



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 20 018 T2** 2008.01.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 356 116 B1**

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

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 20 018.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/02642**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 706 073.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/061139**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.01.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **08.08.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.10.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.01.2008**

(30) Unionspriorität:
772123 29.01.2001 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(73) Patentinhaber:
Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Ariz., US

(72) Erfinder:
**UTERMOHLEN, Joseph, Tucson, AZ 85711, US;
WOLF, Catherine, F-67201 Eckbolsheim, FR;
CHRISTENSEN, Kimberly, Tucson, AZ 85712, US**

(74) Vertreter:
**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European
Patent Attorneys, 81671 München**

(54) Bezeichnung: **HYBRIDISIERUNGSPUFFER DIE NIEDERMOLEKULARES DEXTRANSULFAT VERWENDEN UND
METHODEN ZU DEREN VERWENDUNG**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Verwendung von Volumenausschlussmitteln zur Verbesserung der in situ Hybridisierung zwischen Polynukleotidsonden und ihren Zielpolynukleotiden, insbesondere in einer automatisierten Testumgebung. Insbesondere in einem Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung von Volumenausschlussmitteln zur Vereinfachung von Assay- und Diagnoseverfahren für den Nachweis von DNA- und RNA-Sequenzen, insbesondere das menschliche Papillomavirus (HPV), das Epstein-Bar-Virus (EBV), die leichte Kette-mRNA von menschlichem Immunoglobulin (Kappa- und Lambda-Sequenzen), das Her-2/neu-Gen, die Maus-PS2-mRNA und DNA-Mikroarray-Oligonukleotide.

[0002] Die Hybridisierung ist eine allgemeine Technik, bei der die komplementären Stränge von Desoxyribonukleinsäure (nachstehend „DNA“)-Moleküle, Ribonukleinsäure (nachstehend „RNA“)-Moleküle und Kombinationen von DNA und RNA in einzelne Stränge getrennt werden und dann lässt man sie zu basengepaarten Doppelhelices renaturieren oder unter Doppelstrangbildung reannealen. Wenigstens drei größere Hybridisierungsklassen sind herkömmlich bekannt und werden verwendet: die Lösungshybridisierung, die die einzelnen Zellen auseinander reißt und vor der Hybridisierung die inneren Nukleinsäuren in die Lösung extrahiert; die Filter- oder Blot-hybridisierung, die extrahierte DNA-(oder RNA-)Fragmente von Agarosegelen auf Filter oder Blotter, wie zum Beispiel Cellulosenitrat oder Nylon, für eine nachfolgende Hybridisierung mit radioaktiver DNA oder (RNA) und anschließendem Nachweis der Hybridisierung durch Autoradiographie oder Fluorographie überträgt; und die in situ Hybridisierung („ISH“), die den Nachweis und die Lokalisierung spezifischer Nukleinsäure- oder Polynukleotidsequenzen direkt innerhalb einer strukturell intakten Zelle oder Zellbestandteil ermöglicht, wo eine Extraktion von Nukleinsäuren aus der Zelle unerwünscht ist. Obwohl jede dieser jeweiligen Hybridisierungstechniken häufig im Allgemeinen Zellen, Gewebe und bestimmte Reagenzien verwendet, wird in diesem Fachgebiet jede Technik im Allgemeinen als voneinander verschieden und vollständig voneinander unterscheidbar betrachtet und angenommen.

[0003] Die in situ Hybridisierung ist eine Technik, die sowohl molekulare als auch morphologische Information über intakte einzelne Zellen und Zellteile liefert. Die Technik erlaubt den Nachweis von DNA oder RNA in situ innerhalb der Zellmorphologie und gestattet dem Forscher diejenigen speziellen Zellen oder Zellteile zu identifizieren, die die interessierenden spezifischen DNA- oder RNA-Sequenzen enthalten, als vielmehr zu erfordern, dass der Forscher mühsam DNA und/oder RNA aus einer heterogenen

Zellpopulation extrahiert. Diese Technik erlaubt ebenfalls die simultane Bestimmung der biochemischen und/oder morphologischen Charakteristika dieser Zellen. Aus diesem Grund weist die in situ Hybridisierungsmethodologie eine direkte Anwendung auf viele Bereiche der biomedizinischen und klinischen Forschung auf, einschließlich der Entwicklungsbiologie, Zellbiologie, Genetik, klinischen Diagnose und pathologischen Bewertung.

[0004] Trotz des Potentials der in situ Hybridisierung als eine molekulare analytische Technik war die Entwicklung wirksamer Protokolle und Verfahren größtenteils planlos und zusammenhanglos. Seit sie das erste mal 1969 von Gall et al., P.N.A.S. U.S.A., 63:378-383 (1969); Methods in Enzymol. 38:370-380 (1971) beschrieben worden ist, wurde die in situ Hybridisierungsmethode auf zwei verschiedene morphologische Situationen gelenkt: die Lokalisierung interessierender spezifischer Nukleinsäuresequenzen in dem Zytoplasma einer Zelle; und die Identifikation spezifischer Nukleinsäuren innerhalb des Kerns und/oder der Chromosomen einer Zelle.

[0005] Ein Großteil der Forschung, die die Hybridisierung zwischen Ziel- und Sondenpolynukleotiden für Assay- und Diagnosezwecke betraf, wurde auf die Optimierung von Hybridisierungsraten gerichtet. Die in situ Hybridisierung ist insbesondere problematisch, weil die Sonden nicht in der Lage sind, ohne weiteres in den Kern oder das Zytoplasma einzudringen, in dem sich ihre Zielnukleotide befinden. Zur Lösung dieser Probleme haben Forscher unter anderem versucht, die Größe der Sonde zu verringern und die Zellfixierungsverfahren zu verändern, um das Eindringen der Sonde in das Zytoplasma oder den Kern zu erleichtern, siehe allgemein Singer, R. H., et al., „Optimization of In Situ Hybridization Using Isotopic and Non-Isotopic Detection Methods," Biotechniques 4(3):230-250, 1986, und Haase, A., et al., „Detection of Viral Nucleic Acids by In Situ Hybridization," Methods in Virology, Band VII, Seiten 189-226, (1984).

[0006] Amasino, R. M., „Acceleration of Nucleic Acid Rate by Polyethylene Glycol," Anal. Biochem, 152:304-307 (1986). Es wurde berichtet, dass die Wirkung von Dextransulfat, welches das am häufigsten verwendete Ausschlussmittel ist, am deutlichsten in Hybridisierungen mit gemischten Phasen ist, bei denen die Sonden 250 Nukleotide überschreiten. Es wurde weiterhin berichtet, dass bei abnehmender Sondengröße ebenfalls die verstärkende Wirkung von Dextransulfat auf die Hybridisierungsgeschwindigkeit abnimmt, ohne dass eine Wirkung für Oligonukleotide mit 14 Basen beobachtet wird. Meinkoth J. und Wahl J., „Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on Solid Supports" (Besprechung), Anal. Biochem., 138:267-284 bei 268 (1984). Es wurde ebenfalls die Verwendung eines Volumenausschlusses zu Verstärkung der in situ Hybridisierung berichtet. Es

wurde berichtet, dass eine durchschnittliche Länge von 40 Nukleotiden für die in situ Hybridisierung in Gegenwart von Dextransulfat optimal ist. Hasse, A., s.o. bei 205.

[0007] Frühere Quellen, die die Verwendung von Dextransulfat als Volumenausschlussmittel offenbaren, umfassen Wahl, G.M., et al., „Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzylxymethyl-paper and rapid hybridization using dextran sulfate," PNAS 76:3683 (1979); und Ledermann, L.L., et al., „The rate of nucleic acid annealing to cytological preparations is increased by the presence of dextran sulfate," Anal. Biochem., 117(1):158-163 (1981).

[0008] Die in situ Lokalisierung von HPV-DNA unter Verwendung langer biotinylierter Sonden in Gegenwart von Dextransulfat wurde ebenfalls von Beckmann, P.M., et al.: "Detection and Localization of Human Papillomavirus DNA in Human Genital Condylomas by In Situ Hybridization with Biotinylated Probes," J. Med. Virol., 16:265-273 (1985); Milde K., Loning, T., „Detection of Papillomavirus DNA in Oral Papillomas and Carcinomas: Application of In Situ Hybridization with Biotinylated HPV 16 grobes," J. Oral. Pathol., 15:292-296 (1986); und Mc Dougall, J.K., et al., „Methods for Diagnosing Papillomavirus Infection," in Papillomaviren, Wiley, Chicester (CIBA Foundation Symposium 120), Seiten 86-103 (1986) berichtet.

[0009] Das US Patent Nr. 5,985,549 (Singer et al.) zeigt die Verwendung eines Dextransulfathybridisierungspuffers, der Formamid (entionisiert); Dextransulfat (10 %); menschliche DNA oder Lachssperma-DNA (100 µg/ml); menschliche tRNA (100 µg/ml); und Vanadylsulfat (10 µM) für die ISH enthält. Das Molekulargewicht von Dextransulfat war nicht offenbart und es wird angenommen, dass ein durchschnittliches Molekulargewicht von 500.000 erhalten wurde.

[0010] Das US Patent Nr. 5,750,340 (Kim, I., et al.) offenbart eine Hybridisierungslösung zur Durchführung der ISH, wobei die Lösung im Wesentlichen aus 8-12 % Dextransulfat, 10-30 % Formamid und einem Salz besteht. Es ist keine Quelle für das Dextransulfat oder ein Molekulargewicht spezifiziert.

[0011] Das US Patent Nr. 5,116,727 (Brigatti) offenbart Hybridisierungspuffer, die anionische Heteropolysaccharide (zum Beispiel Chondroitin A-Sulfat) als nützliche Volumenausschlussmittel zur Beschleunigung von Hybridisierungsreaktionen enthalten. Chondroitin A-Sulfat-Hybridisierungspuffer wiesen eine geringe Viskosität auf, die eine nützliche Eigenschaft für Kapillarspaltobjektträger und deren Verwendung in dem automatisierten Betrieb von in situ Hybridisierungsreaktionen ist. Brigatti lehrt, dass die

niedrige Viskosität dieses Puffers auf das Volumenausschlussmittel mit anionischer Heteropolysaccharidstruktur zurückzuführen ist; dies wurde mit anionischen Polysacchariden wie Dextransulfat verglichen. Brigatti offenbart weiter, dass anionische Homopolysaccharide wie Dextransulfatpolymer, basierend auf deren Monomerstruktur, Puffer, mit einer beträchtlich größeren Viskosität erzeugen. Diese hohe Viskosität macht derartige Hybridisierungspuffer für die Kapillarspalttechnologie nicht ideal, da eine hohe Viskosität sowohl die Diffusion der Sonde in das Ziel und vom Ziel heraus und während der Waschschriffe zum Abwaschen von überschüssiger Sonde verhindert. Brigatti lehrt weiterhin, dass eine Erhöhung der Dextransulfatkonzentration ebenfalls die Viskosität erhöht und somit den Hybridisierungsprozess hemmt.

[0012] Das US Patent Nr. 4,886,741 (Schwartz et al.) beschreibt die Verwendung von Dextransulfat, Natriumsalz, zur Verwendung als ein Volumenausschlussmittel für die ISH. Das durchschnittliche Molekulargewicht ist nur durch Verweis auf die Quelle (Sigma Chemical, Products for Life Sciences, St. Louis, MO) beschrieben, es weist ein durchschnittliches Molekulargewicht von 500.000 auf. Schwartz et al. offenbart ebenfalls, dass Dextransulfat typischerweise bei einer Konzentration von ungefähr 5-10 % (w/v) verwendet wird.

[0013] Das US Patent 4,302,204 (Wahl, G., et al.) beschreibt die Verwendung von Dextransulfatpolymeren als Hybridisierungspuffer, die für die in vitro Blot-Hybridisierung verwendet werden. In diesem Patent enthielten jedoch die bevorzugten Hybridisierungspuffer Dextransulfat mit einem MW von 500.000. Es wurden keine Beispiele gezeigt, die ein Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht verwenden, noch wurde eine in situ Reaktion geschildert oder beansprucht.

[0014] Auf dem Gebiet der Nukleinsäurehybridisierung ist der Bedarf an schnellen Assaytests zum genauen und reproduzierbaren Nachweis von Nukleinsäuren schon ein lange bestehendes Problem. Alle Verfahren, die eine Tendenz zur Beschleunigung der typischerweise viele Stunden langen Verfahren zeigen, sind insbesondere für Hybridisierungsassays wertvoll, die durch klinische Labore durchgeführt werden.

[0015] Die vorliegende Erfindung zeigt, dass Dextransulfat mit niedrigerem Molekulargewicht ebenfalls für Hybridisierungsreaktionen ein wirksames Volumenausschlussmittel ist. Die Hybridisierungspuffer der vorliegenden Erfindung verwenden kleinere Dextransulfatpolymere und weisen somit eine niedrigere Viskosität als herkömmliche Hybridisierungspuffer auf, die als Volumenausschlussmittel Dextransulfatpolymere mit höherem Molekulargewicht verwenden. Die niedrigere Viskosität dieser Dextransulfatpoly-

merpuffer mit geringem Molekulargewicht macht sie für automatisierte Hybridisierungsverfahren, wie beim Dispensieren, automatisiertem Durchfluss und Mischen auf einem Objektträger verwendbar.

[0016] Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zum automatischen Hybridisieren einer Polynukleotidsonde an ein Ziel bzw. Target, umfassend die Schritte des Herstellens eines zu untersuchenden Gewebeabschnitts oder Zellen; des Hybridisierens des Gewebeabschnitts oder des zellulären Präparat mit einer Nukleinsäuresondenzusammensetzung in der Anwesenheit eines Dextransulfats mit niedrigem Molekulargewicht, wobei die Sondenzusammensetzung mindestens eine Sequenz, die zu einem kodierenden Bereich des Ziels komplementär ist, enthält; des Entferns der nicht-hybridisierten Sonden von dem Gewebeabschnitt oder dem zellulären Präparat, und des Nachweisens der hybridisierten Sonde-Ziel-Kombination.

[0017] Die **Fig. 1A** und **Fig. 1B** sind Farbaufnahmen menschlicher Milzgewebeproben, die mit einer DNA-Sondenkollektion hybridisiert sind, bestehend aus Sonden, die Zielgen spezifische Domänen, die der EBV EBER 1 und 2 Kern-RNA entsprechen, besitzen, wobei die Gewebeprobe vor der in situ Hybridisierung (A) nicht mit Ribonuklease A behandelt war oder vor der in situ Hybridisierung (B) mit Ribonuklease A behandelt war.

[0018] Die **Fig. 2A** und **2B** sind Farbaufnahmen von Lymphomgeweben unter Verwendung einer Sondenkollektion, bestehend aus Sonden, die Zielgen spezifische Domänen, die der kappa leichten Kette-mRNA von menschlichem Immunglobulin entsprechen, besitzen. Die Lymphomgewebe in **Fig. 2A** überexprimieren die kappa leichte Kette und das Gewebe in **Fig. 2B** überexprimiert die lambda leichte Kette.

[0019] Die **Fig. 3A** und **3B** sind Farbaufnahmen menschlicher Lymphomgewebe unter Verwendung einer Sondenkollektion, bestehend aus Sonden, die Zielgen spezifische Domänen, die der lambda leichte Kette-mRNA von menschlichem Immunglobulin entsprechen, besitzen. Das Gewebe in **Fig. 3A** überexprimiert die lambda leichte Kette und das Gewebe in **Fig. 3B** überexprimiert die kappa leichte Kette.

[0020] **Fig. 4** ist eine Farbaufnahme eines auf einem Objektträger basierenden in situ Hybridisierungsbildes einer Maus-pS2-Genexpression in dem Mäusemagen unter Verwendung einer Maus-pS2-Antisense-Ribosonde verdünnt in Puffer B.

[0021] **Fig. 5** ist eine gescannte Farbaufnahme des ClonTech-Human Atlas DNA-Mikroarrays, das mit einer Cy3-markierten amplifizierten cDNA-Sonde aus Plazenta-RNA sondiert wurde.

[0022] **Fig. 6** ist eine Farbaufnahme eines Objektträgers mit der Her-2/neu Kontrollzelllinie hoher Amplifikation, (Ventana Kat. Nr. S1003) hybridisiert an eine Her-2/neu-DNA-Sonde.

[0023] **Fig. 7** ist eine Farbaufnahme eines Objektträgers mit der Her-2/neu Kontrollzelllinie niedriger Amplifikation, (Ventana Kat. Nr. S1002) hybridisiert an dieselbe Her-2/neu-DNA-Sonde.

[0024] **Fig. 8** ist eine Farbaufnahme eines Objektträgers mit der nicht amplifizierten Her-2/neu Kontrollzelllinie, (Ventana Kat. Nr. S1001) hybridisiert an eine Her-2/neu-DNA-Sonde.

[0025] **Fig. 9** ist eine Farbaufnahme von in Paraffin eingebetteten Zelllinien von Caski-Zellen mit näherungsweise 500 Kopien von HPV16, die in den Zellkern integriert sind.

[0026] **Fig. 10** ist eine Farbaufnahme von in Paraffin eingebetteten Kontrollzelllinien von HeLa-Zellen mit näherungsweise 20-50 Kopien von HPV18, die in den Zellkern integriert sind.

[0027] Die Erfinder haben hierin gezeigt, dass Dextransulfatpolymere mit niedrigem Molekulargewicht von näherungsweise 10.000 MW (Molekulargewicht) für Hybridisierungsreaktionen zwischen DNA:DNA, DNA:RNA und RNA:RNA wirksame Volumenausschlussmittel sind. Puffer, die Dextransulfat innerhalb des Bereichs von 10.000 MW umfassen, zeigten eine gute Leistung für sowohl Nick-translatierte markierte Sonden, Oligonukleotid-DNA-Sonden, cDNA-Sonden als auch in vitro transkribierte markierte RNA-Sonden. Der Zieltyp von Nukleinsäuren waren chromosomale (Interphasenzellen), Kern-RNA (EBER) mRNA-Ziele und DNA-Mikroarrayoligonukleotide. Sowohl kolorimetrische ISH- als auch FISH-Sonden wurden mit diesen Puffern getestet. Die Puffer funktionierten mit in Paraffin eingebetteten Formalin-fixierten Geweben und Zelllinie-, Abschnitte-Cytospinzellpräparaten und ThinPrep™ (ein Flüssigkeits-basiertes Präparat)-Zellpräparaten. Diese Puffer verhielten sich überraschend so gut wie oder besser als vergleichbare Puffer, die unter Verwendung von Standarddextransulfatpolymer mit 500.000 MW hergestellt wurden.

[0028] Im Allgemeinen werden Volumenausschlussmittel zur Beschleunigung der Reassoziationskomplementärer DNA zu Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Zunahme in der Reassoziationskinetik in Verbindung mit herkömmlichen Dextransulfatpolymeren (500.000 bis 2.000.000 MW) liegt im Bereich von 8 bis 15 mal so viel im Vergleich mit Puffern, denen dieses Volumenausschlussmittel fehlt (Wetmur, J.G., 1975, Biopolymers 14:2517-2524; Wahl und Stark, US Patent Nr. 4,302,204). Die bevorzugte Konzentration (Verhältnis von Gewicht zu Volumen) für Dext-

ransulfatpolymere (500.000-2.000.000 MW) liegt zwischen 5 % bis 10 %. Die Schlüsselarbeit für die Beschreibung der Beschleunigungswirkung von Dextransulfatpolymeren als Volumenausschluss war die von Wetmur, s.o. Das relative Molekulargewicht von offenbarten Dextransulfaten betrug 500.000 und 2.000.000 MW. Die Wirksamkeit von Dextransulfatpolymeren mit niedrigem Molekulargewicht als Volumenausschlussmittel wurde nicht getestet.

[0029] Die Erfinder sprachen mehrere fundamentale Punkte an, als sie die Entwicklung dieser ISH-Hybridisierungspuffer mit niedriger Viskosität übernahmen, wie zum Beispiel:

- ob Polymerdextransulfat in einem niedrig molekulargewichtigen Bereich (8.000 bis 15.000) ein wirksames Volumenausschlussmittel für Hybridisierungspuffer ist;
- ob Puffer mit diesen kleineren Polymeren bei automatisierten in situ Hybridisierungsreaktionen unter Verwendung der Ventana Medical Systems, Inc. Abdecktechnologie wirksam sind;
- ob eine höhere Viskosität eine notwendige Eigenschaft für Dextransulfatpuffer ist, damit sie für die Hybridisierung wirksam sind;
- ob diese Polymere mit niedrigerem Molekulargewicht mit Oligonukleotidsonden funktionieren, weil die Beispiele von Schwartz (US 4886741) Puffer mit Dextransulfatpolymeren mit hohem Molekulargewicht waren. Die Folgerung war, dass kleinere Polymere nicht wirksam sein könnten;
- ob diese Puffer sich mit anderen Lösungen auf einem Objektträger zur Bildung einer wirksamen Hybridisierungslösung mischen;
- ob eine kleinere Größe und größere Löslichkeit von Volumenausschlussmitteln das Spülverhalten beim Auswaschen der Sonde und des Hybridisierungspuffers während den Waschgängen nach der Hybridisierung beeinflusst, wodurch ein abweichendes Signal auf Probengewebe verringert wird; und
- ob Formamid in dem Puffer inkompatibel ist. Die Wirkung von Formamid bei der Beschleunigung der Hybridisierung wird nicht gut verstanden. Die meisten Untersuchungen schlagen vor, dass Formamid bei Konzentrationen von mehr als 25 Vol.-% tatsächlich die Hybridisierungsreaktion reduziert (J.R. Hutton, „Renaturation kinetics and thermal stability of DNA in aqueous solutions of formamide and urea," Nucleic Acid. Res. 4(10):3537-3555, Okt. 1977). Die Eigenschaften von Dextransulfatpolymeren mit höherem Molekulargewicht als Volumenausschlussmittel können auf die Eigenschaft einer erhöhten Viskosität zurückzuführen sein, oder deren höheres Molekulargewicht kann ein synergetisches Ergebnis mit Formamid oder Alditolen sein. Die von Brigatti (US 5116727, s.o.) beschriebenen Polymere waren 10 mal kleiner als Dextransulfat mit 500.000, obwohl gelehrt wurde, dass diese von Dextransul-

fat verschieden sind, da sie Heteropolysaccharidpolymere waren, eine für Chondroitin A-Sulfatvolumenausschlussmittel einzigartige Eigenschaft. Daher war zu Beginn dieser Untersuchungen nicht definiert noch war es verstanden, ob die kleineren Dextransulfatpolymere wirksame Volumenausschlussmittel sind.

[0030] Für automatisierte Verfahren ist für Hybridisierungsreaktionen ein Hybridisierungspuffer mit niedriger Viskosität erwünscht. Die automatisierte in situ Hybridisierung unter Verwendung von DISCOVERY™, NexES® oder BENCHMARK™ Geräten von Ventana Medical Systems verwendet ein LIQUID COVERSLIP™ zur Verhinderung eines Reagenzverlustes durch Verdampfen während der Reaktion. Die Kompatibilität von Hybridisierungspuffer mit Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht mit dem Flüssigabdeckungssystem von Ventana war nicht bekannt. Die Kompatibilität des Puffers und ein großer Bereich von Sondentypen auf dem Objektträgeranfarbungssystem von Ventana waren vor diesen Untersuchungen nicht bekannt. Es wurde festgestellt, dass diese Puffer mit synthetischen Oligonukleotidsonden, Nick-translatierten DNA-Sonden aus Plasmiden oder von Cosmidursprung und mit in vitro synthetisierter RNA verwendbar sind.

[0031] Die automatisierte Objektträgerverarbeitung auf der Ventana DISCOVERY™ automatisierten ISH-Anfärbungsvorrichtung war das mit diesen Puffern verwendete Testsystem. Dieses Anfärbungssystem beruht auf dem Mischen durch Gegenrotation der flüssigen Abdeckung mit Luftstrahlen zur Stimulierung der Reagenzvermischung auf dem Objektträger und der völligen Verteilung der Reagenzien über die Oberfläche des Objektträgers. Das Ventana-Verfahren funktioniert am besten, wenn die Reagenzien eine ähnliche oder kleinere Viskosität als die von Wasser aufweisen. Reagenzien mit hohen Viskositäten werden nicht leicht an das DISCOVERY-System angepasst. Viele der herkömmlichen Hybridisierungspuffer, die anionische Dextransulfathomopolymere mit niedrigem Molekulargewicht verwenden, sind auf diesem Anfärbungssystem nicht wirksam.

[0032] Nach bestem Wissen des Erfinders ist der Nutzen von Polymeren mit niedrigem Molekulargewicht sowie ihre Wirksamkeit beim Antrieb der Nukleinsäure-Reassoziations in der Hybridisierungsliteratur nicht vollständig erforscht worden. Die Polymergröße des Dextransulfats, von dem gezeigt wurde, dass es wirksam die Nukleinsäurereassoziations antreibt, liegt im Bereich von 500.000 bis 2.000.000 MW. Jedoch haben die Erfinder festgestellt, dass Dextrane mit viel niedrigerem MW und niedrigeren Viskositäten mit dem zusätzlichen Ergebnis verwendet werden können, dass Hybridisierungspuffer basierend auf Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht und niedriger Viskosität in der kleinvolumigen Umgebung eines

automatisierten Gerätes verwendet werden können. Dies war ein überraschendes Ergebnis, weil wenigstens ein Kommentator beobachtet hat, dass Homopolymere, wie Dextransulfat mit hohen durchschnittlichen Molekulargewichten als Volumenausschlussmittel höchst wirksam sind (siehe Brigatti, US 5,516,727, diskutiert s.o.). Die Viskositäts- und Löslichkeitscharakteristika von jedem Polymer in Lösung (bei einer gegebenen Konzentration) ist eine Funktion seines Stokes-Radius oder des Molekülvolumens des Polymers. Somit weisen größere Polymere eine niedrigere Löslichkeit auf und induzieren Lösungen mit größerer Viskosität für beliebige zwei Polymere derselben Monomereinheit.

[0033] Die größere Löslichkeit von Dextransulfatpolymeren mit niedrigerem Molekulargewicht erlaubt die Bildung von Hybridisierungspuffern mit Dextransulfatpolymeren bei Konzentrationen von gleich oder mehr als 10 % in Gegenwart von Formamidkonzentrationen im Bereich von 5 % bis 80 %. Dies erlaubt, dass Lösungen als 2X Stammlösungen formuliert werden können. Mischhybridisierungspuffer aus 2X Stammlösungen können auf dem Objektträger mit wässrigen Lösungen zur Herstellung des Hybridisierungspuffers mit optimalen Konzentrationen für alle Bestandteile gemischt werden.

Zusammensetzungen von Hybridisierungspuffern mit Dextransulfatpolymeren mit niedrigem Molekulargewicht

Puffer A:

20 % Gew./Vol. Dextransulfat mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10 K
 50 % Vol./Vol. Formamid
 10 mM Tris (15:85 Tris-HCl:Tris-OH)
 5 mM EDTA
 300 mM NaCl
 30 mM Trinatriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)
 0,05 % Brij-35
 pH = 7,3

[0034] Puffer A kann direkt ohne weitere Verdünnung in einem automatisierten Format unter Verwendung des Handbetriebsprotokolls für ISH verwendet werden. Diese Lösung kann ebenfalls über ein automatisiertes Protokoll als näherungsweise 2X konzentrierte Lösung verwendet werden, die für die meisten automatisierten Verfahren in ein gleiches Volumen von 2X SSC-Triton X100 dispensiert ist. 1X SSC umfasst 0,15 M NaCl; 0,015 M Trinatriumcitrat. Die resultierende Hybridisierungslösung auf dem Objektträger beträgt 50 % der Konzentration von Puffer A mit Ausnahme der NaCl- und Trinatriumcitratkonzentrationen, die gleich bleiben.

[0035] Die Konzentration des pH-Werts kann im Bereich von 6-8 liegen, jedoch ist 7,3 besonders bevor-

zugt.

[0036] Modifikationen des Basispuffers mit niedrigem Molekulargewicht sind für spezifische Anwendungen verwendbar, wie zum Beispiel bei der Hybridisierung von DNA- oder RNA-Sonden an mRNA (Puffer B):

20 % Gew./Vol. Dextransulfat mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10 K
 80 % Vol./Vol. Formamid
 2x SSPE
 0,05 % Brij-35

[0037] 1x SSPE ist eine Stammlösung, die folgendes umfasst: 150 mM NaCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA in Wasser. Puffer B kann über ein automatisiertes Protokoll als näherungsweise 2-fach konzentrierte Lösung verwendet werden, die für die meisten automatisierten Verfahren in ein gleiches Volumen von 2 X SSPE, 0,025 % Triton-X100 und 0,025 % Brij-35 dispensiert ist. Die resultierende Hybridisierungslösung wäre 10 % Gew./Vol. Dextransulfat mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10 K, 40 % Vol./Vol. Formamid, 2x SSPE und 0,025 % Brij-35. Der bevorzugte Bereich der Formamidkonzentration beträgt ungefähr 20 % bis ungefähr 80 %, eine bevorzugte Konzentration beträgt ungefähr 40 % bis 80 % und die besonders bevorzugte Konzentration beträgt 80 % (40 % auf dem Objektträger). Der bevorzugte Bereich der SSPE-Konzentration beträgt ungefähr 2-4X, während die besonders bevorzugte Konzentration 2X SSPE beträgt.

[0038] Eine andere Variante des Dextransulfathybridisierungspuffers mit niedrigem Molekulargewicht von Puffer A wird vorzugsweise für automatisch hybridisierende „DNA-Chips“ verwendet, die auf Mikroskopglasobjektträgern aufgebaut sind, die typischerweise von Unternehmen wie Incyte und ClonTech verkauft werden. Die Zusammensetzung des Puffers (Puffer C) ist: 6x SSPE, 20 % Dextransulfat (10 K MW), und 10 % Formamid. Puffer C wird typischerweise auf dem Gerät in 1:1-Verdünnung mit 2X SSPE, 0,0125 % Triton-X100 und 0,025 % Brij-35 verwendet. Einer der großen Vorteile von Puffer C besteht darin, dass er zur Maximierung der Verlauffähigkeit des Puffers auf der Objektträgeroberfläche formuliert ist, wodurch alle der verfügbaren Sondenarrays bedeckt sind. Eine bevorzugte Konzentration von SSPE liegt im Bereich von 2-8X, während 3-7X bevorzugter ist und 6X besonders bevorzugt ist. Der bevorzugte Konzentrationsbereich von Formamid beträgt 0-20 %, bevorzugter 5-15 % und besonders bevorzugt 10 %.

[0039] Das hierin verwendete Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht stammt von Sigma Chemical. Es wird von Sigma mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von näherungsweise 10.000

verkauft. Das mittlere Molekulargewicht (das heißt durch Analyse des Molekulargewichts von minimal 75 % der gesamten Population der Dextransulfatpolymere) für drei Chargen des Sigma Produkts Dextransulfat (Katalognummer D-6924) betrug jedoch für die Chargennummern 49H0530, 100K1379 und 070K0848 12.750 MW, 13.360 MW beziehungsweise 13.360 MW. Der Molekulargewichtsbereich für dieses Material liegt innerhalb zwei Standardabweichungen (8.000 bis 16.000 MW). Der Begriff „Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht“ ist daher mit einer gewissen Variabilität verbunden, da es ein Polymer ist, das bezüglich seiner durchschnittlichen Größe nicht gut kontrolliert ist.

[0040] Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zum automatischen Hybridisieren einer Nukleinsäuresonde an ein Ziel, umfassend die Schritte des Herstellens eines zu untersuchenden Gewebeabschnitts oder Zellen; des Hybridisierens des Gewebeabschnitts oder des zellulären Präparats mit einer Nukleinsäuresondenzusammensetzung in der Anwesenheit eines Dextransulfats mit niedrigem Molekulargewicht, wobei die Sondenzusammensetzung mindestens eine Sequenz, die zu einem kodierenden Bereich des Ziels komplementär ist, enthält; des Entfernens der nichthybridisierten Sonden von dem Gewebeabschnitt oder dem zellulären Präparat, und des Nachweisens der hybridisierten Sonde-Ziel-Kombination.

[0041] Die automatische Hybridisierung ist der Begriff, der zur Beschreibung der Hybridisierung einer Sonde an ein Ziel durch ein automatisiertes Gerät, wie zum Beispiel die von Ventana Medical Systems verkauften, verwendet wird. Diese umfassen die Modelle ES[®], NexES[®], DISCOVERY[™] und BENCHMARK[™]. Die Herstellung der Gewebe- oder Zellprobe ist wie das Einlegen der Objektträger auf das System manuell. Das Hybridisierungsverfahren wird durch das Gerät unter Verwendung eines programmierten Protokolls ausgeführt, das spezifisch für die Verwendung auf der automatisierten Anfärbungsvorrichtung angepasst ist. Ein Durchschnittsfachmann ist vollständig in der Lage ein Gerät zum automatisierten Anfärben zu bedienen, um automatisierte Hybridisierungsreaktionen durchzuführen, wenn er für die Besonderheiten des Geräts ausgebildet worden ist. Ähnlich sind Nukleinsäuresondenzusammensetzung im Stand der Technik gut bekannt und von einer Anzahl Quellen, einschließlich Ventana, Novocastra, Zymed, Vysis und Enzo kommerziell erhältlich. Das Entfernen von unhybridisierter Sonde aus der Probe wird durch die automatisierte Anfärbungsvorrichtung durch eine vorprogrammierte Waschkfunktion durchgeführt, die ein Teil des Protokolls ist. Entsprechend ist die Nachweisfunktion Teil des Protokolls. Es werden Standardnachweisreagenzien verwendet, wie sie von Ventana zur Verwendung auf ihren Geräteplattformen verkauft werden. Die Kategorien der zum

Nachweis hybridisierter Sonden verwendeten Marker umfassen Fluorophore, Haptene und Chromogene. Der Durchschnittsfachmann kennt spezifische Marker und deren Stärken und Schwächen in einer speziellen Nachweisumgebung. Primäre Nachweisschemata können verwendet werden, wenn die Sonde direkt markiert ist und mit einem Fluorophor, wie zum Beispiel Fluorescein oder Texas Red (erhältlich von Molecular Probes, Eugene, OR) sichtbar gemacht wird, oder ein durch Antikörper vermitteltes sekundäres Nachweisschema kann verwendet werden.

[0042] Die Erfindung kann entweder mit einem Präparat einer Gewebeprobe verwendet werden, wie zum Beispiel eine, die von einem in Paraffin eingebetteten Gewebeblock unter Verwendung eines Mikrotoms abgeschnitten ist, oder mit einer zellulären Zusammensetzung, die aus einer Flüssigkeits-basierten Präparation, wie zum Beispiel ThinPrep[™], erhältlich von Cytoc, Inc., Boxborough, MA, hergestellt wird. Eine Flüssigkeits-basierte Präparation ist einfach ein Mikroskopobjektträger mit einer Monolage von Zellen, die gleichmäßig auf seiner Oberfläche verteilt sind. Die Zellen werden in einem Sammelgefäß gesammelt und in einem Medium suspendiert, das sie für eine spätere Analyse konserviert. Ein Aliquot dieser Suspension wird durch ein Filter filtriert und der Filter wird dann auf dem Objektträger bedruckt, wobei eine dünne Zellschicht von der Glasoberfläche des Objektträgers anhaftet.

[0043] Blockierungs-DNA kann in Verbindung mit Nukleinsäuresonden zum Verringern des Hintergrundsignals, das jedem Sondieren chromosomaler DNA zueigen ist, verwendet werden. Das US Patent Nr. 5,544,841 (Grat, J., et al.) beschreibt das Verfahren im Allgemeinen.

[0044] Die bevorzugten Ausführungsformen der Hybridisierungspuffer der vorliegenden Erfindung sind am besten durch Bezugnahme auf die folgenden Beispiele verständlich. Die Beispiele, die folgen, erläutern spezifische Ausführungsformen der Erfindung, und deren verschiedene Verwendungen. Sie sind nur für Erklärungszwecke ausgeführt und sollen nicht als die Erfindung beschränkend verstanden werden.

BEISPIELE

A. Allgemeine Verfahren

[0045] Beispiele für eine ISH-Analyse wurden durch Schneiden von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Zellen oder Gewebeproben in Abschnitte von 4 µm und Legen der Abschnitte auf Standardmikroskopglasobjektträger präpariert. Die nachfolgende Verarbeitung und ISH der Proben wurden in einer automatisierten Vorrichtung ausgeführt, wie zum Beispiel der automatisierten DISCOVERY[™] ISH/ICH-Anfärbvorrichtung (Ventana Medical Sys-

tems, Inc., Tucson, AZ), beschrieben in der WO 99/44030. Zum Entfernen von Paraffin von den Proben wurden die Objektträger in eine wässrige Lösung getaucht, für näherungsweise 20 Minuten erhitzt und dann gespült. Das automatisierte Entparaffinisierungsverfahren ist vollständiger in der WO 00/14507 beschrieben. Die Proben wurden dann mit Protease 1 behandelt und die Objektträger wurden auf 85 °C erhitzt (zur Hybridisierung an RNA-Zielgene) oder auf 90-95 °C (zur Hybridisierung an DNA-Zielgene) während 4 bis 10 Minuten.

[0046] Hybridisierungsreaktionen wurden typischerweise in einem Hybridisierungspuffer, bestehend aus einer Verdünnung von Puffer A in 2X SSC-Triton-X100, in einem Verhältnis von 1:1, und zwischen 25 bis 125 ng/l von jedem einzelnen Sondenmolekül ausgeführt. ISH-Reaktionen wurden zwischen 37 °C bis 54 °C durchgeführt.

[0047] Die Hybridisierung von Fluorescein-markierten Sonden an ein spezielles Zielgen in der Probe wurde unter Verwendung einer sequentiellen Reihe von Bindungsproteinen, das heißt, eines sekundären Antikörnernachweises, nachgewiesen. Jedoch ist es entsprechend möglich, einen direkten Nachweis zu verwenden, wenn gebundene Sonden sichtbar gemacht werden. Beim sekundären Nachweis wurde zu der Probe zuerst ein Anti-Fluorescein-Maus-monoklonaler Antikörper gegeben, der gegen das an das Sondenmolekül gebundene Fluoresceinhapten gerichtet war. Dann wurde zu der Probe ein Biotin-markierter polyklonaler Ziege-Antikörper gegeben, der gegen den Maus-Antikörper gerichtet war. Schließlich wurden die Hybridisierungsreaktionen kolorimetrisch unter Verwendung eines 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitroblautetrazolium (BCIP/NBT)-Substrats nachgewiesen. Diese als „sekundärer Antikörnernachweis“ bezeichnete Technik ist für den Fachmann Routine. Primäre und sekundäre Antikörper sind von zahlreichen Lieferanten, einschließlich Ventana Medical Systems, Tucson, AZ erhältlich, und sie sind zur Verwendung auf den automatischen Anfärbungssystemen (ES®, NexES®, DISCOVERY™ und BENCHMARK™ optimiert.

B. Beispiele

Beispiel 1. In Situ Hybridisierung unter Verwendung von Puffer A im Vergleich zu einem Standard-Dextransulfatpuffer.

[0048] Ein Cocktail von zwei Sonden, die zu der menschlichen Alu-repetitiven Sequenz komplementär sind, wurde zum Bewerten der Wirksamkeit des Dextransulfats mit niedrigerem Molekulargewicht als brauchbares Volumenausschlussmittel für Hybridisierungsreaktionen verwendet. Die zwei Alu-Proben, die für das Experiment zum Vergleich der Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht enthaltenen Hy-

bridisierungspuffer verwendet wurden, waren ein Cocktail zweier Oligonukleotide mit jeweils 3 anhaftenden Fluoresceinhaptene pro Sonde. Diese Sonden wurden mit einer zusammengesetzten Konzentration von 500 ng/ml gelöst. Die zwei Hybridisierungspuffer waren Puffer A und ein Standarddextransulfat (Molekulargewicht von 500.000)-Puffer mit 10 % (Gew./Vol.) Dextransulfat, 50 % (Vol./Vol.) Formamid, 2X SSC und 0,05 % Brij-35 bei einem letztendlichen pH-Wert von 7,3.

[0049] Die Hybridisierung wurde mit einem DISCOVERY™-Instrument unter Verwendung des automatisierten Dispensierungsprotokolls für die Sonde und alle anderen Reagenzien durchgeführt. Die Probe war eine in Paraffin eingebettete Zelllinie, Oncor IN-FORM™ Her-2/neu Kontrollobjektträger, Katalognummer S8100, Level 1, erhältlich von Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ. Alle Objektträger wurden durch Entfernen von Paraffin durch ein automatisiertes wässriges Entparaffinisierungsverfahren (siehe die parallel anhängige internationale Patentanmeldung mit der Anmeldenummer WO 00/14507), gefolgt von der Behandlung mit Ventana Protease 1 während 8 Minuten bei 50 °C in 1:2,7 Verdünnung mit Ventanas APK-Puffer behandelt. Die Probenzellen wurden dann mit 2X SSC (Ventana 2X SSC) äquilibriert und dann zum Entfernen von allem bis auf ein Restvolumen von näherungsweise 100 µl auf dem Objektträger gespült. Die Sonde und der Hybridisierungspuffer mit 2X-Konzentration wurden auf dem Objektträger verteilt (100 µl) und mit dem restlichen Volumen von 2X SSC unter Verwendung von Luftstrommischen gemischt. Nach dem Mischen wurde der Objektträger innerhalb eines Schritts von 10 Minuten auf 85 °C erhitzt, dann auf 37 °C abgekühlt für eine Hybridisierungsreaktion während einer Stunde. Auf die Hybridisierung folgten zum Entfernen überschüssiger Sonde und nicht spezifisch an DNA gebundener Sonde Waschgänge mit Standard 2X SSC bei 37 °C. Der Nachweis der an Alu-Sequenzen hybridisierten Sonde wurde durch einen sekundären Antikörnernachweis über die Bindung eines Anti-Fluorescein-Maus-Antikörpers an Fluoresceinhaptene, die an der Sonde hafteten, gefolgt von der Ventana Enhanced Alkaline Phosphatase Blue Detection (Ventana Katalognummer 760-061)-Chemie ausgeführt. Sofern es nicht anders angegeben ist, wurden alle Reagenzien von Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ erhalten und jede dieser Reaktionen auf dem Objektträger wurden unter einem LIQUID COVERSLIP™-Film durchgeführt, um während der Verarbeitung einen Wasserverlust durch Verdampfung zu verhindern.

[0050] Die Ergebnisse (kolorimetrisch beobachtet) waren, dass der Hybridisierungspuffer, der Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht in einer Konzentration von 20 % enthielt, wirksamer und leistungsfähiger in der automatisierten Anfärbung von

Ventana Medical Systems, Inc. war. Die auf dem Puffer, der Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht enthielt, basierende Reaktion ergab ein starkes intensives Signal für die meisten Kerne über den Gewebeabschnitt hinweg, welches das erwartete Ergebnis einer Sonde für die Alu-Satelliten-Sequenz war. Die den Hybridisierungspuffer mit Dextransulfat mit einem Molekulargewicht von 500.000 enthaltenden Reaktionen ergaben kein so starkes Signal und die Intensität war nicht dieselbe für jeden Zellkern. Für diese Reaktionen gab es einige Objektträger, in denen Bereiche des Gewebeabschnitts sehr schwach anfärbten und andere Bereiche, die überhaupt nicht anfärbten. Von 10 Objektträgern, die mit dem 500.000 MW Dextransulfatpuffer hybridisiert waren, wiesen 8 davon Bereiche in den Gewebeabschnitten auf, die ein schwaches Kernsignal aufwiesen, und Bereiche, die überhaupt kein Signal aufwiesen. Umgekehrt wies unter den 10 Objektträgern, die mit dem Dextransulfatpuffer mit niedrigem Molekulargewicht der vorliegenden Erfindung hybridisiert worden waren, nur einer dieser Objektträger einen Bereich des Gewebeabschnitts auf, der eine schwache Anfärbung zeigte. Es wurde gefolgert, dass diese Beobachtung der schwachen Anfärbung auf die ungleichmäßige Verteilung und/oder Mischen des Hybridisierungspuffers über den Gewebeabschnitt hinweg zurückzuführen ist. Für dieses Experiment war dieses Phänomen üblicher unter den auf dem Dextransulfatpuffer mit 500.000 MW basierenden Reaktionen.

[0051] Die Hybridisierungsreaktionen mit Cocktails, die mit dem Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht hergestellt waren, ergaben im Vergleich zu den Reaktionen mit dem 500.000 MW Dextransulfatpuffer routinemäßig ein intensiveres Signal mit der Alu-Satelliten-Sequenzsonde. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass (1) Dextransulfate mit niedrigem Molekulargewicht wirksamere Volumenausschlussmittel für Hybridisierungsreaktionen sind, und (2) solche Puffer für automatisierte Hybridisierungsprotokolle leistungsfähiger sind als entsprechende Puffer, die mit Dextransulfat mit 500.000 MW hergestellt sind.

Beispiel 2. ISH mit menschlichen Milzproben

[0052] Die [Fig. 1A-Fig. 1B](#) erläutern die für die ISH-Analyse von menschlichem Milzgewebe erhaltenen Ergebnisse unter Verwendung einer Sonden-sammlung, die aus markierten Oligonukleotiden besteht, die zu den EBV frühen RNA-Transkripten EBER 1 und 2 komplementär sind. Dieses Experiment zeigte, dass Dextransulfathybridisierungspuffer unter Verwendung eines Molekulargewichts von 10.000 die spezifische Hybridisierung zwischen DNA-Oligonukleotidsonden und RNA-Zielen, in diesem Fall Kern-RNAs unterstützt. Diese zwei viralen Transkripte sind Kern-RNA. Die Zielspezifität wird durch den Signalverlust mit Geweben, die vor der Hy-

bridisierung (B) mit RNase behandelt worden sind gegenüber einer nicht mit Ribonuklease A behandelten Probe vor der in situ Hybridisierung (A) gezeigt. Die Abnahme des nachweisbaren Signals bei (B) weist darauf hin, dass diese Sonde spezifisch an die EBV RNA-Transkripte EBER 1 und EBER 2 hybridisiert.

Beispiel 3. IHS bei Lymphom-Gewebeproben.

[0053] Die [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) erläutern durch Vergleich zweier Sondensammlungen, die jeweils zur mRNA der beiden leichten Kette-Gene von menschlichem Immunglobulin, kappa beziehungsweise lambda spezifisch sind, dass die Hybridisierungspuffer mit Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht spezifische Hybridisierungsreaktionen unterstützen. Die verwendeten Gewebe waren Plasmacytoid-Lymphomgewebe, die jeweils für die eine oder andere leichte Kette-mRNA von monoklonalem Ursprung waren. In [Fig. 2A](#) war der Tumor kappa monoklonal, wie durch die abnormal hochfrequent kappa exprimierenden Zellen gezeigt ist, wohingegen das Gewebe in [Fig. 2B](#) ein für die lambda Genexpression monoklonales Gewebe war, wodurch ein niedriges Niveau kappa exprimierender Zellen gefunden wurde. Das Umgekehrte wurde in dem Gewebe in [Fig. 3](#) gefunden. Unter Verwendung einer lambda Sonde wurde diese Monoklonalität erkannt, wie in den [Fig. 3A](#) und [3B](#) erläutert ist. Das Gewebe in [Fig. 3A](#) zeigt eine hohe Frequenz von Zellen, die lambda leichte Kette-mRNA überexprimieren; das Gewebe in [Fig. 3B](#) wies eine niedrige Frequenz lambda-exprimierender Zellen auf. Somit kann für Sonden von entsprechenden Genen der Dextransulfatpuffer mit niedrigem Molekulargewicht die spezifische Hybridisierung unterstützen.

Beispiel 4. ISH unter Verwendung von Puffer B

[0054] [Fig. 4](#) ist eine Farbaufnahme eines Objektträger-basierten in situ Hybridisierungsbildes einer Maus-pS2-Genexpression im Mäusemagen unter Verwendung der in Puffer B verdünnten Maus-pS2-Antisense-Ribosonde. Das Maus-mPS2-Gen, von dem festgestellt wurde, dass es im normalen Epithelium des Magens exprimiert wird (Lefebvre, O., Wolf, C., Kédinger, M., Chenard, M.P., Tomasetto, C., Chambon, P., Rio, M.C., „The mouse one P-Domain (pS2) and two P-Domain (mSP) genes exhibit distinct patterns of expression," J. Cell Biol., 122:191-198 (1993)), wurde als Modell zum Untersuchen der Verwendung des Puffer B-Hybridisierungspuffers verwendet. Die mPS2-cDNA wurde subkloniert in einem pBluescript-Plasmid (Promega, Madison), das für eine in vitro Transkription geeignet und linearisiert war, bereitgestellt.

[0055] Antisense und Sense DIG-markierte Ribosonden wurden unter Verwendung des Roche RNA

DIG-Markierungskits (Roche Molecular Katalognummer 175 025) synthetisiert und in einem Endvolumen von 200 µl H₂O (Stammlösung) solubilisiert. Eine 1:1000 Verdünnung der mPS2-Ribosonden in dem Puffer B stellte die Arbeitsverdünnung bereit.

[0056] Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Mäusemagenabschnitte (5 µm) wurden auf der DISCOVERY-Instrumentenplattform nach Online-Entparaffinisierung und Verdauungsschritten hybridisiert. Die Sonde und Objektträger wurde bei 70 °C während 6 Minuten codenaturiert und während 3 Stunden bei 60 °C hybridisiert. Der Hybridisierung folgten drei stringente Waschgänge von jeweils 6 Minuten unter Verwendung von 0,1 C SSC bei 65 °C.

[0057] Die Sonde wurde unter Verwendung eines biotynilierten Anti-Dig-Antikörpers (Sigma, 1:200) durch Immunhistochemie nachgewiesen, dem folgte ein Streptavidinalkalische Phosphatase & NBT/BCIP kolorimetrischer Nachweis (Ventana Enhanced Blue Nachweiskit).

[0058] Ein Signal wurde in den epithelialen Zellen des menschlichen Magens unter Verwendung der Antisense-Sonde gefunden, während unter Verwendung der Sense-Sonde kein Signal nachgewiesen wurde. Durch Vergleich mit früher veröffentlichten radioaktiven ISH-Ergebnissen (Lefebvre et al., 1993) wurde festgestellt, dass die Lokalisierung des Signals zutreffend war.

Beispiel 5. ISH bei HPV-Kontrollzelllinien in in Paraffin eingebettetem Gewebe

[0059] Für eine ISH unter Verwendung von HPV-Sonden als Cocktail aus klonierten DNAs von HPV Hochrisiko- oder Niederrisikostämmen (beschrieben in der gemeinsamen internationalen Patentanmeldung PCT/US99/25109) wurden Hybridisierungsreaktionen unter stringenten Bedingungen ausgeführt, die das Erkennen von Hochrisiko- und Niederrisiko-HPV-Stämmen in Geweben, die in Paraffin eingebettet waren, erlaubten. Die Hybridisierungsreaktionen wurden bei 57 °C während 2 Stunden, gefolgt von 2X SSC Waschgängen bei 76 °C ausgeführt. Die Endkonzentrationen der Hybridisierungspufferbestandteile betrugen 25 % Formamid (Vol/Vol), 2X SSC, 5 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 0,025 % Brij-35, 0,25 % Triton X-100 bei 0,25 Gew.-% Vol. Die Proben waren in Paraffin eingebettete Zelllinien von (a) Caski-(näherungsweise 500 Kopien von HPV 16) ([Fig. 9](#)) und (b) HeLa-Zellen mit HPV 18 (Kopienzahl innerhalb eines Bereichs von 20 bis 50 pro Zelle) ([Fig. 19](#)). Die erkrankten Gewebe waren in Paraffin eingebettete mit HPV infizierte Zervikalgewebe.

[0060] Die Ergebnisse waren folgende. [Fig. 9](#) zeigt, dass die in Paraffin eingebetteten Caski-Zelllinien ein gutes Signal in dem erwarteten Kernmuster mit nied-

rigem bis keinen Hintergrund auf den Kernen aufweisen. [Fig. 10](#) zeigt, dass eingebettete HeLa-Zellen einen kleineren Kernsignalfleck mit niedrigem bis keinem Hintergrund aufweisen, wie von der niedrigeren Kopienzahl erwartet wurde.

[0061] Eine patentrechtlich geschützte Her-2/neu-Gen (c-erbB2)-DNA-Sonde wurde unter Verwendung von Puffer A als Volumenausschlussmittel getestet. Die Sonde wurde in diesem Puffer unter Verwendung von Objektträgern mit in Paraffin eingebetteten Zelllinien (Ventana Medical Systems, Inc. Katalognummer S8100) und Brustkrebsgeweben getestet. Das Kit mit eingebetteten Zelllinien besteht aus Objektträgern, die jeweils eine Zelllinie aufweisen, die eine unterschiedliche Kopienzahl der Her-2/neu-Gens aufweist: Niveau 1 Objektträger (Oncor Katalognummer S8100-1) weisen Zellen mit der normalen Kopienzahl des Her-2/neu-Gens (3 oder weniger) auf; die Niveau 2 Objektträger (Oncor Katalognummer S8100-2) weisen Zellen mit dem niedrig amplifizierten Gehalt des Her-2/neu-Gens, 4 Kopien, auf; der Niveau 3 Objektträger (Oncor Katalognummer S8100-3)-Zellen weisen hoch amplifizierte Zahlen des Her-2/neu-Gens, 10 Kopien oder mehr, auf. Die Objektträger wurden auf dem DISCOVERY-Instrument verarbeitet. Die Objektträger wurden online entparaffiniert, mit einer Detergenslösung bei 90 °C vorbehandelt und dann weiter mit Ventana Protease 1 (Katalognummer 760-2018) während 4 Minuten bei 37 °C bei eingebetteten Zellen und 10 Minuten bei 50 °C bei eingebettetem Gewebe behandelt. Die Denaturierung wurde bei 90 °C während 10 Minuten und die Hybridisierung während 12 Stunden bei 50 °C durchgeführt. Waschgänge nach der Hybridisierung waren folgendermaßen, 6 Minuten bei 50 °C in 2X SSC, gefolgt von 6 Minuten bei 60 °C in 2X SSC. Hybride wurden durch indirekten Fluoreszenznachweis durch Binden eines FITC-markierten Anti-biotin-Antikörpers, gefolgt von FITC-markiertem Antimäus-Antikörper nachgewiesen. Die Objektträger wurden mit Propidiumiodid gegengefärbt und nach Beendigung der automatisierten Verarbeitung abgedeckt.

[0062] Die Ergebnisse waren folgende. Unter Bezugnahme auf die [Fig. 6-Fig. 8](#) weisen die eingebetteten Zelllinien ein starkes Signal mit erwartetem Muster mit niedrigem bis keinem Hintergrund auf dem Kern auf. Das Gewebe weist ein Signal auf den Tumorzellen mit einem niedrigen Hintergrundniveau auf. Somit erlaubt der Hybridisierungspuffer mit 10 % Dextransulfat mit einem Molekulargewicht von 10.000 MW eine kontrollierte Hybridisierung unter stringenten Bedingungen und gute Ergebnisse mit den Her-2/neu-Sonden unter Verwendung einer während 12 Stunden unter dem LIQUID COVERSLIP™ durchgeführten Hybridisierung mit sowohl Kontrollzelllinien- und Patientengewebeproben. [Fig. 6](#) erläutert ein Signal von dem hoch amplifizierten

Her-2/neu-Gen (mehr als 10 Kopien/Zelle). [Fig. 7](#) erläutert ein Signal von dem niedrig amplifizierten Her-2/neu-Gen (4 Kopien/Zelle). [Fig. 8](#) erläutert ein Signal von der diploiden Kopienzahl des Her-2/neu-Gens.

Beispiel 6. Mikroarray-Hybridisierung unter Verwendung von Puffer C

[0063] [Fig. 5](#) ist eine Farbaufnahme eines Human Atlas-DNA-Mikroarrays von Clontech (ClonTech, Inc., Palo Alto, CA), das unter Verwendung einer Cy3-markierten amplifizierten cDNA-Sonde aus Plazenta-RNA (Ambion, Austin, TX, Katalognummer 7959) sondiert wurde. Die Sonden wurden gemäß den Verfahren von Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W.H., Tom, E., Mack, D.H. und Levine A.J., „Analysis of p53-regulated gene expression Patterns using oligonucleotide arrays,” *Genes & Development* 14:981-983 (2000) markiert. Der Hybridisierungspuffer C wurde zum Hybridisieren der Sonden an die DNA-Mikroarray-Oligonukleotide unter Verwendung von Standardinstrumentenprotokollen verwendet.

Patentansprüche

1. Polynukleotidhybridisierungspuffer zur automatisierten in situ-Hybridisierung, umfassend ein Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht, wobei das Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht im Bereich von etwa 8000 bis etwa 16000 MW liegt, mit der Maßgabe, daß das Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht nicht 10000 MW aufweist.

2. Polynukleotidhybridisierungspuffer nach Anspruch 1, wobei das Dextransulfat ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 13000 aufweist.

3. Polynukleotidhybridisierungspuffer nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Konzentration des Dextransulfats mit niedrigem Molekulargewicht im Bereich von etwa 5 % bis etwa 25 % Gewicht/Volumen liegt.

4. Polynukleotidhybridisierungspuffer nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Puffer gegebenenfalls Formamid mit einer Konzentration von etwa 5 % bis etwa 80 % Gewicht/Volumen enthält.

5. Polynukleotidhybridisierungspuffer nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend:

- a) von etwa 5 % bis etwa 25 % Gewicht/Volumen Dextransulfat, MW 13000;
- b) von etwa 20 % bis etwa 50 % Volumen/Volumen Formamid;
- c) von etwa 5 mM bis etwa 10 mM Tris (15:85 von Tris-HCl:Tris-OH);
- d) von etwa 1 mM bis etwa 5 mM EDTA;
- e) bis zu etwa 300 mM NaCl;

f) etwa 30 mM Trinatriumcitrat;

g) von etwa 0,025 % bis etwa 0,05 % Brij-35;

welcher auf ein pH-Wert von etwa 7,3 eingestellt ist.

6. Polynukleotidhybridisierungspuffer nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend:

- a) von etwa 10 % bis etwa 20 % Gewicht/Volumen Dextransulfat, MW 13000;
- b) von etwa 40 % bis etwa 80 % Volumen/Volumen Formamid;
- c) etwa 2 × SSPE; und
- d) etwa 0,05 % Brij-35.

7. Polynukleotidhybridisierungspuffer nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend:

- a) von etwa 10 % bis etwa 20 % Gewicht/Volumen Dextransulfat, MW 13000;
- b) etwa 6 × SSPE; und
- c) etwa 10 % Formamid.

8. Verfahren zum automatisierten Hybridisieren einer Polynukleotidsonde an ein Ziel bzw. Target, umfassend die Schritte:

- a) des Herstellens von zu untersuchendem Gewebeabschnitt oder Zellen;
- b) des Hybridisierens des Gewebeabschnitts oder des zellulären Präparats mit einer Polynukleotidsondenzusammensetzung in der Anwesenheit eines Dextransulfats mit niedrigem Molekulargewicht mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 8000 bis etwa 16000, wobei die Sondenzusammensetzung mindestens eine Sequenz, die zu einem kodierenden Bereich des Ziels komplementär ist, enthält;
- c) des Entferns der nichthybridisierten Sonden von dem Gewebeabschnitt oder dem zellulären Präparat, und
- d) des Nachweisens der hybridisierten Sonde-Ziel-Kombination.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Polynukleotidsondenzusammensetzung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus DNA-Sonden und RNA-Sonden.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei der Gewebeabschnitt ein in Paraffin eingebetteter Gewebeabschnitt ist.

11. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei der Gewebeabschnitt ein frischgefrorener Gewebeabschnitt ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei die Polynukleotidsondenzusammensetzung mit einer nachweisbaren Markierung markiert ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Markierung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend im

wesentlichen aus Fluorophoren, Haptenen und Chromogenen.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 13, wobei der Schritt des Herstellens des zu untersuchenden Gewebeabschnitts oder der Zellen einen Flüssigkeitsbasierten Präparationsschritt umfaßt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 14, wobei der Schritt des Präparierens eines zu untersuchenden Gewebeabschnitts oder der Zellen das Inkontaktbringen der Ziel-RNA oder -DNA mit Blockierungs-DNA zum Unterdrücken von Hintergrundkreuzreaktionssignal, umfaßt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 15, wobei die Hybridisierungs-, Entfernungs- und Nachweisschritte von einem automatisierten Gewebe-Anfärbungsinstrument durchgeführt werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 16, wobei die Sondenzusammensetzung auf einem festen Substrat angeordnet ist.

18. Verwendung eines Polynukleotidhybridisierungspuffers, umfassend ein Dextransulfat mit niedrigem Molekulargewicht mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht im Bereich von etwa 8000 bis etwa 16000 für automatisierte in situ-Hybridisierung.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

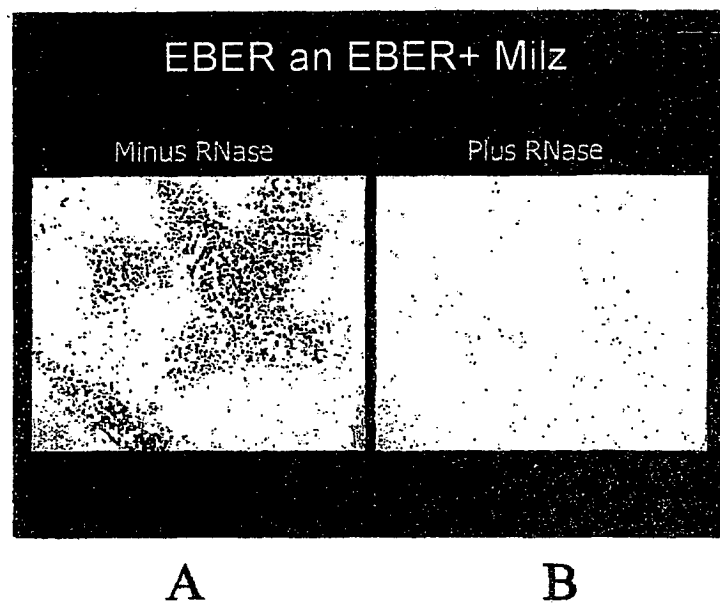


Fig. 1

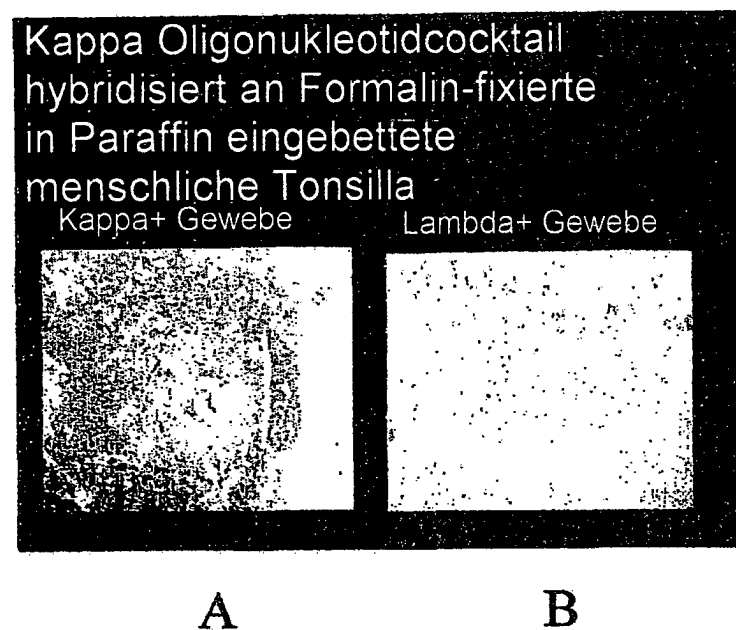


Fig. 2

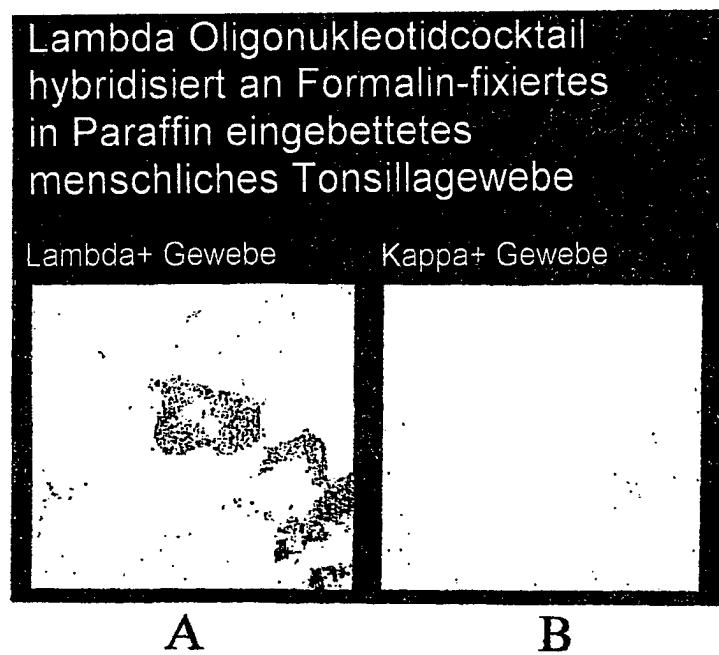


Fig. 3

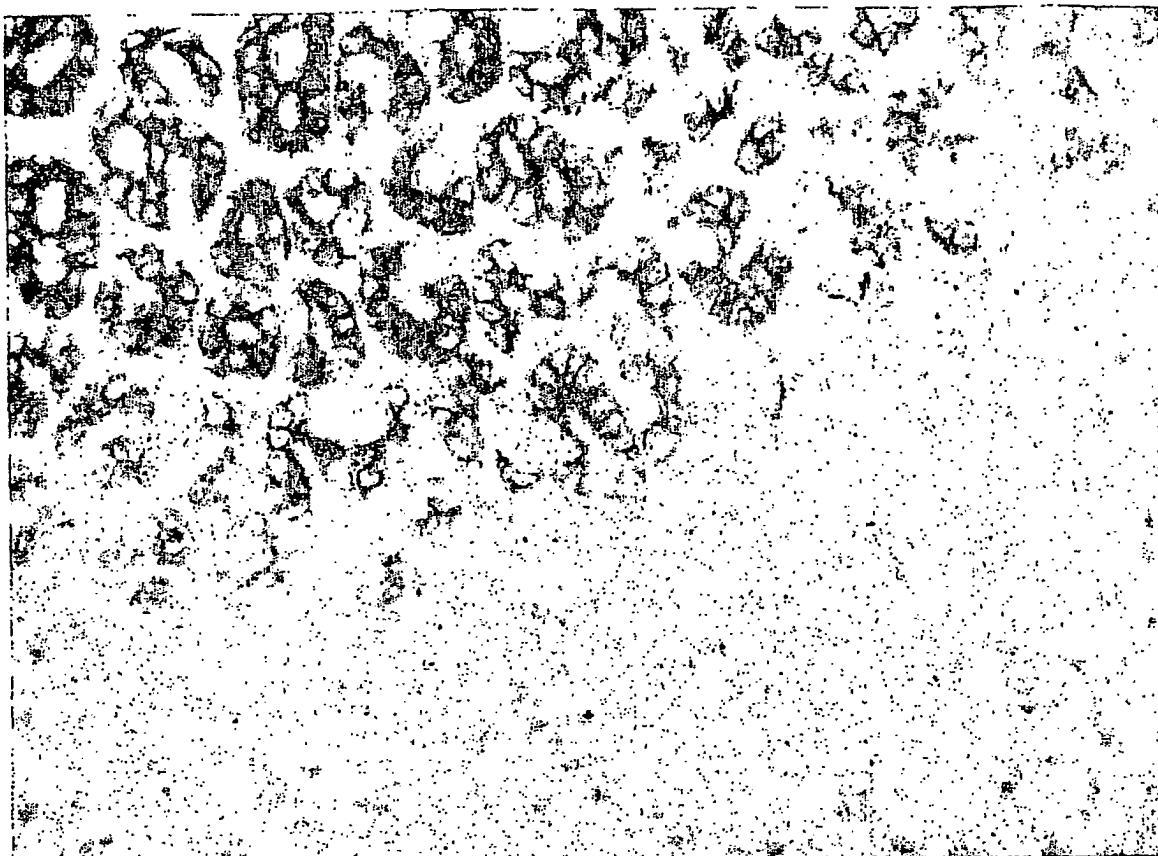


Fig. 4

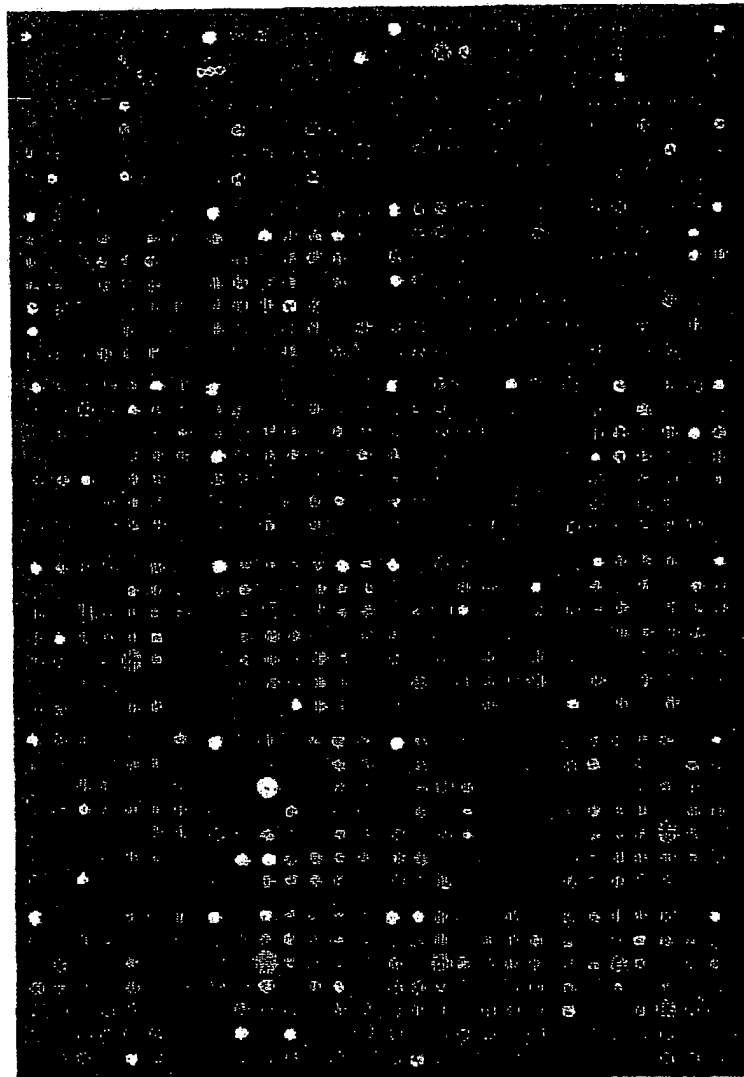


Fig. 5

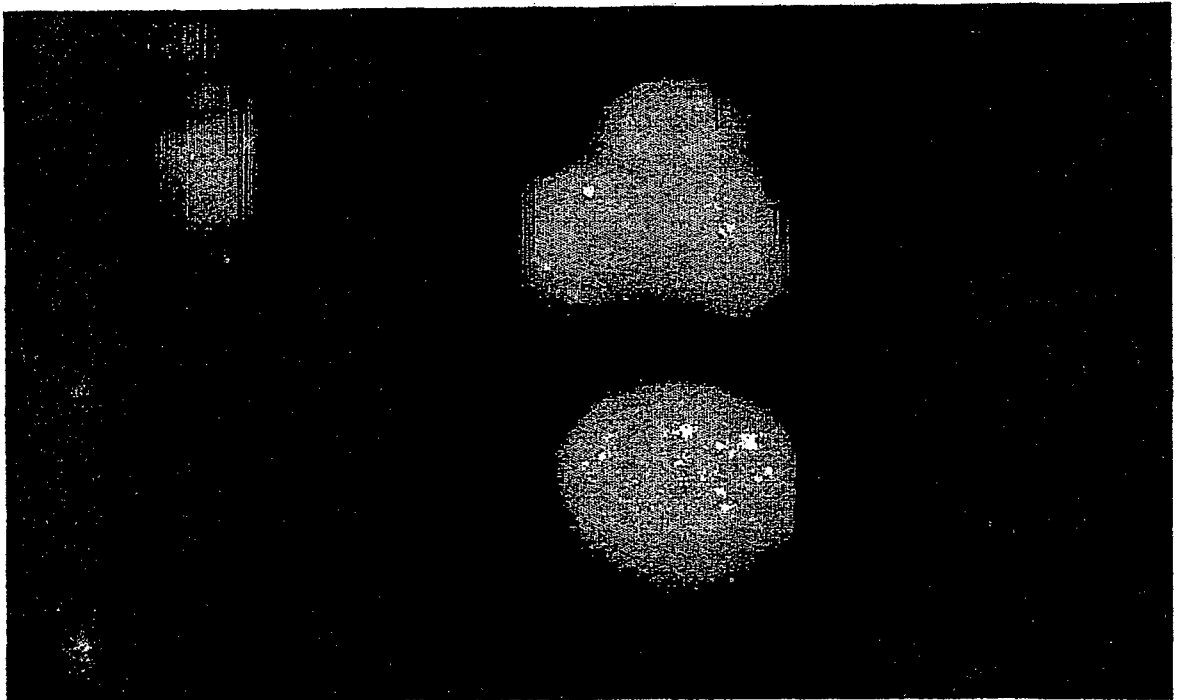


Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8



Fig. 9

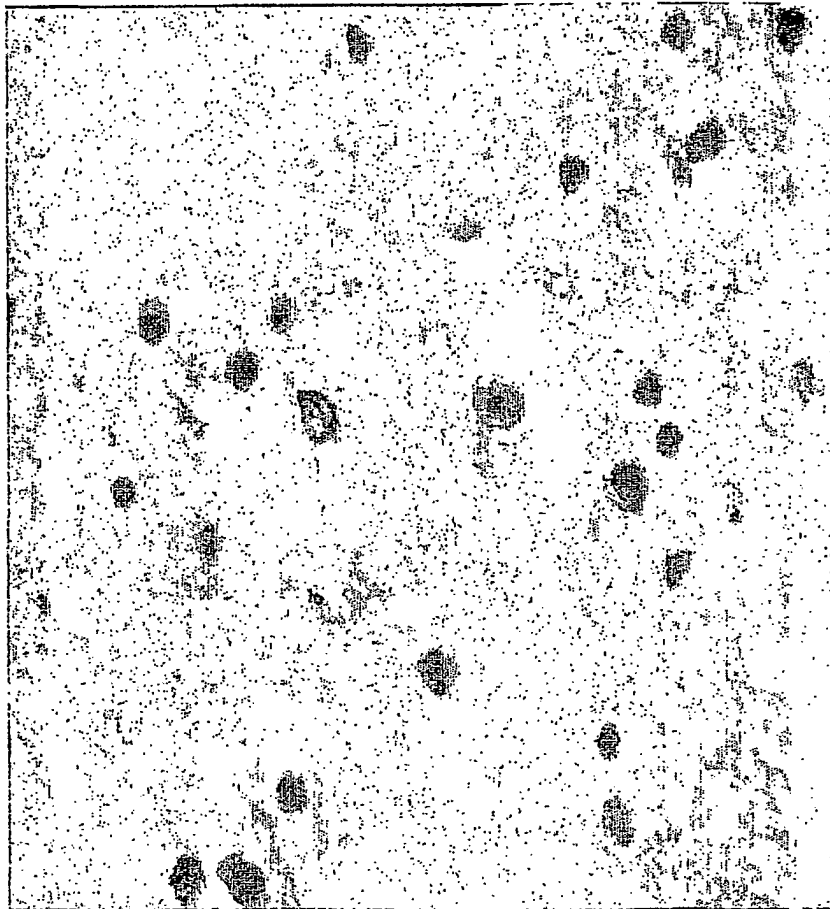


Fig. 10