(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 35 060 T2** 2009.01.02

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 728 218 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 35 060.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/13415**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 904 104.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/013399**
(86) PCT-Anmeldetag: **14.11.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **18.05.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.08.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **02.01.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.01.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
152006 12.11.1993 US

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

(73) Patentinhaber:
PHRI Properties,Inc., Newark, N.J., US

(74) Vertreter:
MÜLLER FOTTNER STEINECKE Rechtsanwälte Patentanwälte, 80335 München

(72) Erfinder:
TYAGI, Sanjay, New York, NY 10019, US; KRAMER, Fred R., Riverdale, NY 10463, US; LIZARDI, Paul M., Wallingford, CT 06492, US

(54) Bezeichnung: **HYBRIDISIERUNGSPROBE ZUR NUKLEINSÄUREDETEKTION, UNIVERSELLE STAMMSTRUKTUREN, METHODEN UND REAGENTIENSÄTZE**

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 den Bereich von Assays, die Nukleinsäure-Hybridisierungssonden einbeziehen. Assays sind nützlich für die Detektion spezifischer Gene, Gensegmente, RNA-Moleküle und anderer Nukleinsäuren. Solche Assays werden klinisch verwendet für z. B. Gewebe-, Blut- und Urinproben, sowie auch in der Lebensmitteltechnologie, Landwirtschaft und biologischer Forschung.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Nukleinsäure-Hybridisierungssonden werden verwendet um spezifische Targetsequenzen in einem komplexen Gemisch zu detektieren. Konventionelle heterogene Hybridisierungsassys, wie beispielsweise solche, die in Gillespie und Spiegelmann (1965) beschrieben sind, umfassen typischerweise die folgenden Schritte: Immobilisierung von mindestens der Targetnukleinsäure auf Papier, Beads, oder Plastikoberflächen, mit oder ohne Verwendung von "Capture"-Sonden; Zugabe eines Überschusses an markierten Sonden, die komplementär zu der Sequenz des Targets sind; Hybridisierung; Entfernen von nicht-hybridisierten Sonden; und Detektion der Sonden, die an das immobilisierte Target gebunden verbleiben.

[0003] EP 0 229 943 offenbart Sonden, die mit einem Donor-Fluorophor und einem Akzeptor-Fluorophor markiert sind, wobei die Fluorophore durch einen entscheidenden Abstand getrennt sind, um den Fluoreszenzresonanzenergietransfer zu maximieren, derart, dass die Sonden bei einer kurzen Wellenlänge angeregt, jedoch bei einer langen Wellenlänge detektiert werden können.

[0004] Nicht-hybridisierte Sonden werden durch ausgiebiges Waschen der Hybride entfernt. Dies ist üblicherweise der zeitaufwändigste Teil der Prozedur und nutzt of komplexe Formate, wie beispielsweise Sandwich-Hybridisierung. Die Verwendung fester Oberflächen verlängert die Zeit, die es zur Hybridisierung braucht durch Beschränken der Mobilität von oder des Zugangs zu dem Target. Der große Bereich, der durch die festen Oberflächen präsentiert wird, hält nicht-hybridisierte Sonden unspezifisch zurück, was zu einem Hintergrundsignal führt. Zusätzlich können feste Oberflächen das Signal von den Sonden stören. Die Bedingung, dass die Sonde-Target-Hybride isoliert seien, schließt in vivo Detektion und entsprechend Detektion von Nukleinsäuren während der Synthesereaktionen (Echtzeit-Detektion) aus.

[0005] Mehrere Lösungsphasen-Detektionssysteme, manchmal bezeichnet als homogene Assays, sind bekannt. Mit "homogen" meinen wir Assays, die ohne Trennen der nicht-hybridisierten Sonden von Sonde-Target-Hybriden durchgeführt werden. Diese Systeme nutzen oft die Tatsache, dass die Fluoreszenz vieler Fluoreszenzmarker durch die unmittelbare chemische Umgebung beeinflusst werden kann. Ein solches System ist von Heller et al. (1983) und ebenfalls von Cardullo et al. (1988) beschrieben. Es verwendet ein paar Oligodesoxynukleotid-Sonden, komplementär zu benachbarten Bereichen eines Target-DNA-Strangs. Eine Sonde enthält einen Fluoreszenzmarker an ihrem 5'-Ende und die andere Sonde enthält einen andersartigen Fluoreszenzmarker an ihrem 3'-Ende. Wenn die Sonden an die Targetsequenz hybridisiert werden, befinden sich die zwei Marker sehr nahe beieinander. Wenn die Probe durch Licht einer geeigneten Frequenz stimuliert wird, findet Fluoreszenzresonanzengergietransfer ("FREI") von einem Marker zu dem anderen statt. Dieser Energietranfer produziert eine messbare Veränderung des spektralen Verhaltens, welches indirekt das Vorhandensein des Targets signalisiert. Die Marker werden manchmal als FREI-Paare bezeichnet. Nichtsdestotrotz sind die veränderten spektralen Eigenschaften fein und die Änderungen gering im Vergleich zum Hintergrundsignal. Das Aufzeichnen erfordert anspruchsvolle Instrumente und selbst in dem Fall ist die Sensitivität limitiert. Darüber hinaus ist das Hybridisierungssignal in manchen Fällen ein negatives; d. h. das Vorhandensein eines Targets führt zu einer Reduktion der Menge an Fluoreszenz, die bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen wird.

[0006] Diese Technik erfordert, dass zwei nicht-assoziierte Sonden gleichzeitig an eine einzelsträngige Targetsequenz binden. Die Kinetiken dieser tri-molekularen Hybridisierung sind zu langsam für diese Technik, um für Echtzeitdetektion geeignet zu sein. Die Anforderung, dass das Target einzelsträngig sei, macht die Technik für in vivo Detektion von doppelsträngigen Nukleinsäuren ungeeignet.

[0007] Ein anderes Lösungsphasen-System nutzt ebenfalls ein Paar an Oligodesoxynukleotidsonden. Nichtsdestotrotz sind hier die zwei Sonden vollständig komplementär sowohl zueinander als auch zu komplementären Strängen einer Target-DNA (Morrison, 1987; Morrison, 1989; Morrison et al., 1989; Morrison und Stols, 1993). Jede Sonde beinhaltet einen Fluorophor, gebunden an ihr 3' Ende und einen quenchenden Rest, gebunden an ihr 5' Ende.

[0008] Wenn die zwei Oligonukleotidsonden aneinander annealed werden, wird der Fluophor jeder Sonde in nächster Nähe zu dem quenchenden Rest der anderen Sonde gehalten. Wenn der Fluoreszenzmarker dann über eine geeignete Lichtfrequenz stimuliert wird, wird die Fluoreszenz durch den quenchenden Rest gequencht. Ist jedoch eine der Sonden an ein Target gebunden, fehlt der quenchende Effekt der komplementären Sonde. Die Sonden sind ausrei-

chend lang, dass sie sich nicht selbst quenchen wenn sie ans Target gebunden sind.

[0009] Bei dieser Art von Assay gibt es zwei entgegengesetzte Entwurfsüberlegungen. Es ist erstrebenswert eine hohe Konzentration an Sonden zu haben, um sicher zu stellen, dass die Hybridisierung der Sonden ans Target schnell ist. Es ist ebenfalls wünschenswert eine geringe Konzentration an Sonden zu haben, so dass das Signal der ans Target gebundenen Sonden, nicht überlagert wird vom Hintergrundsignal von Sonden, die weder ans Target, noch an andere Sonden hybridisiert sind. Diese Situation erfordert das Warten einer relativ langen Zeit vor dem Lesen des Floureszenzsignals bis die Hintergrundfluoreszenz abgeklungen ist.

[0010] Ein Assay nach diesem System beginnt mit Schmelzen eins Gemischs von Sonden und Probe, die Targetsequenzen enthalten kann. Die Temperatur wird dann erniedrigt, was zu kompetitiver Hybridisierung führt. Manche Sonden werden ans Target, falls vorhanden, hybridisieren; manche werden an komplementäre Sonden hybridisieren; und manche werden nicht hybridisieren und ein Hintergrundsignal hervorrufen. Ein paralleler Kontrollassay wird ohne Target laufen gelassen, der lediglich einen Hintergrundlevel an Fluoreszenz gibt. Wenn die Probe ausreichend Target enthält, wird ein detektierbar höheres Level an verbleibender Fluoreszenz erhalten werden.

[0011] Mit diesem System ist es erforderlich, das Lesen der verbleibenden Fluoreszenz für eine beträchtliche Zeit zu verzögern, um fast all den überschüssigen Sonden zu erlauben an ihre Komplemente zu annealen. Ebenfalls muss eine parallele Kontrollreaktion durchgeführt werden. Zusätzlich wird eine geringe Konzentration an Sonden verwendet um den Fluoreszenzhintergrund zu reduzieren. Daher sind die Kinetiken schlecht und resultieren in einem grundsätzlich langsamen Assay. Dies schließt Echtzeitdetektion aus. Diese Probleme sind besonders schwerwiegend für doppelsträngige Targets. Die Sonden, sowie die Targets müssen geschmolzen werden, was den Assay ungeeignet für die Verwendung in vivo macht. Auch ist das Signal nicht nur verbleibend, es ist ein unterschiedliches Signal aus dem Vergleich mit einer externen Kontrolle.

[0012] EP 0 601 889 offenbart, dass die Targeterkennung und kompetitive Sequenzen eines Sondenpaares kombiniert werden kann in einen Strang, der einen Nukleotidspacer enthält, welcher diese Sequenzen trennt. In diesen Sonden ist jede Sequenz markiert, eine mit Donorfluorophor und die andere mit einem Akzeptorfluorophor. In Abwesenheit des Targets hybridisieren die beiden Sequenzen und es findet Energietransfer statt. Beim Gebrauch wird die Sonde mit dem Target in Kontakt gebracht, bei einer Temperatur, die ausreichend hoch ist, um das Intra-Sondenhybrid aufzulösen, sodass einzelsträngige Spezies sowohl von Target als auch Sonde vorliegen, sowie Sekundärstrukturen wie beispielsweise Haarnadeln fehlen. Das Target konkurriert dann mit dem/den Quenchingstrang oder -strängen der Sonde, hierin bezeichnet als ein kompetitiver Arm oder Arme, um an die Targeterkennungssequenz der Sonde zu hybridisieren.

[0013] Ein anderes Lösungsphasen-System, das das als Strangverdrängung bekannte Phänomen verwendet, wird von Diamond et al., 1988 beschrieben. Typischerweise beinhalten diese Essays einen bimolekularen Nukleinsäure-Sonde-Komplex. Ein kürzerer Einzelstrang, der einen Teilbereich der Targetsequenz umfasst, wird an einen längeren Sondeneinzelstrang, der die gesamte Targetbinderegion der Sonde enthält, annealed. Der beschriebene Sondenkomplex enthält also sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Abschnitte. Die Referenz schlägt vor, dass diese Sondenkomplexe ferner umfassen können, entweder eine ^{32}P-Markierung, angeheftet an den kürzeren Strang, oder einen Fluophor- und einen Quencherrest, die in Nähe zueinander gehalten werden können, wenn der Sondenkomplex gebildet ist.

[0014] Es ist angegeben, dass in Assays, die diese Sondenkomplexe verwenden, Targetdetektion in einem Zweischrittprozess bewerkstelligt wird. Erstens hybridisiert der einzelsträngige Teil des Komplexes mit dem Target. Es ist beschrieben, dass Targeterkennung im Anschluss daran folgt, wenn durch den Mechanismus der Verzweigungswanderung die Targetnuldeinsäure den kürzen, die Markierung enthaltenden Strang aus dem Sondenkomplex verdrängt. Es heißt, dass der die Markierung enthaltende Strang in die Lösung freigesetzt wird, aus der er isoliert und detektiert werden kann. In einer alternativen Anordnung berichtet als ^{32}P-markierte Sonde für eine "Capture"-Prozedur, werden die zwei einzelsträngigen Nukleinsäuren zu einem einzigen Molekül verbunden.

[0015] Diese Strangverdrängungssondenkomplexe haben Nachteile.

[0016] Der Mechanismus ist zweischrittig, indem der Sondenkomplex zuerst an das Target binden muss und dann Strangverdrängung über Verzweigungswanderung stattfinden muss, bevor ein Target erkannt und ein Signal generiert wird. Von bimolekularen Sondenkomplexe ist nicht berichtet, dass sie sich mit hoher Effizienz bilden, was in Sondenpreparationen resultiert, wobei die Mehrheit der targetbindenden Bereiche möglicherweise nicht an einen markierten Strang annealt werden kann. Das kann zu Konkurrenz zwischen die Markierung enthaltenden und markierungsfreien targetbindenden Bereichen für dieselbe Targetsequenz (ihren. Zusätzlich können Probleme auftauchen mit unspezifischem Abfallen

markierter Stränge. Darüber hinaus kann es nötig sein, den verdrängten markierten Strang von den nicht-hybridisierten Sodenkomplexen zu trennen, bevor ein Signal detektiert werden kann. Dieses Erfordernis würde solch einen Sondenkomplex für einen homogenen Assay ungeeignet machen.

[0017] Die veröffentlichte japanische Patentanmeldung Nr. 3-285221 offenbart das Vorliegen sowohl einer zweiteiligen Target-komplementären Sequenz, getrennt durch eine intervenierende Sequenz, oder einer einteiligen Target-komplementären Sequenz, flankiert durch stammbildende Sequenzen. In beiden Fällen trägt (tragen) der Teil (die Teile), die nicht die Target-komplementäre Sequenz darstellen, einen Donor-Fluorophor und einen Akzeptor-Fluorophor. Beim Gebrauch werden die Sonden mit einem Target gemischt, wonach das Gemisch auf mindestens 60°C erhitzt wird und dann langsam über mindestens 5 Minuten abkühlen gelassen wird, wonach eine Änderung in der Fluoreszenz detektiert wird.

[0018] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, die oben diskutierten Einschränkungen konventioneller Hybridiserungssonden und -Assays als auch existierender homogener Hybridisierungssonden und -Assays zu überwinden.

[0019] Ein weiteres Ziel dieser Erfindung ist die Verwendung von Hybridisierungssonden, die nach Hybridisieren mit einer Target-Nukleinsäuresequenz ein Signal generieren, die jedoch nur eine schwache oder keine Signalgenerierung zeigen wenn sie nicht-hybridisiert sind, sowie Assays, die diese Sonden verwenden.

[0020] Weitere Ziele dieser Erfindung sind Kits, die verwendet werden können um solche Nukleinsäuresonden, spezifisch für Targetsequenzen nach Wahl, herzustellen.

[0021] Ein weiteres Ziel dieser Erfindung sind homogene Assays unter Verwendung solcher Sonden.

[0022] Ein weiteres Ziel dieser Erfindung sind Hybridisierungssonden und schnelle Verfahren, wobei die Detektion schnell und ohne Verzögerung durchgeführt wird.

[0023] Ein weiteres Ziel dieser Erfindung sind Hybridisierungssonden und Verfahren, die Nukleinsäuren in vivo detektieren können.

[0024] Ein weiteres Ziel dieser Erfindung sind Hybridisierungssonden und Verfahren, die Nukleinsäure is situ detektieren können.

[0025] Ein weiteres Ziel dieser Erfindung sind Hybridisierungssonden und Verfahren, die Nukleinsäuretargetsequenzen in Nukleinsäureamplifikations- oder anderen Synthesereaktionen im Echtzeitmodus detektieren können.

[0026] Ein weiteres Ziel dieser Erfindung sind Hybridisierungssonden und Assays, die die Detektion von Nukleinsäuretargets ohne Verwendung von teurer Ausstattung erlauben.

[0027] Um das gesamte Potenzial des Hybridisierungsprozesses im Bereich der Diagnostik und Forschung zu realisieren, wird eine Technik zum überwachen von Hybridisierung in Lösungen benötigt, mit Sonden, die nur ein schwaches oder kein eigenes Signal haben, jedoch ein detektierbares Signal produzieren, wenn sie an ein Target hybridisiert sind. Vorzugsweise sollte die Sonde das Überwachen des Fortschreitens von Reaktionen erlauben, die Nukleinsäuren mit entweder linearen oder exponentiellen Kinetiken produzieren. Ebenfalls sollte die Sonde die Detektion von Nukleinsäuren in vivo (und in situ) ohne die Zerstörung des Gewebes oder der Zelle erlauben. Selbstverständlich sollte die Sonde ebenfalls in konventionellen Hybridisierungsassays verwendbar sein. Zusätzlich sollten die Assays eine sehr sensitive Detektion von Targets erlauben, entweder direkt oder in Verbindung mit Amplifikationstechniken. Ebenfalls vorzugsweise sollte die Sonde in der Lage sein, ein Hybridisierungssignal zu generieren, das mit dem bloßen Auge detektierbar ist. Schließlich sollten die Sonden die Detektion verschiedener Targets in einem einzigen Assay erlauben. Ziele dieser Erfindungsind Nukleinsäurehybridisierungsassays und -sonden, die alle oder fast alle diese Erfordernisse erfüllen.

[0028] Manche Ausführungsformen des Gegenstands, die den Prozess der Erfindung wie beansprucht betreffend sind:

1. Eine markierte einheitliche Sonde zum Detektieren von mindestens einem Nukleinsäurestrang, enthaltend eine vorausgewählte Nukleinsäuretargetsequenz unter vorausgewählten Assaybedingungen, einschließlich einer Detektionstemperatur, wobei die Sonde umfasst:
   eine einzelsträngige Target-komplementäre Sequenz, die von zehn bis ungefähr 140 Nukleotide aufweist, die einen 5'-Terminus und einen 3'-Terminus aufweist, und die komplementär zur Targetsequenz ist;
   einen Stammduplex mit einer Länge von 3 bis 25 Nukleotiden, bestehend aus einer 5'-Armsequenz, benachbart zu und kovalent gebunden an den 5'-Terminus, und eine 3'-Armsequenz benachbart zu und kovalent gebunden an den 3'-Terminus, wobei der Duplex eine Schmelztemperatur oberhalb der Detektionstemperatur unter den vorausgewählten Assaybedingungen aufweist; und
   mindestens ein Markierungspaar, wobei jedes Paar einen ersten Markierungsrest, gebunden an die Sonde in der Nähe der 5'-Armsequenz um-

fasst und einen zweiten Markierungsrest, nahe zum ersten Markierungsrests und gebunden an die Sonde in der Nähe der 3'-Armsequenz,
wobei die Sonde unter den vorausgewählten Assaybedingungen in Abwesenheit der Targetsequenz ein charakteristisches Signal aufweist, dessen Level eine Funktion des Grads der Wechselwirkung des ersten und zweiten Markierungsrestes ist, wobei das Signal ein erstes Level bei 10°C unterhalb der Schmelztemperatur, ein zweites Level bei 10°C oberhalb der Schmelztemperatur und ein drittes Level bei der Detektionstemperatur aufweist,
wobei unter den vorausgewählten Assaybedingungen bei der Detektionstemperatur und in Anwesenheit eines Überschusses der Targetsequenz die Hybridisierung der Target-komplementären Sequenz an die Targetsequenz den Level des charakteristischen Signals von dem dritten Level zu dem zweiten Level um einen Betrag von mindestens 10 Prozent des Unterschieds zwischen dem ersten und zweiten Level verändert.
2. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, wobei die einheitliche Sonde eine unimolekulare Sonde ist.
3. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, wobei die einheitliche Sonde bimolekulare Sonde ist, bestehend aus einem ersten Molekül, enthaltend ungefähr die Hälfte der Target-komplementären Sequenz, einschließlich des 5'-Terminus', der 5'-Armsequenz und des ersten Markierungsrests; und ein zweites Molekül, enthaltend ungefähr die Hälfte der Target-komplementären Sequenz, einschließlich des 3'-Terminus', der 3'-Armsequenz und des zweiten Markierungsrests.
4. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, wobei das mindestens eine Markierungspaar ein FREI-Paar ist.
5. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, wobei die Schmelztemperatur mindestends 5°C oberhalb der Detektionstemperatur liegt.
6. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 5, wobei das mindestens eine Markierunspaar ein FREI-Paar ist.
7. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 6.
8. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 6, wobei sich die 5'- und 3'-Armsequenzen unmittelbar benachbart zu der Target-komplementären Sequenz befinden.
9. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 8.
10. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 6, wobei die ersten und zweiten Markierungsreste kovalent in die einheitliche Sonde (ein)gebunden sind.
11. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 10.
12. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 6, wobei die Schmelztemperatur mindestens 10°C oberhalb der Detektionstemperatur liegt.
13. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 12.
14. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 6, wobei das FREI-Paar ein Fluoreszierer und ein Quencher ist.
15. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 14.
16. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 7, wobei das FREI-Paar aus EDANS und DABCYL besteht.
17. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, wobei die 5'- und 3'-Armsequenzen direkt kovalent an die Target-komplementäre Sequenz gebunden sind.
18. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 17.
19. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, wobei mindestens eine der 5'- und 3'-Armsequenzen mindestens teilweise komplementär zu dem Nukleinsäurestrang ist, der die Targetsequenz enthält.
20. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 19.
21. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, wobei jede der 5'- und 3'-Armsequenzen benachbarte komplementäre Sequenzen von mindestens drei Nukleotiden umfasst.
22. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 21.
23. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, wobei die Sondensequenzen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus DNA, RNA und Gemischen von DNA und RNA.
24. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, wobei die ersten und zweiten Markierungsreste kovalent in die einheitliche Sonde (ein)gebunden sind.
25. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 24, wobei die ersten und zweiten Markierungsreste durch einen Alkylspacer kovalent gebunden sind.
26. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 25.
27. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, gebunden an eine feste Oberfläche.
28. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 27.
29. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 1, wobei die Schmelztemperatur mindestens 5°C oberhalb der Detektionstemperatur liegt, wobei die 5'- und 3'-Armsequenzen direkt kovalent an die Target-komplementäre Sequenz gebunden sind, wobei die ersten und zweiten Markierungsreste kovalent an die 5'- und 3'-Armsequenzen gebunden sind, und das mindestens eine Markierungspaar aus einem Fluoreszierer und einem Quencher besteht.
30. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 29.
31. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 29, gebunden an einen festen Träger.
32. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 31.

33. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 29, wobei die Target-komplementäre Sequenz von 20 bis 60 Nukleotide aufweist.
34. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 33.
35. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 34, gebunden an einen festen Träger.
36. Eine einheitliche Hybridisierungssonde für die Detektion von mindestens einem Nukleinsäuretarget, umfassend eine vorausgewählte Targetsequenz in einem vorausgewählten Nukleinsäurehybridisierungsassay, wobei die Sonde in der Lage ist, eine geschlossenen Konformation und eine offene Konformation einzunehmen, umfassend:
(a) Eine Target-komplementäre Sequenz von 10 bis ungefähr 140 Nukleotiden, komplementär zu der vorausgewählten Nukleinsäuretargetsequenz, die einen 5'-Terminus und einen 3'-Terminus aufweist,
(b) Ein Affinitätspaar, umfassend einen ersten Affinitätsrest, kovalent gebunden an den 5'-Terminus, und einen zweiten Affinitätsrest, kovalent gebunden an den 3'-Terminus, wobei das Affinitätspaar ausreichend wechselwirkt, um die Sonde in dem vorausgewählten Assay in Abwesenheit des Nukleinsäuretargets in der geschlossenen Konformation zu halten, und
(c) Ein Markierungspaar, umfassend einen ersten Markierungsrest, konjugiert an die Sonde in der Nähe des ersten Affinitätsrests, und einen zweiten Markierungsrest, konjugiert an die Sonde in der Nähe des zweiten Affinitätsrests, wobei die Markierungsreste Wechselwirken, um eine messbare Eigenschaft von mindestens einem von ihnen zu bewirken, wenn die Sonde in der geschlossenen Konformation vorliegt, wobei die Hybridisierung der Target-komplementären Sequenz an die Targetsequenz in dem vorausgewählten Assay die Sonde dazu veranlasst, ihre offene Konformation einzunehmen, in der die Markierungsreste nicht derart Wechselwirken.
37. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 36, wobei die einheitliche Sonde eine unimolekulare Sonde ist.
38. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 36, wobei die einheitliche Sonde eine bimolekulare Sonde ist, bestehend aus einem ersten Molekül, enthaltend ungefähr die Hälfte der Target-komplementären Sequenz, einschließlich des 5'-Terminus', des ersten Affinitätsrests und des ersten Markierungsrests; und ein zweites Molekül, enthaltend ungefähr die Hälfte der Target-komplementären Sequenz, einschließlich des 3'-Terminus', des zweiten Affinitätsrests und des zweiten Markierungsrests.
39. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 36, wobei der erste Markierungsrest an den ersten Affinitätsrest konjugiert ist und der zweite Markierungsrest an den zweiten Affinitätsrest konjugiert ist.
40. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 39.
41. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 36, wobei das Affinitätspaar komplementäre Oligonukleotid-Armsequenzen von 3 bis 25 Nukleotiden in der Länge umfasst.
42. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 41, wobei der erste Markierungsrest kovalent an den ersten Affinitätsrest gebunden ist und der zweite Markierungsrest kovalent an den zweiten Affinitätsrest gebunden ist.
43. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 42.
44. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 39, wobei das Markierungspaar ein FREI-Paar umfasst.
45. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 44.
46. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 36, wobei das Affinitätspaar einen Antikörper und ein Antigen umfasst.
47. Eine Sonde gemäß Ausführungsform 36, gebunden an eine feste Oberfläche.
48. Eine unimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 47.
49. Einen allgemeinen Stamm, umfassend:
ein erstes Oligonukleotid von 5 bis 20 Nukleotiden, das eine erste kovalent-reaktive Gruppe an seinem 3'-Terminus aufweist und das an sich konjugiert an einer anderen Stelle als seinem 3'-Terminus mindestens einen Markierungsrest eines ersten Markierungspaars aufweist, und
ein zweites Oligonukleotid, komplementär zu dem ersten Oligonukleotid, von 5 bis 20 Nukleotiden, das eine zweite kovalent-reaktive Gruppe an seinem 5'-Terminus aufweist, und das an sich konjugiert an einer anderen Stelle als seinem 5'-Terminus mindestens einen zweiten Markierungsrest des ersten Markierungspaars aufweist, wobei die Markierungsreste benachbart sind, wenn die Oligonukleotide aneinander hybridisiert sind,
wobei mindestens ein Markierungsrest des ersten Markierungspaars eine physikalisch-messbare Eigenschaft des anderen herbeiführt, wenn die ersten und zweiten Markierungsreste benachbart zueinander sind in einem Ausmaß, das detektierbar verschieden ist von demjenigen, wenn sie nicht benachbart zueinander sind.
50. Ein allgemeiner Stamm gemäß Ausführungsform 49, wobei die ersten und zweiten Oligonukleotide ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus DNA, RNA und Gemischen von DNA und RNA.
51. Ein allgemeiner Stamm gemäß Ausführungsform 50, wobei die erste kovalent-reaktive Gruppe und die zweite kovalent-reaktive Gruppe jeweils ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyl, Phosphat, Sulfhydryl, Amino, Alkylphosphat, Alkylamino und Hydroxylalkyl.
52. Ein allgemeiner Stamm gemäß Ausführungsform 49, wobei jedes der ersten und zweiten Oli-

gonukleotide benachbarte komplementäre Sequenzen von mindestens drei Nukleotiden einschließt.
53. Ein allgemeiner Stamm gemäß Ausführungsform 49, wobei das erste Markierungspaar ein FREI-Paar ist.
54. Ein allgemeiner Stamm gemäß Ausführungsform 49, wobei die ersten und zweiten Oligonukleotide aneinander hybridisieren und einen ligierbaren Überhang bereitstellen, in welchem einer der 5'-Terminus und 3'-Terminus über den anderen um mindestens zwei Nukleotide herausragt.
55. Ein allgemeiner Stamm gemäß Ausführungsform 54, wobei das erste Markierungspaar ein FREI-Paar ist.
56. Ein allgemeiner Stamm gemäß Ausführungsform 49, wobei die ersten und zweiten Oligonukleotide getrennt in einem Paar von Behältern verpackt sind.
57. Ein allgemeiner Stamm gemäß Ausführungsform 49, wobei eines der ersten und zweiten Oligonukleotide an eine feste Oberfläche gebunden ist.
58. Ein Kit zum Verwenden eines allgemeinen Stamms, um mindestens eine Sonde gemäß Ausführungsform 1 zu erstellen, umfassend:
einen allgemeinen Stamm gemäß Ausführungsform 49, und ausreichend Information zum kovalenten Binden einer Target-komplementären Sequenz gemäß Ausführungsform 1 an den Stamm.
59. Ein Kit gemäß Ausführungsform 58, wobei das erste Markierungspaar des allgemeinen Stamms ein FREI-Paar ist.
60. Ein Kit gemäß Ausführungsform 58, wobei die ersten und zweiten Oligonukleotide des allgemeinen Stamms getrennt verpackt sind.
61. Ein Kit gemäß Ausführungsform 60, wobei die Information ausreichend ist zum kovalenten Binden eines ersten Nukleinsäurestrangs an das zweite Oligonukleotid, enthaltend ungefähr die Hälfte einer Target-komplementären Sequenz gemäß Ausführungsform 1, einschließlich ihres 3'-Terminus' des ersten Oligonukleotids, und zum kovalenten Binden eines zweiten Nukleinsäurestrangs, enthaltend ungefähr die Hälfte der Target-komplementären Sequenz, einschließlich ihres 5'-Terminus'.
62. Ein Kit gemäß Ausführungsform 61, wobei eins der ersten und zweiten Oligonukleotide an eine feste Oberfläche gebunden ist.
63. Ein Kit gemäß Ausführungsform 58, wobei die ersten und zweiten Oligonukleotide des Stamms aneinander hybridisieren und einen ligierbaren Überhang bereitstellen, in dem einer des 5'-Terminus' und des 3'-Terminus' über den anderen um mindestens zwei Nukleotide herausragt, und wobei die Information ausreichend ist, zum Ligieren eines selbsthybridisierenden Einzelstrangs an den Stamm, der komplementär zu dem Überhang ist und eine Target-komplementäre Sequenz gemäß Ausführungsform 1 enthält.
64. Ein Kit gemäß Ausführungsform 63, enthaltend mindestens zwei Stämme, die verschiedene Schmelztemperaturen unter den vorausgewählten Assaybedingungen aufweisen.
65. Ein Kit gemäß Ausführungsform 64, wobei die Stämme ein gemeinsames erstes oder zweites Oligonukleotid haben.
66. Ein Kit gemäß Ausführungsform 63, wobei das erste Markierungspaar des allgemeinen Stamms ein FREI-Paar ist.
67. Ein Kit gemäß Ausführungsform 63, wobei jedes der ersten und zweiten Oligonukleotide des Stamms benachbarte komplementäre Sequenzen von mindestens drei Nukleotiden enthält.
68. Ein Kit gemäß Ausführungsform 63, wobei eines des ersten und zweiten Oligonukleotids an eine feste Oberfläche gebunden ist.
69. Ein Assay zum Detektieren von mindestens einem Nukleinsäurestrang, enthaltend eine vorausgewählte Targetsequenz unter vorausgewählten Assaybedingungen, einschließlich einer Detektionstemperatur, umfassend die Schritte:
Zugeben einer einheitlichen Sonde gemäß Ausführungsform 1 zu einer Probe unter den vorausgewählten Assaybedingungen, und
Ermitteln jeder Veränderung im Level des charakteristischen Signals bei der Detektionstemperatur.
70. Ein Assay gemäß Ausführungsform 69, wobei der Schritt des Ermittelns ein Messen umfasst.
71. Ein Echtzeit-Assay gemäß Ausführungsform 70.
72. Ein Echtzeit-Assay gemäß Ausführungsform 69.
73. Ein Assay gemäß Ausführungsform 70, wobei der Schritt des Ermittelns das Messen als eine Funktion der Zeit umfasst.
74. Ein Assay gemäß Ausführungsform 70, ferner umfassend einen Schritt des Zugeben der Probe gemäß Ausführungsform 1 zu einer Target-losen Kontrolle unter den vorausgewählten Assaybedingungen und
Messen jeder Veränderung im Level für diese Kontrolle, wobei der Schritt des Ermittelns das Berechnen einer Differenz zwischen der Veränderung im Level für die Kontrolle und der Veränderung im Level für die Probe einschließt.
75. Ein Assay gemäß Ausführungsform 69, ferner umfassend einen Schritt des Zugebens der Sonde gemäß Ausführungsform 1 zu einer Target-losen Kontrolle.
76. Ein Assay gemäß Ausführungsform 69, wobei die Sonde eine bimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 3 ist, und der Assay vollständig unterhalb der Schmelztemperatur der Sonde durchgeführt wird.
77. Ein Assay gemäß Ausführungsform 69, wobei die Schmelztemperatur der Sonde mindestens 5°C oberhalb der Detektionstemperatur liegt, wobei die 5'- und 3'-Armsequenzen direkt kovalent

an die Target-komplementäre Sequenz gebunden sind, wobei die ersten und zweiten Markierungsreste kovalent an die 5'- und 3'-Armsequenzen gebunden sind, und das mindestens eine Markierunspaar ein Fluoreszierer und ein Quencher ist.

78. Ein Echtzeit-Assay gemäß Ausführungsform 77.

79. Ein Assay gemäß Ausführungsform 77, wobei die Sonde eine bimolekulare Sonde gemäß Ausführungsform 3 ist, und der Assay vollständig unterhalb der Schmelztemperatur der Sonde durchgeführt wird.

80. Ein Assay gemäß Ausführungsform 69, wobei der Schritt des Ermitteln quantitativ ist.

81. Ein Assay gemäß Ausführungsform 69, wobei die Sonde eine unimolekulare Sonde ist.

82. Ein Assay gemäß Ausführungsform 81, wobei der Schritt des Ermitteln quantitativ ist.

83. Ein Assay gemäß Ausführungsform 81, ferner umfassend einen Schritt des Zugebens der unimolekularen Sonde gemäß Ausführungsform 2 zu einer Target-losen Kontrolle.

84. Ein Assay gemäß Ausführungsform 81, wobei die Schmelztemperatur der Sonde mindestens 5°C oberhalb der Detektionstemperatur liegt, wobei die 5'- und 3'-Armsequenzen direkt kovalent an die Target-komplementäre Sequenz gebunden sind, wobei die ersten und zweiten Markierungsreste kovalent an die 5'- und 3'-Armsequenzen gebunden sind, und das mindestens eine Markierungspaar ein Fluoreszierer und ein Quencher ist.

85. Ein Assay gemäß Ausführungsform 81, wobei die Nukleinsäuretargetsequenz ein Produkt einer Amplifikationsreation ist, und wobei der Schritt des Zugebens der Sonde zu einer Probe der Vervollständigung der Amplifikationsreaktion vorausgeht.

86. Ein Assay gemäß Ausführungsform 85, ferner umfassend einen Schritt des Zugebens der Sonde zu einer Negativkontrolle, wobei der Schritt der Vervollständigung der Amplifikationsreaktion für die Negativkontrolle vorausgeht.

87. Ein Echtzeit-Assay gemäß Ausführungsform 86.

88. Ein Assay gemäß Ausführungsform 87, wobei der Schritt des Ermittelns das Berechnen einer Differenz zwischen der Änderung im Level für die Kontrolle und der Änderung im Level für die Probe einschließt.

89. Ein Assay gemäß Ausführungsform 85, wobei der Schritt des Ermittelns das über die Zeit wiederholte Messen während der Amplifikationsreaktion einschließt.

90. Ein Assay gemäß Ausführungsform 89, wobei die Schmelztemperatur der Sonde mindestens 5°C über der Detektionstemperatur liegt, wobei die 5'- und 3'-Armsequenzen direkt kovalent an die Target-komplementäre Sequenz gebunden sind, wobei die ersten und zweiten Markierungsreste kovalent an die 5'- und 3'-Armsequenzen gebunden sind, und das mindestens eine Markierungspaar ein Fluoreszierer und ein Quencher ist.

91. Ein Assay gemäß Ausführungsform 85, wobei die Amplifikationsreaktion eine Amplifikation eines RNA-Reporters über eine RNA-Polymerase ist.

92. Ein Assay gemäß Ausführungsform 85, wobei die Amplifikationsreaktion eine PCR-Reaktion ist.

93. Ein Assay gemäß Ausführungsform 85, wobei die Amplifikationsreaktion eine SDA-Reaktion ist.

94. Ein Assay gemäß Ausführungsform 85, wobei das Markierungspaar ein FREI-Paar ist.

95. Ein Assay gemäß Ausführungsform 69, wobei die Sonde gemäß Ausführungsform 1 an eine feste Oberfläche gebunden ist.

96. Ein Assay gemäß Ausführungsform 95, einschließend mindestens eine zusätzliche befestigte Sonde gemäß dieser Erfindung, die eine unterschiedliche Target-komplementäre Sequenz aufweist und an dieselbe Trägeroberfläche an eine vorher bestimmte Stelle gebunden ist.

97. Ein Assay zum Detektieren mindestens eines Nukleinsäuretargets, enthaltend eine vorausgewählte Targetsequenz, umfassend die Schritte:

Zugeben einer einheitlichen Sonde gemäß Ausführungsform 36 zu einer Probe unter den vorausgewählten Assaybedingungen, und

Ermitteln jeder Änderung im Level der messbaren Eigenschaft.

98. Ein Assay gemäß Ausführungsform 97, wobei der Schritt des Ermessens Messen umfasst.

99. Ein Assay gemäß Ausführungsform 98, wobei das Messen das visuelle Vergleichen mit einem Standard umfasst.

100. Ein Assay gemäß Ausführungsform 97, wobei das Nukleinsäuretarget ein Produkt einer Amplifikationsreaktion ist, und wobei die Sonde unimolekular ist.

101. Ein Assay gemäß Ausführungsform 100, wobei der Schritt des Zugebens der Sonde der Vervollständigung der Amplifikationsreaktion vorausgeht.

102. Ein Kit zum Durchführen eines Assays gemäß Ausführungsform 69, umfassend eine Sonde gemäß Ausführungsform 1 und Anleitungen zum Durchführen des Assays.

103. Ein Kit gemäß Ausführungsform 102, ferner enthaltend ein oder mehrere Reagenzien ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Salzen, Puffer, Nuklease-Inhibitoren, Restriktionsenzymen und Denaturierungsmitteln.

104. Ein Amplifikationskit gemäß Ausführungsform 102, einschließend ein oder mehrere Komponenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Polymerase-Templates.

105. Ein Amplifikationskit gemäß Ausführungsform 102, wobei die Sonde unimolekular ist.

106. Ein Vitalfarbe-Assaykit gemäß Ausführungsform 102, einschließend ein und mehrere Kompo-

nenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus permeabilisierenden Agenzien, Liposom-Vorläufern und Gegensträngen.

107. Ein in situ Assaykit gemäß Ausführungsform 102, einschließend ein oder mehrere Komponenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Fixierungsmitteln, dehydratisierenden Agenzien, Proteasen, Gegensträngen und Detergenzien.

108. Ein Feldkit gemäß Ausführungsform 102, wobei die Sonde eine befestigte Sonde ist.

109. Ein Kit gemäß Ausführungsform 108, einschließend mindestens eine zusätzliche befestigte Sonde gemäß dieser Erfindung, die eine unterschiedliche Target-komplementäre Sequenz aufweist und an dieselbe Trägeroberfläche an eine vorher bestimmten Stelle gebunden ist.

110. Ein Kit gemäß Ausführungsform 108, einschließend eine positive Kontrollsonde gemäß dieser Erfindung.

111. Ein Kit gemäß Ausführungsform 108, wobei die Sonde unimolekular ist.

[0029] Sonden zur Verwendung in Übereinstimmung mit dieser Erfindung sind "einheitlich", womit wir meinen entweder bimolekulare Sonden verbunden als ein Paar und betriebsbereit in einem Assay als verbundene oder unimolekulare Einzelstränge. Sie umfassen mindestens: eine einzelsträngige Nukleinsäuresequenz, die komplementär zu einer gewünschten Targetnukleinsäure ist, hierin als eine "Target-komplementäre Sequenz" bezeichnet; 5' und 3'-Bereiche, die die Target-komplementäre Sequenz flankieren, welche reversibel über komplementäre Nukleinsäuresequenzen Wechselwirken; und interaktive Markierungsreste zum Generieren eines Signals. Bevorzugte Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung schließen ein komplementäre Nukleinsäuresequenzen, oder "Arme", die reversibel über Hybridisieren aneinander Wechselwirken, unter den Detektionsbedingungen, wenn die Target-komplementäre Sequenz nicht an das Target gebunden ist. Wo die einheitliche Sonde unimolekular ist, befinden sich all die obigen Komponenten in einem Molekül. Wenn die einheitliche Sonde bimolekular ist, befindet sich die Hälfte oder ungefähr die Hälfte der Target-komplementären Sequenz, ein Mitglied des Affinitätspaars und ein Mitglied des Markierungspaars in jedem Molekül.

[0030] Die Signal-generierenden Markierungsreste sind "Paare", derart angepasst, dass mindestens ein Markierungsrest mindestens eine physikalisch messbare Eigenschaft eines anderen Markierungsrests verändern kann, im Falle nächster Nähe, jedoch nicht in ausreichend getrennt. Die Markierungsreste sind derart an die Sonde konjugiert, dass die Nähe der Markierungsreste zueinander durch den Status der Wechselwirkung des Affinitätspaars reguliert wird. In der Abwesenheit des Targets werden die Markierungsreste durch die verbindende Wechselwirkung des Affinitätspaars in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander gehalten. Wir bezeichnen diese Konfirmation als den "geschlossenen" Zustand. Wenn das Target-anzeigende detektierbare Signal in dem geschlossenen Zustand nicht generiert wird, was der Fall für die meisten Ausführungsformen ist, sagen wir, das der geschlossene Zustand der "aus" Zustand ist.

[0031] Wenn die Target-komplementäre Sequenz an ihr Target hybridisiert, findet eine Konformationsänderung in der einheitlichen Sonde statt, die das Affinitätspaar und konsequenterweise die Markierungsreste trennt. Wir bezeichnen diese Konformation als den "offenen" Zustand, der in den meisten Ausführungsformen der "an" Zustand ist. Die Trennung wird verursacht durch die Thermodynamik der Bildung der Helix aus der Target-komplementaren Sequenz und Targetsequenz. Die Bildung der Helix aus der Target-komplementären Sequenz und Targetsequenz, entweder vollständig oder bruchstückhaft überwindet die Anziehung des Affinitätspaars unter den Assaybedingungen. Ein Signal wird generiert weil die Trennung des Affinitätspaars die Wechselwirkung der Markierungsrest verändert und man danach einen Unterschied in mindestens einer Eigenschaft von mindestens einem Markierungsrest gebunden an die Sonde messen kann. Ein wichtiges Merkmal der Sonden zur Verwendung in dieser Erfindung ist, dass sie nicht in die offene Konformation shiften wenn sie unspezifisch gebunden sind.

[0032] Sonden zur Verwendung in dieser Erfindung haben eine messbare Eigenschaft, welche wir manchmal mit ein "Signal" bezeichnen, das sich unterscheidet, abhängig davon, ob die Sonden offen oder geschlossen sind. Die messbare Eigenschaft ist eine Funktion der Wechselwirkung der Markierungsreste, und der Grad der Wechselwirkung zwischen den Resten variiert als eine Funktion ihrer Trennung. Wie angegeben haben einheitliche Proben zur Verwendung in dieser Erfindung eine geschlossene Konformation und eine offene Konformation. Die Markierungsreste sind in der offenen Konformation mehr als in der geschlossenen Konformation getrennt, und dieser Unterschied ist ausreichend, um eine detektierbare Änderung in mindestens einer messbaren Eigenschaft zu produzieren. In der geschlossenen Konformation sind die Markierungsreste "in Nachbarschaft" zueinander, das heißt, sie sind ausreichend nahe, um zu Wechselwirken, sodass sich die messbare Eigenschaft in detektierbarer Menge, Qualität oder Level von der offenen Konformation, wenn sie nicht derart Wechselwirken, unterscheidet. Es ist natürlich erstrebenswert, dass die Differenz so groß wie möglich ist. In manchen Fällen ist es wünschenswert, dass in dem "aus"-Zustand die messbare Eigenschaft ein Signal so nah wie möglich bei null ist.

[0033] Die messbare Eigenschaft kann ein charak-

teristisches Lichtsignal sein, das vom Stimulieren von mindestens einem Mitglied eines Fluoreszenzresonanzengergietransfer (FRET)-Paars herrührt. Es kann eine Farbänderung sein, die aus der Aktion eines Enzym/Supressor-Paars oder eines Enzym/Co-Faktor-Paars auf einem Substrat herrührt, um ein detektierbares Produkt zu bilden. In all diesen Fällen können wir sagen, dass die Sonden ein charakteristisches Signal haben, dessen Level davon abhängt, ob die Markierungsreste benachbart sind aufgrund dessen, dass die Sonden sich in der geschlossenen Position befinden oder getrennt sind aufgrund dessen, dass die Sonden sich in der offenen Position befinden.

[0034] Wie angegeben, kann ein detektierbares Signal durch die Sonde entweder in der offenen oder geschlossenen Konformation generiert werden. Die Wahl der Markierungsreste bestimmt in welchem Stadium ein Signal generiert wird oder dass verschiedene Signale in jedem Stadium generiert werden.

[0035] Interaktive Markierungsreste sind ein Fluophor/Quencher-Paar, das kovalent an die Sonde, an Arm-Teile konjugiert ist, die nicht komplementär zum Target sind. Sonden generieren daher ein positives Fluoreszenzsignal einer bestimmten Wellenlänge, wenn sie an das Target im offenen Zustand gebunden sind und mit einer geeigneten Lichtquelle stimuliert werden. Wenn bezugnehmend auf diese Sonden sprechen wir von dieser Konformation auch von dem "an"-Zustand.

[0036] Ebenfalls geeignet für diese Erfindung sind "allgemeine Stämme" und Kits. Ein allgemeiner Stamm kann verwendet werden, um Sonden zur Verwendung mit der Erfindung herzustellen zur Detektion von einer oder einer anderen Targetsequenz durch ligieren oder auf andere Weise kovalentes Binden eines Oligonukleotids oder von Oligonukleotiden, die eine Sequenz komplementär zu der gewünschten Targetsequenz enthalten, an den allgmeinen Stamm.

[0037] Die Erfindung umfasst ferner Assayverfahren, die mindestens eine einheitliche Sonde gemäß der Erfindung nutzen. Assays der Erfindung können verwendet werden für Targets die einzelsträngig oder doppelsträngig sind. Jedoch für Assays, die einen Schritt oder Schritte beeinhalten, die das Affinitätspaar in einer Target-unabhängigen Weise trennen können, sind nur unimolekulare Sonden geeignet. Assays gemäß der Erfindung können in vitro oder in vivo durchgeführt werden. Die Assays können in situ in lebenden oder fixiertem Gewebe ohne Zerstörung des Gewebes durchgeführt werden. Bevorzugte Assays der Erfindung benötigen keine Trennung oder Waschen um nicht-gebundene Sonden zu entfernen, obwohl Waschen die Leistung verstärken kann. Unsere stärksten bevorzugten Assays sind homogene Assays.

[0038] Assays gemäß der Erfindung umfassen mindestens das Zugeben von mindestens einer einheitlichen Sonde gemäß der Erfindung zu einer Probe, die mutmaßlich Nukleinsäurestränge enthält, die eine Targetsequenz enthalten, unter für die Sonde geeigneten Assaybedingungen, und Ermessen, ob oder ob nicht eine Änderung in der messbaren Eigenschaft der Sonde vorliegt, verglichen mit der Eigenschaft unter den gleichen Bedingungen in Abwesenheit der Targetsequenz. Die Assays können qualitativ oder quantitativ sein. In machen Ausführungsformen kann es gewünscht sein, eine Kontrolle laufen zu lassen, die kein Target enthält und die Antwort der Probe mit der Antwort der Kontrolle zu vergleichen. Das Signallevel kann für quantitative Bestimmungen gemessen werden. Eine Änderung kann einfach für qualitative Assays detektiert werden. Wenn eine Kontrolle verwendet wird, kann die Differenz in der Singaländerung zwischen der Probe und der Kontrolle berechnet werden.

[0039] Assays gemäß der vorliegenden Erfindung können das Inkontaktbringen von mindestens einer unimolekularen Sonde der Erfindung mit Amplifikation oder anderen Nukleinsäure-Synthesereaktionen einschließen, zum Beispiel: Polymerasekettenreaktionen, PCR, (Erlich et al., 1991); Q-beta Replikase-vermittelte Amplifikationsreaktionen, (Lomeli et al., 1989); Strangverdrängungsamplifikationsreaktionen, SDA, (Walker et al., 1992); self-sustained Sequenzreaktionen, 3SR, (Guatelli et al., 1990); und Transkription- und Replikationsreaktionen.

[0040] Bimolekulare Sonden, wie oben erwähnt, sind nicht zur Verwendung in jeder Reaktion geeignet, z. B. PCR, in der das Affinitätspaar in einer Target-unabhängigen Weise getrennt würde; aber sie können in anderen Reaktionen verwendet werden, z. B. Transkription. In jeder solcher Reaktion bevorzugen wir jedoch unimolekulare Sonden. Diese Assays können qualitativ oder quantitativ sein. Sie können synthetisierte Targets im Echtzeitmodus detektieren. Selbstverständlich können entweder unimolekulare oder bimolekulare Sonden zur Verwendung in der Erfindung in Assays von vervollständigten Reaktionen verwendet werden.

[0041] Die Erfindung stellt ebenfalls Mittel zum lokalisieren und isolieren amplifizierter Targets bereit. Zum Beispiel, unter Verwendung einer bevorzugten Sonde, die ein Fluorophor/Quencher-Markierungspaar umfasst, können PCR-Produkte identifiziert, quantifiziert und gegebenenfalls nach Elektrophorese in einem Gel isoliert werden, durch Stimulieren der hybridisierten Sonde in dem Gel, wobei jedes resultierende Signal die Anwesenheit, Menge und Lokalisierung des Targets anzeigt. In ähnlicher Weise stellt die Erfindung ein Mittel zum Identifizieren und gege-

benenfalls Isolieren jeder gewünschten Nukleinsäure aus einem Gemisch von Nukleinsäuren bereit, das über physikalische Methoden, wie über Chromatographie oder Elektrophorese getrennt ist.

[0042] Kits von Reagenzien und Makromolekülen mm Ausführen der Assays gemäß der Erfindung können ebenfalls verwendet werden.

[0043] In dieser Beschreibung beziehen wir uns manchmal auf "Probe", "Target", "Oligonukleotid", "Nukleinsäure", "Strang" und andere ähnliche Bezeichnungen im Singular. Der Fachmann wird verstehen, dass viele Begriffe, die verwendet werden, um Moleküle zu beschreiben im Singular benutzt werden können und sowohl das Einzelmolekül, als auch eine Vielzahl betreffen. Zum Beispiel, obwohl eine Targetsequenz über eine Sonde in einem Assay detektiert werden kann (und tatsächlich jede individuelle Sonde mit einer individuellen Targetsequenz wechselwirkt), benötigen die Assays viele Kopien an Sonde und viele Kopien an Target. Unter solchen Umständen sind die Begriffe im Kontext zu verstehen. Solche Begriffe sind nicht zu beschränken, dass sie entweder ein einzelnes Molekül oder mehrere Moleküle meinen.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0044] Fig. 1 ist eine schematische Darstellung einer bevorzugten bimolekularen Sonde gemäß der Erfindung in der "geschlossenen" Konformation.

[0045] Fig. 2 ist eine schematische Darstellung einer Sonde aus Fig. 1 in der "offenen" Konformation.

[0046] Fig. 3 ist eine schematische Darstellung der Sonde aus Beispiel I, unsere am stärksten bevorzugte unimolekulare Sonde.

[0047] Fig. 4 ist eine schematische Darstellung der Verwendung eines allgemeinen Stamms wie in Beispiel II.

[0048] Fig. 5 ist eine schematische Darstellung der unimolekularen Sonde aus Beispiel III.

[0049] Fig. 6 zeigt die thermische Denaturierungskurven der Sonden von den Beispielen I und III.

[0050] Fig. 7 ist eine Fotographie, die die Ergebnisse aus Beispiel V darstellt.

[0051] Fig. 8 ist ein Graph der Hybridisierungskinetiken der Sonden von Beispiel V.

[0052] Fig. 9 ist eine schematische Darstellung einer unimolekularen Sonde mit Haarnadelsequenzen in den Armen, gebunden an eine Targetsequenz.

[0053] Fig. 10 ist eine schematische Darstellung einer gebundenen unimolekularen Sonde gemäß der Erfindung.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0054] Hybridisierungssonden zur Verwendung in der Erfindung können hergestellt werden von DNA, RNA oder eine Kombination der beiden. Die Sonden können modifizierte Nukleotide einschließen. Die Verbindungen zwischen Nukleosiden in den Sonden können andere als Phosphodiesther-Bindungen einschließen. Fig. 1 zeigt schematisch eine bimolekulare Version der einheitlichen Sonde **1**. Sonde **1** enthält eine einzelsträngige Target-komplementäre Sequenz **2** mit einem 5'-Terminus und einem 3'-Terminus, die in der bimolekularen Sonde **1** Sequenz **2a** und Sequenz **2b** einschließt, die zusammen komplementär zu einer vorausgewählten Targetsequenz sind, enthalten innerhalb eines Nukleinsäure-Targetstrangs. Sonde **1** kann betrachtet werden als ein Einzelstrang, die unimolekulare Version, bei der eine einzige Target-komplementäre Sequenz **2** an ungefähr ihrem Mittelpunkt getrennt ist. Der Einfachheit halber beschreibt die folgende Beschreibung Sonde **1** als derart betrachtet, das heißt als die unimolekulare Version. Die Beschreibung ist daher sowohl auf die bimolekulare als auch unimolekulare Version anwendbar.

[0055] Erweiternd von Sequenz **2** und daran gebunden ist ein Affinitätspaar, hierin dargestellt als Oligonukleotidarme **3**, **4**. Das Affinitätspaar wechselwirkt reversibel ausreichend stark, um die Sonde unter Detektionsbedingungen in Abwesenheit der Targetsequenz in dem geschlossenen Zustand zu halten, aber ausreichend schwach, dass die Hybridisierung der Target-komplementären Sequenz und ihrer Targetsequenz thermodynamisch favorisiert ist gegenüber der Wechselwirkung des Affinitätspaars. Diese Balance erlaubt es der Sonde einen Konformationswechsel vom geschlossenen Zustand in den offenen Zustand zu durchlaufen. Zusätzlich sollte das Affinitätspaar sich nur trennen, wenn die Sonde an das Target bindet und nicht wenn die Sonde unspezifisch gebunden ist.

[0056] Bezug nehmend auf Fig. 1, sind Arme **3**, **4** derart ausgewählt, dass unter vorausgewählten Assaybedingungen, einschließlich einer Detektionstemperatur, sie aneinander hybridisieren, Stammduplex **5** bilden, welchen wir manchmal als einen Arm-Stamm bezeichnen. In Abwesenheit des Targets ist die Assoziierung der Arme **3**,**4** thermodynamisch favorisiert und hält Stammduplex **5** aufrecht, was die Sonde **1** in der in Fig. 1 gezeigten geschlossenen Konformation hält. In Fig. 2 ist die Target-komplementäre Sequenz **2** (umfassend Sequenzen **2a** und **2b**) an die Targetsequenz **8** der Targetnukleinsäure **9** hybridisiert. Diese Hybridisierung bildet eine relativ starre Doppelhelix geeigneter Länge. Für die bimole-

kulare Version gezeigt in Fig. 2, ist es eine bruchstückhafte Helix. Für Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist die Bildung einer Helix über Wechselwirkung der Target-komplementären Sequenz und der Targetsequenz thermodynamisch unter Assaybedingungen bei der Detektionstemperatur favorisiert und treibt die Trennung der Arme **3**, **4** an, was zur Auflösung des Stammduplex **5** und der Aufrechterhaltung der offenen Konformation, dargestellt in Fig. 2, führt. Arm-Bereiche **3** und **4** Wechselwirken nicht miteinander um den Stammduplex zu bilden, wenn die Target-komplementäre Sequenz **2** an die Targetsequenz **8** hybridisiert ist. Da die Wechselwirkung der Target-komplemenären Sequenz **2** mit der Targetsequenz **8** die Trennung der Arme **3** und **4** antreibt, bezeichnen wir diesen Mechanismus manchmal als eine "Antriebsfeder". Der Shift von der geschlossenen Konformation zu der offenen Konformation, der stattfindet wenn die Target-komplementäre Sequenz an die Targetsequenz hybridisiert, kann trotz der Anwesenheit eines Bruchteils oder der Anwesenheit von einer oder mehreren Nukleotid-Fehlpaarung(en) stattfinden. Wichtig ist, dass die unspezifische Bindung der Sonde nicht die Assoziation der Arme in dieser Art übertrifft. Dieses Merkmal führt zu sehr geringem Hintergrundsignal von ungeeigneterweise "geöffneten" Sonden.

[0057] Arme **3**, **4** sind derart gewählt, dass Stammduplex **5** (Fig. 1) ein kleineres Hybrid darstellt als das Hybrid aus Target-komplementärer Sequenz **2** und Targetsequenz **8** (Fig. 2). In der bimolekularen Version sollte Stammduplex **5** kleiner sein als jeder Teil der bruchteilhaften Helix der **2a** oder **2b** einschließt. Wenn dieser Limitierung genügt wird, sagen wir, dass jede von **2a** und **2b** "ungefähr die Hälfte" der Target-komplementären Sequenz **2** enthält.

[0058] Eine einheitliche Sonde zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung hat eine messbare Eigenschaft, die wir manchmal ein charakteristisches Signal oder einfach das Signal nennen, aufgrund des Markierungspaars. Sonde **1** enthält Markierungsreste **6**, **7**, konjugiert an und bildend einen Teil bildend von Sonde **1** an den 5'- beziehungsweise 3'-Termini des Stammduplex **5**. Markierungsreste **6**, **7** sind derart platziert, dass ihre Nähe und somit ihre Wechselwirkung miteinander verändert wird durch die Wechselwirkung der Arme **3**, **4**. Markierungsreste **6**, **7** können auch woanders an Arme **3**, **4** oder an Sequenz **2** nahe ihrer Verbindung mit dem Stamm **5**, d. h. nahe den Armen **3**, **4** konjugiert werden. Manche Markierungsreste werden zu einem detektierbar höheren Grad Wechselwirken, wenn sie intern entlang der Arme konjugiert sind. Dies ist weil sie nicht durch das Auflösen der Termini betroffen sind.

[0059] Mehr als ein Paar von Markierungsresten kann verwendet werden. Außerdem gibt es keine Notwendigkeit für eine molekulare eins-zu-eins-Übereinstimmung zwischen Mitgliedern eines Markierungspaars, insbesondere wo ein Mitglied mehr als ein Molekül des anderen Mitglieds beeinflussen oder dadurch beeinflusst werden kann. Markierungsreste, die geeignet sind zur Verwendung in Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung Wechselwirken der Art, dass mindestens ein Rest mindestens eine physikalisch messbare Eigenschaft eines anderen Markierungsrestes in einer von der Nähe abhängigen Art und Weise verändern kann. Das charakteristische Signal des Markierungspaars ist detektierbar verschieden, abhängig davon, ob die Sonde in der offenen Konformation oder in der geschlossenen Konformation vorliegt.

[0060] Zum Beispiel, Bezug nehmend auf Fig. 1 und Fig. 2, sind die bevorzugten Markierungsreste ein FREI-Paar, am meisten bevorzugt Flurophor **7** und Quencher **6**. In dieser Ausführungsform ist das charakteristische Signal Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge. Wenn Sonde **1** im geschlossenen Zustand vorliegt (Fig. 1) quencht Markierungsrest **6** die Fluoreszenz von Rest **7**. Wenn Rest **7** durch eine geeignete Lichtfrequenz stimuliert wird, wird ein Fluoreszenzsignal von der Sonde auf einem ersten Level generiert, welches Null sein kann. Die Sonde **1** ist "aus." Wenn Sonde **1** in dem offenen Zustand vorliegt (Fig. 2), ist Markierungsrest **6** ausreichend getrennt von Markierungsrest **7**, sodass ein Fluoreszenzresonanzenergietransfer zwischen ihnen im wesentlichen wenn nicht vollständig ausgeschlossen ist. Markierungsrest **6** ist daher nicht in der Lage, effektiv die Fluoreszenz von Markierungsrest **7** zu quenchen. Wenn Rest **7** stimuliert wird, wird ein Fluoreszenzsignal eines zweiten Levels, höher als das erste, generiert. Sonde **1** ist "an". Die Differenz zwischen den beiden Leveln an Fluoreszenz ist detektierbar und messbar. Unter Verwendung der fluoreszierenden und Quentcher-Reste in dieser Weise, ist die Sonde nur in der "offenen" Konformation "an" und zeigt durch Ausstrahlen eins leicht detektierbaren Signals an, dass die Sonde an das Target gebunden ist. Der Konformationszustand der Sonde ändert das Signal, welches von der Sonde generiert wird, durch Regulieren der Wechselwirkung zwischen den Markierungsresten.

[0061] Die Längen der Target-komplementären Sequenzen und Armsequenzen werden hinsichtlich des geeigneten thermodynamischen Funktionierens der Sonde unter den Bedingungen des geplanten Hybridisierungsansatzes gewählt. Der Fachmann für Hybridisierungsassays wird verstehen, dass angemessene Bedingungen Sonde, Target und Substanzkonzentrationen, Detektionstemperatur, die Anwesenheit von Denaturierungsmitteln und Volumenausschließer, und andere die Hybridisierung beeinflussende Faktoren einschließen. Die Länge einer Target-komplementären Sequenz kann sich von 10 Nukleotiden bis ungefähr 140 Nuldeotiden erstrecken. Für bimole-

kulare Ausführungsformen sollte jeder Teil der Target-komplementären Sequenz eine Länge von mindestens 10 Nukleotiden aufweisen. Das untere Limit wird durch die Mindestdistanz festgelegt, bei welcher keine detektierbare Differenz in der messbaren Eigenschaft (oder dem charakteristischen Signal) vorliegt, welches hervorgerufen wird durch die Wechselwirkung zwischen den Markierungsresten, die verwendet werden, wenn die Sonde geschlossen ist, von wenn die Sonde geöffnet ist. Daher hängt die Mindestlänge der Target-komplementären Sequenz **2** für eine bestimmte Sonde von der Identität des Markierungspaars und seiner Konjugation an die Sonde ab. Unsere am meisten bevorzugten Markierungsreste sind der fluoreszierende Rest 5-[(2-Aminoethyl)amino]naphthalen-1-sulfonsäure (EDANS) und der quenchende Rest 4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoesäure (DABCYL). Für EDANS und DABCYL wird das Quenching im Wesentlichen eliminiert durch eine Trennung von 60 Ångström, was einer Länge von ungefähr 20 Nukleotidpaaren in einer doppelhelikalen Nukleinsäure entspricht. Daher sollte in der bevorzugten Ausführungsform von Fig. 1 und Fig. 2 die Target-komplementäre Sequenz **2**, umfassend **2a** und **2b**, mindestens 20 Nukleotide lang sein. Das Verkürzen von Sequenz **2** wird zunehmend das Signal von hybridisierten Sonden schwächen und dabei die Differenz im Signallevel zwischen offenen und geschlossenen Sonden verringern.

[0062] Die maximale Länge der Sonde ist weniger streng und wird festgelegt durch die bekannte Flexibilität von doppelhelikalen Nukleinsäuremolekülen (Shore et al., 1981). Aufgrund der Flexibilität in dem Sonden-Target-Hybrid ist es für die Enden von doppelhelikalen Nukleinsäuremolekülen möglich, sich zu berühren, im Falle, dass die Länge der Sonden-Target-Doppelhelix ungefähr 140 Nukleotidpaare überschreitet. Wie für den Fachmann naheliegend sein wird, kann dieser Abstand variieren, abhängig von den Nukleinsäuren in der Doppelhelix (DNA:DNA, DNA:RNA oder RNA:RNA) und des Typs der gebildeten Doppelhelix (A-Form, B-Form, Z-Form, etc.). Zum Beispiel kann es zu unerwünschtem Quenching in der offenen Konformation kommen, im Falle, dass die Target-komplementäre Sequenz **2** (Fig. 1) länger als ungefähr 140 Nukleotide ist und ein Target bindet, um eine A-Form DNA:RNA-Doppelhelix zu bilden. Gelegentliches Quenching, obwohl es nicht vollständig die Fähigkeit einer Sonde zerstört, ein detektierbares Signal zu generieren, tendiert dazu, die Sondenleistung zu degradieren. Unerwünschtes Quenching kann reduziert werden durch Konjugieren des Markierungspaars an eine andere Stelle als die Termini der Arme.

[0063] Die maximale Länge einer Target-komplementären Sequenz ist beschränkt durch das funktionelle Erfordernis, dass eine Sonde eine thermodynamisch favorisierte offene Konformation einnimmt, wenn sie an das Target gebunden ist. Übermäßig lange Target-komplementäre Sequenzen bilden Sonden-Target-Doppelhelices mit ausreichender Flexibilität, dass sowohl die Sonden-Target-Helix als auch die Arm-Stamm-Helix in demselben Komplex vorhanden sein kann. Die Sonde würde dann in dem geschlossenen Zustand verbleiben. Daher muss die maximale Länge der Target-komplementären Sequenz kurz genug sein und die resultierende Sonden-Target-Helix daher starr genug, dass die Sonde eine offene Konformation einnimmt, wenn sie an das Target gebunden ist. Aus den oben genannten Gründen sollte die maximale Länge der Target-komplementären Sequenz in jedem Fall nicht ungefähr 140 Nukleotide überschreiten, womit wir meinen, innerhalb von 10 Prozent dieser Zahl, abhängig von den oben diskutierten Faktoren.

[0064] Beim Entwerfen der Sonden zur Verwendung der vorliegenden Erfindung sollte der helikalen Natur doppelsträngiger DNA Beachtung geschenkt werden. Wenn eine unimolekulare Sonde in der offenen Konformation vorliegt, ist die maximale Trennung der Markierungsreste erreicht, wenn die Reste auf gegenüberliegenden Seiten der Sonden-Target-Doppelhelix lokalisiert sind. Zum Beispiel, wenn die Markierungsreste an die 5'- und 3'-Termini des Stammduplex distal zu der Target-komplementären Sequenzverbindung konjugiert sind und eine B-Form-Doppelhelix aus Target-komplementärer Sequenz und Target-Sequenz erwartet wird, wird die Wahl einer 16-, 26-, 37-, 47-, 58-, 68- oder 79-Nukleotid-langen Target-komplementären Sequenz die maximale Trennung erreichen, durch Orientierung der Markierungsreste in einer Transkonfiguration auf gegenüberliegenden Seiten der Doppelhelix wie Markierungsreste **6**, **7**, dargestellt in Fig. 2. In diesem Größenbereich bevorzugen wir Target-komplementäre Sequenzen, die innerhalb von 1 bis 3 Nukleotiden dieser Längen liegen. Wir bevorzugen eine Target-komplementäre Sequenz mit einer Länge im Bereich von 20 bis 60 Nukleotiden. Die Target-Komplementäre Sequenz unserer bis heute hergestellten am stärksten bevorzugten Ausführungsform, umfasst 35 Nukleotide.

[0065] Die Armsequenzen sollten von einer ausreichenden Länge sein, so dass unter den Bedingungen des Assays und bei der Detektionstemperatur, wenn die Sonde nicht an ein Target gebunden ist, die Arme assoziiert sind und die Markierungsreste in enger Nachbarschaft zueinander gehalten werden. Abhängig von den verwendeten Assaybedingungen können 3–25 Nukleotid-Armlängen diese Funktion erfüllen. Oft ist ein Zwischenbereich von 6–15 Nukleotiden geeignet. Die tatsächliche Länge wird hinsichtlich der Target-komplementären Sequenz gewählt, derart, dass die Sonde in Abwesenheit des Targets in der geschlossenen Konformation verbleibt und eine offene Konformation einnimmt, wenn sie an das Target gebunden ist. Mit der Zunahme der Größe der Tar-

get-komplementären Sequenz bis zu 100 Nukleotiden kann die Armlänge bis zu 15–25 Nukleotiden zunehmen. Oberhalb einer 100 Nukleotid-langen Target-komplementären Sequenz wird die Armlänge nicht weiter erhöht.

[0066] Das obere Limit der Länge der Arme wird beherrscht von zwei Kriterien, bezogen auf die Thermodynamik von erfindungsgemäßen Sonden. Erstens bevorzugen wir, dass die Schmelztemperatur des Armstamms unter Assaybedingungen höher sei als die Detektionstemperatur des Assays. Wir bevorzugen Stämme mit Schmelztemperaturen von mindestens 5°C höher als die Assaytemperatur und, stärker bevorzugt, mindestens 10°C höher.

[0067] Zweitens sollte die Energie, die durch die Bildung des Stamms freigesetzt wird, geringer sein als die Energie, die freigesetzt wird bei der Bildung des Hybrids aus Target-komplementärer Sequenz und Targetsequenz, so dass Target-vermitteltes Öffnen der Sonde thermodynamisch favorisiert ist.

[0068] Daher ist die Schmelztemperatur des Hybrids aus Target-komplementärer Sequenz und Targetsequenz höher als die Schmelztemperatur des Stamms. Daher sollten die Armsequenzen kürzer als die Target-komplementäre Sequenz sein. Für bimolekulare Ausführungsformen, wie bereits erwähnt, sollten die Armsequenzen kürzer als jeder Teil der Target-komplementären Sequenz sein.

[0069] Daher muss die Schmelztemperatur des Armstamms oberhalb der Assaytemperatur liegen, so dass die Sonde nicht öffnet, bevor die Target-komplementäre Sequenz an ein Target hybdidisiert, und dennoch ausreichend unterhalb der Schmelztemperatur des Hybrids, vollständig oder bruchstückhaft, aus Target-komplementärer Sequenz und der Targetsequenz, um das korrekte Funktionieren der Sonde und dabei die Generierung eines detektierbaren Signals sicherzustellen. Wir bevorzugen, dass die Schmelztemperatur des Armstamms mindestens 5°C, stärker bevorzugt mindestens 10°C oberhalb der Assaytemperatur und mindestens ungefähr 20°C unterhalb der Schmelztemperatur des Hybrids aus Target-komplementärer Sequenz und der Targetsequenz liegt.

[0070] Ein Fachmann wird erkennen, dass diese Parameter innerhalb der Bedingungen des Hybridisierungsassays variieren und dass diese Bedingungen beim Entwerfen der Nukleinsäuresequenz von Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung berücksichtigt werden müssen. Anders gesagt, muss die Sonde so konstruiert werden, dass sie wie oben beschrieben unter den Bedingungen des Assays, in dem sie zu verwenden ist funktioniert, um eine Sonde zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung darzustellen. Eine bestimmte Konstruktion kann eine Sonde zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung sein indem ein Satz von Assaybedingungen, aber nicht bei einem anderen Satz von Assaybedingungen. Die Länge der Arme und ihr Guanosin-Cytidin-Gehalt beeinflussen die Schmelztemperatur eines Stammduplexes. Für eine gewünschte Schmelztemperatur, unter bestimmten Assaybedingungen kann eine Länge und ein Guanosin-Cytidin-Gehalt der Arme leicht vom Fachmann berechnet werden. Die Schmelztemperatur des Duplexstamms einer Sonde kann für gegebene Assaybedingungen empirisch bestimmt werden unter Verwendung der unten in Beispiel IV beschriebenen Verfahren.

[0071] Wir sehen diese Parameter als Entwurfserwägungen an, die als Richtlinien hilfreich sind. Da das Verhalten von Sonden in komplexen Lösungen nicht immer mit Sicherheit vorhergesagt werden kann, ist empirisches Testen sehr hilfreich für das Maßschneidern von Sonden zur Verwendung in der Erfindung, um optimal unter bestimmten Assaybedingungen zu funktionieren, das heißt, die Differenz zwischen dem Aus- gegenüber dem An-Signal zu maximieren und, falls gewünscht, das Aus-Signal-Level zu minimieren.

[0072] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen bildet die Sequenz jedes Arms eine interne Sekundärstruktur wie beispielsweise einen Haarnadel-Stamm, wenn die Sonde offen ist. Eine einheitliche Sonde **90** dieses Entwurfs ist in Fig. 9 dargestellt. Sonde **90** ist unimolekular, aber dieses Entwurfsmerkmal trifft auch auf bimolekulare Sonden zu. Wenn einmal die Target-komplementäre Sequenz **91** an die Targetsequenz **92** von Target **93** gebunden und eine Sonden-Target-Helix gebildet hat, werden Arme **94**, **95** getrennt und ein Signal wird durch die Trennung von Markierungsresten **96**, **97** generiert. Die in Fig. 9 dargestellte offene Konformation wird stabilisiert, da die offenen Arme **94**, **95** auf sich selbst zurückfalten, um Haarnadeln **98**, **99** zu bilden. Die Haarnadeln sind zusammengesetzt aus benachbarten komplementären Sequenzen, die einen Stamm bilden, der mindestens 3 Nukleotidpaare lang ist. Dies stabilisiert die offene Konformation, da zusätzliche Energie freigesetzt wird, wenn jeder getrennte Arm **94**, **95** eine interne Haarnadelstruktur bildet. Zusätzlich sind Arme, die diese Haarnadelstrukturen enthalten, effektiv verkürzt und es ist daher weniger wahrscheinlich, dass sie miteinander reagieren. Mit diesem Merkmal kann es möglich sein, Arme innerhalb des 10–25-Nukleotid-Bereichs zu verwenden, die relativ länger sind als für Arme ohne dieses Merkmal geeignet wäre, um die Markierungsreste in der geschlossenen Konformation enger zusammenzuhalten. Konsequenterweise können Sonden mit diesem Merkmal ein schärferes Signal aufweisen aufgrund eines geringeren Levels an Hintergrund in der geschlossenen Konformation.

[0073] Ein anderes Mittel zum Stabilisieren der offenen Konformation ist, dass eine oder beide Armsequenzen zumindest teilweise komplementär zu Sequenzen sind, die benachbart zur Targetsequenz sind. Komplementäre Sequenzen können innerhalb eines Armes an Stellen proximal oder distal zu der Verbindung von Arm- und Target-komplementärer Sequenz platziert werden. Ferner kann eine Armsequenz vollständig komplementär zu zum Target benachbarten Sequenzen sein, ohne dem Entwurf einer Sonde, maßgeschneidert auf ein spezifisches Target, eine unzumutbare Einschränkung aufzuerlegen. Dieses Merkmal erhöht die thermodynamische Stabilität der offenen Konformation. Wir merken an, dass obwohl Teile der Arme komplementär zum Target sein können, die Wechselwirkung der Target-komplementären Sequenz mit der Targetsequenz ausreichend sein muss, um die Sonde in die offene Konformation zu shiften. Dieses Entwurfsmerkmal trifft sowohl auf unimolekulare Ausführungsformen als auch auf bimolekulare Ausführungsformen zu.

[0074] Fig. 1–Fig. 5 zeigen unser bevorzugtes Markierungspaar als einen lumineszierenden Rest (**7**, **37**, **46**, **55**) und einen quenchenden Rest (**6**, **38**, **45**, **56**). Jegliches Markierungspaar kann verwendet werden um ein Signal zu generieren, wo ein Mitglied des Paars im Falle enger Nähe detektierbar mindestens eine physikalisch messbare Eigenschaft des anderen ändern kann, jedoch in einem verschiedenen Ausmaß, wenn es entfernt liegt. Alternativ können beide Mitglieder detektierbar eine solche Eigenschaft von einem Mitglied im Falle enger Nähe verändern, jedoch verschieden, wenn sie entfernt liegen. Zusätzlich ist es notwendig, dass die Markierungsreste an die Sonde konjugierbar sind.

[0075] Lumineszierende Markierungsreste, die mit geeigneten Quenchingresten zu paaren sind, können ausgewählt werden aus jeder der folgenden bekannten Kategorien: eine fluoreszierende Markierung, eine radiolumineszierende Markierung, eine chemilumineszierende Markierung, eine bioluminesziernde Markierung und eine elektrochemilumineszierende Markierung. Die Verwendung von mehreren Quenchingresten mit einem einzigen lumineszierenden Rest wird das Quenching erhöhen. In diesem Fall umfasst ein Markierungspaar einen fluoreszierenden Rest "gepaart" mit mehreren Quenchingresten. Andere nützliche Markierungspaare schließen ein Reporterenzym und einen geeigneten Inhibitor ein.

[0076] Obwohl nicht bevorzugt, kann ein geeignetes Markierungspaar ein Signal in der geschlossenen Konformation generieren und in der offenen Konformation inaktiv sein. Beispiele für solche Paare sind ein Enzym und sein Cofaktor und Fragmente oder Untereinheiten von Enzymen, die nahe beieinander sein müssen, damit das Enzym aktiv ist. In Ausführungsformen dieser Art entspricht die geschlossene Formation dem "An"-Zustand.

[0077] Unsere bevorzugten Markierungen sind derart ausgewählt, dass Fluoreszenzresonanzenergietransfer die Art der Wechselwirkung zwischen den zwei Markierungen ist. In solchen Fällen können die messbaren physikalischen Eigenschaften der Markierungen eine Abnahme in der Lebensdauer des angeregten Zustands eines Markers, ein vollständiges oder teilweises Quenching der Fluoreszenz eines Markers, eine Verstärkung der Fluoreszenz eines Markers oder eine Depolarisation der Fluoreszenz eines Markers sein. Die Marker können mit einem engen Wellenlängenbereich an Strahlung oder einem breiten Wellenlängenbereich an Strahlung angeregt werden. In ähnlicher Weise kann die emittierte Strahlung in einem nahen oder breiten Bereich von Wellenlängen aufgezeichnet werden, entweder mit der Hilfe eines Instruments oder durch direkte visuelle Beobachtung. Beispiele solcher Paare sind Fluoreszein/Sulforhodamin **101**, Fluoreszein/Pyrenbutanoat, Fluoreszein/Fluoreszein, Acridin/Fluoreszein, Acridin/Sulforhodamin **101**, Fluoreszein/Ethenadenosin, Fluoreszein/Eosin, Fluoreszein/Erythrosin und Anthranilamid-3-nitrotyrosin/Fluoreszein. Andere derartige Markierungspaare sind für den Fachmann offensichtlich.

[0078] Unsere genauer in den Beispielen beschriebenen am stärksten bevorzugten Sonden, sowohl unimolekular als auch bimolekular, erlauben die Detektion der Hybridisierung mit dem bloßen Auge und erfordern lediglich eine einfache ultraviolette Lampe als Anregungsmittel. Diese Sonden erfüllen die folgenden Kriterien: Nur ein Markierungsrest ist fluoreszierend und seine Fluoreszenz ist mit dem bloßen Auge sichtbar; der andere Markierungsrest quencht diese Fluoreszenz extrem effizient; und kein signifikantes Quenching findet bei Distanzen größer als ungefähr zwei Windungen einer Nukleinsäure-Doppelhelix statt. Selbstverständlich können mehrere Kopien einer oder beider Markierungsreste verwendet werden.

[0079] Unser am stärksten bevorzugter Fluoreszenzmarker ist EDANS und unser am stärksten bevorzugter Quenchingrest ist DABCYL. Das Absorptionsspektrum von DABCYL zeigt eine gute Überlappung mit dem Emissionsspektrum von EDANS, was zu einem sehr effektiven Energietransfer führt. Es wurde gezeigt, dass man eine 40-fache Reduktion der Fluoreszenz von EDANS erreichen kann durch seine Bindung an DABCYL über einen Oktapeptid-Spacer, und eine mehr als 200-fache Reduktion der Fluoreszenz durch Binden von EDANS direkt an DABCYL. Es findet ebenfalls kein Quenching der Fluoreszenz von EDANS durch DABCYL bei Distanzen größer als 60 Ångström statt. Schließlich hat DABCYL keine eigene Fluoreszenz (Matayoshi et al., 1990; Wang et al., 1991).

[0080] EDANS und DABCYL werden an die Sonde in den Bereich der Oligonukleotidarme oder eines anderen Affinitätspaars konjugiert. In unseren bis heute am stärksten bevorzugten Sonden, sowohl unimolekular als auch bimolekular, werden EDANS und DABCYL kovalent an die freien 5'- und 3'-Termini der Arme, distal zur Verbindung der Arme mit der Target-komplementären Sequenz, gebunden. Die Positionen von EDANS bzw. DABCYL an den 5'- und 3'-Termini kann selbstverständlich umgedreht werden. Die EDANS- und DABCYL-Reste können überall entlang der terminalen Abschnitte der Sonde konjugiert werden, solange sie in der geschlossenen Konformation der Sonde nahe beieinander sind und in der offenen Konformation ausreichend voneinander getrennt sind.

[0081] Bezug nehmend auf Fig. 1 kann das Anordnen der Markierungsreste entlang des Stammduplex **5** eher als an den freien 5'- und 3'-Termini der Arme die Wechselwirkung zwischen den Markierungsresten erhöhen, wenn die Sonde in der geschlossenen Konformation ist. Es ist wohlbekannt, dass die terminalen Nukleotide einer Doppelhelix sich in einer zufälligen Art und Weise auftrennen und rehybridisieren zu einem Grad, der von der Temperatur abhängt. Daher wird das Platzieren der Reste intern entlang des Stamms zu weniger Trennung der Reste aufgrund des Auftrennens der Termini führen.

[0082] Im Falle des Platzierens der Reste entlang des Stamm-Duplex sollte der helikalen Struktur des Stammduplexes Beachtung geschenkt werden. Die Reste können an Nukleotide, gestaffelt entlang jedes Arms konjugiert werden, so dass, wenn die Arme annealen, die Reste auf derselben Seite der Stammduplex-Helix liegen. Dieses Positionieren wird weiter die Wechselwirkung der Markierungsreste in der geschlossenen Konformation maximieren.

[0083] Wie bereits früher erwähnt, können mehrere Markierungen, z. B. mehrere EDANS- und DABCYL-Reste verwendet werden. Mehrere Markierungen ermöglichen in manchen Fällen Assays mit höherer Sensitivität. Zum Beispiel kann, wenn das Affinitätspaar aus Oligonukleotidarme besteht, eine Vielzahl von Markierungen erreicht werden durch Verteilen etlicher EDANS-Resten auf einem Arm und einer entsprechenden Anzahl von DABCYL-Resten auf dem anderen Arm, so dass jeder EDANS-Rest nahe bei einem DABCYL-Rest sein kann, wenn sich die Arm-Stamm-Helix bildet. Eine Vielzahl kann ebenfalls erreicht werden durch kovalentes Binden von mehreren Markierungen an die Arme in einer Art, die einen Traubenbund darstellt. Es sollte keine Vielzahl von Markierungen verwendet werden mit Markierungsresten, die selbst quenchen. In einer zu bevorzugenden Anwendung kann das Quenching in der geschlossenen Konformation verstärkt werden durch Platzieren eines einzigen EDANS-Restes auf einem Arm und mehrerer DABCYL-Reste auf dem anderen Arm, so dass, wenn die Stammhelix gebildet wird, auf jeden Fall mindestens ein DABCYL-Rest benachbart zu einem EDANS-Rest ist.

[0084] Die Konjugation der Markierungsreste an eine Stelle auf der Sonde muss unter den Bedingungen des Assays stabil sein. Die Konjugation kann kovalent sein, was wir bevorzugen. Beispiele von nicht-kovalenten Konjugationen schließen, ohne Limitierung ein, ionische Bindung, Interkalation, Protein-Ligand-Bindung und hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen. Geeignete stabile Mittel zur Assoziation von Markierungsresten an die Sonden sind für den Fachmann offensichtlich. Die Verwendung des Begriffs "Konjugation" hierin umfasst alle Mittel der Assoziation der Markierungsreste an die Sonde, die unter den verwendeten Bedingungen stabil sind. Wir erachten stabil konjugierte Markierungsreste als innerhalb des Sondenmoleküls eingeschlossen, an welches sie konjugiert sind.

[0085] Manchmal konjugieren wir Markierungsreste an die Sonden durch kovalente Bindung über Spacer, vorzugsweise lineare Alkyl-Spacer. Die Natur des Spacers ist unkritisch. Zum Beispiel können EDANS und DABCYL über wohlbekannte und üblicherweise in dem Fachbereich verwendete sechs Kohlenstoff-lange Alkyl-Spacer, verbunden werden. Die Alkyl-Spacer verleihen den Markierungsresten genug Flexibilität, um miteinander wechselzuwirken für effizienten Fluoreszenzresonanzenergietransfer und konsequenterweise effektives Quenching. Die chemischen Bestandteile von geeigneten Spacern werden vom Fachmann geschätzt. Die Länge eines Kohlenstoffketten-Spacers kann beträchtlich variieren von mindestens 1 bis 15 Kohlenstoffen. Jedoch ist im Falle von mehreren Markierungen, die an einen Arm in einer "Traubenbund"-Konfiguration konjugiert sind, ein mehrfach gegabelter Spacer wünschenswert.

[0086] Hybridisierungssonden und allgemeine Stämme, nützlich in der vorliegenden Erfindung, können Nukleinsäuremoleküle umfassen, die durch üblicherweise bekannte Verfahren wie Festphasensynthese, über Ligation von synthetischen Sequenzen oder Restriktionsfragmenten oder über eine Kombination dieser Techniken zusammengesetzt werden können. Die einfachsten Sonden können zusammengesetzt werden durch Synthese eines einzigen Oligonukleotids, das Armsequenzen umfasst, die die Target-komplementäre Sequenz flankieren. Markierungsreste werden dann an die Termini des Oligonukleotids konjugiert. Eine bimolekulare Sonde kann als zwei separat synthetisierte markierte Oligonukleotide hergestellt werden. Eine bimolekulare Sonde kann in die entsprechende unimolekulare Sonde umgewandelt werden durch Verbinden der Target-komplementären Sequenzteile, wie durch Ligation auf einem Splint. Direkte Synthese ist besonders geeignet

in Fällen, wo dies mit akzeptabler Ausbeute durchgeführt werden kann.

[0087] Eine Verwendung einer Kombination von Synthese und Ligation wird dargestellt durch den Zusammenbau einer unimolekularen DNA-Sonde aus zwei direkt synthetisierten Oligodesoxynukleotiden. Ein Oligonukleotid enthält die Target-komplementäre Sequenz, eine vollständige erste Armsequenz, kovalent gebunden an einen der Markierungsreste, und einen Teil der zweiten Armsequenz. Der Arm und Armteil dieses Oligonukleotids hybridisieren aneinander. Das zweite Oligonukleotid umfasst den restlichen Teil der zweiten Armsequenz, kovalent gebunden an den anderen Markierungsrest. Das zweite Oligonukleotid ist komplementär zu dem unhybridisierten oder der Überhangregion des ersten. Die zwei Oligonukleotide werden aneinander annealt. Schließlich wird die Sonde über Ligation des annealten Komplexes zusammengesetzt.

[0088] Alternativ werden zwei Oligonukleotide synthetisiert, wobei jedes einen wesentlichen Teil, "ungefähr die Hälfte", wie wir diesen Begriff verwenden, der Target-komplementären Sequenz, eine Armsequenz, lokalisiert 5' auf einem der Oligonukleotide und 3' auf dem anderen, sowie geeignete Markierungsreste enthält. Falls eine unimolekulare Sonde gewünscht ist, werden diese zwei Oligonukleotide über ein Splint-Oligonukleotid annealed und ligiert. Die Sonde wird dann von dem Splint über Gelaufreinigung oder andere im Fachbereich bekannte Mittel aufgereinigt. Wenn eine bimolekulare Sonde gewünscht ist, wird die Sonde durch Annealen der zwei Oligonukleotide zusammengesetzt.

[0089] Kits, die einen allgemeinen Stamm und Anleitungen zur Verwendung des allgemeinen Stamms enthalten, können verwendet werden, um Sonden zur Verwendung in der Erfindung herzustellen zur Detektion einer Vielzahl von vorausgewählten Targetsequenzen. Der allgemeine Stamm umfasst Teile von Armbereichen, wobei jeder an ein Mitglied eines Markierungspaars gebunden ist. Zur Verwendung in der Herstellung unimolekularer Sonden kann ein Stamm als eine Einheit geliefert und verwendet werden mit den Armen aneinanderhybridisiert, so dass ein verbindendes Ende des Duplexes, der die reaktiven Gruppen umfasst, gebildet wird. Gegebenenfalls kann das verbindende Ende ein ligierbares stumpfes Ende oder einen Überhang enthalten. Alternativ können andere biochemisch verbindende Agenzien oder chemische Agenzien an den 5'- und 3'-verbindenden Termini des allgemeinen Stamms vorhanden sein. Chemische Ligation kann reaktive Gruppen beinhalten wie beispielsweise Hydroxyl, Phosphat, Sufhydryl, Amino, Alkylphosphat, Alkylamino oder Hydroxyalkyl. Wir bevorzugen kovalent reaktive Gruppen.

[0090] Es ist vorteilhaft, wenn der allgemeine Stamm zu dem Zeitpunkt hybridisiert vorliegt, an dem eine Sonde hergestellt wird, da das automatisch das Binden desselben Armbereichs an beide Enden der Sonde verhindert. Jedoch muss alternativ der allgemeine Stamm nicht während der Sondenherstellung hybridisiert werden, wenn sich gegenseitig ausschließende Anheftungs-Reaktionen für jeden Armbereich verwendet werden. Im letzteren Fall können die Armbereiche für aufeinanderfolgende Reaktionen getrennt gehalten werden, wobei wir jedoch noch immer die Armteile als einen allgemeinen Stamm bezeichnen. Zur Verwendung bei der Herstellung bimolekularer Sonden und zur Verwendung bei der Herstellung unimolekularer Sonden über Ligation von bimolekularen Sonden bevorzugen wir, dass die zwei Stammteile getrennt geliefert und verwendet werden.

[0091] Wir bevorzugen allgemeine Stämme, die Oligonukleotid-Armteile von 5 bis 20 Nukleotiden Länge umfassen. Die Nukleotide der Armteile in einem allgemeinen Stamm gemäß der vorliegenden Erfindung müssen nicht an der Targetsequenzerkennung beteiligt sein und werden dies auch nicht, ausgenommen in speziellen Fällen, wie verständlich ist. Der Stamm muss lediglich am Regulieren des Konformationszustands der einheitlichen Sonde teilnehmen. Unsere bevorzugten allgemeinen Stämme beinhalten FREI-Paare als Markierungsreste, am meisten bevorzugt EDANS und DABCYL, wobei jedes wie unten beschrieben an einen Terminus des Stammduplexes, distal zu dem verbindenden Ende konjugiert ist. Wir haben die beiden allgemeinen Stamm-Oligonukleotide über Festphasensynthese hergestellt. Dennoch können natürliche Sequenzen von geeigneter Länge und Schmelztemperatur ebenfalls zur Verwendung als Stämme angepasst werden.

[0092] Wie der Fachmann erkennen wird, können Stämme, die ein Oligonukleotid besitzen, welches eine Überhangsequenz umfasst, die komplementär zu sich selbst ist, zu unerwünschten Assoziationen zweier Stämme führen. Es wird daher bevorzugt, obwohl nicht erforderlich, die Verwendung von Oligonukleotiden, die solche Dimere bilden, zu vermeiden.

[0093] Die Verwendung eines allgemeinen Stamms kann die Synthese eines Oligonuldeotids beinhalten, das eine Target-komplementäre Sequenz umfasst, welche von den verbleibenden Resten der Armsequenz der endgültigen Sonde flankiert wird. Dieses Oligonukleotid hybridisiert mit sich selbst über die verbleibenden Armteile und schafft dabei einen verbindbaren Terminus. Falls der allgemeine Stamm einen Überhang enthält, sollte das Oligonukleotid einen Überhang haben, der komplementär zu dem Überhang auf dem allgemeinen Stamm ist. Dieses Oligonukleotid wird dann an den allgemeinen Stamm gebunden, vorzugsweise wie oben beschrieben über enzymatische oder chemische Ligation. Der allgemeine Stamm wird dabei in den endgültigen Sonden-

stamm einer unimolekularen Sonde eingebaut.

[0094] Ein allgemeiner Stamm hat einen besonderen Vorteil für einen Forscher, der es wünscht, eine Vielfalt von unimolekularen oder bimolekularen Sonden zu entwerfen. Allgemeine Stämme können Teil eines Kits sein, das einen oder mehrere Stämme und Anleitungen zur Herstellung geeigneter Oligonukleotide mit Target-komplementärer Sequenz, oder geeignete Restriktionsfragmente, sowie anschließendes Verbinden an einen Stamm umfasst. Die Anleitungen sollten die Teile der Armsequenzen beschreiben, die – wenn überhaupt – nötig sind, um die Target-komplementäre Sequenz zu flankieren und wie oben beschrieben den geeigneten verbindbaren Terminus zu bilden. Ein Kit kann mehrere allgemeine Stämme einschließen, die in der Schmelztemperatur und/oder Länge des endgültigen Sondenstamms, der gebildet werden soll, variieren. Ein Kit kann ein gemeinsames Stamm-Oligonuldeotid und verschiedene Versionen von anderen Stamm-Nukleotiden, die in der Länge variieren, umfassen. Daher kann ein Kit Stämme enthalten, die geeignet sind zur Herstellung von Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung mit mehreren Längen von Targetsequenzen oder mit derselben Targetsequenz zur Verwendung unter einer Vielzahl von verschiedenen vorausgewählten Assaybedingungen. Anleitungen in solch einem Kit werden den Verwender zu dem korrekten allgemeinen Stamm führen, für die Verwendung mit einer bestimmten Target-komplementären Sequenz gemäß der Lehren hierin. Kits können gegebenenfalls auch Enzyme und Reagenzien einschließen, so dass der Kit-Verwender leicht die allgemeinen Stämme verwenden kann, um Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zu entwerfen und herzustellen.

[0095] Assays gemäß der vorliegenden Erfindung, die qualitativ oder quantitativ sein können, benötigen kein Waschen, um ungebundene Sonden zu entfernen. Ein Assay gemäß der vorliegenden Erfindung kann daher das Zugeben einer einheitlichen Sonde gemäß der vorliegenden Erfindung zu einer Probe umfassen, von der angenommen wird, dass sie Stränge enthält, die eine Targetsequenz enthalten, und das Ermitteln, ob oder ob nicht unter den Assaybedingungen bei der Detektionstemperatur ein detektierbares Signal auftritt. Homogene Assays werden bevorzugt, obwohl Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung in heterogenen Hybridisierungsassays verwendet werden können. Simultan kann eine Kontrolle ohhne Targetsequenz durchgeführt werden, in welchem Fall die Signalgenerierung der Probe und der Kontrolle verglichen werden können, entweder qualitativ oder quantitativ durch Messen der beiden und Berechnen einer Differenz. Assays der Erfindung beinhalten Echtzeit- und Endpunktdetektion von spezifischen einzelsträngigen oder doppelsträngigen Produkten von Nukleinsäuresynthesereaktionen, wie beispielsweise Transkription, Replikation, Polymerasekettenreaktion (PCR), self-sustained Sequenzreaktion (3SR), Strangverdrängungs-Amplifikationsreaktion (SDA) und Q-beta-Replikase-vermittelte Amplifikationsreaktion. Für Assays, in denen die einheitlichen Sonden Schmelzen oder anderer Denaturierung unterzogen werden, müssen die Sonden unimolekular sein.

[0096] Quantitative Assays können im Fachbereich bekannte quantitative Verfahren verwenden. Ein Endpunkt für eine Probe kann beispielsweise mit Endpunkten einer Verdünnungsserie des Targets verglichen werden. Ebenfalls können Aufzeichnungen über die Zeit aufgenommen werden und verglichen werden mit Aufzeichnungen einer Positiv- oder Negativkontrolle oder beiden oder verglichen werden mit Kurven von einem oder mehreren Mitgliedern einer Verdünnungsserie des Targets.

[0097] Assays gemäß der Erfindung schließen qualitative oder quantitative in situ-Detektion, von Nukleinsäuren in beispielsweise fixierten Geweben ein, ohne Zerstörung des Gewebes. Da ein großer Überschuss an Sonden verwendet werden kann ohne die Notwendigkeit des Waschens und ohne Generierung eines starken Hintergrundsignals, sind die in situ-Assays der vorliegenden Erfindung besonders nützlich. In situ-Hybridisierungsassays gemäß der vorliegenden Erfindung schließen "Chromosomenmalerei" zum Zwecke des Mappings von Chromosomen und zum Detektieren chromosomaler Abnormalitäten ein (Lichter et al., 1990).

[0098] Durch Verwenden mehrerer Sonden, die unterschiedliche, sich nicht-störende detektierbare Signale generieren, z. B. Fluoreszenz bei verschiedenen Wellenlängen oder Fluoreszenz und die Bildung farbiger Produkte, können Assays der vorliegenden Erfindung mehrere Targets in einem einzigen Assay detektieren. Ebenfalls können mehrere Sonden, jede spezifisch für verschiedene Bereiche auf derselben Target-Nukleinsäure, die dennoch dasselbe Markierungspaar aufweisen, verwendet werden, um das Signal zu verstärken. Wenn multiple Sonden für dasselbe Target verwendet werden, sollten sie in der Art an das Target binden, dass benachbarte Sonden sich nicht gegenseitig quenchen.

[0099] Zusätzlich können spezielle Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung entworfen werden, um mehrere Targetsequenzen zu detektieren. Wenn mehrere Target-komplementäre Sequenzen in eine Sonde eingebaut werden, muss der Sondenentwurf derart sein, dass Hybridisierung jeder einzelnen Sequenz an ihr Target die Sonde veranlasst, von der geschlossenen Konformation in die offene Konformation zu shiften.

[0100] Bestimmte bevorzugte Ausführungsformen

von Assays gemäß dieser Erfindung umfassen die Zugabe von Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zu einer Probe und Visualisierung mit bloßem Auge zur Detektion einer spezifischen Target-Nukleinsäuresequenz in einem komplexen Gemisch. Durch Vergleich mit positiven Standards oder den Ergebnissen, die mit positiven Standards erhalten wurden, kann die Visualisierung grob quantitativ sein. In bestimmten Situationen wie solchen, in denen Information über die Größe einer Nukleinsäure gewünscht wird, kann die Nukleinsäure in der Probe erst über nicht-denaturierende Gelelektrophorese fraktioniert werden, und dann kann das Gel selbst direkt untersucht werden. Alternativ kann Hybridisierung mit Restriktionsfragmenten durchgeführt werden, entweder ohne Fraktionierung oder vor Fraktionierung wie in Beispiel VI.

[0101] Daher kann mit dieser Erfindung das Bedürfnis nach oft verwendeten Prozeduren wie beispielsweise Southern und Northern Blotting (Sambrook et al., 1989) beseitigt werden. Dennoch sind Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ebenfalls in solchen heterogenen Assays sehr nützlich. Ein Hauptnachteil dieser Assays, nämlich die Notwendigkeit von extensivem Waschen, um das Hintergrundsignal von Sonden, die nicht an Targets hybridisiert sind, zu reduzieren, wird durch die Verwendung von Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung verbessert.

[0102] Sonden, sowohl unimolekular als auch bimolekular, geben nur in der Target-gebundenen, offenen Konformation ein hohes Level an positivem Signal ab und wenig bis kein Signal in der geschlossenen Konformation. Außerdem nehmen die Sonden nicht die offene Konformation ein, bevor sie ans Target gebunden sind und bleiben geschlossen, wenn sie unspezifisch gebunden sind. Wie oben beschrieben, führt dies zu einem Hintergrundsignal, das nicht existent oder natürlich sehr schwach ist. Daher vereinfacht die Verwendung dieser Sonden enorm die konventionellen heterogenen Assays, da entweder kein Waschen oder nur mildes und wenig stringentes Waschen verwendet wird, um ein Hintergrundsignal, das nach der Hybridisierung vorhanden ist, weiter zu reduzieren. Zusätzlich können konventionelle Hybridisierungen unter im Wesentlichen weniger stringenten Bedingungen durchgeführt werden.

[0103] Sonden zur Verwendung in der Erfindung öffnen sich bei Wechselwirkung mit einer Targetsequenz sehr schnell. Wie der Fachmann für Hybridisierungsassays erkennt, ist die Fähigkeit wechselzuwirken konzentrationsabhängig. Es können Assaybedingungen ausgewählt werden, in denen die Sonden auf das Vorhandensein von Target-Nukleinsäuren ansprechen und sehr schnell ein Signal generieren. Aus diesem Grund schließen Assays gemäß der vorliegenden Erfindung das Echtzeit-Überwachen der Herstellung spezifischer Nukleinsäuren ein. Syntheseprozesse wie beispielsweise Transkription, Replikation oder Amplifikation können überwacht werden durch Einschließen von Sonden in das Reaktionsgemisch und kontinuierliches oder periodisches Messen der Fluoreszenz. Sonden werden in wesentlichem Überschuss verwendet, so dass die vergleichsweise reichlich vorhandenen Sonden ihre Targets in den naszierenden Nukleinsäuresträngen finden, bevor die Targets durch die Bindung von komplementären Strängen beschlagnahmt sind.

[0104] Die Verwendung von Sonden in dieser Erfindung in Assays zur Identifikation von Produkten aus Nukleinsäure-Amplifikationsreaktionen beseitigt im Wesentlichen die Notwendigkeit von Post-Amplifikationanalysen, um gewünschte Produkte zu detektieren und gewünschte Produkte von unerwünschten Nebenreaktionen oder Hintergrundprodukten zu unterscheiden. Selbstverständlich können die Sonden zur Verwendung in der Erfindung am Ende eines Syntheseprozesses zur Endpunkt-Detektion von Produkten zugegeben werden. In Assays zum Überwachen des Fortschreitens einer Amplifikationsreaktion können die Sonden während der Synthese anwesend sein. Das Vorhandensein von Sonden verstärkt die Akkuratheit, Präzision und den dynamischen Bereich der Schätzungen der Target-Nukleinsäurekonzentration. Reaktionen in geschlossenen Gefäßen können überwacht werden, ohne überhaupt die Gefäße zu öffnen. Daher können Assays unter Verwendung dieser Sonden die Anzahl der falsch Positiven limitieren, da die Kontamination limitiert werden kann.

[0105] Unimolekulare Sonden zur Verwendung in der Erfindung sind besonders nützlich in Assays zum Verfolgen von Polymerase-Kettenreaktionen, da die Sonden gemäß der vorliegenden Erfindung sich mit einer Geschwindigkeit öffnen und schließen können, die schneller ist als die Geschwindigkeit des thermischen Cyclings. Eine Sonde, die in der geschlossenen Position "aus" ist und eine Target-komplementäre Sequenz einschließt, die Komplementarität zu einem erwarteten Amplifikationsprodukt aufweist, ist in einem Polymerase-Kettenreaktionsgemisch enthalten. Für diese Ausführungsform hat die Sonde eine derartige Schmelztemperatur, dass die Sonde unter den Reaktionsbedingungen bei der Annealing-Temperatur der Polymerasekettenreaktion geschlossen ist. Die Sonde kann, muss aber nicht bei der Verlängerungstemperatur geschlossen bleiben, falls diese höher als die Annealing-Temperatur ist. Bei der Annealing-Temperatur hybridisiert die Target-komplementäre Sequenz an ihr Target und die Sonde generiert das Signal. Während des Herunterfahren von der Denaturierungstemperatur zu der Annealing-Temperatur und ebenso bei der Annealing-Temperatur schließen sich die geschmolzenen (d. h. offenen) Sonden, die ihr Target nicht finden, schnell über

ein intramolekulares Ereignis. Das Signal, z. B. Fluoreszenz, kann daher bei der Annealing-Temperatur abgelesen werden. Es ist ebenfalls möglich, in den Reaktionszyklus eine bestimmte Temperatur zu programmieren, bei der die Fluoreszenz abgelesen wird. Beim Entwerfen einer Sonde zur Verwendung in einer PCR-Reaktion würde man natürlich eine Target-komplementäre Sequenz auswählen, die nicht komplementär zu einem der PCR-Primer ist.

[0106] Manche Sonden können von ihrer Targetsequenz verdrängt werden durch das Annalen des zum Produkt komplementären Strangs wie das PCR-Primer können. Dies kann überwunden werden durch Erhöhen der Konzentration der Sonden oder durch Entwerfen einer Asymmetrie in die Synthese der Produktstrange in der Polymerase-Kettenreaktion. Bei einer asymmetrischen Amplifikation wird mehr von dem Strang, der das Target enthält, synthetisiert im Vergleich zu der Synthese des komplementären Strangs.

[0107] In ähnlicher Weise können andere Nukleinsäure-Amplifikationssysteme (siehe Landegren, 1993, zur Übersicht) mit Ausführungsformen der Sonden der vorliegenden Erfindung überwacht oder untersucht werden. Geeignete Sonden können zum Beispiel in Q-beta-Replikase-vermittelter Amplifikation, Self-sustained Sequenzreplikation, Transkriptions-basierter Amplifikation und Strangverdrängungs-Amplifikationsreaktionen ohne irgendeine Modifizierung im System der Amplifikation verwendet werden.

[0108] Bestimmte Ausführungsformen von Assays gemäß der vorliegenden Erfindung verwenden mehrere Hybridisierungssonden, die an (eine) feste Oberfläche oder Oberflächen gebunden sind. Da Sonden zur Verwendung in dieser Erfindung verwendet werden, ist Waschen nicht erforderlich. Wenn Sonden an eine feste Oberfläche gebunden werden, bezeichnen wir diese als "befestigte Sonden". Eine Sonde dieser Art ist in Fig. 10 abgebildet, die eine Sonde **101** zeigt, mit einer Target-komplementären Sequenz **104**, komplementären Arme **105** und **106** und Markierungspaar **107**, **108**, konjugiert an die Arme **105**, **106**. Sonde **101** ist über einen verbindenden Rest **102** an die feste Oberfläche **103** gebunden. Der verbindende Rest **102** kann kovalent oder nicht-kovalent sein. Wir bevorzugen kovalente Bindung. Jede Art von Oberfläche **103** kann verwendet werden, einschließlich Beads, Membranen, Mikrotiter-Wells und (Pegel)Stäbe. Wir bevorzugen Oberflächen, die neutral sind bezüglich der Bestandteile der Sonde, das heißt, Oberflächen, die nicht mit Nukleinsäuren Wechselwirken, nicht mit den Markierungsresten Wechselwirken und nicht das Sondensignal stören. Ein Beispiel einer solchen Oberfläche ist eine Oberfläche, die mit einem silikonisierenden Agens beschichtet ist.

[0109] Eine nützliche Oberfläche stört nicht signifikant: a) die Fähigkeit des Affinitätspaars, vorzugsweise die Armsequenzen, der Sonde, die geschlossene Konformation aufrecht zu erhalten; b) die Hybridisierung der Target-komplementären Sequenz an das Target; c) die Fähigkeit des Affinitätspaars, verdrängt zu bleiben, vorzugsweise von Armsequenzen der Sonde, um in der offenen Konformation zueinander unhybridisiert zu verbleiben; d) die Wechselwirkung von benachbarten Markierungsresten in der geschlossenen Konformation, vorzugsweise das Quenching eines lumineszierenden Rests durch einen Quenchingrest; und e) die Wirkung von Markierungsresten in der offenen Konformation, vorzugsweise die Fähigkeit eines lumineszierenden Rests zu lumineszieren, wenn er durch Licht einer geeeigneten Frequenz stimuliert wird. Solche Oberflächen sind im Fachbereich bekannt.

[0110] Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können durch zahlreiche dem Fachmann bekannte molekulare verbindende Reste **102**, befestigt werden. Zum Beispiel umfasst ein geeigneter bindender Rest **102** eine Alkylkette oder eine Oligonukleiotidkette (wie beispielseweise Oligouridin). Wir bevorzugen Oligonukleotid-verbindende Reste, da sie leicht in Sonden eingebaut werden. Wie der Fachmann abschätzen wird, sollte die Nukleotidsequenz eines solchen Oligonukleotid-verbindenden Restes im Wesentlichen nicht komplementär zu einer anderen Sequenz in der Sonde sein.

[0111] Befestigte Sonden sind vorteilhafterweise nützlich in Assays zur gleichzeitigen Bestimmung eines vorbestimmten Sets of Targetsequenzen. Zum Beispiel kann eine Reihe lumineszierender Sonden hergestellt werden, wobei jede eine verschiedene Target-komplementäre Sequenz umfasst. Jede Sonde kann an ihrer eigenen vorbestimmten Stelle an dieselbe Trägeroberfläche wie beispielsweise einen (Pegel-)Stab gebunden werden. Nach Inkontaktbringen des Trägers und der Probe unter Hybridisierungsbedingungen kann der Träger mit Licht einer geeigneten Frequenz stimuliert werden. Es wird dann Lumineszenz an den Stellen auftreten, wo befestigte Sonden mit Targetmolekülen aus der Probe Hybride gebildet haben.

[0112] Solche Assays sind besonders nützlich in klinischen Situationen, z. B., in denen ein Patient eine offensichtliche Infektion hat und der Arzt die Identität des infektiösen Agens kennen muss, um schnell eine effektive Behandlung anzuordnen.

[0113] Assay-Kits zur Verwendung in dieser Erfindung schließen mindestens eine Sonde und Anleitungen zur Durchführung eines Assays ein. Kits können ebenfalls Assay-Reagenzien, z. B. Salze, Puffer, Nuklease-Inhibitoren, Restriktionsenzyme und Denaturierungsmittel enthalten. Kits können ein Target

oder Modelltarget für einen positiven Kontrolltest und eine targetlose "Probe" für einen negativen Kontrolltest enthalten.

[0114] Amplifikationsassay-Kits können, zusätzlich zu einigem oder allem oben genannten, Primer, Nukleotide, Polymerasen und Polymerase-Templates für den Assay und für Kontrollassays einschließen.

[0115] Vital-Farbe-Kits können, zusätzlich zu Sonde und Anleitungen, permeabilisierende Agenzien, Liposom-Vorläufer, Puffer, Salze, Gegenstränge und optische Filter enthalten.

[0116] In situ-Kits können, zusätzlich zu Sonde und Anleitungen, Fixierungsmittel, dehydratisierende Agenzien, Proteasen, Gegenstränge, Detergenzien, optische Filter und beschichtete Mikroskopdias enhalten.

[0117] Feld-Kits können, zusätzlich zu Anleitungen, befestigte Sonden gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten. Mindestens eine Sonde kann an Beads, Wells oder einen (Pegel-)Stab gebunden sein. Es können mehrere Sonden, einschließlich einer positiven Kontrollsonde, die an einen Bestandteil von nicht-infizierten Proben hybridisiert, enthalten sein.

[0118] Feld-Kits können, zusätzlich zu Anleitungen, nicht-befestigte Sonden gemäß der Erfindung enthalten. Solche Kits können für infektiöse Agenzien oder Gene sein. Kits für Gene können negative und, manchmal, positive Targets enthalten.

[0119] Sondenkonstrukte können getestet werden, um zu bestimmen, ob sie unter bestimmten Assaybedingungen einheitliche Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung sind. Ein Test kann entworfen werden, der für das in dem Sondenkonstrukt verwendete Affinitätspaar und die Markierungsreste geeignet ist. Der Test sollte unter den Bedingungen des Hybridisierungsassays durchgeführt werden, unter Verwendung des zu verwendenden Detektors und im Wesentlichen die folgenden Schritte umfassen: Zunächst misst man das Level des Signals, das in Abwesenheit des Targets generiert wird; dann misst man das Level des Signals, das generiert wird, wenn ein Überschuss an Sonde in Anwesenheit eines minimalen Levels an Target vorliegt, das man detektieren muss. Wenn das Level des Signals der Messung mit dem Level, das von benachbarten Markierungsresten erwartet wird, übereinstimmt, wenn das Level des Signals der zweiten Messung mit dem Level, das aufgrund des Öffnens der Sonde erwartet wird, übereinstimmt, und wenn der Detektor zuverlässig zwischen den Levels des Signals der beiden Messungen unterscheiden kann, handelt es sich bei dem Konstrukt in diesem Assay um eine Sonde zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung.

[0120] Das Sondenkonstrukt muss den in Beispiel IV beschriebenen Test bestehen, um eine Sonde zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zu sein.

[0121] Die folgenden Beispiele illustrieren verschiedene Ausführungsformen der Erfindung. Sie sind nicht dazu gedacht, die Erfindung, welche nicht auf diese spezifische Ausführungsform beschränkt ist, einzuschränken.

BEISPIEL I: Synthese von Sonde A

[0122] Sonde A ist in Fig. 3 dargestellt. Fig. 3 zeigt die Nukleotidsequenz einer unimolekularen Sonde **30**, welche die Target-komplementäre Sequenz **31** und komplementäre Arme umfasst. Die spezielle, in Fig. 3 dargestellte, Sonde ist für die Detektion des Integrasegens des humanen Immundeffizienz-Virus HIV-1 (Muesing et al., 1985). Die Tartget-komplementäre Sequenz **31**, die sich 5' bis 3' von Nukleotid **32** bis Nukleotid **33** ausdehnt, ist komplementär zu der Targetsequenz 5' – AATGGCAGCAATTTCACCAGTACTACAGTTAAGGC – 3'. Es ist einzusehen, dass eine Target-komplementäre Sequenz derselben Länge, die komplementär zu einem anderen Target ist, ersetzt werden kann. Sonde **30** wurde zusammengesetzt unter Verwendung des oben beschriebenen ersten Zwei-Oligonukleotid-Ligationsverfahrens. Jedes der zwei Oligonukleotide **34**, **35** wurde über Festphasensynthese hergestellt. Während der Synthese von Oligonukleotid **34**, gekennzeichnet in Fig. 3 durch eine Box, wurde ein modifiziertes Nukleotid am 5'-Terminus eingeführt. Dieses Nukleotid umfasst eine Sulfhydryl-Gruppe, die kovalent über einen Hexa-Alkyl-Spacer an das 5'-Phosphat gebunden ist. Oligonukleotid **34** wurde dann an den EDANS-Markierungsrest **34** gekoppelt. Das Verfahren von Connoly und Rider (1985), hierin durch Bezugnahme eingeschlossen, wurde verwendet, um eine Sulfhydryl-reaktive Form von EDANS (1,5-IAEDANS, Molecular Probes, Eugene, Oregon) über eine Thioether-Bindung an das Oligonukleotid zu koppeln. Oligonukleotid **34** wurde dann über Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) gereinigt. Im Verlauf der Synthese von Nuldeotid **35**, wurde das Verfahren von Nelson et al., (1989) welches hierin durch Bezugnahme eingeschlossen ist, verwendet, um eine primäre Aminogruppe, die kovalent über einen Hexa-Alkyl-Spacer an den 3'-Sauerstoff des 3'-terminalen Nukleotids gebunden ist, einzufügen. Ungefähr 2,5 mg des Oligonuldeotids **35** wurde an seinem 5'-Ende mit ^{32}P unter Verwendung von T4 Polynukleotid-Kinase kinasiert. Das ^{32}P wurde verwendet, um das Oligonukleotid während der Synthese und auf Reinigung zu verfolgen. Das kinasierte Oligonukleotid **35** wurde dann in 300 l von 0,2 M Natriumbikarbonat gelöst und mit 300 l 60 mg/ml der amino-reaktiven Form des Markierungsrestes **38**, DABCYL-succinimidylester (Molecular Probes, Eugene, Oregon) zur Reaktion gebracht. Das amino-reaktive DABCYL wurde zu ei-

nem kontinuierlich gerührten Reaktionsgemisch in fünfzehn Aliquots von je 20 l über einen Zeitraum von 72 Stunden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit Ethylalkohol präzipitiert.

[0123] Oligonukleotid **35** wurde dann über HPLC aufgereinigt. Oligonukleotid **34** und **35** wurden dann aneinander annealed und durch Inkubation mit T4 DNA-Ligase bei 16°C ligiert. Das ligierte Produkt wurde über Polyacrylamid-Gelektrophorese in Anwesenheit von 7 M Harnstoff aufgereinigt. Die Bande, die Probe A enthält, zeigte (auf Grund des EDANS) in Anwesenheit von Harnstoff blau-weiß-Fluoreszenz, und war (auf Grund des DABCYL) orange in der Farbe und (auf Grund des ^{32}P) radioaktiv. Die aufgereinigte Probe A wurde aus dem Gel eluiert und wurde in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, enthaltend 1 mM EDTA (TE-Puffer) aufbewahrt.

BEISPIEL II: Allgemeiner Stamm und ein Verfahren zur Verwendung desselben

[0124] Fig. 4 zeigt Sonde **40**, hierin auch bezeichnet hierin als Sonde B, entworfen unter Verwendung eines allgemeinen Stamms zur Verwendung in dieser Erfindung. Bezugnehmend auf Fig. 4 umfasst der allgemeine Stamm **41**, der Klarheit halber dargestellt durch Linie **42**, die Armregionen **43**, **44**, an welche ein Strang, der eine beliebige Target-komplementäre Sequenz enthält, wie unten beschrieben ligiert werden kann.

[0125] Um den allgemeinen Stamm **41** zusammenzusetzen wurden zwei Oligonukleotide **43**, **44** über Festphasensynthese hergestellt. Oligonukleotid **43** wurde unter Verwendung von T4 Polynukleotid-Kinase kinasiert. Oligonukleotide **43**, **44** sind komplementär. Eins, in diesem Fall Oligonukleotid **43**, ist fünf Nukleotide länger als das andere, Oligonukleotid **44**. Bezugnehmend auf Fig. 4 sind diese fünf Nukleotide 5'-ATCCG. Oligonukleotid **43** wurde an den Markierungsrest **45**, ein DABCYL-Rest an sein 3'-Terminus konjugiert. Oligonukleotid **44** wurde an Markierungsrest **46**, einen EDANS-Rest an sein 5'-Terminus konjugiert. Diese Konjugationen wurden durchgeführt und die konjugierten Oligonuldeotide aufgereinigt, wie in Beispiel I beschrieben. Oligonukleotide **43**, **44** wurden dann annealed, wodurch die Markierungsreste **45**, **46** in enge Nachbarschaft zueinander platziert wurden.

[0126] Oligonukleotid **47**, hergestellt über Festphasensynthese, enthält eine in Fig. 4 als Linie dargestellte Target-komplementäre Sequenz, flankiert durch Regionen, die die verbleibenden Teile **48**, **49** der Armsequenzen enthalten. Die Armteile **48**, **49** wurden aneinander annealed, um einen Überhang zu bilden, der komplementär ist zu dem Überhang auf dem allgemeinen Stamm. Der Überhang 5'-CGGAT umfasst die ersten fünf Nukleotide des Armteils **48**. Oligonukleotid **47** wurde dann, unter den Bedingungen von Beispiel I, an den allgemeinen Stamm **41** annealed und daran ligiert. Sonde B wurde aus dem Ligationsgemisch über Gelelektrophorese isoliert. Obwohl die Stammsequenzen **43**, **44** und Armteile **48**, **49** vor dem Gemischtwerden getrennt annealed wurden, könnten sie auch nach dem Mischen annealed worden sein. Der endgültige Armstamm von Sonde **40** umfasst die Kombination der Bereiche **44** und **48** beziehungsweise der Bereiche **43** und **49**.

BEISPIEL III: Syntehese von Sonde C

[0127] Sonde C, eine unimolekulare Sonde dargestellt in Fig. 5, wurde über das zweite oben beschriebene Zwei-Oligonukleotid-Verfahren, hergestellt. Oligonukleotid **51**, das sich vom 5'-Ende von Sonde **50** bis Nukleotid **52** erstreckt, und Oligonukleotid **53**, das sich von Nukleotid **54** bis 3'-Terminus von Sonde **50** erstreckt, wurden über Festphasensynthese hergestellt. Oligonukleotid **51** wurde an EDANS **55** an sein 5'-Terminus konjugiert und Oligonukleotid **53** wurde an DABCYL **56** an sein 3'-Terminus konjugiert. Die Konjugationen und Aufreinigungen der konjugierten Oligonukleotide wurden, wie in Beispiel I beschrieben, durchgeführt.

[0128] An diesem Punkt können die beiden Moleküle, Oligonukleotide **51** und **53**, annealed werden um eine bimolekulare Sonde zu bilden. Eine unimolekulare Sonde wurde aus diesen Oligonukleotiden gebildet, durch Annalen derselben an einen Oligonuldeotid-Splint, der die Sequenz 5'-AATGGCAGCAATTTCACCAGTACTACAGTTAAGGC-3' aufweist und ligiert ist an die Verbindung von Nukleotiden **52** und **54**. Die unimolekulare Sonde wurde dann elektrophoretisch, wie in Beispiel I beschrieben, aufgereinigt. Sonde C hat dieselbe Target-komplementäre Sequenz wie Sonde A, wurde jedoch zur Verwendung unter verschiedenen Bedingungen entworfen. Die Target-komplementäre Sequenz erstreckt sich 5' zu 3', von Nukleotid **57** zu Nukleotid **58**, erstreckt. Der Stammduplex **59** von Sonde C ist acht Basenpaare lang.

BEISPIEL IV: Testen von Sondenkonstrukten

[0129] Dieses Beispiel beschreibt den Test, um zu bestimmen, ob oder ob nicht eine Sonde, die mit Nukleinsäure-Armsequenzen konstruiert wurde, unter bestimmten Assay-Bedingungen eine Sonde zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist. Daten für ein solches Sondenkonstrukt, Sonde A, ist bereitgestellt und ausgewertet. Für Sonde A wurde gefunden, dass sie in einem Assay bei 20°C ohne jegliches Salz eine Sonde zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist.

[0130] Sonden weisen eine charakteristische Schmelztemperatur, Tm, auf, die Temperatur, bei

welcher zwei hybridisierte Nukleinsäurestränge sich auf Grund thermischer Energie trennen. Die Schmelztemperatur von Sonde A wurde bestimmt durch Überwachen des Levels ihres Fluoreszenzsignals während unter vorausgewählten Assay-Bedingungen: TE-Puffer ohne zugegebenes Salz. Die Konzentration an Sonden bei 150 pmol in einem Volumen von 2 ml TE-Puffer, die Temperatur von 10°C auf 80°C erhöht wurde. Die thermische Denaturierung oder Übergangskurven wurden mit einem Perkin-Elmer LS-5B-Fluorometer aufgezeichnet. Der EDANS-Rest von Sonde A wurde bei 336 nm angeregt und das Level an Fluoreszenz bei 480 nm wurde aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dargestellt. Die instrumentelle Verfolgung **60** zeigt die thermische Denaturierungskurve von Sonde A unter diesen Assay-Bedingungen. Der Tm einer Sonde ist angegeben durch den Wendepunkt ihrer thermischen Denaturierungskurve. Die Schmelztemperatur, Tm, von Sonde A war 72°C.

[0131] Die folgenden Signallevels, hier Fluoreszenz, sind von der thermischen Denaturierungskurve aufgezeichnet: Ein erstes Level bei Tm –10°C, ein zweites Level bei Tm +10°C, und ein drittes Level bei der Detektionstemperatur des vorausgewählten Assays. Ein Sondenkonstrukt ist in der vorliegenden Erfindung unter den vorausgewählten Assay-Bedingungen zu verwenden, wenn unter diesen Bedingungen bei der Detektionstemperatur die Zugabe eines Überschusses von Model-Target zu einer Änderung im Signallevel führt in Richtung zu dem Level bei Tm +10°C, um einen Betrag gleich oder mindestens 10% der Differenz zwischen den Signallevels bei Tm –10°C und Tm +10°C. "Modell-Target" ist ein Nukleinsäurestrang, der eine Sequenz enthält, die komplementär zu der Target-komplementären Sequenz des Sondenkonstrukts ist und nicht mehr als ein ein zusätzliches Nukleotid unmittelbar 5' oder 3' angrenzend dazu. Oft wird das tatsächliche Target dieser Definition entsprechen. Die Konzentration des Sondenkonstrukts, die verwendet wird, um das Signallevel in Anwesenheit des Modell-Targets zu messen, ist dieselbe Konzentration, die verwendet wird, um die Signallevels in der Abwesenheit des Targets zu messen, d. h. die Konzentration, die verwendet wird, um die thermische Denaturierungskurve zu erhalten.

[0132] Für Sonde A wurden die in Fig. 6 dargestellten Signallevels von instrumentellem Verfolgen wie folgt bestimmt: Bei Tm –10°C, ein Level von 2 Einheiten; bei Tm +10°C, ein Level von 16 Einheiten; und bei der Detektionstemperatur, 20°C, ein Level von 2.5 Einheiten. Die Zugabe von überschüssigem Target bei der Detektionstemperatur shiftete das Level in drei Stunden von 2.5 Einheiten zu 14.5 Einheiten unter Verwendung eines wie oben beschriebenen großen Überschusses an Modell-Targets. Folglich ist Sonde A eine Sonde zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung unter diesen vorausgewählten Assay-Bedingungen.

[0133] Das Modell-Target war ein DNA-Strang mit der Sequenz: 5'-CAGACAATGGCAGCAATTTCACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTGT-3', die über Festphasensynthese hergestellt und über HPLC aufgereinigt wurde. Die unterstrichene Teilsequenz identifiziert die Targetsequenz für Sonde A. 25 nmol Modell-Target, wurde zu 2 ml TB-Puffer, der 150 pmol an Sonde A enthielt, zugegeben. Die Fluoreszenz wurde über die Zeit in einem Perkin-Elmer LS-5B-Fluorometer mit einer Quartzküvette, die bei der Detektionstemperatur gehalten wurde, aufgezeichnet. Die instrumentelles Verfolgung **82** zeigt in Fig. 8 die Ergebnisse. Fig. 8 zeigt, dass ein hoher Grad an Änderungen der Fluoreszenz früh stattfand, über die Zeit abnahm, und sich einem Plateau näherte. Der Testpunkt ist das Plateaulevel obwohl man, wie in diesem Fall, nicht derart lang warten muss, falls ein "testbestehendes" Level früher erreicht ist. Wie zu erkennen ist, hängt die Zeit bis zum Plateaulevel von der Konzentration des Model-Targets ab. Zum Beispiel wenn wir die Modell-Targetkonzentration fünffach reduzierten, instrumentelle Verfolgung **81** in Fig. 8, wurde das Plateau selbst nach zehn Stunden nicht erreicht.

[0134] Ein weiteres Konstrukt, Sonde C, wurde unter anderen vorausgewählten Assay-Bedingungen, 10 mM MgCL, in TE-Puffer bei 37°C, getestet. Ihre thermische Denaturierungskurve, instrumentelle Verfolgung **61** in Fig. 6, zeigt ihren Tm bei 61°C an. Aus den Daten des instrumentellen Verfolgens **61** und von den Messungen des Signals in Anwesenheit von überschüssigem Modell-Target bei 37°C, wurde für Sonde C gefunden, dass sie unter den vorausgewählten Assay-Bedingungen eine Sonde zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist. Eine bimolekulare Ausführungsform der einheitlichen Sonde C wurde unter denselben Assay-Bedingungen getestet, die verwendet wurden, um die unimolekulare Ausführungsform der einheitlichen Sonde C zu testen. Für die bimolekulare Sonde wurde herausgefunden, dass sie nützlich in der vorliegenden Erfindung ist. Bimolekulare Sonden weisen praktisch dieselben Hybridisierungs-Kinetiken wie ihre unimolekularen Gegenstücke auf.

BEISPIEL V: Demonstration der Sondenfunktion

[0135] Zusätzliche Tests mit Sonde A wurden durchgeführt, um die Sondenfunktion zu testen. Sonde A wurde getestet mit einem Überschuss an DNA-Target und mit einem Überschuss an RNA-Target. Das DNA-Target war das oben beschriebene Modell-Target. Das RNA-Target war eine 880-Nukleotid-RNA, die dem Integrasegen von HIV-1 entspricht (Muesing et al., 1985). Die Sequenz des DNA-Modell-Targets ist innerhalb der Sequenz des RNA-Targets enthalten.

[0136] Die Targetnukleinsäuren und Sonde A wurden in TE-Puffer gelöst. Fünf 0,5 ml Plastikröhrchen mit Schnappdeckel wurden präpariert, die enthielten: 1) 1.000 pmol an DNA-Target; 2) 80 pmol an RNA-Target; 3) 80 pmoles an RNA-Target und 15 pmoles an Sonde A; 4) 1.000 pmoles an DNA-Target und 15 prol an Sonde A; und 5) 15 pmol an Sonde A. Das Endvolumen von jedem Test wurde auf 6 µl mit TE-Puffer eingestellt.

[0137] Während dem Bestrahlen der Röhrchen mit ultraviolettem Licht eines Transilluminators (Model Nr. 3-3100, Fotodyne, New Berlin, Wisconsin) wurden die Röhrchen durch vorsichtiges zweimaliges Pipettieren mit einem Gilson-Mikropipettor gemischt. Intensive blaue Fluoreszenz, die die Detektion der Targets durch Sonde A anzeigt, wurde per Auge detektiert und fotografiert. Ergebnisse 71–75, die den Röhrchen 1–5 entsprechen, sind in Fig. 7 dargestellt.

[0138] Das Auftreten eines Fluoreszenzsignals war praktisch augenblicklich in dem Röhrchen, das das DNA-Target enthielt und trat einige Minuten später in dem Röhrchen mit dem RNA-Target auf. Man glaubt, dass die Verzögerung mit dem RNA-Target auf die geringere Menge an verwendetem Target zurückzuführen ist, obwohl es auch auf Grund der Beschlagnahmung der Targetsequenz durch die umgebenden Sequenzen in der RNA sein kann. In einem Kontrolltest wurden Nukleinsäuren, die in keinem Zusammenhang stehen, mit Sonde A vermischt. In diesen Kontrollen wurde keine Fluoreszenz beobachtet (Daten nicht gezeigt).

[0139] Aus den Ergebnissen dieser Experimente folgern wir, dass: a) in Abwesenheit des Targets haben gut-entworfene Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ein sehr geringes Level an Hintergrundsignal; b) Sonde-Target Hybridisierung kann eine Signaländerung hervorrufen, die mit dem menschlichen Auge detektierbar ist; c) Sonden zur Verwendung in dieser Erfindung funktionieren sowohl mit RNA- als auch mit DNA-Targets; und d) in Anwesenheit eines Targets können Sonden zur Verwendung in dieser Erfindung sehr schnell, innerhalb weniger Sekunden, "an" schalten. Zusätzlich zeigte schnelles Erhitzen und Kühlen von Sonde A in Abwesenheit der Targetsequenz, dass die Sonde ebenfalls sehr schnell, praktisch augenblicklich, "aus"schaltete.

[0140] Die Probe, die in dem in Fig. 8 berichteten Test verwendet wurde, Tracing **82**, wurde anschließend auf 95°C erhitzt, sehr schnell in einem Eisbad abgekühlt und erneut bei 20°C, der Detektionstemperatur, inkubiert. Die Kinetiken der Signalgeneration wurden wie vorher verfolgt. Das Verfolgen während der Inkubation bei 20°C war praktisch nicht unterscheidbar von Tracing **82**. Das zeigt, dass mit gut-entworfenen unimolekularen Sonden, Sonden-Target-Hybride reversibel thermisch denaturierbar sind. Folglich sind solche Ausführungsformen geeignet zum Einbau in thermisch zyklierende Reaktionen, wie beispielsweise PCR, zur Echtzeit-Detektion von Amplifikationsprodukten.

BEISPIEL VI: Assays

[0141] Assays, die die Sonden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung verwenden, beginnen einfach mit der Zugabe der Sonden zu dem Material von Interesse unter Bedingungen, die hybridisierungsfähig sind. Die Verfahren zur Verarbeitung der Proben und des Auszeichnens des Fluoreszenzsignals können mit der Natur der Proben variieren. Gewebe können mechanisch oder durch Inkubation mit chaotropen Salzen aufgebrochen werden. Die am meisten aufgebrochenen Gewebe können direkt in den Assays verwendet werden. Manche Gewebe enthalten jedoch natürlich fluoreszierende Materialien, die die Detektion des Signals stören können. In solchen Fällen können die Nukleinsäuren aus den fluoreszierenden Materialien entweder vor oder nach Hybridisierung isoliert werden. Die Fluoreszenz von geöffneten Sonden kann über Fluorometer aufgezeichnet werden.

[0142] Bevorzugte einheitliche Sonden sind nützlich in Feld-Tests für infektiöse Krankheiten. Zum Beispiel kann ein Test auf Malaria mit der Zugabe von Guanidinthiocyanat zu einer Blutprobe beginnen, um die Zellen zu lysieren, die Zellen zu detoxifizieren und die Bestandteile zu denaturieren. Ein großer Überschuss an Sonde (im Vergleich zu der erwarteten maximalen Targetkonzentration), welche komplementär zu der ribosomalen RNA des Malaria-Parasiten ist, kann dann zugegeben werden, und die Hybridisierung kann fortfahren. Die Fluoreszenz von offenen Sonden kann entweder visuell oder mit Hilfe eines Fluorometers beobachtet werden. Die Detektion eines positiven Fluroreszenzsignals zeigt die Infektion mit dem Malaria-Parasit an.

[0143] Sonden können verwendet werden, um bestimmte Nukleinsäurefragmente in einem Gel oder anderen Medium zu lokalisieren, zum Beispiel, wenn Information über die Größe einer spezifischen Nukleinsäure gewünscht ist. Die Nukleinsäuren in der Probe können zunächst über Gelelektrophorese fraktioniert werden und anschließend kann das Gel selbst in einer Lösung, die die Sonden enthält, gebadet werden. Der Ort im Gel, wo die Targetnukleinsäure wandert, wird über das charakteristische Signal als Ergebnis der Hybridisierung detektierbar sein.

[0144] Sonden, vorzugsweise unimolekular, die einen Fluoreszierer und einen Quencher als Markierungsreste haben, können als Vital-Farbstoffe zur Detektierung von Zellen verwendet werden, die eine Targetnukleinsäure beherbergen. Modifizierte Nukle-

otide sind speziell nützlich für solche Sonden. Um die Sonden in die Zellen zu befördern, wird ein permeabilisierendes Agens, wie beispielsweise Toluen vor der Zugabe der Sonden zu dem Gewebe gegeben. Alternativ können die Sonden in Liposomen eingekapselt und diese Liposomen mit den Zellen fusioniert werden. Nach der Beförderung der Sonden findet die Hybridisierung innerhalb der Zellen statt. Wenn das Gewebe unter einem Fluroreszenzmikroskop betrachtet wird, werden diejenigen Zellen, die die Targetnukleinsäure enthalten, fluoreszierend erscheinen. Die subzelluläre Lokalisation der Targetnuldeinsäure kann ebenfalls in diesen Experimenten wahrgenommen werden.

[0145] Die Herstellung von Nukleinsäuren in Synthesereaktionen kann verfolgt werden über das Einschließen geeigneter entworfener Sonden in das Reaktionsgemisch und Beobachten des Signallevels, z. B. Fluoreszenz, in Echtzeit. Die Sonden sollten derart entworfen sein, dass sie komplementär zu einem Segment der Nukleinsäure sind, die hergestellt wird. Beispiele solcher Reaktionen sind RNA-Synthese über DNA-abhängige RNA-Polymerasen und über Q-Beta-Replikase. Unimolekulare Sonden sind besonders nützlich im Verfolgen einer Polymerasekettenreaktion, da sie sich mit einer Geschwindigkeit öffnen und schließen, die schneller ist, als die Geschwindigkeit der thermischen Zyklen, die in dieser Reaktion verwendet werden. Eine zusätzliche Temperatur in jedem Zyklus, die 5–12°C unterhalb der Schmelztemperatur des Stamms der Sonde hegt, kann eingebaut werden als Detektionstemperatur. In jedem Zyklus wird der Fluoreszenzlevel die Menge des vorliegenden Target-DNA-Strangs anzeigen. Ein Überschuss der Sonden, ebenso wie ein Überschuss von PCR-Primern sollte im Reaktionsgemisch verwendet werden. Die PCR kann asymmetrisch sein. Echtzeit-Beobachtung der korrekten Produkte, im Gegensatz zur Endpunkt-Detektion, verstärkt die Präzision und den dynamischen Bereich der Einschätzungen der Targetnukleinsäurekonzentrationen durch Polymerasekettenreaktionen und macht die Notwendigkeit für Postamplifikationsanalysen überflüssig.

[0146] Die Sonden können ebenfalls verwendet werden zum Beobachten anderer Nukleinsäureamplifikationsreaktionen, wie beispielsweise Strangverdrängungsamplifikationsreaktionen und self-sustained Sequenzreplikationsreaktionen. Nützliche Sonden werden in einer ähnlichen Art wie die Sonden für Polymerasekettenreaktionsprodukte entworfen und verwendet.

BEISPIEL VII: Befestigte Sonden

[0147] Sonden können in Assays verwendet werden, wobei sie an einen, wie oben diskutierten und in Fig. 10 dargestellten, festen Träger gebunden sind.

[0148] In einer bevorzugten Ausführungsform werden mehrere Sonden hergestellt. Jede Sonde enthält eine einzigartige Target-komplementäre Sequenz. Alle können dasselbe Markierungspaar, einen Fluorophor und einen Quencher enthalten. Jede Sonde enthält ebenfalls eine Oligonukleotidkette die sich von dem Ende eines Arms erstreckt.

[0149] Jede Sonde ist über eine Oligonukleotidkette an eine spezifische ihr zugewiesene Stelle auf einem (Pegel)Stab befestigt. Der Entwurf lässt der Target-komplementären Sequenz die Freiheit, an homogener Hybridisierung teilzunehmen. In einem Assay, der diese Ausführungsform verwendet, wird der (Pegel)Stab in Kontakt gebracht mit einer Probe, die ein oder mehrere verschiedene Targetsequenzen enthalten kann.

[0150] Die befestigten Sonden Wechselwirken dann mit ihren korrespondierenden Targetsequenzen. Solche derart wechselwirkende Sonden werden in den offenen Zustand shiften. Der (Pegel)Stab wird mit Licht einer geeigneten Frequenz bestrahlt. Fluoreszenz von bestimmten Stellen auf dem (Pegel)Stab zeigen das Vorhandensein korrespondierender Targetsequenzen an. Zusätzliche Gestaltungen von Assays mit befestigten Sonden sind für den Fachmann offensichtlich.

REFERENZEN

Cardullo, R. A., Agarwal, S., Flores, C., Zamecnik, P. C. und Wolf, D. E., (1988), Detection of hybridization by nonradiative fluorescence energy transfer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 8790-8794.

Connoly, B. A. und Rider, P., (1985), Chemical synthesis of oligonucleotide containing a free sulphhydryl group and a subsequent attachment of thiol specific probes, Nucleic Acids Res. 13, 4485–4502.

Diamond, S. E., Brewen, J. G., Williams, J. I., Ellwood, M. S., Collins, M. und Fritsch, E. F., (1988), Displacement polynucleotide assay method and polynucleotide complex reagent therefore, U.S. Patent No. 4,766,062.

Erlich, H. A., Gelfand, D. und Sninsky, J. J., (1991), Recent advances in the polymerase chain reaction, Science 252, 1643–1651.

Gillespie, D. und Spiegelman, S., (1956), A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane, J. Mol. Biol. 12, 829–852.

Guatelli, J. C., Whitfield, K. M., Kwoh, D. Y., Barringer, K. J., Richman, D. D. und Gingeras, T. R., (1990), Isothermal in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modelled after retroviral replication, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 1874–1878.

Heller, M. J., Morrison, L. E., Prevatt, W. D. und Akin, C., (1983), Homogeneous nucleic acid hybridization diagnostics by nonradiative energy transfer, European Patent Application 070685.

Landegren, U. (1993), Molecular mechanics of nucle-

ic acid sequence amplification, Trends Genet. 9, 199–204.
Lichter, P., Tang, C. J. C., Call, K., Hermanson, G., Evans, G. A., Housman, D. und Ward, D. C., (1990), High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones, Science 247, 64–69.
Lomeli, H., Tyagi, S., Pritchard, C. G., Lizardi, P. M. und Kramer, F. R., (1989), Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes, Clin. Chem. 38, 1826–1831.
Matayoshi, E. D., Wang, G. T., Krafft, G. A. und Erickson, J. E., (1990), Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer, Science 247, 954–958.
Morrison, L. E., (1987), Competitive homogenous assays, European Patent Application 87300195.2
Morrison, L. E., (1989), Lifetime-resolved assay procedures, U.S. Patent No. 4, 822,733.
Morrison, L. E., Halder, T. C. und Stols, L. M., (1989), Solution phase detection of polynucleotides using interacting fluorescent labels and competitive hybridization, Analyt. Biochem. 183, 231–244.
Morrison, L. E. und Stols, L. M. (1993), Sensitive fluorescence-based thermodynamic and kinetic measurements of DNA hybridization in solution, Biochemistry 32, 3095–3104.
Muesing, M. A., Smith, D. H., Cabrailla, C. D., Benton, C. V., Lasky, L. A. und Eopon, D. J., (1985), Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/adenopathy retrovirus, Nature 313, 450–458.
Nelson, P. S., Fry, R. A. und Liu, E., (1989), Bifunctional oligonuceotide probes synthesized using a novel CPG support are able to detect single base pair mutations, Nucleic Acids Res. 17, 7187–7194.
Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., (1989), Molecular cloning – a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Shore, D., Langowski, J. und Baldwind, R. L., (1981), DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 4833–4827.
Walker, G. T., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G. und Malinowski, D. P., (1992), Strand displacement amplification – an isothermal, in vitro DNA amplification technique, Nucleic Acids Res. 20, 1691–1696.
Wang, G. T., Matayoshi, E. D., Huffaker, H. J. und Krafft, G. A., (1991), Design and synthesis of new fluorogenic HIV protease substrates based on resonance energy transfer, Tetrahedron Lett. 31, 6493–6496.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zur homogenen Detektion von mindestens einem Amplifikationsprodukt einer Nukleinsäureamplifikationsreaktion umfassend:
Zugeben einer Dualkonformation-Oligonukleotidhybridisierungssonde zu einem Nukleinsäureamplifikationsreaktionsgemisch, die eine Target-komplementäre Sequenz aufweist, beziehungsweise hybridisierbar gegen das mindestens eine Amplifikationsprodukt, flankiert von einem Paar komplementärer Armsequenzen ist, markiert mit einem Fluorophor und einem nicht-fluoreszierenden Quencher, der in der Lage ist, die Fluoreszenz von dem Fluorophor durch Fluoreszenzresonanzenergietransfer zu absorbieren
Durchführen der Nukleinsäureamplifikationsreaktion; und
Detektieren der Zunahme an Fluoreszenz von dem Fluorophor unter Bedingungen, bei denen die Target-komplementäre Sequenz an das mindestens eine Amplifikationsprodukt bindet, als ein Anzeichen für das Vorhandensein des mindestens einen Amplifikationsprodukts,
wobei während des Schritts des Detektierens die komplementären Arme der Sonde aneinander hybridisieren um einen Stammduplex zu bilden, was dem Quencher erlaubt, die Fluoreszenzemission von dem Fluorophor zu absorbieren, jedoch bei Kontakt der Sonde mit dem mindestens einen Amplifikationsprodukt innerhalb weniger Sekunden die Hybridisierung der Target-komplementären Sequenz der Sonde an das mindestens eine Amplifikationsprodukt den doppelsträngigen Stammduplex überwiegt und den Fluorophor von dem Quencher trennt,
und wobei die Schritte des Durchführens der Amplifikationsreaktion und des Detektierens des mindestens einen Amplifikationsprodukts in einem geschlossenen Reaktionsgefäß durchgeführt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Schritt des Detektierens während der Amplifikationsreaktion in Echtzeit durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Amplifikationsreaktion eine Polymerasekettenreaktion ist, umfassend wiederholte Temperaturzyklen von Denaturierungs-, Anlagerungs- und Verlängerungstemperaturen, und wobei während des Rampings von der Denaturierungstemperatur zur Anlagerungstemperatur die Sonden, die nicht an das mindestens eine Amplifikationsprodukt hybridisieren, schnell ein Stammhybrid bilden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–3, wobei der nicht-fluoreszierende Quencher DABCYL ist.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

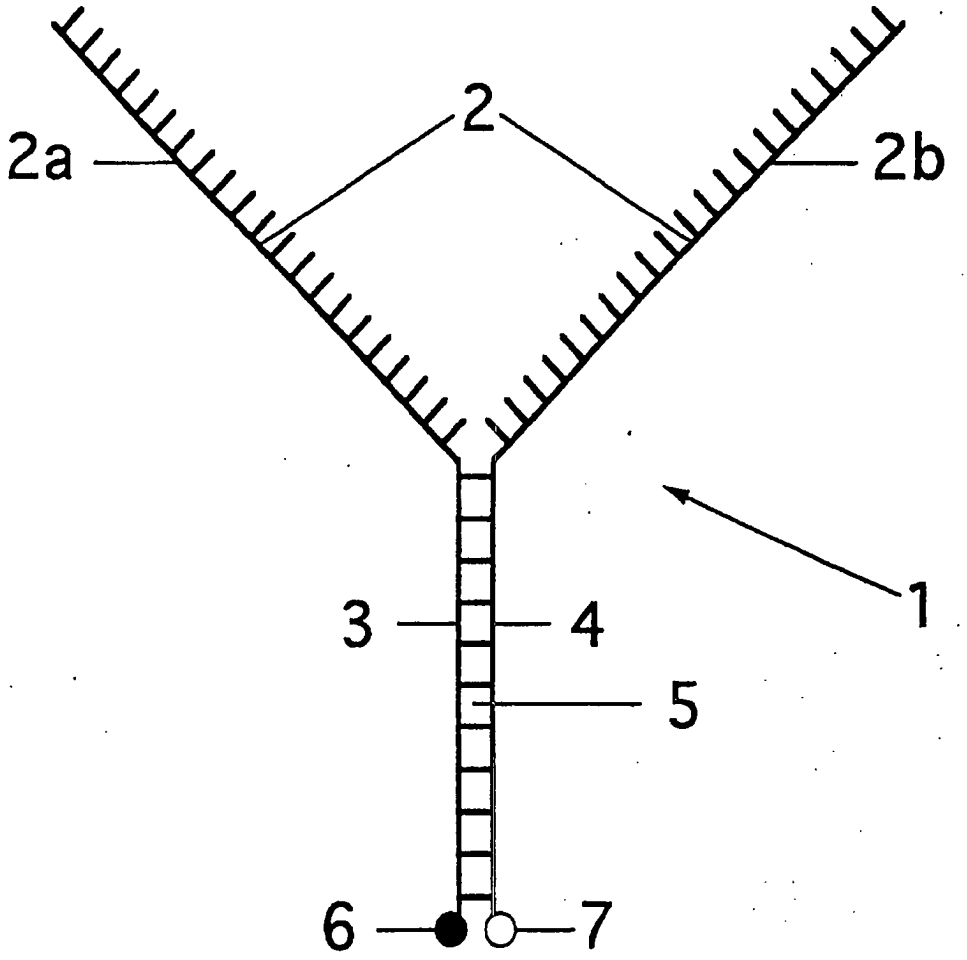


FIG. 1

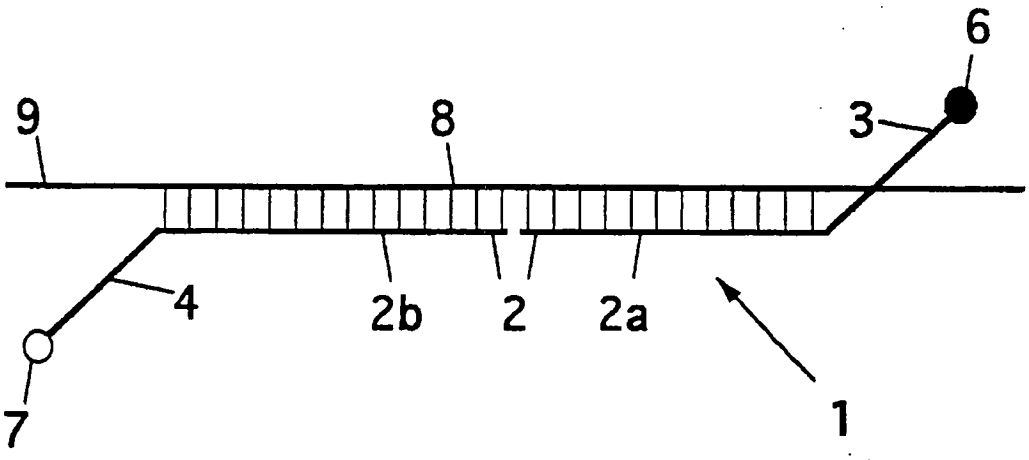


FIG. 2

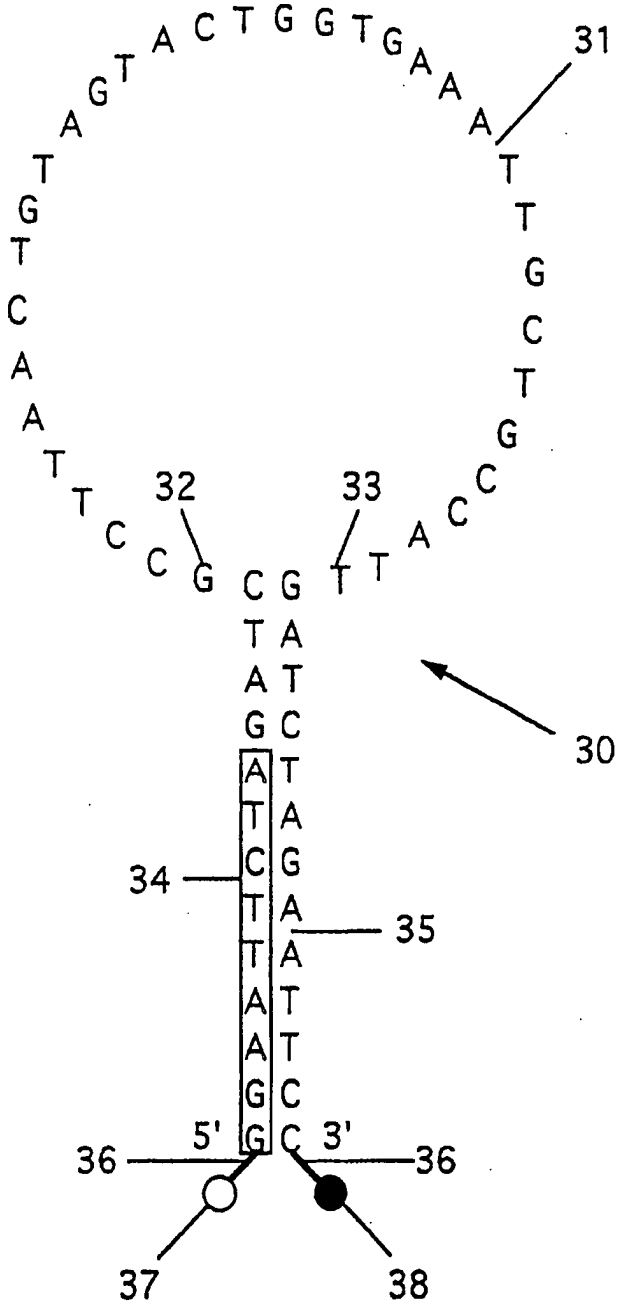


FIG. 3

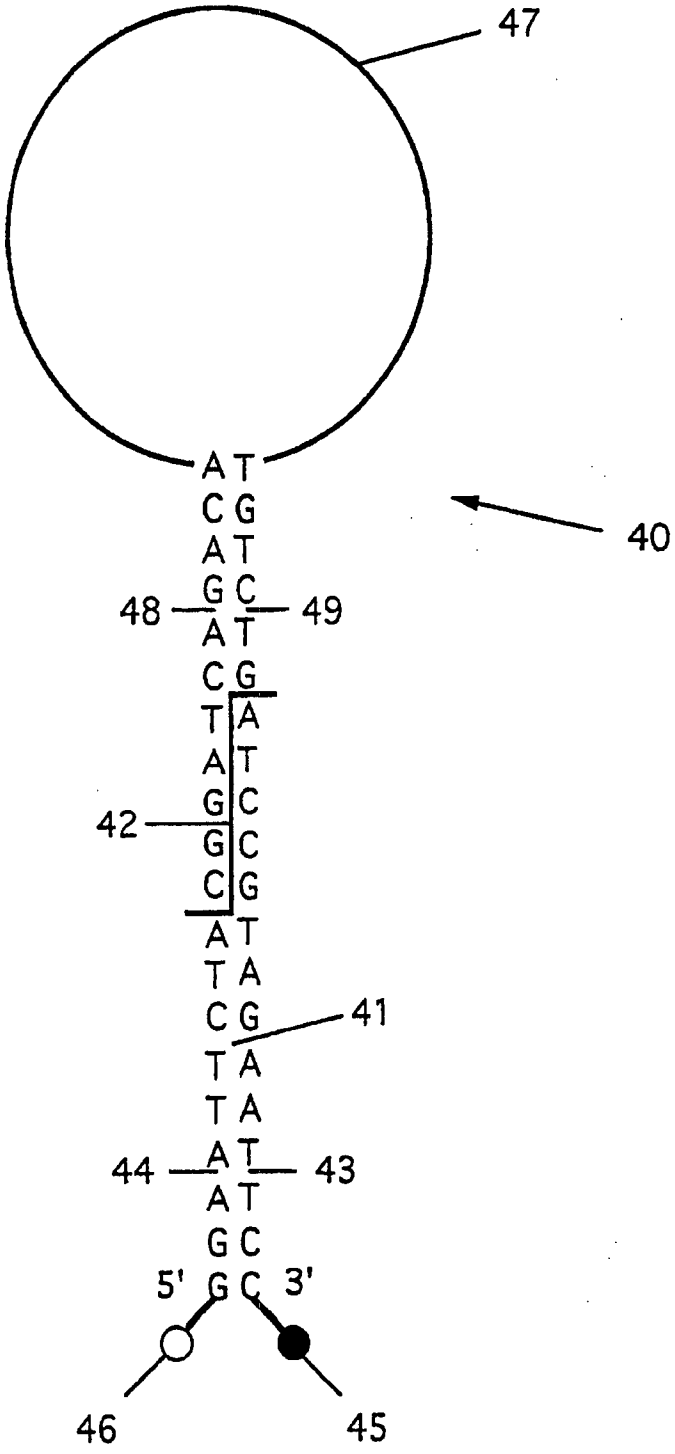


FIG. 4

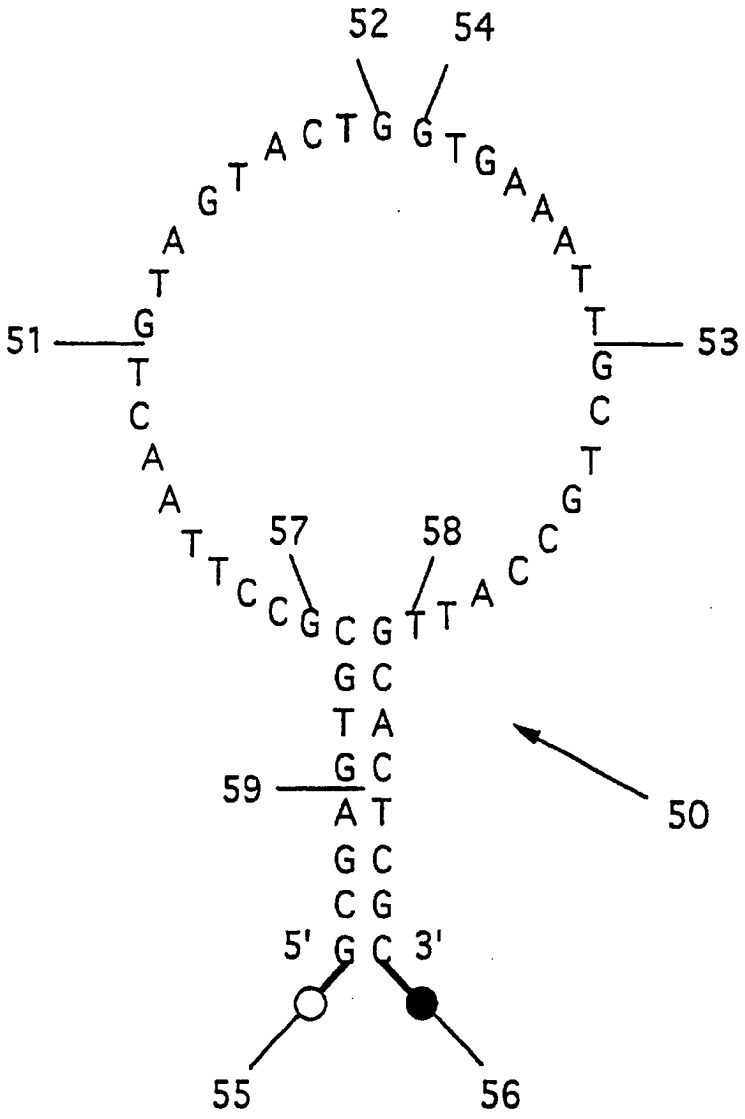


FIG. 5

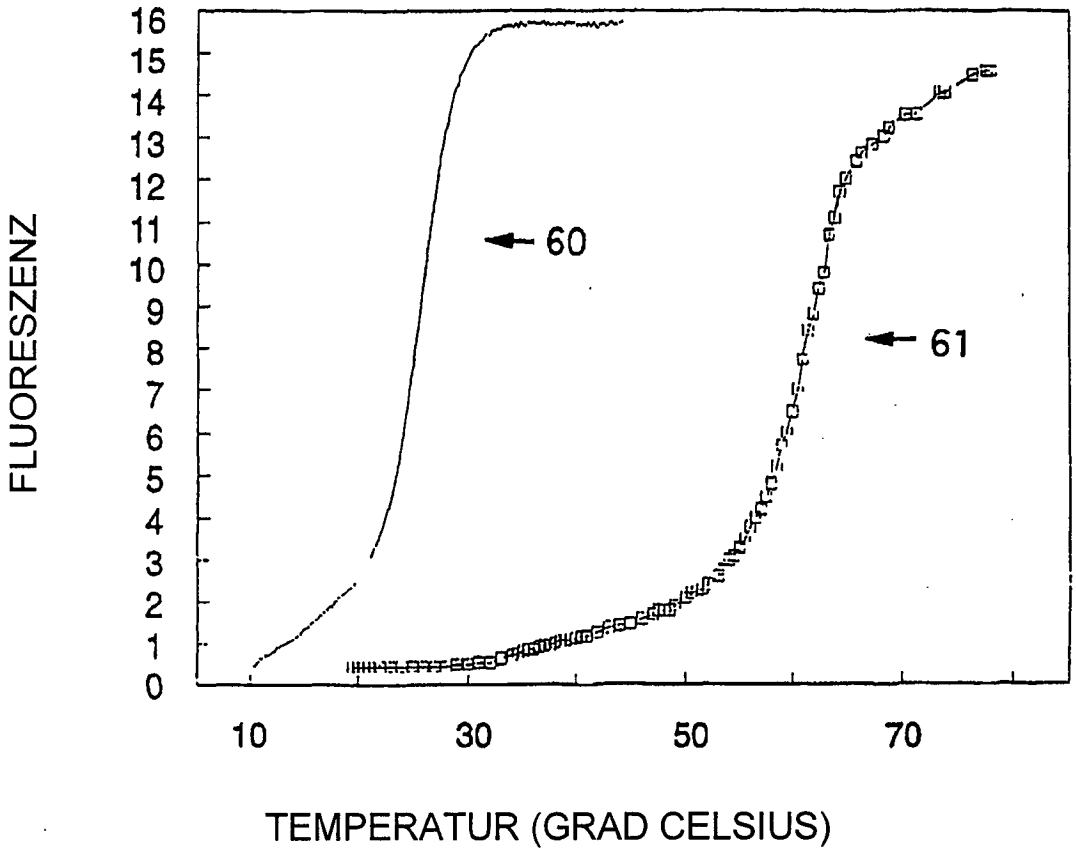

FLUORESZENZ
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
60
61
10
30
50
70
TEMPERATUR (GRAD CELSIUS)

FIG. 6

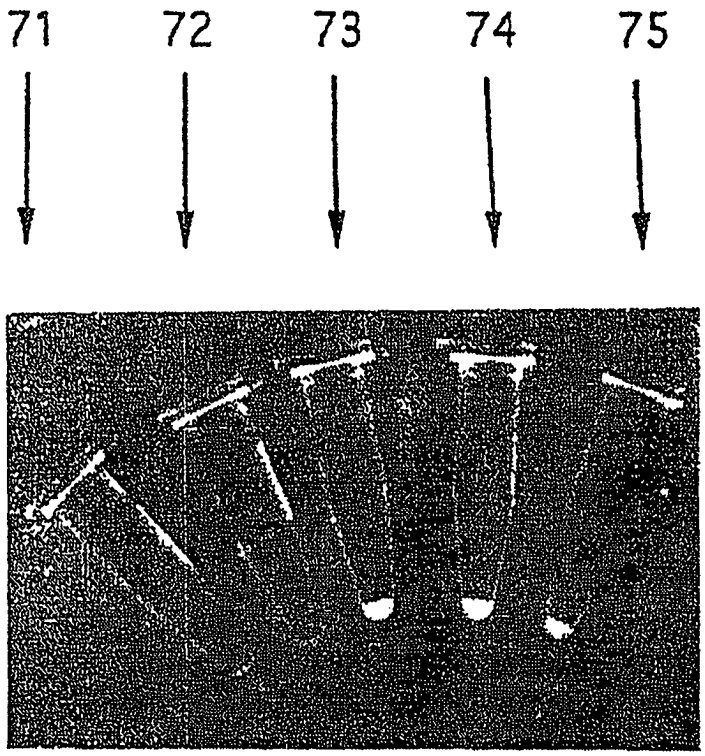


FIG. 7

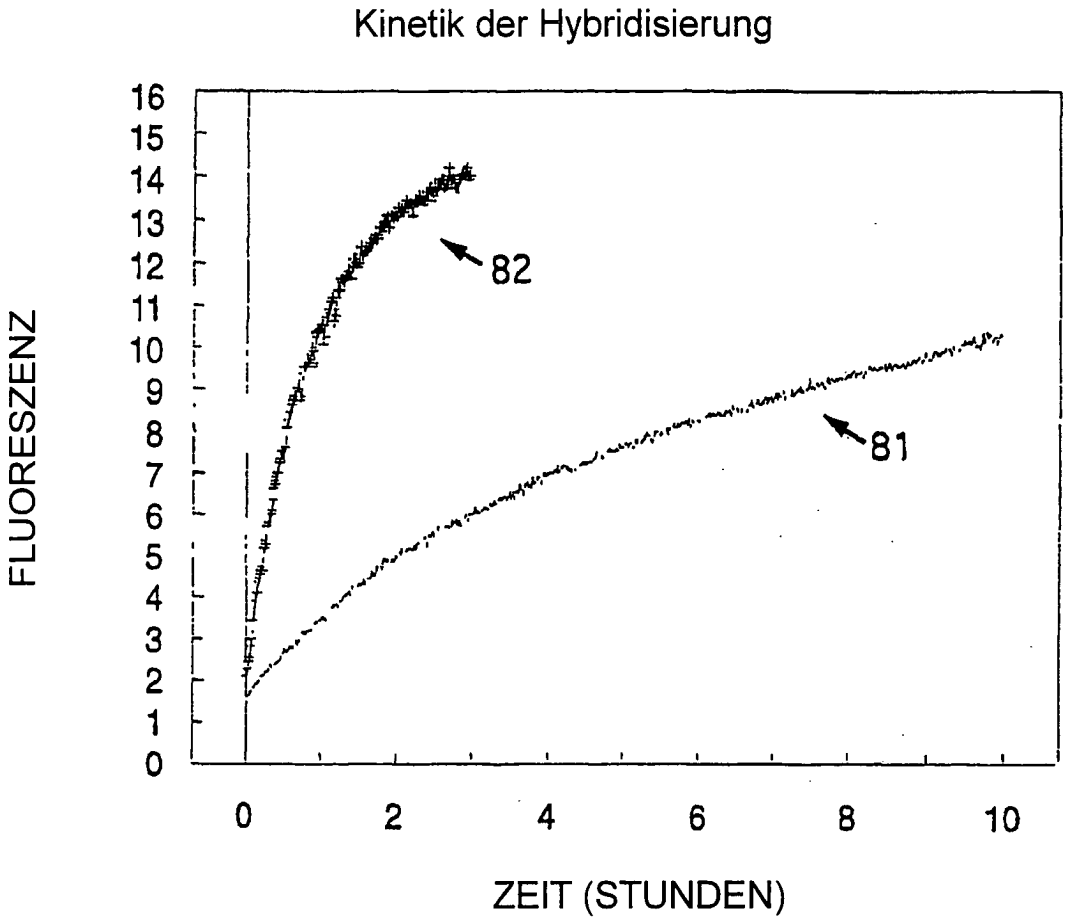

Kinetik der Hybridisierung
FLUORESZENZ
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
82
81
0
2
4
6
8
10
ZEIT (STUNDEN)

FIG. 8

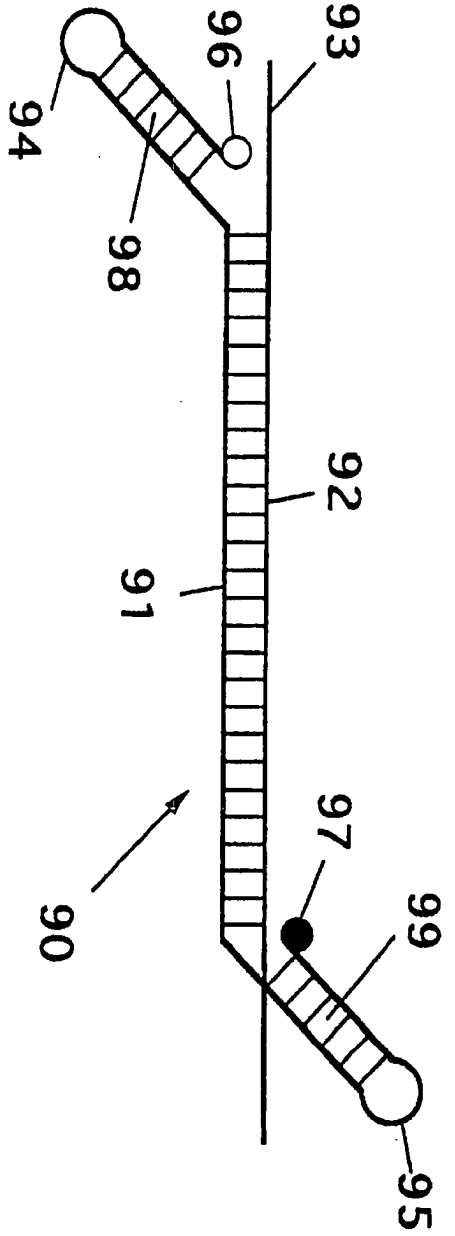


FIG. 9

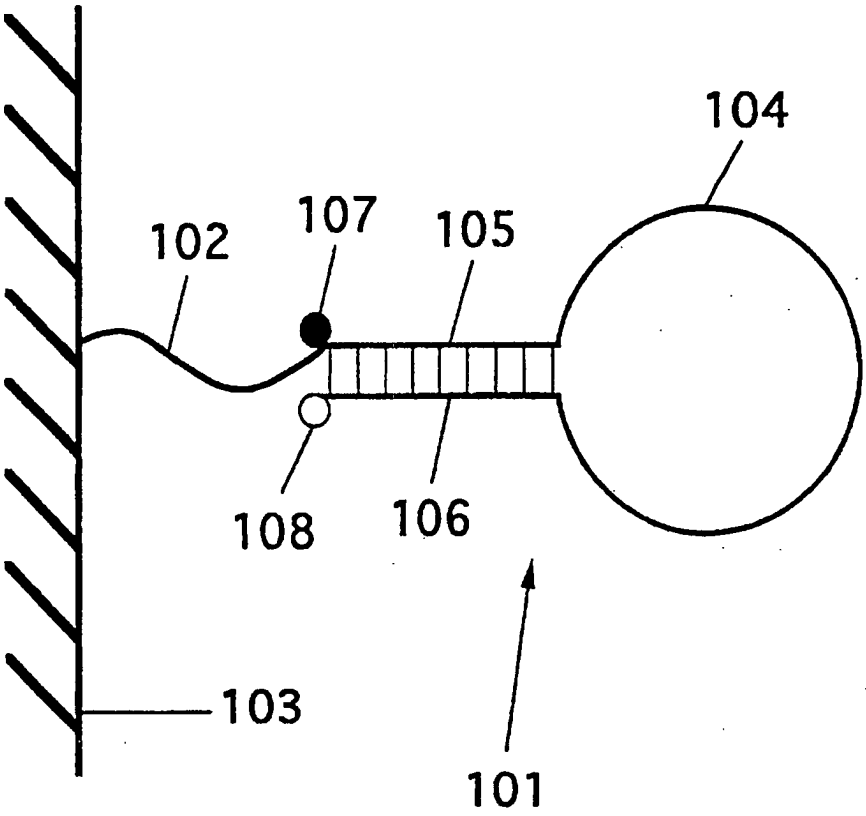


FIG. 10