



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 666 696 A5

⑤① Int. Cl.4: C 12 Q 1/68
G 01 N 33/58

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer:	5378/85	㉗ Inhaber:	Orion-Yhtymä Oy, Espoo (FI)
㉔ Anmeldungsdatum:	17.12.1985		
㉓ Priorität(en):	02.01.1985 FI 850004	㉖ Erfinder:	Söderlund, Hans Erik, Espoo (FI)
㉔ Patent erteilt:	15.08.1988		
㉕ Patentschrift veröffentlicht:	15.08.1988	㉘ Vertreter:	A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

㉙ Verfahren zur Identifizierung von Nucleinsäuren.

㉙ Beschrieben wird ein Verfahren zum Identifizieren von Nucleinsäuren mit Hilfe in Lösung erfolgender Hybridisierung. Man arbeitet mit wenigstens zwei in der gleichen Lösungsphase vorliegenden Nucleinsäure-Sonden. Die Sonden sind zur zu identifizierenden Nucleinsäure ausreichend homologe Nucleinsäurefragmente. Die Detektorsonde ist mit einem messbaren Indikator markiert. An die als Einfangsonde dienende Sonde ist eine Komponente gebunden, die als Partner in einem Affinitätspar zu fungieren vermag. Nach erfolgter Hybridisierungsreaktion wird das gebildete Einfangsonde:Probe:Detektorsonde-Hybrid mit der anderen Komponente des Affinitätspaares in Kontakt gebracht und von den übrigen im Hybridisierungsgemisch befindlichen Komponenten getrennt. Vorteilhaft sind die aus Biotin-Streptavidin, Homopolynucleotiden oder Antigen-Antikörper gebildeten Affinitätspaare.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Identifizierung von Nucleinsäuren mit Hilfe in Lösung erfolgender Hybridisierung, dadurch gekennzeichnet, dass man mit wenigstens zwei in der gleichen Lösungsphase vorliegenden Sonden arbeitet, die zur zu identifizierenden Nucleinsäure ausreichend homologe Nucleinsäurefragmente sind und von denen die Detektorsonde mit einem messbaren Indikator markiert ist, während an die andere, als Einfangs- oder -sonde fungierende Sonde eine Komponente gebunden ist, welche als Partner in einem Affinitäts- oder -paar zu fungieren vermag, nach erfolgter Hybridisierungsreaktion das entstandene Einfangs- oder -sonde: Probe: Detektorsonde-Hybrid mit der anderen Komponente des Affinitäts- oder -paares in Kontakt bringt und von den übrigen im Hybridisierungsgemisch befindlichen Komponenten trennt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Komponentenpaar, das Affinität zueinander hat, Biotin - Streptavidin oder Biotin - Avidin ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Komponentenpaar, das Affinität zueinander hat, ein Homopolynukleotid-Paar ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Komponentenpaar, das Affinität zueinander hat, Poly dC - Poly dG ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Komponentenpaar, das Affinität zueinander hat, Poly dA - Poly dT ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Komponentenpaar, das Affinität zueinander hat, Poly dA - Poly U ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Komponentenpaar, das Affinität zueinander hat, aus Antigen - Antikörper besteht.

BESCHREIBUNG

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von Nucleinsäuren mit Hilfe in Lösung erfolgender Hybridisierung, das im Patentanspruch 1 definiert ist.

Zur Identifizierung von Nucleinsäuren hat man sich verschiedenartiger Hybridisierungsverfahren bedient. Als Beispiele seien die direkten Hybridisierungsverfahren und die Sandwich-Hybridisierungsverfahren genannt. Bei den direkten Hybridisierungsverfahren liegt die Nucleinsäureprobe entweder in Lösung oder an einen festen Trägerstoff gebunden vor. Die zu identifizierende Nucleinsäure wird unter Verwendung einer einzigen markierten Sonde nachgewiesen. Bei den Sandwich-Hybridisierungsverfahren (US 4486539) arbeitet man mit zwei verschiedenen Sonden, mit denen die zu identifizierende Nucleinsäure in der Probelösung nachgewiesen wird. Die Detektorsonde ist dabei mit einem Indikatorstoff markiert, während die Trennsonde an einen festen Träger gebunden ist.

Erfindungsgemäss wurde ein neues Hybridisierungsverfahren entwickelt, bei dem man mit zwei verschiedenen Sonden arbeitet, wobei beide Sonden in der gleichen Lösungsphase enthalten sind. Da die an der Hybridisierung teilnehmende Probenucleinsäure und beide Sonden sich in der gleichen Lösungsphase befinden, erfolgt die Hybridisierungsreaktion beträchtlich schneller als bei jener Sandwich-Hybridisierung, bei der die Trennsonde an einen festen Träger gebunden ist. Beim erfindungsgemässen Verfahren ist eine einstündige Inkubationszeit ausreichend. Bei der einstufigen Sandwich-Hybridisierung (US 4486539) sind für eine ausreichende Hybridisierung 12 Stunden erforderlich. Bei der zweistufigen Sandwich-Hybridisierung (Dun und Hassell, Cell. Vol. 12,

S. 23-36, 1977) benötigt man eine Hybridisierungszeit von wenigstens 24 Stunden.

Beim erfindungsgemässen Verfahren arbeitet man mit wenigstens zwei Sonden. Diese Sonden sind zur zu identifizierenden Nucleinsäure ausreichend homologe Nucleinsäurefragmente. Es ist von Vorteil, wenngleich nicht erforderlich, wenn die Sonden homolog zu relativ nahe beieinander liegenden Stellen in der zu identifizierenden Nucleinsäure sind. Die Sonden dürfen nicht homolog zueinander sein.

Die Sonden können synthetisch, halbsynthetisch, mit Hilfe von DNA-Rekombinationstechnik oder aus direkt aus der Natur isolierten Nucleinsäuren gewonnen werden. Derartige Sonden sind auch im Handel erhältlich. Die Sonde kann an einen geeigneten Vektor gebunden sein; sie kann Vektorteile enthalten oder völlig frei von Vektorteilen sein.

Die Detektorsonde ist durch passende Indikatoren markiert. Als Indikatoren eignen sich verschiedenartige radioaktive Isotope oder radioaktiv markierte Verbindung. Der Indikator kann auch fluoreszierend, lumineszierend, lichtemittierend oder enzymatisch bzw. immunologisch nachweisbar sein usw. Als Beispiele seien die auf der Affinität von Biotin und Avidin oder Streptavidin basierenden Indikatorstoffe, die Lanthanidchelate, die Ferritin- und Hämverbindungen und die immunologisch nachweisbaren Haptene, wie die Acetoxyacetylfluorenderivate (WO 8302286), genannt. Auch eine Identifizierung über Proteine ist möglich. Das erfindungsgemässe Verfahren ist unabhängig vom verwendeten Indikator. Im Zusammenhang mit dem Verfahren können alle bekannten und zukünftig zu entwickelnden, für die Nucleinsäurehybridisierung geeigneten Indikatorstoffe frei eingesetzt werden.

An die als Einfangs- oder -sonde dienende Sonde ist eine Komponente gebunden, die als Partner in einem Affinitäts- oder -paar zu fungieren vermag. Derartige Affinitäts- oder -paare sind beispielsweise Biotin-Avidin, Biotin-Streptavidin und die verschiedenen Homopolynukleotide, wie Poly dG - Poly dC, Poly dA - Poly dT oder Poly dA - Poly U. Es können jedoch auch andere Affinitäts- oder -paare eingesetzt werden, sofern ihre Komponenten nur eine genügend starke Affinität zueinander haben. Unter den bei immunologischen Verfahren eingesetzten Liganden und Konjugaten finden sich geeignete Affinitäts- oder -paare.

Vor der Hybridisierungsreaktion wird die Probe so behandelt, dass die Nucleinsäure in einsträngiger Form in die Hybridisierungslösung freigesetzt werden. Die Hybridisierung erfolgt in einer Hybridisierungsmischung, in der die Nucleinsäuren, die markierte Detektorsonde und die Einfangs- oder -sonde nötigenfalls in einsträngige Form überführt sind. Als Hybridisierungslösung können verschiedenartige für diesen Zweck geeignete Puffer verwendet werden. Die Hybridisierung erfolgt im Temperaturbereich 0 bis 80 °C, jedoch wird vorzugsweise mit einer Temperatur von 65 °C gearbeitet. Enthält die Hybridisierungslösung Formamid (40 bis 55%), so kann eine Temperatur von 37 °C angewendet werden. Als Hybridisierungszeit genügt eine Stunde.

Nach erfolgter Hybridisierung wird die Lösung nötigenfalls so verdünnt, dass sich für das Affinitäts- oder -paar günstige Verhältnisse ergeben. Danach bringt man das Gemisch mit dem anderen Partner des Affinitäts- oder -paares in Kontakt, der an einen festen Träger gebunden ist, z. B. an eine Affinitätschromatographie-Säule, ein Filter oder eine Plastik- bzw. Glasfläche, und isoliert das Einfangs- oder -sonde: Probe: Detektorsonde-Hybrid.

Als Affinitäts- oder -säulen-Trägermaterial kann zum Beispiel Cellulose, Latex, Polyacrylamid, Dextran oder Agarose dienen. Diese Materialien können auch als Suspensionen im Reagenzglas eingesetzt werden. Vorteilhaft gestaltet es sich auch, mit Reagenzgläsern zu arbeiten, an deren Innenfläche

die eine Komponente des Affinitätspaares angelagert ist. Voraussetzung bei der Wahl des Materials ist, dass daran eine Komponente gebunden werden kann, welche Affinität zu der an die Einfangsonde gebundenen Komponenten hat.

Falls die Probe zu identifizierende Nucleinsäure enthält, entsteht bei der Hybridisierung ein Einfangs-sonde: Probe: Detektorsonde-Hybrid. Dieses Hybrid haftet sich bei der Fraktionierung an den Träger. Die Markierung der sich an den Träger gehafteten Fraktion kann nach herkömmlichen Verfahren direkt am Träger oder nach vorheriger Elution am Eluat gemessen werden.

Bei der Fraktionierung können anstelle von Affinitätschromatographie auch andere Systeme, beispielsweise Phasenextraktion oder Magnetfeld, zur Anwendung gebracht werden.

In den folgenden Anwendungsbeispielen wird das erfindungsgemäße Verfahren im einzelnen beschrieben. Das erfindungsgemäße Verfahren ist nicht an die in den Beispielen verwendeten Nucleinsäurefragmente gebunden. Für den Fachmann ist es eine Selbstverständlichkeit, wie sich entsprechende Nucleinsäurefragmente gewinnen lassen.

Beispiel 1

Identifizierung von Adenovirus-DNA aus Zellenlysat unter Verwendung von Homopolynucleotid

Als Detektorsonde dient der mit ^{125}I markierte rekombinante Phage mKTH 1206, ein Bgl II-Fragment des Adenovirus (Typ 2) aus der Adenovirus-Genkarten-Position 42 bis 45,3%. Der besagte rekombinante Phage wurde in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen am 15. Dezember 1983 unter der Nummer DSM 2827 deponiert. Seine spezifische Aktivität beträgt 7×10^7 cpm/ μg DNA. Eine nähere Beschreibung dieser Sonde findet sich in der Schrift Ranki et al. 1983, Gene 21, S. 77–85.

Als Einfangs-sonde dient das rekombinante Plasmid pKTH 1202, das in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen am 15. Dezember 1983 unter der Nummer DSM 2824 deponiert wurde und aus einem BamHI D-Fragment des Adenovirus (Kartenposition 29 bis 42%), kloniert auf das Plasmid pBR322, besteht. Das rekombinante Plasmid pKTH 1202 (DSM 2824) wurde mit Restriktionsenzym Hae III gespalten, und an die 3'-Enden der Fragmente wurde mit Hilfe von Terminaltransferase ein Poly-A-Schwanz gefügt. Die Schwanzlänge wurde durch ^3H -A-Inkorporation gemessen. Die Länge betrug im Durchschnitt etwa 70 A-Reste. Vor Gebrauch wurde die Einfangs-sonde durch Kochen denaturiert. Als Probe dienten Adenovirus-infizierte A-549-Zellen. Die infizierten Zellen wurden 21 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden gesammelt und mit einprozentiger Natriumdodezylsulfatlösung aufgebrochen. Die Lösung enthielt etwa 10^6 Zellen/ml. Die Viskosität wurde durch Ultraschallbehandlung gesenkt. Als Kontrolle dienten nichtinfizierte A-549-Zellen, die identisch behandelt wurden. Vor der Hybridisierung wurde die Probe 5 min in 0,02 M NaOH gekocht, auf 0°C abgekühlt und mit Essigsäure neutralisiert.

Für den Test wurden im Reagenzglas 500.000 cpm Detektorsonde, 50 ng Einfangs-sonden-DNA und 10 μl Probe zusammengebracht. Das Volumen wurde auf 50 μl eingestellt, und als Pufferlösung dienten 0,6 M Natriumchlorid, 0,06 M Natriumzitratsäure, 0,02 M Natriumphosphat (pH 7,6) und 0,5% Natriumdodezylsulfat. Das Gemisch wurde eine Stunde bei 65°C inkubiert.

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Lösung auf $+20^\circ\text{C}$ abgekühlt und langsam durch eine Chromatographiesäule geschleust, die 1 ml Oligo-dT-Cellulose enthielt. Der Durchlauf wurde aufgefangen und erneut durch die Säule geschickt. Danach wurde die Säule mit 20 ml Lösung gewaschen, welche 0,15 M Natriumchlorid, 0,015 M Natrium-

phosphat (pH 7,6) und 0,5% Natriumdodezylsulfat enthielt. Die angelagerte DNA wurde zum Schluss mit 1 ml 0,02 M NaOH abgelöst. Diese Lösung wurde aufgefangen, und ihre Radioaktivität wurde bestimmt.

5

Ergebnis:	^{125}I -Aktivität (cpm)
Probe:	infizierte Zellen
10	Kontrollzellen
	5230
	325

Beispiel 2

Identifizierung der DNA von Chlamydia trachomatis unter Verwendung von Biotin – Streptavidin

15

Als Detektorsonde diente der mit ^{125}I markierte rekombinante Phage mKTH 1245, welcher zwei BamIII – SalI-DNA-Fragmente des Clons pKTH 1220 enthält, die zusammen an den Vektor M13mp8 gebunden sind. Der Klon pKTH 1220 Verbindungsstoss nach Anspruch von Mikroorganismen am 15. Dezember 1983 unter der Nummer DSM 2825 deponiert und in der Publikation Palva et al., FEMS Microbiology Letters 23, S. 83–89 (1984), beschrieben.

20

Als Einfangs-sonde diente das rekombinante Plasmid pKTH 1250. Dieses Plasmid besteht aus einem 2,9 kb SalI – ClaI-Fragment des Plasmids pKTH 1220 (DSM 2825) und dem Vektor pAT 153. An die DNA des pKTH 1250 wurden unter Anwendung des bekannten Nick-Translationsverfahrens (Rigby et al., J. Mol. Biol. 113, S. 237–251, 1977) und mit Biotin-11-UTP als Substrat (Bethesda Research Laboratories) 30 Biotinmoleküle kovalent gebunden. Die Einfangs-sonden-DNA wurde vor Gebrauch 5 min in dem Puffer 10 mM Tris-C1 pH 7,6, 1 mM EDTA gekocht.

30

Als Probe diente das rekombinante Plasmid pKTH 1220 (DSM 2825). Dieses Plasmid enthält etwa 10 kb für Chlamydia trachomatis typische DNA, gebunden an den Vektor pBR 322. Das Plasmid fungiert als Modell-DNA und repräsentiert Genom-DNA des Bakteriums. Vor Gebrauch wurde das Plasmid 5 min in 0,02 M NaOH gekocht und sodann die Lösung mit Essigsäure neutralisiert.

35

Das als Affinitätsmaterial verwendete Streptavidin wurde an CNBr-aktivierte Sepharose gebunden (Axen et al., Nature 214, S. 1302–1304, 1967).

40

Für den Test wurden im Reagenzglas 500.000 cpm Detektorsonde, 50 ng Einfangs-sonden-DNA und 10 ng Proben-DNA zusammengebracht. Das Volumen wurde auf 20 μl eingestellt, und die Pufferlösung war die gleiche wie im Beispiel 1. Als Kontroll-DNA diente Kalbsthymus-DNA.

45

Das Gemisch wurde bei 65°C 60 min inkubiert. Danach wurden 500 μl Pufferlösung folgender Zusammensetzung zugesetzt: 0,1 M Tris-C1 pH 7,5, 0,1 M NaCl, 2 mM MgCl_2 , 0,05% Triton x-100. Die Lösung wurde zum Schluss in einer 0,2-ml-Streptavidin-Sepharose-Säule fraktioniert. Die Säule wurde mit 10 ml der obengenannten Pufferlösung und mit 0,015 M Natriumchlorid-, 0,015 M Natriumphosphat- (pH 7,6), 0,5% Natriumdodezylsulfatlösung (50°C), Volumen 10 ml, gewaschen. Dabei haftete sich die biotinylierte DNA ans Streptavidin, während die übrige DNA die Säule passierte. Die radioaktive Sonde haftete sich nur als Folge der Hybridbildung an. Die angehaftete Radioaktivität wurde durch Einbringen der gesamten Säule in das Zählrohr eines Gammazählers bestimmt.

50

55

60

Ergebnis:	^{125}I -Aktivität (cpm)
Probe:	10 ng pKTH 1220
65	10 ng Kontroll-DNA
	1350
	115

Beispiel 3

Identifizierung von Plasmid-pBR322-DNA unter Verwendung eines Antigen-Antikörper-Paares

Als Detektorsonde diente ein Plasmid-pBR322-Derivat (kommerziell aus verschiedenen Quellen erhältlich), aus dem das Fragment PstI-SalI (3613-651) entfernt worden war. Das Plasmid war nach einem bekannten Verfahren (Forster et al., Nucleic Acids Res. 13, S. 745-761, 1985) und unter Verwendung im Handel erhältlicher Reagenzien (Bresa, Adelaide, Australien) mit Photobiotin markiert worden.

Als Einfangsonde diente DNA des rekombinanten Phagen M13mplI, an welche das Plasmidfragment PstI-SalI gefügt worden war. Die DNA war nach einem bekannten Verfahren (Organics Ltd. Yavne, Israel) sulfoniert worden.

Als Probe diente E. Coli HB 101, an welches das Plasmid pBR 322 gefügt war. Die Plasmid-pBR322-Menge wurde durch Chloramphenikol-Amplifikation erhöht (Maniatis et al., Molecular cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Die Bakterienzellen wurden mit Lysozym aufgebrochen und in NaOH gekocht wie in der Publikation Palva, J. Clin. Microbiol. 18, S. 92-100, 1983, beschrieben ist.

Die Antisulfon-monoklonalen Antikörper wurden nach Standardverfahren (McKearn, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, ed. Kennett et al., Plenum Press 1980) in den Vertiefungen der aus Polystyrol hergestellten Mikrotiter befestigt.

Für den Test wurden 5×10^6 aufgebrochene E.-coli-Zellen (sowie ans Plasmid pBR 322 gefügt als auch ohne dieses), 100

ng Einfangsonden-DNA und 100 ng Detektorsonden-DNA zu einer Hybridierungslösung vereint, deren Volumen man auf 50 µl einstellte. Die Hybridisierungsverhältnisse waren die gleichen wie im Beispiel 1 mit der Ausnahme, dass 5% Polyethylenglykol (PEG 6000) zugesetzt wurden und der Natriumdodezylsulfatgehalt 0,1% betrug.

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Lösung mit 0,02 M Natriumphosphat (pH 7,6) auf 250 µl verdünnt; danach wurde die Lösung in die Mikrotiter-Vertiefungen gebracht, in denen Antikörper befestigt waren. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C. Danach wurden die Mikrotiter mit einer aus 0,15 M Natriumchlorid, 0,02 M Natriumphosphat und 0,05% Triton-X-100 bestehenden Lösung gewaschen.

Die Beobachtung der Detektorsonde erfolgte durch Zugabe von Streptavidin (Bethesda Research Laboratories, BRL), Waschen, Zugabe von biotinylierter alkalischer Phosphatase (BRL) und Waschen wie in der Publikation Leary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, S. 4045-4049, 1983, beschrieben ist. Zum Schluss wurden 250 µl Paranitrophenylphosphatlösung (35 mg/ml, Sigma) im Diethanolaminpuffer (pH 10) zugesetzt. Nach 60 Minuten wurde die Reaktion gestoppt und die Absorption bei 410 nm gemessen.

Ergebnis: A 410 nm

Probe:	Zellen, an die pBR322 gefügt war	>2
	Kontrollzellen (ohne pBR322)	0,15