



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 19 143 T2 2005.08.11**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 064 406 B1

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/68**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 19 143.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP99/01782**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 915 651.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/047705**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.03.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **23.09.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.01.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **04.08.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.08.2005**

(30) Unionspriorität:

9805935 19.03.1998 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Novartis AG, Basel, CH

(72) Erfinder:

ABEL, Andreas, CH-4102 Binningen, CH; BECK, Joseph, James, Cary, US; EHRAT, Markus, CH-4312 Magden, CH; OROSZLAN, Peter, CH-4053 Basel, CH

(74) Vertreter:

Zumstein & Klingseisen, 80331 München

(54) Bezeichnung: **NUKLEINSÄURE HYBRIDISIERUNG-TESTVERFAHREN IN LÖSUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die nicht-isotope Quantifizierung von Polynukleotiden, insbesondere die sequenz-spezifische Erkennung und Quantifizierung mit Hilfe der optischen Affinitäts-Sensor-Technologie.

[0002] Es wurde ein Verfahren zur direkten Quantifizierung von Nukleinsäuren in klinischen Proben von Cytomegalovirus (CMV), Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV) und Immunodeficiency-Virus (HIV) unter Verwendung der verzweigten DNA (bDNA)-Technologie entwickelt (Dewar et al. (1994), J. Infect. Dis. 170, 1172–1179; US-4 868 105). Das Verfahren, das weitverzweigte Oligonukleotide zur Signalverstärkung und enzymatischen Signalerzeugung verwendet, ist im Stande, einige Tausend Genome (physiologische Konzentrationen) eines gegebenen Virus nachzuweisen. Ein Nukleinsäure-Sandwich-Assay in Lösungsphase unter Verwendung der bDNA-Technologie wird in US-4 868 105 beschrieben.

[0003] Ein Nukleinsäure-Sandwich-Assay in Lösungsphase verwendet das Minimum eines Sets von Capture-Proben und eines Sets von Label-Proben, um die Target-Nukleinsäure nachzuweisen, indem die Label-Probe (in einem Capture-Probe/Target-Nukleinsäure/Label-Probe-Sandwich) auf einer Oberfläche derart immobilisiert wird, dass eine Trennung von gebundenem und nicht-gebundenem Label und Nachweis/Quantifizierung von gebundenem (oder nicht-gebundenem) Label und hiermit der Target-Nukleinsäure möglich wird. Die Capture- und Label-Proben umfassen Nukleinsäuren mit Bereichen, die zur Target-Nukleinsäure komplementär sind. Die Label-Probe kann bDNA umfassen, wie in US-4 868 105 beschrieben.

[0004] Die Verwendung eines Verfahren zur Signalverstärkung erlaubt einen sensitiven Nachweis und Quantifizierung, besitzt jedoch den Nachteil, dass die Quantifizierung möglicherweise nicht exakt ist, insbesondere wenn das zu bestimmende Target-Polynukleotid in einem komplexen Medium, wie Blut, Gewebe oder Pflanzenextrakten, erhalten wird. In der Probe vorhandene Moleküle können in die Signalverstärkung eingreifen und hierdurch die Reproduzierbarkeit und damit die Eignung zur Verwendung als quantitative Methode reduzieren. Es können Probenherstellungsstufen durchgeführt werden, um den Gehalt an störenden Verunreinigungen zu reduzieren, jedoch können diese zeitaufwendig sein und weitere Quellen für eine Veränderung einschleusen.

[0005] Somit sind Nachteile der Signalverstärkungs-Strategien, insbesondere bDNA, i), die Notwendigkeit einer weiteren Verstärkungsstufe, ii) die mühsame Chemie möglicherweise begleitet von einer ziemlich hohen NSB/nicht-spezifischen Hybridisierung (NSH) durch das letzte Paar der Assay-Stufen, d.h. Hybridisierung von bDNA zu dem Oberflächen gebundenen Target-DNA-Komplex und Hybridisierung der Label-Probe (sperriges Enzym-Label) zu der bDNA, iii) langsame, schleppende Bindungskinetik, daher geringe Effizienz der bDNA-Stufe selbst, und iv) ausgedehntes (sich hinziehendes) Assay-Verfahren.

[0006] Polynukleotide besitzen die Tendenz, stark mit anderen geladenen Makromolekülen, wie Proteinen, zu assoziieren. Über den Daumen gepeilt, je größer/sperriger das Nukleotid ist, um so stärker kann diese Assoziation sein. Dies macht die Durchführung des gesamten bDNA-Assays in einer Stufe unmöglich, da die bDNA sich in dem Probenmedium an Makromoleküle binden kann. Die nicht-spezifische Bindung von verschiedenen Spezies an den Komplex in Lösungsphase oder an die Oberfläche kann eine überproportionale Menge an bDNA während der späteren Phase des Assays einfangen. All dies kann zu einer erhöhten Messungs-Variabilität führen, insbesondere wenn es sich um komplexe Probenmedien handelt.

[0007] Bei der vorstehenden Methode ist es auch nötig, das an das Target-Polynukleotid gebundene Label vom nicht-gebundenen Label zu trennen. Dies kann in die Messungen eine weitere Variabilität einführen. Wird das Label durch Fluoreszenz, Chemilumineszenz oder Absorption nachgewiesen, kann die optische Opazität des Probenmediums den Nachweis des in dem Probenmedium verbleibenden Labels beeinträchtigen und eine zusätzliche Variabilität mit sich bringen.

[0008] Andere Methoden zum Nachweis eines Polynukleotids in niedrigen Konzentrationen macht von einer Amplifikationsmethode, wie der Polymerase-Kettenreaktion Gebrauch, um die Anzahl der Kopien des Target-Polynukleotids vor der Verwendung einer Nachweismethode zu erhöhen. Diagnostische Systeme, die mit Target-Amplifikationsmethoden arbeiten, wie PCR, können andere Quantifizierungsprobleme aufweisen, d.h. Fehler während des Amplifikationsverfahrens einführen. Mutationen in der Target-Polynukleotid-Sequenz können ebenfalls einen Effekt mit dem Faktor von einigen Hunderten auf die Nachweis-Effizienz ausüben (Urdea (1994), Biotechnology, 12, 926–928).

[0009] Es besteht daher ein Bedarf für ein Verfahren zum Nachweis eines Target-Polynukleotids bei sehr geringen Konzentrationen, das keine Amplifikationsstufe erfordert und das weniger zu Störungen infolge von

Komponenten des Probenmaterials neigt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Diesem Bedarf kann mit Hilfe eines Verfahrens genügt werden, das auf dem Nachweis der Lumineszenz beruht, die in dem evaneszenten Feld eines optischen Wellenleiters angeregt wird.

[0011] Das Verfahren des Nachweises eines Target-Polynukleotids verwendet einen Nukleinsäure-Sandwich-Assay in Lösungsphase, worin der feste Träger ein optischer planarer Wellenleiter ist, und das Label nachgewiesen wird durch Messen der Lumineszenz, die in dem evaneszenten Feld des Wellenleiters angeregt wird oder durch Messen der Lumineszenz, die in dem Nah-Feld des Wellenleiters erzeugt wird.

[0012] Das Phänomen des evaneszenten Felds kann unter Verwendung des Beispiels eines planaren optischen Wellenleiters beschrieben werden. Wird eine Lichtwelle in einen planaren optischen Wellenleiter gekuppelt, der von Medien mit niedrigeren Brechungsindizes umgeben ist, ist sie durch nahezu vollständige Reflexion an den Grenzflächen der Wellenleiterschicht begrenzt. Im einfachsten Fall besteht ein planarer optischer Wellenleiter aus einem Dreischichtensystem: Substrat, Wellenleiterschicht, Überschicht (oder zu untersuchende Proben), wobei die Wellenleiterschicht den höchsten Brechungsindex aufweist. Zusätzliche Zwischenschichten können die Wirkung des planaren optischen Wellenleiters weiter verbessern.

[0013] Bei dieser Anordnung gelangt eine Fraktion bzw. ein Teil der elektromagnetischen Energie in das Medium mit dem niedrigeren Brechungsindex. Dieser Teil wird als evaneszentes (schwächer werdendes) Feld bezeichnet. Die Stärke des evaneszenten Felds hängt in sehr großem Ausmaß von der Dicke der Wellenleiterschicht selbst und von dem Verhältnis der Brechungsindizes der Wellenleiterschicht und der sie umgebenden Medien ab. Im Fall von dünnen Wellenleitern, d.h. Schichtdicken, die gleich sind wie oder geringer sind als die zu leitende Wellenlänge, können diskrete Moden des geleiteten Lichts unterschieden werden.

[0014] Unter Verwendung eines evaneszenten Felds ist es beispielsweise möglich, Lumineszenz in Medien mit relativ geringem Brechungsindex anzuregen und diese Lumineszenz lediglich in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem Wellenleiterbereich anzuregen. Dieses Prinzip ist als evaneszente Lumineszenz-Anregung bekannt.

[0015] Evaneszente Lumineszenz-Anregung ist bei der Analyse von Nutzen, da die Anregung auf die unmittelbare Nähe zur Wellenleiterschicht begrenzt ist. Somit werden etwaige lumineszierende Moleküle, die sich nicht in unmittelbarer Nähe zur Wellenleiterschicht befinden, nicht nachgewiesen und müssen nicht entfernt werden, um lumineszierende Moleküle, die beispielsweise über biochemische Wechselwirkung an die Oberfläche des Wellenleiters gebunden wurden, zu bestimmen.

[0016] Methoden und Vorrichtungen zur Bestimmung der evaneszent angeregten Lumineszenz von Antikörpern oder Antigenen, die mit Lumineszenz-Farbstoffen einem Labelling unterzogen worden sind, sind bekannt und werden zum Beispiel in US-A-4 582 809 beschrieben. Die dort beanspruchte Anordnung verwendet eine optische Faser zur evaneszenten Lumineszenz-Anregung. Derartige optische Fasern besitzen typischerweise einen Durchmesser bis zu einem Millimeter und leiten eine Vielzahl von Moden bzw. Wellentypen, wenn Laserlicht in sie eingekoppelt wird. Die evaneszent angeregte Lumineszenz kann einfach lediglich mittels des Teils gemessen werden, der in die Fasern zurückgekoppelt wird. Die Vorrichtung ist relativ groß und vergleichsweise große Probenvolumina sind notwendig. Die Empfindlichkeit ist durch die relativ schwachen evaneszenten Feld-Intensitäten, die mit hochgradigen Multimoden-Wellenleitern assoziiert sind, begrenzt. Die Empfindlichkeit ist weiterhin durch die Endflächen-Output-Kopplung begrenzt: da die Anregungs- und Lumineszenz-Strahlung co-linear laufen und durch Strahlenteiler und Filter (z.B. Sperrfilter oder Bandfilter) getrennt werden müssen, beschränkt das Unterscheidungsvermögen der Filtereinheit die Nachweisempfindlichkeit.

[0017] Photometrische Instrumente zur Bestimmung der Lumineszenz von Biosensoren unter evaneszenten Anregungs-Bedingungen bei Verwendung von planaren optischen Wellenleitern sind ebenfalls bekannt und werden zum Beispiel in WO 90/06503 beschrieben, wo planare Wellenleiter von 160 nm bis 1000 nm Dicke verwendet werden. Die Anregungswelle wird ohne Gitterkoppler eingekoppelt.

[0018] Es wurden verschiedene Versuche unternommen, um die Empfindlichkeit der evaneszent angeregten Lumineszenz zu erhöhen und integrierte optische Sensoren herzustellen. Diese schlossen Verbesserungen ein bei der Herstellung von planaren Wellenleitern mit hoher gleichmäßiger optischer Qualität und reproduzierbaren konstanten Schichtdicken, und Verbesserungen hinsichtlich der Natur der Einkopplung der Lichtwelle in

die Wellenleiterschicht einschließlich der Verwendung von Gittern (Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors V (1994), Proc. SPIE, 2068, 313–325). Die Verwendung von Gittern in Kombination mit Lumineszenz wird in US-A-5 081 012 und WO 95/33198 beschrieben. In US-A-5 081 012 wird Anregungslicht in einen Wellenleiterfilm mit einer Dicke von 200 nm bis 1000 nm eingekoppelt und durch den als Messbereich zu verwendenden Teil bis zu einem zweiten reflektierenden Gitter mit dem Ergebnis weitergeleitet, das die eingekoppelte Lichtwelle zumindest zweimal durch den Messbereich zwischen den Gittern passieren muss. Es wird angenommen, dass dies die Empfindlichkeit erhöht. Ein Nachteil jedoch besteht darin, dass die Reflexion zu einer erhöhten Streuung des Anregungslights und einer Erhöhung in der Hintergrund-Strahlungsintensität führen kann. In WO 95/33198 wird ein erstes Gitter zur Einkopplung des Anregungslights in den Wellenleiter und ein zweites separates Gitter für die Auskopplung der Menge an Lumineszenz verwendet, die entlang der weitergeleiteten Anregungs-Mode angeregt und in den Wellenleiter zurückgekoppelt wurde.

[0019] Außer der Verwendung eines evaneszenten Felds, das mit Anregungslight assoziiert ist, welches in der Wellenleiterschicht für die Anregung lumineszierender Moleküle nahe der Wellenleiteroberfläche weitergeleitet wird, ist es auch möglich, Luminophore in dem Nah-Feld des Wellenleiters unter Verwendung klassischer Konfigurationen der Trans-Illumination oder Oberflächen-Illumination anzuregen. Der sich an der Oberfläche der Wellenleiterschicht befindende Analyt wird direkt mit dem Anregungslight entweder durch den Träger des planaren Wellenleiters oder durch Strahlung entgegengesetzt zur Wellenleiterschicht bestrahlt. Es sollte zu verstehen sein, dass das Nah-Feld durch die Eindringtiefe des evaneszenten Felds der geleiteten Lumineszenz begrenzt ist. In diesem Fall ist die Menge an Anregungslight, die sich in dem Wellenleiter fortbewegt, vernachlässigbar. Von der Menge der Lumineszenz, die aus Luminophoren in dem Nah-Feld des Wellenleiters stammt, wird jedoch eine signifikante Menge in den Wellenleiter eingekoppelt und kann einem optischen Detektor unter Verwendung eines auskoppelnden Beugungsgitters zugeführt werden. Aufgrund der hohen geometrischen Raum-Selektivität des Rückkopplungsmechanismus bei dieser Konfiguration, die zu sehr niedrigen Hintergrund-Signalen führt, kann eine hohe Empfindlichkeit erreicht werden.

[0020] Es wurden auch Verbesserungen erzielt, um den Nachweis von evaneszent angeregter Lumineszenz in Mehrfachproben gleichzeitig oder in rascher Abfolge zu ermöglichen. WO 94/27137 schlägt zum Beispiel eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Durchführung von Immuno-Assays unter Verwendung der evaneszent angeregten Fluoreszenz vor.

[0021] In WO 92/19976 wird eine Anordnung beschrieben, die eine Vielzahl integrierter Messstreifen zum Nachweis eines komplexen Signals, zum Beispiel dem Nachweis eines Geruchs durch eine künstliche Nase, umfasst.

[0022] In WO 96/35940 wird eine Sensor-Plattform auf Basis von zumindest zwei planaren, getrennten, anorganischen, dielektrischen Wellenleiterbereichen auf einem üblichen Substrat beschrieben, wobei die Plattform geeignet ist zur parallelen evaneszenten Anregung und Nachweis der Lumineszenz von identischen oder verschiedenen Analyten. Derartige getrennte Wellenleiterbereiche können jeweils ein oder mehrere Kopplungsgitter aufweisen. Ein wesentlicher Vorteil dieser Sensor-Plattform besteht darin, dass beispielsweise mehrere Probenlösungen gleichzeitig mit einem hohen Empfindlichkeitsgrad analysiert werden können. Als Folge der Realzeit-Messtauglichkeit sind keine Wasch- oder Reinigungsstufen zwischen den einzelnen Messungen notwendig mit dem Ergebnis, dass ein hoher Probendurchsatz je Zeiteinheit erreicht wird. Zusätzlich zur zeitgleichen Analyse einer Vielzahl von Probenlösungen ist es auch möglich, dass eine Probenlösung hinsichtlich mehrerer ihrer Analyte gleichzeitig oder in Abfolge auf einer Sensor-Plattform untersucht wird. Dies ist insbesondere im Fall einer Blut- oder Serum-Untersuchung von Vorteil, die so besonders rasch und wirtschaftlich durchgeführt werden kann. Sollen mehrere Probenlösungen gleichzeitig analysiert werden, verhindern die getrennten Wellenleiterbereiche einen Cross-Talk zwischen lumineszierenden Signalen von verschiedenen Proben. Es können ein hoher Selektivitätsgrad und niedrige Fehlerraten mit dieser Methode erzielt werden.

[0023] Die individuellen separaten Wellenleiterbereiche können selektiv auf optischen, chemischen oder fluidikalen Wegen angesprochen werden.

[0024] Besonders geeignet ist eine Sensor-Plattform mit physikalisch oder optisch separaten planaren Wellenleiterbereichen, worin lediglich ein Modus oder eine geringe Anzahl von Moden geleitet wird. Eine derartige Sensor-Plattform wird in WO 95/33197 beschrieben. Sie zeichnet sich durch einen besonders hohen Empfindlichkeitsgrad und eine außerordentlich kleine Struktur aus. Unter Verwendung der Wellenleiter-Filmparameter wie in WO 95/33197 beschrieben, kann die Abdämpfung der geleiteten Lichtwelle geringer als 3 dB/cm sein, wodurch ein in großem Abstand geleiteter Strahl und eine geringe Streuung der geleiteten Welle in das sie umgebende Medium erzielt wird. Eine derartige Sensorplattform mag als "Chip" bekannt sein. In der Regel wird

nicht der gleiche Empfindlichkeitsgrad mit multi-modalen Wellenleitern planarer Struktur erzielt.

[0025] Die Verwendung von auf evaneszent angeregter Fluoreszenz basierender Methoden für den Nachweis und die Quantifizierung von Polynukleotiden wird in WO 95/33198, WO 96/35940 und WO 95/33197 erwähnt, jedoch werden keine Methoden zur Optimierung der Empfindlichkeit des Nachweises beschrieben. WO 95/16055 beschreibt eine Masse-Fluoreszenz-Anregungsmethode, worin die Empfindlichkeit erhöht wird, indem man eine Amplifier-Bindung verwendet, die an das Target gebunden ist, woran multiple Label-Proben gebunden sind und indem man spezielle Bindungsbedingungen für Capture, Capture-Extender, Label-Extender und Label-Proben aufrechterhält.

[0026] Diese Erfindung verwertet die Empfindlichkeit des Nachweises der evaneszent angeregten Lumineszenz bei einem Verfahren zum Nachweis von Polynukleotiden, insbesondere bei geringen Konzentrationen. Das Verfahren macht Gebrauch von multiplen fluoreszent einem Labelling unterzogenen Polynukleotiden (Label-Extender-Proben), die gebunden sind an ein Target-Polynukleotid oder dieses binden, welches an der Oberfläche eines optischen planaren Wellenleiters abgefangen (d.h. denaturiert und immobilisiert) ist. Das Target-Polynukleotid wird abgefangen durch Binden an eine oder eine Reihe von Capture-Extender-Proben, die sich an multiple Kopien einer einzelnen Spezies einer Capture-Probe, welche an den Wellenleiter gebunden sind, binden. Alternativ können die Capture-Extender-Probe (wenn keine Capture-Probe verwendet wird) oder die Capture-Probe weiter einen Liganden umfassen, der zur Bindung an einen Rezeptor befähigt ist, welcher an der Oberfläche des Wellenleiters gebunden ist. Dies ist möglich, da das Label nicht zu weit von der Oberfläche des Wellenleiters platziert wird, da die evaneszente Lumineszenz exponentiell mit dem Abstand von der Oberfläche abnimmt. Das gebundene Label wird hiernach in dem evaneszenten Feld nachgewiesen. Das gebundene Label ist der Menge des in der Assay-Probe vorhandenen Target-Polynukleotids proportional und die Menge des Target-Polynukleotids kann durch Bezugnahme auf Proben quantifiziert werden, die bekannte Mengen des Target-Polynukleotids enthalten oder unter Verwendung einer Referenzkurve, die hergestellt wurde unter Verwendung eines Polynukleotids mit der gleichen Sequenz bekannter Konzentration und Reinheit. Die Quantifizierung ist auch möglich unter Verwendung von internen Standards oder einer Zwei- oder Multi-Wellenlängenmethode, d.h.

[0027] Energietransfer oder Zwei-Label-Koinzidenzmethode. Der bzw. die internen Standards müssen nicht das Target-Polynukleotid sein. Sie können eine beliebige Sequenz sein, die so ausgestaltet ist, dass sie die als internen Standard zu verwendenden Kriterien erfüllt.

[0028] Die Methode kann zu einer höheren Effizienz der Nachweiskaskade im Vergleich zu der bDNA-Methode führen (d.h. einer weitaus höheren Gesamtausbeute an abgefangenem Label) und daher zu einer gleichen oder höheren Empfindlichkeit, was den Nachweis von < 50 Target-Sequenzen erlaubt, die äquivalent sein können zur physiologischen Konzentration einer relevanten biologischen Target-Probe (z.B. HIV-virale mRNA).

[0029] Unter "optischer planarer Wellenleiter" ist ein Wellenleiter zu verstehen, der im Wesentlichen aus einem planaren Träger und einer dünnen transparenten Schicht auf einer Oberfläche mit einem höheren Brechungsindex als demjenigen des Trägers besteht, wobei der Träger und die dünne Wellenleiterschicht auf seiner Oberfläche zumindest in dem spektralen Bereich zwischen der nachzuweisenden Anregungs- und Emissionswellenlänge transparent ist. Im Kontakt mit der Wellenleiterschicht wird ein optisches Kopplungselement, vorzugsweise ein optisches Beugungselement (DOE) zur Einkopplung von Anregungslicht moduliert. Vorzugsweise ist das DOE ein Reliefgitter. Das Gitter kann zuerst in der Trägerschicht, zum Beispiel mit Hilfe photolithographischer Methoden, wie in Proc. SPIE, 2068 (1993), 313–325, beschrieben, erzeugt und dann nach Abscheiden der Wellenleiterschicht in die Wellenleiterschicht transferiert werden, oder es kann in der abgeschiedenen Wellenleiterschicht gebildet werden. Bevorzugter sind in der Wellenleiterschicht zwei separate modulierte Gitter, eines das als Einkopplungsgitter verwendet wird und ein anderes für die Auskopplung von angeregtem Emissionslicht. Gitterkonstanten und Dimensionen werden in WO 95/33198, EP-A-0 759 159 und WO 96/35940 beschrieben. Die planare Wellenleitertechnologie ist aus dem Stand der Technik, zum Beispiel wie in den vorstehenden Literaturstellen beschrieben, gut bekannt. Transparenz in diesem und im folgenden Zusammenhang bedeutet Transparenz im spektralen Bereich von der Anregung bis zur nachzuweisenden Emissionswellenlänge.

[0030] Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt den Vorteil, dass die Trennung von gebundenem und nicht-gebundenem Label nicht notwendigerweise erforderlich ist, da lediglich gebundenes Label nachgewiesen wird. Die optische Opazität der Probe beeinträchtigt nicht signifikant den Nachweis von gebundenem Label. Es wurde gefunden, dass die inkorporierte dreifache Selektivität, d.h. das evaneszente Feld für die räumliche Auflösung, die biochemische Erkennung für die chemische Selektivität und das Fluoreszenz-Labelling für

verbesserte Selektivität und Empfindlichkeit des Nachweises die Messung geringster Mengen an Analyten in einem komplexen Probenmedium, wie Blut, Gewebe oder Pflanzenextrakte, ohne langwierige Probenherstellung erlaubt.

[0031] Es versteht sich, dass das Verfahren der Erfindung eine Methode des Nachweises eines Target-Polynukleotids anwenden kann, welche einen Nukleinsäure-Sandwich-Assay in Lösungsphase umfasst, der ähnlich sein kann demjenigen, wie er in US-4 868 105, wie vorstehend erläutert, beschrieben wird, mit der Ausnahme, dass der feste Träger ein optischer planarer Wellenleiter ist, das gebundene Label von dem nicht gebundenen Label vor der Messung des gebundenen Labels abgetrennt oder nicht abgetrennt werden kann, und das Label nachgewiesen wird durch Messen der Lumineszenz, die in dem evaneszenten Feld des Wellenleiters angeregt wird, oder durch Messen der Lumineszenz, die in dem Nah-Feld des Wellenleiters erzeugt wird.

[0032] Es wurde gefunden, dass die zwei oder drei Hybridisierungs-Wechselwirkungen, die nötig sind, um das fluoreszierende Label in das evaneszente Feld zu bringen, das erfindungsgemäße Verfahren selektiver machen als die zuvor beschriebenen Methoden des Polynukleotid-Nachweises unter Verwendung von planaren Wellenleitern, die eine einzige Hybridisierungs-Wechselwirkung in Betracht ziehen. Es wurden gefunden, dass die Multiple-Capture- und -Label-Extender-Proben, die sich an ein Target-Polynukleotid binden können, das Verfahren empfindlicher machen als die früher beschriebenen Methoden.

[0033] Es ist auch ersichtlich, dass das Wiederbeschichten des Wellenleiters mit Capture-Proben nicht nötig ist, um verschiedene Target-Polynukleotide unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Methode nachzuweisen, da das Target-Polynukleotid nicht direkt zur Capture-Probe hybridisiert, ganz im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Methoden (zum Beispiel in WO 95/33198 und WO 96/35940), wo das Target-Polynukleotid direkt zu dem an den Wellenleiter gebundenen Polynukleotid hybridisiert, wo ein Wiederbeschichten mit einem verschiedenen Polynukleotid erforderlich sein kann. Die Sequenz der Capture-Extender-Probe kann derart variiert werden, dass verschiedene Capture-Extender-Proben imstande sind, sich an eine gemeinsame Capture-Probe, jedoch verschiedene Target-Polynukleotide zu binden.

[0034] Ein erster Aspekt der Erfindung umfasst ein Verfahren zum Nachweis eines Target-Polynukleotids, bei dem zwei Sets von Reagenzien, ein Labelling-Set und ein Capture-Set, eingesetzt werden, und worin ein optischer planarer Wellenleiter verwendet wird, umfassend

1) die Bereitstellung des Labelling-Sets der Reagenzien, welches umfasst:

a) eine Vielzahl von Label-Proben, jeweils umfassend einen Label-Teil und einen Nukleinsäurebereich (der vorzugsweise einsträngig ist) mit gleichen oder verschiedenen Sequenzen L1 (vorzugsweise zwischen etwa 5 und 100 Nukleotiden (nt) lang; bevorzugter zwischen etwa 8 und 100 nt lang), die komplementär sind zu gleichen oder verschiedenen Sequenzen des Target-Polynukleotids, und gegebenenfalls zweite Sequenzen zwischen dem Label-Teil und Sequenzen L1, die weder komplementär sind zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids noch zu dem Capture-Extender oder Capture-Proben und die weniger als etwa 500 nt lang sind, wobei der Label-Teil ein Label umfasst, das ein Signal liefert, welches nachweisbar ist durch Lumineszenz einschließlich evaneszent angeregter Lumineszenz, oder

b) eine Vielzahl von (b1) Label-Extender-Proben, von denen eine jede eine Labelbindende Nukleinsäuresequenz L2 und Nukleinsäuresequenzen L1 umfasst, worin die Sequenzen L1 komplementär sind zu Nukleinsäuresequenzen des Target-Polynukleotids und die Sequenz L2 komplementär ist zu der Nukleinsäuresequenz L3 einer Label-Probe, und gegebenenfalls (b2) eine Label-Probe, umfassend eine Nukleinsäuresequenz L3, die komplementär ist zu der Sequenz L2, und ein Label-Teil, umfassend ein Label, das ein Signal liefert, welches nachweisbar ist durch Lumineszenz einschließlich der evaneszent angeregten Lumineszenz, und

2) die Bereitstellung des Capture-Sets von Reagenzien, umfassend

c) eine Vielzahl von Capture-Proben, umfassend gleiche oder verschiedene Nukleinsäuresequenzen D1, die komplementär sind zu Nukleinsäuresequenzen des Target-Polynukleotids, worin die Nukleinsäuresequenzen D1 (vorzugsweise zwischen etwa 10 und 100 nt lang) nicht komplementär sind zu Sequenzen L1, L2 und L3, die in der Label-Probe und der Label-Extender-Probe enthalten sind, und worin die Capture-Probe gebunden ist an oder befähigt ist, spezifisch gebunden zu werden an die Oberfläche der Wellenleiterschicht eines Wellenleiters, entweder direkt oder über verknüpfende Gruppen; oder

d) eine Vielzahl von (d1) Capture-Extender-Proben, jeweils umfassend einen Nukleinsäurebereich (vorzugsweise einsträngig) mit einer Sequenz C1 (vorzugsweise zwischen etwa 10 und 100 nt lang), die komplementär ist zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids, und gegebenenfalls einen zweiten Bereich, der nicht komplementär ist zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids und vorzugsweise kleiner ist als etwa 500 nt lang, und weiterhin umfassend eine Capture-Probenerkennungs-Nukleinsäuresequenz C2, und (d2) eine Capture-Probe und worin die Capture-Probe gebunden ist an oder befähigt ist, gebunden zu werden

an die Oberfläche der Wellenleiterschicht eines Wellenleiters entweder direkt oder über verknüpfende Gruppen, umfassend Nukleinsäuresequenzen D2, die komplementär sind zur Sequenz C2, worin die Sequenzen L1 und C1 nicht-identische, nicht-komplementäre Sequenzen sind;

3) Kombinieren in einem wässrigen Medium unter bindenden Bedingungen für komplementäre Sequenzen, einer Testprobe, worin die Anwesenheit des Target-Polynukleotids bestimmt werden soll (das derart behandelt worden sein kann, dass das Target-Polynukleotid in einsträngiger Form vorliegt), mit

a) Zusammensetzungen 1a) und 2c) oder 1a) und 2d), oder (b) Zusammensetzungen 1b) und 2c) oder 1b) und 2d), oder (c) Zusammensetzungen 1a), 1b) und 2c) oder 1a), 1b) und 2d), oder (d) Zusammensetzungen 1a), 2c) und 2d) oder 1b), 2c) und 2d), oder (e) Zusammensetzungen 1a), 1b), 2c) und 2d), so dass Komplexe gebildet werden;

4) Binden der Komplexe von Stufe 3 an den Wellenleiter über eine Vielzahl von Kopien der Capture-Probe (die Capture-Probe kann an den Wellenleiter vor dem Binden an die Komplexe von Stufe 3 gebunden werden oder an den Wellenleiter nach Binden an die Komplexe von Stufe 3 gebunden werden);

5) wenn die Zusammensetzung 1b) keine Label-Probe umfasst und ein Label nicht in Stufe 3 eingeschlossen ist, um besagte Komplexe einem Labelling zu unterziehen, dann Kombinieren des gebundenen Komplexes von Stufe 4 mit dem Label;

6) Nachweis des an das Target-Polynukleotid gebundenen Labels durch Messen der Lumineszenz, die in dem evaneszenten Feld des Wellenleiters angeregt wird, oder durch Messen der Lumineszenz, die in dem nahen Feld des Wellenleiters erzeugt wird,

wobei zumindest zwei Label-Proben oder Label-Extender, Capture-Proben oder Capture-Extender-Proben mit verschiedenen Nukleinsäuresequenzen, die zu verschiedenen Target-Nukleinsäuresequenzen komplementär sind, verwendet werden.

[0035] Es ist bevorzugt, dass jede der Sequenzen L1 komplementär ist zu einem jeweiligen physikalisch eigenständigen nicht-überlappenden Bereich des besagten Target-Polynukleotids; und es ist bevorzugt, dass jede der Sequenzen L1 und C1 nicht-identische, nicht komplementäre Sequenzen sind, die vorzugsweise jeweils komplementär sind zu physikalisch eigenständigen nicht-überlappenden Bereichen des Target-Polynukleotids.

[0036] Eine Vielzahl bedeutet im Zusammenhang mit der Erfindung, dass bis zu 100, vorzugsweise 5 bis 80, insbesondere 5 bis 50, meist bevorzugt 5 bis 40, und ganz besonders bevorzugt 10 bis 30, mit verschiedenen Nukleinsequenzen verwendet werden können.

[0037] Vorzugsweise wird die Lumineszenz unter Verwendung eines optischen Kopplungselements in den Wellenleiter eingekoppelt, weitergeleitet und ausgekoppelt.

[0038] Es ist bevorzugt, dass C1, C2, L1 und D1 nicht in Bezug aufeinander identisch sind und dass C1, L1 und D1 in Bezug aufeinander nicht komplementär sind. Es ist weiterhin bevorzugt, dass wenn der Label-Extender eine Bindungsstelle für den Label umfasst und diese Bindungsstelle eine einsträngige Nukleinsäuresequenz (L2) umfasst und das Label eine einsträngige Nukleinsäuresequenz (L3), die komplementär ist zu L2, umfasst, jenes L3 nicht zur D1 komplementär ist.

[0039] Als bevorzugte Ausführungsform der Erfindung in diesem Zusammenhang wird die in dem evaneszenten Feld des Wellenleiters angeregte Lumineszenz nachgewiesen.

[0040] Weitere Ausführungsformen umfassen den Nachweis von Lumineszenz, Chemolumineszenz, Biolumineszenz oder Elektrolumineszenz, die in dem Nah-Feld des Wellenleiters erzeugt werden. Vorzugsweise wird diese Lumineszenz unter Verwendung eines optischen Kopplungselements in den Wellenleiter eingekoppelt, weitergeleitet und ausgekoppelt.

[0041] Ein bevorzugtes optisches Kopplungselement für die Einkopplung von Anregungslicht in den Wellenleiter oder das Ausleiten von Lumineszenz aus dem Wellenleiter sind in dem Wellenleiter oder in dem Trägermaterial modulierte Gitter.

[0042] Es versteht sich, dass die folgenden Punkte für mehrere Aspekte der vorliegend beschriebenen Erfindung relevant sein können.

[0043] Es ist bevorzugt, dass der optische planare Wellenleiter ein optischer planarer Wellenleiter auf einem kontinuierlichen Substrat ist. Es ist weiterhin bevorzugt, dass das Substrat transparentes Glas, Quarz oder ein

transparentes thermoplastisches Kunststoffmaterial wie Polycarbonat ist. Es können weiterhin eine transparente Zwischenschicht zwischen dem Substrat und der Wellenleiterschicht mit einem geringeren Brechungsindex als demjenigen des Wellenleiters, vorzugsweise auch geringer als der Brechungsindex des Substrats, vorgesehen sein.

[0044] Der Brechungsindex des Wellenleiters sollte größer sein als derjenige des Substrats und jeglicher Zwischenschichten, die verwendet werden. Die planare transparente Wellenleiterschicht besteht vorzugsweise aus einem Material mit einem Brechungsindex von größer als 1,8, noch bevorzugter von größer als 2,0. Geeignete Materialien umfassen zum Beispiel anorganische Materialien, insbesondere anorganische Metalloxide wie TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 oder ZrO_2 . TiO_2 oder Ta_2O_5 sind bevorzugt. Es ist bevorzugt, dass Kombinationen von anorganischen Metalloxiden nicht eingesetzt werden.

[0045] Die Dicke der Wellenleiterschicht beträgt vorzugsweise von 40 bis 1000 nm, bevorzugter von 40 bis 300 nm und meist bevorzugt von 70 bis 160 nm.

[0046] Die Modulationstiefe der Gitter beträgt vorzugsweise von 3 bis 60 nm, bevorzugter von 3 bis 30 nm. Das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der Wellenleiterschicht ist vorzugsweise gleich oder geringer als 0,5 und bevorzugter gleich oder geringer als 0,2.

[0047] Die Gitter können in Form von optischen Beugungsgittern, vorzugsweise in Form von Reliefgittern, vorliegen. Die Reliefstruktur kann verschiedene Formen aufweisen, zum Beispiel sinusförmige, rechteckige oder sägezahnförmige Strukturen.

[0048] Die Gitterstruktur kann auf dem Substrat erzeugt werden und dann zur Wellenleiterschicht transferiert werden, wo die Gitterstruktur sich dann selbst reproduziert, oder das Gitter wird in der Wellenleiterschicht selbst erzeugt.

[0049] Der Gitterabstand kann von 200 nm bis 1000 nm betragen und wird derart gewählt, dass er eine Einkopplung von Licht in oder Auskopplung aus dem Wellenleiter in der ersten Beugungs-Ordnung erlaubt.

[0050] Die Wellenleiterschichten leiten vorzugsweise lediglich 1, 2, 3 oder 4 Moden und sind vorzugsweise monomodale Wellenleiter.

[0051] Es versteht sich, dass die Label-Extender-Proben, Capture-Extender-Proben und Capture-Probe Bereiche von einsträngiger Nukleinsäure umfassen können.

[0052] Es versteht sich ferner, dass unter "Nukleinsäure" DNA, RNA, PNA (Peptidnukleinsäure) oder andere modifizierte Oligonukleotide wie 2'-O-Methyl- oder P=S (Phosphorthioat)-Analoga umfasst sind. Modifizierte Oligonukleotide und Nukleinsäure-Analoga können bei der Optimierung des Assays hinsichtlich Empfindlichkeit und Spezifität wertvoll sein. Zusätzlich können modifizierte Oligonukleotide von Nukleasen nicht verdaut werden und sind daher in realen Testproben wie Blutserum oder Pflanzenextrakten stabil. Eine Optimierung kann erzielt werden, indem man kinetische Analysen durchführt, zum Beispiel unter Verwendung von einer Computer-gestützten Assay-Anordnung.

[0053] Es versteht sich, dass die Stufen nicht in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt werden müssen, obgleich es bevorzugt ist, wenn die Stufen in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt werden. Insbesondere versteht es sich, dass die Reihenfolge, in der das Target-Polynukleotid die Label-Extender-Probe, die Capture-Extender-Probe, die Capture-Probe und das Label (wenn in der Label-Extender-Probe umfasst) binden, für die Arbeitsweise der Erfindung nicht kritisch ist. Es ist bevorzugt, dass das Target-Polynukleotid an die Label-Extender-Probe und Capture-Extender-Probe vor dem Binden an die Capture-Probe bindet (d.h. dass eine "Pre-Inkubation"-Stufe durchgeführt wird). Das kann das Signal optimieren und den Hintergrund minimieren.

[0054] Der Hybridisierungs-Assay kann in jeder möglichen Reihenfolge und Kombination, in Abhängigkeit von dem spezifischen Assay-Target (ss oder ds; DNA, RNA) und in Abhängigkeit davon, ob Empfindlichkeit oder Spezifität bei dem speziellen Assay am wichtigsten ist, durchgeführt werden. Die beiden Extreme sind:

1) Ein Verfahren, bei dem der gesamte Assay in einer Stufe *in situ* durchgeführt wird, zum Beispiel in einer Vertiefung, wo die Lösung mit der Oberfläche des planaren Wellenleiters (PWG) mit einem immobilisierten Rezeptor in Kontakt tritt oder in einer separaten Pre-Inkubationskammer. Der immobilisierte Rezeptor ist imstande, den Capture-Extender zu binden und kann daher das gesamte Sandwich, welches in der Lösung

gebildet wird, einschließlich des Labels binden.

2) Alternativ können die gleichzeitigen Hybridisierungsstufen nacheinander direkt auf der Oberfläche des PWG durchgeführt werden (d.h. innerhalb eines sequenziellen Verfahrens). Zwischen diesen Extremen kann jede Variation vorgenommen werden.

[0055] Somit betrifft ein Aspekt der Erfindung ein Verfahren gemäß der vorstehend beschriebenen ersten Ausführungsform, worin Stufen 3 und 4 kombiniert sind derart, dass eine Testprobe, worin die Anwesenheit des Target-Polynukleotids bestimmt werden soll, kombiniert wird mit den Label-Extender-Proben und den Capture-Extender-Proben und der gegebenenfalls an den planaren Wellenleiter gebundenen Capture-Probe derart, dass (Label-Extender-Probe) + (Target-Polynukleotid) + (Capture-Extender-Probe) + (Capture-Probe)-Komplexe gebildet werden, die an den planaren Wellenleiter über die Capture-Probe gebunden werden. Es ist bevorzugt, dass die Capture-Probe auf der Wellenleiteroberfläche immobilisiert ist, jedoch versteht sich, dass mehrere Komplexe multiple Sandwich-Anordnungen möglich sind.

[0056] Die Lösung, in der die Assay-Stufen durchgeführt werden, ist eine wässrige Lösung. Es kann sich um eine beliebige geeignete Pufferlösung handeln, zum Beispiel 75 mM Natriumzitrat, 750 mM Natriumchlorid, 0,1% Tergitol NP-40 (Tergitol ist eine Handelsbezeichnung für eine Reihe von Netzmitteln), eingestellt auf pH 7,0.

[0057] Geeignete Pufferkomponenten können umfassen

0–2 M	Natriumzitrat
0–2 M	Natriumchlorid
0–2%	Tergitol® NP-40
0–2% Gew./Vol.	Tween-20® oder 80 oder ein anderes Detergens
0–2 M	Tris-HCl, pH 6–8
0–2%	Rinderserumalbumin (BSA)
0–500 mM	EDTA
0–2% Gew./Vol.	Tartrazin

[0058] Unter "komplementärer Sequenz" ist eine Sequenz zu verstehen, die imstande ist, mit einer Polynukleotid-Sequenz unter den in dem Assay verwendeten Bedingungen zu hybridisieren. Unter "Hybridisieren" ist zu verstehen, dass die Sequenzen imstande sind, zusammen eine stabile Struktur zu ergeben, die durch aus dem Stand der Technik gut bekannte Hybridisierungs-Assays nachgewiesen werden kann. Diese Bedingungen können derart sein, dass die Hybridisierung lediglich dann erfolgt, wenn die Sequenzen zu zumindest 60% invers identisch sind, bevorzugter zumindest 80% invers identisch, noch bevorzugter zumindest 90% invers identisch und meist bevorzugt zumindest 95% invers identisch. Unter "% invers identisch" ist der Prozent-Anteil an Basen (in dem betrachteten Bereich) zu verstehen, die theoretisch imstande sind, Basenpaare zu bilden, wenn einsträngige Sequenzen mit einem 5'-3'-Strang und die anderen 3'-5' angeordnet sind. Die Hybridisierungsstufen können zwischen 0°C und 90°C in dem vorstehend beschriebenen Puffer durchgeführt werden, vorzugsweise werden sie bei 53°C durchgeführt.

[0059] Es versteht sich, dass das Target-Polynukleotid oder das Signal vor dem Nachweis verstärkt werden kann, jedoch ist diese Verstärkung nicht wesentlich.

[0060] Es versteht sich, dass das Polynukleotid bei extrem geringer Konzentration nachgewiesen werden kann. Hierunter ist zu verstehen, dass weniger als 10⁴ Kopien eines Target-Polynukleotids nachgewiesen werden können, vorzugsweise weniger als 10³ Kopien, noch bevorzugter 10² Kopien oder weniger. Probenvolumen können zwischen 10 nl und 10 ml betragen. Es wurde nun gezeigt, dass es möglich ist, weniger als 1000 Äquivalente der genomen DNA in 10 µl einer Probe, wie in den Beispielen beschrieben, nachzuweisen.

[0061] Es ist nicht wesentlich, die Probe und nicht-gebundenes Label vor dem Abfangen des spezifischen Target-bezogenen Signals nicht zu entfernen. In Fällen von extrem hoher Empfindlichkeit kann es vorkommen, dass das "bulk"-Signal, welches die temporär in unmittelbarer Nachbarschaft zur Oberfläche (in dem evaneszenten Feld) befindlichen Labels repräsentiert, das spezifische Signal auf Grund der hohen Label-Konzentration im Vergleich zu dem bei dem Versuch verwendeten Target-Level maskiert. In solchen Fällen ist es vorteilhaft, nicht-gebundene Labels (durch Waschen der Zelle) vor der Signalaufzeichnung zu entfernen.

[0062] Das Target-Polynukleotid kann DNA oder RNA, ss oder ds, sein. Zum Beispiel kann es eine mRNA,

eine virale DNA oder eine genome Sequenz eines pathogenen Organismus sein. Es kann jegliches Gel von Interesse, zum Beispiel für experimentelle oder diagnostische Zwecke sein. Es versteht sich, dass das Target-Polynukleotid sich von einem pflanzlichen Pathogen oder einem tierischen oder menschlichen Pathogen ableiten kann. Ein Beispiel für ein pflanzliches Pathogen, von dem sich ein Target-Polynukleotid ableiten kann, ist *Pseudocercospora herpotrichoides*. Eine bevorzugte Möglichkeit, die in der klinischen Diagnostik von Bedeutung ist, besteht darin, dass das Pathogen ein Virus ist. Es ist besonders bevorzugt, wenn der Virus CMV (Cytomegalovirus), HBV (Hepatitis B-Virus), HCV (Hepatitis C-Virus) oder HIV (human immunodeficiency-Virus) ist. Dieser Assay kann zum Beispiel angewandt werden, um die fünf Genotypen des Hepatitis C-Virus zu identifizieren und zu differenzieren (Cha et al., (1972), PNAS, 89, 7144–7148). Andere Targets sind Marker-Gene oder Wirkstoff-bedingte Messages, d.h. mRNAs, deren Menge sich als Reaktion auf einen speziellen Wirkstoff verändert.

[0063] Es versteht sich, dass das Target-Polynukleotid ein Polynukleotid sein kann, das eine Sequenz umfasst, die mit einer Erkrankung verknüpft ist. Zum Beispiel kann es eine Mutation umfassen, die statistisch mit Krebs oder mit einer speziellen Form von Krebs verknüpft ist. Beispiele für Krebsformen, die mit speziellen Mutationen verknüpft sind, umfassen Prostatakrebs, Brustkrebs, Darmkrebs und Leukämien. Ein Beispiel für eine Mutation, die mit einer Erkrankung verknüpft sein kann, ist das cystische Fibrose-Gen. In Enzymen durch Pharmaco- und Toxicogenetik identifizierte Mutationen können ebenfalls nachgewiesen werden, wobei diese ein P450-Enzym umfassen können.

[0064] Die Kombination der planaren Wellenleitertechnologie mit DNA/RNA-Hybridisierung erlaubt den Nachweis von Erkrankungs-Markern wie einsträngige DNA, RNA oder denaturierte doppelsträngige DNA. Das DNA-Target kann zum Beispiel ein DNA-Fragment, virale DNA oder genome DNA sein.

[0065] Ist das Polynukleotid ein ds-Polynukleotid oder eine Triple Helix, sollte diese vor dem Nachweis denaturiert werden. Die Denaturierung kann mit Hilfe jeder geeigneten Maßnahme erfolgen, wie Wärmeanwendung oder Veränderung der Ionenstärke oder des pH. Alternativ können einsträngige Kopien durch asymmetrische PCR hergestellt werden. Es ist bevorzugt, dass einsträngige Kopien eher durch Denaturierung als durch asymmetrische PCR hergestellt werden, da die Anwendung einer PCR-Stufe, wie vorstehend beschrieben, Variabilität bedingen kann. Es versteht sich, dass die Denaturierung nach Kombinieren der das Target-Polynukleotid enthaltenden Probe mit den Assay-Reagenzien erfolgen kann. Vorzugsweise erfolgt dies nach Kombination. Dies besitzt den Vorteil, dass die Gelegenheiten für eine Renaturierung des Target-Polynukleotids vor dem Kontakt mit den Assay-Reagenzien reduziert sind. Die Denaturierung kann zweckmäßig durch Erhitzen auf 95°C während 5 Minuten durchgeführt werden.

[0066] Das Set von Label-Extender-Proben zum Nachweis eines gegebenen Target-Polynukleotids umfasst zumindest zwei Probentypen und kann bis zu 30 Probentypen umfassen. Es ist bevorzugt, wenn das Set zwischen 5 und 30, bevorzugter zwischen 10 und 25, und meist bevorzugt zwischen 15 und 25 Probentypen umfasst. Es versteht sich, dass (i) die optimale Größe des Sets abhängig sein kann vom Target und Assay und (ii) die erzielte Amplifikation der Anzahl der verwendeten Label-Extender-Proben proportional ist. Jede Label-Extender-Probe umfasst einen einsträngigen Nukleinsäure-Bereich und ein Label-Teil, wobei der Nukleinsäure-Bereich eine Sequenz L1, die komplementär ist zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids, aufweist, und das Label-Teil ein Label, welches ein durch Lumineszenz, zum Beispiel evanescent angeregte Lumineszenz, nachweisbares Signal ergibt, oder eine Bindestelle für dieses Label umfasst, worin jede der besagten Sequenzen L1 zu physisch verschiedenen, nicht-überlappenden Bereichen des Target-Polynukleotids komplementär ist. Jede Label-Extender-Probe kann weiterhin einen zweiten Nukleinsäure-Bereich umfassen, der nicht zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids komplementär ist und der weniger als etwa 500 nt aufweist.

[0067] Die Bindestelle für das Label kann eine einsträngige Polynukleotid-Sequenz umfassen. Sie kann eine Sequenz (L2) sein, die zu einer Sequenz (L3) eines Polynukleotids, an das ein oder mehrere Label-Moleküle gebunden sind, komplementär ist. Diese zweite Sequenz wird derart ausgewählt werden, dass sie nicht zu einer Sequenz der Target-Polynukleotidsequenz oder irgendeiner anderen Sequenz, die voraussichtlich in der Probe vorzufinden ist, komplementär ist. Es versteht sich, dass wenn die Bindestelle für das Label eine einsträngige Polynukleotid-Sequenz umfasst, die Label-Extender-Probe einen "Ketten-Extender", wie er in einigen aus dem Stand der Technik bekannten Sandwich-Assays verwendet wird, entsprechen kann und das Label einer "Label-Probe" entspricht.

[0068] Die Bindestelle und das Label können jeweils alternativ Moleküle mit hoher Spezifizierung und Affinität füreinander, zum Beispiel Biotin/Avidin oder Streptavidin, umfassen. Somit kann die Bindestelle Biotin umfassen und als Label kann Avidin umfassen, oder umgekehrt. Alternativ kann das Label direkt an die Label-Extender-Probe gebunden sein.

der-Probe gebunden sein.

[0069] Der Bereich L1 wird im Allgemeinen zwischen 5 und 5000 Nukleotide, vorzugsweise zwischen 10 und 500 Nukleotiden, bevorzugter zwischen 15 und 20 Nukleotide in der Länge umfassen. Es versteht sich, dass der Bereich L1 an einen zweiten Nukleinsäure-Bereich gebunden sein kann, der zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids am 3'- oder 5'-Ende nicht komplementär ist.

[0070] Die komplementären Sequenzen werden derart gewählt, dass Sequenzen des Target-Polynukleotids für die Bindung der Capture-Extender-Probe hieran verbleiben. Gewöhnlich werden zumindest 25 Nukleotide verfügbar bleiben. Die zu den Label-Extender-Proben komplementären Sequenzen können getrennt oder im Wesentlichen angrenzend sein. Sie können mit Sequenzen alternieren, die zu den Sequenzen der Capture-Extender-Probe komplementär sind. Es ist bevorzugt, dass die zu dem Label- und dem Capture-Extender-Proben komplementären Sequenzen über die Target-Sequenz verteilt sind und alternieren.

[0071] Die Sequenzen und die Anzahl der Capture-Extender-Proben, die zu dem Target-Polynukleotid komplementär sind, können auf Basis von speziellen Kriterien ausgewählt werden. Zum Beispiel können, wenn es erwünscht ist, die Menge des Polynukleotids mit einer speziellen Mutation zu quantifizieren, die Sequenzen dann so gewählt werden, dass unter den Assay-Bedingungen eine Bindung an den Polynukleotid-Molekülen nur mit dieser speziellen Mutation erfolgt.

[0072] Die Label-Extender-Probe kann zweckmäßig nach bekannten Methoden der Oligonukleotid-Synthese oder durch Klonen hergestellt werden und kann in geeigneter Weise für das Labelling modifiziert werden. Es ist bevorzugt, wenn die Sequenzen durch Synthese hergestellt werden. Indem man für eine Endgruppe sorgt, die eine geeignete Funktionalität besitzt, können mit einem Label versehene Moleküle über die funktionelle Gruppe verknüpft werden. Beispiele umfassen Carboxy, Thio, Amin oder Hydrazin.

[0073] Das Label umfasst eine lumineszierende Verbindung. Vorzugsweise besitzt die Verbindung eine Lumineszenz-Wellenlänge im Bereich von 330 nm bis 1000 nm. Beispiele umfassen, ohne hierauf beschränkt zu sein: Rhodamine, Phycoerythrin, Umbelliferon, Luminol, Texas-Rot, Fluorescein-Derivate, Cumarin-Derivate, Distyrylbiphenyle, Stilben-Derivate, Phthalocyanine, Naphthalocyanine, Polypyridyl/Ruthenium-Komplexe wie Tris-(2,2'-bipyridyl)-rutheniumchlorid, Tris-(1,10-phenanthroline)-rutheniumchlorid, Tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)-rutheniumchlorid und Polypyridyl/Phenazin/Ruthenium-Komplexe, Platin/Porphyrin-Komplexe wie Octaethyl-Platin-Porphyrin, langlebige Europium- und Terbium-Komplexe oder Cyanid. Besonders geeignet für Analysen von Blut oder Serum sind Farbstoffe mit Absorptions- und Emissionswellenlängen im Bereich von 5600 bis 900 nm.

[0074] Farbstoffe wie Fluorescein-Derivate, die funktionelle Gruppen aufweisen, über die sie kovalent gebunden werden können, wie Fluoresceinisothiocyanat, sind bevorzugt. Funktionelle fluoreszierende Farbstoffe, die im Handel von Biological Detection Systems, Inc., erhältlich sind, zum Beispiel die mono- und bi-funktionellen Cy5^(R)-Farbstoffe (Clin. Chemistry, (1994), 40(9), 1819–1822) sind besonders bevorzugt.

[0075] Zusätzlich kann die längere Emissionswellenlänge von roten und NIR (nahe Infrarot)-Farbstoffen für bestimmte Anwendungen aufgrund der größeren Penetrationstiefe des evaneszenten Felds (je längen die Wellenlänge ist, um so größer ist die Eindringtiefe des evaneszenten Felds) von Vorteil sein. Das Labelling der Oligonukleotide während der letzten Stufe der DNA-Synthese ist günstig, was zu einer höheren Ausbeute und Homogenität des Label-versehenden Oligonukleotids, zum Beispiel mit Cy5^(R), führt.

[0076] Die Capture-Probe kann eine Nukleinsäure-Sequenz, die komplementär ist zu der Capture-Proben-Erkennungssequenz, umfassen, worin die Nukleinsäuresequenz zwischen etwa 10 und 100 nt lang ist und nicht zu Sequenzen, die in der Label-Extender-Probe enthalten sind, komplementär ist und worin die Capture-Probe gebunden ist an oder imstande ist, spezifisch gebunden zu werden an einen planaren Wellenleiter. Es kann ein Polynukleotid mit zwischen 10 und 100 Nukleotiden in der Länge, vorzugsweise zwischen 15 und 50 Nukleotiden, bevorzugter zwischen 18 und 30 Nukleotiden in der Länge sein. Die Capture-Probe kann eine "universelle" Sequenz aufweisen, derart, dass sie bei dem Nachweis verschiedener unterschiedlicher Target-Polynukleotide eingesetzt werden kann. Eine bevorzugte Capture-Proben-Sequenz ist 3'-TTATAGTACTC-CAATGCC-5'. Diese Sequenz besitzt eine günstige Stabilität gegenüber Exonukleasen aufgrund der Immobilisierung an der Oberfläche am 3'-Ende. Die Anknüpfung der Capture-Probe am 3'-Ende ist günstig, da die Capture-Probe durch die meisten Exonukleasen, die Oligonukleotide am 3'-Ende angreifen, nicht verdaut werden kann.

[0077] Die Capture-Probe kann mit Hilfe bekannter Syntheseprotokolle synthetisiert werden. Es ist bevorzugt, wenn sie auf einem Wellenleiter-"Chip" synthetisiert wird, so dass sie durch das 3'-Ende immobilisiert werden kann. Zum Beispiel kann sie mit einem Oligonukleotid-Synthesizer (Applied Biosystems 394B) direkt auf dem Wellenleiter-Chip synthetisiert werden, der silaniert ist mit 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan über eine Standardverfahrens-Modifizierung, die angewandt wird bei der Oligonukleotid-Synthese auf Teilchen (zum Beispiel wie in Gait (1990), Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Oxford University Press, NY, beschrieben). Anstelle der Standard-Synthese wird 4-(4,4-Dimethoxytrityl)-hydroxybuttersäure als stabile verknüpfende Gruppe zur Verankerung des 3'-Endes des Oligonukleotids an der Oberfläche verwendet. Die Oberfläche kann vor der Verwendung in dem Assay gewaschen werden.

[0078] Während die vorstehende Methode angewandt werden kann, ist die folgende Methode bevorzugt:

- a) PWG-Chips werden mit CHCl_3 gereinigt
- b) die Silanierung in flüssiger Phase der PWG-Chips erfolgt durch Behandlung mit 2% (Vol./Vol.) 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan und 0,2% (Vol./Vol.) N-Ethyldiisopropylamin in o-Xylool bei erhöhter Temperatur (d.h. 50 bis 90°C) während mehrerer Stunden.
- c) Silanierte PWG-Chips werden in CH_3CN gereinigt
- d) PWG-Chips werden in einem Exsikkator unter Vakuum getrocknet
- e) Immobilisierung der Oligonukleotide

Die Oberflächen-gebundenen Epoxyringe können über Ringöffnung mit endständigen Amino- oder Thiolgruppen der modifizierten Oligonukleotide reagieren: 100 μl einer 10 nmol einer Thiol- oder Amino-terminierten Capture-Probe enthaltenden Lösung werden bei 35°C über Nacht in 100 mM wässrigem Carbonatpuffer, pH 8,2, inkubiert.

f) PWG-Chips mit immobilisierten Capture-Proben werden mit Wasser gespült, getrocknet und bei -20°C bis zur Verwendung in dem PWG-Setup aufbewahrt.

[0079] Die Capture-Probe kann auf dem Wellenleiter auch mit Hilfe anderer Mittel verankert werden. Zum Beispiel kann ein photochemisches Vernetzen, wie in WO 94/27137 beschrieben, angewandt werden. Eine adhäsions-fördernde Schicht kann zwischen die Wellenleiterbereiche und die immobilisierte Capture-Probe platziert werden. Die Dicke der adhäsions-fördernden Schicht ist vorzugsweise gleich oder geringer als 50 nm, bevorzugter geringer als 20 nm und noch bevorzugter geringer als 10 nm.

[0080] Die Lösung, die die Capture-Probe enthält, kann tropfenweise unter Verwendung eines Multi-Pipettenkopfs oder eines modifizierten Tintenstrahldruckkopfs mit piezoelektrischen Antriebselementen aufgebracht werden. Dies besitzt den Vorteil, dass das Verfahren rasch durchgeführt werden kann und dass sehr geringe Mengen verwendet werden können. Wird eine "universelle" Capture-Probe verwendet, kann die gleiche Lösung auf sämtliche Messbereiche aufgebracht werden.

[0081] Die Capture-Probe und anschließenden Reagenzien können mit Hilfe einer Strömungszelle den Messbereichen zugeführt werden. Die Trennung der Bereiche kann mechanisch unter Verwendung von Trennstäben oder im Fall eines laminaren Stroms fluidisch durchgeführt werden.

[0082] Die selektive Immobilisierung der spezifischen Erkennungselemente ausschließlich auf den Nachweisbereichen, entweder direkt oder über adhäsions-fördernde Schichten, kann bei Verwendung einer Probenzelle, die sowohl den Wellenleiterbereich als auch Nicht-Wellenleiterbereiche bedeckt, zu einer Zunahme der Empfindlichkeit der Nachweismethode führen, da die nicht-spezifische Bindung der Analyte in den für die Signalerzeugung nicht verwendeten Bereichen reduziert ist.

[0083] Es versteht sich, dass eine adhäsions-fördernde Schicht selektiv lediglich im Wellenleiterbereich aufgebracht werden kann oder in den Nicht-Wellenleiterbereichen deaktiviert werden kann, beispielsweise mit Hilfe einer photochemischen Aktivierung oder der vorstehend beschriebenen Zufuhr-Mittel.

[0084] Generell kann die Capture-Probe mit Hilfe von Methoden immobilisiert werden, die die hydrophobe Adsorption oder kovalente Bindung direkt an die Wellenleiterbereiche oder nach chemischer Oberflächenmodifizierung, zum Beispiel durch Silanierung oder durch Aufbringen einer Polymerenschicht, einschließen. Um die Immobilisierung der Capture-Probe direkt auf dem Wellenleiter zu fördern, kann eine dünne Zwischenschicht, die zum Beispiel aus SiO_2 besteht (Boksányi et al., (1976), Advanc. Colloid interface Sci., 6, 95–137) als adhäsions-fördernde Schicht aufgebracht werden.

[0085] Es versteht sich, dass die hydrophobe Verknüpfung nicht möglich ist, wenn die Capture-Probe ein Polynukleotid ist. Kovalente oder ionische Verknüpfung sind im Allgemeinen bevorzugt, jedoch sind auch andere

Rezeptor/Liganden-Paare, wie Avidin/Biotin, Antikörper-Haptene oder Erkennungssysteme wie (His)₆-markiertes Oligonukleotid an NTA (Nitritotriessigsäure) möglich.

[0086] Der Adhäsions-Promotor kann eine funktionalisierte Silanschicht oder eine Polymerschicht sein (z.B. Polylysin; M. Schena, D. Shalon, R. Heller, A. Chai, P.O. Brown und R. W. Davis: Parallel human genome analysis: microarray based expression monitoring of 1000 genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, (1996), 10614–10619), die Funktionen (zum Beispiel Epoxy, -NH₂, -SH, -COOH, -NHS, Maleimid) aufweisen, wobei die Funktion vor der Verknüpfung der funktionalisierten Capture-Probe (Funktionen wie vorstehend angegeben) aktiviert werden sollte. Im Fall von ionischen Verknüpfungen sollten Bedingungen angewandt werden, die ionische Wechselwirkungen zwischen der verknüpfenden Funktion der Capture-Probe (jedoch nicht der Capture-Sequenz oder eines Gliedes der gesamten Nachweiskaskade) und der adhäsions-fördernden (also ionischen, komplementär geladenen) Schicht fördern.

[0087] Bei einer nicht-kovalenten Verknüpfung kann die Regenerierung der Oberfläche durchgeführt werden, indem man Bedingungen schafft, die die Abspaltung der Capture-Probe von der Oberfläche begünstigen.

[0088] Es kann möglich sein, das Target-Polynukleotid, die Capture-Extender-Probe und die Label-Extender-Probe von der Wellenleiteroberfläche derart zu entfernen, dass die Capture-Probe unbeschädigt bleibt und der Wellenleiter erneut für den Nachweis des gleichen oder eines verschiedenen Target-Polynukleotids verwendet werden kann. Zum Beispiel können niedriger pH oder hoher pH, erhöhte Temperatur, organische Lösungsmittel oder chaotropes Mittel (Salze) verwendet werden, um das Target-Polynukleotid, die Capture-Extender-Probe und die Label-Extender-Probe abzuspalten. Ein pH < 4 kann die DNA beschädigen und ist daher nicht bevorzugt. Ein hoher pH, z.B. 10 mM NaOH, oder 50% wässrige Harnstofflösung, können verwendet werden, um die dsDNA an der Sensor-Oberfläche zu denaturieren und hierdurch das Target-Polynukleotid und die Capture-Extender-Probe von der Capture-Probe abzuspalten.

[0089] Capture-Extender-Proben umfassen jeweils zweisträngige Nukleinsäurebereiche, wobei der erste Nukleinsäurebereich eine Sequenz C1 zwischen etwa 10 und 100 nt Länge aufweist, die komplementär ist zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids und wobei der zweite Bereich nicht komplementär ist zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids und weniger als etwa 500 nt Länge aufweist und weiterhin eine Capture-Probe-Erkennungssequenz C2 umfasst, worin die Sequenzen L1 und C1 nicht-identische, nicht-komplementäre Sequenzen sind, die jeweils komplementär zu physisch eigenständigen nicht-überlappenden Sequenzen des Target-Polynukleotids sind.

[0090] Es versteht sich, dass mehr als ein Typ des Target-Polynukleotids auf einmal in einer Probe nachgewiesen werden kann. Capture-Extender-Proben und Label-Extender-Proben von unterschiedlicher Spezifität können gemischt werden und die unterschiedlichen Target-Polynukleotide getrennt nachgewiesen und quantifiziert werden, wenn Labels verwendet werden, die verschiedene Emissionswellenlängen besitzen und daher in einem geeigneten Wellenleitersystem voneinander unterschieden werden können.

[0091] Es versteht sich, dass das Verhältnis von Target zu Capture-Extender eine Optimierung für ein spezielles Target-Polynukleotid und einen speziellen Konzentrationsbereich erfordert wird. Dies kann erfolgen, indem man das Verhältnis der Capture-Extender-Probe zu dem Target-Polynukleotid verändert, während man ein konstantes Verhältnis Target zu Label-Extender verwendet. Das Optimierungsverfahren wird zur Bestimmung der besten Ergebnisse hinsichtlich des Verhältnisses von spezifischer zu nicht-spezifischer Bindung (d.h. Bindung in Abwesenheit des Target-Polynukleotids) führen.

[0092] Das Verhältnis von Target zu Label-Extender kann ähnlich optimiert werden, indem man ein konstantes Verhältnis Target zu Capture-Extender anwendet, um das optimale Verhältnis von Target zu Label-Extender zu finden.

[0093] Es versteht sich, dass die Gewichtsverhältnisse oder Konzentrationen der Bestandteile, zum Beispiel Label-Extender (LE), Capture-Extender (CE) und Label-Probe (LP) im Wesentlichen Assay-spezifisch (d.h. abhängig von der Natur der Probe) und Target-spezifisch sind und für jedes Target optimiert werden müssen.

[0094] Es ist bevorzugt, dass die Konzentrationen innerhalb der folgenden Bereiche liegen:

- 1) 0,1 bis 30, bevorzugter 0,5 bis 20 und meist bevorzugt 0,5 bis 10 nM von LE,
- 2) 0,01 bis 20, bevorzugter 0,1 bis 10 und meist bevorzugt 0,1 bis 5 nM von CE,
- 3) 0,1 bis 30, bevorzugter 0,5 bis 20 und meist bevorzugt 0,5 bis 10 nM von LP.

[0095] Es versteht sich, dass die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis eines Target-Polynukleotids unter Verwendung eines planaren Wellenleiters umfasst, worin das Target-Polynukleotid auf dem Wellenleiter immobilisiert wird mit Hilfe von zwei Klassen von Bindungswechselwirkungen, wobei die erste Klasse der Bindungswechselwirkung mit multiplen Capture-Extender-Proben vonstatten geht, und die zweite Klasse von Bindungswechselwirkung zwischen zumindest einer der Capture-Extender-Proben und zumindest einer der multiplen Capture-Proben, die gebunden sind oder befähigt sind, gebunden zu werden, und anschließend gebunden werden an die Oberfläche des optischen planaren Wellenleiters. Es versteht sich, dass die multiplen Capture-Proben zueinander identisch sein können.

[0096] Es versteht sich, dass die erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung eines vollautomatisierten Analysesystems, zum Beispiel des in Sensors and Actuators (1997), Vol. B38-39, 88-95, beschriebenen durchgeführt werden können. Dieses System ist so ausgestaltet, dass Bioaffinitäts-Wechselwirkungen in Real-Zeit untersucht werden. Die hohe Empfindlichkeit und Selektivität dieses Systems, kurze Assay-Zyklen und die Notwendigkeit der Herstellung einer lediglich kleineren Probe kann den Nachweis von Polynukleotiden ohne die Notwendigkeit einer Target-Amplifizierung durch PCR oder unter Verwendung von verzweigter DNA für die Signal-Amplifizierung erlauben. Dies kann dramatisch die Quantifizierung von zum Beispiel mRNA als Marker von infektiösen Erkrankungen erleichtern und vereinfachen.

[0097] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in der Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens für die Untersuchung oder Diagnose einer Erkrankung oder anderen Reaktion eines lebenden Organismus, die mit dem Target-Polynukleotid assoziiert sind. Zum Beispiel kann ein Organismus auf eine Veränderung seiner Umgebung, zum Beispiel einer Temperaturänderung, auf osmotischen Schock oder die Konzentration von Schwermetallionen, durch temporale oder räumliche Veränderung in der Gen-Expression reagieren. So können Hitze- oder Kälteschock Veränderungen in den Expressions-Levels von speziellen Genen verursachen. Es versteht sich, dass die Expression von rekombinanten Genen gemessen werden können, zum Beispiel eines rekombinanten Gens, dessen Expression durch einen Wärmeschock-Promotor kontrolliert wird.

[0098] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung richtet sich auf einen optischen planaren Wellenleiter, worin an die Oberfläche der Wellenleiterschicht des planaren Wellenleiters gebunden ist

- a) eine Vielzahl von Capture-Proben, wie vorstehend unter 2c) definiert, oder eine Vielzahl von Capture-Extender-Proben und eine Capture-Probe wie vorstehend unter 2d) definiert;
- b) ein Target-Polynukleotid, das gebunden ist an die Capture-Probe oder die Capture-Extender-Probe; und
- c) eine Vielzahl von Label-Proben, wie vorstehend unter 1a) definiert, die an das Target-Polynukleotid gebunden sind, oder eine Vielzahl von Label-Proben-Extendern wie vorstehend unter 1b) definiert, die an das Target-Polynukleotid gebunden sind, und eine Label-Probe wie vorstehend unter 1b) definiert, die an den Label-Proben-Extender gebunden ist.

[0099] Vorzugsweise ist die Capture-Probe ein Polynukleotid mit einer Länge von 10 bis 100 Nukleotiden. Bevorzugter ist die Capture-Probe kovalent an die Oberfläche des Wellenleiters, wie vorstehend und in Beispiel 1 beschrieben, gebunden.

[0100] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Kit von Teilen, umfassend eine Capture-Probe, Capture-Extender-Probe, Label-Extender-Probe und gegebenenfalls Label, sämtlich wie vorstehend definiert, zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren im Hinblick auf ein spezielles Target-Polynukleotid.

[0101] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung eines Wellenleiters in einem Nukleinsäure-Sandwich-Assay zum Nachweis eines Target-Polynukleotids.

[0102] Ein weiterer Aspekt richtet sich auf die Verwendung eines nicht-Label-amplifizierten Sandwich-Assays in einem Wellenleiter-vermittelten Polynukleotid-Nachweis-Assay. Unter "nicht-Label-amplifizierter Sandwich-Assay" ist ein Nukleinsäure-Sandwich-Assay zu verstehen, worin nicht bDNA verwendet wird.

[0103] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen Sandwich-Assay zum Nachweis eines Target-Polynukleotids unter Verwendung eines optischen planaren Wellenleiters.

[0104] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine Zusammensetzung umfassend einen optischen planaren Wellenleiter, worin an die Oberfläche der Wellenleiterschicht direkt oder indirekt eine Capture-Probe oder Capture-Extender-/Capture-Proben gebunden sind, an die Capture- oder Capture-Extender-/Capture-Probe das Target-Polynukleotid gebunden ist, an das Target eine Label-Extender-Probe gebunden ist und wenn die

Label-Extender-Probe eine Bindestelle für ein Label umfasst, das besagte Label, worin sämtliche Komponenten wie bei den vorangehenden Aspekten der Erfindung definiert sind.

[0105] Die Erfindung wird nun eingehender unter Bezugnahme auf die folgenden Figuren und Beispiele beschrieben.

[0106] [Fig. 1](#) veranschaulicht eine Möglichkeit eines planaren Wellenleiter-Assays [als Multiple Oligonucleotide Hybridisation Assay – (MOHA) bezeichnet]. Der planare Wellenleiter umfasst einen transparenten Träger **1** und eine Wellenleiterschicht **2**. Auf der Oberfläche der Wellenleiterschicht ist eine Capture-Probe **3** mit der Nukleinsäuresequenz D2 gebunden, woran über eine Sequenz C2 eine Vielzahl von Capture-Extender-Proben **4** mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen C1 gebunden ist. Das Target-Polynukleotid **5** ist an die Sequenzen C1 gebunden. An das Target-Polynukleotid ist eine Vielzahl von Label-Extender-Proben **6** gebunden, die Nukleinsäure-Sequenzen L1 und L2 aufweisen. An diese Label-Extender-Proben sind über deren Nukleinsäure-Sequenzen L3 Label-Proben **7** mit Nukleinsäure-Sequenzen L3 gebunden. Bei einem weiteren Beispiel kann die Vielzahl von Capture-Proben **3'** direkt an das Target mit einer Nukleinsäure-Sequenz D1 gebunden sein. Bei einer anderen Variante kann eine Vielzahl von Label-Proben **6'** direkt an das Target über Nukleinsäure-Sequenzen gebunden sein, die zu den ausgewählten Target-Sequenzen komplementär sind.

Beispiel 1: Assay für *Pseudocercosporella herpotrichoides*: Sequenz-spezifischer Nachweis des ITS-Bereichs

[0107] Der intern transkribierte Sparer (ITS)-Bereich von *Pseudocercosporella herpotrichoides*, das kausale Mittel der Augenflecken-Erkrankung bei Weizen, wurde sequenziert und als einziges Target-Gen in einem PCR-basierenden Diagnostik-Projekt verwendet. Da die ITS-Sequenz bekannt ist, ist die Entwicklung von Oligonukleotid-Proben relativ unkompliziert. Zusätzlich werden mit verschiedenen Infektionsgraden verfügbare Augenfleckeninfizierte Weizenextrakte mit Hilfe des vorstehend genannten Diagnostik-Projekts charakterisiert. Aus diesen Gründen repräsentierte der Augenflecken-ITS-Bereich ein gutes Target für ein Modell eines DNA-Assays auf Basis eines planaren Wellenleiters. Tabelle 1 zeigt das Molekulargewicht und die Anzahl der Basenpaare der genomen DNA, und das PCR-amplifizierte ITS-Fragment von *Pseudocercosporella herpotrichoides*. Diese Targets sind sämtlich doppelsträngige DNAs, die vor der Verwendung denaturiert werden müssen. Zur Optimierung der Assay-Bedingungen wurde ein einsträngiges ITS-Fragment durch asymmetrische PCR unter Verwendung eines 20-fachen Überschusses eines Primers hergestellt, der die interessierende Sequenz amplifiziert.

Tabelle 1: Doppelsträngige Target-DNA-Moleküle von verschiedener Größe aus *Pseudocercosporella herpotrichoides*

Target	Anzahl der Basenpaare	Molekulargewicht (Da)
ssITS-Fragment	627 b	$2,07 \times 10^5$
ds ITS-Fragment	627 bp	$4,14 \times 10^5$
Plasmid-Vektor	4559 bp	$3,01 \times 10^6$
Genome DNA	40 Mbp	$2,64 \times 10^{10}$

[0108] Die einsträngige ITS-Target-Sequenz wird nachstehend beschrieben. Es werden auch die für die 20 Label-Extender (LE) und 5 Capture-Extender (CE) ausgewählten Bereiche angegeben.

1	TCCGTAGGTGAAACCTCGGAAGGATCATTAA <u>ATAGAGCAATGGATAGACAG</u>	50
51	<u>CGCCCCGGAGAAATCCTGGGGCCACCCCTACTCGGTAAAGGTTAGAGT</u>	100
101	<u>CGTCGGGCCTCTCGGAGAAAGCCTGGTCCAGACCTCCACCCCTGAATAAT</u>	150
151	<u>TACCTTGTGTTGGCAGGGCGCCTCGCCAGCGGCTCGGTGTTG</u>	200
201	<u>AGTACCTGCCAGAGGACCAACTCTTGTGTTAGTGTGAGTACT</u>	250
251	<u>ATATAATAGTTAAAACCTTCAACAAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGAT</u>	300
301	<u>GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCACTGA</u>	350
351	<u>ATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGCA</u>	400
401	<u>TGCCTGTTGAGCGTCATTATAACCACTCAAGCTCTCGCTGGTATTGGG</u>	450
451	<u>GTTCGCGTCTTCGCGGCCTCTAAAATCAGTGGCGGTGCGTGTGGCTCTA</u>	500
501	<u>CGCGTAGTAATACTCCTCGCATTGAGTCCGGTAGGTTACTTGCCAGCA</u>	550
551	<u>ACCCCCAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTG</u>	606
601	<u>AACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</u>	650

[0109] Die verwendeten Label-Extender-Proben und Capture-Extender-Proben werden in Tabelle 2 gezeigt. Sie waren so beschaffen, dass sie für den Rye-Pathotyp von *P. herpotrichoides* spezifisch sind. Die tatsächlichen Proben- und Hybridisierungsbedingungen können es ermöglichen, dass der Assay mit dem Weizen-Pathotyp von *P. herpotrichoides* (98% Gen-Erhaltung in dem ITS-Bereich) eine Kreuzreaktion eingeht.

Tabelle 2: Label-Extender- und Capture-Extender-Proben

31-50	LE1	317-337	LE11
54-71	CE1	341-361	LE12
75-92	LE2	365-382	LE13
96-112	LE3	386-402	LE14
116-133	LE4	406-426	LE15
137-158	CE2	429-447	LE16
162-178	LE5	451-467	CE4
182-198	LE6	471-489	LE17
202-218	LE7	493-514	LE18
222-242	CE3	518-535	LE19
246-269	LE8	539-556	CE5
273-291	LE9	560-579	LE20
295-313	LE10		

[0110] Der ITS-Bereich ist ein guter Gen-Bereich für das Target zur Assay-Entwicklung, da dieser Bereich bei dem Spezies-Level hoch-divergent ist. Die extensivere Sequenz-Divergenz in dem ITS-Bereich war die Basis für die Entwicklung der PCR-Assays, die imstande sind, Pflanzenpathogene einschließlich *Septoria*, *Mycosphaerella*, *P. herpotrichoides* und *Verticillium* nachzuweisen.

[0111] Ähnliche Proben-Sets können im Hinblick auf jede bekannte ITS-Sequenz aus einem beliebigen Target-Pathogen von Interesse entwickelt werden. Diese können die Weizen-Pathogene *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae* f. sp. *Triticea*, *Fusarium* spp. *Microdochium nivale*, *Drechslera tritici-repentis* und *Rhizoctonia cerealis* einschließen. Da die ITS-Bereiche bekannt sind, können die Assays auch im Hinblick auf Mais-Pathogene *Cercospora zea-maydis*, *Puccinia sorghi*, *Kabatiella zaeae*, *Helminthosporium turicum*, *Helminthosporium maydis* und *Helminthosporium carbonum* entwickelt werden.

[0112] Die Assay-Charakteristiken werden wie nachstehend gezeigt zusammengefasst.

Messvolumen: 10 μ l

Target-Konzentration: 1,7 aM bis 17 fM ($1,7 \times 10^{-23}$ bis $1,7 \times 10^{-19}$ Mol je 10 μ l)

Label-Extender: jeweils 1 nM (1×10^{-14} Mol je 10 μ l sämtlicher 20 Label-Extender)

Capture-Extender: jeweils 0,1 nM (1×10^{-15} Mol je 10 μ l sämtlicher 5 Capture-Extender)

Assay-Verfahren: 10 min Äquilibrierung/Waschen

30 min Inkubation (gestoppter Fluss),

10 min Waschen,

5 min Regeneration,

5 min Waschen

Nachweis: 5 min nach der Inkubationsstufe während der Waschstufe

Denaturierung: 95°C während 30 min

Proben-Rack: 1°C

Gittersignal (Durchschnitt von 3 Messungen): Blindwert 4013 \pm 57 cps, 1,7 aM 3982 \pm 175 cps, 17 aM 4711 \pm 365, 170 aM 5721 \pm 237, 1,7 fM 11641 \pm 163, 17 fM 23509 \pm 1270 cps: LOD: 10 aM.

[0113] Eine universelle Capture-Probe (Chip-3'-TTATAGTACTCCAATGCC-5') wurde über das 3'-Ende an der Chip-Oberfläche auf folgende Weise immobilisiert:

a) Oberflächenfunktionalisierung: Flüssigphasen-Silanisierung der PWG-Chips erfolgt durch Behandlung mit 2% (Vol./Vol.) 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan und 0,2% (Vol./Vol.) N-Ethylidiisopropylamin in o-Xylool bei erhöhter Temperatur (d.h. 50–90°C) während mehrerer Stunden; die silanisierten PWG-Chips werden in CH₃CN gereinigt und in einen Exzikkator unter Vakuum getrocknet.

b) Immobilisierung der Oligonukleotide: Die Oberflächen-gebundenen Epoxy-Ringe reagieren über Ringöffnung mit endständigen Amino- oder Thiol-Gruppen der modifizierten Oligonukleotide: 100 μ l einer Lösung, die 10 nmol einer Thio- oder Amino-terminierten Capture-Probe enthält, wird bei 35°C über Nacht in 100 mM wässrigem Carbonatpuffer, pH 8,7, inkubiert; Chips mit immobilisierten Capture-Proben werden mit Wasser gespült, getrocknet und bei –20°C bis zur Verwendung in dem PWG-Setup aufbewahrt.

[0114] Das genome DNA-Target vom R-Pathotyp ($10\text{--}10^5$ genome Äquivalente) wurde mit einer Lösung von 5 Capture-Extenders (CEs, jeweils 0,1 nM) und 20 Cy5-gekennzeichneten Label-Extendern (LEs 1–20, jeweils 1 nM) in einem Hybridisierungspuffer, pH 7,0 (75 mM Natriumzitrat, 750 nM Natriumchlorid, 0,1% Tergitol NP-40) gemischt. 200 μ l dieser Mischung wurden auf 95°C 30 min erhitzt und anschließend in einem Proben-Rack 30 min bei 1°C aufbewahrt. Die Hybridisierungs-Assays erfolgten in dem gleichen Hybridisierungspuffer bei 53°C. Die Probenmischung wurde (unter Verwendung einer Apparatur und Methode mit gestopptem Fluss) 30 min während des Hybridisierungs-Assays inkubiert. Die niedrigste nachgewiesene Menge der Target-DNA betrug 100 genome Äquivalente (in einem Volumen von 10 μ l), bestimmt als das Signal oberhalb von drei Standardabweichungen des Signals, ermittelt für die negative Kontrolle mit drei Wiederholungen.

Beispiel 2: Pseudocercospora herpotrichoides-Assay-Spezifität: (Sequenzspezifischer Nachweis der genomen DNA)

[0115] Der Target-Bereich der genomen DNA ist ihr ITS-Bereich und die CE- und LE-Proben werden in Beispiel 1 beschrieben.

[0116] Die Spezifität für den Nachweis des interessierenden cerealen Pathogens (Pseudocercospora herpotrichoides #308, R-Pathotyp) wurde mit dem nicht-spezifischen Signal verglichen, das von einem anderen cerealen Pathogen mit der gleichen Konzentration erhalten wurde: Microdochium nivale #18222, Fusarium graminearum R-8417, Septoria tritici #26517, Ceratobasidium cereale (Rhizoctonia cerealis) #44234, Drechslera sorokiniana #11404, Cercospora arachidicula #52476 und Septoria nodorum #24425. Bei einem Target-Level von 10^4 genomen Äquivalenten eines jedes cerealen Pathogens wurde ein Verhältnis von spezifischem zu nicht-spezifischem Signal von 6,1 in dem Assay für Pseudocercospora herpotrichoides #308 R-Pathotyp beobachtet, wohingegen ein Verhältnis von spezifischem zu nicht-spezifischem Signal von 1,0 für sämtliche anderen cerealen Pathogene beobachtet wurde.

[0117] Die Assay-Charakteristiken werden wie nachstehend gezeigt zusammengefasst:

Messvolumen: 10 μ l

Target-Konzentration: 1,7 fM ($1,7 \times 10^{-18}$ Mol je 10 μ l)

Label-Extender: jeweils 1 nM (1×10^{-14} Mol je 10 μ l sämtlicher 20 Label-Extender)

Capture-Extender: jeweils 0,1 nM (1×10^{-15} Mol je 10 μ l sämtlicher 5 Capture-Extender)

Assay-Verfahren: 10 min Äquilibrierung/Waschen

30 min Inkubation (gestoppter Fluss),

10 min Waschen,

5 min Regeneration,

5 min Waschen

Nachweis: 5 min nach der Inkubationsstufe während der Waschstufe

Denaturierung: 95°C während 30 min

Proben-Rack: 1°C

Gittersignal (Durchschnitt von 3 Messungen):

Blindwert 1201 ± 97 cps;

Interessierendes Pathogen:

Pseudocersprolella herpotrichoides #308, R-pathotyp	7270 ± 200 cps;
Micrachium nivale #18222	1136 ± 206 cps;
Fusarium graminearum R-8417	1235 ± 84 cps;
Septoria tritici #26517	1166 ± 106 cps;
Ceratobasidium cereale (Rhizoctonia cerealis) #44234	1295 ± 308 cps;
Drechslera sorokiniana #11404	1172 ± 192 cps;
Cercospora arachidicula #52476	1091 ± 115 cps
Septoria nodorum #24425	1020 ± 63 cps.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Target-Polynukleotids, bei dem zwei Sets von Reagenzien, ein Labelling-Set und ein Capture-Set eingesetzt werden, und worin ein optischer planarer Wellenleiter verwendet wird, umfassend

1) die Bereitstellung des Labelling-Sets der Reagenzien, welches umfasst:

a) eine Vielzahl von Label-Proben, jeweils umfassend einen Label-Teil und einen Nukleinsäurebereich (der vorzugsweise einsträngig ist) mit gleichen oder verschiedenen Sequenzen L1 (vorzugsweise zwischen etwa 5 und 100 Nukleotiden (nt) lang; bevorzugter zwischen etwa 8 und 100 nt lang), die komplementär sind zu gleichen oder verschiedenen Sequenzen des Target-Polynukleotids, und gegebenenfalls zweite Sequenzen zwischen dem Label-Teil und Sequenzen L1, die weder komplementär sind zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids noch zu dem Capture-Extender oder Capture-Proben und die weniger als etwa 500 nt lang sind, wobei der Label-Teil ein Label umfasst, das ein Signal liefert, welches nachweisbar ist durch Lumineszenz einschließlich evaneszent angeregter Lumineszenz, oder

b) eine Vielzahl von (b1) Label-Extender-Proben, von denen eine jede eine Labelbindende Nukleinsäuresequenz L2 und Nukleinsäuresequenzen L1 umfasst, worin die Sequenzen L1 komplementär sind zu Nukleinsäuresequenzen des Target-Polynukleotids und die Sequenz L2 komplementär ist zu der Nukleinsäuresequenz L3 einer Label-Probe, und gegebenenfalls (b2) eine Label-Probe, umfassend eine Nukleinsäuresequenz L3, die komplementär ist zu der Sequenz L2, und ein Label-Teil, umfassend ein Label, das ein Signal liefert, welches nachweisbar ist durch Lumineszenz einschließlich der evaneszent angeregten Lumineszenz, und

2) die Bereitstellung des Capture-Sets von Reagenzien, umfassend

c) eine Vielzahl von Capture-Proben, umfassend gleiche oder verschiedene Nukleinsäuresequenzen D1, die komplementär sind zu Nukleinsäuresequenzen des Target-Polynukleotids, worin die Nukleinsäuresequenzen D1 (vorzugsweise zwischen etwa 10 und 100 nt lang) nicht komplementär sind zu Sequenzen L1, L2 und L3, die in der Label-Probe und der Label-Extender-Probe enthalten sind, und worin die Capture-Probe gebunden ist an oder befähigt ist, spezifisch gebunden zu werden an die Oberfläche der Wellenleiterschicht eines Wellenleiters, entweder direkt oder über verknüpfende Gruppen; oder

d) eine Vielzahl von (d1) Capture-Extender-Proben, jeweils umfassend einen Nukleinsäurebereich (vorzugsweise einsträngig) mit einer Sequenz C1 (vorzugsweise zwischen etwa 10 und 100 nt lang), die komplementär ist zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids, und gegebenenfalls einen zweiten Bereich, der nicht komplementär ist zu einer Sequenz des Target-Polynukleotids und vorzugsweise kleiner ist als etwa 500 nt lang, und weiterhin umfassend eine Capture-Probenerkennungs-Nukleinsäuresequenz C2, und (d2) eine Capture-Probe und worin die Capture-Probe gebunden ist an oder befähigt ist, gebunden zu werden an die Oberfläche der Wellenleiterschicht eines Wellenleiters entweder direkt oder über verknüpfende Gruppen, umfassend Nukleinsäuresequenzen D2, die komplementär sind zur Sequenz C2, worin die Sequenzen L1 und C1 nicht-identische, nicht-komplementäre Sequenzen sind;

3) Kombinieren in einem wässrigen Medium unter bindenden Bedingungen für komplementäre Sequenzen, einer Testprobe, worin die Anwesenheit des Target-Polynukleotids bestimmt werden soll (das derart behandelt worden sein kann, dass das Target-Polynukleotid in einsträngiger Form vorliegt), mit

a) Zusammensetzungen 1a) und 2c) oder 1a) und 2d), oder (b) Zusammensetzungen 1b) und 2c) oder 1b) und 2d), oder (c) Zusammensetzungen 1a), 1b) und 2c) oder 1a), 1b) und 2d), oder (d) Zusammensetzungen 1a), 2c) und 2d) oder 1b), 2c) und 2d), oder (e) Zusammensetzungen 1a), 1b), 2c) und 2d), so dass Komplexe ge-

bildet werden;

4) Binden der Komplexe von Stufe 3 an den Wellenleiter über eine Vielzahl von Kopien der Capture-Probe (die Capture-Probe kann an den Wellenleiter vor dem Binden an die Komplexe von Stufe 3 gebunden werden oder an den Wellenleiter nach Binden an die Komplexe von Stufe 3 gebunden werden);
5) wenn die Zusammensetzung 1b) keine Label-Probe umfasst und ein Label nicht in Stufe 3 eingeschlossen ist, um besagte Komplexe einem Labelling zu unterziehen, dann Kombinieren des gebundenen Komplexes von Stufe 4 mit dem Label;
6) Nachweis des an das Target-Polynukleotid gebundenen Labels durch Messen der Lumineszenz, die in dem evaneszenten Feld des Wellenleiters angeregt wird, oder durch Messen der Lumineszenz, die in dem nahen Feld des Wellenleiters erzeugt wird,
wobei zumindest zwei Label-Proben oder Label-Extender, Capture-Proben oder Capture-Extender-Proben mit verschiedenen Nukleinsäuresequenzen, die zu verschiedenen Target-Nukleinsäuresequenzen komplementär sind, verwendet werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, worin die Stufen 3 und 5 vor Stufe 4 durchgeführt werden.

3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, worin das Label-Teil eine lumineszierende Verbindung umfasst.

4. Verfahren zum Nachweis eines Target-Polynukleotids gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, unter Verwendung eines Nukleinsäure-Sandwich-Assays mit Lösungsphase, worin der feste Träger ein optischer planarer Wellenleiter ist und das Label nachgewiesen wird durch Messen der Lumineszenz, die in dem evaneszenten Feld des Wellenleiters angeregt wird, oder Lumineszenz, die in dem nahen Feld des Wellenleiters erzeugt wird.

5. Verfahren zum Nachweis eines Target-Polynukleotids unter Verwendung eines optischen planaren Wellenleiters gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, worin das Target-Polynukleotid auf dem Wellenleiter immobilisiert wird mit Hilfe von zwei Klassen von Bindungs-Wechselwirkungen, wobei die erste Klasse der Bindungs-Wechselwirkung mit zumindest einer Capture-Extender-Probe stattfindet und die zweite Klasse der Bindungs-Wechselwirkung stattfindet zwischen zumindest einer der besagten Capture-Extender-Proben und zumindest einer der zahlreichen Capture-Proben, die gebunden sind an oder befähigt sind, gebunden zu werden und anschließend gebunden werden an die Oberfläche der Wellenleiterschicht des planaren Wellenleiters.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, worin das gebundene Label von dem nicht-gebundenen Label vor der Messung des gebundenen Labels nicht getrennt wird.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, worin ein Target-Polynukleotid nachgewiesen wird, wenn weniger als 10^4 Kopien des Target-Polynukleotids in Testprobenvolumina zwischen 10 nl bis 10 ml vorhanden sind.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, worin weniger als 1 000 Äquivalente der genomen DNA in 10 μ l eines Testprobenvolumens vorliegen.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, worin die Capture-Probe auf dem optischen planaren Wellenleiter synthetisiert wird.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, worin mehr als ein Target-Polynukleotid in einer Testprobe nachgewiesen wird.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, worin das Target-Polynukleotid eine Sequenz aus einem pathogenen Organismus ist oder ein Polynukleotid ist, das eine Sequenz umfasst, die mit einer Erkrankung eines lebenden Organismus assoziiert ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, worin der pathogene Organismus ein Virus ist.

13. Verwendung eines Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 für die Untersuchung oder Diagnose einer Erkrankung, die mit dem Target-Polynukleotid assoziiert ist.

14. Kit aus Teilen, umfassend Capture-Proben gemäß 2c) von Anspruch 1, Capture-Extender-Proben gemäß 2d) von Anspruch 1, Label-Proben gemäß 1a) von Anspruch 1, und Label-Extender-Proben zusammen mit Label-Proben gemäß 1b) von Anspruch 1, wobei zumindest zwei Label-Proben oder Label-Extender-Pro-

ben, Capture-Proben oder Capture-Extender-Proben verschiedene Nukleinsäuresequenzen umfassen, die komplementär sind zu verschiedenen Target-Nukleinsäuresequenzen.

15. Optischer planarer Wellenleiter, worin an die Oberfläche der Wellenleiterschicht des planaren Wellenleiters gebunden ist:

- a) eine Vielzahl von Capture-Proben, wie unter 2c) definiert, oder eine Vielzahl von Capture-Extender-Proben und einer Capture-Probe, wie unter 2d) von Anspruch 1 definiert;
- b) ein Target-Polynukleotid, das gebunden ist an die Capture-Probe oder die Capture-Extender-Probe; und
- c) eine Vielzahl von Label-Proben, wie unter 1a) von Anspruch 1 definiert, die gebunden sind an das Target-Polynukleotid, oder eine Vielzahl von Label-Proben-Extendern, wie unter 1b) von Anspruch 1 definiert, die gebunden sind an das Target-Polynukleotid, und eine Label-Probe, wie unter 1b) von Anspruch 1 definiert, die an den besagten Label-Proben-Extender gebunden ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

FIGUR 1

