Philippinen mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2.

Fig. 4: Generelle Anwendung von ISTR-Primern im Pflanzenbereich.

DNA verschiedener Pflanzenspezies wurde einer Amplifikation mit den Primern ISTR5/ISTR-2 unterzogen. In den einzelnen Spuren wurden die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen:

1: Tabak, 2: Gerste, 3: Kartoffel, 4: Mais, 5: Antirrhinum, 6: Arabidopsis, 7: Raps, 8: Craterostigma, 9: Petunie, 10: Petersilie, 11: Sisal, 12: Milala-Palme, 13: Borassus-Palme, 14: Kokospalme, 15: Zuckerrübe, 16: Cuphea, 17: Hefe.

Fig. 5: ISTR-Analyse von einzelnen Angehörigen der Familie der Arecaceae (Palmae). DNAs von 17 verschiedenen Palmenarten wurden in einer Standard-PCR-Reaktion mit den Primern ISTR5/ISTR-2 amplifiziert und auf einem 4% PAGE-Gel aufgetrennt. In den einzelnen Spuren sind die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen: 1: *Hyphaene petersiana* Mart.; 2: *Bismarckia nobilis* Hildebrandt & H. Wendl.; 3: *Eugeissona utilis* Becc.; 4: *Korthalsia echinometra* Becc.; 5: *Mauritiella aculeata* (H.B. & K.) Burret; 6: *Nypa fruticans* Wurmb.; 7: *Pseudophoenix sargentii* H. Wendl. ex Sarg.; 8: *Oraniopsis appendiculata* (F.M.Bailey) J.Dransf., Irvine and N.W.Uhl; 9: *Socratea exorrhiza* (Mart.) H.Wendl.; 10: *Halmoorea tripatha* J. Dransf. & N.W.Uhl.; 11: *Cyrtostachys peekeliana* Becc.; 12: *Deckenia nobilis* H.Wendl.; 13: *Oncosperma tigillarium* (Jack) Ridley; 14: *Syagrus amara* (Jacq.f.) Mart.; 15: *Attalea allenii* H.E.Moore ex L.H.Bailey; 16: *Scheelea insignis* (Mart.) Karsten; 17: *Asterogyne martiana* (H.Wendl.) H.Wendl. ex Hemsley.

Fig. 6: ISTR-Analyse von Gerstensorten. DNAs von 35 verschiedenen Gersten-Genotypen wurden in einer Standard-PCR-Reaktion mit den Primern ISTR5/ISTR-2 amplifiziert und auf einem 4% PAGE-Gel aufgetrennt. In den einzelnen Spuren sind die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen: 1: Fiction; 2: Kaskade; 3: Red; 4: Georgie; 5: Alexis; 6: Marinka; 7: Flash; 8: Portikos; 9: Aura; 10: Gimpel; 11: Prisma; 12: Gitane; 13: Gavotte; 14: Manila; 15: Pilastro; 16: Mastro; 17: Torrent; 17: Torrent; 18: Thibault; 19: Onice; 20: Mette; 21: Robur; 22: Probidor; 23: Tania; 24: Mario Otter; 25: Nico; 26: Magie; 27: Vogelsanger Gold; 28: Tekto 2002; 29: Asse; 30: Calcaroides-C15 (ex Bonus); 31: calcaroides-b2 (ex Bonus); 32: calcaroides-b19 (ex Bonus); 33: Bonus; 34: Christina; 35: Nudinka.

- Fig. 7:** Analyse einer Rinderfamilie (A) und zweier Schafsfamilien (B, C).
 (A) Fünf Nachkommen sowie die beiden Eltern einer Rinderfamilie wurden einer ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2 unterzogen. V: Vater; M: Mutter. Die einzelnen Nachkommen sind numeriert. Der Pfeil deutet auf einen Marker, der nicht in allen Nachkommen auftritt.
 (B, C) Analyse zweier Schafsfamilien mit Nachkommen einer Kreuzung zwischen dem identischen Vater und Mutter M1 (B) sowie Mutter M2 (C). Pfeile zeigen segregierende ISTR-Marker an; Sterne deuten auf Individuum-spezifische Marker, die weder in den Eltern noch in den Geschwistern vorhanden sind.
 GSM: Marker (untere Bande des Triplets), der mit der männlichen Geschlechtsausprägung kosegregiert. V: Vater. Die einzelnen Nachkommen der verschiedenen Züchtungen sind numeriert.

- Fig. 8:** Analyse dreier Menschenfamilien I, II und III mit verschiedenen Primerpaaren.
 (A) ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-1. (B) ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-2. V: Kindvater; M: Mutter; SSM: sexspezifischer Marker. Die Nachkommen sind numeriert. Die beiden Nachkommen der Familien I und II sind eineiige Zwillinge.

- Fig. 9:** Figur 9 zeigt die DNA Analyse von Weinsorten. Für die ISTR-Fingerprint-Analyse wurde DNA aus 19 verschiedenen Weingenotypen mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2 einer PCR-Reaktion unterzogen. In den einzelnen Spuren wurden die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen:
1. Sangiovese piccolo precoce, 2. Sangiovese dell'Elba, 3. Sangiovese polveroso Bonechi, 4. Colorino americano, 5. Prugnolino medio, 6. Colorino del Valdarno, 7. Morellino, 8. Brunellone, 9. Sangiovese forte, 10. Sangiovese R10, 11. Saragiolo, 12. Colorino di Pisa, 13. Prugnolino dolce, 14. Morellino di Scansano, 15. Colorino di Lucca, 16. Giacchè, 17. Tinturiér, 18. Sangiovese polveroso, 19. Prugnolo gentile.

Fig. 10: Analyse von *Phytophthora palmivora*-Isolaten aus den Philippinen mit der Primer-Kombination ISTR5/ISTR-2

1: #P8704 (DRC089; Davao City, Mindanao); 2: #P8646 (DRC001; Davao Sur, Mindanao); 3: #P8652 (DRC007; Davao City, Mindanao); 4: #P8650 (DRC005; Davao City, Mindanao); 5: #P8698 (DRC082; Zamboanga, Mindanao); 6: #P8684 (DRC065; De Oro City, Mindanao); 7: #P8676 (DRC053; Davao City, Mindanao); 8: #P8653 (DRC008; Davao Norte, Mindanao); 9: #P8647 (DRC002; Davao Norte, Mindanao); 10: #P8649 (DRC004; Davao Norte, Mindanao); 11: #P8662; 12: #P8663 (DRC030; Davao Norte, Mindanao); 13: #P8667 (DRC036; South Cotabato, Mindanao); 14: #P8651 (DRC006; Davao Sur, Mindanao); 15: #P8674 (DRC047; Batangas, Luzon); 16: #P8660 (DRC025; Laguna, Luzon); 17: #P8705 (DRC090; Davao Norte, Mindanao); 18: #P8665 (DRC033; South Cotabato, Mindanao).
M: Kontroll-Reaktion mit DNA der MRD (Malayan Red Dwarf)-Kokospalme.

Fig. 11: ISTR-Analyse genomischer DNA mit den ISTR-Primerpaaren F6/B7 (Fig. 11A) und F21/B21 (Fig. 11B).

A. Die einzelnen Spuren sind DNA-Fingerprints folgender genomischer DNAs. 1: EAT (Kokusnuß); 2: PRD (Kokusnuß); 3: SRT (Kokusnuß); 4: Mensch; 5: Hamster; 6: Rostpilz.

B. Spur 1: EAT (Kokusnuß); 2: PRD (Kokusnuß); 3: SRT (Kokusnuß); 4: Mensch; 5: Raps; 6: Gerste.

Die angegebenen Zahlenwerte über den Spuren entsprechen den in der Standard-PCR-Reaktion gewählten "annealing"-Temperaturen.

Fig. 12. ISTR-Analyse von verschiedenen Isolaten des Rostpilzen *Puccinia recondita* f.sp. *secalis* mit der Primerkombination F6/B3 (siehe Tabelle 2).

DNAs von verschiedenen Rostpilzisolaten wurden in einer Standard PCR-Reaktion mit den Primern F6/B3 (siehe Tabelle 2) amplifiziert und auf einem 4%igen Page-Gel aufgetrennt.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Nachweis von Längenpolymorphismen bei der Kokosnuß

Für diesen Versuch, der in Fig. 3 dargestellt ist, wurden die Primerpaare ISTR5/ISTR-2 und ISTR5/ISTR-1 (siehe Tabelle 1) verwendet. Als zu untersuchende DNAs werden die genomischen DNAs von einzelnen Palmen aus Populationen von East African Tall (EAT) und Malayan Yellow Dwarf (MYD) sowie je einer einzelnen Palme Rennel Island Tall (RLT) und Pemba Red Dwarf (PRD) verwendet. Die betreffenden Oligodeoxynukleotide (Primer) wurden mit Hilfe der Polynukleotidkinase in bekannter Weise an ihrem Ende mit ^{32}P radioaktiv markiert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Diese wird standardmäßig in einem Volumen von 20 μl durchgeführt und enthält je 1 pmol der Primer und 25 ng der zu amplifizierenden genomischen DNA in 1x PCR-Reaktionspuffer (z.B. der Firma GIBCO/BRL), 2.5 mM MgCl_2 , 0.25 mM dNTP (Deoxynukleosid-Triphosphate), und 1 Einheit Taq-DNA-Polymerase. Das Gemisch wird zunächst für 3 Min. bei 95°C denaturiert und danach werden insgesamt 40 Zyklen von 95°C (30 Sekunden, Denaturierung), 45°C (30 Sekunden, Anlagerung) und 72°C (2 Minuten, Synthese) durchgeführt. Die Reaktion wird durch einen Syntheseschritt (72°C für 10 Minuten) beendet, 10 μl Farbstoffgemisch (in Formamid) hinzugefügt und nach erneutem Erhitzen 3 μl davon auf einem 4% Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetrennt. Das Gel wird nach Trennen der beiden Glasplatten in bekannter Weise an einer der Sequenz-Glasplatten getrocknet und die aufgetrennten radioaktiv markierten PCR-Produkte durch Belichten eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Wie aus Fig. 3 hervorgeht, sind eine Reihe von DNA-Produkten allen Palmen gemein, aber es sind in beiden Populationen auch Unterschiede in einzelnen Palmen zu beobachten. Dies ist weniger überraschend für den "Tall"-Typ EAT (Fig. 3A), da für diese Kokosnuß-Typen Fremdbefruchtung im Feld beobachtet worden ist. Überraschenderweise entdeckt die ISTR-Analyse jedoch auch im allgemein als autogam geltenden "Dwarf"-Palmentyp wie MYD Unterschiede innerhalb der Populationen sowie auch Unterschiede zwischen den Populationen aus Tanzania und den Philippinen (Fig. 3B). Mit bisher verwendeten RFLP-Markern konnten Unterschiede in Dwarf-Populationen nicht nachgewiesen wer-

den. Darüberhinaus ist ersichtlich, daß die Verwendung des Primerpaars ISTR5/ISTR-1 nicht nur - wie von der Lage des ISTR-1-Primers erwartet (Fig. 2B) - etwa 100 bp kleinere PCR-Produkte ergibt, sondern auch neue Polymorphismen verursacht. Die Ursache hierfür kann nur vermutet werden, aber dieser Befund eröffnet die Möglichkeit, basierend auf den ermittelten copia-ähnlichen Sequenzen der Kokosnuß alle denkbaren copia-ähnlichen Sequenzen und Primerkombinationen für die ISTR-Analyse einzusetzen. Dieses einfache Experiment zeigt daher eindrucksvoll, wie bereits mit Hilfe einer einzigen PCR-Amplifikation unter Verwendung des identischen Primerpaares eine reproduzierbare Fingerprintanalyse einzelner Palmen und Aussagen zur genetischen Homogenität von Populationen ermöglicht werden. Dieses experimentelle Protokoll ist für alle ISTR-Primer anwendbar und wurde, wenn nicht anders angegeben, auch für die nachfolgenden Beispiele benutzt.

Tabelle 1

Beispiele verwendeter Oligodesoxynukleotide (ISTR-Primer) für die ISTR-Analyse

ISTR-Primer Sequenz (5'→3')

Vorwärtsprimer

ISTR1 AGG AGG TGA ATA CCT TAG

ISTR2 AAA ATG GCA TAG TCT CTC

ISTR3 GTC GAC ATG CCA TCT TTC

ISTR4 TAT AGT ACC TAT TGG GTG

ISTR5 ATA TAT GGA CTT AAG CAA GC

ISTR6 GTA TTG TAC GTG GAT GAC ATC

ISTR7 CAA CAG TGC TCC CAC TGA

ISTR7' TGC TAG GAC TTT CAC AGA

Rückwärtsprimer

ISTR-1 TTT TCT ACT TCA TGT CTG A

ISTR-2 AAT AAA TCG ATC ATC GAC

ISTR-3 ATT CCC ATC TGC ACC AAT

ISTR-4 ATG TCA TCC ACG TAC AAT

ISTR-5 CTT CTG TGA AAG TCC TAG

Beispiel 2

Test auf generelle Anwendung bei Pflanzen

Um die Möglichkeit zu ergründen, die Kokosnuß-spezifischen ISTR-Primer generell in Pflanzen für den Nachweis von DNA-Polymorphismen in copia-ähnlichen Sequenzen anzuwenden, wurden in dem in Beispiel 2 durchgeführten Versuch die genomischen DNAs verschiedener Pflanzen mit dem ISTR-Primerpaar ISTR5/ISTR-2 in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Aus Fig. 4 ist ersichtlich, daß von Tabak- bis zu Hefe-DNA alle eingesetzten DNAs durch Kokosnuß-spezifische Primer individuelle PCR-Produkte ergeben. Ähnliche Versuche wurden auch mit anderen ISTR-Primerkombinationen durchgeführt. Dies zeigt, daß ähnliche wie die für Kokosnuß beschriebenen Familien von benachbart gelegenen copia-ähnlichen repetitiven Elementen in niederen und höheren Pflanzen existieren und für eine Fingerprintanalyse zugänglich sind. Als Konsequenz ist die ISTR-Analyse daher über die in Beispiel 1 für eine einzelne Pflanzenspezies gezeigte Möglichkeit hinaus anwendbar für die Charakterisierung genetischer Diversität und das Erfassen pflanzen-genetischer Ressourcen, entweder in Genbanken oder durch in situ-Konservierung.

Beispiel 3

Test auf Anwendung innerhalb einer Pflanzenfamilie am Beispiel der Palmen (Arecaceae)

Die mögliche Anwendung der ISTR-Analyse zu taxonomischen Studien wurde mit Hilfe des ISTR-Primerpaars ISTR5/ISTR-2 an Pflanzenspezies der Familie Arecaceae (Palmae) durchgeführt. Dazu wurden DNAs von 17 Palmenarten (siehe Legende zu Fig. 5) in einer PCR-Reaktion mit den erwähnten Primern amplifiziert und die PCR-Produkte in bekannter Weise analysiert. Wie aus Fig. 5 ersichtlich, wird für jede Palme ein unterschiedlicher Fingerprint erhalten, der es ermöglicht, die Daten durch Computer-unterstützte Auswertung einer entsprechenden Matrix zur Ermittlung biologischer Diversität durch die Erstellung von Dendrogrammen nach üblichen Verfahren zu verarbeiten. Für die praktische Anwendung ist zum Beispiel von Bedeutung, welche genetische Verwandtschaft etwa zwischen den bedeutenden Ölpflanzen der Öl- und der Kokosnuß-Palme existieren. Genetische Marker etwa für das für die Ölausbeute bedeutsame Merkmal der Nußschalendicke könnten dann in beiden Spezies für die Züchtung Anwendung finden, wenn diese genetisch hochverwandt sind.

Beispiel 4

Test auf Anwendung bei gezüchteten Sorten am Beispiel der Gerste

Die Charakterisierung von gezüchteten Sorten durch Fingerprintanalyse mit Hilfe der ISTR-Technologie wurde am Beispiel von Gerstensorten getestet. Fig. 6 zeigt eine PAGE-Analyse von PCR-Produkten, die für insgesamt 35 Varietäten bzw. Genotypen erhalten wurde. Die hohe genetische Verwandtschaft der untersuchten Hochleistungssorten ist aus der hohen Anzahl von monomorphen DNA-Fragmenten ersichtlich. Dennoch konnten allein aus dieser einen Analyse insgesamt 44 polymorphe Marker identifiziert werden, die vor allem im oberen Bereich des Sequenzgels gelegen waren. Diese Marker wurden in einer Matrix angeordnet und daraus nach der UPGMA-Methode ein Dendrogramm ermittelt. Die Tatsache, daß die Sorte Bonus (Spur 33) nicht von calcaroides-b19 (Spur 32) zu unterschieden ist, ist nicht weiter verwunderlich, da dieser Genotyp eine in Bonus erzeugte rezessive Mutante ist. Dies gilt allerdings auch für die Genotypen Calca-

roides-C15 (Spur 30) und calcaroides-b2 (Spur 31), die durch Mutagenese im selben genetischen Hintergrund erzeugt worden waren. Allerdings wurden hier für die Mutagenese Neutronen-(Calcaroides-C15) bzw. Röntgenstrahlen (calcaroides-b2) als Mutagene verwendet, die auf chromosomaler Ebene in der Regel zu Deletionen und Inversionen führen, während calcaroides-b19 aus Bonus durch Natriumazid-Behandlung erhalten wurde, die Punktmutationen hervorruft. Dieses Beispiel erläutert daher einmal, daß die ISTR-Analyse Hinweise auf Umordnungen des genetischen Materials zu geben vermag. Zweitens ist allein aus der Verwendung eines einzigen ISTR-Primerpaars eine Fingerprintanalyse von Hochleistungssorten möglich. Daraus folgt, daß mit der Verwendung weiterer ISTR-Primerpaare ein eindeutiger sortenspezifischer Fingerprint erhalten werden kann, der als biochemische Charakterisierung der Sorte dient (Sortenschutz).

Beispiel 5

Test auf Anwendung bei Tieren: Evidenz für segregierende sowie neu entstehende Marker in Familien

Zum Test auf die generelle Anwendbarkeit der ISTR-Analyse genetischen Materials außerhalb des Pflanzenreichs wurden Tierfamilien untersucht, bei denen der Vater durch kontrollierte Züchtung (in vitro-Fertilisation) bekannt war. Fig. 7 illustriert eine ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2 an einer Rinderfamilie (Fig. 7A) und an zwei Schaffamilien mit identischem Vater, aber zwei verschiedenen Müttern M1 (Fig. 7B) und M2 (Fig. 7C). Aus beiden Analysen ist ersichtlich, daß 1) Kokosnuß-spezifische ISTR-Primer auch im Tierreich zur Fingerprintanalyse angewendet werden können, und daß 2) sowohl segregierende Marker (siehe Pfeile in Fig. 7C) als auch Individuum-spezifische Marker (siehe Sterne in Fig. 7) durch die ISTR-Analyse zugänglich sind. Einen Hinweis, daß segregierende ISTR-Marker mit wichtigen Phänotypen kosegregieren können, gibt die mit SSM (sexspezifischer Marker) bezeichnete DNA-Bande des prominenten Triplets in Fig. 7B, C: Diese Bande ist im Vater, nicht jedoch in den beiden Müttern vorhanden. Tatsächlich sind die beiden Nachkommen der Familie 1 (Fig. 7B) weiblichen Geschlechts, während die Familie 2 (Fig. 7C) einen männlichen Nachkommen hat. Die Tatsache, daß elterliche Marker nicht in allen Nachkommen vorhanden sind (siehe Pfeil in Fig. 7A) bzw. daß neue Marker entstehen

(siehe Sterne in Fig. 7), kann als Hinweis interpretiert werden, daß die ISTR-Analyse Rekombinationsereignisse bei Kreuzungen entdecken kann.

Beispiel 6

Test auf Anwendung beim Menschen: Evidenz für geschlechts- und Individuum-spezifische Polymorphismen

Dieses Beispiel erläutert die Anwendung der ISTR-Analyse im humanen Bereich. Dazu wurden drei Familien I, II und III analysiert, wobei die beiden Kinder der Familien I und II jeweils homozygote (eineiige) Zwillinge waren. Da von vornherein nicht zu erwarten war, daß ISTR-Primer DNA-Polymorphismen bei eineiigen Zwillingen entdecken können (hochpolymorphe Mikrosatellitenprimer zeigen keine Unterschiede; Haas, Institut für Rechtsmedizin, Universität Giessen; persönliche Mitteilung), wurden 6 verschiedene ISTR-Primerpaare getestet. Bei allen 6 Analysen sind DNA-Polymorphismen sichtbar, und zwei der ISTR-Analysen mit den Primerpaaren ISTR6/ISTR-1 und ISTR6/ISTR-2 sind in Fig. 8 dargestellt. Die Analyse mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-1 (Fig. 8A) ist bemerkenswert für die Vielzahl von polymorphen DNA-Banden, die Individuum-spezifisch sind und selbst bei den beiden Paaren von eineiigen Zwillingen der Familien I und II eine eindeutige Charakterisierung des individuellen Menschen zulassen. Dies trifft ebenfalls für die in Fig. 8B mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-2 durchgeführte ISTR-Analyse zu, auch wenn die Anzahl der polymorphen Banden geringer ist. Bemerkenswerterweise findet sich hier unter den neuen Polymorphismen eine DNA-Bande (SSM in Fig. 8B), die nur in den drei Vätern, nicht jedoch in den drei Müttern und den fünf Kindern auftritt. Tatsächlich könnte es sich hier, wie im Beispiel 5 für die Schaffamilien erwähnt, um einen geschlechtsspezifischen Marker handeln, da alle 5 Kinder weiblichen Geschlechts sind und somit eine strikt geschlechtsspezifische Segregation bei insgesamt 11 Individuen gegeben ist.

Beispiel 7

Nachweis von ISTR-Fingerprints bei Wein

Für diesen Versuch, der in Figur 9 dargestellt ist, wurde das Primerpaar ISTR5/ISTR-2 (siehe Tabelle 1) verwendet. Als zu untersuchende DNAs wurden die genomischen DNAs von 19 *Vitis vinifera* L. Pflanzen einschließlich 13 vermuteter "Sangiovese" Genotypen und 6 "gefärbte" Ecotypen verwendet, deren Früchte von Bedeutung für die intensive Rotfärbung des Weines sind. Aus Figur 9 ist ersichtlich, daß eine große Anzahl polymorpher DNA-Fragmente erhalten wurde. Obwohl die Variabilität am größten in den "gefärbten" Ecotypen ist, konnte die ISTR-Analyse außerdem einen hohen Anteil von Polymorphismen in den "Sangiovese"-Genotypen feststellen. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf die polyclonale Herkunft vieler Weinkultivare zurückzuführen. Daher zeigt auch dieses Beispiel, daß die ISTR-Analyse eine effiziente und sensitive Methode für die Untersuchung der genetischen Diversität innerhalb von Ecotypen und für die Identifizierung von einzelnen Clonen einsetzbar ist.

Beispiel 8

Anwendung des ISTR-Fingerprints bei Mikroorganismen

Als Beispiel für die Anwendung der ISTR-Technologie auf Mikroorganismen dienten Isolate des Pilz *Phytophthora palmivora*, der auf Kokospalmen lethale Erkrankungen ("bud rot") hervorruft. Es wurde hier ein besonders diffiziles Beispiel für die Anwendung einer DNA-Marker-Technologie gewählt, für das eigentlich aufgrund der begrenzten genetischen Diversität nur wenige Polymorphismen erwartet wurden, da es sich in allen Fällen um *P. palmivora*-Isolate handelte, die zudem ausschließlich in den Philippinen isoliert wurden und auch hier überwiegend lokal begrenzt waren (die Isolate stammten vorwiegend von der Insel Mindanao).

Es wurden je 1 µg DNA von achtzehn *P. palmivora*-Isolaten aus den Philippinen in einer Standard-PCR-Reaktion mit der Primer-Kombination ISTR5/ISTR-2 amplifiziert, die Produkte in bekannter Weise durch PAGE auf einem 4%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die einzelnen Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Fig. 10 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Bereits durch die Gelanalyse (Fig. 10A) werden mit einer einzigen ISTR-Primer-Kombination eine Fülle polymorpher DNA-Fragmente sichtbar. Dreißig dieser Banden wurden nach bekannten Verfahren der Cluster-Analyse ausgewertet zu Phenogrammen nach

der UPGMA-Methode (SAHN-Clustering; Fig. 10B) und durch PCA (principal coordinate analysis; Fig. 10C). Die erhaltenen Daten stimmen gut mit der anhand von RAPD-DNA-Marker-Analysen vorgenommenen Klassifizierung dieser Isolate überein.

Beispiel 9

Spezifität der ISTR-Analyse bei überlappenden Primer-Paaren

Die nachstehend genannten und in Tabelle 2 aufgeführten Oligodesoxynukleotide (Primer) wurden mit Hilfe der Polynukleotidkinase in bekannter Weise an ihrem Ende mit ^{32}P radioaktiv markiert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Diese wurde standardgemäß in einem Volumen von 20 μl durchgeführt und enthielt je 1 pmol der Primer und 25 ng der zu amplifizierenden genomischen DNA in 1x PCR-Reaktionspuffer (z.B. der Firma GIBCO/BRL), 2.5 mM MgCl_2 , 0.25 mM dNTPs (Desoxynukleosid-Triphosphate), und 1 Einheit Taq-DNA-Polymerase. Das Gemisch wurde zunächst für 3 Min. bei 95°C denaturiert. Danach wurden insgesamt 40 Zyklen von 95°C (30 Sekunden, Denaturierung), 50°C bzw. wie in der Legende zu Fig. 11 angegeben (30 Sekunden, Anlagerung oder "annealing") und 72°C (2 Minuten Synthese) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch einen Syntheseschritt (72°C für 10 Minuten) beendet, 10 μl übliches Farbstoffgemisch (in Formamid) hinzugefügt und nach erneutem Erhitzen 3 μl davon auf einem 4% Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetrennt. Das Gel wurde nach Trennen der beiden Glasplatten in bekannter Weise an einer der Sequenz-Glasplatten getrocknet und die aufgetrennten radioaktiv markierten PCR-Produkte durch Belichten eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Dieses experimentelle Protokoll ist für alle ISTR-Primer anwendbar und wurde, wenn nicht anders angegeben, auch für die nachfolgenden Beispiele benutzt.

Tabelle 2

PCR-Primer für die ISTR-Analyse mit F(forward)- und B(backward)-Primern

Vorwärtsprimer

F1	AGG AGG TGA ATA CCT TAG
F2	TTT TCT ACT TCA TGT CTG AAT
F3	AAA ATG GCA TAG TCT CTC
F4	GTC GAC ATG CCA TCT TTC
F5	TAT AGT ACC TAT TGG GTG
F6	ATA TAT GGA CTT AAG CAA GC
F7	GTA TTG TAC GTG GAT GAC ATC C
F8	CAA CAG CGC TCC CAC TGA
F9	TGC TAG GAC TTT CAC AGA
F10	CAA CAG TGC TCC CAC TGA
F11	TAA TAG TGC TCC CAT TGA TCT
F12	TTG GAC AAC CAT ATT TTG ACT
F13	ATA TGG ACT TAA GCA AGC CA
F14	ACC CTT TTC TAC TTC ATG TCT
F15	GAT CAA AAA GTT TGG TTT CAT
F16	TAG AGT TTT CCA TAC TAA ACC
F17	GCT CGG TAC CCA TAT ATG G
F18	CAT ATT GGC GTT CAT GGA G
F19	TCC ATG AAA GAC CTA GGT GA
F20	AGT ATG GAA AAC TCT AAG AGG
F21	ATA TAT GGA CTT AAG CAA GCA TCT CGG AGC

Rückwärtsprimer

B1	TTT TCT ACT TCA TGT CTG AAT
B2	AAT AAA TCG ATC ATC GAC TC
B3	GGA TAT CCT ATG AAT CAA GC
B4	ATT CCC ATC TGC ACC AAT
B5	ATG TCA TCC ACG TAC AAT
B6	CTT CTG TGA AAG TCC TAG
B7	AAT CGT GTA TCT TCA AAA AAG
B8	ATA TAT GGA CTT AAG CAA GCA
B9	GGA ATA TCA TTC CCA ATA AG
B10	CCT CCT TAT TGG GAA TGA TAT
B11	GAA ACG AGT GTT CCA GTT C
B12	GAC CCT TTT GAA AAC ACA TG
B13	TCT TGG AGT TGG AAC ACT C

B14	GTT TCA ATG ATG TGA TCA AAA A
B15	GGG TAT TAA TCC CCT CCT AG
B16	AAA CCT AGC GGC TAT TCC AT
B17	GGC TAC AAT AGC ATG CAA TG
B18	CAG AGT TGA TAT CTG ATA TCG
B19	CCT CTA TAT CCT TTG AAA TAG
B20	CAC ATT GTG ATC TTC TAT AAT
B21	AAT AAA TCG ATC ATC GAC TCT AAA GGA CCT

Im angeführten Beispiel der Temperaturabhängigkeit der PCR-Amplifikation während der ISTR-Analyse wurden 2 Primerpaare verwendet, die i) überlappen (F6 mit F21 sowie B7 mit B21; siehe Tabelle 2) und ii) sich durch die Länge unterscheiden:

- i) Überlappende Primer
 - A) ISTR-Primerpaar F6(20mer)/B7(21mer)
 - B) ISTR-Primerpaar F21(30mer)/B21(30mer)

Die gesamte Sequenz der Primer F6 und B7 ist in den Primern F21 bzw. B21 enthalten. Die in Fig. 11A und B gezeigten Ergebnisse belegen, daß auch überlappende Primer für die ISTR-Analyse benutzt werden können und zu voneinander verschiedenen DNA-Fingerprints führen (jeweils Spuren 1-3).

ii) Temperaturabhängigkeit der ISTR-Analyse

Die Spezifität der ISTR-Primer gegenüber den sogenannten "arbitrary primers" (beliebig primende Oligodesoxynukleotide), wie sie von J. Welsh und M. McClelland in "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers", *Nucleic Acids Res.*, 18:7213-7218 (1990) beschrieben worden sind, wurde durch die Temperaturabhängigkeit der PCR-Reaktion gezeigt. Während die von Welsh und McClelland beschriebenen Primer selbst bis zu einer Länge von 34 Nukleotiden keine PCR-Amplifikation bei 52 Grad "annealing"-Temperatur mehr ergaben (op. cit., s. 7215), zeigte die ISTR-Analyse mit den 30mer-ISTR-Primern sogar bei einer "annealing"-Temperatur von 72 Grad sowohl im homologen (Kokusnuß) als auch im heterologen System (Mensch, Raps, Gerste) diskrete und reproduzierbare Fingerprints (Fig. 11B). Wie auf der Basis der Lehre diese Anmeldung für die Länge der gewählten Primer im ISTR-Primerpaar F6(20mer)/B7(21mer) nicht anders zu erwarten, erhielt man bei einer "annealing"-

Temperatur von 55 Grad noch eine gute Amplifikation, nicht dagegen bei 60 Grad (Fig. 11A).

Beispiel 10

Nachweis von ISTR-Fingerprints bei verschiedenen Isolaten des Rostpilz *Puccinia recondita* f.sp. *secalis*

Als ein weiteres Beispiel der Anwendung der ISTR-Technologie auf Mikroorganismen dienten verschiedene Isolate des Rostpilz *Puccinia recondita* f.sp. *secalis*. In diesem Versuch, der in Figur 12 dargestellt ist, wurde DNA aus Einzelpustel-Isolaten des Rostpilzes isoliert und das Primerpaar F6/B3 (siehe Tabelle 2) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde wie in Beispiel 8 beschrieben durchgeführt, und die Produkte nach an sich bekannter Weise durch PAGE auf einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die einzelnen Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Wie Figur 12 zeigt, wird wiederum mit einer einzigen ISTR-Primerkombination eine Fülle polymorpher DNA-Fragmente erzeugt, durch die sich die verschiedenen Rostpilzisolat unterscheiden lassen. Daher ist dieses Experiment ein weiterer Beleg für die Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen ISTR-Technologie bei Mikroorganismen.

Patentansprüche

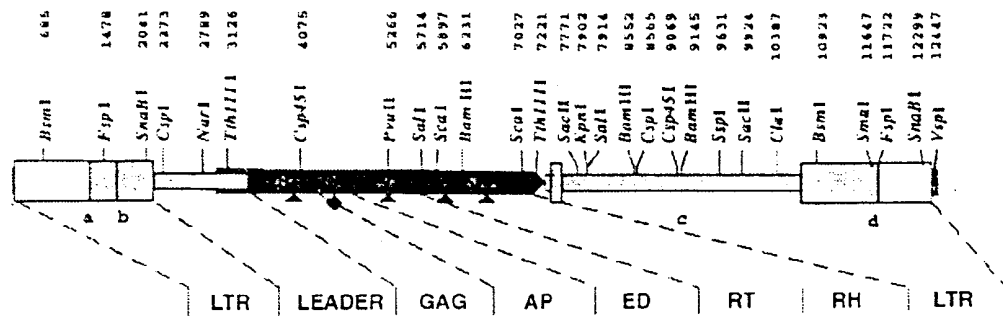
1. Verwendung eines Primers oder Primerpaares zur DNA-Fingerprint-Analyse, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint sowohl von Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen als auch von Mikroorganismen erhältlich ist, und wobei der Primer oder das Primerpaar an DNA, die die Endonuclease, die Reverse Transcriptase oder die RNase H eines copia- oder copia-ähnlichen Elements insbesondere aus der Kokosnuß (*Cocos nucifera* L.) codiert, hybridisiert.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint mit DNAs aus dem gesamten Tier- und Pflanzenreich, umfassend
 - (a) das Tierreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die Metazoen, darin enthalten die Unterstämme der Vertebraten, dabei vorzugsweise die Klasse der Säugetiere, darin enthalten insbesondere die Familie der Hominiden und die Familie der Bovidae, darin enthalten die Spezies *Bovis taurus* und *Ovis aries*, sowie alle Rassen und Varietäten, die sich aus der entsprechenden Spezies ableiten lassen;
 - (b) das Pflanzenreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die der Mycobionta und Cormobionta, bei letzterer vorzugsweise die Abteilung der Spermatophyten, darin vorzugsweise die Klasse der Monocotyledonae mit ihren Familien der Areaceae und ihren Vertretern der Spezies *Cocos nucifera* oder der Familie der Poaceae mit ihren Vertretern der Spezies *Hordeum vulgare* und *Zea mays*, außerdem besonders bevorzugt die Klasse der Dicotyledonae mit ihren Familien, z.B. der Solaneaceae und ihrem Vertreter der Spezies *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida*, oder z.B. die Familie der Brassicaceae mit ihrem Vertreter der Spezies *Brassica napus* oder die Familie der Chenopodiaceae mit ihrem Vertreter *Beta vulgaris* sowie alle Varietäten und Sorten, die sich von der entsprechenden Spezies ableiten lassen;
 - (c) den Menschen; und

- (d) Mikroorganismen umfassend prokaryotische Mikroorganismen, dabei vorzugsweise Gram-positive Bakterien wie z.B. Milchsäurebakterien, Sarcina und Coryneforme Bakterien und Gram-negative Bakterien wie z.B. Neisseria und Enterobakterien, und eukaryotische Mikroorganismen umfassend Pilze, dabei vorzugsweise Phycomyceten wie z.B. Phytophthora und Ascomyceten wie z.B. Hefen erhältlich ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die zu analysierenden DNAs mit dem Primer oder dem Primerpaar durch PCR amplifiziert und nachfolgend der Größe nach auf einem Gel aufgetrennt werden.
 4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Gel ein Sequenzgel ist.
 5. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß als weiterer Schritt ein Southern Blot durchgeführt wird, und die auf die Membran übertragenen DNAs durch Hybridisierung mit einer Sonde sichtbar gemacht werden.
 6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde der bzw. das in einem der vorstehenden Ansprüche genannte Primer oder Primerpaar ist.
 7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer oder das Primerpaar eine Markierung trägt.
 8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine nicht-radioaktive Markierung, insbesondere Digoxigenin, Biotin, ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Farbstoff oder eine radioaktive Markierung, insbesondere ^{32}P ist.
 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer eine der in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen aufweist.

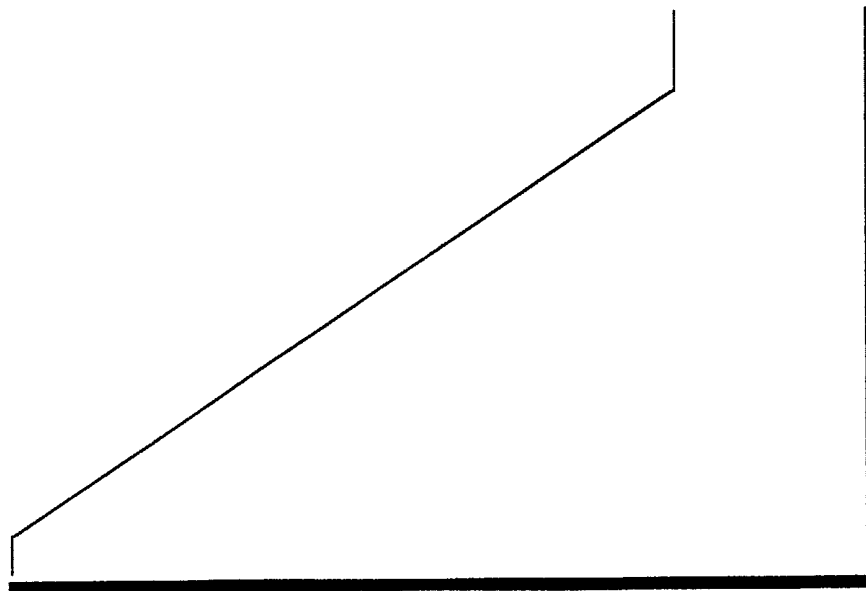
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer eine Sequenz aufweist, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Fingerprint-Analyse für Biodiversitätsstudien, Studien zur genetischen Verwandtschaft, taxonomische Studien, und insbesondere in der Rechtsmedizin, der Züchtung, im Sortenschutz, im Genbank-Management, in der Diagnostik, in der Populationsgenetik oder für Evolutionsstudien eingesetzt wird.
12. Primer zur Verwendung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer eine der in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen aufweist oder eine Sequenz aufweist, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt.
13. Kit enthaltend mindestens einen Primer und vorzugsweise mindestens ein Primerpaar, der bzw. das an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisiert oder der/das in einem der Ansprüche 1 bis 12 gekennzeichnet ist.
14. Verwendung von mindestens einen Primer und vorzugsweise mindestens ein Primerpaar, der/das in einem der Ansprüche 1 bis 12 gekennzeichnet ist zur Herstellung eines Kits nach Anspruch 13.
15. Verwendung eines Primers oder Primerpaares, der bzw. das an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisiert zum Nachweis von Rekombinationsereignissen bei Kreuzungen, insbesondere in der Tier- und Pflanzenzüchtung.

1/14

A



B



COPIA-ÄHNLICHE KOKOSNUSS-SEQUENZ

FIG. 1

2/14

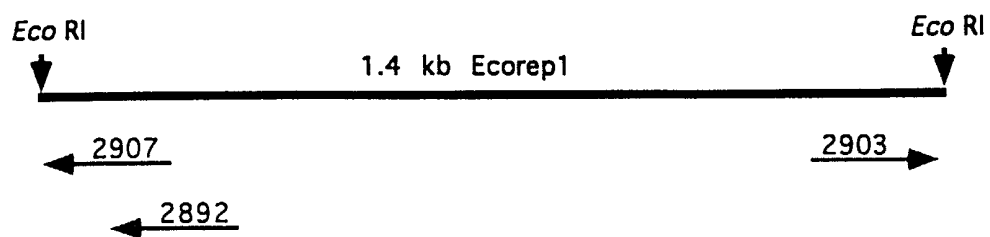
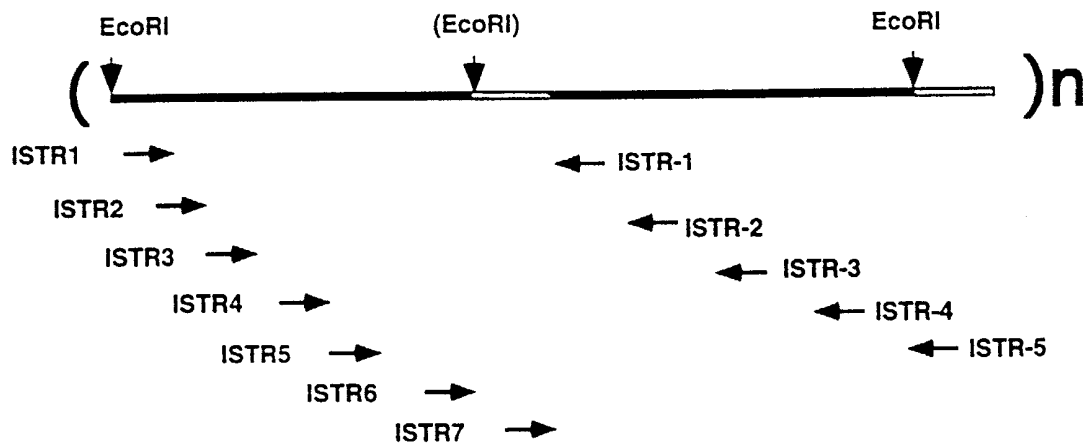
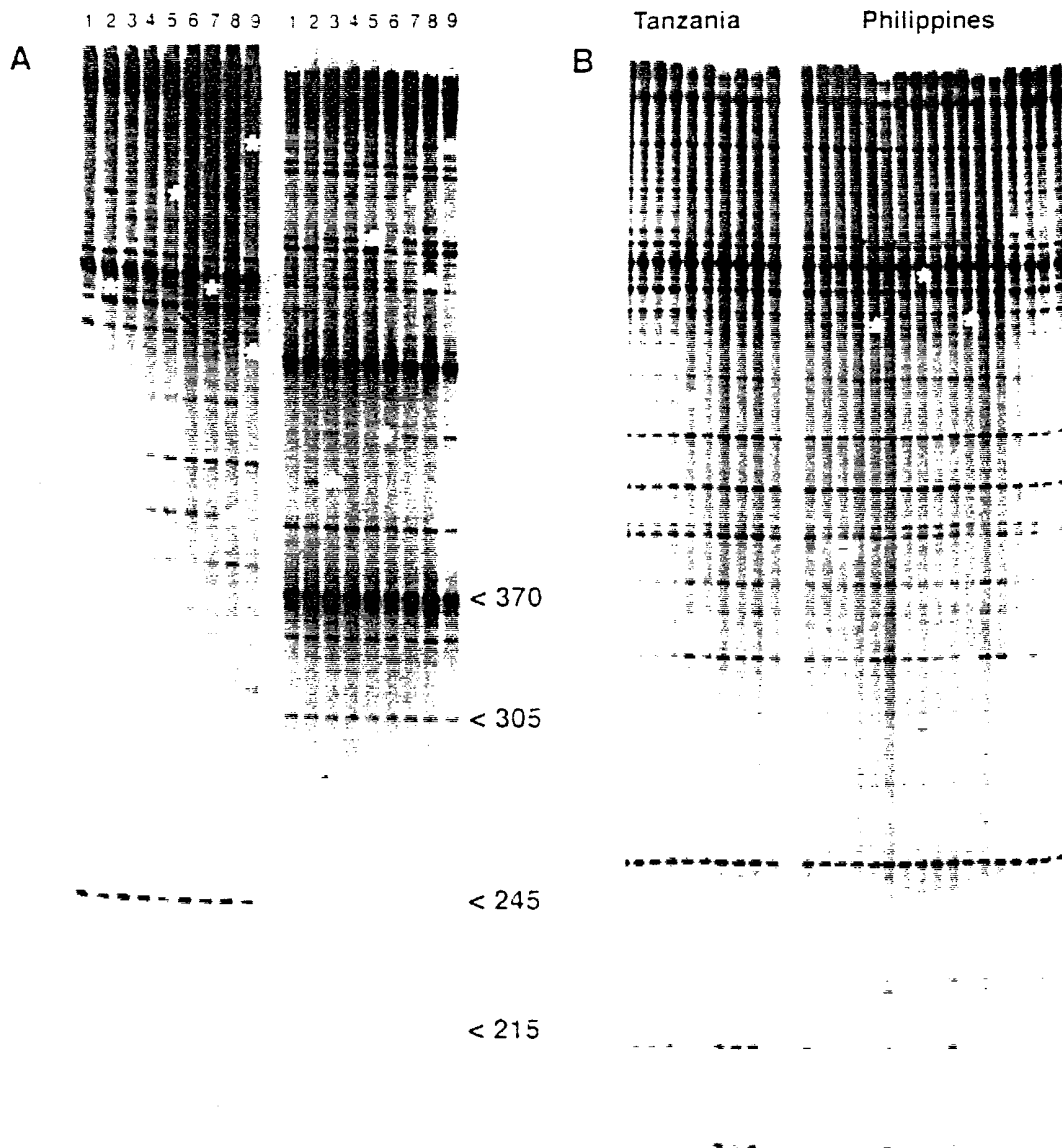
A**B**

FIG. 2

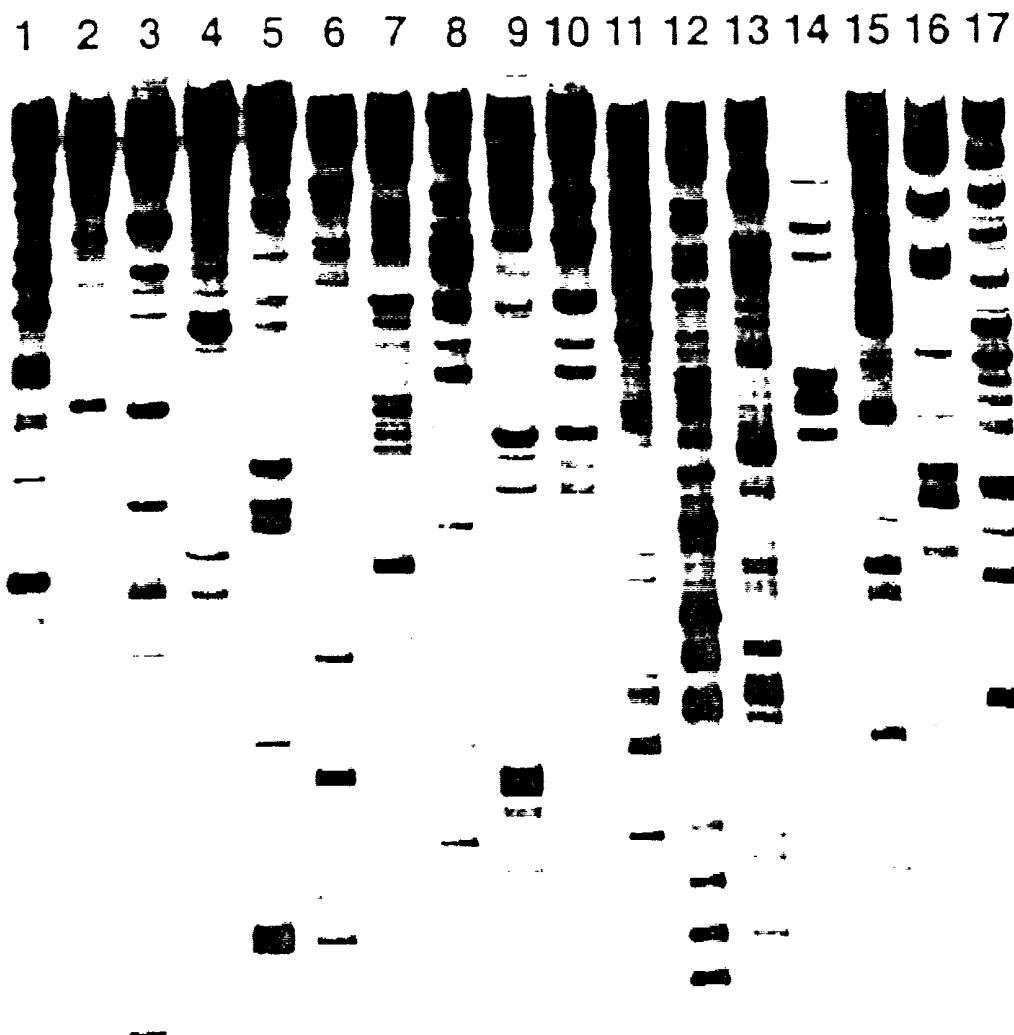
3/14

FIG. 3



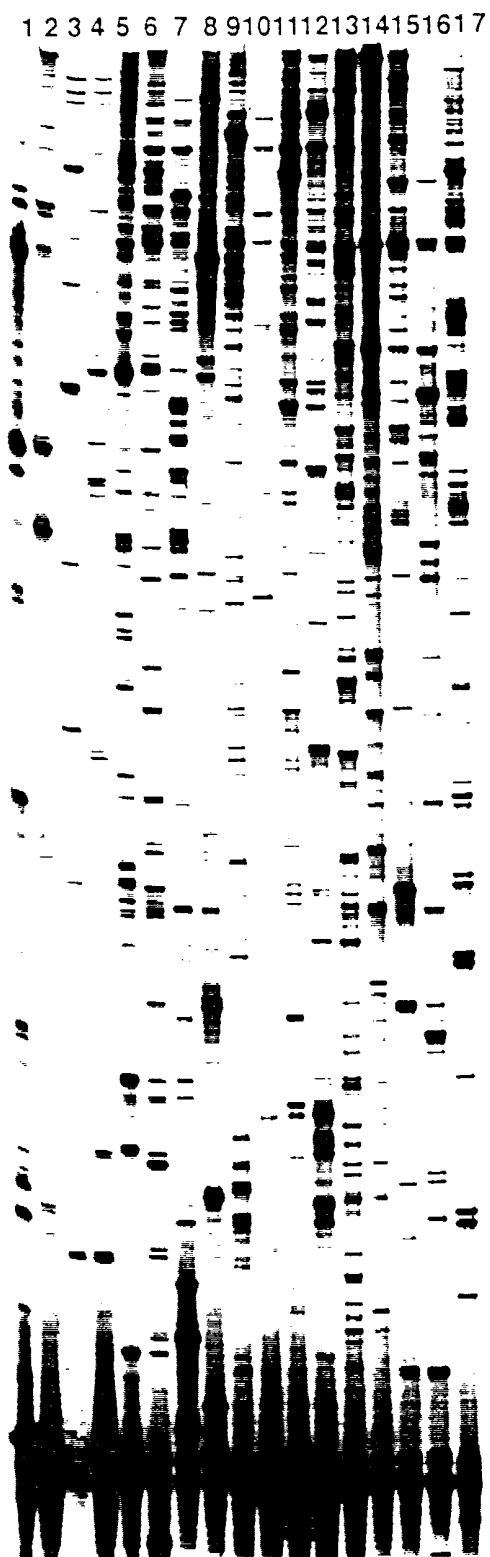
4/14

FIG. 4



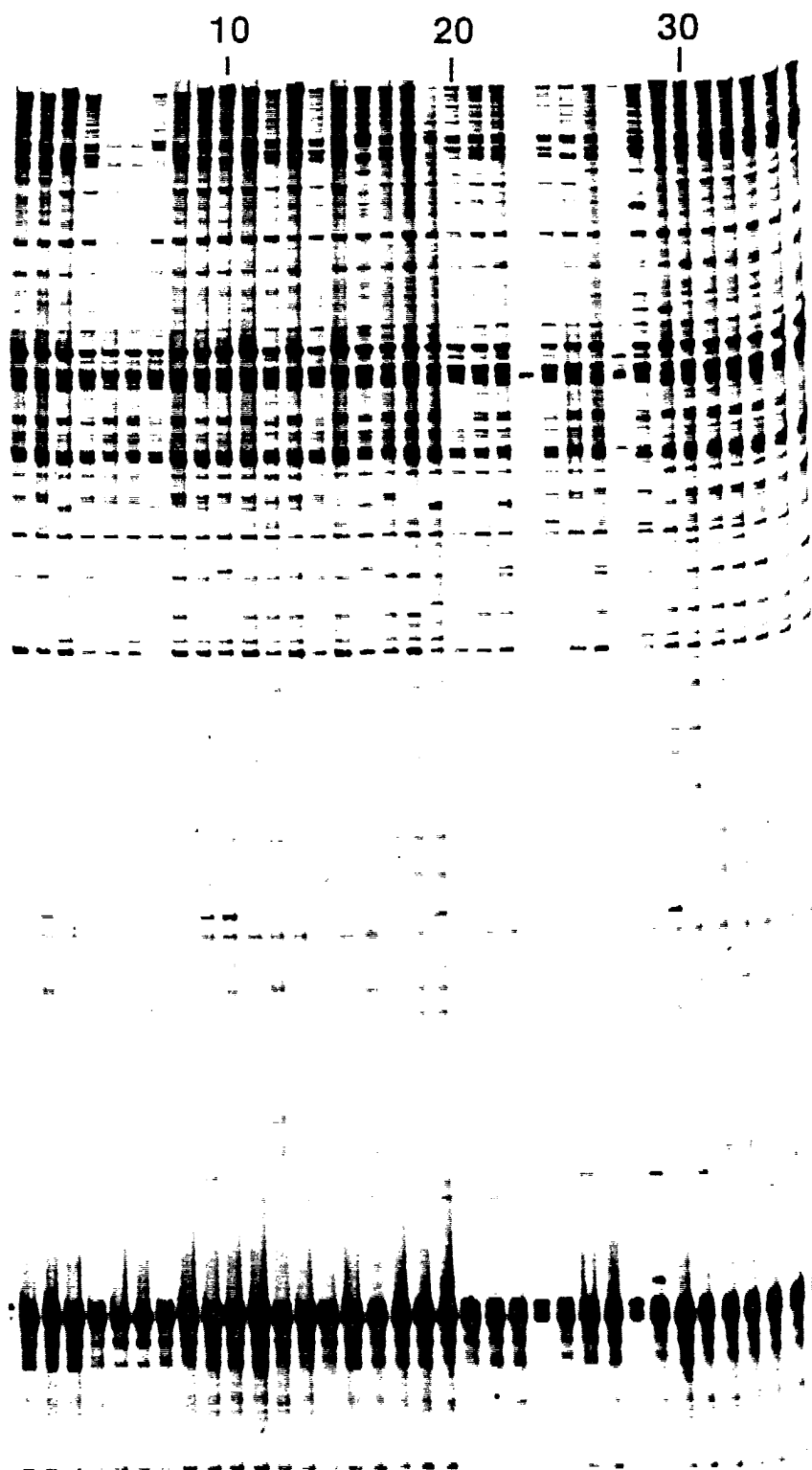
5/14

FIG. 5



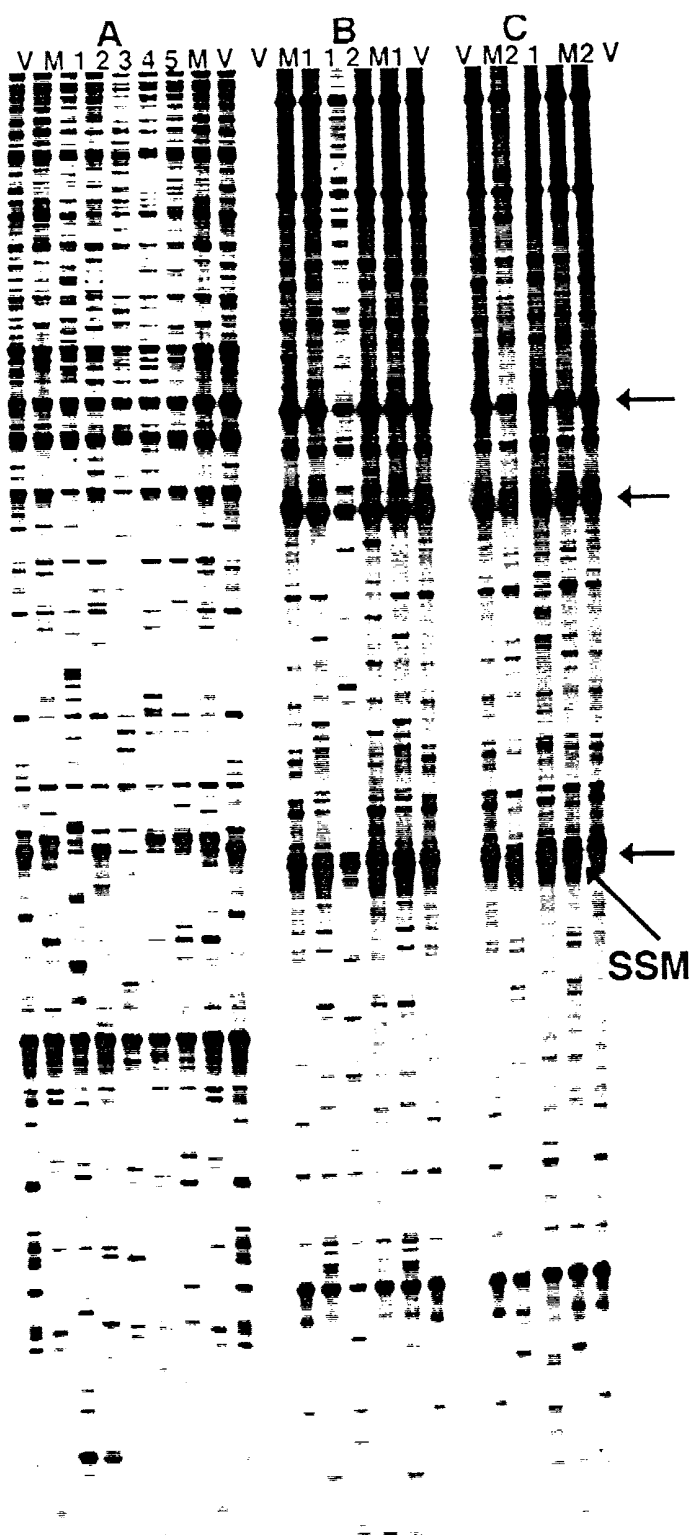
6/14

FIG. 6



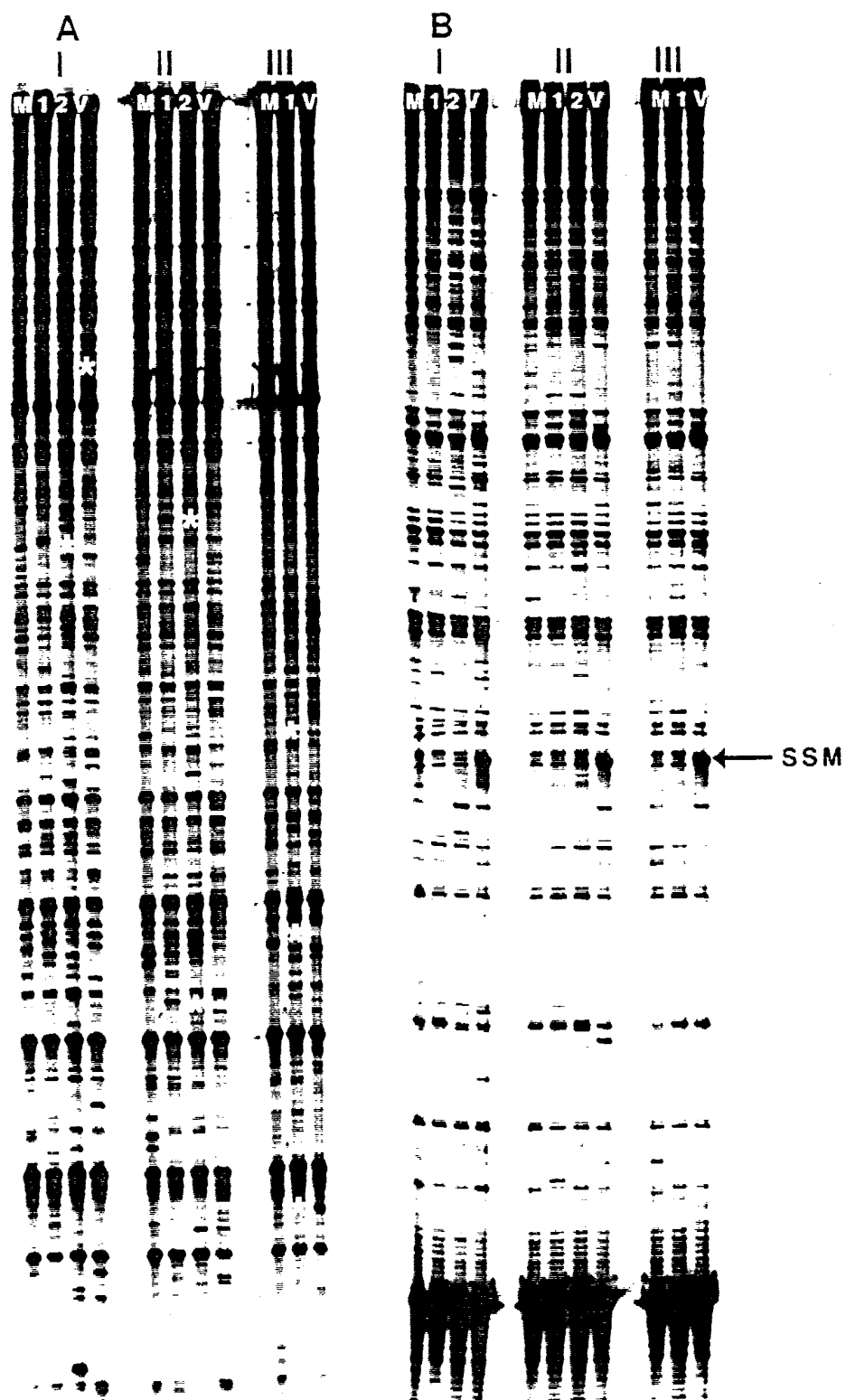
7/14

FIG. 7



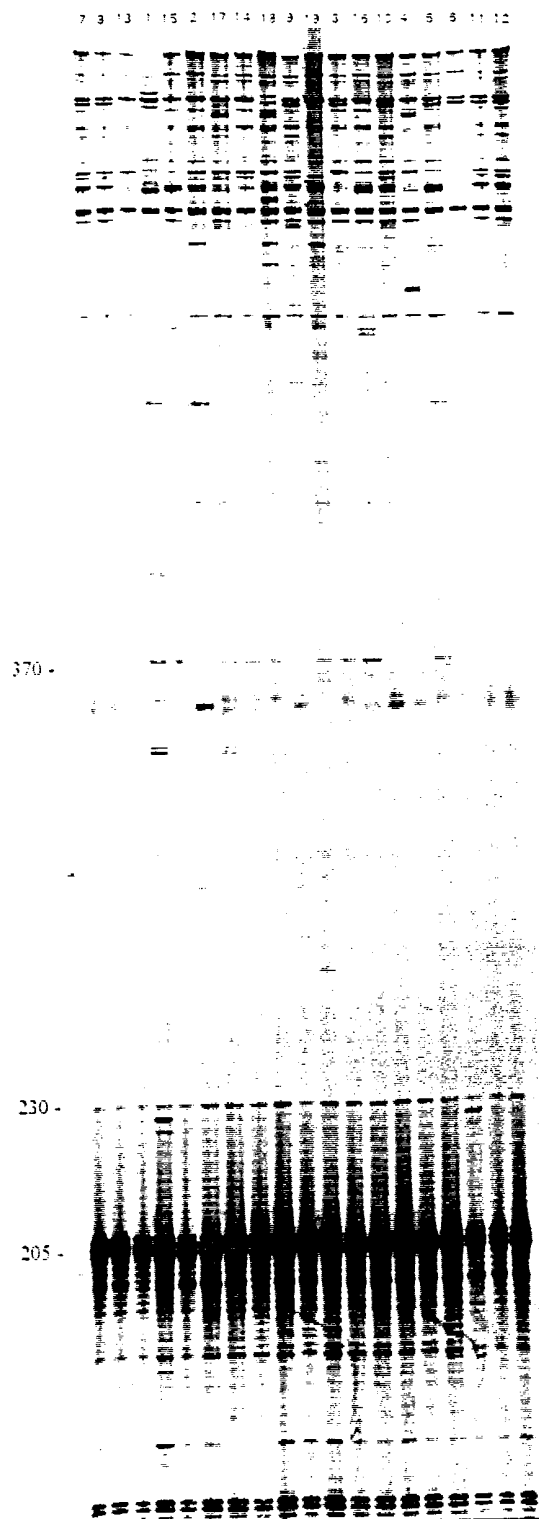
8/14

FIG. 8



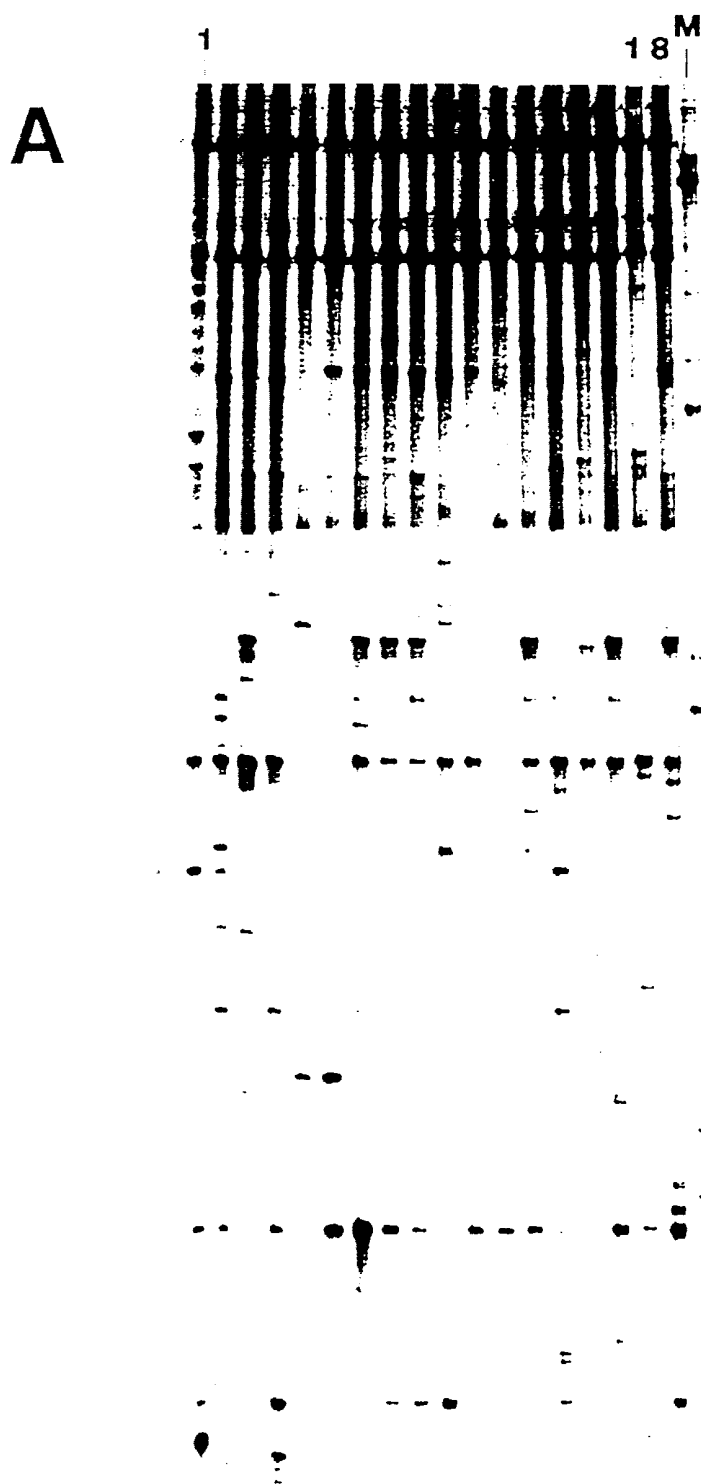
9/14

FIG. 9



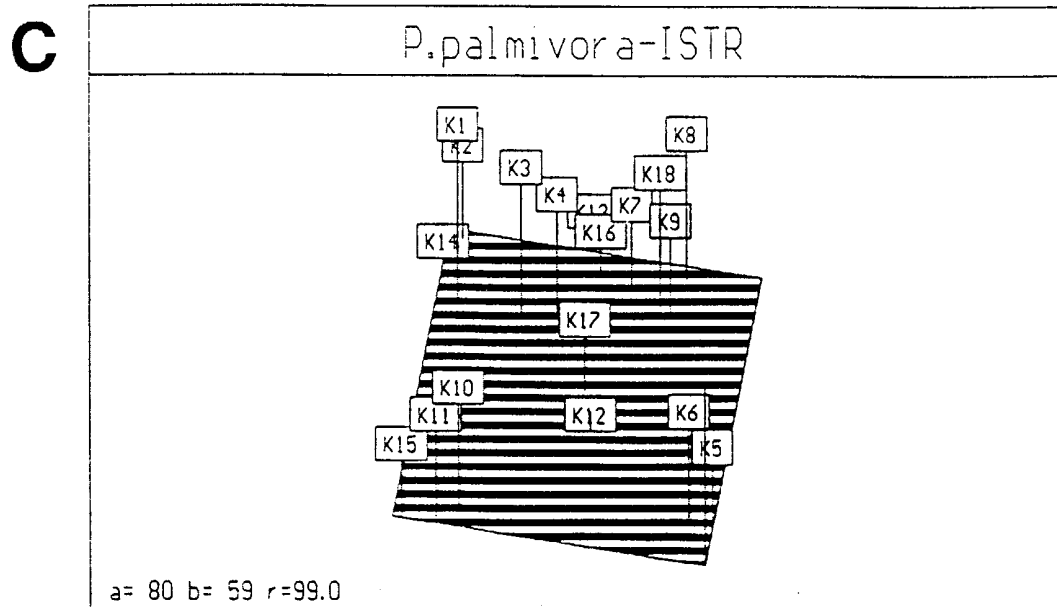
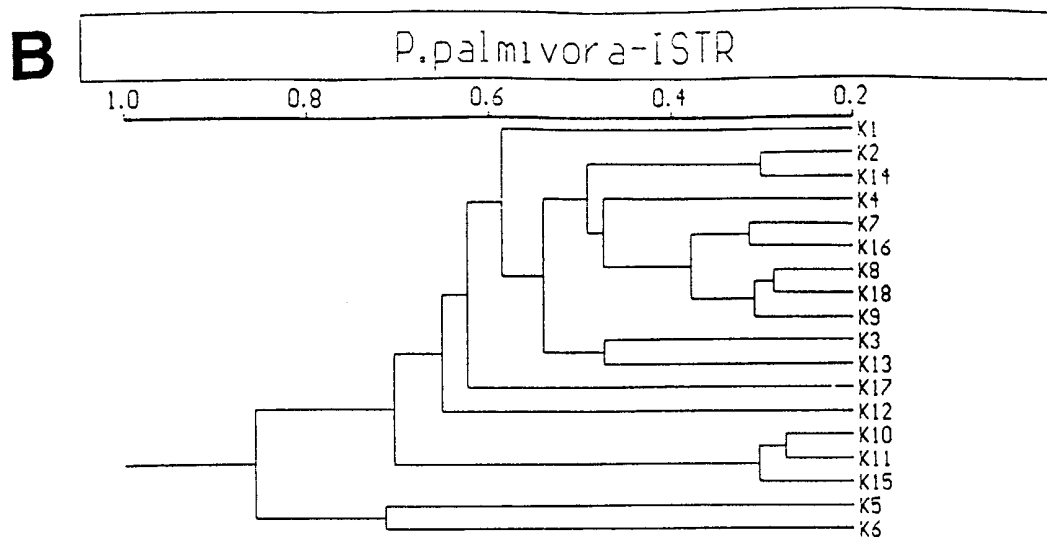
10/14

FIG. 10



11/14

FIG. 10



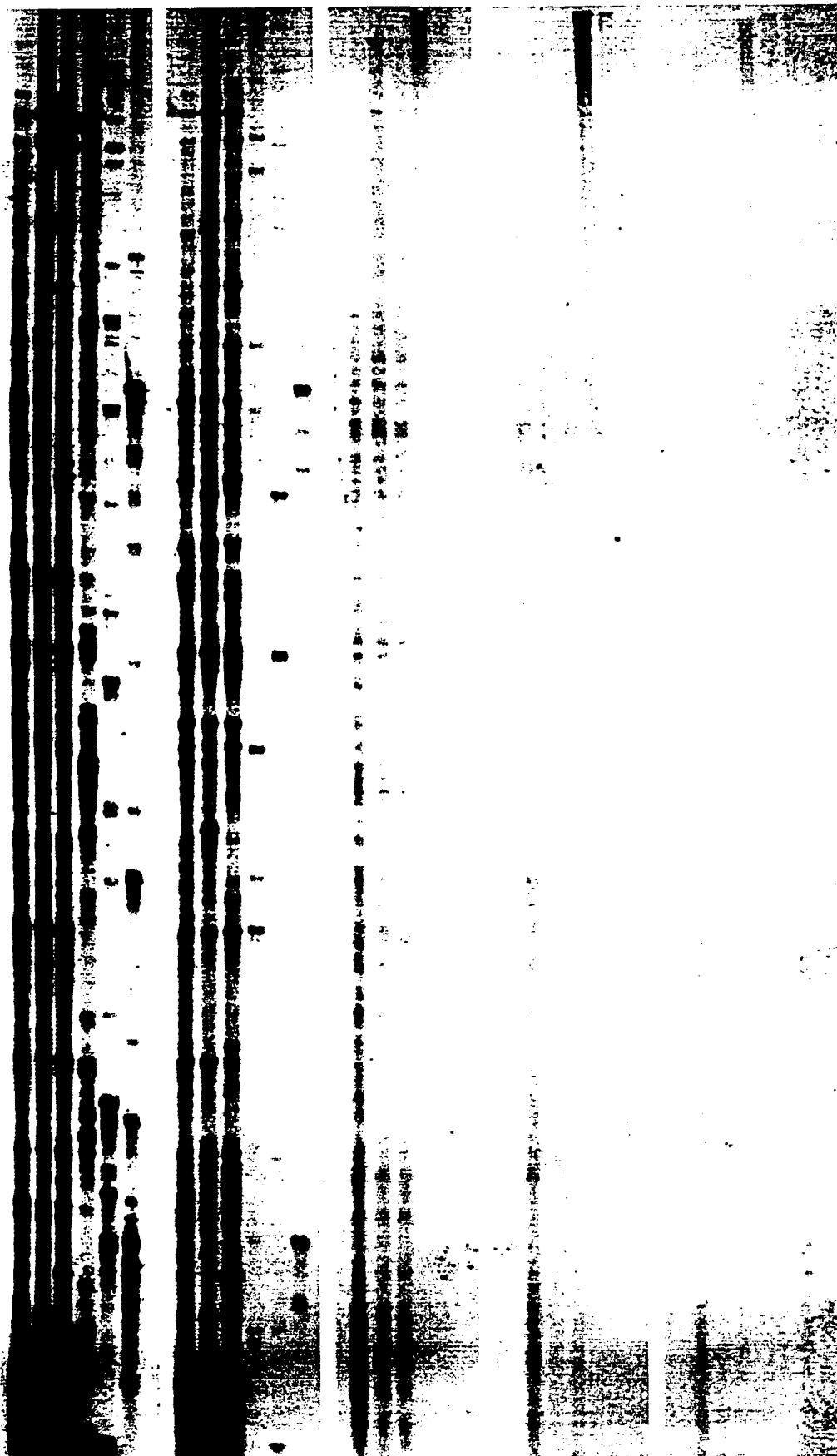
12/14

50 A 55

60

65

72



50 **B** **55** **60** **65** **72**

13/14



14/14

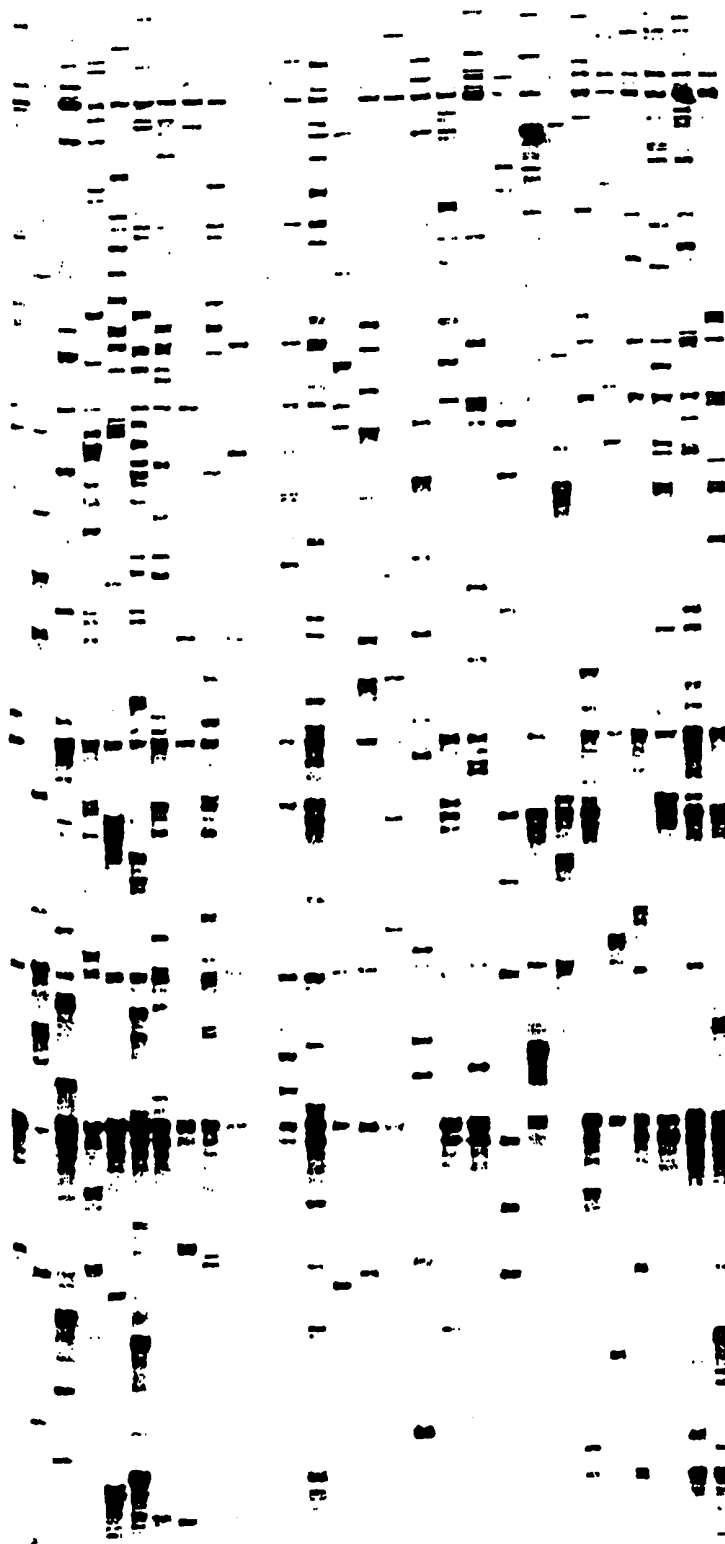


Fig. 14