



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 33 825 T2** 2007.11.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 210 457 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 33 825.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/22446**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 955 585.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/012859**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.08.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **22.02.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.06.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **07.03.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.11.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
376097 17.08.1999 US

(73) Patentinhaber:
Dade Behring Inc., Deerfield, Ill., US

(74) Vertreter:
**Zounek, Plate, Schweitzer Patentanwaltskanzlei,
65203 Wiesbaden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, ES, FR, GB, IT

(72) Erfinder:
**LISHANSKI, Alla, San Jose, CA 95126, US;
TAYLOR, Marc, Mountain View, CA 94040, US;
KURN, Nurith, Palo Alto, CA 94306, US**

(54) Bezeichnung: **DETEKTION VON UNTERSCHIEDEN IN NUKLEINSÄUREN DURCH INHIBIERUNG SPONTANER
DNA VERZWEIGUNGSMIGRATION**

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 eingelegt, 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

TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft den Nachweis von Unterschieden zwischen Nukleinsäuresequenzen, einschließlich des Nachweises von Mutationen und Einzelnukleotidpolymorphismen. Die vorliegende Erfindung eignet sich zur Verwendung bei Umwelt- und Diagnostiktests, und zwar aufgrund ihrer praktischen Durchführbarkeit.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Nukleinsäurehybridisierung ist zur Untersuchung der Identität und zum Nachweis des Vorhandenseins von Nukleinsäuren eingesetzt worden. Die Hybridisierung beruht auf komplementärer Basenpaarung. Werden komplementäre einzelsträngige Nukleinsäuren zusammen inkubiert, paaren sich die komplementären Basensequenzen unter Ausbildung von doppelsträngigen Hybridmolekülen. Die Fähigkeit einzelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (ssDNA) oder Ribonukleinsäure (RNA), eine wasserstoffverbrückte Struktur mit einer komplementären Nukleinsäuresequenz zu bilden, ist als analytisches Werkzeug in der molekularbiologischen Forschung eingesetzt worden. Die Verfügbarkeit radioaktiver Nukleosidtriphosphate mit hoher spezifischer Aktivität sowie die ³²P-Markierung von DNA mit T4-Polynukleotidkinase ermöglichte die Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung verschiedener biologisch interessanter Nukleinsäuresequenzen.

[0003] Die Nukleinsäurehybridisierung besitzt großes Potential bei der Diagnose von mit einmalig vorhandenen Nukleinsäuresequenzen assoziierten Krankheitszuständen. Diese einmalig vorhandenen Nukleinsäuresequenzen können das Ergebnis einer genetischen Veränderung oder einer Veränderung der Umgebung in der DNA durch Insertionen, Deletionen, Punktmutationen oder durch den Erwerb von Fremd-DNA oder -RNA mittels Infektion mit Bakterien, Schimmelpilzen, Pilzen und Viren sein. Bislang wurde die Nukleinsäurehybridisierung vorwiegend in akademischen und industriellen molekularbiologischen Laboratorien eingesetzt. Aufgrund der häufig sehr niedrigen Konzentrationen von mit einer Krankheit zusammenhängender, in der Körperflüssigkeit eines Patienten vorkommender DNA oder RNA und der Nichtverfügbarkeit eines ausreichend empfindlichen Verfahrens zur Nukleinsäurehybridisierungsanalyse ist die Anwendung der Nukleinsäurehybridisierung als diagnostisches Werkzeug in der klinischen Medizin beschränkt.

[0004] Bei einem Verfahren zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen wird die Zielnukleinsäure im allgemeinen auf einem festen Träger, wie z. B. Nitrocellulosepapier, Cellulosepapier, diazotiertem Papier oder einer Nylonmembran, immobilisiert. Nach dem Fixieren der Zielnukleinsäure auf dem Träger wird dieser mit einer in geeigneter Weise markierten Nukleinsäuresonde etwa zwei bis achtundvierzig Stunden in Kontakt gebracht. Nach Ablauf des obigen Zeitraums wird der feste Träger mehrmals unter Temperaturkontrolle zur Entfernung von nicht hybridisierter Sonde gewaschen. Der Träger wird danach getrocknet und das hybridisierte Material über Autoradiographie oder spektrometrische Verfahren nachgewiesen.

[0005] Das obige Verfahren ist, falls sehr niedrige Konzentrationen nachgewiesen werden müssen, langsam und arbeitsaufwendig, und nichtisotopische Markierungen, die sich gegenüber radioaktiven Markierungen weniger leicht nachweisen lassen, sind häufig nicht geeignet.

[0006] Ein als das Polymerasekettenreaktionsverfahren (PCR-Verfahren) bekanntes Verfahren zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte ist beschrieben worden. Dieses In-vitro-Amplifikationsverfahren beruht auf wiederholten Zyklen aus Denaturierung, Oligonukleotidprimer-Annealing und Primer-Verlängerung mittels thermophiler Polymerase, was zu einer exponentiellen Erhöhung der Kopienzahl des von den Primern flankierten Bereichs führt. Die PCR-Primer, deren Annealing an gegenüberliegende Stränge der DNA erfolgt, werden so positioniert, daß das Produkt der von der Polymerase katalysierten Verlängerung des einen Primers als Vorlagenstrang für den anderen Primer dienen kann, wodurch sich ein diskretes Fragment anreichert, dessen Länge durch den Abstand zwischen den Hybridisierungsstellen auf der DNA-Sequenz, die zu den 5'-Enden der Oligonukleotidprimer komplementär sind, definiert ist.

[0007] Weitere Verfahren zur Nukleinsäureamplifikation sind die Einzelprimeramplifikation, Ligasekettenreaktion (LCR), die Amplifikation auf Nukleinsäuresequenzbasis (NASBA) sowie das Q-beta-Replicaseverfahren. Unabhängig von der verwendeten Amplifikation muß jedoch das amplifizierte Produkt nachgewiesen werden.

[0008] Bei der genetischen Rekombination erfolgt der Austausch von DNA-Strängen zwischen zwei verwandten DNA-Duplexen. Der Verzweigungspunkt zwischen zwei Duplex-DNAs, bei denen ein Strangpaar ausge-

tauscht wird, ist vermutlich eine wichtige Zwischenverbindung bei der homologen Rekombination. Dieser Verzweigungspunkt wird ansonsten auch als Holliday-Übergangsstelle (Holliday junction) bezeichnet. Durch Bewegung der Holliday-Übergangsstelle durch "Branch Migration" (= Wanderung entlang eines Schenkels der DNA-Struktur) läßt sich die Menge an genetischer Information, die zwischen Homologen ausgetauscht wird, erhöhen oder verringern. Im Gegensatz zur spontanen Wanderung, die in vitro auftritt, wird der In-vivo-Strangtausch durch Proteine vermittelt.

[0009] Es besteht ein großer Bedarf an einfachen universellen Hochdurchsatzverfahren zum Nachweis von Unterschieden in verwandten Nukleinsäuresequenzen unabhängig von der genauen Beschaffenheit des Unterschieds. Dieser Bedarf wird aufgrund der fortschreitenden schnellen Entdeckung neuer, mit einer Krankheit in Verbindung stehender Mutationen, ausgelöst durch den Fortschritt des Human Genome Project, immer dringender. Ein Nachweisverfahren für Mutationen, das nicht von der genauen Position der Mutation abhängt, ist wertvoll im Falle von Krankheiten, die bekanntermaßen auf verschiedene Mutationen innerhalb einer gegebenen Sequenz zurückzuführen sind. Außerdem ist ein solches Verfahren zur Verifizierung einer Sequenzhomologie im Zusammenhang mit verschiedenen Anwendungen in der Molekularbiologie, Molekularmedizin und Populationsgenetik geeignet.

[0010] Einige der zur Zeit vorhandenen Verfahren zielen entweder auf Sätze von bekannten Mutationen ab, wie z. B. das Reverse-Dot-Blot-Verfahren, oder beinhalten Techniken auf Gelbasis, wie z. B. Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (SSCP), denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) oder die direkte Sequenzierung ebenso wie eine Reihe von Verfahren zum Nachweis von Heteroduplexen. Dementsprechend sind solche Verfahren arbeits- und zeitaufwendig.

[0011] In den letzten Jahren wurden verschiedene Verfahren zum Mutationsnachweis auf Grundlage der Amplifikationstechnik entwickelt. Der Nachweis von Sequenzveränderungen beruht auf einem der folgenden Prinzipien: Allelspezifische Hybridisierung, chemische Modifikation fehlgepaarter Basen mit anschließender Strangspaltung, Nukleasespaltung an Fehlpaarungsstellen, Erkennung von Fehlpaarungen durch spezifische DNA-Bindungsproteine, Änderungen in der elektrophoretischen Beweglichkeit fehlgepaarter Duplexe in Denaturierungsmittelgradienten, konformationsinduzierte Änderungen der elektrophoretischen Beweglichkeit von Einzelstrang-DNA, manchmal in Kombination mit konformationsspezifischer Nukleasespaltung. Einige dieser Verfahren sind zu arbeits- und zeitaufwendig, und viele sind von der Art der Basenveränderung abhängig.

[0012] Es besteht der Wunsch nach einem empfindlichen, einfachen, kostengünstigen Verfahren zum Nachweisen von Unterschieden in Nukleinsäuren, wie z. B. Mutationen, vorzugsweise in einem homogenen Format. Durch das Verfahren sollten die Anzahl und Komplexität der Schritte und Reagentien minimiert werden. Ein solches Verfahren wäre für ein Populationsscreening im großen Maßstab geeignet.

BESCHREIBUNG DES STANDS DER TECHNIK

[0013] Die Bildung einer Einzelbasenfehlpaarung, die spontane DNA-Branch Migration beeinträchtigt, wird von Panyutin et al., (1993) J. Mol. Biol., 230:413-424 beschrieben.

[0014] Die Kinetik der spontanen DNA-Branch Migration wird in Panyutin et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:2021-2025 erörtert.

[0015] Der Mechanismus der Hemmung spontaner DNA-Branch Migration durch Fehlpaarungen wird ferner bei Biswas et al. (1998) J. Mol. Biol., 279,795-806 erörtert.

[0016] Der Nachweis der stabilen kreuzförmigen Strukturen, womit eine Sequenzänderung in der Testssequenz relativ zu einer Referenzsequenz angezeigt wird und wobei mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten sowie ein Konjugat aus Enzym und monoklonalem Antidigoxin-Antikörper verwendet wird, ist bei Lishanski et al. 1996, A homogenous mutation detection method based on inhibition of branch migration, Abstract of the 28th Annual Oakridge Conference on Advanced Analytical Concepts for the Clinical Laboratory, "Tomorrow's Technology Today", S. 15, beschrieben. Der Nachweis von Sequenzänderungen unter Verwendung der Hemmung von Branch Migration in einem LOCI (luminescent oxygenchanneling assay) – Testformat ist in der WO 97/23646 angegeben.

[0017] Aus der europäischen Patentanmeldung Nr. 0 450 370 A1 (Wetmur et al.) ist die Branch Migration von Nukleotiden bekannt.

[0018] Ein Polynukleotid-Verdrängungstestverfahren und ein Polynukleotidkomplexreagens dafür wird im US-Patent Nr. 4,766,062 (Diamond, et al.) erörtert.

[0019] Ein Strangverdrängungstest und ein dafür geeigneter Komplex werden in der PCT-Anmeldung WO 94/06937 (Eadie et al.) erörtert.

[0020] In der PCT-Anmeldung WO/86/06412 (Fritsch et al.) werden ein Verfahren sowie ein Nukleinsäurekonstrukt zur Herstellung von bei der Bestimmung von Zielnukleotidsequenzen geeigneten Reagenskomplexen erörtert.

[0021] Ein Verfahren zur Amplifikation zum Nachweis und/oder zur Klonierung von Nukleinsäuresequenzen ist aus den US-Patenten Nr. 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188 und 5,008,182 bekannt. Die Sequenzpolymerisierung mittels Polymerasekettenreaktion ist in Saiki et al. (1986), Science, 230:1350-1354, beschrieben. Eine Primer-gesteuerte enzymatische Amplifikation von DNA mit einer temperaturstabilen DNA-Polymerase ist in Saiki et al., Science (1988) 239:487, beschrieben.

[0022] Im US-Patent Nr. 4,683,202 (Mullis) ist ein stufenweises PCR-Verfahren dargestellt, bei dem ein zweiter Primersatz zur Amplifikation einer innerhalb der von einem ersten Primersatz amplifizierten DNA-Sequenz liegenden kürzeren DNA-Sequenz verwendet wird. Dieses Verfahren, das allgemein als "nested PCR" [etwa: geschachtelte PCR] bezeichnet wird, ist als ein empfindlicheres und spezifischeres Verfahren anerkannt. Siehe US-Patente Nr. 5,556,773 (Youno) und 5,340,728 (Grosz et al.) sowie Gyllensten U. B., et al., Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:7652-56 (1998); Youno J, A Method of Nested PCR with Single Closed Reaction Tubes, PCR Methods and Applications, 2:60-65 (1992); Rimstad E. et al., Identification of a Double-Stranded RNA Virus by Using Polymerase Chain Reaction and Magnetic Separation of the Synthesized DNA Segments, J. Clin. Micro. 28:2275-78 (1990); Erlich H. A. et al., Recent Advances in Polymerase Chain Reaction, Science, 252:1643-50 (1991); Porter-Jordan et al., Nested Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Cytomegalovirus Overcomes False Positives Caused by Contamination with Fragmented DNA, J. Med. Vir., 30:85-91 (1990).

KURZE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0023] Die vorliegende Erfindung sieht ein Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins einer Mutation in einer Zielnukleinsäuresequenz bzw. des Vorhandenseins eines Unterschieds zwischen einer Zielnukleinsäure und einer Referenznukleinsäure vor, wodurch die Auswirkung eines falschen Priming in den Amplifikationsreaktionen der vorliegenden Erfindung minimiert wird. Bei dem Verfahren werden Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen mittels der Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der Primer P2, P4 und P5 amplifiziert. Dabei weist der Primer P4 einen 3'-terminalen Bereich Pa, der zur Hybridisierung an das Ziel bzw. die Referenz fähig ist, sowie einen 5'-terminalen Bereich T auf, der weder zum Ziel noch zur Referenz komplementär ist. Der Primer P5 ist in der Lage, an das Ziel bzw. die Referenz an einem Ort in 3'-Richtung der zur Hybridisierung des 3'-Bereichs des Primers P4 fähigen Sequenz zu hybridisieren. Dabei stellt entweder Primer P2 ein Gemisch von P2 mit einer ersten Markierung und P2 mit einer zweiten Markierung dar, oder P4 weist eine erste Markierung und P5 eine zweite Markierung auf. Nach der Amplifikation entstehen mit einem Schwanz versehene partielle Duplexe der Referenz- bzw. Zielsequenz. Die mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexe weisen Schwänze aus nicht komplementären Strängen auf, wobei es sich bei dem ersten Strang um die Sequenz von P5 oder seinem Komplement und bei dem zweiten Strang um T oder sein Komplement handelt. Ein quadramolekularer Komplex wird durch die Hybridisierung komplementärer Schwänze an die beiden partiellen Duplexe gebildet, wobei der Komplex wenigstens ein Paar nicht komplementärer Stränge sowie jeder Strang jeweils eine Markierung aufweist. Der Nachweis der Assoziation der Markierungen als Teil des Komplexes steht in Verbindung mit dem Vorhandensein des Unterschieds zwischen den Ziel- und Referenzsequenzen.

[0024] Der 3'-Anteil des Primers P4 kann an die Zielnukleinsäuresequenz an einer neben der zum Primer P5 hybridisierbaren Sequenz liegenden Sequenz hybridisieren, doch brauchen derartige Sequenzen nicht nebeneinander zu liegen. Die Sequenzen können teilweise überlappen oder in ihrer Abfolge durch eine Lücke voneinander getrennt sein. Die Amplifikation der Ziel- und Referenzsequenzen kann in denselben oder in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen durchgeführt werden.

[0025] Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich um ein Verfahren zur Herstellung partieller Duplexe mit zwei vordefinierten nicht komplementären Einzelstrangsequenzen. Bei dem Verfahren werden in einem Medium eine Polymerase, Nukleosidtriphosphate sowie die Primer P2, P4 und P5 kom-

biniert. Das Medium wird dann zur Bildung der partiellen Duplexe einem Temperaturkreislauf ausgesetzt.

[0026] Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich um ein Verfahren zur Herstellung partieller Duplexe mit zwei vordefinierten nicht komplementären Einzelstrangsequenzen. Bei dem Verfahren werden in einem ersten Medium eine eine Zielnukleinsäure enthaltende Probe, eine Polymerase, Nukleosidtriphosphate und die Primer P2 und P4 sowie in einem zweiten Medium eine Zielnukleinsäuresequenz, eine Polymerase, Nukleosidtriphosphate und die Primer P2 und P5 kombiniert. Die Kombinationen werden einem Temperaturkreislauf ausgesetzt. Die Medien werden zusammengegeben und die Kombination Bedingungen ausgesetzt, die zur Denaturierung und Reassoziierung der Einzelstrangamplifikationsprodukte unter Bildung der partiellen Duplexe führen.

[0027] Bei einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich um einen durch das Verfahren der Amplifikation einer Zielnukleinsäuresequenz mit einer Mutation und einer Referenznukleinsäuresequenz unter Verwendung der Primer P2, P4 und P5 hergestellten quadramolekularen Komplex. Dabei werden die Schwanzsequenzen der durch die Amplifikationsreaktion gebildeten mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexe unter Bildung des quadramolekularen Komplexes hybridisiert.

[0028] Bei einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich um einen Kit zum Nachweis eines Unterschieds zwischen einer Zielnukleinsäuresequenz und einer Referenznukleinsäuresequenz bzw. des Vorhandenseins einer Mutation in einer Nukleinsäuresequenz. Dabei umfaßt ein Kit im Sinne der vorliegenden Erfindung in abgepackter Kombination Primer, nämlich Primer P2, Primer P4 und Primer P5, wie oben beschrieben, sowie ferner eine Polymerase, Nukleosidtriphosphate, eine Referenznukleinsäuresequenz und Pufferreagentien, die zur Ausführung einer Nukleinsäureamplifikation mittels Polymerasekettenreaktion ausreichen. Die Primer können mit Markierungen assoziiert sein. Die Primer können in getrennten Packungen in verschiedenen Kombinationen enthalten sein.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0029] Bei [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) handelt es sich um schematische Diagramme, die die Verzweigungsmigration im quadramolekularen Komplex der vorliegenden Erfindung zeigen.

[0030] Bei [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) handelt es sich um schematische Diagramme, die die Bildung des quadramolekularen Komplexes der vorliegenden Erfindung aus den mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexen der vorliegenden Erfindung zeigen.

[0031] Bei [Fig. 3](#) handelt es sich um ein schematisches Diagramm, das die Herstellung der mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexe der vorliegenden Erfindung unter Verwendung einer ersten Ausführungsform eines Primerschemas der vorliegenden Erfindung zeigt.

[0032] Bei [Fig. 4](#) handelt es sich um ein schematisches Diagramm, das die Herstellung der mit Schwänzen versehenen partiellen Zielduplexe der vorliegenden Erfindung unter Verwendung einer ersten Ausführungsform eines Primerschemas der vorliegenden Erfindung nach einer Voramplifikation der Ziel- bzw. Referenzsequenz zeigt.

[0033] Bei [Fig. 5](#) handelt es sich um ein schematisches Diagramm eines Verfahrens zum Anfügen von Primerbindungsstellen an die Ziel- bzw. Referenzsequenz.

[0034] Bei [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) handelt es sich um schematische Diagramme, die den Nachweis eines Unterschieds zwischen einer Zielnukleinsäuresequenz und einer Referenznukleinsäuresequenz unter Verwendung von PCR darstellen.

[0035] Bei [Fig. 7](#) handelt es sich um ein schematisches Diagramm, das ein Primerschema der vorliegenden Erfindung darstellt, mit dem die Auswirkungen eines falschen Priming in der Amplifikationsreaktion der vorliegenden Erfindung reduziert werden.

[0036] Bei [Fig. 8](#) handelt es sich um ein schematisches Diagramm des quadramolekularen Komplexes der vorliegenden Erfindung.

[0037] Bei [Fig. 9](#) handelt es sich um ein schematisches Diagramm, das die Amplifikation der Referenzsequenz, der Zielsequenz unter Verwendung der Primer der vorliegenden Erfindung zeigt.

BESCHREIBUNG DER SPEZIFISCHEN AUSFÜHRUNGSFORMEM

[0038] Die vorliegende Erfindung ist universell und gestattet den Nachweis eines beliebigen Unterschieds in zwei verwandten Nukleinsäuresequenzen, gleichgültig ob ein solcher Unterschied bekannt ist oder nicht. Zu solchen Unterschieden gehören alle Mutationen, einschließlich Einzelbasensubstitution, Deletion oder Insertion, innerhalb einer Sequenz, die durch ein Primerpaar zur Ausführung der Polymerasekettenreaktion definiert werden kann. Das Verfahren kann homogen oder heterogen, nichtradioaktiv, schnell und einer Automatisierung zugänglich sein. Es eignet sich in idealer Weise zum schnellen Prä-Screening von Mutationen. Die Erfindung findet ebenso Anwendung auf dem Gebiet der Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion. Die vorliegende Erfindung gestattet die Durchführung einer PCR und der nachfolgenden Schritte, wie beispielsweise dem Nachweis der PCR-Produkte, in einem einzigen Behälter ohne Trennschritt und ohne, daß zusätzliche Sonden benötigt werden.

[0039] In einem Aspekt beinhaltet das vorliegende Verfahren die Bildung einer kreuzförmigen DNA-Struktur bzw. eines kreuzförmigen DNA-Komplexes mit jeweils vier Strängen. Die Bildung erfolgt durch Herstellung partieller Duplexe mittels Amplifikation, wobei drei unterschiedliche Primer in der Polymerasekettenreaktion verwendet werden und das Annealing der Amplifikationsprodukte gestattet wird. Der Komplex dissoziiert in normale Duplexstrukturen durch Strangaustausch mittels Branch Migration, wenn die doppelsträngigen Anteile der partiellen Duplexe jeweils identisch sind. Liegt jedoch ein Unterschied zwischen den beiden doppelsträngigen Anteilen vor, so findet keine Dissoziation des Komplexes statt, was als Anzeichen für das Vorhandensein eines Unterschieds zwischen den Nukleinsäuren nachgewiesen werden kann.

[0040] Bevor mit einer Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung fortgefahren wird, soll eine Reihe von Ausdrücken definiert werden.

Definitionen

[0041] Nukleinsäure – eine Verbindung oder Zusammensetzung, bei der es sich um ein polymeres Nukleotid oder Polynukleotid handelt. Zu den Nukleinsäuren gehören sowohl Nukleinsäuren als auch Fragmente davon aus einer beliebigen Quelle in gereinigter oder ungereinigter Form, einschließlich DNA (dsDNA und ssDNA) und RNA, einschließlich t-RNA, m-RNA, r-RNA, mitochondriale DNA und RNA, Chloroplasten-DNA und -RNA, DNA-RNA-Hybride, oder Gemische davon, Gene, Chromosomen, Plasmide, die Genome aus biologischem Material, wie z. B. Mikroorganismen, z. B. Bakterien, Hefen, Viren, Viroide, Schimmelpilze, Pilze, Pflanzen, Tiere, Menschen u. ä. Bei der Nukleinsäure kann es sich lediglich um eine kleinere Fraktion eines komplexen Gemischs, wie z. B. einer biologischen Probe, handeln. Die Nukleinsäure läßt sich mit im Fachgebiet allgemein bekannten Verfahrensweisen aus einer biologischen Probe gewinnen. Ebenso umfaßt sind Gene, wie z. B. das Hämoglobingen für Sichelzellenanämie, das Gen für zystische Fibrose, Onkogene, cDNA u. ä. Handelt es sich bei der Nukleinsäure um RNA, so wird diese zunächst mittels eines Primers und reverser Transkriptase in cDNA umgewandelt. Die in der vorliegenden Erfindung zur Durchführung der Amplifikation und Kettenverlängerung verwendete Nukleotidpolymerase kann eine Reverse-Transkriptase-Aktivität aufweisen. Interessierende Sequenzen können in Sequenzen des Chromosoms, der cDNA, des Plasmids usw. von beliebiger Länge eingebettet sein.

[0042] Probe – das Material, von dem vermutet wird, daß es die Nukleinsäure enthält. Zu solchen Proben gehören biologische Flüssigkeiten, wie z. B. Blut, Serum, Plasma, Speichel, Lympheflüssigkeit, Samen, Vaginalschleim, Faeces, Urin, Rückenmarksflüssigkeit u. ä.; biologisches Gewebe, wie z. B. Haar und Haut; usw. Zu weiteren Proben gehören Zellkulturen u. ä., Pflanzen, Lebensmittel, forensische Proben, wie z. B. Papier, Gewebe und Ausschabungen, Wasser, Abwasser, Arzneien, usw. Falls notwendig, kann die Probe mit Reagentien vorbehandelt werden, um die Probe zu verflüssigen und die Nukleinsäuren von bindenden Substanzen zu befreien. Solche Vorbehandlungen sind im Fachgebiet allgemein bekannt.

[0043] Amplifikation von Nukleinsäuren – alle Verfahren, die zur Bildung einer oder mehrerer Kopien einer Nukleinsäure führen. Eines dieser Verfahren zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen ist als Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) bekannt, wie von Saiki et al., supra, beschrieben. Dieses In-vitro-Amplifikationsverfahren beruht auf wiederholten Zyklen aus Denaturierung, Oligonukleotidprimer-Annealing und Primerverlängerung durch thermophile matrizenabhängige Polynukleotidpolymerase, was zu einem exponentiellen Anstieg an Kopien der gewünschten Sequenz der von den Primern flankierten Nukleinsäure führt. Die beiden unterschiedlichen PCR-Primer werden für ein Annealing an gegenüberliegende Stränge der DNA an Positionen konstruiert, die dem Produkt der von der Polymerase katalysierten Verlängerung des einen Primers gestatten, als Matrizenstrang für den anderen zu dienen, was zur Anhäufung

eines diskreten doppelsträngigen Fragments führt, dessen Länge durch den Abstand zwischen den 5'-Enden der Oligonukleotidprimer definiert ist. Die Primerlänge kann von etwa 10 bis 50 oder mehr Nukleotiden variieren und wird typischerweise so ausgewählt, daß sie wenigstens etwa 15 Nukleotide beträgt, um eine hohe Spezifität sicherzustellen. Das hergestellte doppelsträngige Fragment wird "Amplifikat" genannt, wobei seine Länge lediglich etwa 30 Nukleotide bis zu 10 000 oder mehr Nukleotide betragen kann.

[0044] Kettenverlängerung von Nukleinsäuren – Verlängerung des 3'-Endes eines Polynukleotids, an das zusätzliche Nukleotide oder Basen angehängt werden. Die Kettenverlängerung im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist matrizenabhängig, d.h. die angehängten Nukleotide werden durch die Sequenz einer Matrizenukleinsäure, an die die sich verlängernde Kette hybridisiert wird, bestimmt. Die hergestellte Sequenz des Kettenverlängerungsprodukts ist zu der Matrizensequenz komplementär. Die Kettenverlängerung ist typischerweise enzymkatalysiert, in der vorliegenden Erfindung vorzugsweise durch eine thermophile DNA-Polymerase.

[0045] Zielnukleinsäuresequenz – eine Sequenz von Nukleotiden, die entweder auf das Vorhandensein eines Unterschieds zu einer verwandten Sequenz oder hinsichtlich der Bestimmung ihres Vorhandenseins oder ihrer Abwesenheit untersucht wird. Die Zielnukleinsäuresequenz kann doppelsträngig oder einzelsträngig sein und aus einer natürlichen oder synthetischen Quelle stammen. Handelt es sich bei der Zielnukleinsäuresequenz um eine einzelsträngige Nukleinsäure, so wird durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung ein Nukleinsäureduplex hergestellt, der die einzelsträngige Zielnukleinsäuresequenz umfaßt.

[0046] Die Zielsequenz kommt normalerweise innerhalb eines Teils oder der Gesamtheit einer Nukleinsäure vor, deren Identität in einem Ausmaß bekannt ist, das ausreicht, um die Herstellung verschiedener Primer, die zur Einführung einer oder mehrerer Primingstellen, die die Zielsequenz flankieren, oder zur Durchführung einer Amplifikation der Zielsequenz oder einer Kettenverlängerung der Produkte einer solchen Amplifikation im Sinne der vorliegenden Erfindung notwendig sind, zu gestatten. Dementsprechend kann, außer für die Stellen, an die die Primer binden, die Identität der Zielnukleinsäuresequenz gegebenenfalls bekannt sein. Im allgemeinen hybridisieren bei der PCR die Primer zumindest an die Zielsequenz und werden entlang dieser verlängert (kettenverlängert), womit die Zielsequenz als Matrize fungiert. Die Zielsequenz enthält üblicherweise etwa 30 bis 20 000 oder mehr Nukleotide, häufiger 100 bis 10 000 Nukleotide, vorzugsweise 50 bis 1000 Nukleotide. Bei der Zielnukleinsäuresequenz handelt es sich im allgemeinen um einen Bruchteil eines größeren Moleküls oder weitgehend um das gesamte Molekül. Die minimale Anzahl an Nukleotiden in der Zielsequenz wird so ausgewählt, daß sichergestellt werden kann, daß eine Bestimmung eines Unterschieds zwischen zwei verwandten Nukleinsäuresequenzen im Sinne der vorliegenden Erfindung erreicht wird.

[0047] Referenznukleinsäuresequenz – eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Zielnukleinsäure dahingehend verwandt ist, daß die beiden Sequenzen identisch sind mit Ausnahme des Vorhandenseins eines Unterschieds, wie z. B. einer Mutation. Falls eine Mutation nachgewiesen werden soll, so enthält die Referenznukleinsäuresequenz üblicherweise die normale oder "Wildtyp"-Sequenz. In gewissen Situationen kann die Referenznukleinsäuresequenz Teil der Probe sein, wie z. B. in Proben aus Tumoren, der Identifizierung teilmutierter Mikroorganismen oder der Identifizierung heterozygoter Träger einer Mutation. Folglich wird sowohl die Referenz- als auch die Zielnukleinsäuresequenz ähnlichen oder den gleichen Amplifikationsbedingungen ausgesetzt. Wie bei der Zielnukleinsäuresequenz braucht die Identität der Referenznukleinsäuresequenz nur in einem Ausmaß bekannt zu sein, das ausreicht, um die Herstellung verschiedener Primer, die zur Einführung einer oder mehrerer Primingstellen, die die Referenzsequenz flankieren, oder zur Durchführung einer Amplifikation der Zielsequenz oder einer Kettenverlängerung des Produkts einer solchen Amplifikation im Sinne der vorliegenden Erfindung notwendig sind, zu gestatten. Dementsprechend kann außer für die Stellen, an die die Primer binden, die Identität der Referenz-Nukleinsäuresequenz gegebenenfalls bekannt sein. Bei der Referenznukleinsäuresequenz kann es sich um ein in den Verfahren im Sinne der vorliegenden Erfindung eingesetztes Reagens handeln. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn das vorliegende Verfahren bei der PCR-Amplifikation zum Nachweis einer Zielnukleinsäuresequenz eingesetzt wird. Je nach dem Verfahren zur Herstellung dieses Reagens kann es gegebenenfalls notwendig sein, die Identität der Referenznukleinsäure zu kennen. Das Referenznukleinsäurereagens kann aus einer natürlichen Quelle gewonnen oder mit bekannten Verfahren, wie z. B. den unten bei der Definition der Oligonukleotide beschriebenen Verfahren, hergestellt werden.

[0048] Holliday-Übergangsstelle – der Verzweigungspunkt an einer vierarmigen Übergangsstelle in einem Komplex aus zwei identischen Nukleinsäuresequenzen und ihren komplementären Sequenzen. Die Übergangsstelle ist dazu in der Lage, eine Branch Migration durchzuführen, was zur Dissoziation in zwei doppelsträngige Sequenzen führt, wobei sich die Sequenzidentität und -komplementarität bis zu den Enden der Stränge erstrecken.

[0049] Komplex – ein Komplex aus vier Nukleinsäuresträngen mit einer Holliday-Übergangsstelle, der aufgrund eines Unterschieds in den Sequenzen und ihren Komplementen an einer Dissoziation in zwei doppelsträngige Sequenzen gehindert wird. Dementsprechend ist der Komplex quadramolekular.

[0050] Verwandte Nukleinsäuresequenzen – zwei Nukleinsäuresequenzen sind verwandt, wenn sie zumindest 15 Nukleotide an jedem Ende enthalten, die identisch sind, jedoch unterschiedliche Längen aufweisen oder dazwischenliegende Sequenzen besitzen, die sich um wenigstens ein Nukleotid unterscheiden. Häufig unterscheiden sich verwandte Nukleinsäuresequenzen durch ein einziges Nukleotid voneinander. Ein solcher Unterschied wird hier als "Unterschied zwischen zwei verwandten Nukleinsäuresequenzen" bezeichnet. Ein Unterschied läßt sich durch die Substitution, Deletion oder Insertion eines einzigen Nukleotids oder einer Reihe von Nukleotiden innerhalb einer Sequenz produzieren.

[0051] Mutation – eine Änderung in der Sequenz von Nukleotiden einer normalerweise konservierten Nukleinsäuresequenz, die zur Bildung einer Mutante führt, wie sie von der normalen (unveränderten) oder Wildtyp-Sequenz unterschieden wird. Mutationen lassen sich im allgemeinen in zwei allgemeine Klassen, nämlich Basenpaarsubstitutionen und "Frameshift" (= Rasterverschiebungs-)Mutationen, einteilen. Letztere umfassen die Insertion oder Deletion einer bis mehrerer Nukleotidpaare. Ein Unterschied von einem Nukleotid kann signifikant sein hinsichtlich der phänotypischen Normalität oder Abnormalität, wie z. B. im Fall der Sichelzellenanämie. Im Sinne der vorliegenden Anmeldung kann eine Mutation einen Polymorphismus beinhalten.

[0052] Polymorphismus – ein Unterschied in der DNA-Sequenz zwischen Individuen. Im Sinne der vorliegenden Anmeldung kann der Begriff Mutation, wie er hier definiert ist, einen Polymorphismus repräsentieren. Bei einem Einzelnukleotidpolymorphismus handelt es sich um einen Unterschied von einem Basenpaar zwischen DNA-Sequenzen.

[0053] Partieller Duplex – eine vollständig komplementäre doppelsträngige Nukleinsäuresequenz, wobei deren eines Ende nicht komplementäre Oligonukleotidsequenzen, die jeweils mit einem Strang des doppelsträngigen Moleküls verknüpft sind, aufweist, wobei jede nicht komplementäre Sequenz 8 bis 60, vorzugsweise 10 bis 50, stärker bevorzugt 15 bis 40, Nukleotide aufweist. Somit wird der partielle Duplex als mit "Schwänzen versehen" bezeichnet, da beide Stränge des Duplex jeweils eine damit verknüpfte einzelsträngige Oligonukleotidkette aufweisen.

[0054] Duplex – eine doppelsträngige Nukleinsäuresequenz, wobei alle Nukleotide darin im wesentlichen komplementär sind.

[0055] Oligonukleotid – ein einzelsträngiges Polynukleotid, üblicherweise ein synthetisches Polynukleotid. Das Oligonukleotid bzw. die Oligonukleotide bestehen normalerweise aus einer Sequenz mit einer Länge von 10 bis 100 Nukleotiden, vorzugsweise 20 bis 80 Nukleotiden und besonders bevorzugt 30 bis 60 Nukleotiden.

[0056] Für die Herstellung eines in der vorliegenden Erfindung verwendeten Oligonukleotids lassen sich verschiedene Techniken einsetzen. Ein solches Oligonukleotid läßt sich durch biologische Synthese oder durch chemische Synthese erhalten. Für kurze Sequenzen (bis zu etwa 100 Nukleotiden) ist die chemische Synthese häufig ökonomischer im Vergleich mit der biologischen Synthese. Neben Wirtschaftlichkeit liefert die chemische Synthese einen zweckmäßigen Weg zum Einbau von niedrigmolekularen Verbindungen und/oder modifizierten Basen während des Syntheseschritts. Weiterhin ist die chemische Synthese sehr flexibel bei der Wahl von Länge und Bereich der Zielpolynukleotidbindungssequenz. Das Oligonukleotid läßt sich mit Standardverfahren, wie z. B. denjenigen, die in kommerziellen Nukleinsäuresyntheseautomaten verwendet werden, synthetisieren. Die chemische Synthese von DNA auf einem geeigneterweise modifizierten Glas oder Harz kann zu einer kovalent an die Oberfläche gebundenen DNA führen. Dadurch können sich Vorteile beim Waschen und der Probenhandhabung ergeben. Für längere Sequenzen können in der Molekularbiologie eingesetzte Standardreplikationsverfahren verwendet werden, wie z. B. die Verwendung von M13 für Einzelstrang-DNA, wie von J. Messing (1983) *Methods Enzymol.* 101:20-78 beschrieben.

[0057] Zu weiteren Verfahren der Oligonukleotidsynthese gehören die Phosphotriester- und Phosphodiesterverfahren (Narang et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90 sowie die Synthese an einem Träger (Beaucage et al. (1981) *Tetrahedron Letters* 22:1859-1862) ebenso wie die Phosphoramidattechnik, Caruthers, M. H. et al., *Methods in Enzymology*, 154:287-314 (1988), und andere, in "Synthesis and Applications of DNA and RNA", S. A. Narang, Herausgeber, Academic Press, New York, 1987, sowie den darin enthaltenen Literaturangaben beschriebene Techniken.

[0058] Oligonukleotidprimer – ein Oligonukleotid, das üblicherweise in einer Kettenverlängerung an einer Polynukleotidmatrize eingesetzt wird, wie z. B. bei der Amplifikation einer Nukleinsäure. Bei dem Oligonukleotidprimer handelt es sich normalerweise um ein synthetisches Oligonukleotid, das einzelsträngig ist und an seinem 3'-Ende eine hybridisierbare Sequenz enthält, die zur Hybridisierung mit einer definierten Sequenz des Ziel- oder Referenzpolynukleotids fähig ist. Normalerweise weist die hybridisierbare Sequenz des Oligonukleotidprimers wenigstens 90 %, vorzugsweise 95 %, am meisten bevorzugt 100 %, Komplementarität zu einer definierten Sequenz oder Primerbindungsstelle auf. Die Anzahl der Nukleotide in der hybridisierbaren Sequenz eines Oligonukleotidprimers sollte so hoch sein, daß zur Hybridisierung des Oligonukleotidprimers verwendete Stringenzbedingungen eine übermäßige nicht spezifische Zufallshybridisierung verhindern. Die Anzahl an Nukleotiden in der hybridisierbaren Sequenz des Oligonukleotidprimers liegt üblicherweise bei wenigstens zehn Nukleotiden, vorzugsweise wenigstens 15 Nukleotiden und bevorzugt bei 20 bis 50 Nukleotiden. Darüber hinaus kann der Primer an seinem 5'-Ende eine Sequenz aufweisen, die nicht mit den Ziel- oder Referenzpolynukleotiden hybridisiert und die 1 bis 60 Nukleotide, vorzugsweise 8 bis 30 Nukleotide, aufweist.

[0059] Nukleosidtriphosphate – Nukleoside mit einem 5'-Triphosphat-Substituenten. Bei den Nukleotiden handelt es sich um Pentosezuckerderivate von stickstoffhaltigen Basen, die sich entweder von Purin oder Pyrimidin ableiten und die kovalent an den 1'-Kohlenstoff des Pentosezuckers, bei dem es sich üblicherweise um eine Desoxyribose oder eine Ribose handelt, gebunden sind. Die Purinbasen umfassen Adenin (A), Guanin (G), Inosin (I) sowie Derivate und Analoga davon. Die Pyrimidinbasen umfassen Cytosin (C), Thymin (T), Uracil (U) sowie Derivate und Analoga davon. Zu den Nukleosidtriphosphaten gehören Desoxyribonukleosidtriphosphate, wie z. B. die vier häufigen Triphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP, sowie die Ribonukleosidtriphosphate, wie z. B. die vier häufigen Triphosphate rATP, rCTP, rGTP und rUTP.

[0060] Der Begriff "Nukleosidtriphosphate" umfaßt ebenso Derivate und Analoga davon, bei denen es sich beispielhaft um solche Derivate handelt, die in ähnlicher Weise wie die nicht derivatisierten Nukleosidtriphosphate erkannt und polymerisiert werden. Als veranschaulichende und nicht einschränkende Beispiele solcher Derivate oder Analoga dienen solche, die biotinyliert, Amin-modifiziert, alkylt u. ä. sind, wobei auch Phosphorothioat-, Phosphat-, Ringatom-modifizierte Derivate u. ä. umfaßt sind.

[0061] Nukleotid – eine Kombination aus Base, Zucker und Phosphat, die die monomere Einheit von Nukleinsäurepolymeren, d.h. DNA und RNA, darstellt.

[0062] Nukleotid – ist eine Kombination aus Base und Zucker oder ein Nukleotid ohne Phosphatgruppe.

[0063] Nukleotidpolymerase – ein Katalysator, üblicherweise ein Enzym, zur Bildung einer Verlängerung eines Polynukleotids entlang einer DNA- oder RNA-Matrize, wobei die Verlängerung komplementär dazu ist. Bei der Nukleotidpolymerase handelt es sich um eine matrizenabhängige Polynukleotidpolymerase, die Nukleosidtriphosphate als Bausteine zur Verlängerung des 3'-Endes eines Polynukleotids zur Bereitstellung einer mit der Polynukleotidmatrize komplementären Sequenz verwendet. Die Katalysatoren sind üblicherweise Enzyme, wie z. B. DNA-Polymerasen, beispielsweise prokaryontische DNA-Polymerase (I, II oder III), T4-DNA-Polymerase, T7-DNA-Polymerase, Klenow-Fragment, sowie reverse Transkriptase, und sind vorzugsweise temperaturstabile DNA-Polymerasen, wie z. B. Vent®-DNA-Polymerase, VentR®-DNA-Polymerase, Pfu®-DNA-Polymerase, Pfu-Turbo®-Polymerase, Taq®-DNA-Polymerase u. ä., die aus einer beliebigen Quelle, wie z. B. Zellen, Bakterien, z. B. E. coli, Pflanzen, Tieren, Viren, thermophilen Bakterien usw. stammen.

[0064] Vollständig oder teilweise sequentiell – wenn die Probe und verschiedene in der vorliegenden Erfindung verwendete Agentien auf andere Weise als gleichzeitig (simultan) kombiniert werden, so können eines oder mehrere mit einem oder mehreren der verbliebenen Agentien unter Bildung einer Teilkombination kombiniert werden. Die Teilkombination sowie verbliebene Agentien können dann kombiniert und dem vorliegenden Verfahren unterzogen werden.

[0065] Hybridisierung (Hybridisieren) und Bindung – im Zusammenhang mit Nukleotidsequenzen werden diese Begriffe hier gegeneinander austauschbar verwendet. Die Fähigkeit zweier Nukleotidsequenzen, miteinander zu hybridisieren, beruht auf dem Grad der Komplementarität der beiden Nukleotidsequenzen, der wiederum auf dem Bruchteil der übereinstimmenden komplementären Nukleotidpaare beruht. Je mehr Nukleotide in einer gegebenen Sequenz zu einer anderen Sequenz komplementär sind, desto stringenter können die Bedingungen für die Hybridisierung sein und desto spezifischer ist die Bindung der beiden Sequenzen. Eine erhöhte Stringenz wird durch Anheben der Temperatur, Erhöhen des Cosolventienverhältnisses, Erniedrigen der Salzkonzentration u. ä. erzielt.

[0066] Komplementär – Zwei Sequenzen sind komplementär, wenn die eine Sequenz an die andere Sequenz in einem antiparallelen Sinn binden kann, wobei jeweils das 3'-Ende der einen Sequenz an das 5'-Ende der anderen Sequenz bindet und jedes A, T(U), G und C der einen Sequenz dann jeweils einem T(U), A, C bzw. G der anderen Sequenz gegenübergestellt wird.

[0067] Kopie – bedeutet eine Sequenz, die eine direkte identische Kopie einer einzelsträngigen Polynukleotidsequenz ist, im Unterschied zu einer Sequenz, die komplementär zu der Sequenz eines solchen einzelsträngigen Polynukleotids ist.

[0068] Bedingungen zur Verlängerung eines Primers – umfaßt eine Nukleotidpolymerase, Nukleosidtriphosphate oder Analoga davon, die als Substrate für die Polymerase fungieren können, sowie andere Materialien und Bedingungen, die für die Enzymaktivität benötigt werden, wie z. B. ein zweiwertiges Metallion (üblicherweise Magnesium), pH, Ionenstärke, organisches Lösungsmittel (z. B. Formamid) u. ä.

[0069] Mitglied eines spezifischen Bindungspaares ("sBp-Mitglied") – eines von zwei unterschiedlichen Molekülen mit einer auf der Oberfläche oder in einer Höhlung befindlichen Fläche, die spezifisch an eine besondere räumliche und polare Struktur des anderen Moleküls bindet und dadurch als komplementär dazu definiert ist. Die Mitglieder des spezifischen Bindungspaares werden auch als Ligand und Rezeptor (Antiligand) bezeichnet. Bei diesen kann es sich um Mitglieder eines immunologischen Paares, wie z. B. Antigen-Antikörper, oder um Operator-Repressor-, Nuklease-Nukleotid-, Biotin-Avidin-, Hormon-Hormonrezeptor-, IgG-Protein A-, DNA-DNA-, DNA-RNA- und ähnliche Paare handeln.

[0070] Ligand – eine beliebige Verbindung, für die es natürlicherweise einen Rezeptor gibt oder für die ein Rezeptor hergestellt werden kann.

[0071] Rezeptor ("Antiligand") – eine beliebige Verbindung oder Zusammensetzung, die zur Erkennung einer besonderen räumlichen und polaren Organisation eines Moleküls, z. B. einer Epitop- oder Determinantenstelle, fähig ist. Zu beispielhaften Rezeptoren zählen natürlich vorkommende und synthetische Rezeptoren, z. B. Thyroxin bindendes Globulin, Antikörper, Enzyme, Fab-Fragmente, Lectine, Nukleinsäuren, Repressoren, Oligonukleotide, Protein A, Komplementkomponente C1q oder DNA bindende Proteine u. ä.

[0072] Kleines organisches Molekül – eine Verbindung mit einem Molekulargewicht von weniger als etwa 1500, vorzugsweise 100 bis 1000, starker bevorzugt 300 bis 600, wie z. B. Biotin, Digoxin, Fluorescein, Rhodamin und andere Farbstoffe, Tetracyclin und andere proteinbindende Moleküle, und Haptene usw. Bei dem kleinen organischen Molekül kann es sich um ein Mittel zur Anbindung einer Nukleotidsequenz an eine Markierung oder einen Träger handeln.

[0073] Träger oder Oberfläche – ein poröses oder nichtporöses wasserunlösliches Material. Der Träger kann hydrophil sein oder hydrophil gemacht werden und umfaßt anorganische Pulver wie z. B. Silika, Magnesiumsulfat und Aluminiumoxid; natürliche Polymermaterialien, besonders Cellulosematerialien und aus Cellulose abgeleitete Materialien, wie z. B. faserhaltige Papiere, z. B. Filterpapier, Chromatographiepapier usw.; synthetische oder modifizierte, natürlich vorkommende Polymere, wie z. B. Nitrocellulose, Celluloseacetat, Polyvinylchlorid, Polyacrylamid, quervernetztes Dextran, Agarose, Polyacrylat, Polyethylen, Polypropylen, Poly(4-methylbuten), Polystyrol, Polymethacrylat, Polyethylenterephthalat, Nylon, Polyvinylbutyrat usw.; entweder allein oder in Verbindung mit anderen Materialien verwendet; als Bioglass erhältliches Glas, Keramik, Metalle u. ä. Natürliche oder synthetische Zusammensetzungen wie z. B. Liposomen, Phospholipidvesikel und Zellen lassen sich ebenfalls einsetzen.

[0074] Die Bindung von sbp-Mitgliedern an einen Träger oder an eine Oberfläche kann mittels allgemein bekannter Techniken, die üblicherweise in der Literatur verfügbar sind, bewerkstelligt werden. Siehe beispielsweise "Immobilized Enzymes", Ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978) und Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970). Die Oberfläche kann in einer Reihe von Formen, wie z. B. Streifen, Stäbchen, Partikel, einschließlich Kügelchen, u. ä., vorliegen.

[0075] Markierung – ein Mitglied eines signalproduzierenden Systems. Zu den Markierungen gehören Reportermoleküle, die sich direkt aufgrund der Erzeugung eines Signals nachweisen lassen, sowie spezifische Bindungspaarmitglieder, die indirekt durch nachfolgende Bindung an ein verwandtes Molekül, das ein Reportermolekül enthält, wie z. B. Oligonukleotidsequenzen, die zur Bindung einer komplementären Sequenz oder eines spezifischen DNA-bindenden Proteins dienen können, nachgewiesen werden können; organische Moleküle, wie z. B. Biotin oder Digoxigenin, die an Streptavidin- bzw. Antidigoxinantikörper binden können; Poly-

peptide; Polysaccharide; u. ä. Im allgemeinen lassen sich alle Reportermoleküle, die nachweisbar sind, einsetzen. Das Reportermolekül kann isotopisch oder nichtisotopisch, üblicherweise nichtisotopisch sein, und es kann sich dabei um einen Katalysator, wie z. B. ein Enzym, Farbstoff, ein Fluoreszenzmolekül, ein Chemilumineszenzmolekül, ein Coenzym, ein Enzymsubstrat, eine radioaktive Gruppe, ein Partikel wie ein Latex- oder Kohlenstoffpartikel, ein Metallsol, ein Kristallit, ein Liposom, eine Zelle usw., handeln, das gegebenenfalls weiter mit einem Farbstoff, Katalysator oder einer anderen nachweisbaren Gruppe u. ä. markiert sein kann. Bei der Reportergruppe kann es sich um eine Fluoreszenzgruppe, wie z. B. Fluorescein, eine Chemilumineszenzgruppe, wie z. B. Luminol, einen Terbiumchelator, wie z. B. N-(Hydroxyethyl)ethyldiamintriessigsäure, der zum Nachweis mittels verzögerter Fluoreszenz fähig ist, u. ä. handeln.

[0076] Die Markierung ist ein Mitglied eines signalproduzierenden Systems und kann ein nachweisbares Signal entweder allein oder zusammen mit anderen Mitgliedern des signalproduzierenden Systems erzeugen. Wie oben erwähnt, kann ein Reportermolekül als Markierung dienen und direkt an eine Nukleotidsequenz gebunden werden. Als Alternative kann das Reportermolekül an eine Nukleotidsequenz binden, indem es an ein zu einem sbp-Mitglied, das eine an eine Nukleotidsequenz gebundene Markierung umfaßt, komplementäres sbp-Mitglied gebunden wird. Beispiele bestimmter Markierungen oder Reportermoleküle sowie deren Nachweis lassen sich im US-Patent 5,595,891 finden.

[0077] Signalproduzierendes System – das signalproduzierende System kann eine oder mehrere Komponenten aufweisen, wobei es sich bei mindestens einer Komponente um die Markierung handelt. Das signalproduzierende System erzeugt ein Signal, das in Beziehung zum Vorhandensein eines Unterschieds zwischen der Zielpolynukleotidsequenz und der Referenzpolynukleotidsequenz steht. Das signalproduzierende System umfaßt alle Reagentien, die zur Erzeugung eines meßbaren Signals benötigt werden. Wenn ein Reportermolekül nicht an eine Nukleotidsequenz konjugiert ist, so ist das Reportermolekül normalerweise an ein zu einem sbp-Mitglied, das an eine Nukleotidsequenz gebunden oder Teil dieser Nukleotidsequenz ist, komplementäres sbp-Mitglied gebunden. Zu weiteren Komponenten des signalproduzierenden Systems lassen sich Substrate, Enhancer-Moleküle, Aktivatoren, Chemilumineszenzverbindungen, Cofaktoren, Inhibitoren, Scavenger-Moleküle, Metallionen, zur Bindung von signalerzeugenden Substanzen benötigte spezifisch bindende Substanzen, Coenzyme, Substanzen die mit Enzymprodukten reagieren, Enzyme und Katalysatoren u. ä. zählen. Das signalproduzierende System liefert ein Signal, das mit externen Mitteln, wie z. B. durch Verwendung elektromagnetischer Strahlung, elektrochemischen Nachweis und wünschenswerterweise durch spektrophotometrischen Nachweis, nachweisbar ist. Das signalproduzierende System ist ausführlicher im US-Patent 5,595,891 beschrieben.

[0078] Hilfsmaterialien – Verschiedene Hilfsmaterialien werden häufig in den im Sinne der vorliegenden Erfindung durchgeführten Verfahren und Tests eingesetzt. So sind beispielsweise im Testmedium normalerweise Puffer ebenso wie Stabilisatoren für das Testmedium und die Testkomponenten vorhanden. Zusätzlich zu diesen Zusatzstoffen können häufig Proteine, wie z. B. Albumine, organische Lösungsmittel, wie z. B. Formamid, quaternäre Ammoniumsalze, Polykationen, wie z. B. Dextransulfat, Tenside, insbesondere nichtionische Tenside, Bindungsverstärker, z. B. Polyalkylenglykole, u. ä. enthalten sein.

Bildung der viersträngigen kreuzförmigen Struktur

[0079] Wie oben erwähnt, betrifft ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zum Nachweis eines Unterschieds zwischen zwei verwandten Nukleinsäuresequenzen, einer Referenzsequenz und einer Zielsequenz. Bei dem Verfahren wird, falls ein Unterschied zwischen den zwei verwandten Nukleinsäuresequenzen vorliegt, ein stabiler quadramolekularer Komplex gebildet, der beide Nukleinsäuresequenzen in doppelsträngiger Form umfaßt. Üblicherweise umfaßt der Komplex eine Holliday-Übergangsstelle. Beide Mitglieder wenigstens eines Paares nicht komplementärer Stränge innerhalb des Komplexes weisen Markierungen auf. Die Vergesellschaftung der Markierungen als Teil des Komplexes wird als Anzeichen für das Vorhandensein des Unterschieds zwischen den zwei verwandten Sequenzen bestimmt. Das Verfahren kann zum Nachweisen des Vorhandenseins einer Mutation einer Zielnukleinsäuresequenz oder zum Nachweisen des Vorhandenseins einer Zielnukleinsäuresequenz eingesetzt werden.

[0080] Ein erfindungsgemäßer Aspekt ist in [Fig. 1A](#) dargestellt. Der quadramolekulare Komplex C umfaßt den partiellen Duplex A' und den partiellen Duplex B'. Die partiellen Duplexe A' und B' sind dahingehend verwandt, daß ihre hybridisierten Anteile mit Ausnahme der Mutation M im partiellen Duplex A' identisch sind. Zusätzlich weist der partielle Duplex A' eine Markierung L1 auf, die gegebenenfalls von der Markierung L2 im partiellen Duplex B' verschieden sein kann. Der Oligonukleotidschwanz A1 des partiellen Duplex A' wird an den entsprechenden Oligonukleotidschwanz B2 des partiellen Duplex B' hybridisiert, wobei in ähnlicher Weise der

Oligonukleotidschwanz A2 des partiellen Duplex A' an den Oligonukleotidschwanz B1 des partiellen Duplex B' hybridisiert wird. Dementsprechend ist der Komplex C quadramolekular und enthält eine vierarmige Übergangsstelle H. Da die Oligonukleotidschwänze A1 und B1 unterschiedlich sind, kann eine Branch Migration nur von diesen Schwänzen entfernt ablaufen und dann ausschließlich, bis die Mutation M erreicht wird, wobei an diesem Punkt die Branch Migration stoppt. Somit ist, wie in [Fig. 1A](#) dargestellt, bei Vorhandensein einer Mutation der Komplex C stabil und lässt sich nachweisen, indem man bestimmt, ob beide Markierungen L1 und L2 miteinander vergesellschaftet worden sind. Die Vergesellschaftung der Markierungen zeigt das Vorhandensein des Komplexes C und somit das Vorhandensein der Mutation M in der Zielnukleinsäuresequenz an. Ist die Mutation M nicht vorhanden (siehe [Fig. 1B](#)), so wird die Branch Migration fortgesetzt, bis ein vollständiger Strang austausch stattgefunden hat und nur die getrennten Duplexe D und E vorliegen, woraufhin kein Komplex C nachgewiesen wird.

[0081] Eine weitere Ausführungsform im Sinne der vorliegenden Erfindung ist in [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) dargestellt. Das Verfahren dient dem Nachweis einer Mutation innerhalb einer Zielnukleinsäuresequenz A, die eine Mutation M enthält. Bei dem Verfahren bildet man aus der Zielsequenz einen mit Schwänzen versehenen partiellen Duplex A', der aus einem Duplex der Zielsequenz, einer Markierung L1 und zwei an einem Ende des Duplex befindlichen nicht komplementären Oligonukleotiden A1 und A2, die jeweils mit einem Strang des Duplex A' verknüpft sind, besteht. Die Oligonukleotide A1 und A2 weisen 8 bis 60 Nukleotide, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide, auf. Der mit Schwänzen versehene partielle Ziel-Duplex wird in Kombination mit einem markierten partiellen, mit Schwänzen versehenen Referenz-Duplex B' ohne die Mutation M bereitgestellt. Der mit Schwänzen versehene partielle Referenz-Duplex B' besteht aus zwei Nukleinsäuresträngen, die bis auf die Mutation M mit den Strängen in A' identisch sind. Dementsprechend weist ein Terminus des mit Schwänzen versehenen partiellen Referenz-Duplex B' jeweils als Endteil jedes Stranges eine Sequenz der nicht komplementären Nukleotide B1 bzw. B2 auf, die zu A2 bzw. A1 komplementär sind. Die Markierungen L1 und L2 liegen in nicht komplementären Strängen der mit Schwänzen versehenen partiellen Ziel- und Referenz-Duplexe (A' und B') vor. L1 und L2 können gleich oder verschieden sein.

[0082] Noch auf [Fig. 2A](#) bezogen, wird ein Komplex C wie oben für [Fig. 1A](#) beschrieben gebildet. Der Oligonukleotidschwanz A1 von A' wird mit dem entsprechenden Oligonukleotidschwanz B2 von B' hybridisiert, wobei in ähnlicher Weise der Oligonukleotidschwanz A2 von A' an den Oligonukleotidschwanz B1 von B' hybridisiert wird. Da die Oligonukleotidschwänze A1 und B1 unterschiedlich sind, kann eine Branch Migration nur von diesen Schwänzen entfernt ablaufen und dann ausschließlich, bis die Mutation M erreicht ist, wobei an diesem Punkt die Branch Migration stoppt. Somit ist bei Vorhandensein einer Mutation der Komplex C stabil und lässt sich nachweisen, indem man bestimmt, ob beide Markierungen L1 und L2 miteinander vergesellschaftet worden sind. Die Vergesellschaftung der Markierungen zeigt das Vorhandensein des Komplexes C an. Die Ausbildung des Komplexes C steht direkt mit dem Vorhandensein der Mutation in Verbindung. Ist, unter Bezugnahme auf [Fig. 2B](#), in der Zielnukleinsäure A keine Mutation M vorhanden, so wird die Branch Migration fortgesetzt, bis ein vollständiger Strangaustausch stattgefunden hat und nur die getrennten Duplexe D und E vorhanden sind. In diesem Fall wird kein Komplex C nachgewiesen.

Herstellung von mit Schwänzen versehenen partiellen Zielduplexen mittels PCR und Kettenverlängerung

Amplifikation der Zielsequenz mittels Polymerasekettenreaktion.

[0083] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist in [Fig. 3](#) gezeigt, in der in beispielhafter Weise und ohne darauf beschränkt zu sein, die Herstellung des mit Schwänzen versehenen partiellen Zielduplex A' aus dem die Mutation M aufweisenden Zielnukleinsäure-Duplex A sowie die Herstellung des mit Schwänzen versehenen partiellen Referenz-Duplex B' aus dem Referenznukleinsäure-Duplex B dargestellt ist. In der Ausführungsform der [Fig. 3](#) wird A durch die Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der Primer P1 und P2 unter Erhalt eines Amplifikats AA amplifiziert. Der Primer P2 enthält eine Markierung L1, wobei der Primer P1 einen 3'-terminalen Anteil Pa, der mit der Zielsequenz hybridisieren kann, sowie einen 5'-terminalen Anteil B1, der nicht mit der Zielsequenz hybridisieren kann, umfasst. Die Amplifikation wird in Gegenwart einer Nukleotidpolymerase sowie von Nukleosidtriphosphaten unter Verwendung eines Temperaturkreislaufs durchgeführt. Das Amplifikat AA weist zwei Stränge auf, einen von Primer P2 abgeleiteten markierten Strang und einen von Primer P1 abgeleiteten nicht markierten Strang. Der nicht markierte Strang weist einen 5'-terminalen Anteil B1 des Primers P1 und der markierte Strang einen entsprechenden 3'-terminalen Anteil A2, bei dem es sich um das Komplement von B1 handelt, auf.

Kettenverlängerung AA (Zielsequenz)

[0084] Wiederum unter Bezugnahme auf [Fig. 3](#) wird dann eine Kettenverlängerung des Primers P3 entlang des markierten Strangs des Amplifikats AA durchgeführt, so daß der mit Schwänzen versehenen partielle Ziel-Duplex A' erhalten wird. Primer P3 umfaßt dabei einen 3'-terminalen Anteil Pa, der mit Pa des Primers P1 identisch ist und an den markierten Strang von AA bindet. P3 weist einen 5'-terminalen Anteil A1 auf, der zum Amplifikat AA nicht komplementär ist. Die Kettenverlängerung wird in Gegenwart einer Nukleotidpolymerase sowie von Nukleosidtriphosphaten unter entsprechenden Temperaturbedingungen durchgeführt, so daß lediglich der komplementäre Strang des markierten Strangs und keine Kopie hergestellt wird. In dieser besonderen Ausführungsform wird dies durch Abtrennen der Primer P2 und P1 vor der Verlängerung von P3 auf eine wie nachfolgend beschriebene Weise erreicht. Der komplementäre nichtmarkierte Strang des mit Schwänzen versehenen partiellen Ziel-Duplex A' weist einen 5'-terminalen Anteil A1 auf, der zum 3'-terminalen Anteil A2 des markierten Strangs von A' nicht komplementär ist. Ebenso ist der nichtmarkierte Strang aus dem Amplifikationsansatz noch vorhanden, außer wenn die PCR-Reaktion unter Erhalt eines Überschusses des markierten Strangs durchgeführt wird. Dieser Strang stellt während der Kettenverlängerung zur Bildung des partiellen Duplex A' keine Matrize dar.

Amplifikation und Kettenverlängerung der Referenzsequenz

[0085] In der Ausführungsform der [Fig. 3](#) liegt die Referenznukleinsäuresequenz B in einem separaten Medium vor; zur Herstellung des Amplifikats BB werden die Primer P2 und P3 in einer Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Die Amplifikation wird unter Verwendung eines Temperaturkreislaufs unter den unten beschriebenen Bedingungen in Gegenwart einer Nukleotidpolymerase sowie von Nukleosidtriphosphaten durchgeführt. B umfaßt eine mit Ausnahme der Mutation M mit A identische Sequenz. Im allgemeinen enthält der für diese Amplifikation verwendete Primer P2 eine Markierung L2, die mit L1 identisch oder davon verschieden sein kann. Das Amplifikat BB weist zwei Stränge auf, einen von Primer P2 abgeleiteten markierten Strang sowie einen von Primer P3 abgeleiteten nichtmarkierten Strang. Der nichtmarkierte Strang weist einen terminalen Anteil A1 des Primers P3 und der markierte Strang einen entsprechenden terminalen Anteil B2, bei dem es sich um das Komplement von A1 handelt, auf.

[0086] Es wird eine Kettenverlängerung des Primers P1 entlang dem markierten Strang des Amplifikats BB unter den oben für die Kettenverlängerung des Primers P3 entlang des markierten Strangs in Duplex AA angegebenen Bedingungen durchgeführt, so daß der mit Schwänzen versehene partielle Referenzduplex B' erhalten wird. Wie oben erwähnt, umfaßt der Primer P1 einen Anteil Pa, der an den markierten Strang von BB bindet, sowie einen Anteil B1, der nicht an das Amplifikat BB bindet. Die Kettenverlängerung wird in Gegenwart einer Nukleotidpolymerase sowie von Nukleosidtriphosphaten unter entsprechenden Temperaturbedingungen durchgeführt, so daß lediglich das Komplement des markierten Strangs und keine Kopie hergestellt wird. Der verlängerte Primer P1 weist einen 5'-terminalen Anteil B1 auf, der zum terminalen Anteil B2 des markierten Strangs von B' nicht komplementär ist. Wie man sehen kann, sind A' und B' dahingehend verwandt, daß ihre markierten Stränge jeweils mit Ausnahme der Mutation M zu dem nichtmarkierten Strang des jeweils anderen Duplexes komplementär sind.

Reaktionsbedingungen für PCR und Kettenverlängerung

[0087] Die obige Amplifikation wird mittels Polymerasekettenreaktion durchgeführt, wobei zur Erzielung der Denaturierung der Duplexe, des Annealing der Oligonukleotidprimer und der Primerverlängerung durch eine thermophile matrizenabhängige Nukleotidpolymerase ein Temperaturkreislauf zur Anwendung kommt. Bei der Ausführung der PCR-Amplifikation von Nukleinsäuren wird das Medium einer Kreisführung zwischen zwei bis drei Temperaturen unterworfen. Die Temperaturen für das vorliegende Verfahren zur Amplifikation mittels PCR reichen im allgemeinen von etwa 50°C bis 100°C, noch üblicher von etwa 60°C bis 95°C. Dabei werden für die Hybridisierungsschritte relativ niedrige Temperaturen von etwa 50°C bis 80°C eingesetzt, während die Denaturierung bei einer Temperatur von etwa 80°C bis 100°C und die Verlängerung bei einer Temperatur von etwa 70°C bis 80°C, üblicherweise von etwa 72°C bis 74°C, durchgeführt wird. Die Amplifikation wird über einen ausreichend langen Zeitraum durchgeführt, so daß eine gewünschte Anzahl an Kopien für eine genaue Bestimmung, ob zwei verwandte Nukleinsäuren einen Unterschied aufweisen oder nicht, erzielt wird. Im allgemeinen reicht der Zeitraum zur Durchführung des Verfahrens von etwa 10 Sekunden bis etwa 10 Minuten pro Zyklus, wobei eine beliebige Anzahl von Zyklen von 1 bis immerhin 60 oder mehr, üblicherweise 10 bis 50, häufig 20 bis 45, verwendet werden kann. Aus Gründen der Zweckmäßigkeit ist es üblicherweise wünschenswert, den Zeitraum und die Anzahl an Zyklen zu minimieren. Im allgemeinen läßt sich der Zeitraum für einen gegebenen Amplifikationsgrad minimieren, indem beispielsweise Nukleosidtriphosphatkonzentrationen ausgewählt

werden, die zur Sättigung der Polynukleotidpolymerase ausreichen, indem die Konzentrationen der Polynukleotidpolymerase und des Polynukleotidprimers erhöht werden und indem ein Reaktionsbehälter, der für eine schnelle thermische Äquilibrierung sorgt, verwendet wird. Im allgemeinen liegt der Zeitraum zur Durchführung der Amplifikation im erfindungsgemäßen Verfahren bei etwa 5 bis 200 Minuten.

[0088] In einem Beispiel eines typischen Temperaturkreislaufs, wie er verwendet werden kann, wird das Medium mehreren Temperaturkreisläufen aus Erwärmung auf 90°C bis 100°C für 2 Sekunden bis 3 Minuten und Abkühlen auf 65°C bis 80°C über einen Zeitraum von 10 Sekunden bis 3 Minuten unterworfen.

[0089] Die Bedingungen zur Durchführung der Kettenverlängerung im Sinne der vorliegenden Erfindung sind ähnlich wie die für die oben beschriebene Amplifikation. Im allgemeinen wird das Medium auf eine Temperatur von 90°C bis 100°C über einen Zeitraum von 2 bis 500 Sekunden erwärmt und danach über einen Zeitraum von 5 bis 2000 Sekunden auf 20°C bis 80°C abgekühlt und anschließend über einen Zeitraum von 5 bis 2000 Sekunden auf 40°C bis 80°C erwärmt. Vorzugsweise wird das Medium einer Erwärmung bei 90°C bis 100°C über einen Zeitraum von 10 Sekunden bis 3 Minuten, einem Abkühlen auf 50°C bis 65°C über einen Zeitraum von 10 Sekunden bis 2 Minuten sowie einem Erwärmen auf 70°C bis 80°C über einen Zeitraum von 30 Sekunden bis 5 Minuten ausgesetzt.

[0090] Bei der Durchführung des vorliegenden Verfahrens wird ein wässriges Medium eingesetzt. Andere polare Cosolventien können ebenfalls eingesetzt werden, und zwar üblicherweise oxygenierte organische Lösungsmittel mit 1-6, noch üblicher 1-4, Kohlenstoffatomen, einschließlich Alkoholen, Ethern u. ä. Bei ihrer Verwendung sind diese Cosolventien üblicherweise mit weniger als etwa 70 Gewichtsprozent, noch üblicher weniger als etwa 30 Gewichtsprozent, vorhanden.

[0091] Der pH-Wert für das Medium liegt üblicherweise im Bereich von etwa 4,5 bis 9,5, noch üblicher im Bereich von etwa 5,5-8,5 und vorzugsweise im Bereich von etwa 6-8, üblicherweise bei etwa 8 (bei Raumtemperatur). Im allgemeinen werden für die Amplifikation der pH-Wert und die Temperatur so gewählt und gegebenenfalls variiert, daß dadurch entweder gleichzeitig oder nacheinander die Dissoziation eventuell vorhandener interner hybridisierter Sequenzen, die Hybridisierung des Oligonukleotidprimers mit der Zielnukleinsäuresequenz, die Verlängerung des Primers sowie die Dissoziation des verlängerten Primers ausgelöst werden. Zur Erreichung des gewünschten pH-Werts und Beibehaltung desselben während der Bestimmung können verschiedene Puffer verwendet werden. Zu den beispielhaften Puffern gehören Borat, Phosphat, Carbonat, Tris, Barbitat u. ä. Der jeweilige eingesetzte Puffer ist für diese Erfindung nicht kritisch, doch kann in einzelnen Verfahren ein Puffer gegenüber einem anderen bevorzugt sein. Der in dem vorliegenden Verfahren verwendete Puffer enthält normalerweise ein Magnesiumion (Mg^{2+}), das gewöhnlich mit vielen bekannten Polymerasen verwendet wird, obwohl andere Metallionen, wie z. B. Mangan, auch verwendet worden sind. Vorzugsweise wird das Magnesiumion in einer Konzentration von etwa 1 bis 20 mM, vorzugsweise von etwa 1,5 bis 10 mM, besonders bevorzugt 2-4 mM, verwendet. Das Magnesium kann in Form eines Salzes, beispielsweise Magnesiumchlorid u. ä., bereitgestellt werden. Der Hauptgesichtspunkt hier ist, daß das Metallion die Unterscheidung zwischen verschiedenen Nukleinsäuren im Sinne der vorliegenden Erfindung gestattet.

[0092] Die Konzentration der Nukleotidpolymerase wird üblicherweise empirisch bestimmt. Vorzugsweise wird eine Konzentration verwendet, die ausreicht, so daß ein weiterer Anstieg der Konzentration die Zeit für die Amplifikation nicht um mehr als das 5fache, vorzugsweise 2fache, verkürzt. Den hauptsächlich limitierenden Faktor stellen im allgemeinen die Kosten für das Reagens dar.

[0093] Die Menge der Zielnukleinsäuresequenzen, die im Sinne der vorliegenden Erfindung untersucht werden soll, kann lediglich aus ein oder zwei Molekülen in einer Probe bestehen. Die Primingspezifität der zum Nachweis eines Unterschieds zwischen zwei verwandten Nukleinsäuren verwendeten Primer und anderer Faktoren wird im Hinblick auf die Notwendigkeit, eine erste Amplifikation der Zielnukleinsäure durchzuführen, betrachtet. Es liegt im Rahmen der vorliegenden Erfindung zum Nachweis einer Mutation, eine vorläufige Amplifikationsreaktion zur Erhöhung der Anzahl der Moleküle der Zielnukleinsäuresequenz um einen Faktor von 10^2 oder mehr durchzuführen. Die Amplifikation läßt sich mit einem beliebigen zweckmäßigen Verfahren, wie z. B. PCR, Amplifikation mit einem Einzelprimer, NASBA usw. durchführen, doch wird vorzugsweise mittels PCR durchgeführt, wie unten beschrieben.

[0094] Die Menge der einer nachfolgenden Amplifikation unter Verwendung von Primern im Sinne der vorliegenden Erfindung unterworfenen Zielnukleinsäuresequenz kann von etwa 1 bis 10^{10} , noch üblicher von etwa 10^3 bis 10^8 , Moleküle, vorzugsweise wenigstens 10^{-21} M, im Medium variieren und kann 10^{-10} bis 10^{-19} M, noch üblicher 10^{-14} bis 10^{-19} M, betragen.

[0095] Wird eine erste Amplifikation der Zielnukleinsäuresequenz zur Erhöhung der Anzahl der Moleküle durchgeführt, so kann es wünschenswert, doch nicht notwendig sein, die in der ersten Amplifikation verwendeten Primer zu entfernen, zerstören oder inaktivieren, je nach der Art des verwendeten Protokolls. Dementsprechend sollte bei der Durchführung des vorliegenden Verfahrens unter Verwendung einer schrittweisen Zugabe von Reagentien für jede getrennte Reaktion, wie z. B. in der Ausführungsform der [Fig. 3](#), der Primer P1 vor der Verlängerung des Primers P3 entfernt werden. Andererseits ist es in der unten beschriebenen Ausführungsform z. B., bei der die Reaktionen gleichzeitig durchgeführt werden, nicht notwendig, überhaupt einen der Primer abzutrennen. Ein Beispiel eines Ansatzes zur Zerstörung der Primer, das der Veranschaulichung dient, ohne darauf beschränkt zu sein, besteht darin, daß man ein Enzym einsetzt, das lediglich einzelsträngige DNA verdauen kann. So kann beispielsweise ein Enzym eingesetzt werden, das sowohl 5'-nach-3'- und 3'-nach-5'-Exonukleaseaktivitäten aufweist, wie z. B. *exo VII*. Das Medium wird bei einer Temperatur und über einen Zeitraum inkubiert, die bzw. der zum Verdauen der Primer ausreicht. Üblicherweise reicht eine Inkubation bei 20°C bis 40°C über einen Zeitraum von 10 bis 60 Minuten für ein Enzym mit der obigen Aktivität aus. Das Medium wird danach zur Inaktivierung des Enzyms behandelt, was sich beispielsweise durch Erwärmen über einen für die Erzielung einer Inaktivierung ausreichenden Zeitraum bewerkstelligen läßt. Die Inaktivierung des Enzyms läßt sich üblicherweise nach Erwärmen des Mediums bei 90°C bis 100°C über 0,5 bis 30 Minuten realisieren. Dem Fachmann sind weitere Verfahren zur Abtrennung der Primer bekannt. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß eine Abtrennung solcher Primer zur Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren nicht notwendig ist.

[0096] Die Menge des bzw. der in der Amplifikationsreaktion der vorliegenden Erfindung verwendeten Oligonukleotidprimers bzw. -primer ist mindestens so groß wie die Anzahl der gewünschten Kopien und liegt üblicherweise bei 10^{-9} bis 10^{-3} M, vorzugsweise 10^{-7} bis 10^{-4} M. Vorzugsweise liegt die Konzentration des Oligonukleotidprimers bzw. der Oligonukleotidprimer wesentlich oberhalb, vorzugsweise wenigstens 100fach oberhalb, noch bevorzugter wenigstens 1000fach oberhalb der Konzentration der Zielnukleinsäuresequenz. Die Konzentration der Nukleosidtriphosphate im Medium kann stark schwanken. Vorzugsweise liegen diese Reagentien in einem Überschuß sowohl für die Amplifikation als auch die Kettenverlängerung vor. Die Nukleosidtriphosphate liegen üblicherweise in einer Konzentration von 10^{-6} bis 10^{-2} M, vorzugsweise 10^{-5} bis 10^{-3} M vor.

Komplexbildung und Nachweis der Hemmung von Branch Migration

[0097] Wie in [Fig. 3](#) gezeigt, läßt man nach der Kettenverlängerung die Stränge der partiellen Duplexe A' und B' binden und eine Branch Migration durchführen, indem die die partiellen Duplexe A' und B' enthaltenden Ansätze kombiniert werden und die Kombination bei einer Temperatur von 30°C bis 75°C, vorzugsweise 60°C bis 70°C, mindestens eine Minute, vorzugsweise 20 bis 120 Minuten, inkubiert wird, wobei der Komplex C, wie oben für die [Fig. 1](#) und [2](#) beschrieben, gebildet wird. Der Oligonukleotidschwanz A1 von A' wird an den entsprechenden Oligonukleotidschwanz B2 von B' hybridisiert, wobei in ähnlicher Weise der Oligonukleotidschwanz A2 von A' an den Oligonukleotidschwanz B1 von B' hybridisiert wird. Die Branch Migration innerhalb des Komplexes C wird unter den obigen Temperaturbedingungen fortgesetzt, wobei sich der Komplex in die Duplexe D und E trennt, außer wenn eine Mutation M vorhanden ist, woraufhin die Branch Migration und Strangdissoziation gehemmt wird. Der Komplex C wird dann nachgewiesen, wobei dessen Vorhandensein direkt mit dem Vorhandensein der Mutation M in Verbindung steht.

[0098] In der in [Fig. 3](#) dargestellten Ausführungsform werden die Markierungen L1 und L2 in die partiellen Duplexe, die den Komplex C umfassen, eingebaut und stellen dabei ein Mittel zum Nachweis des Komplexes C bereit. Dies erfolgt in beispielhafter Weise, ohne darauf beschränkt zu sein, und es können andere zweckmäßige Verfahren zum Nachweis des Komplexes C eingesetzt werden, wie z. B. die Verwendung eines Rezeptors für den Komplex. Bei diesem Ansatz wird nur eine Markierung, L1 oder L2, benötigt, welche ein sbp-Mitglied oder ein Reportermolekül umfaßt. Ein Rezeptor für das sbp-Mitglied sowie ein Rezeptor, der an den Komplex C aufgrund eines von L1 oder L2 verschiedenen Merkmals binden kann, können beide an den Komplex C binden und stellen dabei ein Mittel zum Nachweis bereit.

Homogene Amplifikation und Kettenverlängerung, Komplexbildung und Nachweis.

[0099] In der Ausführungsform der [Fig. 3](#) werden die Reaktionen unabhängig unter Erhalt von mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexen A' bzw. B' durchgeführt. Danach lassen sich die Reaktionsgemische kombinieren, um den jeweiligen Strängen von A' bzw. B' die Bindung aneinander unter Bildung des Komplexes C zu gestatten.

[0100] Überraschenderweise wurde jedoch festgestellt, daß die Reaktionen der vorliegenden Erfindung im

gleichen Reaktionsmedium durchgeführt und daß viele oder alle Reaktionen gleichzeitig durchgeführt werden können. Dies ist ein besonders attraktives Merkmal der vorliegenden Erfindung. Bei diesem Ansatz wird eine Kombination in einem einzigen Medium bereitgestellt. Die Kombination umfaßt (i) eine Probe mit einer Zielnukleinsäuresequenz, von der vermutet wird, daß sie eine Mutation aufweist, (ii) eine Referenznukleinsäuresequenz, die getrennt zugegeben werden kann, falls bekannt ist, daß sie nicht in der Probe vorhanden ist, und die der Zielnukleinsäure ohne die Mutation entspricht, wobei es sich, wie oben erläutert, um die Wildtyp-Nukleinsäure handeln kann, (iii) eine Nukleotidpolymerase, (iv) Nukleosidtriphosphate und (v) die Primer P1, P2 und P3, wobei P2 den mit L1 markierten Primer P2 und den mit L2 markierten Primer P2 umfassen kann oder P2 nicht markiert sein kann und die Primer P1 und P3 mit L1 bzw. L2 markiert sein können. Das Medium wird dann mehreren Temperaturkreisläufen aus Erwärmen und Abkühlen unterzogen, um so alle oben für [Fig. 3](#) beschriebenen Amplifikations- und Kettenverlängerungsreaktionen gleichzeitig zu erzielen, außer daß bei dieser Ausführungsform keine Notwendigkeit besteht, die Herstellung von Kopien eines der verlängerten Primer zu vermeiden. Vorzugsweise umfaßt in dieser Ausführungsform jeder Kreislauf das Erwärmen des Mediums bei 90°C bis 100°C für 2 Sekunden bis 3 Minuten, das Abkühlen des Mediums auf 60°C bis 70°C über einen Zeitraum von 8 Sekunden bis 3 Minuten sowie das Erwärmen des Mediums bei 70°C bis 75°C über einen Zeitraum von 10 Sekunden bis 3 Minuten, obwohl je nach Länge der Primersequenzen unterschiedliche Temperaturen erforderlich sein können. Im Anschluß an die obigen Temperaturkreisläufe wird das Medium über einen Zeitraum erwärmt, der ausreicht, um doppelsträngige Moleküle zu denaturieren, vorzugsweise 10 Sekunden bis 2 Minuten bei 90°C bis 99°C, und dann auf 40°C bis 80°C, vorzugsweise 60°C bis 70°C abgekühlt und bei dieser Temperatur mindestens eine Minute, vorzugsweise 20 Minuten bis 2 Stunden, gehalten.

[0101] Nach dem Abkühlen des Mediums werden alle möglichen partiellen und vollständigen Duplexe gebildet, die sich aus 1) Einzelsträngen, die eine beliebige Kombination aus Referenz- oder Mutanten-Sequenzen und den 5'-Enden A2 und B2 aufweisen, und 2) Einzelsträngen, die eine beliebige Kombination aus Referenz- oder Mutanten-Sequenzen und den 5'-Enden A1 oder B1 aufweisen, bilden können, wobei die Stränge weiterhin mit entweder L1 oder L2 markiert werden können, wenn L1 und L2 verschieden sind. Unter den partiellen Duplexen, die gebildet werden, sind die mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexe A' und B', die aneinander unter Ausbildung des Komplexes C, der nicht in die Duplexe D und E dissoziiert, wenn eine Mutation vorhanden ist, binden können. Eine Bestimmung des Vorhandenseins eines solchen Komplexes wird danach durchgeführt, um das Vorhandensein einer Mutation in der Zielnukleinsäuresequenz zu etablieren. Werden die Primer P1 und P3 anstelle des Primers P2 markiert, so werden die Markierungen L1 und L2 in den partiellen Duplexen A' und B' an die Schwänze A1 bzw. B1 gebunden, was dennoch für den Nachweis des Komplexes C sorgt, wenn eine Mutation vorhanden ist.

[0102] Während alle Schritte dieser Bestimmung vorzugsweise im gleichen Medium wie dem, das für die obigen Reaktionen verwendet wurde, durchgeführt werden, können einige oder alle Schritte vollständig oder teilweise sequentiell in unterschiedlichen Medien durchgeführt werden. So läßt sich beispielsweise die PCR-Amplifikation der Zielsequenz A und der Referenzsequenz B, bei der jeweils die Primer P1, P2 und P3 verwendet werden, in getrennten Lösungen ausführen. Die Lösung läßt sich dann kombinieren, auf 90°C bis 100°C zur Denaturierung der Stränge erwärmen und danach wie zuvor bei 40°C bis 80°C inkubieren, um die Ausbildung von Duplexen und des Komplexes C, wenn eine Mutation vorhanden ist, zu gestatten. Der Nachweis des Komplexes C läßt sich dann direkt in den kombinierten Lösungen durchführen oder indem zum Nachweis benötigte Reagentien zugegeben werden oder der Komplex C beispielsweise an einer festen Oberfläche getrennt und sein Vorhandensein auf der Oberfläche nachgewiesen wird.

Erste Amplifikation von Ziel- oder Referenzsequenzen

[0103] Wird zum Nachweis eines Unterschieds zwischen einer Ziel- und Referenznukleinsäure ein einziges Reaktionsmedium verwendet, so kann es notwendig sein, eine erste Amplifikation auszuführen, um die Konzentration der Zielnukleinsäuremoleküle und der Referenznukleinsäuremoleküle im Verhältnis zu der Konzentration anderer Nukleinsäuren, die in der Probe vorhanden sein können, zu erhöhen. Unter Bezugnahme auf [Fig. 4](#) läßt sich eine solche erste Amplifikation unter Verwendung zweier zusätzlicher Primer PX1 und PX2 durchführen, die auf den Ziel- und Referenznukleinsäuren an Stellen binden, die sich stromaufwärts von der P2-Bindungsstelle bzw. der P1- und P3-Bindungsstelle befinden. Diese erste Amplifikation läßt sich im gleichen Medium wie die obigen Reaktionen durchführen. Somit können die Zielsequenz TS, die Primer PX1, PX2, P1, P2 und P3 alle mit den Ziel- und Referenzsequenzen vor dem Temperaturkreislauf kombiniert werden, wie in [Fig. 4](#) dargestellt ist. Zwei Primer PX1 und PX2 werden eingesetzt und binden an Stellen auf TS, die sich oberhalb der Stellen befinden, an die die Primer P1 bzw. P2 binden. Diese Stellen sind in [Fig. 4](#) mit Pa' bzw. P2' bezeichnet. Die Stellen, an die die Primer PX1 und PX2 binden, liegen im allgemeinen innerhalb von 0 bis 500 Nukleotiden, vorzugsweise von etwa 0 bis 200 Nukleotiden, Entfernung von Pa' und P2' und können teil-

weise oder vollständig mit Pa' und P2' überlappen. PX1 und PX2 werden entlang ihrer entsprechenden Stränge verlängert. Die Amplifikation produziert mehrere Kopien der Zielnukleinsäuresequenz A. Nach der entsprechenden Denaturierung läßt man die Primer P1 und P2 eine Annealingreaktion untergehen und entlang der jeweiligen Stränge von A unter Erhalt mehrerer Kopien von AA verlängern. Das Obige findet auch für die Referenz-DNA unter Erhalt mehrerer Kopien der Referenznukleinsäure B statt, die weiter mit den Primern P2 und P3 unter Erhalt mehrerer Kopien von BB amplifiziert wird.

[0104] Vorzugsweise werden bei einer ersten Amplifikation unter Verwendung der Primer PX1 und PX2 diese Primer so konstruiert, daß sie ein Annealing an die Ziel- und die Referenznukleinsäuren bei einer höheren Temperatur als der für die Primer P1, P2 bzw. P3 durchlaufen. Dies wird üblicherweise dadurch erzielt, daß man PX1- und PX2-Sequenzen auswählt, die länger oder GC-reicher sind als P2 und die Pa-Bindungssequenz in P1 und P3. Die erste Amplifikation wird dann bei Temperaturen durchgeführt, die die für die Bindung von P1, P2 und P3 erforderliche Temperatur überschreiten, wobei die nachfolgenden Amplifikationen zur Bildung von AA und BB bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt werden, die die Bindung von P1, P2 und P3 gestatten. Es ist dann möglich, den Unterschied zwischen den Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen durch Kombination der Sequenzen, der Primer PX1, PX2, P1, P2 und P3, wobei P2 oder P1 und P3 markiert sind, der Polynukleotidpolymerase, der Nukleotidtriphosphate und gegebenenfalls der zum Nachweis des Komplexes C benötigten Reagentien in einem einzigen Medium nachzuweisen. Die erste Amplifikation wird bei Temperaturen durchgeführt, die die Bindung von PX1 und PX2, aber nicht von P1, P2 und P3 an die Zielsequenz gestatten, woraufhin die Sequenzen A und B gebildet werden. Der Temperaturkreislauf wird dann bei einer niedrigeren Temperatur durchgeführt, bei der P1, P2 und P3 binden und verlängert werden können. Das Gemisch wird dann auf 90°C bis 100°C erwärmt, um die Duplexe zu denaturieren, und abgekühlt, um die Ausbildung der partiellen Duplexe AA und BB und ihre Hybridisierung unter Bildung des Komplexes C zu gestatten. Der Komplex läßt sich dann direkt nachweisen, falls alle notwendigen Reagentien vorhanden sind, oder der Nachweis läßt sich in einem getrennten Schritt durchführen. Die Art der Primer PX1 und PX2 wird ebenso wie die geeignete Temperatur zur Bindung dieser Primer an die Zielsequenz im allgemeinen empirisch bestimmt, wobei auf die Nukleotidzusammensetzung der Primer P1, P2 und P3 Bezug genommen wird.

[0105] Die Reihenfolge der Kombination der verschiedenen Reagentien kann variieren. Die Zielnukleinsäure kann mit einer zuvor hergestellten Kombination aus den Primern PX1, nicht markiertem P2, markiertem P2 und P1 und P3, Nukleosidtriphosphaten und Nukleotidpolymerase kombiniert werden. Als Alternative läßt sich die Zielnukleinsäure beispielsweise nur mit den Primern PX1 und nicht markiertem P2 zusammen mit den Nukleosidtriphosphaten und der Polymerase kombinieren. Nach Durchführung des Temperaturkreislaufs kann das Reaktionsgemisch mit den restlichen Primern P1 und markiertem P2 kombiniert werden.

Einführung von P1-, P2- und P3-Priming-Stellen auf den Ziel- und Referenzsequenzen

[0106] In einem weiteren Ansatz im Sinne der vorliegenden Erfindung können Primingstellen für die Primer P1, P2 und P3 in die Ziel- und Referenzsequenzen eingeführt werden, wobei sie üblicherweise die Ziel- oder Referenzsequenz flankieren. Man führt einen PCR-Schritt unter Verwendung von Adapter-Primern durch, die aus zwei Bereichen bestehen: einem 3'-proximalen Bereich, der an eine bestimmte Primingstelle auf der Ziel- oder Referenznukleinsäuresequenz hybridisieren kann, und einem 5'-proximalen Bereich, der nicht an die Ziel- oder Referenznukleinsäuresequenz hybridisieren kann und im wesentlichen die gleiche Sequenz wie der 3'-proximale Bereich eines in oben beschriebenen, beim Nachweis von Unterschieden zwischen zwei verwandten Nukleinsäuren eingesetzten Amplifikationen verwendeten Primers aufweist. „Im wesentlichen die gleiche Sequenz“ bedeutet, daß ein in einer Amplifikation unter Verwendung der Adapter-Primer hergestelltes Verlängerungsprodukt eine Primingstelle enthält, an die ein solcher in oben beschriebenen, beim Nachweis von Unterschieden zwischen zwei verwandten Nukleinsäuren eingesetzten Amplifikationen verwendeter Primer hybridisieren kann. Solche Adapter-Primer werden zur Herstellung von Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen mit darin eingebauten spezifischen, universellen Primingstellen verwendet, wobei diese Sequenzen wiederum als Matrizen für einen universellen Satz von Primern verwendet werden, die in den oben beschriebenen Amplifikationen im Sinne des vorliegenden Verfahrens zum Nachweis von Unterschieden zwischen zwei verwandten Nukleinsäuresequenzen verwendet werden.

[0107] Unter Bezugnahme auf [Fig. 5](#) wird vor den Amplifikationen zur Bildung von AA und BB eine Amplifikation ausgeführt, wobei zwei zusätzliche Primer PX1i und PX2i verwendet werden, die an Stellen auf den Ziel- und Referenznukleinsäuren binden. Diese Amplifikation kann in den gleichen oder in verschiedenen Reaktionsbehältern oder in von dem Medium, in dem die Amplifikationen zur Bildung von AA und BB durchgeführt werden, verschiedenen Reaktionsmedien durchgeführt werden. Beispielsweise werden die Primer PX1i und PX2i mit den Ziel- und Referenzsequenzen entweder im gleichen oder in einem anderen Reaktionsmedium

kombiniert und dem Temperaturkreislauf ausgesetzt. In [Fig. 5](#) ist die eine erste Amplifikation für einen mutanten DNA-Analyten TS und eine entsprechende Referenznukleinsäure RS dargestellt. Dabei werden zwei Primer PX1i und PX2i eingesetzt und binden an die jeweiligen Primingstellen auf TS und RS. PX1i weist einen 3'-terminalen Anteil, der mit der Ziel- und Referenzsequenz hybridisieren kann, sowie einen 5'-terminalen Anteil Pa, der nicht mit der Ziel- oder Referenzsequenz hybridisieren kann, auf. PX2i weist einen 3'-terminalen Anteil, der mit der Ziel- und Referenzsequenz hybridisieren kann, sowie einen 5'-terminalen Anteil P2, der nicht mit der Ziel- oder Referenzsequenz hybridisieren kann, auf. PX1i und PX2i werden entlang ihrer jeweiligen Stränge verlängert. Die Amplifikation produziert mehrere Kopien der verlängerten Primer, die den relevanten Anteil der Zielnukleinsäuresequenz und der Referenznukleinsäuresequenz, jeweils flankiert von den Primingstellen Pa und P2, umfassen und mit A bzw. B bezeichnet werden.

[0108] Die Reaktionsprodukte aus dieser ersten Amplifikation werden mit den Primern P1, P2 und P3, wie in [Fig. 3](#) gezeigt, kombiniert. Nach dem Annealing an die jeweiligen Stränge von A werden die Primer P1 und P2 entlang dieser Stränge unter Erhalt mehrerer Kopien von AA verlängert. Das Obige erfolgt ebenso für die Referenz-DNA unter Erhalt mehrerer Kopien der Referenznukleinsäure B, die weiter mit den Primern P2 und P3 unter Erhalt mehrerer Kopien von BB amplifiziert wird. Die restlichen stattfindenden Reaktionen erfolgen wie oben beschrieben und ergeben A' und B', die danach den Komplex C bilden können.

[0109] Die Ausführungsform der [Fig. 5](#) gestattet die Verwendung der universellen Primer P1, P2 und P3. Dies bedeutet, daß ein Satz von Primern zur Durchführung der Reaktionen unter Erhalt des Komplexes C für die Analyse einer großen Anzahl von Zielnukleinsäuresequenzen und entsprechenden Referenznukleinsäuresequenzen verwendet werden kann. Bei einem solchen Ansatz werden die Primer PX1i und PX2i, die zur Einführung von Primingstellen für die universellen Primer P1, P2 und P3 in die Ziel- und Referenzsequenzen konstruiert werden, verwendet. Die Beziehung von PX1i und PX2i besteht darin, daß sie jeweils einen 5'-terminalen Anteil enthalten, der je nachdem dem Primingsequenzanteil, d. h. dem Anteil der Zielsequenz, an den der Primer hybridisiert, am 3'-Ende der Primer P1, P2 oder P3 entspricht. In der in [Fig. 5](#) gezeigten Ausführungsform enthält PX1i den 5'-terminalen Anteil P2, was zur Einführung der Primingstelle P2' in TS führt, an die P2 hybridisieren kann. Der Primer PX2i enthält den 5'-terminalen Anteil Pa, was zur Einführung der Primingstelle Pa' in TS führt, an die Pa der Primer P1 und P3 hybridisieren kann.

[0110] Es liegt im Rahmen der vorliegenden Erfindung, in Verbindung mit der Ausführungsform der [Fig. 5](#) eine erste Amplifikation, wie oben beschrieben und beispielhaft in [Fig. 4](#) dargestellt, anzuwenden, um die Konzentration der Zielnukleinsäuremoleküle und der Referenznukleinsäuremoleküle im Verhältnis zu der Konzentration anderer Nukleinsäuren, die in der Probe vorhanden sein können, zu erhöhen.

[0111] Die Verwendung von universellen Primern gestattet eine Durchführung der Verfahren im Sinne der vorliegenden Erfindung, die bei einigen Anwendungen kostengünstiger ist als ein Verfahren, bei dem für jede zu analysierende Zielnukleinsäuresequenz ein anderer Satz solcher Primer verwendet wird. Der Ansatz findet insbesondere Anwendung bei der Suche in großen, durchgehenden Abschnitten (mehrere zehn oder hunderte Kilobasen) genomischer DNA nach einer einzigen bedeutsamen Sequenzänderung, die gegebenenfalls vorhanden sein kann. Zu solchen Gebieten gehören der Vergleich von DNA-Fragmenten in der Nachbarschaft eines verdächtigen Gens sowohl in gesunden als auch betroffenen Personen, die Entwicklung polymorpher Marker für die Konstruktion von Genkarten mit hoher Auflösung, Forschungsanwendungen zur Korrelation bestimmter Phänotypen in verschiedenen Modellorganismen mit spezifischen DNA-Veränderungen, Untersuchungen zur Diversität innerhalb einer Spezies usw.

[0112] Wie oben erwähnt muß die Identität der Zielnukleinsäuresequenz nur in einem Ausmaß bekannt sein, das die Herstellung der zur Durchführung der obigen Reaktionen notwendigen Primer gestattet. Die vorliegende Erfindung erlaubt die Bestimmung des Vorhandenseins oder der Abwesenheit einer Mutation in einer Nukleinsäure in einer Probe, ohne daß die Sequenz der Nukleinsäure vollständig identifiziert zu werden braucht. Dementsprechend ist man in der Lage, das Vorhandensein einer Mutation in einer Nukleinsäure zwischen zwei Sequenzen von Nukleotiden, für die Primer hergestellt werden können, zu bestimmen.

Nachweise des quadramolekularen Komplexes durch Nachweisen der Vergesellschaftung der Markierungen

[0113] In der vorliegenden Erfindung werden bei einem Mittel zum Nachweis des quadramolekularen Komplexes zwei Markierungen auf nicht komplementären Strängen verwendet. Die Markierungen werden dadurch vergesellschaftet, daß sie beide im quadramolekularen Komplex vorhanden sind, falls ein Unterschied zwischen den verwandten Sequenzen vorliegt. Der Nachweis der beiden Markierungen im Komplex sorgt für den Nachweis des Komplexes. Im allgemeinen wird die Vergesellschaftung der Markierungen im Komplex nachge-

wiesen. Diese Vergesellschaftung kann auf vielerlei Arten nachgewiesen werden. Beispielsweise kann es sich bei einer der Markierungen um ein sbp-Mitglied handeln, wobei ein komplementäres sbp-Mitglied gebunden an einen Träger bereitgestellt wird. Nach der Bindung der komplementären sbp-Mitglieder aneinander wird der Komplex an den Träger gebunden und vom Reaktionsmedium getrennt. Bei der anderen verwendeten Markierung handelt es sich um ein Reportermolekül, das dann auf dem Träger nachgewiesen wird. Das Vorhandensein des Reportermoleküls auf dem Träger zeigt das Vorhandensein des Komplexes auf dem Träger an, was wiederum das Vorhandensein der Mutation in der Zielnukleinsäuresequenz anzeigt. Ein wie oben beschriebenes System ist beispielsweise der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), dessen Beschreibung sich in "Enzyme-Immunoassay", Edward T. Maggio, Herausgeber, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1980), findet, wobei dort beispielsweise das sbp-Mitglied Biotin, das komplementäre sbp-Mitglied Streptavidin und das Reportermolekül ein Enzym, wie z. B. alkalische Phosphatase, ist.

[0114] Der Nachweis des Signals hängt von der Art des verwendeten signalproduzierenden Systems ab. Falls es sich bei dem Reportermolekül um ein Enzym handelt, würden zu den zusätzlichen Mitgliedern des signalproduzierenden Systems Enzymsubstrate usw. gehören. Das Produkt der Enzymreaktion ist vorzugsweise ein lumineszierendes Produkt oder ein Fluoreszenz- oder Nichtfluoreszenzfarbstoff, die jeweils spektrophotometrisch nachgewiesen werden können, oder ein Produkt, das mit anderen spektrometrischen oder elektrometrischen Mitteln nachgewiesen werden kann. Falls es sich bei dem Reportermolekül um ein Fluoreszenzmolekül handelt, läßt sich das Medium bestrahlen und die Fluoreszenz bestimmen. Ist die Markierung eine radioaktive Gruppe, kann das Medium einer Zählung zur Bestimmung der radioaktiven Menge unterzogen werden.

[0115] Die Vergesellschaftung der Markierungen innerhalb des Komplexes kann ebenso durch Verwendung von Markierungen bestimmt werden, die nur dann ein Signal liefern, falls die Markierungen zu einem Teil des Komplexes werden. Dieser Ansatz ist insbesondere dann attraktiv, wenn gewünscht wird, die vorliegende Erfindung in homogener Weise durchzuführen. Zu solchen Systemen gehören der Enzym-Channeling-Immunoassay, der Fluoreszenzenergietransfer-Immunoassay, der Elektrochemilumineszenz-Assay, der induzierte Lumineszenz-Assay, Latex-Agglutininierung u. ä.

[0116] In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung erfolgt der Nachweis des Komplexes dadurch, daß wenigstens ein suspendierbares Partikel als Träger eingesetzt wird, das entweder direkt an einen Nukleinsäurestrang oder an ein sbp-Mitglied, das komplementär zu einem an einen Nukleinsäurestrang gebundenen sbp-Mitglied ist, gebunden werden kann. Ein solches Partikel dient als Mittel zur Abtrennung der gebundenen Zielpolynukleotidsequenz von der Gesamtlösung, beispielsweise durch Absetzen, elektrophoretische Trennung oder magnetische Trennung. Eine zweite Markierung, die Teil des Komplexes wird, falls eine Mutation vorhanden ist, ist ein Teil des signalproduzierenden Systems, der getrennt oder in einem kleinen Bereich der Lösung konzentriert wird, um den Nachweis zu erleichtern. Typische Markierungen, die in dieser besonderen Ausführungsform verwendet werden können, sind Fluoreszenzmarkierungen, Partikel mit einem Sensitizer und einem chemilumineszenten Olefin (siehe US-Patent 5,709,994), Chemilumineszenz- und Elektrolumineszenzmarkierungen.

[0117] Vorzugsweise kann das Partikel selbst als Teil eines signalproduzierenden Systems dienen, das ohne Trennung oder Abtrennung funktionieren kann. Die zweite Markierung ist ebenso Teil des signalproduzierenden Systems und kann ein Signal in Zusammenarbeit mit dem Partikel produzieren, so daß ein homogenes Testnachweisverfahren bereitgestellt wird. Für diesen Zweck lassen sich verschiedene Kombinationen von Markierungen verwenden. Werden alle Reagentien zu Beginn der Reaktion zugegeben, so sind die Markierungen auf diejenigen beschränkt, die bei den für die Amplifikation, Kettenverlängerung und Branch Migration verwendeten erhöhten Temperaturen stabil sind. In dieser Hinsicht ist es wünschenswert, als Markierungen Polynukleotid oder Polynukleotidanaloge mit 5 bis 24 oder mehr Nukleotiden, je nach den verwendeten Nukleotiden und der Beschaffenheit des Analogs einzusetzen. Zu den Polynukleotidanalogen gehören Strukturen wie z. B. Polyribonukleotide, Polynukleosidphosphonate, Peptidonukleinsäuren, Polynukleosidphosphorothioate, Homo-DNA u. ä. Im allgemeinen liefern unveränderte Nukleinsäureanaloge eine stärkere Bindung, wobei kürzere Sequenzen verwendet werden können. Das Reaktionsmedium beinhaltet Oligonukleotid- oder Polynukleotidanaloge, die komplementäre Sequenzen von Nukleotiden aufweisen. Eines dieser Oligonukleotide oder Oligonukleotidanaloge wird beispielsweise an ein Reportermolekül oder ein Partikel gebunden. Das andere Molekül wird an einen Primer, entweder den Primer P2 oder den Primer P1 und/oder P3 als Markierung gebunden. Weder das Oligonukleotid- noch das Polynukleotidanalogue sollte als Matrize für die Polynukleotidpolymerase dienen. Dies wird dadurch erreicht, daß entweder ein Polynukleotidanalogue oder ein Polynukleotid, das mit dem Primer über eine abasische Gruppe verbunden ist, verwendet wird. Die abasische Gruppe umfaßt eine Kette von 1 bis 20 oder mehr Atomen, vorzugsweise mindestens 6 Atome, stärker bevorzugt 6 bis 12 Atome, wie z. B. Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel und Phosphor, die als verschiedene Gruppen, wie

z. B. Polymethylene, Polymethylenether, hydroxylierte Polymethylene usw. vorliegen können. Die abasische Gruppe kann zweckmäßigerweise während der Festphasensynthese mittels Standardverfahren in den Primer eingeführt werden.

[0118] Bei der korrekten Annealingtemperatur kann ein an ein Reportermolekül oder Partikel gebundenes Oligonukleotid oder Polynukleotidanalogs an sein komplementäres Polynukleotidanalogs bzw. Oligonukleotid, getrennt durch eine abasische Stelle, die während der Amplifikation in die partiellen Duplexe A' und B' als Markierungen eingebaut worden ist, binden. Falls die partiellen Duplexe Teil eines quadramolekularen Komplexes werden, wird das Reportermolekül oder Partikel Teil des Komplexes. Durch Verwendung unterschiedlicher Polynukleotidanalogs oder Oligonukleotidsequenzen für die Markierungen L1 und L2 können zwei unterschiedliche Reportermoleküle oder Partikel Teil des Komplexes werden. Es lassen sich verschiedene Kombinationen von Partikeln und Reportermolekülen verwenden.

[0119] Bei den Partikeln kann es sich beispielsweise um einfache Latexpartikel oder um Partikel handeln, die ein Sensitizer-, Chemilumineszenz-, Fluoreszenz-, Farbstoffmolekül u. ä. umfassen. Zu den typischen Partikel/Reportermolekül-Paaren gehören ein Farbstoffkristallit und eine Fluoreszenzmarkierung, wobei die Bindung ein Quenchen der Fluoreszenz verursacht, oder ein tritiiertes Reportermolekül und ein einen Szintillator enthaltendes Partikel. Zu den typischen Reportermolekülpaaren gehören ein fluoreszierender Energiedonor und ein fluoreszierender Energieakzeptorfarbstoff. Zu den typischen Partikelpaaren gehören (1) zwei Latexpartikel, deren Vergesellschaftung mittels Lichtstreuung oder Turbidimetrie nachgewiesen wird, (2) ein zur Lichtabsorption fähiges Partikel sowie als zweite Markierung ein Partikel, das nach Aufnahme von Energie vom ersten Partikel fluoresziert, und (3) ein einen Sensitizer enthaltendes Partikel und ein zweites, ein Chemilumineszenzmolekül enthaltendes Partikel, wie für den induzierten Lumineszenz-Immunoassay beschrieben, auf den im US-Patent 5,340,716 Bezug genommen wird.

[0120] Kurz gesagt wird beim Nachweis des quadramolekularen Komplexes unter Verwendung des induzierten Lumineszenz-Assays, wie er in der vorliegenden Erfindung angewandt wird, ein Photosensitizer als Teil einer Markierung und eine Chemilumineszenzverbindung als Teil der anderen Markierung eingesetzt. Bei Vorliegen des Komplexes geraten der Photosensitizer und die Chemilumineszenzverbindung in enge Nachbarschaft. Der Photosensitizer erzeugt Singulett-Sauerstoff und aktiviert die Chemilumineszenzverbindung, wenn sich die beiden Markierungen in enger Nachbarschaft befinden. Die aktivierte Chemilumineszenzverbindung produziert daraufhin Licht. Die produzierte Lichtmenge steht in Verbindung mit der Menge an gebildetem Komplex.

[0121] Wie in der vorliegenden Erfindung angewandt, wird beispielhaft ein Partikel eingesetzt, das die Chemilumineszenzverbindung in Vergesellschaftung damit umfaßt, wie z. B. durch Einbau darin oder Bindung daran. Die Partikel weisen eine Erkennungssequenz, üblicherweise ein Oligonukleotid oder Polynukleotidanalogs, auf, die daran mit einer komplementären Sequenz, die in einen der Nukleinsäurestränge als eine Markierung L1 eingebaut ist, gebunden ist. Ein weiterer Partikel wird eingesetzt, das den Photosensitizer in Vergesellschaftung damit aufweist. Diese Partikel weisen eine daran gebundene Erkennungssequenz auf, die sich von der an die Chemilumineszenzpartikel gebundenen Sequenz unterscheidet. Eine komplementäre Sequenz wird als eine Markierung L2 in denjenigen Nukleinsäurestrang im Komplex C eingebaut, der zum die Markierung L1 tragenden Nukleinsäurestrang nicht komplementär ist. Nachdem das Medium zur Bildung eines quadramolekularen Komplexes C im Sinne der vorliegenden Erfindung behandelt wurde, wird das Medium zur Anregung des Photosensitizers, der in seinem angeregten Zustand zur Aktivierung von Sauerstoff in einen Singulettzustand fähig ist, mit Licht bestrahlt. Da die Chemilumineszenzverbindung eines der Sätze von Partikeln sich nun aufgrund des Vorhandenseins des Zielpolynukleotids mit einer Mutation in enger Nachbarschaft zu dem Photosensitizer befindet, wird die Chemilumineszenzverbindung durch den Singulett-Sauerstoff aktiviert und emittiert Lumineszenz. Das Medium wird daraufhin auf das Vorhandensein und/oder die Menge an emittierter Lumineszenz bzw. emittiertem Licht untersucht, wobei das Vorhandensein davon in Verbindung mit dem Vorhandensein des quadramolekularen Komplexes C steht. Das Vorhandensein des letzteren zeigt das Vorhandensein und/oder die Menge des Zielpolynukleotids mit einer Mutation oder des Zielpolynukleotids selbst an. Als Alternative und zur Veranschaulichung, wie in der vorliegenden Erfindung praktiziert, können die Markierungen L1 und L2 jeweils einen Liganden und die signalerzeugenden Partikel jeweils einen entsprechenden zur Bindung von L1 bzw. L2 fähigen Rezeptor umfassen.

Nachweis einer Zielsequenz mittels PCR

[0122] Wie oben erwähnt sieht die vorliegende Erfindung auch den Nachweis einer Zielsequenz mittels PCR vor. Ein Beispiel dieser Ausführungsform ist in [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) dargestellt. Bei diesem PCR-Verfahren wird

eine viersträngige Struktur bzw. ein viersträngiger Komplex, wie oben zum Nachweis einer Mutation, gebildet. Jedoch handelt es sich bei dem Ansatz in [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) bei der Zielnukleinsäuresequenz A um die mittels PCR nachzuweisende Sequenz, wobei die Referenznukleinsäuresequenz B als Reagens eingeführt wird und einen Unterschied Q zur Zielnukleinsäuresequenz enthält. Dieser Unterschied besteht, wie oben beschrieben, zwischen zwei verwandten Nukleinsäuresequenzen. Somit ist in dieser Ausführungsform die Identität der Zielnukleinsäuresequenz in einem Ausmaß bekannt, das benötigt wird, um die Herstellung der Primer und der Referenznukleinsäuresequenz zu gestatten. Bei der Bildung eines solchen Komplexes werden zwei partielle Duplexe durch Amplifikation unter Verwendung von drei unterschiedlichen Primern in der Polymerasekettenreaktion produziert und den amplifizierten Produkten wird dann ein Annealing gestattet. In dieser besonderen Ausführungsform hängt die Ausbildung des Komplexes vom Vorhandensein der Zielnukleinsäuresequenz ab. Falls die Zielnukleinsäuresequenz nicht vorhanden ist, wird kein Komplex nachgewiesen. Ist jedoch die Zielnukleinsäure vorhanden, so besteht ein Unterschied zwischen den zwei hybridisierten Anteilen des Komplexes. Der Komplex dissoziiert nicht und läßt sich als Anzeichen für das Vorhandensein der Zielnukleinsäuresequenz nachweisen.

[0123] Mit Bezugnahme auf [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) wird nun die Zielnukleinsäure A, falls vorhanden, mit der Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der Primer P1 und P2 unter Erhalt eines Amplifikats AA amplifiziert. Der Primer P2 enthält eine Markierung L1, und der Primer P1 besteht aus einem 3'-terminalen Anteil Pa, der mit der Zielsequenz hybridisieren kann, sowie dem 5'-terminalen Anteil B1, der nicht mit der Zielsequenz hybridisieren kann. Die Amplifikation wird unter den bei der PCR verwendeten Reaktionsbedingungen in Gegenwart einer Nukleotidpolymerase und Nukleosidtriphosphaten unter Verwendung eines Temperaturkreislaufs durchgeführt. Das Amplifikat AA weist zwei Stränge auf, einen aus dem Primer P2 abgeleiteten markierten Strang und einen aus dem Primer P1 abgeleiteten nicht markierten Strang. Der nicht markierte Strang weist einen 5'-terminalen Anteil B1 des Primers P1 und der markierte Strang einen entsprechenden 3'-terminalen Anteil A2, der das Komplement von B1 ist, auf.

[0124] Danach wird eine Kettenverlängerung des Primers P3 entlang dem markierten Strang des Amplifikats AA unter Erhalt des mit Schwänzen versehenen partiellen Ziel-Duplex A' durchgeführt. Der Primer P3 besteht aus einem 3'-terminalen Anteil Pa, der mit Pa des Primers P1 identisch ist und der an den markierten Strang von AA bindet. P3 weist einen 5'-terminalen Anteil A1 auf, der zum Amplifikat AA nicht komplementär ist. Die Kettenverlängerung wird in Gegenwart einer Nukleotidpolymerase und Nukleosidtriphosphaten unter entsprechenden Temperaturbedingungen durchgeführt, so daß lediglich der komplementäre Strang des markierten Strangs und nicht eine Kopie produziert wird. Dieser komplementäre nicht markierte Strang des mit Schwänzen versehenen partiellen Ziel-Duplex A' weist einen 5'-terminalen Anteil A1 auf, der zum 3'-terminalen Anteil A2 des markierten Strangs von A' nicht komplementär ist. Außer wenn die PCR-Reaktion zur Herstellung eines Überschusses des markierten Strangs durchgeführt wird, ist auch der nicht markierte Strang aus der Amplifikation vorhanden. Dieser Strang stellt keine Matrize während der Kettenverlängerung zur Bildung des partiellen Duplex A' dar.

[0125] In der Ausführungsform der [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) liegt die Referenznukleinsäuresequenz B in einem getrennten Medium vor, wobei zur Herstellung des Amplifikats BB mittels Polymerasekettenreaktion die Primer P2 und P3 verwendet werden. Die Amplifikation wird unter Verwendung eines Temperaturkreislaufs unter den oben beschriebenen Bedingungen in Gegenwart einer Nukleotidpolymerase und Nukleosidtriphosphaten durchgeführt. B besteht aus einer Sequenz, die mit Ausnahme des Unterschieds Q mit A identisch ist. Im allgemeinen enthält der für diese Amplifikation verwendete Primer P2 eine Markierung L2, die mit L1 identisch oder davon verschieden sein kann. Das Amplifikat BB weist zwei Stränge auf, einen aus dem Primer P2 abgeleiteten markierten Strang und einen aus dem Primer P3 abgeleiteten nicht markierten Strang. Der nicht markierte Strang weist einen terminalen Anteil A1 des Primers P3 und der markierte Strang einen entsprechenden terminalen Anteil B2, bei dem es sich um das Komplement von A1 handelt, auf.

[0126] Es wird eine Kettenverlängerung des Primers P1 entlang dem markierten Strang des Amplifikats BB unter den oben erwähnten Bedingungen zur Kettenverlängerung des Primers P3 entlang dem markierten Strang im Duplex AA durchgeführt, wobei der mit Schwänzen versehene partielle Referenz-Duplex B' erhalten wird. Wie oben erwähnt besteht der Primer P1 aus einem Anteil Pa, der an den markierten Strang von BB bindet, sowie einen Anteil B1, der nicht an das Amplifikat BB bindet. Die Kettenverlängerung wird in Gegenwart einer Nukleotidpolymerase und Nukleosidtriphosphaten unter geeigneten Temperaturbedingungen durchgeführt, so daß lediglich das Komplement des markierten Strangs und nicht eine Kopie produziert wird. Der verlängerte Primer P1 weist einen 5'-terminalen Anteil B1 auf, der zum terminalen Anteil B2 des markierten Strangs von B' nicht komplementär ist. Wie man sehen kann, sind A' und B' dahingehend verwandt, daß ihre markierten Stränge jeweils komplementär zum nicht markierten Strang des jeweils anderen Moleküls sind, mit

Ausnahme des Unterschieds Q.

[0127] Man läßt die Stränge der partiellen Duplexe A' und B' aneinander binden und eine Branch Migration durchführen, indem man die die partiellen Duplexe A' und B' enthaltenden Gemische kombiniert und die Kombination unter den oben für den Mutationsnachweis beschriebenen Bedingungen inkubiert, wobei der Komplex C gebildet wird, wenn die Zielnukleinsäuresequenz vorhanden ist. Der Oligonukleotidschwanz A1 von A' wird an den entsprechenden Oligonukleotidschwanz B2 von B' hybridisiert, wobei in ähnlicher Weise der Oligonukleotidschwanz A2 von A' an den Oligonukleotidschwanz B1 von B' hybridisiert wird. Die Branch Migration innerhalb des Komplexes C wird fortgesetzt, bis der Unterschied Q erreicht ist, wobei an diesem Punkt die Wanderung aufhört. In der in [Fig. 8](#) dargestellten Ausführungsform werden die Markierungen L1 und L2 in die partiellen Duplexe, die den Komplex C bilden, eingebaut.

[0128] In der Ausführungsform der [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) werden die Reaktionen unabhängig unter Erhalt der mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexe A' bzw. B' durchgeführt. Danach können die Reaktionsgemische kombiniert werden, um den jeweiligen Strängen von A' und B' die Bindung aneinander unter Bildung des Komplexes C zu gestatten.

[0129] Ein besonders attraktives Merkmal der vorliegenden Erfindung stellt die Tatsache dar, daß das Verfahren zur Verwendung einer PCR beim Nachweis einer Zielnukleinsäuresequenz in einem einzigen Reaktionsbehälter ohne einen Trennschritt durchgeführt werden kann. In dieser Ausführungsform wird eine Kombination in einem einzigen Medium bereitgestellt. Die Kombination umfaßt (i) eine Probe, von der vermutet wird, daß sie eine Zielnukleinsäuresequenz enthält, (ii) eine Referenznukleinsäuresequenz, die mit der Zielnukleinsäuresequenz zwar verwandt, jedoch davon verschieden ist, (iii) eine Nukleotidpolymerase, (iv) Nukleosidtriphosphate und (v) die Primer P1, P2 und P3, wobei P2 den mit L1 markierten Primer P2 und den mit L2 markierten Primer P2 umfassen kann, oder P2 nicht markiert ist und die Primer P1 und P3 mit L1 bzw. L2 markiert sein können. Das Medium wird dann mehreren Temperaturkreisläufen aus Erwärmen und Abkühlen ausgesetzt, so daß alle oben für [Fig. 8A](#) beschriebenen Amplifikations- und Kettenverlängerungsreaktionen gleichzeitig erreicht werden können, mit der Ausnahme, daß in dieser Ausführungsform die Herstellung von Kopien von einem der verlängerten Primer nicht vermieden zu werden braucht. Das Medium wird Bedingungen zur Ausführung der PCR, wie oben beschrieben, ausgesetzt.

[0130] Ist die Zielnukleinsäure vorhanden, so werden alle möglichen partiellen und vollständigen Duplexe gebildet, die sich aus 1) Einzelsträngen, die eine beliebige Kombination aus Referenz- oder Zielsequenzen und den 5'-Enden A2 und B2 aufweisen, und 2) Einzelsträngen, die eine beliebige Kombination aus Referenz- oder Mutanten-Sequenzen und den 5'-Enden A1 oder B1 aufweisen, bilden können, wobei die Stränge weiterhin mit entweder L1 oder L2 markiert werden können, wenn L1 und L2 verschieden sind. Unter den partiellen Duplexen, die gebildet werden, sind die mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexe A' und B', die aneinander unter Ausbildung des Komplexes C, der nicht dissoziiert, binden können. Eine Bestimmung des Vorhandenseins eines solchen Komplexes wird danach durchgeführt, um das Vorhandensein der Zielnukleinsäuresequenz zu etablieren. Werden die Primer P1 und P3 anstelle des Primers P2 markiert, so werden die Markierungen L1 und L2 in den partiellen Duplexen A' und B' an die Schwänze A1 bzw. B1 gebunden, was dennoch für den Nachweis des Komplexes C sorgt, wenn die Zielnukleinsäuresequenz vorhanden ist.

[0131] Ist die Zielnukleinsäuresequenz nicht vorhanden (d. h. das Ziel ist mit der Referenz identisch, siehe [Fig. 6B](#)), bilden sich aufgrund der Amplifikation der Referenznukleinsäuresequenz zwei Duplexe, wobei man eine erste PCR-Amplifikation mit beiden Primersätzen, nämlich auf der einen Seite P2 und P3 (durch den Duplex BB in [Fig. 8B](#) repräsentiert) und auf der anderen Seite P2 und P1 (durch den Duplex BB in [Fig. 8B](#) repräsentiert), erreichen kann. Die Kettenverlängerung des Primers P1 auf dem Amplifikat BB führt zu B', und die Kettenverlängerung des Primers P3 auf dem Amplifikat bb führt zu b'. Eine durch Hybridisierung der jeweiligen Schwänze von B' und b' aneinander gebildete viersträngige Struktur dissoziiert vollständig, da in beiden Duplexen kein Unterschied vorliegt, um den vollständigen Strangaustausch zu hemmen. Mit anderen Worten, der Komplex dissoziiert in die normalen Duplexstrukturen D' und E' durch Strangaustausch mittels Branch Migration, wenn die hybridisierten Anteile der partiellen Duplexe jeweils identisch sind. In dieser Ausführungsform sind beim Fehlen der Zielnukleinsäuresequenz die hybridisierten Anteile dahingehend identisch, daß jeder Strang einen Unterschied Q enthält.

Reduzierung des Hintergrundsignals durch Verwendung alternativer Primer (P4 und P5)

[0132] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beinhaltet einen Weg zur Reduzierung des Hintergrundes aufgrund von falschem Priming in der PCR. Bei den homogenen Nachweisverfahren der vorlie-

genden Erfindung können sich durch verschiedene, durch falsches Priming erhaltene Produkte erzeugte nichtspezifische Signale zu einem beträchtlichen Hintergrund aufsummieren. Verfahren zur Minimierung von falschem Priming bei der PCR wurde bereits beschrieben, einschließlich unter anderem einer Wachs-vermittelten Warmstart-Standardverfahrensweise, wie sie bei Chou, Q., et al., Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications, Nucleic Acids Res. 20: 1717-1723 (1992) beschrieben ist, sowie einer Verfahrensweise unter Nutzung 3'-etheno-modifizierter PCR-Primer, wie in der PCT WO 98/28443 beschrieben. Das vorliegende erfindungsgemäße Verfahren stellt Mittel zur Reduzierung von Hintergrundsignalen aufgrund von falschem Priming zur Verfügung, indem die Produkte des falschen Priming nichtnachweisbar gemacht werden. Mit diesem Verfahren läßt sich die Bildung signalerzeugender Komplexe aufgrund von Fehlpriming verhindern, wenn mehr als ein Priming-bereich auf den Zielsträngen oder Referenzsträngen zur Verfügung steht.

[0133] Wie oben beschrieben, werden durch die PCR-Amplifikation der Ziel- und Referenzsequenzsequenzen unter Verwendung einer Kombination der Primer der vorliegenden Erfindung markierte Duplexe mit vorbestimmten Schwanzsequenzen, die weder zum Ziel noch zur Referenz komplementär sind, erhalten. Somit sind alle durch die PCR-Amplifikation mit diesen Primern hergestellten Produkte in der Lage, partielle Duplexe zu bilden, die ferner durch Hybridisierung der Schwanzsequenzen aneinander unter Bildung viersträngiger DNA-Komplexe binden können. Unterscheiden sich die doppelsträngigen Anteile der partiellen Duplexe voneinander durch eine Mutation M, so wird der Strang austausch in den viersträngigen DNA-Strukturen verhindert, was zur Bildung eines stabilen quadramolekularen Komplexes führt. Auf ähnliche Weise werden nichtspezifische, aus dem Fehlpriming entstammende Amplifikationsprodukte markiert, wobei sie an einem Ende Schwanzsequenzen umfassen. Diese Produkte können partielle Duplexe bilden, die ferner an durch spezifische Amplifikation hergestellte partielle Duplexe ebenso wie an durch nichtspezifische Amplifikation hergestellte partielle Duplexe binden können. Da die mit dem Ziel verwandten doppelsträngigen Anteile des aus der Kombination durch spezifisches bzw. nichtspezifisches Priming hergestellter partieller Duplexe erhaltenen quadramolekularen Komplexes vollkommen unterschiedlich sind, können derartige Komplexe keine Stränge austauschen und zu markierten vollständigen Duplexen dissoziieren. Die stabilen quadramolekularen Komplexe sind nachweisbar und erzeugen somit ein Signal, das zwar mit dem nichtspezifischen Priming, jedoch nicht mit dem Vorhandensein einer Mutation in Verbindung steht.

[0134] Um die aus dem Fehlpriming entstandenen Signale zu vermeiden, wird in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine alternative Konstruktion der Primer verwendet. Unter Bezugnahme auf [Fig. 7](#) bindet der Primer P2 (wie hier zuvor beschrieben markiert) an einen ersten Strang der Zielsequenz (A) mit einer Mutation M und der Referenzsequenz (B). Die Primer P4 und P5 können an den zweiten Strang des Ziels A und der Referenz B binden. Primer P4 umfaßt einen 3'-terminalen Pa-Bereich, der zum Ziel oder zur Referenz komplementär ist, sowie einen 5'-terminalen Schwanz T, der nicht zum Ziel oder zur Referenz komplementär ist. Der PA-Bereich von P4 bindet an den zweiten Strang an einem Ort stromaufwärts (in 5'-Richtung) von der Sequenz, die P5 bindet. Zwar zweigt [Fig. 7](#), daß Pa an den zweiten Strang unmittelbar neben P5 bindet, doch sind kleine Lücken oder partielle Überlappungen zwischen diesen beiden Sequenzen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung. Die Menge an Lücke bzw. Überlappung läßt sich experimentell bestimmen (siehe Beispiele), wobei die Erfindung auf keine bestimmte Anzahl an Basen beschränkt ist. Ebenso weisen, sowohl in [Fig. 7](#) als auch in den Beispielen unten, T und P5 die gleiche Länge auf, wobei dies jedoch zur praktischen Durchführung der Erfindung nicht erforderlich ist. Es ist wünschenswert, daß der T_m -Wert für T in der Nähe des T_m -Werts für P5 liegt.

[0135] Unter Bezugnahme auf [Fig. 7](#) werden durch die Amplifikation der Ziel- und Referenzsequenzen mittels PCR unter Verwendung der Primer P2, P4 und P5 unter hier zuvor beschriebenen Bedingungen Duplexe hergestellt, die die Ziel- und Referenzsequenzen entweder mit Sequenz T und ihrem Komplement an einem Ende (Duplexe A1 und B1) oder Sequenz P5 und ihrem Komplement an einem Ende (Duplexe A2 und B2) umfassen. Nach Denaturierung und Reannealing des Amplifikationsansatzes bilden die Amplifikationsprodukte mit Schwänzen versehene partielle Duplexe. Die mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexe umfassen doppelsträngige Ziel- und Referenzsequenzen, die an den Enden der Stränge des Duplexes jeweils nicht komplementäre Einzelstränge aufweisen. Die nicht komplementären einzelsträngigen Sequenzen umfassen T, deren komplementäre Sequenz T' sowie P5 und deren Komplement P5'.

[0136] Unter Bezugnahme auf [Fig. 8](#) binden die mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexe aneinander durch Hybridisierung der entsprechenden Schwänze unter Bildung eines viersträngigen DNA-Komplexes C. Wie in [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) dargestellt, führt Branch Migration innerhalb von Komplex C zur Trennung des Komplexes in Duplexe, außer wenn eine Mutation M vorhanden ist, woraufhin die Branch Migration und Strangdissoziation gehemmt wird. Anschließend wird Komplex C aufgrund der Vergesellschaftung der Markie-

rungen L1 und L2 nachgewiesen, wobei dessen Vorhandensein in direkter Verbindung mit dem Vorhandensein der Mutation M steht.

[0137] Die Amplifikation der Zielsequenz und der Referenzsequenz lässt sich getrennt oder vorzugsweise im gleichen Reaktionsmedium bewerkstelligen. Diese Kombination umfaßt (a) eine Zielnukleinsäuresequenz, von der vermutet wird, daß sie eine Mutation aufweist, enthaltende Probe (b) eine Referenznukleinsäuresequenz, die, falls nicht bekannt ist, ob sie in der Probe vorhanden ist, separat zugegeben werden kann und die der Zielnukleinsäure ohne die Mutation entspricht, wobei es sich, wie oben erklärt, um die Wildtyp-Nukleinsäure handeln kann, (iii) eine Nukleotidpolymerase, (iv) Nukleosidtriphosphate und (v) die Primer P2, P4 und P5. Primer P2 kann mit L1 markiert und getrennt davon mit L2 markiert sein oder Primer P4 und P5 können mit L1 bzw. L2 markiert sein. Das Medium wird anschließend mehreren Temperaturkreisläufen aus Erhitzen und Abkühlen unterzogen, so daß alle notwendigen Amplifikations- und Kettenverlängerungsreaktionen gleichzeitig erfolgen. Dabei beinhaltet in dieser Ausführungsform jeder Kreislauf vorzugsweise das Aufheizen des Mediums auf 90°C bis 100°C für 2 Sekunden bis 3 Minuten, das Abkühlen des Mediums auf 50°C bis 70°C über einen Zeitraum von 8 Sekunden bis 3 Minuten sowie das Aufheizen des Mediums auf 70°C bis 75°C über einen Zeitraum von 10 Sekunden bis 3 Minuten, obwohl je nach den Mengen der Primersequenzen andere Temperaturen erforderlich sein können. Nach dem obigen Temperaturkreislauf wird das Medium über einen zur Denaturierung doppelsträngiger Moleküle ausreichenden Zeitraum erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch abgekühlt, um (1) das Reannealing der einzelsträngigen Moleküle unter Bildung von mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexen, (2) die Bindung der mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexe unter Bildung viersträngiger Komplexe und (3) den Strangaustausch zwischen den Komplexen durch Branch Migration zu gestatten. Vorzugsweise wird das Medium dabei 10 Sekunden bis 2 Minuten zur Denaturierung auf 90°C bis 99°C erhitzt und anschließend auf 40°C bis 80°C, vorzugsweise 60°C bis 70°C, abgekühlt und mindestens eine Minute, vorzugsweise 20 Minuten bis 2 Stunden, für das Reannealing und den Strangaustausch bei dieser Temperatur gehalten.

[0138] Unter Bezugnahme auf [Fig. 8](#) befinden sich unter den nach Abkühlen des Mediums gebildeten partiellen Duplexen die mit Schwänzen versehenen partiellen Duplexe, die aneinander unter Bildung des Komplexes C binden können. Wie in [Fig. 1A](#) und [Fig. 2A](#) dargestellt, findet keine Dissoziation des Komplexes zu Duplexen statt, wenn eine Mutation vorhanden ist (die partiellen Duplexe in [Fig. 1A](#) und [Fig. 2A](#) wurden unter Verwendung des für jene Ausführungsform beschriebenen Primerschemas erzeugt; allerdings ist das Prinzip des Strangaustauschs im Komplex gleich, unabhängig vom zur Erzeugung der partiellen Duplexe verwendeten Primerschema). Anschließend wird das Vorhandensein eines solchen Komplexes bestimmt, um das Vorhandensein einer Mutation in der Zielnukleinsäuresequenz zu etablieren. Werden anstelle des Primers P2 die Primer P4 und P5 markiert, so sind die Markierungen L1 und L2 in den partiellen Duplexen an die nicht komplementären Schwänze gebunden, wodurch immer noch für einen Nachweis von Komplex C bei Vorhandensein einer Mutation gesorgt ist.

[0139] Wie hier zuvor beschrieben, setzt sich die Branch Migration innerhalb der viersträngigen DNA-Komplexe fort, außer wenn eine Mutation M vorhanden ist. Siehe [Fig. 1](#) und [2](#). Markierungen, wie sie zuvor beschrieben wurden, lassen sich in die partiellen Duplexe einbauen und stellen ein Mittel zum Nachweis der viersträngigen Komplexe dar. Siehe [Fig. 3](#) und [Fig. 8](#). Falls eine Mutation vorhanden ist, findet eine Vergesellschaftung der Markierungen aufgrund der Tatsache, daß sie beide im Komplex vorhanden sind, statt. Wie hier zuvor beschrieben, sieht der Nachweis der Markierungen den Nachweis des Komplexes vor.

[0140] Sowohl Primer P4 als auch Primer P5 können falsche Priming-Stellen in der Ziel- und Referenz-DNA aufweisen, doch ist es höchst unwahrscheinlich, daß diese Stellen nebeneinander liegen. Somit würden die jeweiligen nichtspezifischen PCR-Produkte keine komplementären mit dem Ziel verwandten Sequenzen miteinander teilen und können daher keine partiellen Duplexe bilden, die zur Bindung aneinander unter Bildung des viersträngigen Komplexes C fähig sind. Dementsprechend tragen aus nichtspezifischen Primern entstandene nichtspezifische PCR-Produkte nicht zu dem Signal in Verbindung mit dem Vorhandensein einer Mutation in der Zielsequenz bei.

[0141] Werden die Primer P4 und P5 im Amplifikationsansatz kombiniert, so können die beiden Primer miteinander konkurrieren. Das heißt, das Amplifikationsprodukt der Primer P2 und P5 umfaßt die Sequenz Pa und deren Komplement, die eine Priming-Stelle für Primer P4 darstellt, wohingegen das Amplifikationsprodukt des Primerpaars P2 und P4 keine Priming-Stelle für den Primer P5 enthält. Somit läßt sich der Primer P4 entlang eines Strangs eines der beiden Amplifikationsprodukte verlängern, während der Primer P5 lediglich an einen Strang des durch Amplifikation unter Verwendung der Primer P2 und P5 hergestellten Produkts binden und daran entlang verlängert werden kann. Falls der Primer P4 genauso effizient oder effizienter als Primer P5 ist,

besteht die Möglichkeit, daß Primer P4 den Primer P5 hinsichtlich der Leistung aussticht. Unter diesen Bedingungen führt die Amplifikation von Ziel- oder Referenznukleinsäuresequenzen zu einem einzigen, durch die Primer P2 und P4 erzeugten Amplifikationsprodukt, was nachfolgend zu einer Unfähigkeit der Bildung partieller Duplexe führt. Somit sollte die ausgewogene Leistung der Primer P4 und P5 in einem Ansatz in Betracht gezogen werden, wobei diese von den relativen thermodynamischen Parametern für die Bindung eines jeden dieser Primer an den Strang der Ziel- bzw. Referenznukleinsäuresequenzen abhängen kann. Dabei sollten zur Maximierung der Ausbeute signalerzeugender viersträngiger Strukturen die Mengen der durch P4 und P5 erzeugten Amplifikationsprodukte gleich sein. Die ausgeglichene Priming-Effizienz der Primer P4 und P5 läßt sich auf Grundlage thermodynamischer Betrachtungen oder durch Optimierung der Verhältnisse der Konzentration der beiden Primer ebenso wie der Temperatur zum Annealing der Primer während des Amplifikationsvorgangs erreichen.

[0142] In einem typischen Optimierungsexperiment werden mehrere unterschiedliche Verhältnisse bei verschiedenen PCR-Zyklus-Annealing-Temperaturen (T_a) untersucht. Der absolute Wert des in einem induzierten Lumineszenztest gemessenen Signals (siehe US-Patent Nr. 5,595,891) ist dabei ein gutes Kriterium für die Optimierung des Verhältnisses der Konzentrationen der Primer P4 und P5. Beispielsweise bedeutet das Fehlen eines Signals, das man erhält, wenn die Zielnukleinsäuresequenz bekanntermaßen eine Mutation umfaßt (vorausgesetzt, daß die Amplifikation erfolgreich war, wie durch Gelelektrophorese beurteilt), daß die Priming-Effizienz des für die Amplifikation Ziel- und Referenznukleinsäuresequenz verwendeten Primers P4 die des Primers P5 überwältigte, was zur Erzeugung lediglich eines Amplifikationsprodukts und der nachfolgenden Unfähigkeit zur Herstellung partieller Duplexe und des Komplexes C führte. Ein Beispiel für ein derartiges Experiment ist unten aufgeführt.

[0143] Unter Bezugnahme auf [Fig. 9](#) läßt sich die vorliegende Erfindung auch durch eine getrennte PCR-Amplifikation von Ziel- oder Referenznukleinsäuresequenzen durchführen, indem die Primer P2 und P4 in einem Reaktionsgefäß und die Primer P2 und P5 in einem anderen Reaktionsgefäß kombiniert werden. Nach der PCR-Amplifikation werden die Reaktionsansätze vereinigt und die Kombination weiter Bedingungen unterworfen, die zur Denaturierung der doppelsträngigen Produkte, dem Annealing der Einzelstränge und zur Bildung partieller Duplexe führen, die durch Hybridisierung der Schwanzsequenzen aneinander unter Bildung viersträngiger DNA-Komplexe C binden. Durch diese Vorgehensweise entfällt die Notwendigkeit für eine ausgewogene Priming-Effizienz der Primer P4 und P5, wie oben erörtert. In ähnlicher Weise ist es bei einer Markierung des Primers P2 möglich, die Erfindung dahingehend durchzuführen, daß die Zielnukleinsäuresequenz unter Verwendung des mit einer der Markierungen markierten Primers P2 und getrennt davon die Referenzsequenz unter Verwendung des mit der zweiten Markierung markierten Primers P2 amplifiziert wird. Nach der PCR-Amplifikation werden die Reaktionsansätze vereinigt und die Kombination Bedingungen unterworfen, die zur Denaturierung der doppelsträngigen Produkte, dem Annealing der Einzelstränge unter Bildung partieller Duplexe und zur Bindung der partiellen Duplexe aneinander durch Hybridisierung der Schwanzsequenzen unter Bildung viersträngiger DNA-Komplexe führen.

[0144] Wie oben erwähnt, liegt es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, eine erste Amplifikation zur Erhöhung der Konzentration der Zielnukleinsäuremoleküle und der Referenznukleinsäuremoleküle relativ zu der anderer Nukleinsäuren, die in der Probe vorhanden sein können, zu nutzen. Bei Verwendung des alternativen erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf das Nichtnachweisbarmachen nichtspezifischer Amplifikationsprodukte gerichtet ist, läßt sich die erste Amplifikation von Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen unter Verwendung der oben erwähnten Primer PX1 und PX2 durchführen. Als Alternative kann die erste Amplifikation unter Verwendung der Primer PX1 und P2 oder PX2 und P5 durchgeführt werden. Nach der ersten Amplifikation von Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen wird der Reaktionsansatz mit den Primern P2, P4 und P5, wie oben beschrieben, kombiniert und die Kombination für die Polymerasekettenreaktion und die Bildung partieller Duplexe geeigneten Temperaturkreislaufbedingungen ausgesetzt. Die von den Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen erhaltenen partiellen Duplexe werden kombiniert und miteinander hybridisiert gelassen, so daß die viersträngigen DNA-Komplexe gebildet werden. Die Bildung des stabilen Komplexes C wird durch die Vergesellschaftung der Markierungen, wie oben erwähnt, nachgewiesen. Der Nachweis des stabilen Komplexes C ist ein Anzeichen auf das Vorhandensein einer Mutation eines Sequenzunterschieds in der Zielnukleinsäuresequenz.

Kits zur praktischen Durchführung der Erfindung

[0145] Aus Gründen der Zweckmäßigkeit lassen sich vorbestimmte Mengen der in der vorliegenden Erfindung verwendeten Reagentien in abgepackter Kombination in einem Kit bereitstellen. Ein Kit kann in abgepackter Kombination (a) einen entlang einem der Stränge der Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen ver-

längerbaren Primer P2, (b) einen Primer P1, der einen 3'-terminalen Anteil Pa, der an den anderen Strang der Ziel- bzw. Referenznukleinsäuresequenzen bindet und daran entlang verlängerbar ist, und einen 5'-terminalen Anteil B1, der nicht an die Ziel- bzw. Referenznukleinsäuresequenzen bindet, umfaßt, und (c) einen den 3'-terminalen Anteil Pa sowie einen von B1 verschiedenen und nicht an die Ziel- bzw. Referenznukleinsäuresequenzen bindenden Anteil A1 umfassenden Primer P3 umfassen. Vorzugsweise läßt sich der Primer P2 markieren, doch können als Alternative die Primer P1 und P3 markiert werden. Der Kit kann ebenso eine Referenznukleinsäure, die mit Ausnahme des möglichen Vorhandenseins eines Unterschieds, wie z. B. einer Mutation, einer Zielnukleinsäuresequenz entspricht, sowie Reagentien zur Durchführung einer Amplifikation der Zielnukleinsäuresequenz, bevor diese den Verfahren der vorliegenden Erfindung unterzogen wird, beinhalten. Der Kit kann ebenso Nukleosidtriphosphate und eine Nukleotidpolymerase beinhalten. Weiterhin kann der Kit zwei zusätzliche Oligonukleotidprimer PX1 und PX2 beinhalten, wobei die Primer dahingehend verwandt sind, daß ein Produkt der Verlängerung des einen Primers entlang der Zielsequenz als Matrize für die Verlängerung des anderen Primers dient. Der Kit kann weiterhin zur Bindung an die Markierung auf wenigstens einem der Primer fähige Partikel, wie oben beschrieben, beinhalten. Der Kit kann weiterhin Mitglieder eines signalproduzierenden Systems und ebenso verschiedene gepufferte Medien beinhalten, von denen einige eines oder mehrere der obigen Reagentien enthalten können. Vorzugsweise sind die Primer PX1, PX2, P1, P2 und P3 in einem einzigen Behälter abgepackt. Besonders bevorzugt sind wenigstens alle der obigen Bestandteile mit Ausnahme des Puffers in einem einzigen Behälter abgepackt.

[0146] Der Kit kann weiterhin ein Paar von Adapterprimern zur Amplifikation der Ziel- und Referenznukleinsäuren beinhalten. Einer der Primer weist einen 3'-terminalen Anteil, der an die Ziel- und Referenznukleinsäuren hybridisierbar ist, sowie 5' davon einen Anteil auf, der nicht mit den Ziel- oder Referenznukleinsäuren hybridisierbar und weitgehend mit Primer P2 identisch ist. Der andere Primer weist einen 3'-terminalen Anteil, der an die Ziel- und Referenznukleinsäuren hybridisierbar ist, sowie 5' davon einen Anteil auf, der nicht mit den Ziel- oder Referenznukleinsäuren hybridisierbar und weitgehend mit dem 3'-terminalen Anteil Pa der Primer P1 und P3 identisch ist. Die Adapterprimer sind üblicherweise in einem Behälter getrennt von den Primern P1, P2 und P3 abgepackt.

[0147] Als Alternative kann ein Kit auch (a) einen Primer P2, der entlang eines der Stränge der Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen verlängerbar ist, (b) einen Primer P4, der einen 3'-terminalen Anteil Pa, der an den jeweils anderen Strang der Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen bindet und daran entlang verlängerbar ist, sowie einen 5'-terminalen Anteil, der nicht an die Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen bindet, umfaßt, sowie (c) einen Primer P5, der an die Ziel- und Referenznukleinsäuresequenzen an einem Ort stromabwärts, in 3'-Richtung, des 3'-terminalen Anteils des Primers P4 bindet, beinhalten. Vorzugsweise kann dabei der Primer P2 markiert sein, doch können als Alternative die Primer P4 und P5 markiert sein. Der Kit kann ebenso eine Referenznukleinsäure, die mit Ausnahme des möglichen Vorhandenseins eines Unterschieds, wie beispielsweise einer Mutation, einer Zielnukleinsäuresequenz entspricht, sowie Reagentien zur Durchführung einer Amplifikation von Zielnukleinsäuresequenz, vor der Behandlung der Zielnukleinsäuresequenz mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung beinhalten. Ebenso kann der Kit Nukleosidtriphosphate und eine Nukleotidpolymerase beinhalten. Ferner kann der Kit wie oben beschriebene Partikel, die an die Markierung auf wenigstens einen der Primer binden können, beinhalten. Ferner kann der Kit Mitglieder eines signalproduzierenden Systems und ebenso verschiedene gepufferte Medien beinhalten, von denen einige ein oder mehrere der obigen Reagentien enthalten können. Vorzugsweise sind die Primer, besonders bevorzugt wenigstens alle obigen Komponenten mit Ausnahme des Puffers in einem einzigen Behälter abgepackt.

[0148] Die relativen Mengen der verschiedenen Reagentien in den Kits lassen sich in einem weiten Bereich variieren, um für Reagenskonzentrationen zu sorgen, die die Reaktionen, die während des vorliegenden Verfahrens ablaufen müssen, weitgehend optimieren, und um weiterhin die Empfindlichkeit des Verfahrens beim Nachweisen einer Mutation weitgehend zu optimieren. Unter entsprechenden Umständen können eines oder mehrere der Reagentien in dem Kit als Trockenpulver, üblicherweise in lyophilisierter Form, einschließlich Hilfsstoffe, die bei Auflösung für eine Reagenslösung mit den zur Durchführung eines Verfahrens oder Tests im Sinne der vorliegenden Erfindung geeigneten Konzentrationen sorgen, bereitgestellt werden. Dabei kann jedes Reagens in getrennten Behältern abgepackt sein, oder einige oder alle Reagentien können in einem Behälter kombiniert sein, falls dies im Hinblick auf Kreuzreaktivität und Haltbarkeit gestattet ist. In einer besonderen Ausführungsform eines Kits im Sinne der vorliegenden Erfindung sind die Reagentien in einem einzigen Behälter abgepackt. Die Kits können ebenso eine schriftliche Beschreibung eines Verfahrens im Sinne der vorliegenden Erfindung, wie oben beschrieben, beinhalten.

Beispiele

[0149] Die Erfindung wird weiter anhand der folgenden veranschaulichenden Beispiele demonstriert. Die Temperaturen sind in Grad Celsius (°C) angegeben, und Anteile sowie Prozentangaben beziehen sich auf Gewicht, wenn nicht anders angegeben. Die folgenden Definitionen und Abkürzungen werden hier verwendet:

Tris	– Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl (10X-Lösung) von BioWhittaker, Walkersville, MD.
Acc-Ab _{Dig}	– An den Anti-Digoxin-Antikörper gekoppelte Akzeptorkügelchen zur Verwendung in einem induzierten Lumineszenztest
Sens-Sav	– An Streptavidin gekoppelte Sensitizer-Kügelchen zur Verwendung in einem induzierten Lumineszenztest
BSA	– Rinderserumalbumin von Gibco BRL, Gaithersburg MD
Bp	– Basenpaare
wt (+)	– Wildtypallel
mut (–)	– Mutantenallel
+/+	– Homozygote mit 2 Normalallelen
–/–	– Homozygote mit 2 Mutantenallelen
+/–	– Heterozygote mit 1 Normal- und einem Mutantenallel
Zielprobe	– auf das Vorhandensein einer Mutation zu testende DNA-Probe;
Referenzprobe	– eine für die wt-Sequenz, die für ein Challenge von Zielproben verwendet wird, homozygote DNA-Probe.
s	– Sekunden
Std.	– Stunden
min	– Minuten
Puffer A	– 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei RT), 50 mM KCl, 4 mM MgCl ₂ , 200 µg/ml BSA
Puffer B	– 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei RT), 50 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 200 µg/ml BSA
Puffer C	– 0,1 M Tris, 0,3 M NaCl, 25 mM EDTA, 0,1 % BSA, 0,1 % Dextran
T-500,	eine 1:320-Verdünnung von Maus-IgG (HBR-1 von Scantibodies Laboratory Inc., Los Angeles, CA), 0,05 % Kathon (Rohm and Haas, Philadelphia, PA), und 0,01 % Gentamycin-sulfat.
RLU	– relative Lichteinheiten
nt	– Nukleotide
MAD	– Maleimidylaminodextran
Ab	– Antikörper
Sav	– Streptavidin
MOPS	– 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
Std.	– Stunde
sulfo-SMCC	– 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäuresulfosuccinimidylester
NHS	– N-Hydroxysuccinimid
EDAC	– 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
DMSO	– Dimethylsulfoxid
MES	– Morpholinoethansulfonat
UpM	– Umdrehungen pro min
EDTA	– Ethylendiamintetraessigsäure
SATA	– S-Acetylthioessigsäure-N-succinimidylester
BSA	– Rinderserumalbumin von Sigma Chemical Company, St. Louis MO
eq	– Äquivalente
Bp	– Basenpaare
A ₂₈₀	– Absorption bei einer Wellenlänge von 280 Nanometern
DexAl	– Dextranaldehyd
DPP	– 4,7-Diphenylphenanthrolin
Eu(TTA) ₃	– Europium-tri-3-(2-thienoyl)-1,1,1-trifluoracetat
L oder l	– Liter

exo VII	– Exonuklease VII aus E.coli (von Amersham Life Science) (USB).
DMF	– Dimethylformamid
THF	– Tetrahydrofuran
MS	– Massenspektroskopie
NMR	– Kernmagnetresonanzspektroskopie
TMSCI	– Tetramethylsilylchlorid
ELISA	– enzyme linked immunosorbent assay, wie in "Enzyme-Immunoassay", Edward T. Maggio, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1980), beschrieben

[0150] Monoklonale Antikörper wurden mittels Standard-Hybridzellentechnologie produziert. Kurz gesagt wurde das entsprechende Immunogen in einen Wirt, üblicherweise eine Maus oder ein anderes geeignetes Tier, injiziert und nach einem geeigneten Zeitraum wurden die Milzzellen aus dem Wirt gewonnen. Als Alternative wurden nichtsensitivierte Zellen aus dem Wirt isoliert und direkt mit dem Immunogen in vitro sensitiviert. Die Hybridzellen wurden gebildet, indem die obigen Zellen mit einer entsprechenden Myelomzelllinie fusioniert und die fusionierten Zellen kultiviert wurden. Die von den kultivierten Hybridzellen produzierten Antikörper wurden einem Screening auf ihre Bindungsaffinität zu dem jeweiligen Antigen, dig-BSA-Konjugat unterzogen. Dabei wurden eine Reihe von Screening-Techniken eingesetzt, wie z.B. ELISA-Screens. Ausgewählte Fusionen wurden danach umklontiert.

Herstellung von Kügelchen zur Verwendung in einem induzierten Lumineszenztest

ACC-Ab_{Dig} – An den Anti-Digoxin-Antikörper gekoppelte Akzeptorkügelchen

[0151] (mit 377 Antikörpermolekülen pro Kügelchen) mit entweder (1) Eu(TTA)₃DPP und C-28-Thioxen (Eu Beads) oder (2) C-28-Thioxen, 1-C₁-BPEA, und Rubren (TAR Beads) wurden in den folgenden Beispielen verwendet. Beispiele 1-3 wurden mit anti-Dig-gekoppelten Eu Beads durchgeführt. Die restlichen Beispiele wurden mit anti-Dig-gekoppelten TAR Beads durchgeführt. Diese Kügelchen wurden wie folgt hergestellt:

Herstellung von C-28-Thioxen:

[0152] Zu einer Lösung von 4-Bromanilin (30 g, 174 mmol) in trockenem DMF (200 ml) wurden 1-Bromtetradekan (89,3 ml, 366 mmol) sowie N,N-Diisopropylethylamin (62,2 ml, 357 mmol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde 16 Std. bei 90 °C unter Argon erhitzt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu dieser Reaktionslösung wurden wiederum 1-Bromtetradekan (45 ml, 184 mmol) und N,N-Diisopropylethylamin (31 ml, 178 mmol) gegeben, und das Reaktionsgemisch wurde weitere 15 Std. bei 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung im Vakuum konzentriert und der Rückstand mit CH₂Cl₂ (400 ml) verdünnt. Die CH₂Cl₂-Lösung wurde mit 1N wässrigem NaOH (2x), H₂O und Sole gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum unter Erhalt eines dunkelbraunen Öls (etwa 110 g) konzentriert. Eine präparative Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Waters-500-Prep-LC-System ergab bei Elution mit Hexan ein gelbes Öl, das vorwiegend das Produkt (4-Brom-N,N-di-(C₁₄H₂₉)-anilin) zusammen mit einem Nebenbestandteil 1 Bromtetradekan enthielt. Die letztere Verbindung wurde aus dem Gemisch mittels Vakuumdestillation (Kp. 105-110 °C, 0,6 mm) unter Zurücklassen von 50,2 g (51 %) des Produkts als braunes Öl abgetrennt. Zu einem Gemisch aus Magnesiumspänen (9,60 g, 395 mmol) in trockenem THF (30 ml) unter Argon wurde eine Lösung des obigen substituierten Anilinprodukts (44,7 g, 79 mmol) in THF (250 ml) getropft. Um die Bildung des Grignard-Reagens zu starten, wurden einige Iodkristalle zugegeben. Sobald das Reaktionsgemisch sich erwärmte und unter Rückfluß zu kochen begann, wurde die Zugabegeschwindigkeit so reguliert, daß ein leichter Rückfluß beibehalten wurde. Nach Beendigung der Zugabe wurde das Gemisch am Rückfluß für eine weitere Stunde erhitzt. Die abgekühlte Überstandslösung wurde über eine Kanüle in einen Zugabetrichter überführt und dann (über 2,5 Std.) zu einer Lösung von Phenylglyoxal (11,7 g, 87 mmol) in THF (300 ml) bei –30 °C unter Argon zuge tropft. Das Reaktionsgemisch wurde über 1 Std. nach und nach auf 0 °C erwärmt und weitere 30 min gerührt. Das erhaltene Gemisch wurde in ein Gemisch aus Eiswasser (800 ml) und Essigester (250 ml) gegossen. Die organische Phase wurde getrennt und die wässrige Phase mit Essigester (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O (2x) und Sole gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurden 48,8 g des Rohprodukts als dunkelgrüne ölige Flüssigkeit erhalten. Eine Flash-Säulenchromatographie dieser Flüssigkeit (Gradientenelution mit Hexan, 1,5:98,5, 3:97, 5:95 Essigester:Hexan) ergab 24,7 g (50 %) des Benzoinprodukts (MS (C₄₂H₆₉NO₂): [M-H]⁺ 618,6, ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) stimmte mit dem erwarteten Benzoinprodukt überein). Zu einer Lösung des obigen Benzoinprodukts (24,7 g, 40 mmol) in trockenem Toluol (500 ml) wurden nacheinander 2-Mercaptoethanol (25 g, 320 mmol) und TMSCI (100 ml, 788 mmol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde am Rückfluß 23 Std. unter Argon erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Dazu wurde wiederum TMSCI (50 ml, 394 mmol) zugegeben; und die Reakti-

onslösung wurde weitere 3 Std. am Rückfluß erhitzt. Die erhaltene Lösung wurde abgekühlt, mit kalter 2,5N wäßriger NaOH-Lösung alkalisch gemacht und mit CH_2Cl_2 (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Schichten wurden mit gesättigtem wäßrigem NaHCO_3 (2x) und Sole gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum unter Erhalt einer braunen öligen Flüssigkeit konzentriert. Die präparative Säulenchromatographie an Kieselgel unter Verwendung eines Waters-500-Prep-LC-Systems (Gradientenelution mit Hexan, 1:99, 2:98 Essigester:Hexan) lieferte 15,5 g (60 %) des C-28-Thioxens als orange-gelbes Öl (MS ($\text{C}_{44}\text{H}_{71}\text{NOS}$): $[\text{M}-\text{H}]^+$ 661,6, $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) stimmte mit dem erwarteten C-28-Thioxenprodukt 2-(4-(N,N-Di-($\text{C}_{14}\text{H}_{29}$)-anilino)-3-phenylthio)phenol überein.

Herstellung von Carboxylakzeptorkügelchen mit $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$ und C-28-Thioxen (Eu-Beads):

[0153] Die Ausgangskügelchen bestanden aus Carboxylat-modifiziertem Latex, bezogen von Seradyn Particle Technology, Indianapolis, IN. Die Kügelchen enthielten $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$, das wie folgt hergestellt wurde: $\text{DPP}/\text{Eu}(\text{TTA})_3$ wurde hergestellt, indem 8,69 g $\text{Eu}(\text{TTA})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (10 mmol, Kodak Chemical Company, Rochester NY) und 1,8 g 1,10-Phenanthrolin (10 mmol, Aldrich) in 50 ml trockenem Toluol zusammengegeben und 1 Stunde in einem Ölbad auf 95 °C erwärmt wurden. Das Toluol wurde unter vermindertem Druck abgetrennt. Der aschefarbene Feststoff wurde aus 10 ml Toluol unter Erhalt von 10 g $\text{DPP}/\text{Eu}(\text{TTA})_3$ kristallisiert. Absorptionsspektrum: 270 nm (20 000), 340 nm (60 000) (Toluol) 1.R(KBr): Cm^{-1} : 3440(s), 1600(s), 1540(s), 1400(s), 1300(s). Vier ml einer 20%igen Suspension (400 mg) von gewaschenen 175-nm-großen Carboxylat-modifizierten Latexkügelchen wurden mit 3 ml Ethoxyethanol in einem 25-ml-Rundkolben mit einem Rührstäbchen verdünnt. Der Rundkolben wurde danach in ein Ölbad bei 105 °C gestellt und 10 Minuten gerührt. Danach wurden 3,3 mM C-28-Thioxen und 15,5 mM $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$ zugegeben; die Kügelchen wurden weitere 5 Minuten gerührt. An dieser Stelle wurden 1,0 ml 0,1 N NaOH langsam über 5 Minuten zugegeben. Die Ölbadtemperatur wurde während der gesamten Zugaben bei 105 °C gehalten. Danach ließ man die Ölbadtemperatur über 2 Stunden langsam auf Raumtemperatur absinken. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch mit 20 ml Ethanol verdünnt und zentrifugiert (12 500 UpM, 30 Minuten). Die Überstände wurden verworfen und die Sedimente in Ethanol mittels Ultraschall resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und das Sediment in Wasser resuspendiert, wonach die Zentrifugation wiederholt wurde. Das Sediment wurde in 5 ml wäßrigem Ethanol in einem Endvolumen von 40 ml resuspendiert.

Herstellung von TAR Beads:

[0154] Es wurde die folgende Farbstoffzusammensetzung eingesetzt: 20% C-28-Thioxen (wie oben beschrieben hergestellt), 1,6% 1-Chlor-9,10-bis(phenylethynyl)anthracen (1-Cl-BPEA) (von Aldrich Chemical Company) sowie 2,7% Rubren (von Aldrich Chemical Company). Bei den Partikeln handelte es sich um Latexpartikel (Seradyn Particle Technology, Indianapolis, IN). Die Farbstoffzusammensetzung (240-250 mM C-28-Thioxen, 8-16 mM 1-C1-BPEA, und 20-30 mM Rubren) wurde in die Latexkügelchen auf ähnliche Weise, wie im US-Patent 5,340,716, erteilt am 23. August 1994 (das '716-Patent), Spalte 48, Zeilen 24-45 beschrieben, eingebaut. Der Färbeprozess beinhaltete die Zugabe der Latexkügelchen (10% Feststoffe) in ein Gemisch aus Ethylenglykol (65,4%), 2-Ethoxyethanol (32,2%) und 0,1 N NaOH (2,3%). Die Kügelchen wurden gemischt und 40 Minuten unter ständigem Rühren bei 95°C erhitzt. Während die Kügelchen erhitzt wurden, wurden die drei Chemilumineszenzfarbstoffe in 2-Ethoxyethanol durch 30minütiges Erhitzen auf 95°C unter ständigem Rühren gelöst. Am Ende der beiden Inkubationen wurde die Farbstofflösung in die Kügelchensuspension gegossen und das erhaltene Gemisch weitere 20 Minuten unter ständigem Rühren inkubiert. Nach der 20minütigen Inkubation wurden die Kügelchen aus dem Ölbad genommen und auf 40°C \pm 10°C abkühlen gelassen. Anschließend wurden die Kügelchen durch ein Polyesterfilter mit einer Maschenweite von 43 Mikrometer geleitet und gewaschen. Die gefärbten Partikel wurden unter Verwendung eines Microgon-Geräts (Microgon Inc., Laguna Hills, CA) gewaschen. Die Kügelchen wurden dabei zunächst mit einem aus Ethylenglykol und 2-Ethoxyethanol (70%/30%) bestehenden Lösungsmittelgemisch gewaschen, und zwar mit 500 ml Lösungsmittelgemisch pro Gramm Kügelchen. Anschließend erfolgt ein Waschschrift mit 10% wäßrigem Ethanol (pH 10-11). Dabei betrug das Waschvolumen 400 ml pro Gramm Kügelchen. Anschließend wurden die Kügelchen gesammelt und auf % Feststoff, Farbstoffgehalt, Partikelgröße, Signal- und Hintergrundherzeugung getestet.

Herstellung von mit Maleimidylaminodextran (MAD) beschichteten Akzeptorkügelchen:

[0155] Hydroxypropylaminodextran (1NH₂/7-Glucose) wurde durch Lösen von Dextran-T-500 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) (50 g) in 150 ml H₂O in einem mit einem mechanischen Rührer und Tropftrichter ausgestatteten Dreihalsrundkolben hergestellt. Zu der obigen Lösung wurden 18,8 g $\text{Zn}(\text{BF}_4)_2$ zugegeben und die Temperatur mit einem Heißwasserbad auf 87 °C gebracht. Epichlorhydrin (350 ml) wurde unter Rühren über etwa 30 min zugetropft, während die Temperatur auf 87-88 °C gehalten wurde. Das Gemisch wurde 4 Std. ge-

rührt, während die Temperatur zwischen 80 und 95 °C gehalten wurde, und das Gemisch wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Chlordextranprodukt wurde durch langsames Gießen in 3 l Methanol unter kräftigem Rühren ausgefällt, durch Filtration gewonnen und über Nacht in einem Vakuumofen getrocknet.

[0156] Das Chlordextranprodukt wurde in 200 ml Wasser gelöst und zu 2 l konzentriertem wässrigem Ammoniak (36%) gegeben. Diese Lösung wurde 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt, danach auf etwa 190 ml an einem Rotationsverdampfer eingengt. Das Konzentrat wurde in zwei gleiche Teile geteilt, wobei jeder Teil durch langsames Gießen in 2 l Methanol unter schnellem Rühren ausgefällt wurde. Das Endprodukt wurde durch Filtration gewonnen und im Vakuum getrocknet.

[0157] Das oben hergestellte Hydroxypropylaminodextran (1 NH₂/7-Glucose) wurde in 50 mM MOPS, pH 7,2, bei 12,5 mg/ml gelöst. Die Lösung wurde 8 Std. bei Raumtemperatur gerührt, unter Kühlen gelagert und 45 min bei 15 000 UpM in einer Sorvall-RC-5B-Zentrifuge unmittelbar vor Gebrauch zentrifugiert, um Spuren von festem Material zu entfernen. Zu 10 ml dieser Lösung wurden 23,1 mg Sulfo-SMCC in 1 ml Wasser gegeben. Dieses Gemisch wurde 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert und ohne weitere Reinigung verwendet.

[0158] Die oben hergestellten Carboxylakzeptorkügelchen (99 mg in 4,5 ml Wasser) wurden langsam an einem Vortex-Mixer zu 5,5 ml des obigen MAD-Aminodextrans gegeben und anschließend mit 1 ml 200 mg/ml NHS in 50 mM MES, pH 6, 1 ml 200 mg/ml EDAC in Wasser und 450 µl 1 M HCl, pH-Endwert 6, versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und danach mit 200 mg Bernsteinsäureanhydrid in 0,5 ml DMSO 30 min bei Raumtemperatur umgesetzt. Danach wurde frisch geöffnetes Surfact-Amps Tween-20 (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois) zugegeben und die Kügelchen wurden 30 min bei 15 000 UpM in einer Sorvall-RC-5B-Zentrifuge zentrifugiert, durch Zentrifugation mit drei 10 ml-Portionen von 50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 0,1 % Surfact-Amps Tween-20 (Pierce Chemical Company), pH 7,2, gewaschen und in 3 ml der gleichen Lösung resuspendiert.

Kopplung von MAD-beschichteten Kügelchen an monoklonalen Anti-Digoxin-Antikörper

[0159] Der monoklonale Anti-Digoxin Ab (wie oben beschrieben hergestellt) wurde mit ABx-Harz (Baker Chemical Company, Phillipsburg, NJ) gereinigt und in 0,15 M NaCl, 5 mM Na₂HPO₄, pH 7,4, dialysiert. Der Anti-Digoxin Ab wurde thioliert, indem 622 µl (4,28 mg) mit 10,2 µl SATA (1,25 mg/ml in Ethanol, 2 eq.) gemischt, 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert und in der Kälte gegen 2x2 l 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, pH 7, dialysiert wurden. Der thioacetylierte Antikörper wurde durch Zugabe von 62,2 µl Hydroxylamin (1 M H₂NOH, 50 mM MOPS, 25 mM EDTA, pH 7), Durchleiten von Argon und 1stündigem Inkubieren bei Raumtemperatur deacetyliert. Das Produkt wurde auf eine Pharmacia-PD-10-Säule (G-25) aufgetragen und mit 50 mM MOPS, 50 mM EDTA, pH 7,2, unter Durchleiten von Argon eluiert. Nach 2,5 ml Vorlauf wurden drei 1-ml-Fractionen gesammelt und vereinigt. Es wurden 3,66 mg oder 86 % (nach A₂₈₀) Antikörper erhalten. Surfact-Amps Tween-20 (10 %) wurde zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 0,2 % erhalten wurde.

[0160] Ein 1,4-ml-Aliquot des obigen thiolierten Antikörpers (1,71 mg Antikörper) wurde sofort zu 300 µl (10 mg) der oben hergestellten maleimidierten Kügelchen zusätzlich zu genügend 10 % Tween-20 zum Erreichen einer Endkonzentration im Gemisch von 0,2 % zugegeben. Das Röhrchen wurde mit Argon gespült und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden 3,4 µl 1 M HSCH₂COOH in Wasser zugegeben. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurden 6,8 µl ICH₂COOH (1 M in Wasser) zugegeben. Nach 30 min wurden 3,5 ml 0,17 M Glycin, 0,1 M NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20, 10 mg/ml BSA, pH 9,2, zugegeben und die Kügelchen zentrifugiert (30 min bei 15 000 UpM), 3 Std. in 5 ml des gleichen Puffers inkubiert, zentrifugiert, durch Zentrifugation mit drei 5-ml-Portionen Puffer C gewaschen, in 5 ml Puffer C resuspendiert und unter Kühlen gelagert. Die Größe der Kügelchen wurde in Puffer C bestimmt und betrug 301 ± 56 nm. Die Bindungskapazität wurde mit ¹²⁵I-Digoxin bestimmt und entsprach 377 Antikörpermolekülen pro Kügelchen.

Herstellung von mit Streptavidin beschichteten Sensitizer-Kügelchen (Sens-Sav)

[0161] Silicium-tetra-t-butylphthalocyanin wurde wie folgt hergestellt:

Frisch geschnittenes Natriummetall (5,0 g, 208 mmol) wurde zu 300 ml wasserfreiem Ether in einem Zwei-Liter-Dreihalskolben, ausgestattet mit einem Magnetrührer, Rückflußkühler, einem Trockenröhrchen und einem Gasblubberer, gegeben. Nach vollständigem Lösen des Natriums wurde 4-t-Butyl-1,2-dicyanobenzol (38,64 g, 210 mmol, von TCI Chemicals, Portland, OR) über einen Trichter zugegeben. Das Gemisch wurde klar, wobei die Temperatur auf etwa 50 °C anstieg. An dieser Stelle wurde ein kontinuierlicher Strom von wasserfreiem Ammoniakgas durch den Glasblubberer über 1 Std. in das Reaktionsgemisch eingeleitet. Das Reaktionsgemisch wurde dann 4 Std. am Rückfluß gekocht, während weiterhin Ammoniakgas zugeströmt wurde. Während

des Verlaufs der Umsetzung begann ein Feststoff auszufallen. Die erhaltene Suspension wurde bis zur Trockne eingeeengt (Hausvakuum) und der Rückstand in Wasser (400 ml) aufgenommen und filtriert. Der Feststoff wurde getrocknet (60 °C, Hausvakuum, P₂O₅). Die Ausbeute des Produkts (1,3-Diiminoisindolin, 42,2 g) war fast quantitativ. Dieses Material wurde für den nächsten Schritt ohne weitere Reinigung verwendet. In einen Ein-Liter-Dreihalskolben, ausgestattet mit einem Kühler und einem Trockenröhrchen, wurde das obige Produkt (18 g, 89 mmol) sowie Chinolin (200 ml, Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO) gegeben. Siliciumtetrachlorid (11 ml, 95 mmol, Aldrich Chemical Company) wurde mit einer Spritze zu der gerührten Lösung über einen Zeitraum von 10 Minuten zugegeben. Nach Beendigung der Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf 180-185 °C 1 Std. in einem Ölbad erhitzt. Man ließ die Reaktion auf Raumtemperatur abkühlen und versetzte danach sorgfältig mit konzentrierter HCl, um das Reaktionsgemisch anzusäuern (pH 5-6). Das dunkelbraune Reaktionsgemisch wurde abgekühlt und filtriert. Der Feststoff wurde mit 100 ml Wasser gewaschen und getrocknet (Hausvakuum, 60 °C, P₂O₅). Das feste Material wurde in einen Ein-Liter-Rundkolben gegeben und unter Rühren mit konzentrierter Schwefelsäure (500 ml) versetzt. Das Gemisch wurde 4 Std. bei 60 °C gerührt und danach vorsichtig mit zerstoßenem Eis (2000 g) verdünnt. Das erhaltene Gemisch wurde filtriert und der Feststoff mit 100 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Der dunkelblaue Feststoff wurde in einen 1-Liter-Rundkolben überführt, mit konzentriertem Ammoniak (500 ml) versetzt, und das Gemisch wurde am Rückfluß unter Rühren 2 Std. gekocht, auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Der Feststoff wurde mit 50 ml Wasser gewaschen und im Vakuum (Hausvakuum, 60 °C, P₂O₅) unter Erhalt von 12 g des Produkts Silicium-tetra-t-butylphthalocyanin als dunkelblauen Feststoff getrocknet. 12 g des obigen Produkts wurden mit 3-Picolin (12 g, von Aldrich Chemical Company), Tri-n-butylamin (wasserfrei, 40 ml) und Tri-n-hexylchlorsilan (11,5 g) in einem Ein-Liter-Dreihalskolben, ausgerüstet mit einem Magnetrührer und einem Rückflußkühler, versetzt. Das Gemisch wurde am Rückfluß 1,5 Std. gekocht und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Picolin wurde im Hochvakuum (Ölpumpe bei etwa 1 mm Hg) zur Trockne abdestilliert. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ gelöst und unter Verwendung einer Kieselgelsäule (Hexan) unter Erhalt von 10 g reinem Produkt Di-(tri-n-hexylsilyl)silicium-tetra-t-butylphthalocyanin als dunkelblauen Feststoff gereinigt. (MS: [M-H]⁺ 1364,2, Absorptionsspektren: Methanol: 674 nm (ε 180 000); Toluol 678 nm; ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ: -2,4 (m, 12 H), -1,3 (m, 12 H), 0,2-0,9 (m, 54 H), 1,8 (s, 36 H), 8,3 (d, 4 H) und 9,6 (m, 8 H) stimmte mit dem obigen erwarteten Produkt überein.

[0162] An Streptavidin gekoppelte Sensitizer-Kügelchen (2300 Sav/Kügelchen).

[0163] Die Sensitizer-Kügelchen wurden hergestellt, indem 600 ml Carboxylat-modifizierte Kügelchen (Sera-dyn) in einen Dreihalsrundkolben, ausgerüstet mit einem mechanischen Rührer, einem mit einem Thermometer versehenen Glasstopfen in einem Hals sowie einem Trichter im gegenüberliegenden Hals, gegeben wurden. Der Kolben war zuvor in ein bei 94±1 °C gehaltenes Ölbad getaucht worden. Die Kügelchen wurden durch den Trichter im Hals in den Kolben gegeben und der Behälter für die Kügelchen mit 830 ml Ethoxyethanol, 1700 ml Ethylenglykol und 60 ml 0,1 N NaOH gespült, wobei die Spüllösung über den Trichter in den Kolben gegeben wurde. Der Trichter wurde durch ein 24-40 Gummiseptum ersetzt. Die Kügelchen wurden bei 765 UpM und einer Temperatur von 94±1 °C 40 min gerührt.

[0164] Silicium-tetra-t-butylphthalocyanin (10,0 g, wie oben hergestellt) wurde in 300 ml Benzylalkohol bei 60±5 °C gelöst, und 85 ml wurden in den obigen Rundkolben über das Septum mittels einer auf 120±10 °C erwärmten Spritze mit einer Geschwindigkeit von 3 ml pro min gegeben. Die verbliebenen 85 ml der Phthalocyaninlösung wurden dann wie oben beschrieben zugegeben. Die Spritze und der das Phthalocyanin ursprünglich enthaltende Kolben wurden mit 40 ml Benzylalkohol gespült und in den Rundkolben übertragen. Nach 15 min wurden 900 ml entionisiertes Wasser und 75 ml 0,1 N NaOH über 40 min zugetropft. Man ließ die Temperatur des Ölbad langsam auf 40±10 °C absinken, woraufhin das Rühren abgebrochen wurde. Die Kügelchen wurden dann durch ein 43-Mikron-Polyesterfilter filtriert und danach einer Filtrationsapparatur mit tangentialer Strömung von Microgon (Microgon Inc., Laguna Hills, CA) unter Verwendung von Ethanol:Wasser, 100:0 zu 10:90 zugeführt und danach durch ein 43-Mikron-Polyesterfilter filtriert.

[0165] Sulfo-SMCC (11,55 mg) wurde in 0,5 ml destilliertem Wasser gelöst. Die obige Lösung wurde langsam über 10 s zu 5 ml gerührter Aminodextranlösung (12,5 mg/ml in 50 mM MOPS, pH 7,2; Aminodextran von Molecular Probes, Eugene, Oregon) gegeben. Das Gemisch wurde 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.

[0166] Die obige gerührte Lösung wurde mit 5 ml 20 mg/ml (100 mg) der oben hergestellten Sensitizer-Kügelchen in destilliertem Wasser versetzt, danach mit 1 ml 200 mg/ml NHS (frisch hergestellt in 50 mM MES, pH mit 6 N NaOH auf 6,0 eingestellt). 200 mg EDAC wurden in 1 ml destilliertem Wasser gelöst, und diese Lösung wurde langsam unter Rühren zu den Sensitizer-Kügelchen gegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 450 µl 1 N HCl auf 6,0 eingestellt und das Gemisch über Nacht im Dunkeln inkubiert. Eine Lösung aus

100 mg Bernsteinsäureanhydrid in 0,5 ml DMSO wurde zu den Sensitizer-Kügelchen gegeben und das Gemisch 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zu diesem Gemisch gab man 0,13 ml 10 % Tween-20, wobei eine Tween-20-Endkonzentration von 0,1 % erreicht wurde. Die Kügelchen wurden 45 min bei 15 000 UpM wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Kügelchen in 10 ml Puffer (50 mM MOPS, 50 mM EDTA und 0,1 % Tween-20, pH 7,2) resuspendiert. Das Gemisch wurde zur Verteilung der Kügelchen mit Ultraschall behandelt. Die Kügelchen wurden wie oben beschrieben 30 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Kügelchen danach resuspendiert. Dieses Verfahren wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach wurden die Kügelchen auf 40 mg/ml in 2,5 ml des obigen Puffers resuspendiert, mit Argon gesättigt, und Tween-20 wurde mit einer Endkonzentration von 0,1 % zugegeben. Die Kügelchen wurden bei 4 °C gelagert.

[0167] Streptavidin wurde an die obigen Kügelchen gebunden, wobei für 100 mg Kügelchen 25 mg Streptavidin eingesetzt wurden. 25 mg Streptavidin (50 mg Aston-Feststoff von Aston, Wellesley, MA) wurden in 1 ml 1 mM EDTA, pH 7,5, gelöst und anschließend mit 77 µl 2,5 mg/ml SATA in Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde eine Deacetylierungslösung hergestellt, die 1 M Hydroxylamin-HCl, 50 mM Na₂PO₄, 25 mM EDTA, pH 7,0, enthielt. 0,1 ml dieser Deacetylierungslösung wurden zu der obigen Lösung gegeben und 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Das erhaltene thiolierte Streptavidin wurde an einer Pharmacia-PD10-Säule gereinigt und mit einem Säulenpuffer, der 50 mM MOPS, 50 mM EDTA, pH 7,2, enthielt, gewaschen. Das Volumen der Probe wurde auf 2,5 ml gebracht, indem 1,5 ml des obigen Säulenpuffers zugegeben wurden. Die Probe wurde auf die Säule geladen und mit 3,5 ml des Säulenpuffers eluiert. Das thiolierte Streptavidin wurde durch Zugabe von 1,5 ml 50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 0,1 % Tween-20, pH 7,2, auf 5 ml verdünnt. 5 ml der thiolierten Streptavidinlösung wurden zu 5 ml Sensitizer-Kügelchen unter Argon gegeben und gut gemischt. Die Kügelchen wurden 1 min mit Argon überschichtet, wonach das Röhrchen verschlossen und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurde.

[0168] Die obigen Kügelchen wurden mit 7,5 ml 50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 0,1 % Tween-20, pH 7,2, versetzt, um die Kügelchen auf 1 mg/ml zu bringen. Die verbliebenen Maleimide wurden einem Capping unterzogen, indem Mercaptoessigsäure mit einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben wurde. Das Gemisch wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Die verbliebenen Thiole wurden einem Capping unterzogen, indem Iodessigsäure mit einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben wurde, und das Gemisch wurde 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kügelchen wurden 30 min bei 15 000 UpM wie oben insgesamt dreimal zentrifugiert.

Beispiel 1

[0169] In diesem Beispiel wurde eine 3-Bp-Deletion, ΔF508, im Exon 10 (die am häufigsten auftretende Mutation) des menschlichen Gens für zystische Fibrose (CFTR) untersucht.

[0170] Menschliche genomische DNA-Proben (50 ng) (von Roche Molecular Systems, Alameda CA, außer ΔF508/ΔF508-Homozygote (–/–), die vom Coriell Institute for Medical Research, Camden NJ, stammt) wurden mittels PCR mit den folgenden Primern amplifiziert:

Primer PX2: 5'-CAAGTGAATCCTGAGCGTGA-3' (SEQ ID NO. 1) und

Primer PX1: 5'-CTAACCGATTGAATATGGAGCC-3' (SEQ ID NO. 2)

[0171] Beide Primer stammten von Oligos Etc., Inc. Wilsonville, OR. Die Amplifikation wurde in einem 96-Loch-Block eines UNO-Thermocycler-Geräts von Biometra, Tampa FL zur Erzeugung eines PCR-Produkts mit einer Länge von 340 Bp durchgeführt. Nach dem ersten Denaturierungsschritt (4 min bei 95°C) wurden 35 Zyklen von jeweils 30 s bei 94°C, 1 min bei 64°C und 1 min bei 72°C durchgeführt.

[0172] Die erhaltenen Amplifikate wurden 1:1000 verdünnt, und Portionen dieser Verdünnungen von jeweils 1 µl (pro 50 µl Reaktionsvolumen) wurden in einer zweiten PCR-Runde (20 Zyklen unter den gleichen Bedingungen wie in Schritt 1) unter Verwendung eines Gemischs der Primer P2B (oder P2D), P1 und P3 amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte weisen eine Länge von 220 Bp auf.

P2: 5'-CTCAGTTTCTGGATTATGCC-3' (SEQ ID NO. 3)

P2D: Digoxigenin-markierter P2 von Genosys Biotechnologies, Inc., Woodlands, TX

P2B: biotinylierter P2 von Oligos Etc., Inc., Wilsonville, OR

P1: 5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGCTAACCGATTGAATATGGAGCC-3' (SEQ ID NO. 4) von Oligos Etc., Inc., Wilsonville, OR.

P3: 5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTCTAACCGATTGAATATGGAGCC-3', (SEQ ID NO. 5) von Oligos Etc.,

Inc., Wilsonville, OR.

[0173] Die unterstrichenen Sequenzen repräsentieren den Schwanz B1 (für Primer P1) bzw. den Schwanz A1 (für Primer P3).

[0174] Pa als Teil der Primer P1 und P3 ist mit PX1 identisch.

[0175] WT1 unten wurde als Referenzprobe verwendet und mit den Primern P2D, P1 und P3 amplifiziert.

[0176] Alle Testproben wurden mit den Primern P2B, P1 und P3 amplifiziert.

[0177] Im nächsten Schritt (Branch Migration) wurden gleiche Volumen von Test- und Referenzamplifikaten gemischt und das Gemisch mit Mineralöl überschichtet. Der Reaktionsansatz wurde 1 min bei 95°C (Denaturierung) und danach 30 min bei 65°C erhitzt.

[0178] Der Nachweis wurde wie folgt durchgeführt:

Acc-Ab_{Dig}- und Sens-Sav-Kügelchen wurden mit verschiedenen Mengen der Branch-Migration-Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen von Testprobe zu Referenzprobe titriert, um eine lineare Antwort zu gewährleisten. Die Mengen der Komponenten waren wie folgt.

[0179] Eine 2-µl-Portion des Branch-Migration-Reaktionsansatzes wurde mit 100 µl Puffer B mit 5 µl (10 µg) Sens-Sav- und 5 µl (10 µg) Acc-Ab_{Dig}-Kügelchen kombiniert und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit einer 150-Watt-Xenonlampe 3 s bestrahlt (3 Zyklen von jeweils 1 s Belichtung und 1 s Wartezeit), wonach das Signal abgelesen wurde.

[0180] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Probe	Signal (RLU)
Leerwert	4790
WT1 (+/+)	19834
WT2 (+/+)	18530
WT3 (+/+)	19496
WT4 (+/+)	19972
WT5 (+/+)	18460
WT6 (+/+)	19380
WT7 (+/+)	17980
ΔF508/ΔF508-Homozygote (–/–)	1341990
WT/ΔF508-Heterozygote 1 (+/–)	524236
WT/ΔF508-Heterozygote 2 (+/–)	625440

Beispiel 2

Nachweis von Mutationen in Exon 10 des Gens für zystische Fibrose.

[0181] In diesem Beispiel wurden die markierten und mit Schwänzen versehenen Amplifikationsprodukte für die Branch-Migration direkt von genomischer DNA hergestellt.

[0182] Menschliche genomische DNA-Proben (50 ng) (von Roche Molecular Systems, Alameda CA, außer ΔF508/ΔF508-Homozygote (–/–), die vom Coriell Institute for Medical Research, Camden NJ, stammt) wurden mittels PCR mit den folgenden Primern amplifiziert:

P2: 5'-CTCAGTTTTCCTGGATTATGCC-3' (SEQ ID NO. 3)

P2D: Digoxygenin-markierter P2 von Genosys Biotechnologies, Inc., Woodlands, TX

P2B: biotinylierter P2 von Oligos Etc., Inc., Wilsonville, OR

P1: 5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGCTAACCGATTGAATATGGAGCC-3' (SEQ ID NO. 4) von Oligos Etc., Inc., Wilsonville, OR.

P3: 5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTCTAACCGATTGAATATGGAGCC-3', (SEQ ID NO. 5) von Oligos Etc., Inc., Wilsonville, OR.

[0183] Bei den unterstrichenen Sequenzen handelt es sich um die 5'-terminalen Anteile der Primer P1 und P3, die weder zu den Ziel- und Referenzsequenzen noch zueinander komplementär sind.

[0184] Testproben wurden mit den Primern P2B (oder P2D), P1 und P3 amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte weisen eine Länge von 220 Bp auf.

[0185] Die PCR-Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt: Die Amplifikation wurde in einem 96-Loch-Block eines UNO-Thermocycler-Geräts von Biometra, Tampa FL, USA, durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Nach dem ersten Denaturierungsschritt (4 min bei 95°C) wurden 35 Zyklen von jeweils 30 s bei 94°C, 1 min bei 64°C und 1 min bei 72°C durchgeführt.

[0186] Branch-Migration wurde wie folgt durchgeführt: jeweils 2 µl der Reaktionsansätze (nach PRC-Amplifikation) wurden kombiniert und mit 8 µl Puffer A mit 28 mM MgCl₂ versetzt (Endkonzentration: 20 mM MgCl₂). Der Reaktionsansatz wurde mit 5 µl Mineralöl überschichtet, 2 min bei 94°C zur Denaturierung der DNA und ferner 30 min bei 65°C zur Bildung partieller Duplexe und zum Strang austausch inkubiert.

[0187] Für den Nachweis des quadramolekularen Komplexes C wurde die folgende Vorschrift verwendet: ACC-Ab_{Dig}- und Sens-Sav-Kügelchen wurden mit verschiedenen Mengen der Branch-Migration-Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen von Testprobe zu Referenzprobe titriert, um eine lineare Antwort zu gewährleisten. Die optimalen Mengen der Komponenten waren wie folgt.

[0188] Eine 2-µl-Portion des Branch-Migration-Reaktionsansatzes wurde mit 100 µl Puffer B mit 5 µl (10 µg) Sens-Sav- und 5 µl (10 µg) Acc-Ab_{Dig}-Kügelchen kombiniert und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit einer 150-Watt-Xenonlampe 3 s bestrahlt (3 Zyklen von jeweils 1 s Belichtung und 1 s Wartezeit), wonach das Signal abgelesen wurde.

[0189] Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Probe	Signal (RLU)
Leerwert	7696
WT1 (+/+)	34980
WT2 (+/+)	34790
WT3 (+/+)	35166
WT4 (+/+)	32692
WT5 (+/+)	33846
WT6 (+/+)	38470
WT7 (+/+)	36374
ΔF508/ΔF508-Homozygote (–/–)	1824820
WT/ΔF508-Heterozygote 1 (+/–)	447710
WT/ΔF508-Heterozygote 2 (+/–)	812436

Beispiel 3

[0190] In diesem Beispiel wurde die in Beispiel 2 für den Nachweis der 3 Bp großen ΔF508-Deletion beschriebene vereinfachte direkte Vorschrift auf den Nachweis von 4 Punktmutationen in Exon 11 angewandt. Genomische DNA mit den folgenden Punktmutationen im Exon 11 des hier verwendeten CFTR-Gens:

Heterozygote DNA mit einem Wildtyp (wt)-Allel und einem der folgenden Mutantenallele:

G542X (G>T-Substitution) von Roche Molecular Systems, Alameda, Kalifornien;
 G551D (G>A-Substitution) von Roche Molecular Systems, Alameda, Kalifornien;
 R553X (C>T-Substitution) von Roche Molecular Systems, Alameda, Kalifornien;
 R560T (G>C-Substitution) von Roche Molecular Systems, Alameda, Kalifornien;

Homozygote DNA:

G542X/G542X von Coriell Institute for Medical Research, Camden, N.J.

[0191] Zur direkten Herstellung von Amplifikationsprodukten für Branch-Migration von genomischer DNA wurden zwei unterschiedliche Paare von markierten und mit Schwänzen versehenen Primern verwendet:

Primersatz I:

Primer P2: 5'-TAGAAGGAAGATGTGCCTTTCA-3' (SEQ ID NO. 6)

P2D bzw. P2B: Digoxigenin- und Biotin-markierter P2.

Primer P1: 5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGTTCTTAACCCACTAGCCATAA A-3' (SEQ ID NO. 7)

Primer P3: 5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTTTCTTAACCCACTAGCCATAA A-3' (SEQ ID NO. 8)

[0192] Die unterstrichene Sequenz repräsentiert den 5'-terminalen Anteil der Primer P1 und P3, die weder zur Ziel- oder Referenzsequenz noch zueinander komplementär sind.

Primersatz II:

Primer P2: 5'-TTACATTAGAAGGAAGATGTGCCT-3' (SEQ ID NO. 9)

P2D bzw. P2B: Digoxigenin- bzw. Biotin-markierter P2.

Primer P1: 5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGGTGATTCTTAACCCACTA GCCA-3' (SEQ ID NO. 10)

Primer P3: 5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTGTGATTCTTAACCCACTA GCCA-3' (SEQ ID NO. 11)

[0193] Die unterstrichene Sequenz repräsentiert den 5'-terminalen Anteil der Primer P1 und P3, der weder zur Ziel- oder Referenzsequenz noch zueinander komplementär ist.

[0194] Alle Primer stammten von Oligos Etc., Inc., Wilsonville, OR.

[0195] Die PCR von genomischer DNA, Branch-Migration und der Nachweis wurden genau wie in Beispiel 2 beschrieben durchgeführt (es wurden 37 PCR-Zyklen ausgeführt). Die erhaltenen PCR-Produkte wiesen eine Länge von 333 Bp bzw. 343 Bp auf.

[0196] WT1 unten wurde als Referenzprobe verwendet und mit den Primern P2D, P1 und P3 des Primersatzes I bzw. Primersatzes II amplifiziert (Primersatz I bzw. Primersatz II in Tabelle 3 unten).

[0197] Alle Testproben wurden mit den Primern P2B, P1 und P3 des Primersatzes I bzw. Primersatzes II (Set I bzw. Set II in Tabelle 3 unten) amplifiziert.

Tabelle 3

<u>Probe</u>	<u>Signal (RLU)</u>	
	Set I	Set II
Leerwert	7384	8396
WT1 (+/+)	45456	56210
WT2 (+/+)	52480	49174
WT3 (+/+)	65172	56992
WT4 (+/+)	30778	88682
WT5 (+/+)	71906	63398
G542X/G542X (-/-)	1797530	1148180
G542X/WT (+/-)	695056	473342
G551X/WT (+/-)	902458	499874
G553X/WT (+/-)	859416	571882
G560T/WT (+/-)	1030630	587710

[0198] In einem weiteren Experiment wurden die genomischen Test- und Referenz-DNA-Proben mit einem Gemisch der Primer P2B, P2D, P1 und P3 des Primersatzes I amplifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 unten zusammengefaßt.

Tabelle 4

Probe	Signal (RLU)
Leerwert	7384
WT1 (+/+)	18166
WT2 (+/+)	16462
WT3 (+/+)	20282
WT4 (+/+)	19106
WT5 (+/+)	21790
G542X/G542X (–/–)	640182
G542X/WT (+/–)	265984
G551X/WT (+/–)	294094
G553X/WT (+/–)	302366
G560T/WT (+/–)	336964

Beispiel 4

[0199] Um nichtspezifische PCR-Produkte nicht nachweisbar zu machen, wurde für den Nachweis einer Mutation in Exon 10 des menschlichen Gens für zystische Fibrose ein alternatives Primerschema eingesetzt. Hierbei nutzt das alternative Primerschema zwei Rückwärtsprimer P4 und P5, wobei P4 einen 3'-terminalen Anteil aufweist, der an einen Strang der Ziel- oder Referenzsequenz an einem Ort stromaufwärts von Primer P5 bindet. In diesem Beispiel wird das alternative Primerschema mit dem Primerschema aus Beispiel 2 verglichen.

[0200] Die Primer P2B, P2D, P1 und P3 für das ursprüngliche Primerschema sind die gleichen wie in Beispiel 2. Bei den Primern für das alternative Schema handelt es sich um P2B, P2D, P4 und P5. Für einen unvoreingenommenen Vergleich zwischen dem alternativen und dem ursprünglichen Schema weisen beide Schemen die gleichen Vorwärtsprimer auf, und P5 ist mit dem 3'-Anteil Pa der Primer P1 und P3 identisch.

[0201] P2B und P2D – Vorwärtsprimer für Exon 10, an ihren 5'-Enden mit Biotin bzw. Digoxigenin markiert, wobei P2 die folgende Sequenz darstellt:
5'-CTCAGTTTTCTGGATTATGCC-3' (SEQ ID NO. 3)

[0202] Die Rückwärtsprimer (P1), (P3), (P4) und (P5) wiesen die folgenden Sequenzen auf:
P1: 5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGCTAACCGATTGAATATGGAGCC-3' (SEQ ID NO. 4), worin die Schwanzsequenz unterstrichen ist
P3: 5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTCTAACCGATTGAATATGGAGCC-3' (SEQ ID NO. 5), worin die Schwanzsequenz unterstrichen ist

[0203] Bei den Schwänzen handelt es sich um B1 bzw. A1, wie in [Fig. 3](#).
P4: 5'-AGCCTAATCGTCCACGATGTATAAATATATAATTTGGGTAGTGT-3' (SEQ ID NO. 12), worin die Schwanzsequenz unterstrichen ist
P5: 5'-CTAACCGATTGAATATGGAGCC-3' (SEQ ID NO. 13)

[0204] Die PCR-Amplifikation wurde unter Verwendung eines TRIO-Thermocycler-Geräts von Biometra (Tampa, FL) durchgeführt. Dabei wurden Amplifikationszyklen von jeweils 30 s bei 94°C, 1 min bei 54°C und 1 min bei 72°C ausgeführt. Das Reaktionsvolumen von 20 µl enthielt 0,5 U temperaturstabile Pfu-Polymerase von Stratagene (San Diego, CA). Das gesamte Reaktionsvolumen für die PCR mit durch Wachs vermitteltem Warmstart betrug 40 µl. Der Puffer enthielt 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂ und 200 µg/ml BSA (Puffer A).

[0205] In der PCR-Amplifikation wurden Primer (jeweils 125 nM) zur Erzeugung eines Amplifikats mit einer Länge von 220 Bp verwendet. Genomische DNA-Proben der Wildtyp (wt)-Homozygote sowie einer zusammengesetzten Heterozygote ΔF508/R553X (mut) stammten vom Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). Die PCR-Ansätze enthielten jeweils 1 ng/µl genomische DNA.

[0206] Nach der PCR wurden die Proben hitzedenaturiert und danach das Reannealing und den Strangaus-tausch durch Branch-Migration durchführen gelassen (2 min bei 94°C und danach 30 min bei 65°C). Dieses letzte Programm war mit dem PCR-Programm verknüpft, so daß die Branch-Migration unmittelbar auf die Amplifikation folgte, ohne daß dabei die Röhrchen geöffnet werden mußten.

[0207] Portionen von jeweils 2 µl wurden mit 50 µl der Kugelchensuspension für den induzierten Lumineszenztest (25 µg S-Sav und 12,5 µg CL-Mab_{Dig} pro 1 ml Puffer) gemischt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurden die induzierten Lumineszenztestsignale unter Verwendung eines zur Bearbeitung von 8-Röhrchen-PCR-Streifen fähigen Meßgeräts abgelesen.

[0208] In Tabelle 5 ist der Vorteil dieses alternativen Primerschemas gegenüber dem Schema aus Beispiel 2 veranschaulicht. Die Wildtyp- und Mutantenproben wurden in Doppelbestimmung gefahren.

Tabelle 5

LOCI-Signal (RLU)

Spalte:	<u>ohne Warmstart</u>		<u>mit Warmstart</u>	
	1	2	3	4
	Original	Alternativ	Original	Alternativ
wt	556122	9236	64464	7744
wt	511318	11446	35096	9200
mut	893474	209052	430266	266062
mut	912204	233812	424330	272332

[0209] Spalte 1 bestätigt unsere frühere Erkenntnis, daß die Realisierung einer Warmstartvorgehensweise für den Branch-Migration-Inhibitionstest gemäß der Primerkonstruktion in Beispiel 2 bevorzugt ist.

[0210] Aufgrund eines sehr hohen Hintergrunds gibt es im wesentlichen keine Unterscheidung zwischen den wt- und den Mutantenproben. Die Verwendung von Wachskügelchen als Mittel zur Durchführung des Warmstarts führt zu einem beträchtlichen Abfall des Hintergrund-(wt)-Signals für dieses Primerschema (Spalte 3). Allerdings ist der Hintergrund immer noch 2-4mal höher als Üblich. Dies liegt daran, daß die PCR bei einer sehr geringen Stringenz durchgeführt wurde: die Zyklus-Annealing-Temperatur betrug 54°C und liegt damit um 10°C niedriger als die optimale Temperatur für diesen Primersatz von 64°C. Diese niedrige Zyklus-Annealing-Temperatur wurde gewählt, da der sequenzspezifische Bereich des Primers P4 aufgrund seines hohen AT-Gehalts gerade einen niedrigen T_m-Wert aufweist.

[0211] Eine deutliche Verbesserung wird beobachtet, wenn man die Rückwärtsprimer gemäß dem alternativen Primerschema einander gegenüberstellt. Selbst ohne einen Warmstart ist der Hintergrund so gering, wie nur eben möglich (das von den Kügelchen erzeugte Signal ohne Probenzugabe). Die Daten in Spalte 2 veranschaulichen diese Verbesserung. Die Realisierung eines Warmstarts führt zu keiner weiteren Verbesserung für dieses alternative Primerschema (Spalte 4).

Beispiel 5

Alternatives Primerschema für mehrere Amplifikate von Exon 11 des Gens für zystische Fibrose.

[0212] Die PCR-Bedingungen waren dieselben wie oben für Beispiel 4 beschrieben. Die PCR-Reaktionen wurden ohne Warmstart gefahren. Es wurden die gleichen genomischen DNA-Proben wie in Beispiel 4 verwendet. Zwei Sätze von Vorwärts-(P2)-Primern und zwei Sätze von Rückwärts-(P4 und P5)-Primern wurden zum Nachweis der Exon-11-Mutationen unter Verwendung des zur Reduzierung des Signals aufgrund nichtspezifischer Amplifikation vorgesehenen alternativen Schemas verwendet. Die Verwendung unterschiedlicher Kombinationen aus Vorwärtsprimer und entweder dem ersten Satz oder dem zweiten Satz von P4- und P5-Primern gestattet die Herstellung von Amplifikationsprodukten mit unterschiedlicher Länge. Alle Primer stammten von Oligos Etc., Inc., Wilsonville, OR.

[0213] Der erste Satz von Vorwärtsprimern beinhaltete: P2B-1 und P2D-1 – Vorwärtsprimer für Exon 11 (Spalten 1 und 3 in Tabelle 6), an ihren 5'-Enden mit Biotin bzw. Digoxigenin markiert, worin P2-1 die folgende Sequenz darstellt:

5'-GCCTTTCAAATTCAGATTGAGC-3' (SEQ ID NO. 14)

[0214] Der erste Satz von Rückwärtsprimern ([Fig. 7](#)), P4-1 und P5-1, wies die folgenden Sequenzen auf:

P5-1: 5'-GACATTTACAGCAAATGCTTGC-3' (SEQ ID NO. 15)

P4-1: 5'-AGACGACGTCTAGTCATTGCAATAGACCAATAATTAGTTATTCA-3' (SEQ ID NO. 16), worin die Schwanzsequenz unterstrichen ist.

[0215] P2B-2 und P2D-2 – der zweite Satz von Vorwärtsprimern für Exon 11 (Spalten 2 und 4 in Tabelle 6), an ihren 5'-Enden mit Biotin bzw. Digoxigenin markiert, worin P2-2 die folgende Sequenz darstellt:

5'-CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT-3' (SEQ ID NO. 17)

[0216] Der zweite Satz von Rückwärtsprimern P4-2 und P5-2, wies die folgenden Sequenzen auf:

P5-2: 5'-GCACAGATTCTGAGTAACCATAAT-3' (SEQ ID NO. 18)

P4-2: 5'-ATGACTTGCTAAGTGCTATGACTCCTCTACCAAATCTGGATACTATAC-3' (SEQ ID NO. 19), worin die Schwanzsequenz unterstrichen ist.

[0217] In diesem Beispiel wurden für jeden Rückwärtsprimer zwei getrennte PCR-Reaktionen gefahren (5 µl eines jeden Ansatzes wurden zusammen gemischt und BMI-Bedingungen ausgesetzt: 2 min bei 94°C und danach 30 min bei 64°C). Bei den in Tabelle 6 dargestellten Daten handelt es sich um folgendes: Die Daten in Spalte 1 wurden durch PCR-Amplifikation unter Verwendung der folgenden Primerkombinationen erhalten: P2B-1, P2D-1, P4-1 und P5-1. Die Daten in Spalte 2 wurden durch PCR-Amplifikation unter Verwendung der folgenden Primerkombinationen erhalten: P2B-2, P2D-2, P4-1 und P5-1. Die Daten in Spalte 3 wurden durch PCR-Amplifikation unter Verwendung der folgenden Primerkombinationen: P2B-1, P2D-1, P4-2 und P5-2 erhalten. Die Daten in Spalte 4 wurden durch PCR-Amplifikation unter Verwendung der folgenden Primerkombinationen: P2B-2, P2D-2, P4-2 und P5-2 erhalten.

[0218] Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Akzeptabel geringe Hintergrundsignale zeigen, daß sich dieses alternative Primerschema auf vier unterschiedliche Exon-11-Amplifikate anwenden läßt und dem ursprünglichen Primerschema unter Verwendung der Primer P2, P1 und P3 in Beispiel 3 dahingehend überlegen ist, daß es eine gute Leistung bei geringer PCR-Stringenz (Zyklus-Annealing-Temperatur von 54°C im Gegensatz zu den normalerweise für die jeweiligen Primer in Beispiel 3 verwendeten 64°C) zeigt und zumindest für diese besonderen Amplifikate keinen Warmstart erfordert.

Tabelle 6

	LOCI-Signal (RLU)			
	1	2	3	4
Amplifikat - 203	203	296	372	425
länge (Bp) :				
wt	6582	8790	10356	11200
wt	6642	8216	11568	11164
mut	861976	116558	317990	137276
mut	924380	205214	268450	85810

Beispiel 6

Optimierung des Verhältnisses der beiden Rückwärtsprimer im alternativen Primerschema.

[0219] In diesem Beispiel ist das Ergebnis einer zur Optimierung des Verhältnisses dieser Primer für den optimalen Nachweis von Mutationen im Exon 11 des Gens für zystische Fibrose vorgesehenen Untersuchung dargestellt. Bei den DNA-Proben für dieses Beispiel handelt es sich um die gleichen wie im vorhergehenden Beispiel, wobei es sich bei den verwendeten Primern um die Primer P2B-1, P2D-1, P4-1 und P5-1 jenes Beispiels handelt.

[0220] Die im alternativen Primerschema ([Fig. 7](#)) verwendeten Primer P4 und P5 konkurrieren in der PCR miteinander, wie oben beschrieben. Somit ist deren ausgeglichene Leistung in einem Gemisch erwünscht und kann von ihren relativen thermodynamischen Parametern abhängen. Idealerweise sollten zur Maximierung der

Ausbeute signalerzeugender viersträngiger Strukturen die Mengen der durch den Vorwärtsprimer P2 und jeden der beiden Rückwärtsprimer P4 und P5 erzeugten Amplifikate gleich sein. Daher stellt der absolute Wert des Signals in einem induzierten Lumineszenztest ein gutes Kriterium für die Optimierung des Verhältnisses dar. So bedeutet beispielsweise die Abwesenheit eines Signals für Mutanten (vorausgesetzt, daß die Amplifikation erfolgreich war, wie anhand von Gelelektrophorese beurteilt), daß einer der Rückwärtsprimer vollkommen dominierte. In einem typischen Optimierungsexperiment werden mehrere unterschiedliche Verhältnisse der Konzentrationen von Primer P5 zu Primer P4 bei verschiedenen PCR-Zyklus-Annealing-Temperaturen (T_a) untersucht.

[0221] Ein Beispiel für ein derartiges Experiment ist unten (Tabelle 7) für den Nachweis von Mutationen in Exon 11 dargestellt. Dabei waren jeweils 125 nM Primer P2B-1 und Primer P2D-1 vorhanden. Die Gesamtkonzentration der beiden Rückwärtsprimer (P4-1 + P5-1) betrug 250 nM.

Tabelle 7

P5:P4-Verhältnis	0,1	0,33	1	3	9	15	19
wt	13992	6590	8544	8614	14986	17548	14208
T_a 52°C wt	8802	6746	7910	6772	15754	17544	11422
mut	7448	10322	8132	32234	327774	406186	348478
mut	7188	8658	8662	29520	299760	376970	328760
wt	5780	8300	8708	9782	11164	12538	14460
T_a 55°C wt	8022	8944	11506	9694	13812	13750	11946
mut	11782	11378	12354	147874	396414	503806	142618
mut	8736	12042	16238	128816	426710		105494
wt	8768	7250	8610	9704	10076	10898	11788
T_a 58°C wt	5910	4816	7538	9234	10956	10640	13004
mut	7504	8944	11880	199796	344222	268254	113748
mut	10784	10388	11118	211828	332226	270942	95674

[0222] Tabelle 7 zeigt, daß der kurze äußere Primer P5 in höheren Konzentrationen (3 bis 20fach) als der innere, lange Primer P4 vorliegen muß, trotz eines höheren T_m -Werts und höherer 3'-terminaler Stabilität des ersteren (diese Parameter unterscheiden sich um 13°C bzw. -1,6 kcal/mol. Bei einem höheren T_a -Wert wird das Optimum bei einem niedrigeren Verhältnis erreicht. Ähnliche Experimente mit anderen Amplifikaten zeigen, daß sich eine ausgewogene Leistung der beiden Rückwärtsprimer üblicherweise durch Variieren ihrer relativen Konzentrationen erreichen läßt.

Beispiel 7

Leistung des alternativen BMI-Schemas beim Nachweis der Mutation in Exon 10 des CFTR-Gens unter Verwendung nichtzusammenhängender Rückwärtsprimer.

[0223] Um zu demonstrieren, daß für das Funktionieren des alternativen Schemas die Primerpaare mit/ohne Schwanz nicht zusammenhängend sein müssen, wurden drei mit Schwänzen versehene Rückwärtsprimer P4 konstruiert: (1) P4-1 – welcher ein Priming an einer Stelle eingeht, die unmittelbar neben der von dem Primer P5 ohne Schwanz gebundenen Stelle liegt; (2) P4-2 – welcher ein Priming an einer Stelle eingeht, die von der von dem gleichen Primer ohne Schwanz gebundenen Stelle getrennt ist (ein Trennabstand von 15 Basen von der P5-Priming-Stelle); (3) P4-3 – welcher ein Priming an einer Stelle eingeht, die mit der von dem Primer ohne Schwanz gebundenen Stelle überlappt (eine Überlappung von 7 Basen mit der P5-Priming-Stelle).

[0224] In diesem besonderen Beispiel wurden die markierten Vorwärtsprimer P2B und P2D mit jedem Rückwärtsprimer, mit Schwanz oder ohne Schwanz, zur separaten Amplifikation der gewünschten Sequenz, einem Teil des Exon 10 des CFTR-Gens, verwendet. Die Produktamplifikate wurden für die nachfolgende BMI-Analyse gemischt, wie im folgenden beschrieben. Alle Primer stammten von Oligos Etc., Inc., Wilsonville, OR.

[0225] P2B und P2D – Vorwärtsprimer für Exon 10, an ihren 5'-Enden mit Biotin bzw. Digoxigenin markiert, weisen die folgende Sequenz auf:

5'-CTCAGTTTTCTGGATTATGCC-3' (SEQ ID NO. 3)

[0226] Die mit Schwänzen versehenen Rückwärtsprimer (P4-1), (P4-2) und (P4-3) weisen die folgenden Sequenzen auf:

P4-1 5'-AGCCTAATCGTCCACGATGTATAAATATATAATTTGGGTAGTGT-3' (SEQ ID NO. 20), worin der Schwanz unterstrichen ist.

P4-2 5'-AGCCTAATCGTCCACGATGTATGTAGTGTGAAGGGTTCATA-3' (SEQ ID NO. 21), worin der Schwanz unterstrichen ist.

P4-3 5'-AGCCTAATCGTCCACGATGTATTGGAGCCAAATATATAATT-3' (SEQ ID NO. 22), worin der Schwanz unterstrichen ist.

[0227] Der schwanzlose Rückwärtsprimer P5 weist die folgende Sequenz auf:

P5 – 5'-CTAACCGATTGAATATGGAGCC-3' (SEQ ID NO. 23)

[0228] Die PCR-Amplifikation wurde unter Verwendung eines TRIO-Thermocycler-Geräts von Biometra (Tampa, FL) durchgeführt. Dabei wurden fünfunddreißig Amplifikationszyklen von jeweils 30 s bei 94°C, 1 min bei 54°C und 1 min bei 72°C ausgeführt. Das Reaktionsvolumen von 20 µl enthielt 0,2 U temperaturstabile Pfu-Polymerase von Stratagene (San Diego, CA). Es wurde kein Warmstartverfahren eingesetzt. Der Puffer enthielt 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂ und 200 µg/ml BSA (Puffer A).

[0229] Das markierte P2B/P2D-Paar wurde in der PCR-Amplifikation mit P4-1, P4-2, P4-3 oder P5 (jeweils 125 nM Primer wurden verwendet) zur Erzeugung von Amplifikaten von 200, 184, 207 bzw. 200 Bp verwendet. Genomische DNA-Proben der Wildtyp (wt)-Homozygote sowie einer zusammengesetzten Heterozygote ΔF508/R553X (mut) stammten vom Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). In jedem PCR-Ansatz lagen jeweils 20 ng genomische DNA vor.

[0230] Nach der PCR wurden jeweils Portionen von 5 µl der P5-haltigen Ansätze mit 5 µl des entsprechenden P4-1 enthaltenden Reaktionsansatzes gemischt. Gleichfalls wurden jeweils Portionen von 5 µl der P5-haltigen Ansätze mit 5 µl des entsprechenden (P4-2) enthaltenden Reaktionsansatzes gemischt, und jeweils Portionen von 5 µl der P5-haltigen Ansätze wurden mit 5 µl des entsprechenden P4-3 enthaltenden Reaktionsansatzes gemischt. Die neuen Probenansätze wurden jeweils Hitzedenaturiert, und danach das Reannealing und den Strangaustausch durch Branch-Migration durchführen gelassen (2 min bei 95°C und danach 30 min bei 65°C).

[0231] Von den Reaktionsansätzen wurden jeweils Portionen von 2 µl mit 50 µl der Kugelchensuspension des induzierten Lumineszenztests (jeweils 2,325 µg Sens-Sav und 1,125 µg Acc-Ab_{Dig}) gemischt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurden die induzierten Lumineszenztestsignale unter Verwendung eines zur Bearbeitung von 8-Röhrchen-PCR-Streifen fähigen Meßgeräts abgelesen.

[0232] In Tabelle 8 ist die Wirksamkeit der Verwendung des alternativen Primerschemas mit getrennter Amplifikation zusammenhängender oder nichtzusammenhängender Primer veranschaulicht. Die Wildtyp- und Mutantenproben wurden in Dreifachbestimmung gefahren:

Tabelle 8

Rückwärtsprimerpaar	DNA-Probe	LOCI-Signal (RLU)	Verhältnis des Mutantensignals zum WT-Signal
P5/P4-1	wt	5806	38,6-fach
(zusammenhängend)	wt	7376	
	wt	7548	
	mut	284922	
	mut	273018	
	mut	241740	
P5/P4-2	wt	16402	27,0-fach
(mit Lücke)	wt	12000	
	wt	15252	
	mut	354264	
	mut	403728	
	mut	421218	
P5/P4-3	wt	8256	21,6-fach
(überlappend)	wt	9252	
	wt	8976	
	mut	200456	
	mut	189290	
	mut	182364	

[0233] Die obigen Signale zeigen eindeutig, daß eine getrennte Amplifikation nicht zusammenhängender Primerpaare im alternativen Primerschema verwendet werden kann. Wie man sehen kann, führten alle drei Sätze von Primerpaaren zu einer guten Unterscheidung zwischen den mit Mutantenproben beobachteten Signalen und den mit Wildtypproben beobachteten Signalen, und zwar mit Verhältnissen von 38,6, 27,0 bzw. 21,6 für zusammenhängende Primer, Primer mit Lücke bzw. überlappende Primer.

Beispiel 8

Optimierung der Leistung des alternativen BMI-Schemas für den Nachweis der Mutation in Exon 10 des CF-TR-Gens unter Verwendung nicht zusammenhängender Rückwärtsprimer.

[0234] Das Ziel des vorliegenden Beispiels besteht darin, zu demonstrieren, daß nicht zusammenhängende Primerpaare, CFTR-P4 und -P5, funktionieren können, wenn sie im gleichen Reaktionsröhrchen kombiniert werden. Dabei wurden die Primer P5/P4-1 (zusammenhängendes Paar), P5/P4-2 (Paar mit Lücke) und P5/P4-3 (überlappendes Paar) jeweils zusammen mit dem markierten Vorwärtsprimerpaar P2B/P2D zur Amplifikation der gewünschten Sequenz, eines Teils von Exon 10 des CFTR-Gens, verwendet. Um die Coamplifikation unter Verwendung der beiden Rückwärtsprimer zu optimieren, wurden verschiedene Konzentrationsverhältnisse der Rückwärtsprimerpaare eingesetzt.

[0235] Die Sequenzen der markierten Vorwärtsprimer, P2B und P2D und P4, der mit Schwänzen versehenen Rückwärtsprimer, P4-1, P4-2, P4-3 und P5, des schwanzlosen Rückwärtsprimers sind in Beispiel 7 aufgeführt und erörtert.

[0236] Die PCR-Amplifikation wurde unter Verwendung eines T3-Thermocycler-Geräts von Biometra (Tampa, FL) durchgeführt. Dabei wurden 38 Amplifikationszyklen von jeweils 30 s bei 94°C, 1 min bei 54°C und 1 min bei 72°C ausgeführt. Das Reaktionsvolumen von 18 µl enthielt 0,36 U temperaturstabile Pfu-Polymerase von Stratagene (San Diego, CA). Das Gesamtreaktionsvolumen für die PCR mit durch Wachs vermitteltem Warmstart betrug 36 µl. Der Puffer enthielt 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂ und 200 µg/ml BSA (Puffer A)

[0237] Die markierten P2B/P2D-Primer (jeweils 125 nM Vorwärtsprimer) wurden in der PCR-Amplifikation mit den variierenden Verhältnissen des P5-/P4-1-Paars, des P5/P4-2-Paars bzw. des P5/P4-3-Paars (insgesamt wurden jeweils 250 nM von allen Rückwärtsprimerpaaren verwendet) zur Erzeugung von zwei Amplifikaten mit jeweils 200 Bp/200 Bp, 184 Bp/200 Bp bzw. 207 Bp/200 Bp verwendet. Die in den Amplifikationsreaktionen verwendeten Verhältnisse des schwanzlosen Primers (P5) zum entsprechenden Primer mit Schwanz (P4-1, P4-2 oder P4-3) betrugen 1:3, 1:1, 3:1 und 9:1. Genomische DNA-Proben der Wildtyp (wt)-Homozygote sowie einer zusammengesetzten Heterozygote ΔF508/R553X (mut) stammten vom Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). Im jeweiligen PCR-Ansatz lagen jeweils 36 ng der genomischen DNA-Proben vor.

[0238] Nach der PCR wurden die Proben hitzedenaturiert und anschließend das Reannealing und den Strangtausch durch Branch-Migration durchführen gelassen (2 min bei 95°C, danach 30 min bei 65°C). Dieses letzte Programm war mit dem PCR-Programm verknüpft, was das unmittelbare Aufeinanderfolgen der Branch-Migration auf die Amplifikation gestattete, ohne daß dabei die Röhrchen geöffnet werden mußten.

[0239] Von den Reaktionsansätzen wurden jeweils Portionen von 2 µl mit 50 µl der Kugelchensuspension des induzierten Lumineszenztests (jeweils 2,325 µg Sens-Sav und 1,125 µg Acc-Ab_{Dig}) gemischt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurden die induzierten Lumineszenztestsignale unter Verwendung eines zur Bearbeitung von 8-Röhrchen-PCR-Streifen fähigen Meßgeräts abgelesen.

[0240] In Tabelle 9 ist die Optimierung und Wirksamkeit der Verwendung des alternativen Primerschemas mit gleichzeitiger Amplifikation zusammenhängender oder nicht zusammenhängender Primerpaare im gleichen Röhrchen veranschaulicht. Die Wildtyp- und Mutantenproben wurden in Doppelbestimmung gefahren.

Tabelle 9

Rückwärtsprimerpaar		DNA- Probe	LOCI-Signal (Verhältnis von P5 zu Primer P4 mit Schwanz)			
			1:3	1:1	3:1	9:1
P5/P4-1	wt	8928	33056	71506	69580	
(zusammenhängend)	wt	8054	39996	67294	60814	
	mut	15946	703178	342828	92338	
	mut	29068	330934	357652	84402	
P5/P4-2	wt	59276	38144	82268	58378	
(mit Lücke)	wt	53396	39992		61370	
	mut	63600	41652	866904	379528	
	mut	72516	41208	817106	383382	
P5/P4-3	wt	11830	59822	68154	71088	
(überlappend)	wt	13230	56868	69926	73036	
	mut	16710	850350	449364	134216	
	mut	14482	829352	373474	130722	

[0241] Die obigen Signale demonstrieren, daß die gleichzeitige Amplifikation zusammenhängender und nicht zusammenhängender Primerpaare im gleichen Röhrchen im alternativen Primerschema verwendet werden kann. Wie man sehen kann, wurden die Verhältnisse aller drei Rückwärtsprimerpaare optimiert, was zu einer akzeptablen Unterscheidung zwischen den mit Mutantenproben beobachteten Signalen und den mit Wildtypproben beobachteten Signalen für jeweils mindestens eine Bedingung führte. Das heißt, mit dem zusammenhängenden Primerpaar P5/P4-1 wurde eine gute Unterscheidung mit einem Verhältnis von P5 zu P4-1 von 1:1 beobachtet, während eine akzeptable Unterscheidung bei Einsatz eines 3:1-Verhältnisses von P5 zu P4-2 für das Paar mit Lücke bzw. eines 1:1-Verhältnisses von P5 zu P4-3 für das überlappende Paar beobachtet wurde. Diese Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, für dieses alternative Schema konstruierte Primerpaare mit Lücke oder mit Überlappung zu verwenden.

[0242] Die obige Diskussion enthält bestimmte Theorien hinsichtlich der bei der vorliegenden Erfindung gezeigten Mechanismen. Diese Theorien sollten in keiner Weise als Beschränkung der vorliegenden Erfindung verstanden werden, da gezeigt werden konnte, daß die beschriebenen Ergebnisse mit der vorliegenden Erfindung erzielt werden.

[0243] Mit der obigen Beschreibung sowie den Beispielen wird die Erfindung einschließlich ihrer bevorzugten Ausführungsformen vollständig offenbart. Dabei sollen dem Durchschnittsfachmann auf Gebieten, wie zum Beispiel der Molekularbiologie und verwandten Wissenschaften, ersichtliche Modifikationen der beschriebenen Verfahren im Umfang der Ansprüche liegen.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Dade Behring Inc.

<120> Detektion von Unterschieden in Nukleinsäuren durch Inhibierung spontaner DNA Verzweigungsmigration

<130> BEH-7419 PCT

<140> PCT/US00/

<141> 2000-08-15

<150> 09/376,097

<151> 1999-08-17

<160> 23

<170> FastSEQ für Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

caagtgaatc ctgagcgtga

20

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ctaaccgatt gaatatggag cc

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

ctcagttttc ctggattatg cc

22

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)...(42)

<400> 4

accatgctcg agattacgag ctaaccgatt gaatatggag cc

42

```

<210> 5
<211> 42
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)...(42)

<400> 5
gatcctagge ctcacgtatt ctaaccgatt gaatatggag cc 42

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Human

<400> 6
tagaaggaag atgtgccttt ca 22

<210> 7
<211> 42
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)...(42)

<400> 7
accatgctcg agattacgag ttcttaaccc actagccata aa 42

<210> 8
<211> 42
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)...(42)

<400> 8
gatcctagge ctcacgtatt ttcttaaccc actagccata aa 42

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)...(24)

<400> 9
ttacattaga aggaagatgt gcct 24

```

```

<210> 10
<211> 42
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)...(42)

<400> 10
accatgctcg agattacgag gtgattctta acccactagc ca
42

<210> 11
<211> 42
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)...(42)

<400> 11
gacccctaggc ctcaogtatt gtgattctta acccactagc ca
42

<210> 12
<211> 44
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)...(44)

<400> 12
agccotaatcg tocacgatgt ataaatatat aatttgggta gtgt
44

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)...(22)

<400> 13
ctaaccgatt gaatatggag cc
22

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Human

<400> 14
gcctttcaaa ttcagattga gc
22

```

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Human

 <400> 15
 gacatttaca gcaaagtgtt gc 22

 <210> 16
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Human

 <400> 16
 agacgacgtc tagtcattcg aatagaccaa taattagtta ttca 44

 <210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)...(24)

 <400> 17
 caactgtggt taaagcaata gtgt 24

 <210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Human

 <400> 18
 gcacagattc tgagtaacca taat 24

 <210> 19
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Human

 <400> 19
 atgacttgct aagtgtatg actcctctac caaatctgga tactatac 48

 <210> 20
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)...(44)

 <400> 20
 agcctaatacg tccacgatgt ataatatat aatttggta gtgt 44

<210> 21
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)...(41)

<400> 21
 agcctaatacg tccacgatgt atgtagtgtg aagggttcat a 41

<210> 22
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)...(41)

<400> 22
 agcctaatacg tccacgatgt attggagcca aatatataat t 41

<210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 23
 ctaaccgatt gaatatggag cc 22

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins eines Unterschieds zwischen einer Zielnukleinsäuresequenz und einer Referenznukleinsäuresequenz, wobei man in dem Verfahren:

(a) die Zielsequenz mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung eines Primers P2, eines Primers P4 mit einem zur Hybridisierung an die Zielsequenz fähigen 3'-Anteil und einem nicht mit dem Ziel komplementären 5'-Schwanzanteil T sowie eines Primers P5, der zur Hybridisierung an das Ziel an einem in 3'-Richtung zu einer zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähigen Sequenz liegenden Ort fähig ist, amplifiziert, wobei entweder:

Primer P2 ein Gemisch von Primer P2 mit einer ersten Markierung und Primer P2 mit einer zweiten Markierung darstellt oder Primer P4 eine erste Markierung und Primer P5 eine zweite Markierung aufweist;

(b) einen mit einem Schwanz versehenen partiellen Zielduplex der Zielsequenz bildet, wobei der Duplex entweder die erste Markierung oder die zweite Markierung sowie einen Schwanz aus zwei nicht komplementären Bereichen aufweist, wobei es sich bei einem ersten Bereich um die Sequenz P5 oder deren Komplement und bei dem zweiten Bereich um die Sequenz T oder deren Komplement handelt;

(c) die Referenzsequenz mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung eines Primers P2, eines Primers P4 mit einem zur Hybridisierung an die Referenzsequenz fähigen 3'-Anteil und einem nicht mit der Referenz komplementären 5'-Schwanzanteil T sowie eines Primers P5, der zur Hybridisierung an die Referenz weitgehend neben, in 3'-Richtung, einer zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähigen Sequenz fähig ist, amplifiziert,

wobei entweder:

Primer P2 ein Gemisch von Primer P2 mit einer ersten Markierung und Primer P2 mit einer zweiten Markierung darstellt oder

Primer P4 eine erste Markierung und Primer P5 eine zweite Markierung aufweist;

(d) einen mit einem Schwanz versehenen partiellen Zielduplex der Referenzsequenz bildet, wobei der partielle Duplex entweder die erste Markierung oder die zweite Markierung sowie einen Schwanz aus zwei nicht komplementären Strängen aufweist, wobei es sich bei einem ersten Strang um die Sequenz P5 oder deren Komplement und bei dem zweiten Strang um die Sequenz T oder deren Komplement handelt;

(e) einen Komplex, umfassend die mit einem Schwanz versehene Zielsequenz und die mit einem Schwanz versehene Referenzsequenz in Doppelstrangform, bildet, wobei der Komplex wenigstens ein Paar der nicht komplementären Stränge umfaßt und die mit einem Schwanz versehene Zielsequenz bzw. die mit einem Schwanz versehene Referenzsequenz jeweils eine der Markierungen aufweist;

(f) die Assoziation der Markierungen als Teil des Komplexes nachweist, wobei die Assoziation mit dem Vorhandensein des Unterschieds in Verbindung steht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Markierungen aus der Gruppe, bestehend aus Oligonukleotiden, Enzymen, Farbstoffen, Fluoreszenzmolekülen, Chemilumineszenzmolekülen, Coenzymen, Enzymsubstraten, radioaktiven Gruppen, kleinen organischen Molekülen sowie festen Oberflächen, ausgewählt sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähige Sequenz auf dem Ziel oder der Referenz unmittelbar neben einer zur Hybridisierung an Primer P5 fähigen Sequenz des Ziels oder der Referenz liegt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähige Sequenz auf dem Ziel oder der Referenz teilweise mit einer zur Hybridisierung an Primer P5 fähigen Sequenz des Ziels oder der Referenz überlappt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähige Sequenz auf dem Ziel oder der Referenz nicht neben einer zur Hybridisierung an Primer P5 fähigen Sequenz des Ziels oder der Referenz liegt.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Amplifikationsschritt (c) im gleichen Reaktionsmedium, das für Schritt (a) verwendet wird, durchgeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich bei der ersten Markierung um die gleiche wie die zweite Markierung handelt.

8. Verfahren zur Herstellung eines partiellen DNA-Duplex mit einem Anteil an seinem einen Ende, der zwei vorbestimmte nicht komplementäre Einzelstrangsequenzen aufweist, wobei man in dem Verfahren:
in einer ersten Kombination eine Nukleinsäure, eine Polymerase, Nukleosidtriphosphate sowie die Primer P2 und P5 zusammen gibt, wobei der Primer P2 zur Hybridisierung an einen ersten Strang der Nukleinsäure fähig ist und entlang diesem verlängert werden kann und der Primer P5 zur Hybridisierung an einen zweiten Strang der Nukleinsäure fähig ist und entlang diesem verlängert werden kann,
in einer zweiten Kombination die Nukleinsäure, die Polymerase und die Nukleosidtriphosphate, den Primer P2 und Primer P4 mit einem zur Hybridisierung an den zweiten Strang fähigen 3'-Anteil und einem weder mit dem ersten Strang noch mit dem zweiten Strang komplementären 5'-Schwanzanteil T zusammen gibt, wobei der 3'-Anteil des Primers P4 zur Hybridisierung an den zweiten Strang an einem in 5'-Richtung zu einer zur Hybridisierung an den Primer P5 fähigen Sequenz liegenden Ort fähig ist;
die erste und die zweite Kombination einem Temperaturkreislauf zur Verlängerung der Primer aussetzt,
die erste Kombination mit der zweiten Kombination unter Bildung eines nicht komplementäre Einzelstrangsequenzen von T oder dessen Komplement sowie P5 oder dessen Komplement aufweisenden partiellen DNA-Duplex vereinigt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die erste Kombination und die zweite Kombination zusammen gegeben werden, bevor sie dem Temperaturkreislauf ausgesetzt werden.

10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die zur Hybridisierung an Primer P5 fähige Sequenz unmittelbar neben einer zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähigen Sequenz liegt.

11. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die zur Hybridisierung an Primer P5 fähige Sequenz unmittelbar mit einer zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähigen Sequenz überlappt.

12. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die zur Hybridisierung an Primer P5 fähige Sequenz nicht neben einer zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähigen Sequenz liegt.

13. Verfahren nach Anspruch 8, wobei entweder:
Primer P2 ein Gemisch von Primer P2 mit einer ersten Markierung und
Primer P2 mit einer zweiten Markierung darstellt oder
Primer P5 eine erste Markierung und Primer P4 eine zweite Markierung aufweist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Markierungen aus der Gruppe, bestehend aus Oligonukleotiden, Enzymen, Farbstoffen, Fluoreszenzmolekülen, Chemilumineszenzmolekülen, Coenzymen, Enzymsubstraten, radioaktiven Gruppen, kleinen organischen Molekülen sowie festen Oberflächen, ausgewählt sind.

15. Verfahren nach Anspruch 13, wobei es sich bei der ersten Markierung um die gleiche wie die zweite

Markierung handelt.

16. Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins einer Mutation in einer Zielnukleinsäuresequenz, bei dem man:

- (a) zur Herstellung eines Zielansatzes in einem Reaktionsgefäß folgendes zusammengibt:
 - (1) die Zielsequenz, von der man annimmt, daß sie die Mutation aufweist;
 - (2) einen zur Hybridisierung an einen ersten Strang des Ziels fähigen Primer P2;
 - (3) einen zur Hybridisierung an einen zweiten Strang des Ziels fähigen Primer P5;
 - (4) einen Primer P4 mit einem zur Hybridisierung an den zweiten Strang des Ziels fähigen 3'-Bereich und einem nicht mit dem zweiten Strang des Ziels komplementären 5'-Schwanzbereich T, wobei ein zur Hybridisierung an den 3'-Bereich von P4 fähiger Bereich auf dem zweiten Strang in 5'-Richtung zu einem zur Hybridisierung an P5 fähigen Bereich des zweiten Strangs lokalisiert ist;
 - (5) eine Polymerase und Nukleosidtriphosphate;
- (b) die Primer entlang der Zielsequenz verlängert,
- (c) partielle Zielduplexe mit einem Schwanz aus zwei nicht komplementären Sequenzen bildet, wobei es sich bei den nicht komplementären Sequenzen um P5 und T oder die Komplemente von P5 und T handelt,
- (d) zur Herstellung eines Referenzansatzes in einem Reaktionsgefäß folgendes zusammengibt:
 - (1) eine Referenznukleinsäuresequenz, wobei die Referenzsequenz weitgehend mit der Zielsequenz identisch ist, mit Ausnahme des möglichen Vorhandenseins der Mutation im Ziel;
 - (2) den Primer P2;
 - (3) den Primer P5;
 - (4) den Primer P4 sowie
 - (5) eine Polymerase und Nukleosidtriphosphate;
- (e) die Primer entlang der Referenzsequenz verlängert,
- (f) partielle Referenzduplexe mit einem Schwanz aus zwei nicht komplementären Sequenzen bildet, wobei es sich bei den nicht komplementären Sequenzen um P5 und T oder die Komplemente von P5 und T handelt,
- (g) die partiellen Zielduplexe mit den partiellen Referenzduplexen vereinigt,
- (h) die nicht komplementären Schwanzsequenzen des partiellen Zielduplex an die nicht komplementären Schwanzsequenzen des partiellen Referenzduplex unter Bildung eines quadramolekularen Komplexes hybridisiert,
- (i) den quadramolekularen Komplex Strangaustauschbedingungen aussetzt, wobei bei Vorliegen des Unterschieds zwischen dem Ziel und der Referenz der Strangaustausch aufhört und, falls kein Unterschied vorliegt, der Strangaustausch fortgesetzt wird, bis ein vollständiger Strangaustausch erfolgt ist,
- (j) das Vorhandensein des Komplexes nachweist, wobei das Vorhandensein in Verbindung mit der Existenz der Mutation steht.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei entweder:

Primer P2 ein Gemisch von Primer P2 mit einer ersten Markierung und Primer P2 mit einer zweiten Markierung darstellt oder

Primer P4 eine erste Markierung und Primer P5 eine zweite Markierung aufweist und das Vorhandensein des Komplexes durch Bestimmen der Assoziation der Markierungen nachgewiesen wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Markierungen aus der Gruppe, bestehend aus Oligonukleotiden, Enzymen, Farbstoffen, Fluoreszenzmolekülen, Chemilumineszenzmolekülen, Coenzymen, Enzymsubstraten, radioaktiven Gruppen, kleinen organischen Molekülen sowie festen Oberflächen, ausgewählt sind.

19. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Assoziation der Markierungen mit einem induzierten Lumineszenztest nachgewiesen wird.

20. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der zur Hybridisierung an Primer P5 fähige Bereich unmittelbar neben dem zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähigen Bereich liegt.

21. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der zur Hybridisierung an Primer P5 fähige Bereich unmittelbar mit dem zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähigen Bereich überlappt.

22. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der zur Hybridisierung an Primer P5 fähige Bereich nicht neben dem zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähigen Bereich liegt.

23. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der Zielansatz und der Referenzansatz im gleichen Reaktionsgefäß zusammengegeben werden.

24. Verfahren nach Anspruch 17, wobei es sich bei der ersten Markierung um die gleiche wie die zweite Markierung handelt.

25. Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins eines Unterschieds zwischen einer Zielnukleinsäuresequenz und einer Referenznukleinsäuresequenz, wobei der Unterschied über das Vorhandensein eines einen mit einem Schwanz versehenen partiellen Duplex der Zielsequenz und einen mit einem Schwanz versehenen partiellen Duplex der Referenzsequenz umfassenden quadramolekularen Komplexes nachgewiesen wird, wobei man in dem Verfahren:

den mit einem Schwanz versehenen partiellen Zielduplex und den mit einem Schwanz versehenen partiellen Referenzduplex bildet, indem man die Ziel- und die Referenznukleinsäuresequenz mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung des Primers P2, eines Primers P4 mit einem zur Hybridisierung an die Zielsequenz oder die Referenzsequenz fähigen 3'-Anteil und einem nicht mit der Zielsequenz oder der Referenzsequenz komplementären 5'-Schwanzanteil T sowie eines Primers P5, der zur Hybridisierung an die Zielsequenz oder die Referenzsequenz an einem in 3'-Richtung zu einer zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähigen Sequenz liegenden Ort fähig ist, amplifiziert.

26. Quadramolekularer Komplex aus einer eine Mutation aufweisenden Doppelstrangnukleinsäure-Zielsequenz und einer Doppelstrangnukleinsäure-Referenzsequenz, wobei der Komplex hergestellt wird, indem man in den folgenden Schritten:

(a) die Ziel- und die Referenznukleinsäuresequenz mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung des Primers P2, eines Primers P4 mit einem zur Hybridisierung an die Referenzsequenz fähigen 3'-Anteil und einem nicht mit der Zielsequenz oder der Referenzsequenz komplementären 5'-Schwanzanteil T sowie eines Primers P5, der zur Hybridisierung an die Zielsequenz oder die Referenzsequenz an einem in 3'-Richtung zu einer zur Hybridisierung an den 3'-Anteil des Primers P4 fähigen Sequenz liegenden Ort fähig ist, amplifiziert, (b) Schwänze aus zwei nicht komplementären Strängen aufweisende partielle Duplexe der Zielsequenz und der Referenzsequenz bildet, wobei es sich bei einem ersten Bereich um die Sequenz P5 oder deren Komplement und bei dem zweiten Bereich um die Sequenz T oder deren Komplement handelt, (c) den Komplex durch Hybridisieren der Stränge des Schwanzes des partiellen Referenzduplex mit den Strängen der Schwänze des partiellen Zielduplex bildet.

27. Quadramolekularer Komplex des Anspruchs 26, wobei der Komplex aufgrund des Vorhandenseins von Markierungen auf den nicht komplementären Strängen der Ziel- und der Referenzsequenz nachweisbar ist, und wobei ferner entweder:

Primer P2 ein Gemisch von Primer P2 mit einer ersten Markierung und Primer P2 mit einer zweiten Markierung darstellt oder

Primer P4 eine erste Markierung und Primer P5 eine zweite Markierung aufweist.

28. Kit zum Nachweis einer Mutation in einer Zielnukleinsäure, wobei der Kit folgendes in abgepackter Form umfaßt:

(a) eine Referenznukleinsäure, wobei die Referenz eine zur Zielnukleinsäure mit Ausnahme des Vorhandenseins der Mutation im Ziel identische Nukleinsäure enthält; (b) einen Primer P2, der entlang eines ersten Strangs des Ziels und der Referenz verlängerbar ist; (c) einen Primer P5, der entlang eines zweiten Strangs des Ziels und der Referenz verlängerbar ist; (d) einen Primer P4 mit einem zur Hybridisierung an den zweiten Strang des Ziels und der Referenz fähigen 3'-Anteil und einem weder mit dem ersten Strang noch mit dem zweiten Strang komplementären 5'-Schwanzanteil T, wobei der 3'-Anteil des Primers P4 zur Hybridisierung an den zweiten Strang an einem in 5'-Richtung zu einer zur Hybridisierung an den Primer P5 fähigen Sequenz liegenden Ort fähig ist.

29. Kit nach Anspruch 28, ferner eine Polymerase und Nukleosidtriphosphate umfassend.

30. Kit nach Anspruch 28, wobei entweder:

Primer P2 ein Gemisch von Primer P2 mit einer ersten Markierung und Primer P2 mit einer zweiten Markierung darstellt oder

Primer P4 eine erste Markierung und Primer P5 eine zweite Markierung aufweist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

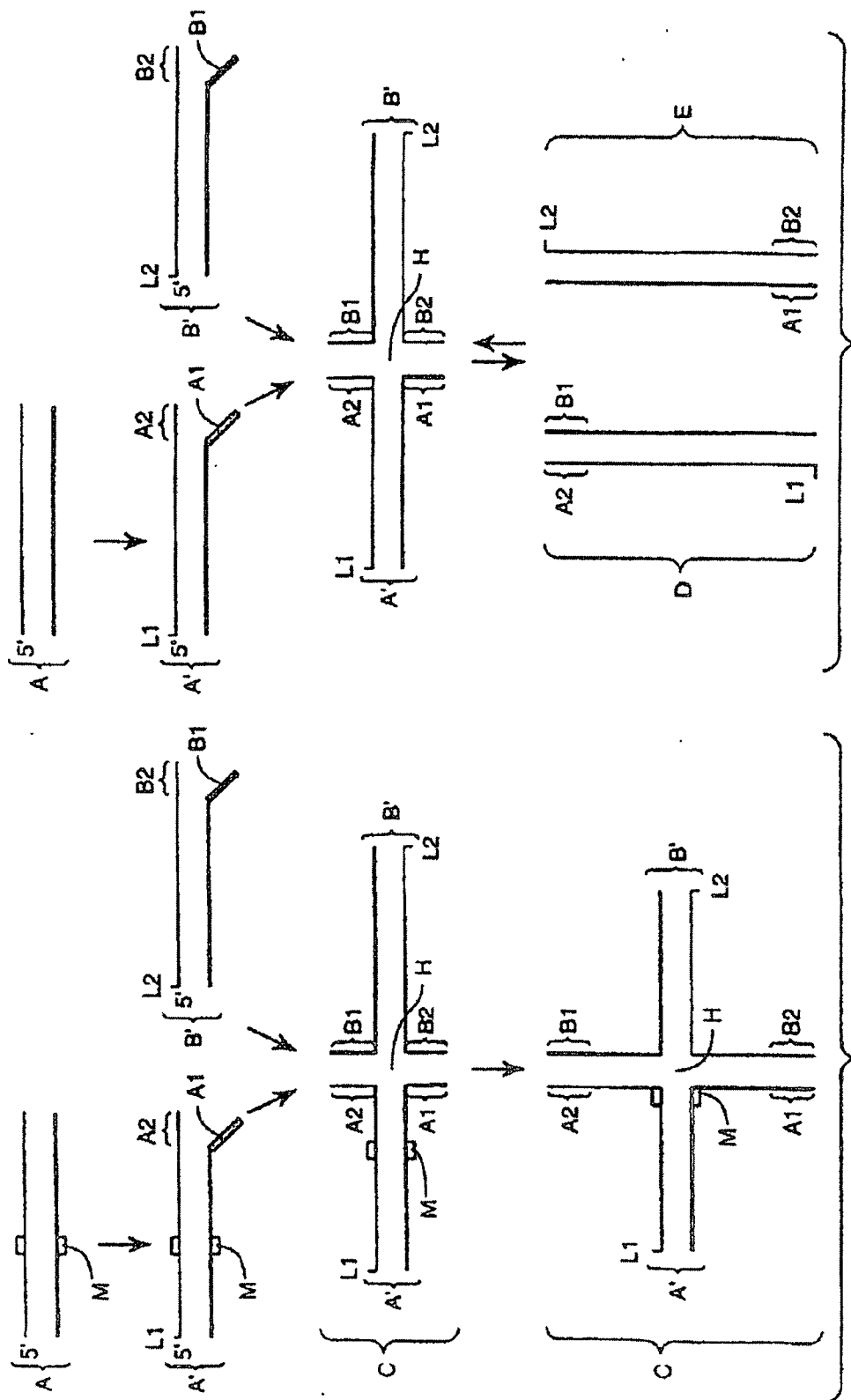


FIG. 2B

FIG. 2A

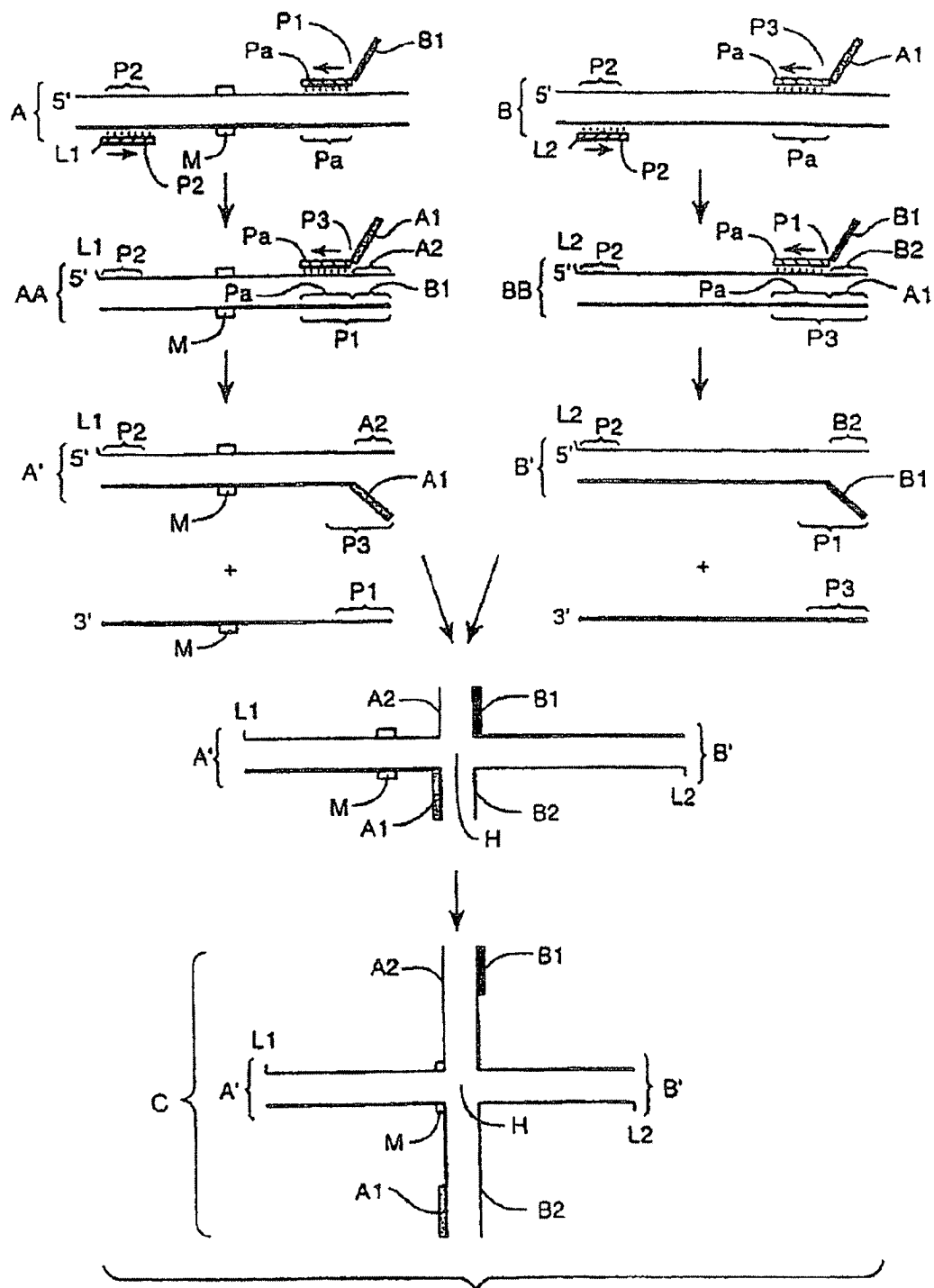


FIG. 3

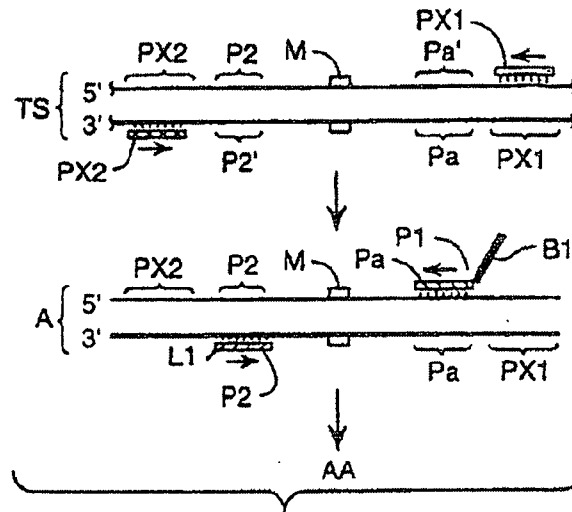


FIG. 4

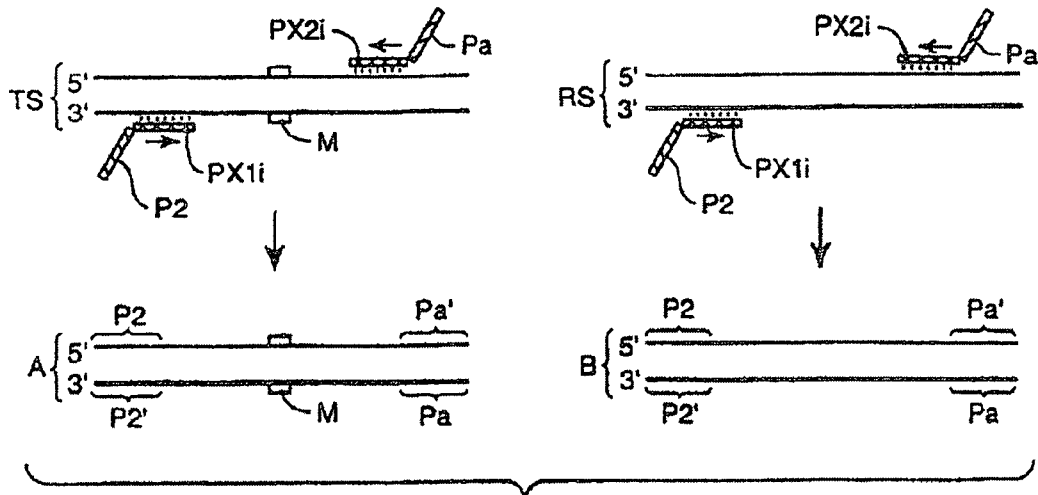


FIG. 5

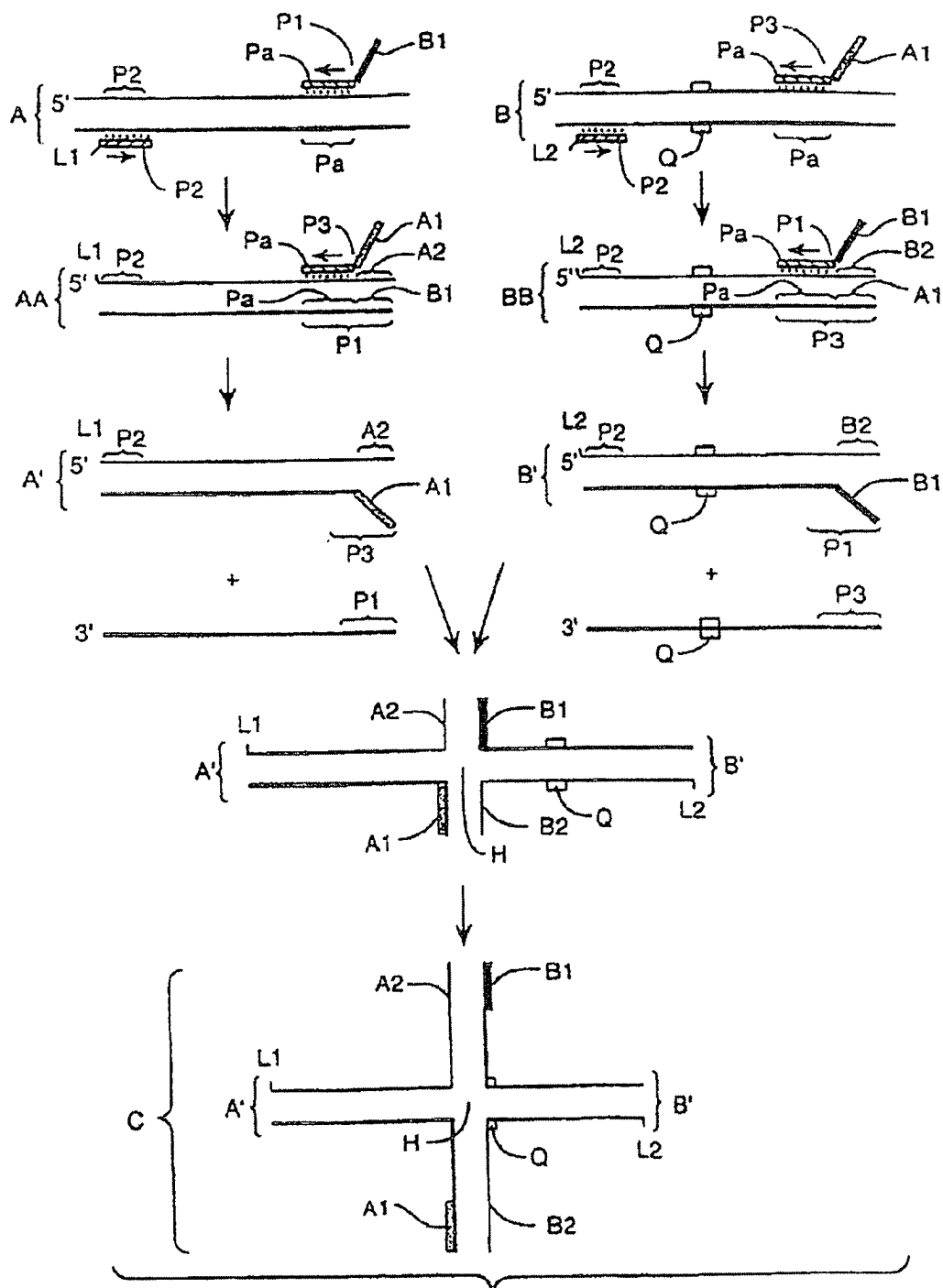


FIG. 6A

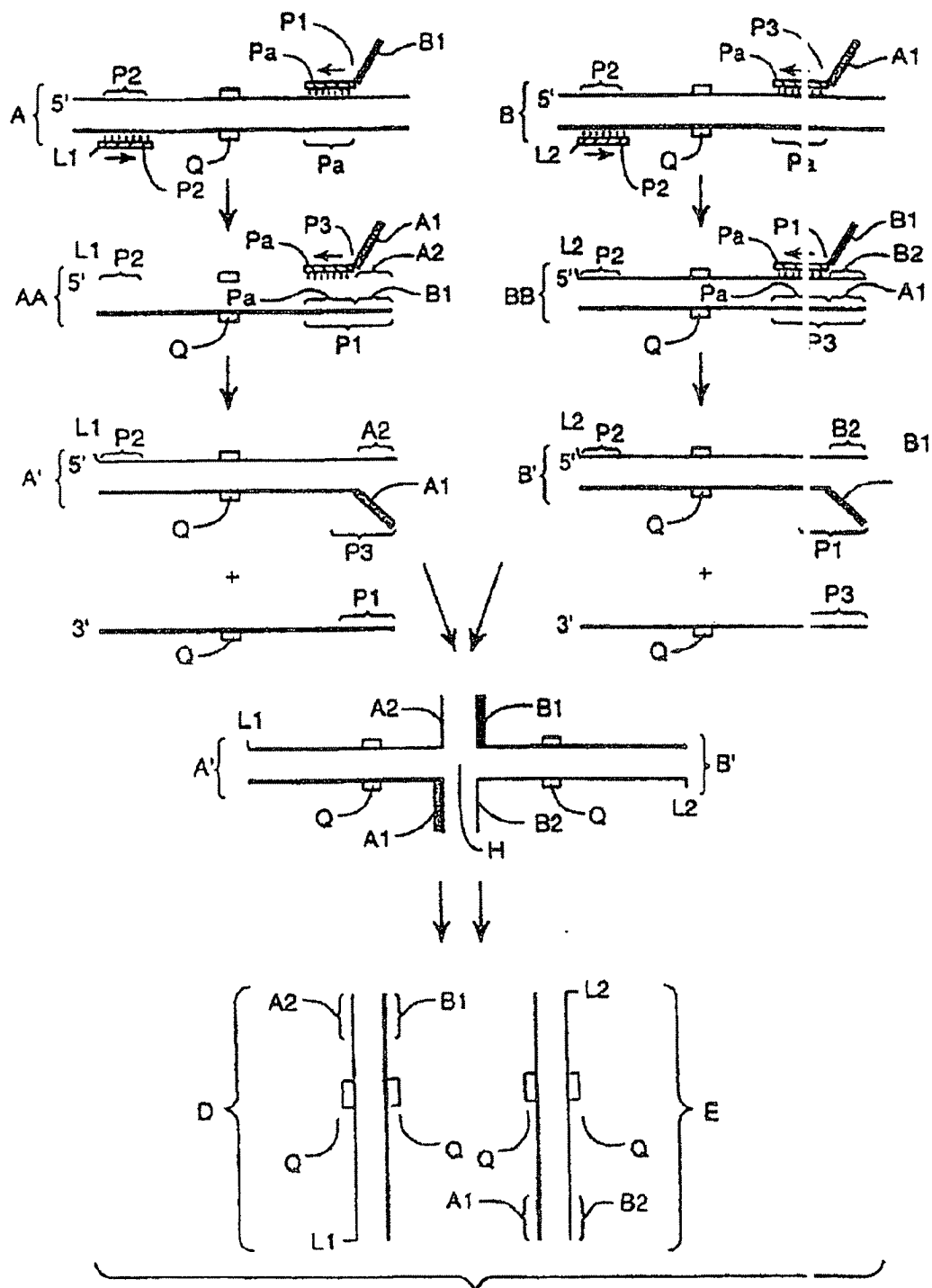


FIG. 6B

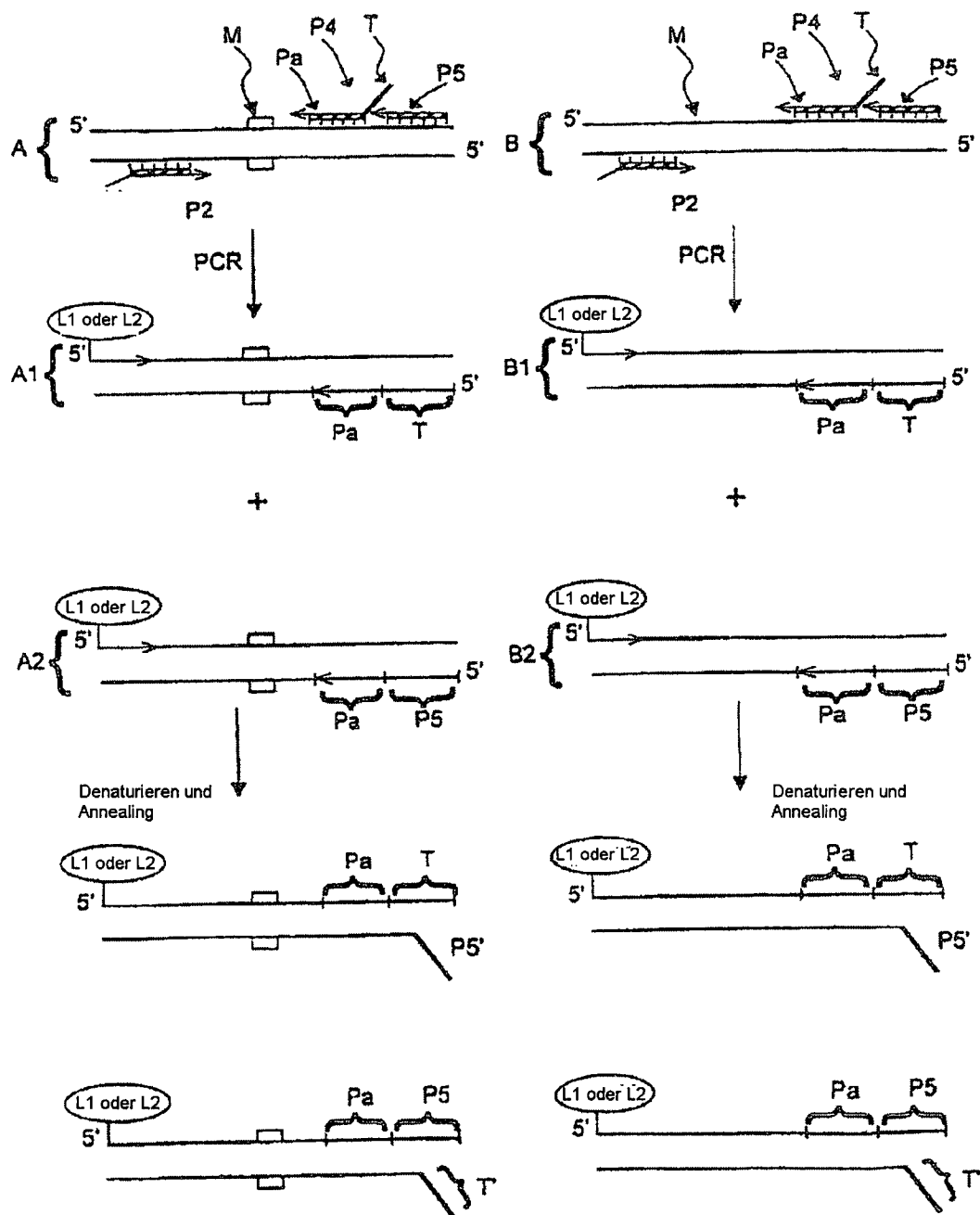


FIG. 7

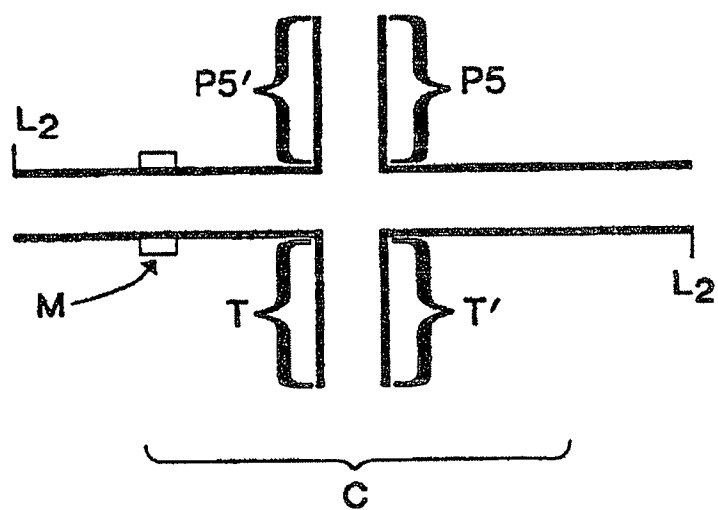


FIG. 8

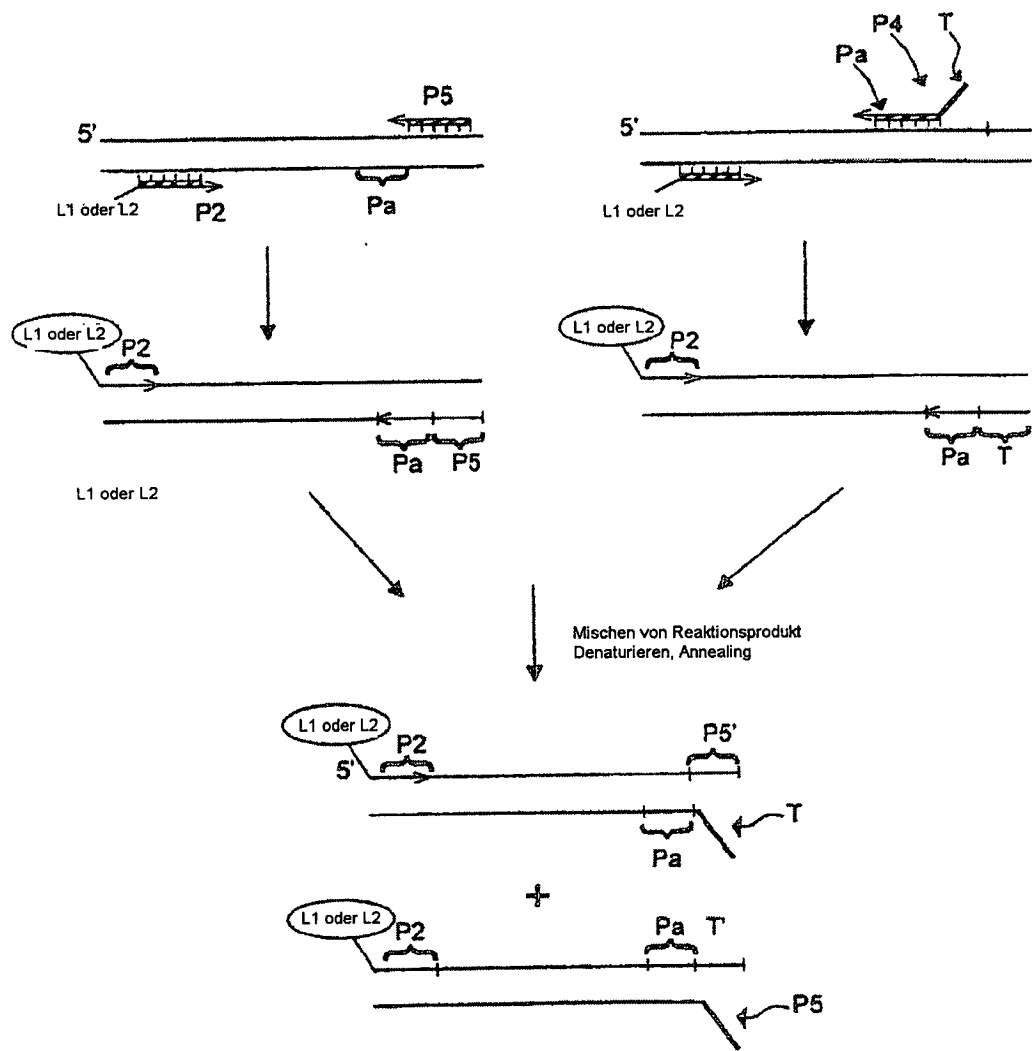


FIG. 9