



(10) **DE 60 2004 036 672 C5** 2012.11.29

(12)

Geänderte Patentschrift

Europäische Veröffentlichungsnummer
(97) **EP 2 145 955 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 036 672.2**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **09 17 5588.4**
(96) Europäischer Anmeldetag: **28.01.2004**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.01.2010**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.02.2012**
(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: –

(51) Int Cl.: **C12N 15/10** (2012.01)
C12Q 1/68 (2012.01)

Patent im Beschränkungsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

| | | |
|-----------------|-------------------|-----------|
| 443471 P | 29.01.2003 | US |
| 465071 P | 23.04.2003 | US |
| 476602 P | 06.06.2003 | US |
| 476313 P | 06.06.2003 | US |
| 476592 P | 06.06.2003 | US |
| 476504 P | 06.06.2003 | US |
| 497985 P | 25.08.2003 | US |

(73) Patentinhaber:

**454 Life Sciences Corporation, Branford, Conn.,
US**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler LLP,
81675, München, DE**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR**

(72) Erfinder:

**Srinivasan, Maithreyan, Mountain View, CA
94043, US; Chen, Yi-Ju, New Haven, CT 06510,
US; Weiner, Michael, Guilford, CT 06437, US;
Lefkowitz, Steven, Branford, CT 06405, US;
Lohman, Kenton, Guilford, CT 06437, US; Sarkis,
Gary J., Guilford, CT 06437, US; Leamon, John
H., Guilford, CT 06437, US; Berka, Jan, Guilford,
CT 06437, US; Rothberg, Jonathan, Guilford, CT
06437, US; Makhijani, Vinod, Branford, CT 06405,
US**

(54) Bezeichnung: **Nukleinsäureamplifikation auf Basis von Kügelchenemulsion**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zum Anreichern eines Amplikons, umfassend:

(a) Verteilen einer Amplifikationslösung, die ein ausreichendes Gemisch von Reagentien, die zur Durchführung einer Amplifikationsreaktion der Templat-DNA erforderlich sind, eine Mehrzahl von Kügelchen und eine Mehrzahl von Arten von Templat-DNAs umfasst, in einer Mehrzahl von wässrigen Mikroemulsionströpfchen in einer wärmestabilen Ölphase, wobei ein erster Teilsatz der Tröpfchen ein Kügelchen und eine oder mehrere der Arten von Templat-DNAs darin eingekapselt umfasst, und ein zweiter Teilsatz der Tröpfchen ein Kügelchen ohne irgendeine der Arten von Templat-DNA darin eingekapselt umfasst,

(b) Amplifizieren der Arten von Templat-DNAs innerhalb des ersten Teilsatzes von Tröpfchen, wobei das Kügelchen innerhalb des ersten Teilsatzes von wässrigen Tröpfchen ein daran immobilisiertes Amplikon aufweist,

(c) Aufbrechen der wässrigen Emulsionströpfchen zum Freisetzen der Kügelchen des ersten und des zweiten Teilsatzes,

(d) Hybridisieren eines biotinylierten Primers an das Kügelchen-immobilisierte Amplikon, der zu dem 3'-Ende des Amplikons komplementär ist und in Schritt (e)...

Beschreibung

[0001] Es liegt zur Veröffentlichung keine Beschreibung vor.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Anreichern eines Amplikons, umfassend:

- (a) Verteilen einer Amplifikationslösung, die ein ausreichendes Gemisch von Reagentien, die zur Durchführung einer Amplifikationsreaktion der Templat-DNA erforderlich sind, eine Mehrzahl von Kügelchen und eine Mehrzahl von Arten von Templat-DNAs umfasst, in einer Mehrzahl von wässrigen Mikroemulsionsströpfchen in einer wärmestabilen Ölphase, wobei ein erster Teilsatz der Tröpfchen ein Kügelchen und eine oder mehrere der Arten von Templat-DNAs darin eingekapselt umfasst, und ein zweiter Teilsatz der Tröpfchen ein Kügelchen ohne irgendeine der Arten von Templat-DNA darin eingekapselt umfasst,
- (b) Amplifizieren der Arten von Templat-DNAs innerhalb des ersten Teilsatzes von Tröpfchen, wobei das Kügelchen innerhalb des ersten Teilsatzes von wässrigen Tröpfchen ein daran immobilisiertes Amplikon aufweist,
- (c) Aufbrechen der wässrigen Emulsionströpfchen zum Freisetzen der Kügelchen des ersten und des zweiten Teilsatzes,
- (d) Hybridisieren eines biotinylierten Primers an das Kügelchen-immobilisierte Amplikon, der zu dem 3'-Ende des Amplikons komplementär ist und in Schritt (e) durch ein Streptavidin-beschichtetes Kügelchen zur Bildung eines Biotin-Streptavidin-Einfang-Ziel-Paars immobilisiert wird,
- (e) Bilden eines Komplex aus Amplikon-immobilisierten Kügelchen und Anreicherungskügelchen, wobei das Streptavidin-beschichtete Anreicherungskügelchen, welches für die Anziehungskraft eines Magnetfeldes empfänglich ist, und der hybridisierte biotinylierte Primer ein Biotin-Streptavidin-Einfang-Ziel-Paar bilden, und
- (f) Anwenden eines Magnetfeldes zum Isolieren des Kügelchen-Komplexes mit einer Anreicherung von Amplikon-immobilisierten Kügelchen von solchen Kügelchen, die kein gebundenes Amplikon aufweisen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem in dem Schritt des Amplifizierens ein Polymerasekettenreaktion-Amplifizierungsprozess eingesetzt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, das ferner das Rezyklisieren und Wiederverwendens der Kügelchen des zweiten Teilsatzes umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 1, das ferner das Verlängern des an das 3'-Ende des Amplikons hybridisierten biotinylierten Primers von Schritt (d) durch Zusetzen von DNA-Polymerase und der vier natürlichen Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) zu dem

Kügelchengemisch umfasst, wobei die Verlängerung die Bindung zwischen dem biotinylierten Primer und dem Kügelchen-immobilisierten Amplikon verstärkt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren ferner umfasst: Trennen des biotinylierten Primers von dem Kügelchen-immobilisierten Amplikon zum Trennen der Streptavidin-beschichteten Anreicherungskügelchen von dem Amplikon-immobilisierten Kügelchen.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen