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

(10) **DE 698 35 015 T2** 2007.05.16

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 994 964 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 35 015.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/05809**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 914 299.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/042873**
(86) PCT-Anmeldetag: **24.03.1998**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **01.10.1998**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.04.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **21.06.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.05.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)
C12P 19/32 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
823516 **24.03.1997** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Third Wave Technologies, Inc., Madison, Wis., US

(74) Vertreter:
Glawe, Delfs, Moll, Patentanwälte, 20148 Hamburg

(72) Erfinder:
HALL, G., Jeff, Madison, WI 53719, US;
LYAMICHEV, Victor I., Madison, WI 53711, US;
MAST, L., Andrea, Madison, WI 53704, US; BROW, Ann, Mary, Madison, WI 53711, US;
KWIATKOWSKI, W., Robert, Verona, WI 53593, US;
VAVRA, H., Stephanie, Waunakee, WI 53597, US

(54) Bezeichnung: **BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN DURCH MEHRFACHE SEQUENZIELLE INVASIVE SPALTUNG**

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

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung ist in den Ansprüchen definiert und betrifft Mittel für den Nachweis und die Charakterisierung von Nukleinsäuresequenzen und Variationen in Nukleinsäuresequenzen. Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Ausbilden einer Nukleinsäurespaltungsstruktur in einer Zielsequenz und zum Spalten der Nukleinsäurespaltungsstruktur auf positionsspezifische Art und Weise. Die 5'-Nukleaseaktivität verschiedener Enzyme wird verwendet, um die zielabhängige Spaltungsstruktur zu spalten, wodurch das Vorhandensein spezifischer Nukleinsäuresequenzen oder spezifischer Variationen davon angezeigt wird. Die vorliegende Erfindung sieht des Weiteren neuartige Verfahren und Vorrichtungen für die Auftrennung von Nukleinsäuremolekülen auf der Basis der Ladung vor. Die vorliegende Erfindung sieht des Weiteren Verfahren zum Nachweis von Nicht-Zielspaltungsprodukten über die Bildung eines vollständigen und aktivierten Proteinbindungsbereiches vor.

ALLGEMEINER STAND DER TECHNIK

[0002] Nachweis und Charakterisierung spezifischer Nukleinsäuresequenzen und Sequenzvariationen wurden verwendet, um das Vorhandensein viraler oder bakterieller Nukleinsäuresequenzen nachzuweisen, die eine Infektion, das Vorhandensein von Varianten oder Allelen von Säugergenen in Verbindung mit Krankheit und Krebserkrankungen und die Identifizierung der Quelle von Nukleinsäuren anzeigen, die in forensischen Proben gefunden werden, sowie beim Vaterschaftsnachweis.

[0003] Es sind verschiedene Verfahren aus dem Stand der Technik bekannt, die zum Nachweis und zur Charakterisierung spezifischer Nukleinsäuresequenzen und Sequenzvarianten verwendet werden können. Dennoch steigt im Zuge der Häufung von Nukleinsäuresequenzdaten des menschlichen Genoms sowie der Genome pathogener Organismen der Bedarf nach schnellen, zuverlässigen, kostenwirksamen und anwenderfreundlichen Tests zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen weiter. Vor allem müssen diese Tests in der Lage sein, in Proben, die sehr wenige Kopien der relevanten Sequenz enthalten, ein nachweisbares Signal zu erzeugen. Die folgende Diskussion untersucht zwei Arten derzeit gebräuchlicher Tests zum Nukleinsäurenachweis: I. Signalamplifizierungstechnologie für den Nachweis seltener Sequenzen, und II. Direktnachweistechnologie für den quantitativen Sequenznachweis.

I. Signalamplifizierungstechnologie-Verfahren für die Amplifizierung

[0004] Die „Polymerasekettenreaktion" (Polymerase Chain Reaction, PCR) umfasst die erste Generation von Verfahren zur Nukleinsäureamplifizierung. Dennoch sind mehrere andere Verfahren entwickelt worden, die dieselbe Spezifitätsbasis nutzen, aber Signale mittels anderer Amplifizierungsmechanismen erzeugen. Zu diesen Methoden gehören die „Ligasekettenreaktion" (Ligase Chain Reaction, LCR), die „Selbst erhaltende Synthesereaktion" (Self-sustained Synthetic Reaction, 3SR/NASBA) und die „Qβ-Replikase" (Qβ).

Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

[0005] Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), wie beschrieben in US-Patent Nr. 4,683,195 und 4,683,202 an Mullis und Mullis et al., beschreibt ein Verfahren zum Erhöhen der Konzentration eines Segments einer Zielsequenz in einer Mischung aus genomischer DNA ohne Klonierung oder Reinigung. Diese Technologie liefert einen Ansatz zur Lösung des Problems einer niedrigen Zielsequenzkonzentration. PCR kann verwendet werden, um die Konzentration der Zielnukleinsäure direkt auf ein leicht nachweisbares Maß zu erhöhen. Dieser Prozess zum Amplifizieren der Zielsequenz umfasst das Einführen eines molaren Überschusses zweier Oligonukleotidprimer, die zu ihren jeweiligen Strängen der doppelsträngigen Zielsequenz komplementär sind, in das DNA-Gemisch, welches die gewünschte Zielsequenz aufweist. Das Gemisch wird denaturiert und kann anschließend hybridisieren. Nach der Hybridisierung werden die Primer von der Polymerase verlängert, um komplementäre Stränge zu bilden. Die Schritte der Denaturierung, Hybridisierung und Polymeraseverlängerung (Polymeraseextension) lassen sich so oft wie nötig wiederholen, um relativ hohe Konzentrationen eines Segments der gewünschten Zielsequenz zu erhalten.

[0006] Die Länge des Segments der gewünschten Zielsequenz wird durch die relativen Positionen der Primer zueinander bestimmt, und diese Länge ist daher ein kontrollierbarer Parameter. Da die gewünschten Segmente der Zielsequenz in dem Gemisch die dominanten Sequenzen werden (was die Konzentration anbelangt), werden sie als „PCR-amplifiziert" bezeichnet.

Ligasekettenreaktion (Ligase Chain Reaction; LCR oder LAR)

[0007] Die Ligasekettenreaktion (Ligase Chain Reaction, LCR; bisweilen bezeichnet als „Ligase Amplifizierungsreaktion" oder LAR), beschrieben von Barany, Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 189 (1991); Barany, PCR Methods and Applic. 1: 5 (1991); und Wu and Wallace, Genomics 4: 560 (1989), hat sich zu einem anerkannten Alternativverfahren zum Amplifizieren von Nukleinsäuren entwickelt. Bei der LCR werden vier Oligonukleotide, zwei benachbarte Oligonukleotide, die speziell an einen DNA-Zielstrang hybridisieren, und ein komplementärer Satz benachbarter Oligonukleotide, die an den gegenüber liegenden Strang hybridisieren, gemischt, und dem Gemisch wird DNA-Ligase zugegeben. Unter der Voraussetzung einer vollständigen Komplementarität an der Verbindungsstelle verbindet die Ligase jeden Satz hybridisierender Moleküle kovalent. Vor allem werden zwei Sonden bei der LCR nur dann miteinander ligiert, wenn sie mit Sequenzen in der Zielprobe ohne Lücken und Fehlpaarungen Basenpaarungen eingehen. Wiederholte Zyklen von Denaturierung, Hybridisierung und Ligierung amplifizieren ein kurzes DNA-Segment. LCR wurde auch in Kombination mit PCR eingesetzt, um einen verstärkten Nachweis einzelner Basenveränderungen zu erreichen. Segev, PCT-Veröffentlichung Nr. WO 9001069 A1 (1990). Da die vier bei diesem Test verwendeten Oligonukleotide jedoch Paarungen eingehen können, um zwei kurze ligierbare Fragmente zu bilden, besteht die Möglichkeit der Entstehung eines zielunabhängigen Hintergrundsignals. Die Verwendung der LCR für Mutantentests ist auf die Untersuchung spezifischer Nukleinsäurepositionen beschränkt.

Selbst erhaltende Synthesereaktion (Self-Sustained Synthetic Reaction, 3SR/NASBA)

[0008] Die selbst erhaltende Synthesereaktion (Self-Sustained Synthetic Reaction, 3SR) (Guatelli et al., Proc. Natl. Acad., Sci., 87: 1874–1878 [1990], mit einem Erratum in Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 7797 [1990]) ist ein transkriptionsbasiertes In-vitro-Amplifizierungsystem (Kwok et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 1173–1177 [1989]), das RNA-Sequenzen bei einer einheitlichen Temperatur exponentiell amplifitieren kann. Die amplifizierte RNA kann dann zum Nachweis von Mutationen verwendet werden (Fahy et al., PCR Meth. Appl., 1: 25–33 [1991]). Bei diesem Verfahren wird ein Oligonukleotidprimer verwendet, um dem 5'-Ende der relevanten Sequenz einen RNA-Phagen-Polymerasepromotor hinzuzufügen. In einer Mischung von Enzymen und Substraten, die einen zweiten Primer, reverse Transkriptase, RNase H, RNA-Polymerase und Ribo- und Desoxyribonukleosidtriphosphate enthält, durchläuft die Zielsequenz wiederholten Runden von Transkription, cDNA-Synthese und Synthese des zweiten Stranges, um den relevanten Bereich zu amplifizieren. Die Anwendung von 3SR zum Nachweis von Mutationen ist kinetisch auf die Untersuchung kleiner DNA-Segmente (z. B. 200–300 Basenpaare) beschränkt.

Q-Beta (Qβ)-Replikase

[0009] Bei diesem Verfahren wird eine Sonde, welche die relevante Sequenz erkennt, an die replizierbare RNA-Vorlage für die Qβ-Replikase angebracht. Ein früher identifiziertes Problem mit Falsch-Positiven infolge der Replikation nicht hybridisierter Sonden, wurde durch Verwendung eines sequenzspezifischen Ligationsschrittes gelöst. Die verfügbaren thermostabilen DNA-Ligasen sind jedoch bei diesem RNA-Substrat nicht wirksam, deshalb muss die Ligation von der T4-DNA-Ligase bei niedrigen Temperaturen (37°C) durchgeführt werden. Dies verhindert die Verwendung hoher Temperatur, um eine Spezifität wie bei der LCR zu erreichen. Das Ligationsereignis kann verwendet werden, um eine Mutation an der Verbindungsstelle nachzuweisen, aber nirgendwo sonst.

[0010] Tabelle 1 unten listet einige Merkmale auf, die für Systeme wünschenswert sind, welche für die empfindliche Nukleinsäurediagnostik geeignet sind, und fasst die Fähigkeiten jedes der wichtigsten Amplifizierungsverfahren zusammen (siehe auch Landgren, Trends in Genetics 9: 199 [1993]).

[0011] Ein erfolgreiches diagnostisches Verfahren muss sehr spezifisch sein. Ein praktisches Verfahren zum Kontrollieren der Spezifität einer Nukleinsäurehybridisierung besteht aus dem Kontrollieren der Reaktionstemperatur. Während die 3SR/NASBA- und Qβ-Systeme alle in der Lage sind, eine hohe Signalmenge zu erzeugen, können eines oder mehrere Enzyme, die jeweils beteiligt sind, nicht bei hoher Temperatur (d. h. > 55°C) verwendet werden. Die Reaktionstemperaturen können daher nicht erhöht werden, um eine unspezifische Hybridisierung der Sonden zu verhindern. Werden die Sonden verkürzt, damit sie bei niedrigen Temperaturen leichter schmelzen, steigt die Wahrscheinlichkeit, in einem komplexen Genom mehr als eine perfekte Paarung zu erhalten. Aus diesen Gründen wird das Forschungsgebiet der Nachweistechnologien derzeit von der PCR und der LCR dominiert.

TABELLE 1

Merkmal	Verfahren				
	PCR	LCR	PCR & LCR	3SR NASBA	Qβ
Amplifiziert die Zielsequenz	+	+	+	+	+
Erkennung unabhängiger Sequenzen erforderlich	+	+	+	+	+
Wird bei hohen Temperaturen durchgeführt	+	+			
Arbeitet bei festen Temperaturen				+	+
Exponentielle Amplifizierung	+	+	+	+	+
Erzeugung eines allgemeinen Signals					+
Einfach automatisierbar					

[0012] Die Grundlage des Amplifizierungsverfahrens bei der PCR und LCR ist die Tatsache, dass die Produkte eines Zyklus geeignete Vorlagen bei allen anschließenden Zyklen werden, was die Population deshalb bei jedem Zyklus verdoppelt. Die abschließende Ausbeute aus solchen Verdoppelungssystemen lässt sich ausdrücken als: $(1 + X)^n = y$, wobei „X" die mittlere Effizienz (prozentuale Kopien in jedem Zyklus), „n" die Anzahl der Zyklen und „y" die Gesamteffizienz bzw. die Ausbeute der Reaktion darstellt (Mullis, PCR Methods Applic., 1: 1 [1991]). Wenn. jede Kopie einer Ziel-DNA in jedem Zyklus einer Polymerasekettenreaktion als Vorlage eingesetzt wird, beträgt die mittlere Effizienz 100%. Wenn 20 PCR-Zyklen durchgeführt werden, liegt die Ausbeute bei 2^{20} bzw. 1.048.576 Kopien des Ausgangsmaterials. Wenn die Reaktionsbedingungen die mittlere Effizienz auf 85% reduzieren, ist die Ausbeute aus diesen 20 Zyklen lediglich $1{,}85^{20}$ bzw. 220.513 Kopien des Ausgangsmaterials. In anderen Worten heißt dies, dass eine PCR mit einer Effizienz von 85% nur 21% des Endproduktes im Vergleich zu einer Reaktion, die mit einer Effizienz von 100% abläuft. Eine Reaktion, die auf eine mittlere Effizienz von 50% reduziert ist, ergibt weniger als 1% Ausbeute des möglichen Produktes.

[0013] In der Praxis erreichen routinemäßig durchgeführte Polymerasekettenreaktionen selten die theoretische maximale Ausbeute, und PCR-Verfahren werden in der Regel über mehr als 20 Zyklen durchgeführt, um die geringere Ausbeute zu kompensieren. Bei einer mittleren Effizienz von 50% wären 34 Zyklen erforderlich, um die millionenfache Amplifizierung zu erreichen, die theoretisch bei 20 Zyklen möglich ist, und bei niedrigeren Effizienzen verbietet sich die erforderliche Anzahl an Zyklen selbst. Darüber hinaus werden etwaige Hintergrundprodukte, die mit einer besseren mittleren Effizienz als die beabsichtigte Zielnukleinsäure amplifizieren, die dominanten Produkte.

[0014] Die mittlere Effizienz der PCR wird außerdem von vielen Variablen beeinflusst, einschließlich durch

Länge und Sekundärstruktur der DNA, Länge und Design der Primer, Konzentration von Primer und dNTPs und der Pufferzusammensetzung, um nur Einige zu nennen. Auch die Kombination der Reaktion mit exogener DNA (z. B. auf Laborarbeitsflächen verschüttete DNA) oder Kreuzkontaminierung sind wesentliche Gesichtspunkte. Die Reaktionsbedingungen müssen für jedes Primerpaar und jede Zielsequenz sorgfältig optimiert werden, und das Verfahren kann Tage dauern, selbst für einen erfahrenen Wissenschaftler. Die Aufwändigkeit dieses Prozesses, einschließlich der zahlreichen technischen Gesichtspunkte und anderer Faktoren, ist ein wesentlicher Nachteil der Anwendung der PCR im klinischen Umfeld. Tatsächlich hat die PCR den klinischen Markt noch nicht wesentlich durchdringen können. Dieselben Bedenken ergeben sich in Verbindung mit der LCR, da die LCR ebenfalls optimiert werden muss, um verschiedene Oligonukleotidsequenzen für jede Zielsequenz anwenden zu können. Beide Verfahren erfordern darüber hinaus teuere Ausrüstung, die in der Lage sein muss, präzise Temperaturzyklen durchzuführen.

[0015] Viele Anwendungen von Nukleinsäurenachweistechnologien, wie beispielsweise bei Untersuchungen von Allelvariation, umfassen nicht nur den Nachweis einer spezifischen Sequenz vor einem komplexen Hintergrund, sondern auch die Unterscheidung zwischen Sequenzen mit wenigen oder einzelnen Nukleotidunterschieden. Ein Verfahren zum Nachweis allelspezifischer Varianten mittels PCR beruht auf der Tatsache, dass es der Taq-Polymerase schwer fällt, einen DNA-Strang zu synthetisieren, wenn Vorlagenstrang und 3'-Ende des Primers nicht zueinander passen bzw. eine so genannte Fehlpaarung bzw. Mismatch vorliegt. Eine allelspezifische Variante kann durch Verwendung eines Primers nachgewiesen werden, der zu lediglich einem der möglichen Allele perfekt passt. Die Fehlpaarung mit dem anderen Allel verhindert die Verlängerung des Primers und damit die Amplifizierung dieser Sequenz. Dieses Verfahren hat insofern eine erhebliche Einschränkung, als die Basenzusammensetzung der Fehlpaarung die Fähigkeit zur Verhinderung einer Verlängerung über die Fehlpaarung hinweg beeinflusst, und bestimmte Fehlpaarungen verhindern die Verlängerung nicht bzw. haben nur einen minimalen Effekt (Kwok et al., Nucl. Acids Res., 18: 999 [1990]).

[0016] Eine ähnliche 3'-Fehlpaarungsstrategie wird mit größerem Erfolg verwendet, um eine Ligation bei der LCR zu verhindern (Barany, PCR Meth. Applic., 1: 5 [1991]). Jede Fehlpaarung blockiert wirksam die Aktion der thermostabilen Ligase, aber die LCR weist dennoch den Nachteil von Produkten infolge einer zielunabhängigen Hintergrundligation auf, welche die Amplifizierung initiieren. Abgesehen davon ist die Kombination von PCR mit einer anschließenden LCR zur Identifizierung der Nukleotide an individuellen Positionen eine eindeutig mühsame Prämisse für ein klinisches Labor.

II. Direktnachweistechnologie

[0017] Liegt die nachzuweisende Nukleinsäure in ausreichender Menge vor, ist es von Vorteil, diese Sequenz direkt nachzuweisen, anstatt mehr Kopien dieses Zieles herzustellen (z. B. wie bei der PCR oder LCR). So ist ein Verfahren, dass keine Signalamplifizierung durchführt, für eine quantitative Analyse erheblich besser geeignet. Selbst wenn das Signal durch Anbringung mehrere Farbstoffe an ein einzelnes Oligonukleotid verstärkt wird, besteht dennoch eine direkte Korrelation zwischen der Signalendintensität und der Menge der Zielsequenz. Ein solches System hat den zusätzlichen Vorteil, dass die Reaktionsprodukte selbst keine weitere Reaktion auslösen, deshalb ist die Verunreinigung von Laborarbeitsflächen durch die Produkte kein so großes Problem. Traditionelle Verfahren des direkten Nachweises, einschließlich Northern und Southern Blotting und RNase-Protektionsverfahren, erfordern in der Regel die Anwendung von Radioaktivität und lassen sich nicht automatisieren. Kürzlich wurden spezielle Techniken gesucht, um die Anwendung von Radioaktivität zu beseitigen und/oder die Empfindlichkeit in automatisierbaren Formaten zu verbessern. Zwei Beispiele sind die „Zyklussondenreaktion" (Cycling Probe Reaction, CPR) und die „Verzweigte DNA" (Branched DNA, bDNA).

[0018] Die Zyklussondenreaktion (Cycling Probe Reaction, CPR) (Duck et al., BioTech., 9: 142 [1990]) verwendet ein langes chimäres Oligonukleotid, in dem ein zentraler Abschnitt aus RNA besteht, während die beiden Endstücke aus DNA bestehen. Hybridisierung der Sonde an eine Ziel-DNA und das Aussetzen gegenüber einer thermostabilen RNase H bewirkt den Verdau des RNA-Abschnittes. Dadurch werden die verbleibenden DNA-Abschnitte des Doppelstranges destabilisiert, wodurch der Rest der Sonde aus der Ziel-DNA freigesetzt wird und ein anderes Sondenmolekül den Prozess wiederholen kann. Das Signal in Form gespaltener Sondenmoleküle sammelt sich in linearer Geschwindigkeit an. Der Wiederholungsprozess erhöht zwar das Signal, aber der RNA-Abschnitt des Oligonukleotids ist gegenüber RNasen anfällig, die während der Probenpräparation mitgeführt werden.

[0019] Verzweigte (Branched) DNA (bDNA), beschrieben von Urdea et al., Gene 61: 253–264 (1987) umfasst Oligonukleotide mit verzweigten Strukturen, die es möglich machen, dass jedes einzelne Oligonukleotid 35 bis 40 Marker trägt (z. B. alkalische Phosphatase-Enzyme). Dies verstärkt zwar das Signal eines Hybridisierungs-

ereignisses, aber Signale aus unspezifischer Bindung werden in ähnlicher Weise verstärkt.

[0020] Während diese beiden Verfahren die oben beschriebenen Nachteile des direkten Nachweises aufweisen, können weder das CPR- noch das bDNA-Verfahren die Spezifität nutzen, die möglich ist, wenn eine unabhängige Erkennung durch zwei oder mehr Sondensequenzen (Oligonukleotidsequenzen) erforderlich ist, wie es bei den in Abschnitt I oben beschriebenen Signalamplifizierungsverfahren üblich ist. Die Maßgabe, dass zwei Oligonukleotide an eine Zielnukleinsäure hybridisieren müssen, damit ein nachweisbares Signal erzeugt wird, verleiht jedem Nachweisverfahren ein zusätzliches Maß an Stringenz. Indem zwei Oligonukleotide erforderlich sind, um an eine Zielnukleinsäure zu binden, reduziert die Chance, dass infolge einer unspezifischen Bindung einer Sonde an eine Zielnukleinsäure ein falsch-„positives" Ergebnis produziert wird. Die zusätzliche Maßgabe, dass die beiden Oligonukleotide relativ zu der Zielnukleinsäure in einer bestimmten Ausrichtung binden müssen, wie es bei der PCR der Fall sein muss, wo die Oligonukleotide derart gegenüber liegen, aber geeignet ausgerichtet sein müssen, dass die DNA-Polymerase die Lücke zwischen den beiden Oligonukleotiden in beiden Richtungen schließen kann, erhöht die Spezifität der Nachweisreaktion weiter. Aus dem Stand der Technik ist allerdings gut bekannt, dass trotz der Verwendung zweier Oligonukleotidsonden (Primer genannt) die „unspezifische" Amplifizierung (d. h. Amplifizierung von Sequenzen, die nicht von den beiden verwendeten Primern gesteuert wird) ein häufiges Artefakt bei der PCR darstellt. Dies liegt zum Teil daran, dass die bei der PCR verwendete DNA-Polymerase sehr große Abstände, gemessen in Nukleotiden, zwischen den Oligonukleotiden überbrücken kann, und daher ein großes Fenster vorhanden ist, in dem eine unspezifische Bindung eines Oligonukleotids zu einer exponentiellen Amplifizierung eines ungeeigneten Produktes führen kann. Im Gegensatz dazu kann die LCR nicht fortfahren, es sei denn, die verwendeten Oligonukleotide binden nebeneinander an die Zielnukleinsäure, und so kann der Vorteil der Hybridisierung mit zwei Oligonukleotiden umfassend genutzt werden.

[0021] Ein ideales Nachweisverfahren würde die Vorteile der direkten Nachweistests (z. B. einfache Quantifizierung und minimales Verschleppungsrisiko) mit der Spezifität kombiniert, die ein Hybridisierungstest mit zwei Oligonukleotiden liefert.

KURZDARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0022] Die vorliegende Erfindung ist in den Ansprüchen definiert und betrifft Mittel zum Spalten einer Nukleinsäurespaltungsstruktur auf positionsspezifische Art und Weise. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Spaltungsagens um eine strukturspezifische Nuklease. Besonders bevorzugte strukturspezifische Nukleasen sind thermostabile strukturspezifische Nukleasen. In einer Ausführungsform handelt es sich bei der strukturspezifischen Nuklease um ein Enzym, das 5'-Nukleasen umfasst, welche aus thermostabilen DNA-Polymerase abgeleitet sind. Diese Polymerasen bilden die Basis eines neuartigen Verfahrens für den Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen. Die vorliegende Erfindung zieht die Verwendung neuartiger Nachweisverfahren für verschiedene Anwendungen in Betracht, einschließlich, aber nicht ausschließlich, für Zwecke der klinischen Diagnose.

[0023] Bedeutenderweise können die 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung lineare Doppelstrangstrukturen spalten, um einzelne diskrete Spaltungsprodukte zu erzeugen. Diese linearen Strukturen werden entweder 1) von den Wildtypenzymen nicht gespalten (in einem wesentlichen Ausmaß) oder 2) von den Wildtypenzymen derart gespalten, um mehrere Produkte zu erzeugen. Diese Eigenschaft der 5'-Nukleasen erwies sich als einheitliche Eigenschaft von Enzymen, die auf diese Weise aus thermostabilen Polymerasen eubakterieller thermophiler Arten gewonnen wurden.

[0024] Die Erfindung soll nicht durch die Art der erforderlichen Veränderung eingeschränkt werden, um die Polymerase synthesedefizient zu machen. Die Erfindung soll auch nicht vom Ausmaß der Defizienz eingeschränkt werden. Die vorliegende Erfindung zieht verschiedene Strukturen in Betracht, einschließlich veränderter Strukturen (primäre, sekundäre, etc.) sowie native Strukturen, die durch Synthesehemmstoffe gehemmt werden können.

[0025] Wo die Polymerasestruktur geändert ist, soll die Erfindung nicht durch Mittel eingeschränkt werden, durch welche die Struktur verändert wird. In einer Ausführungsform umfasst die Veränderung der nativen DNA-Sequenz eine Veränderung in einem einzigen Nukleotid. In einer anderen Ausführungsform umfasst die Veränderung der nativen DNA-Sequenz eine Deletion von einem oder mehreren Nukleotiden. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Veränderung der nativen DNA-Sequenz die Insertion eines oder mehrerer Nukleotide. Es wird in Betracht gezogen, dass die Veränderung der DNA-Sequenz sich als Veränderung "der Aminosäuresequenz manifestieren kann.

[0026] Die vorliegende Erfindung zieht strukturspezifische Nukleasen aus verschiedenen Quellen in Betracht, einschließlich aus mesophilen, psychrophilen, thermophilen und hyperthermophilen Organismen. Die bevorzugten strukturspezifischen Nukleasen sind thermostabil. Thermostabile strukturspezifische Nukleasen werden als besonders geeignet erachtet, da sie bei Temperaturen arbeiten, bei denen eine Nukleinsäurehybridisierung äußerst spezifisch ist, was einen allelspezifischen Nachweis zulässt (einschließlich Einzelbasen-Fehlpaarungen). In einer Ausführungsform handelt es sich bei den thermostabilen strukturspezifischen Nukleasen um thermostabile 5'-Nukleasen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, welche aus veränderten Polymerasen besteht, die aus den nativen Polymerasen der Thermus-Arten abstammen, einschließlich, aber nicht ausschließlich, Thermus aquaticus, Thermus flavus und Thermus thermophilus. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die Verwendung thermostabiler 5'-Nukleasen beschränkt. Thermostabile strukturspezifische Nukleasen aus den Nuklease-Klassen FEN-1, RRD2 und XPG sind ebenfalls bevorzugt.

[0027] Entsprechend stellt die vorliegende Erfindung verbesserte enzymatische Spaltungsmittel bereit. In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung eine thermostabile strukturspezifische Nuklease mit einer Aminosäuresequenz bereit, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche aus SEQ ID Nr.: 61, 66, 69 und 72 besteht. In einer anderen Ausführungsform wird die Nuklease von einer DNA-Sequenz codiert, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus SEQ ID Nr.: 60, 65, 68 und 70 besteht.

[0028] Wie oben erwähnt, zieht die vorliegende Erfindung die Verwendung strukturspezifischer Nukleasen in einem Nachweisverfahren in Betracht. In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins einer Ziel-Nukleinsäure bereit, umfassend: a) das Bereitstellen i) eines Spaltungsagens; ii) einer Quelle einer ersten Ziel Nukleinsäure, die einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich und einen dritten Bereich aufweist, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt und der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt; iii) eines ersten Oligonukleotids mit einem 3'-Anteil und einem 5'-Anteil, wobei der 5'-Anteil des ersten Oligonukleotids eine Sequenz enthält, die zum zweiten Bereich (oder wenigstens zu einem Anteil des zweiten Bereichs) der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des ersten Oligonukleotids eine Sequenz enthalt, die wenigstens zu einem Anteil des dritten Bereichs der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist; iv) eines zweiten Oligonukleotids mit einem 3'-Anteil und einem 5'-Anteil, wobei der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids eine Sequenz enthält, die zu wenigstens einem Anteil des ersten Bereichs der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids eine Sequenz enthält, die zu wenigstens einem Anteil des zweiten Bereichs der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist; v) einer zweiten Zielnukleinsäure, die einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich und einen dritten Bereich umfasst, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt und der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt; vi) eines dritten Oligonukleotids, umfassend einen 5'- und einen 3'-Anteil, wobei der 5'-Anteil des dritten Oligonukleotids eine zu wenigstens einem Anteil des zweiten Bereichs der zweiten Zielnukleinsäure komplementäre Sequenz enthält und wobei der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids eine zu wenigstens einem Anteil des dritten Bereichs der zweiten Zielnukleinsäure komplementäre Sequenz enthält; b) das Erzeugen einer ersten Spaltungsstruktur, wobei wenigstens der 3'-Anteil des ersten Oligonukleotids in einer Annealing-Reaktion an die erste Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei wenigstens der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids in einer Annealing-Reaktion an die erste Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei die Spaltung der ersten Spaltungsstruktur über das Spaltungsagens erfolgt, wodurch das erste Oligonukleotid gespalten wird, um ein viertes Oligonukleotid zu erzeugen, wobei das vierte Oligonukleotid einen 5'- und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des vierten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu wenigstens einem Anteil des ersten Bereichs der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des vierten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu wenigstens einem Anteil des zweiten Bereichs der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist; c) das Erzeugen einer zweiten Spaltungsstruktur unter Bedingungen, bei denen wenigstens der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids in einer Annealing-Reaktion an die zweite Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei wenigstens der 5'-Anteil des vierten Oligonukleotids in einer Annealing-Reaktion an das zweite Zielnukleinsäure-Oligonukleotid gebunden wird und wobei eine Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur stattfindet, um ein fünftes Oligonukleotid zu erzeugen, wobei das fünfte Oligonukleotid eine 3'-Hydroxylgruppe aufweist; und d) den Nachweis des fünften Oligonukleotids.

[0029] Es wird in Betracht gezogen, dass der erste, zweite und dritte Bereich der Zielnukleinsäuren unmittelbar nebeneinander liegt. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die Verwendung eines Ziels beschränkt, bei dem die drei Bereiche aufeinander folgen bzw. kontig sind. Die vorliegende Erfindung zieht daher die Verwendung von Zielnukleinsäuren in Betracht, bei denen diese drei Bereiche kontig sind, sowie Zielnukleinsäuren, bei denen diese drei Bereiche nicht kontig sind. Es wird weiter in Betracht gezogen, dass zwischen den drei Bereichen der Zielnukleinsäuren Lücken von etwa 2–10 Nukleotiden, die Bereiche von Nichtkomplementarität zu den Oligonukleotiden (z. B. das erste und/oder zweite Oligonukleotid) vorhanden sein können.

[0030] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung sind nicht durch die Größe der verwendeten Oligonukleotide beschränkt. In einer bevorzugten Ausführungsform hat das erste Oligonukleotid eine Länge zwischen elf und fünfzehn Nukleotiden.

[0031] Es ist beabsichtigt, dass die Erzeugung der ersten und zweiten Spaltungsstruktur und die Spaltung dieser Strukturen unter verschiedenen Bedingungen stattfindet. In einem bevorzugten Format umfassen die Bedingungen der Erzeugung der Spaltungsstrukturen das Mischen der Zielnukleinsäuren mit dem ersten, zweiten und dritten Oligonukleotide und dem Spaltungsagens in einer wässrigen Lösung, in welcher eine Quelle divalenter Kationen fehlt. In diesem Format wird die Spaltungsreaktion durch Zugabe einer Lösung ausgelöst, die Mn^{2+}- oder Mg^{2+}-Ionen enthält. In einem anderen bevorzugten Format umfassen die Mischbedingungen das Mischen der Zielnukleinsäure und des ersten, zweiten und dritten Oligonukleotids in einer wässrigen Lösung, die Mn^{2+}- oder Mg^{2+}-Ionen enthält, und das anschließende Zugeben des Spaltungsagens zu der Reaktionsmischung.

[0032] Es wird in Betracht gezogen, dass die Oligonukleotide markiert sind. Wenn also die Spaltungsreaktion ein drittes Oligonukleotid mit einem Marker umfasst, kann der Nachweis des Spaltungsproduktes des dritten Oligonukleotids (d. h. das fünfte Oligonukleotid) den Nachweis des Markers umfassen. Die Erfindung ist nicht durch die Art des gewählten Markers eingeschränkt, einschließlich, aber nicht ausschließlich, Marker, welche einen Farbstoff oder ein radioaktives Nukleotid (z. B. ^{32}P), eine Fluoreszeineinheit, eine Biotineinheit, lumino-gene, fluorogene, phosphoriszierende Einheiten oder Fluore in Kombination mit Einheiten umfassen, die Emission durch Fluoreszenzenergietransfer (FET) unterdrücken können. Für den Nachweis von Nukleinsäuren mit einem der oben aufgeführten Marker sind zahlreiche Verfahren verfügbar. Beispielsweise lassen sich biotinmarkierte Oligonukleotide mithilfe nicht-radioaktiver Nachweisverfahren nachweisen, welche Konjugate aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase verwenden. Fluoreszein-markierte Oligonukleotide lassen sich mit einem Fluoreszein-Imager nachweisen. Darüber hinaus können das Oligonukleotid und insbesondere die Sondenoligonukleotide positiv geladene Addukte (z. B. die Farbstoffe Cy3 und Cy5, die in **Fig. 66** gezeigten Farbstoffe, etc.) und/oder positiv geladene Aminosäuren und/oder ein Phosphonatgerüst aufweisen, um den Nachweis des fünften Oligonukleotids durch selektive Ladungsumkehrung zu ermöglichen (d. h. des Nicht-Zielspaltungsproduktes, das durch Spaltung der zweiten [oder terminalen, wenn die Kaskade aus mehr als zwei Reaktionen besteht] Spaltungsstruktur erzeugt wird), wie hierin beschrieben (siehe Abschnitt IV der Beschreibung der Erfindung). Die Oligonukleotide können mit unterschiedlichen Markern markiert sein (z. B. können das erste und das dritte Oligonukleotid jeweils einen anderen Marker tragen).

[0033] Markierte Oligonukleotide (gespalten oder ungespalten) können auch durch andere Mittel als durch Elektrophorese aufgetrennt werden. Beispielsweise können biotinmarkierte Oligonukleotide von der in der Reaktionsmischung vorhandenen Nukleinsäure getrennt werden, indem paramagnetische oder magnetische Kügelchen oder Partikel verwendet werden, welche mit Avidin (oder Streptavidin) beschichtet sind. Auf diese Weise lässt sich der Komplex aus biotinyliertem Oligonukleotid und avidinbeschichtetem magnetischem Kügelchen von den anderen Komponenten in der Mischung physikalisch trennen, indem der Komplex einem Magnetfeld ausgesetzt wird. Darüber hinaus kann das Signal der gespaltenen Oligonukleotide von dem der ungespaltenen Oligonukleotide ohne physikalische Separation unterschieden werden. Beispielsweise können eine Größenänderung und daher die Rotationsrate in Lösung fluoreszierender Moleküle durch Fluoreszenzpolarisierungsanalyse nachgewiesen werden.

[0034] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Reaktionsbedingungen eine Spaltungsreaktionstemperatur, die niedriger als die Schmelztemperatur des ersten Oligonukleotids und höher als die Schmelztemperatur des 3'-Anteils des ersten Oligonukleotids ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Reaktionstemperatur zwischen etwa 40–75°C. In einer anderen Ausführungsform ist die Reaktionstemperatur zwischen etwa 40–60°C. Es wird in Betracht gezogen, dass die Reaktionstemperatur, bei der die Spaltungsreaktion stattfindet, unter Berücksichtigung der in der Beschreibung der Erfindung gegebenen Leitlinien ausgewählt wird.

[0035] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist nicht durch die Art der Zielnukleinsäure eingeschränkt. Die Zielnukleinsäure kann einzelsträngige oder doppelsträngige DNA, RNA und/oder DNA/RNA-Hybride umfassen. Wird eine doppelsträngige Zielnukleinsäure verwendet, kann die Reaktionsmischung derart behandelt werden, dass die doppelsträngige Hilfs-DNA im Wesentlichen einzelsträngig gemacht wird. Ein bevorzugtes Verfahren, um doppelsträngige DNA im Wesentlichen einzelsträngig zu machen, verwendet eine erhöhte Temperatur. Wenn RNA-umfassende Zielnukleinsäuren verwendet werden, können die Oligonukleotide DNA, RNA oder ein Oligonukleotid umfassen, das eine Mischung aus RNA und DNA aufweist. Es ist nicht beabsichtigt, dass die Erfindung durch die Art des verwendeten Oligonukleotide eingeschränkt wird.

[0036] Die Oligonukleotide können DNA, RNA oder ein Oligonukleotid umfassen, das eine Mischung aus RNA und DNA aufweist. Die Erfindung zieht auch die Verwendung eines zweiten Oligonukleotids in Betracht (d. h. des stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids in der ersten Spaltungsstruktur), welches eine Funktionsgruppe (z. B. einen 5'-Peptidbereich) umfasst, die die Dissoziation des 5'-Anteils des zweiten Oligonukleotids von dem ersten Bereich der Zielnukleinsäure verhindert. Wenn in dem zweiten Oligonukleotid eine solche Funktionsgruppe vorhanden ist, kann die Wechselwirkung zwischen dem 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids und dem ersten Bereich der Zielnukleinsäure durch die Verwendung A-T-reicher Sequenzen, von Basenanaloga, die weniger Wasserstoffbindungen bilden (z. B. dG-dU-Paare), oder durch Verwendung von Phosphorothionat-Gerüsten destabilisiert werden (d. h. mit einer niedrigeren lokalen Schmelztemperatur konzipiert sein), damit der 5'-Bereich des ersten Oligonukleotids erfolgreich um die Hybridisierung konkurrieren kann.

[0037] Die Erfindung ist nicht auf die Verwendung von Oligonukleotide beschränkt, die zu ihrer verwandten Zielsequenz vollständig komplementär sind. In einer Ausführungsform ist sowohl das erste als auch das zweite Oligonukleotid zur ersten Zielnukleinsäure vollständig komplementär. In einer anderen Ausführungsform ist das erste Oligonukleotid partiell komplementär zur ersten Zielnukleinsäure. In einer anderen Ausführungsform ist das zweite Oligonukleotid partiell komplementär zur ersten Zielnukleinsäure. In einer anderen Ausführungsform ist sowohl das erste als auch das zweite Oligonukleotid partiell komplementär zur ersten Zielnukleinsäure. Entsprechend können das dritte und vierte Oligonukleotid entweder vollständig oder partiell zur zweiten Zielnukleinsäure komplementär sein.

[0038] Die Verfahren der Erfindung können eine Quelle von Zielnukleinsäuren verwenden, welche eine Probe aufweist, die genomische DNA enthält. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die genomische DNA enthaltende Probe aus der Gruppe ausgewählt, die Blut, Speichel, Liquor, Pleuraflüssigkeit, Milch, Lymphe, Sputum und Samen einschließt, aber nicht darauf beschränkt ist.

[0039] In einer bevorzugten Ausführungsform verwendet das Verfahren Reaktionsbedingungen, welche das Bereitstellen einer Quelle divalenter Kationen umfasst. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das divalente Kation aus der Gruppe ausgewählt, die Mn^{2+}- und Mg^{2+}-Ionen umfasst.

[0040] Die Erfindung ist nicht durch die Art des Spaltungsagens eingeschränkt. Wie oben erläutert, zieht die Erfindung in Betracht, dass das Spaltungsmittel eine thermostabile 5'-Nuklease aufweist, obgleich die Erfindung nicht auf die Anwendung einer thermostabilen 5'-Nuklease beschränkt ist. Wenn eine thermostabile 5'-Nuklease verwendet wird, kann ein Anteil der Aminosäuresequenz der Nuklease zu einem Anteil der Aminosäuresequenz einer thermostabilen DNA-Polymerase aus einem thermophilen Organismus homolog sein. Besonders bevorzugte Spaltungsmittel sind strukturspezifische Nukleasen, wobei thermostabile strukturspezifische Nukleasen am meisten bevorzugt sind. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die thermostabile strukturspezifische Nuklease von einer DNA-Sequenz codiert, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche aus SEQ ID Nr.: 1–3, 9, 10, 12, 21, 25, 26, 60, 65, 68, 70, 74 und 78 besteht. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der thermostabilen strukturspezifischen Nuklease um eine Nuklease aus der Nukleaseklassen FEN-1/RAD2/XPG. Eine bevorzugte thermostabile strukturspezifische Nuklease ist die FEN-1-Endonuklease aus Pyrococcus woesei.

[0041] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform enthält eines oder mehrere des ersten, zweiten und dritten Oligonukleotids ein Didesoxynukleotid am 3'-Ende. Wenn Didesoxynukleotid-haltige Oligonukleotide verwendet werden, umfasst der Nachweis des fünften Oligonukleotids vorzugsweise: a) Inkubieren des fünften Oligonukleotids mit einer vorlagenunabhängigen Polymerase und wenigstens einem markierten Nukleosidtriphosphat unter solchen Bedingungen, dass der 3'-Hydroxylgruppe des fünften Oligonukleotids wenigstens ein markiertes Nukleotid hinzugefügt wird, um ein markiertes fünftes Oligonukleotid herzustellen, und b) Nachweisen des Vorhandenseins des markierten fünften Oligonukleotids. Die Erfindung ist nicht durch die Art der verwendeten vorlagenunabhängigen Polymerase eingeschränkt. In einer Ausführungsform ist die vorlagenunabhängige Polymerase aus der Gruppe ausgewählt, die aus terminaler Desoxynukleotidyltransferase (TdT) und Poly-A-Polymerase besteht. Werden im Nachweisschritt TdT oder Poly-A-Polymerase verwendet, kann das dritte Oligonukleotid einen Marker am 5'-Ende enthalten, wobei der Marker am 5'-Ende ein anderer Marker ist als der Marker, der am markierten Nukleosidtriphosphat vorhanden ist. Die Erfindung ist nicht durch die Art des Markers am 5'-Ende eingeschränkt; aus dem Stand der Technik sind viele verschiedene geeignete 5'-Ende-Marker bekannt und umfassen Biotin, Fluoreszein, Tetrachlorfluoreszein, Hexachlorfluoreszein, Cy3, Cy5 und Digoxigenin.

[0042] In einer anderen Ausführungsform umfasst der Nachweis des fünften Oligonukleotids: a) Inkubieren des fünften Oligonukleotids mit einer vorlagenunabhängigen Polymerase und wenigstens einem markierten

Nukleosidtriphosphat unter solchen Bedingungen, dass der 3'-Hydroxylgruppe des fünften Oligonukleotids wenigstens ein markiertes Nukleotid hinzugefügt wird, um ein fünftes Oligonukleotid mit Schwanzteil (tailed) herzustellen, und b) Nachweisen des Vorhandenseins des fünften Oligonukleotids mit Schwanzteil (tailed). Die Erfindung ist nicht durch die Art der verwendeten vorlagenunabhängigen Polymerase eingeschränkt; in einer Ausführungsform ist die vorlagenunabhängige Polymerase aus der Gruppe ausgewählt, die aus terminaler Desoxynukleotidyltransferase (TdT) und Poly-A-Polymerase besteht. Werden im Nachweisschritt TdT oder Poly-A-Polymerase verwendet, kann das zweite Oligonukleotid einen Marker am 5'-Ende enthalten. Die Erfindung ist nicht durch die Art des Markers am 5'-Ende eingeschränkt; aus dem Stand der Technik sind viele verschiedene geeignete 5'-Ende-Marker bekannt und umfassen Biotin, Fluoreszein, Tetrachlorfluoreszein, Hexachlorfluoreszein, Cy3, Cy5 und Digoxigenin.

[0043] Die Erfindung stellt weiter ein Verfahren zum Nachweis des fünften Oligonukleotids bereit (d. h. des Nicht-Zielspaltungsproduktes, das durch Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur erzeugt wird), umfassend: a) das Bereitstellen: i) des fünften Oligonukleotids; ii) einer Zusammensetzung, welche zwei einzelsträngige Nukleinsäuren umfasst, die derart durch eine Annealing-Reaktion gebunden sind, dass sie einen einzelsträngigen Anteil eines Proteinbindungsbereiches definieren; iii) eines Nukleinsäure produzierenden Proteins; b) das Aussetzen des fünften Oligonukleotid gegenüber dem einzelsträngigen Anteil des Proteinbindungsbereichs unter derartigen Bedingungen, dass das Nukleinsäure produzierende Protein an den Proteinbindungsbereich bindet und Nukleinsäure produziert. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der einzelsträngige Anteil des Proteinbindungsbereiches: a) einen ersten kontinuierlichen Einzelstrang einer Nukleinsäure, die eine Sequenz aufweist, welche den Vorlagenstrang eines RNA-Polymerase-Bindungsbereiches definiert; und b) einen zweiten kontinuierlichen Einzelstrang einer Nukleinsäure mit einem 5'- und einem 3'-Ende, wobei die zweite Nukleinsäure einen Bereich aufweist, der zu einem Anteil der ersten Nukleinsäure komplementär ist, wobei die zweite Nukleinsäure durch eine Annealing-Reaktion an die erste Nukleinsäure gebunden wird, um den einzelsträngigen Anteil des Proteinbindungsbereiches zu definieren.

[0044] Die Erfindung ist durch die Art des verwendeten Proteinbindungsbereiches nicht eingeschränkt. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Proteinbindungsbereich um einen vorlagenabhängigen RNA-Polymerase-Bindungsbereich, mehr bevorzugt um einen T7-RNA-Polymerase-Bindungsbereich.

[0045] Die Erfindung stellt des Weiteren ein Verfahren zum Nachweisen des fünften Oligonukleotids bereit, umfassend: a) das Bereitstellen: i) des fünften Oligonukleotids; ii) eines kontinuierlichen Einzelstrangs einer Nukleinsäure, welche eine Sequenz aufweist, die einen Einzelstrang eines RNA-Polymerase-Bindungsbereiches definiert; iii) einer vorlagenabhängigen DNA-Polymerase; iv) einer vorlagenabhängigen RNA-Polymerase; b) das Aussetzen des fünften Oligonukleotid gegenüber einem RNA-Polymerase-Bindungsbereich unter solchen Bedingungen, dass das fünfte Oligonukleotid an einen Anteil des Einzelstrangs des RNA-Polymerase-Bindungsbereiches bindet; c) das Aussetzen des gebundenen fünften Oligonukleotids gegenüber der vorlagenabhängigen DNA-Polymerase unter solchen Bedingungen, dass ein doppelsträngiger RNA-Polymerase-Bindungsbereich hergestellt wird; und d) das Aussetzen des doppelsträngigen RNA-Polymerase-Bindungsbereichs gegenüber der vorlagenabhängigen RNA-Polymerase unter solchen Bedingungen, dass RNA-Transkripte hergestellt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren des Weiteren das Nachweisen der RNA-Transkripte.

[0046] Die Erfindung ist durch die Art des verwendeten Proteinbindungsbereiches nicht eingeschränkt. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Proteinbindungsbereich um einen vorlagenabhängigen RNA-Polymerase-Bindungsbereich, mehr bevorzugt um einen T7-RNA-Polymerase-Bindungsbereich.

[0047] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Nachweisen des Vorhandenseins eines Zielnukleinsäuremoleküls bereit, umfassend: a) das Bereitstellen: i) eines Spaltungsagens, ii) einer Quelle einer ersten Zielnukleinsäure, die einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich, einen dritten Bereich und einen vierten Bereich aufweist, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt, der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt und der dritte Bereich stromabwärts unmittelbar auf den vierten Bereich folgt; iii) eines ersten Oligonukleotids, das zu dem vierten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des vierten Bereichs) der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist; iv) eines zweiten Oligonukleotids, das einen 5'-Anteil und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem zweiten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des zweiten Bereichs) der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem dritten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des dritten Bereichs) der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist; v) eines dritten Oligonukleotids, das einen 5'-Anteil und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des dritten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem ersten Bereich (zu wenigstens ei-

nem Anteil des ersten Bereichs) der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem zweiten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des zweiten Bereichs) der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist; vi) einer Quelle einer zweiten Zielnukleinsäure, wobei die zweite Zielnukleinsäure einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich und einen dritten Bereich aufweist, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt, der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt; viii) eines vierten Oligonukleotids, das einen 5'-Anteil und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des vierten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem zweiten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des zweiten Bereichs) der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des vierten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem dritten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des dritten Bereichs) der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist; b) das Erzeugen einer ersten Spaltungsstruktur, wobei das erste Oligonukleotid durch eine Annealing-Reaktion an den vierten Bereich der ersten Zielnukleinsäure gebunden ist und wobei wenigstens der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die erste Zielnukleinsäure gebunden ist und wobei wenigstens der 5'-Anteil des dritten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die erste Zielnukleinsäure gebunden ist und wobei eine Spaltung der ersten Spaltungsstruktur stattfindet, wodurch das zweite Oligonukleotid gespalten wird, um ein fünftes Oligonukleotid zu erzeugen, wobei das fünfte Oligonukleotid einen 5'- und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des fünften Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem ersten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des ersten Bereichs) der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des fünften Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem zweiten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des zweiten Bereichs) der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist; c) das Erzeugen einer zweiten Spaltungsstruktur unter Bedingungen, bei denen wenigstens der 3'-Anteil des vierten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die zweite Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei wenigstens der 5'-Anteil des fünften Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die zweite Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei eine Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur stattfindet, um ein sechstes Oligonukleotid zu erzeugen, wobei das sechste Oligonukleotid eine 3'-Hydroxylgruppe aufweist; und d) das Nachweisen des sechsten Oligonukleotids.

[0048] Der Nachweis des sechsten Oligonukleotids kann durch verschiedene Verfahren erreicht werden, beispielsweise durch die oben für das Verfahren Beschriebenen, in dem das fünfte Oligonukleotid nachgewiesen werden soll. Wie oben beschrieben, ist die Erfindung nicht durch die Art der Zielnukleinsäuren, die Art der Spaltungsmittel, die Art der Oligonukleotide, etc. eingeschränkt.

[0049] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Nachweisen des Vorhandenseins eines Zielnukleinsäuremoleküls bereit, umfassend: a) das Bereitstellen: i) eines Spaltungsagens, ii) einer Quelle einer Zielnukleinsäure, die einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich und einen dritten Bereich aufweist, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt und der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt; iii) eines ersten Oligonukleotids, das einen 5'-Anteil und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des ersten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem zweiten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des zweiten Bereichs) der Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 5'-Anteil des ersten Oligonukleotids einen Bereich der Selbstkomplementarität aufweist, und wobei der 3'-Anteil des ersten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem dritten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des dritten Bereichs) der Zielnukleinsäure komplementär ist; iv) eines zweiten Oligonukleotids, das einen 5'-Anteil und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem ersten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des ersten Bereichs) der Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem zweiten Bereich (zu wenigstens einem Anteil des zweiten Bereichs) der Zielnukleinsäure komplementär ist; v) eines dritten Oligonukleotids, das einen 5'-Anteil und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem 5'-Anteil (zu wenigstens einem Anteil des 5'-Anteils) des ersten Oligonuklotids komplementär ist; b) das Erzeugen einer ersten Spaltungsstruktur, wobei wenigstens der 3'-Anteil des ersten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die Zielnukleinsäure gebunden ist und wobei wenigstens der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die Zielnukleinsäure gebunden ist und wobei eine Spaltung der ersten Spaltungsstruktur stattfindet, wodurch das erste Oligonukleotid gespalten wird, um ein viertes Oligonukleotid zu erzeugen, wobei das vierte Oligonukleotid einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich und einen dritten Bereich aufweist, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt und der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt, und wobei der dritte Bereich des vierten Oligonukleotids einen Bereich der Selbstkomplementarität aufweist; c) Erzeugen einer zweiten Spaltungsstruktur unter Bedingungen, bei denen wenigstens der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an den ersten Bereich des vierten Oligonukleotids gebunden wird und bei denen wenigstens der 5'-Anteil des vierten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an den zweiten Bereich des dritten Oligonukleotids gebunden wird und wobei der dritte Bereich des vierten Oligonuk-

leotids eine Haarnadelstruktur bildet und wobei eine Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur stattfindet, um ein fünftes Oligonukleotid zu erzeugen, wobei das fünfte Oligonukleotid eine 3'-Hydroxylgruppe aufweist; und d) das Nachweisen des fünften Oligonukleotids.

[0050] Der Nachweis des fünften Oligonukleotids kann durch verschiedene Verfahren erreicht werden, beispielsweise durch die oben beschriebenen Verfahren. Wie oben beschrieben, ist die Erfindung nicht durch die Art der Zielnukleinsäuren, die Art der Spaltungsmittel, die Art der Oligonukleotide, etc. eingeschränkt.

[0051] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Nachweisen des Vorhandenseins eines Zielnukleinsäuremoleküls bereit, umfassend: a) das Bereitstellen eines Spaltungsagens; einer Quelle einer ersten Zielnukleinsäure, die einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich und einen dritten Bereich aufweist, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt und der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt; erster und zweiter Oligonukleotide, die 5'-Anteile und 3'-Anteile aufweisen, wobei der 3'-Anteil des ersten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem dritten Bereich der Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 5'-Anteil des ersten Oligonukleotids und der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids jeweils eine Sequenz aufweisen, die zu dem zweiten Bereich der Zielnukleinsäure vollständig komplementär ist, und wobei der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids Sequenzkomplementarität zu dem ersten Bereich der Zielnukleinsäure aufweist; eine Quelle einer zweiten Zielnukleinsäure, die einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich und einen dritten Bereich aufweist, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt und der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt; eines dritten Oligonukleotids, das einen 5'-Anteil und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des dritten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem zweiten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem dritten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist; b) das Erzeugen einer ersten Spaltungsstruktur, wobei wenigstens der 3'-Anteil des ersten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die erste Zielnukleinsäure gebunden ist und wobei wenigstens der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die erste Zielnukleinsäure gebunden ist und wobei eine Spaltung der ersten Spaltungsstruktur stattfindet, wodurch das erste Oligonukleotid gespalten wird, um ein viertes Oligonukleotid zu erzeugen, wobei das vierte Oligonukleotid einen 5'- und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des vierten Oligonukleotids eine Sequenzkomplementarität zu dem ersten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure aufweist und wobei der 3'-Anteil des vierten Oligonukleotids eine Sequenzkomplementarität zu dem zweiten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure aufweist; c) Erzeugen einer zweiten Spaltungsstruktur unter Bedingungen, bei denen wenigstens der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die zweite Zielnukleinsäure gebunden wird und bei denen wenigstens der 5'-Anteil des vierten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an das zweite Zielnukleinsäureoligonukleotid gebunden wird und wobei eine Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur stattfindet, um ein fünftes Oligonukleotid zu erzeugen, wobei das fünfte Oligonukleotid eine 3'-Hydroxylgruppe aufweist; und d) das Nachweisen des fünften Oligonukleotids.

[0052] In einigen Ausführungsformen dieses Verfahren hat das erste Oligonukleotid eine Länge zwischen elf und fünfzehn Nukleotiden. In anderen Ausführungsformen handelt es sich bei dem Spaltungsagens um eine strukturspezifische Nuklease. In anderen Ausführungsformen handelt es sich bei der strukturspezifischen Nuklease um eine thermostabile strukturspezifische Nuklease. In weiteren Ausführungsformen handelt es sich bei der thermostabilen strukturspezifischen Nuklease um eine Afu FEN-1-Endonuklease. In weiteren Ausführungsformen enthalten das eine oder mehrere erste, zweite und/oder dritte Oligonukleotid ein Didesoxynukleotid am 3'-Ende. In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Verfahren des Weiteren das Bereitstellen eines Arrestors™, wobei der Arrestor™ die Wechselwirkung zwischen dem ersten Oligonukleotid und dem zweiten Ziel reduziert.

[0053] In einigen bevorzugten Ausführungsformen des Verfahrens umfasst der Schritt des Nachweisens des fünften Oligonukleotids: Inkubieren des fünften Oligonukleotids und wenigstens eines markierten Nukleosidtriphosphates unter solchen Bedingungen, dass der 3'Hydroxylgruppe des fünften Oligonukleotids wenigstens ein markiertes Nukleotid hinzugefügt wird, um ein markiertes fünftes Oligonukleotid zu erzeugen, und Nachweisen des Vorhandenseins des markierten fünften Oligonukleotids. In anderen bevorzugten Ausführungsformen des Verfahrens wird die Inkubation in Gegenwart einer Polymerase durchgeführt. In alternativen bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei der Polymerase um eine vorlagenabhängige Polymerase. In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist die vorlagenabhängige Polymerase aus der Gruppe ausgewählt, die aus terminaler Desoxynukleotidyltransferase und Poly-A-Polymerase besteht. In anderen Ausführungsformen enthält das dritte Oligonukleotid einen Marker am 5'-Ende, wobei sich der Marker am 5'-Ende von dem Marker unterscheidet, der an dem markierten Nukleosidtriphosphat vorhanden ist.

[0054] In zusätzlichen Ausführungsformen des Verfahrens umfasst der Schritt des Nachweisens des fünften Oligonukleotids: Inkubieren des fünften Oligonukleotids mit einer Polymerase und wenigstens einem Nukleosidtriphosphat unter solchen Bedingungen, dass der 3'Hydroxylgruppe des fünften Oligonukleotids wenigstens ein Nukleotid hinzugefügt wird, um ein Oligonukleotid mit Schwanzregion (tailed) zu erzeugen, und Nachweisen des Vorhandenseins des fünften Oligonukleotids mit Schwanzregion (tailed). In einigen bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei der Polymerase um eine vorlagenabhängige Polymerase. In anderen bevorzugten Ausführungsformen ist die vorlagenabhängige Polymerase aus der Gruppe ausgewählt, die aus terminaler Desoxynukleotidyltransferase und Poly-A-Polymerase besteht. In anderen Ausführungsformen enthält das dritte Oligonukleotid einen Marker am 5'-Ende.

[0055] Die vorliegende Erfindung stellt auch Verfahren zum Nachweisen des Vorhandenseins eines Zielnukleinsäuremoleküls bereit. Diese Verfahren umfassen a) das Bereitstellen eines Spaltungsagens; einer Quelle einer ersten Zielnukleinsäure, die einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich, einen dritten Bereich und einen vierten Bereich aufweist, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt, der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt und der dritte Bereich stromabwärts unmittelbar auf den vierten Bereich folgt; eines ersten Oligonukleotids, das zu dem vierten Bereich der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist; zweiter und dritter Oligonukleotide, die 5'- und 3'-Anteile aufweisen, wobei der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem dritten Bereich der ersten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids und der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids jeweils Sequenzkomplementarität aufweisen, die zum dem zweiten Bereich der Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 5'-Anteil des dritten Oligonukleotids Sequenzkomplementarität zu dem ersten Bereich der Zielnukleinsäure aufweist; einer Quelle einer zweiten Zielnukleinsäure, wobei die zweite Zielnukleinsäure einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich und einen dritten Bereich aufweist, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt, der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt; eines vierten Oligonukleotids, das einen 5'-Anteil und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des vierten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem zweiten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des vierten Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem dritten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist; b) das Erzeugen einer ersten Spaltungsstruktur, wobei das erste Oligonukleotid durch eine Annealing-Reaktion an den vierten Bereich der ersten Zielnukleinsäure gebunden ist und wobei wenigstens der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die erste Zielnukleinsäure gebunden ist und wobei wenigstens der 5'-Anteil des dritten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion mit der ersten Zielnukleinsäure verbunden ist und wobei eine Spaltung der ersten Spaltungsstruktur stattfindet, wodurch das zweite Oligonukleotid gespalten wird, um ein fünftes Oligonukleotid zu erzeugen, wobei das fünfte Oligonukleotid einen 5'- und einen 3'-Anteil aufweist, wobei der 5'-Anteil des fünften Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem ersten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 3'-Anteil des fünften Oligonukleotids eine Sequenz aufweist, die zu dem zweiten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist; c) das Erzeugen einer zweiten Spaltungsstruktur unter Bedingungen, bei denen wenigstens der 3'-Anteil des vierten Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die zweite Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei wenigstens der 5'-Anteil des fünften Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion an die zweite Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei eine Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur stattfindet, um ein sechstes Oligonukleotid zu erzeugen, wobei das sechste Oligonukleotid eine 3'-Hydroxylgruppe aufweist; und d) das Nachweisen des sechsten Oligonukleotids. In einigen Ausführungsformen hat das erste Oligonukleotid eine Länge zwischen elf und fünfzehn Nukleotiden. In anderen Ausführungsformen handelt es sich bei dem Spaltungsagens um eine strukturspezifische Nuklease. In bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei der strukturspezifischen Nuklease um eine thermostabile strukturspezifische Nuklease. In besonders bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei der thermostabilen strukturspezifischen Nuklease um eine Afu FEN-1-Endonuklease. In anderen Ausführungsformen enthalten das eine oder mehrere erste, zweite und/oder dritte Oligonukleotid ein Didesoxynukleotid am 3'-Ende. In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Verfahren des Weiteren das Bereitstellen eines Arrestors™, wobei der Arrestor™ die Wechselwirkung zwischen dem ersten Oligonukleotid und dem zweiten Ziel reduziert.

[0056] In anderen Ausführungsformen des Verfahrens umfasst der Schritt des Nachweisens des sechsten Oligonukleotids: Inkubieren des sechsten Oligonukleotids und wenigstens eines markierten Nukleosidtriphosphates unter solchen Bedingungen, dass der 3'Hydroxylgruppe des sechsten Oligonukleotids wenigstens ein markiertes Nukleotid hinzugefügt wird, um ein markiertes sechstes Oligonukleotid zu erzeugen, und Nachweisen des Vorhandenseins des markierten sechsten Oligonukleotids. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst der Inkubationsschritt des Weiteren das Inkubieren einer Polymerase mit dem sechsten Oligonukleotid und wenigstens einem markierten Nukleosidtriphosphat. In besonders bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei der Polymerase um eine vorlagenabhängige Polymerase. In alternativ bevorzugten Ausfüh-

rungsformen ist die vorlagenabhängige Polymerase aus der Gruppe ausgewählt, die aus terminaler Desoxynukleotidyltransferase und Poly-A-Polymerase besteht.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0057] **Fig.** 1–24, Fig. 26–Fig. 28, Fig. 58–Fig. 74 und Fig. 80–95 beziehen sich auf Ausführungsformen, die kein Teil der Ansprüche sind.

[0058] Fig. 25 liefert eine Schemazeichnung einer Zielnukleinsäure mit einem Invader™-Oligonukleotid und einem Sondenoligonukleotid, die durch eine Annealing-Reaktion an die Zielnukleinsäure gebunden sind.

[0059] Fig. 29 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, das zeigt, dass das Vorhandensein eines Invader™-Oligonukleotids eine Verschiebung der Spaltungsstelle in einem Sonde/Ziel-Doppelstrang verursacht.

[0060] Fig. 30 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die unter Verwendung der drei in Fig. 28 dargestellten, zielspezifischen Oligonukleotide durchgeführt worden sind.

[0061] Fig. 31 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die in Gegenwart oder Abwesenheit von Nicht-Zielnukleinsäuremolekülen durchgeführt worden sind.

[0062] Fig. 32 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die in Gegenwart von abnehmenden Mengen von Zielnukleinsäure durchgeführt worden sind.

[0063] Fig. 33 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die in Gegenwart oder Abwesenheit von Speichelextrakt unter Verwendung verschiedener thermostabiler 5'-Nukleasen oder DNA-Polymerasen durchgeführt worden sind.

[0064] Fig. 34 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die unter Verwendung verchiedener 5'-Nukleasen durchgeführt worden sind.

[0065] **Fig.** 35 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die bei zwei verschiedenen Reaktionstemperaturen unter Verwendung von zwei Zielnukleinsäuren durchgeführt worden sind, welche sich durch ein einziges Basenpaar unterscheiden.

[0066] **Fig.** 36A liefert ein Schema, das die Wirkung einer Temperaturerhöhung auf die Annealing-Reaktion und die Spaltung eines Sondenoligonukleotids entlang einer Zielnukleinsäure zeigt, wobei die Sonde einen Bereich der Nichtkomplementarität zu der Zielnukleinsäure enthält.

[0067] **Fig.** 36B liefert ein Schema, das die Wirkung des Hinzufügens eines Oligonukleotids stromaufwärts nach der Annealing-Reaktion und Spaltung eines Sondenoligonukleotids entlang einer Zielnukleinsäure zeigt, wobei die Sonde einen Bereich der Nichtkomplementarität zu der Zielnukleinsäure enthält.

[0068] Fig. 37 liefert ein Schema, das eine Anordnung eines zielspezifischen Invader™-Oligonukleotids (SEQ ID Nr.: 39) und eines zielspezifischen Sondenoligonukleotids (SEQ ID Nr.: 38) zeigt, das einen 5'-Cy3-Marker entlang einer Zielnukleinsäure (SEQ ID Nr.: 31) trägt.

[0069] Fig. 38 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die in Gegenwart steigender Konzentrationen von KCl durchgeführt wurden.

[0070] Fig. 39 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die in Gegenwart steigender Konzentrationen von $MnCl_2$ oder $MgCl_2$ durchgeführt wurden.

[0071] Fig. 40 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die in Gegenwart steigender Mengen genomischer DNA oder tRNA durchgeführt wurden.

[0072] Fig. 41 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die unter Verwendung eines HCV-RNA-Ziels durchgeführt wurden.

[0073] **Fig.** 42 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte von Invader™-gesteuerten Spaltungen anzeigt, die unter Verwendung eines HCV-RNA-Ziels durchgeführt wurden, und die Stabilität von RNA-Zielen unter Bedingungen einer Invader™-gesteuerten Spaltung zeigt.

[0074] Fig. 43 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Empfindlichkeit des Nachweises und die Stabilität von RNA bei Invader™-gesteuerten Spaltungen unter Verwendung eines HCV-RNA-Zieles anzeigt.

[0075] Fig. 44 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, das den wärmebedingten Zerfall eines Oligonukleotids mit oder ohne 3'-Phosphatgruppe zeigt.

[0076] Fig. 45 zeigt die Struktur der aminomodifizierten Oligonukleotide 70 und 74.

[0077] Fig. 46 zeigt die Struktur des aminomodifizierten Oligonukleotids 75.

[0078] Fig. 47 zeigt die Struktur des aminomodifizierten Oligonukleotids 76.

[0079] Fig. 48 ist das durch einen Fluoreszenzimagerscan eines IEF-Gels erzeugte Bild, welches die Migration der Substrate 70, 70dp, 74, 74dp, 75, 75dp, 76 und 76dp zeigt.

[0080] **Fig.** 49A zeigt ein Schema, das die Anordnung eines zielspezifischen Invader™ Oligonukleotids (SEQ ID Nr.: 50) und eines zielspezifischen Sondenoligonukleotids (SEQ ID Nr.: 51) zeigt, welches einen 5'-Cy3-Marker entlang einer Zielnukleinsäure (SEQ ID Nr.: 52) zeigt.

[0081] **Fig.** 49B ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, das den Nachweis spezifischer Spaltungsprodukte zeigt, welche in einem invasiven Spaltungstest unter Verwendung von Ladungsumkehrung erzeugt wurden (d. h. ladungsbasierte Trennung von Spaltungsprodukten).

[0082] Fig. 50 ist das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, das die Empfindlichkeit des Nachweises spezifischer Spaltungsprodukte darstellt, die in einem invasiven Spaltungstest unter Verwendung von Ladungsumkehrung erzeugt wurden.

[0083] Fig. 51 zeigt eine erste Ausführungsform einer Vorrichtung für die ladungsbasierte Trennung von Oligonukleotiden.

[0084] Fig. 52 zeigt eine zweite Ausführungsform einer Vorrichtung für die ladungsbasierte Trennung von Oligonukleotiden.

[0085] Fig. 53 zeigt ein Autoradiogramm eines Gels, welches die Ergebnisse von Spaltungsreaktionen zeigt, die in Gegenwart oder Abwesenheit eines Primeroligonukleotids durchgeführt wurden; eine Sequenzierungsleiter ist als Größenmarker gezeigt.

[0086] **Fig.** 54A–D zeigt vier Paare von Oligonukleotiden; in jedem gezeigten Paar fehlt der oberen Anordnung einer durch eine Annealing-Reaktion an eine Zielnukleinsäure gebundenen Sonde ein stromaufwärts gelegenes Oligonukleotid, und die untere Anordnung enthält ein stromaufwärts gelegenes Oligonukleotid (SEQ ID Nr.: 32 und 54–58 sind in **Fig.** 54A–D gezeigt).

[0087] Fig. 55 zeigt die chemische Struktur mehrerer positiv geladener heterodimerer DNA-Bindungsfarbstoffe.

[0088] Fig. 56 ist ein Schema, das alternative Verfahren für das Tailing und den Nachweis spezifischer Spaltungsprodukte in Verbindung mit der Invader™-gesteuerten Spaltung zeigt.

[0089] Fig. 57 liefert eine Schemazeichnung einer Zielnukleinsäure mit einem Invader™-Oligonukleotid, einer Minisonde und einem durch eine Annealing-Reaktion an die Zielnukleinsäure gebundenen „Stacker"-Oligonukleotid.

[0090] **Fig.** 75A–C zeigt von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bilder, welche die Produkte zeigen, die bei einer Invader™-gesteuerten Spaltung hergestellt wurden, der bei verschiedenen Temperaturen unter Verwendung einer Minisonde durchgeführt wurde, welche zu der Zielnukleinsäure vollständig komplementär ist oder eine einzelne Fehlpaarung mit der Zielnukleinsäure aufweist.

[0091] Fig. 76 zeigt die Sequenz von Oligos 166 (SEQ ID Nr.: 103), 165 (SEQ ID Nr.: 104), 161 (SEQ ID Nr.: 106), 162 (SED ID Nr.: 105) und 164 (SEQ ID Nr.: 107) sowie eine Spaltungsstruktur.

[0092] Fig. 77 zeigt das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte zeigt, die bei einer Invader™-gesteuerten Spaltung hergestellt wurden, welcher unter Verwendung der Sequenz des ras-Gens als Ziel durchgeführt wurde.

[0093] **Fig.** 78A–C zeigt die Sequenz der S-60-Haarnadel (SEQ ID Nr.: 29) (A) und des P-15-Oligos (SEQ ID Nr.: 30) (gezeigt nach Bindung an die S-60-Haarnadel in B durch eine Annealing-Reaktion) und das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Produkte zeigt, welches die Produkte zeigt, die durch Spaltung der S-60-Haarnadel in Gegenwart verschiedener Invader™-Oligos hergestellt wurden.

[0094] Fig. 79 zeigt die Struktur verschiedener Substituenten am 3'-Ende.

[0095] Fig. 96 ist ein Schema, das eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung veranschaulicht, bei der die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als das Invader™-Oligonukleotid in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird.

[0096] Fig. 97 ist ein Schema, das eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung veranschaulicht, bei der die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als ein integrierter Invader-Zielkomplex in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird.

[0097] Fig. 98 zeigt die Nukleotidsequenz der Sonde PR1 (SEQ ID Nr.: 119), des Invader™-Zieloligonukleotids (SEQ ID Nr.: 118) IT3, der Oligonukleotide IT3-8, IT3-6, IT3-4, IT3-3 und IT3-0 (SEQ ID Nr.: 147–151).

[0098] Fig. 99 zeigt Strukturen, die verwendet werden können, um die Fähigkeit eines Enzyms zum Spalten einer Sonde in Gegenwart und Abwesenheit eines stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids zu bestimmen. Fig. 99 zeigt die Sequenz von Oligo 89-15-1 (SEQ ID Nr.: 152), Oligo 81-69-5 (SEQ ID Nr.: 156), Oligo 81-69-4 (SEQ ID Nr.: 155), Oligo 81-69-3 (SEQ ID Nr.: 154), Oligo 81-69-2 (SEQ ID Nr.: 153) und einen Anteil von M13mp18 (SEQ ID Nr.: 163).

[0099] Fig. 100 zeigt das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Abhängigkeit von Pfu FEN-1 von dem Vorhandensein eines überlappenden stromaufwärts liegenden Oligonukleotids zur spezifischen Spaltung der Sonde zeigt.

[0100] **Fig.** 101a zeigt das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, welches die Menge an Produkt, das in einer Standardreaktion (d. h. einer nicht-sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion) und in einer sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion erzeugt: wurde, vergleicht.

[0101] **Fig.** 101b ist ein Diagramm, das die Menge an Produkt, das in einer Standardreaktion oder Basisreaktion (d. h. einer nicht-sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion) und in einer sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion („Invader-Quadrat") erzeugt wurde, vergleicht (y-Achse = Fluoreszenzeinheiten; x-Achse = Ziel in Attomol).

[0102] Fig. 102 zeigt das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, das zeigt, dass die Produkte einer abgeschlossenen sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion eine nachfolgende ähnliche Reaktion nicht kreuzkontaminieren können.

[0103] Fig. 103 zeigt die Sequenz des Oligonukleotids, das bei einer invasiven Spaltungsreaktion für den Nachweis viraler HCMV-DNR verwendet wurde. Fig. 103 zeigt die Sequenz von Oligo 89-76 (SEQ ID Nr.: 161), Oligo 89-44 (SEQ ID Nr.: 160) und Nukleotid 3057–3110 des HCMV-Genoms (SEQ ID Nr.: 162).

[0104] Fig. 104 zeigt das von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bild, das den empfindlichen Nachweis von viraler HCMV-DNA in Proben zeigt, welche humane genomische DNA enthalten, unter Verwendung einer invasiven Spaltungsreaktion.

[0105] Fig. 105 ist ein Schema, das eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung veranschaulicht, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als Invader™-Oligonukleotid in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird und wobei ein Arrestor™-Oligonukleotid die Beteiligung der verbleibenden ungeschnittenen ersten Sonde an der Spaltung der zweiten Sonde verhindert.

[0106] Fig. 106 ist ein Schema, das eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung veranschaulicht, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als integrierter Invader™-Zielkomplex in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird und wobei ein Arrestor™-Oligonukleotid die Beteiligung der verbleibenden ungeschnittenen ersten Sonde an der Spaltung der zweiten Sonde verhindert.

[0107] Fig. 107 zeigt drei von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bilder, welche zeigen, dass zwei verschiedene Längen eines 2'-O-methyl-, 3'-terminal aminmodifizierten Arrestor™-Oligonukleotids die unspezifische Hintergrundspaltung der zweiten Sonde reduzieren, wenn sie im zweiten Schritt einer Reaktion verwendet werden, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als integrierter Invader™-Zielkomplex in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird.

[0108] Fig. 108A zeigt zwei von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bilder, welche die Effekte steigender Konzentrationen einer primären Sonde auf das unspezifische und spezifische Spaltungssignal in einem ersten Schritt einer Reaktion zeigen, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als Invader™-Oligonukleotid in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird.

[0109] Fig. 108B zeigt zwei von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bilder, welche die Effekte steigender Konzentrationen einer primären Sonde auf das unspezifische und spezifische Spaltungssignal in einem ersten Schritt einer Reaktion zeigen sowie den Einschluss eines 2'-O-methyl-, 3'-terminal aminmodifizierten Arrestor™-Oligonukleotids im zweiten Schritt einer Reaktion, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als Invader™-Oligonukleotid in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird.

[0110] Fig. 108C zeigt ein Diagramm, das mithilfe der Tabellensoftware Microsoft Excel erstellt wurde und die Wirkung steigender Konzentrationen einer primären Sonde in einem ersten Schritt einer Reaktion auf das unspezifische und spezifische Spaltungssignal zeigt; in Gegenwart oder Abwesenheit eines 2'-O-methyl-, 3'-terminal aminmodifizierten Arrestor™-Oligonukleotids im zweiten Schritt einer Reaktion, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als Invader™-Oligonukleotid in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird.

[0111] Fig. 109A zeigt zwei von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bilder, welche die Effekte des Einschlusses eines nicht-modifizierten Arrestor™-Oligonukleotids in dem zweiten Schritt der Reaktion auf das unspezifische und spezifische Spaltungssignal zeigen, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als Invader™-Oligonukleotid in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird.

[0112] Fig. 109B zeigt zwei von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bilder, welche die Effekte des Einschlusses eines 3'-terminal aminmodifizierten Arrestor™-Oligonukleotids, eines partiell 2'-O-methylsubstituierten, 3'-terminal aminmodifizierten Arrestors™ oder eines vollständig 2'-O-methyl-, 3'-terminal aminmodifizierten Arrestor™-Oligonukleotids in dem zweiten Schritt der Reaktion auf das unspezifische und spezifische Spaltungssignal zeigen, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als Invader™-Oligonukleotid in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird.

[0113] Fig. 110A zeigt zwei von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bilder, welche die Effekte des Einschlusses von Arrestor™-Oligonukleotiden verschiedener Länge in dem zweiten Schritt der Reaktion auf das unspezifische und spezifische Spaltungssignal vergleichen, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als Invader™-Oligonukleotid in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird.

[0114] Fig. 110B zeigt zwei von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bilder, welche die Effekte des Einschlusses von Arrestor™-Oligonukleotiden verschiedener Länge in dem zweiten Schritt der Reaktion auf das unspezifische und spezifische Spaltungssignal vergleichen, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als Invader™-Oligonukleotid in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird und wobei eine längere Variante der zweiten in den Reaktionen in Fig. 110A verwendete Sonde getestet wird.

[0115] Fig. 110C zeigt ein Schemadiagramm einer primären Sonde in Ausrichtung mit mehreren Arrestor™-Oligonukleotiden verschiedener Längen. Der Bereich der primären Sonde, der zu der HBV-Zielsequenz komplementär ist, ist unterstrichen. Die Arrestors™ sind nach Komplementarität zu der Sonde ausgerichtet.

[0116] Fig. 111 zeigt zwei von einem Fluoreszenzimager erzeugte Bilder, welche die Effekte des Einschlusses von Arrestor™-Oligonukleotiden verschiedener Länge in dem zweiten Schritt der Reaktion auf das unspezifische und spezifische Spaltungssignal vergleichen, wobei die geschnittene Sonde aus einer anfänglichen invasiven Spaltungsreaktion als Invader™-Oligonukleotid in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion verwendet wird und wobei sekundäre Sonden mit zwei verschiedenen Längen verwendet werden.

DEFINITIONEN

[0117] Wie hierin verwendet, werden die Begriffe „komplementär" oder „Komplementarität" in Bezug auf Polynukleotide verwendet (d. h., auf eine Sequenz von Nukleotiden, wie beispielsweise ein Oligonukleotid oder eine Zielnukleinsäure), die durch die Basenpaarungsregeln verwandt sind. Beispielsweise ist die Sequenz „A-G-T" komplementär zu der Sequenz „T-C-A". Komplementarität kann „partiell" sein, bei der nur einige der Nukleinsäuren nach den Basenpaarungsregeln zusammenpassen. Oder zwischen den Nukleinsäuren liegt eine „vollständige" oder „totale" Komplementarität vor. Der Grad der Komplementarität zwischen Nukleinsäuresträngen hat wesentlichen Einfluss auf die Effizienz und die Stärke der Hybridisierung zwischen Nukleinsäuresträngen. Dies ist besonders wichtig bei Amplifizierungsreaktionen sowie bei Nachweisverfahren, die von der Bindung zwischen Nukleinsäuren abhängen.

[0118] Der Begriff „Selbst-Komplementarität" bedeutet bei Verwendung in Bezug auf einen Nukleinsäurestrang (z. B. ein Oligonukleotid), dass separate Bereiche auf diesem Strang Basenpaarungen eingehen können. Da sich dieser Begriff nur auf intramolekulare Basenpaarung bezieht, muss jeder Strang, der einen Bereich der Selbst-Komplementarität aufweist, wenigstens zwei Bereiche aufweisen, die Basenpaarungen miteinander eingehen können. Wie oben definiert, kann Komplementarität entweder „vollständig" oder „total" sein. Wie in Bezug auf das Sondenoligonukleotid der vorliegenden Erfindung verwendet, gelten Bereiche als signifikante Selbst-Komplementarität aufweisend, wenn sie einen Doppelstrang von wenigstens 3 aufeinander folgenden Basenpaaren ausbilden können (d. h. drei Basenpaare mit vollständiger Komplementarität) oder wenn sie einen längen Doppelstrang ausbilden können, der partiell komplementär ist. Die Fähigkeit eines Oligonukleotids mit einem Bereich der Selbst-Komplementarität, erfolgreich sowohl als Zielstrang für eine Sonde als auch als stromaufwärts gelegenes Oligonukleotid zu dienen, das eine invasive Spaltung dieser Sonde anleitet, wie in Fig. 97 gezeigt, gilt als ausreichender Beweis einer Selbst-Komplementarität wie hierin definiert.

[0119] Der Begriff „Homologie" bezieht sich auf einen Grad der Identität. Es kann eine partielle oder eine vollständige Homologie vorliegen. Eine partielle identische Sequenz ist eine, die weniger als 100 identisch ist zu einer anderen Sequenz.

[0120] Wie hierin verwendet, wird der Begriff „Hybridisierung" in Bezug auf die Paarung komplementärer Nukleinsäuren verwendet. Hybridisierung und die Stärke der Hybridisierung (d. h. die Stärke der Verbindung zwischen den Nukleinsäuren) wird von Faktoren wie beispielsweise dem Grad der Komplementarität zwischen den Nukleinsäuren, der Stringenz der beteiligten Bedingungen, der T_m des gebildeten Hybrids und dem G:C-Verhältnis innerhalb der Nukleinsäuren bestimmt.

[0121] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „T_m" auf die „Schmelztemperatur". Die Schmelztemperatur ist die Temperatur, bei der eine Population doppelsträngiger Nukleinsäuremoleküle halb zu Einzelsträngen dissoziiert. Die Gleichung zur Berechnung der T_m von Nukleinsäuren ist aus dem Stand der Technik gut bekannt. Wie durch Standardbezugsverweise angezeigt, kann ein einfacher Schätzwert der T_m durch die Gleichung: $T_m = 81{,}5 + 0{,}41$ (% G + C) berechnet werden, wenn sich eine Nukleinsäure in einer wässrigen Lösung mit 1 M NaCl befindet (siehe beispielsweise Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization (1985). Andere Bezugsverweise enthalten ausgeklügeltere Berechnungen, die bei der Berechnung der T_m Struktur- sowie Sequenzeigenschaften berücksichtigen.

[0122] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Stringenz" auf die Bedingungen von Temperatur, Ionenstärke und das Vorhandensein anderer Verbindungen, unter denen Nukleinsäurehybridisierungen durchgeführt werden. Unter Bedingungen „hoher Stringenz" findet nur zwischen solchen Nukleinsäurefragmenten eine Basenpaarung statt, die viele komplementäre Basensequenzen aufweisen. Bedingungen „schwacher" oder „niedriger" Stringenz sind daher häufig erforderlich, wenn Nukleinsäuren, die nicht vollständig komplementär

zueinander sind, hybridisieren oder durch eine Annealing-Reaktion aneinander gebunden werden sollen.

[0123] Der Begriff „Gen" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die Steuerungs- und Codierungssequenzen umfasst, die für die Herstellung eines Polypeptids oder eines Vorläufers notwendig sind. Das Polypeptid kann von einer Codierungssequenz in voller Länge oder durch einen beliebigen Anteil der Codierungssequenz codiert sein, so lange die gewünschte Enzymaktivität erhalten bleibt.

[0124] Der Begriff „Wildtyp" bezieht sich auf ein Gen oder ein Genprodukt, das die Eigenschaften dieses Gens oder Genproduktes aufweist, wenn es aus einer natürlich vorkommenden Quelle isoliert wird. Ein Wildtyp-Gen ist eines, das in einer Population am häufigsten beobachtet wird und daher beliebig als das „normal" oder die „Wildtyp"-Form des Gens bezeichnet wird. Der Begriff „modifiziert" oder „mutant" bezieht sich dagegen auf ein Gen oder ein Genprodukt, das im Vergleich zum Wildtyp-Gen oder -Genprodukt Modifikationen der Sequenz oder der Funktionseigenschaften (d. h. veränderte Eigenschaften) zeigt. Diese natürlich vorkommenden Mutanten können isoliert werden; sie werden anhand der Tatsache identifiziert, dass sie veränderte Eigenschaften aufweisen, wenn sie mit dem Wildtyp-Gen oder -Genprodukt verglichen werden.

[0125] Der Begriff „rekombinanter DNA-Vektor", wie hierin verwendet, bezieht sich auf DNA-Sequenzen mit einer gewünschten Codierungssequenz und der geeigneten DNA-Sequenz, die für die Expression der funktional verknüpften Codierungssequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus erforderlich ist. Für die Expression in Prokaryonten erforderliche DNA-Sequenzen umfassen einen Promotor, wahlweise eine Operator-Sequenz, eine Ribosomenbindungsstelle und gegebenenfalls weitere Sequenzen. Eukaryontische Zellen verwenden bekannterweise Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer.

[0126] Der Begriff „LTR", wie hierin verwendet, bezieht sich die lange terminale Wiederholungssequenz (Long Terminal Repeat) an jedem Ende eines Provirus (d. h. der integrierten Form eines Retrovirus). Die LTR-Sequenz enthält zahlreiche regulatorische Signale, einschließlich Transkriptionssteuerungselemente, Polyadenylierungssignale und Sequenzen, die zur Replikation und Integration des viralen Genoms erforderlich sind. Die virale LTR-Sequenz wird in drei Bereiche mit der Bezeichnung U3, R und U5 eingeteilt.

[0127] Der U3-Bereich enthält die Enhancer- und Promotorelemente. Der U5-Bereich enthält die Polyadenylierungssignale. Der R-Bereich (Repeat- bzw. Wiederholungsbereich) trennt den U3- und den U5-Bereich, und sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende der viralen RNA sind transkribierte Sequenzen des R-Bereichs vorhanden.

[0128] Der Begriff „Oligonukleotid", wie hierin verwendet, ist definiert als ein Molekül, das aus zwei oder mehreren Desoxyribonukleotiden oder Ribonukleotiden zusammengesetzt ist, vorzugsweise aus wenigstens 5 Nukleotiden, mehr bevorzugt aus wenigstens etwa 10–15 Nukleotiden und mehr bevorzugt von wenigstens etwa 15 bis 30 Nukleotiden. Die genaue Größe richtet sich nach vielen Faktoren, die ihrerseits wiederum von der letztendlichen Funktion oder Verwendung des Oligonukleotids abhängen. Das Oligonukleotid kann auf jede beliebige Weise hergestellt werden, einschließlich durch chemische Synthese, DNA-Replikation, reverse Transkription oder eine Kombination davon.

[0129] Da Mononukleotide zur Herstellung von Oligonukleotiden auf eine Weise in Reaktion gebracht werden, dass das 5'-Phosphat eines Mononukleotidpentoserings an dem 3'-Sauerstoff seines Nachbarn in eine Richtung über eine Phosphodiesterverknüpfung angebracht wird, wird ein Ende eines Oligonukleotids als das „5'-Ende" bezeichnet, wenn sein 5'-Phosphat nicht mit dem 3'-Sauerstoff eines Mononukleotidpentoserings verknüpft ist, und als das „3'-Ende", wenn sein 3'-Sauerstoff nicht mit einem 5'-Phosphat eines nachfolgenden Mononukleotidpentoserings verknüpft ist. Wie hierin verwendet, kann auch eine Nukleinsäuresequenz, selbst wenn sie sich innerhalb eines größeren Oligonukleotids befindet, 5'- und 3'-Enden aufweisen. Ein erster Bereich entlang einem Nukleinsäurestranges gilt als stromaufwärts von einem anderen Bereich, wenn das 3'-Ende des ersten Bereichs vor dem 5'-Ende des zweiten Bereichs liegt, wenn man sich entlang einem Nukleinsäurestrang in der Richtung von 5'- zu 3'-bewegt.

[0130] Wenn zwei verschiedene nicht-überlappende Oligonukleotide durch eine Annealing-Reaktion an verschiedene Bereiche derselben linearen komplementären Nukleinsäuresequenz gebunden werden und das 3'-Ende eines Oligonukleotids zum 5'-Ende des anderen zeigt, kann Ersteres als das „stromaufwärts gelegene" Oligonukleotid und Letzteres als „stromabwärts gelegene" Oligonukleotid bezeichnet werden.

[0131] Der Begriff „Primer" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, das als Anfangspunkt einer Synthese dienen kann, wenn es unter Bedingungen platziert wird, in denen eine Primerverlängerung ausgelöst wird. Ein Oligonukleotid-„Primer" kann natürlicherweise auftreten, wie bei einem gereinigten Restriktionsverdau, oder kann

synthetisch hergestellt werden.

[0132] Ein Primer wird ausgewählt, um „im Wesentlichen" zu einem Strang einer bestimmten Sequenz der Vorlage komplementär zu sein. Ein Primer muss ausreichend komplementär sein, um mit einem Vorlagenstrang hybridisieren zu können, damit eine Primerverlängerung stattfindet. Eine Primersequenz braucht nicht die exakte Sequenz der Vorlage wiederzugeben. Beispielsweise kann ein nicht-komplementäres Nukleotidfragment an das 5'-Ende des Primers angebracht sein, wobei die übrige Primersequenz im Wesentlichen zu dem Strang komplementär ist. In dem Primer können nicht-komplementäre Basen oder längere Sequenzen eingestreut sein, vorausgesetzt, die Primersequenz weist ausreichende Komplementarität mit der Sequenz der Vorlage auf um zu hybridisieren und dadurch einen Vorlage-Primer-Komplex zur Synthese des Verlängerungsproduktes des Primers auszubilden.

[0133] „Hybridisierungs"-Verfahren umfasst das Binden einer komplementären Sequenz an die Zielnukleinsäure (die nachzuweisende Sequenz: der Nachweis dieser Sequenz kann durch direkte oder indirekte Mittel erfolgen) durch eine Annealing-Reaktion. Die Fähigkeit der beiden Polymere von Nukleinsäure enthaltenden komplementären Sequenzen, zueinander zu finden und durch Basenpaarungswechselwirkungen in einer Annealing-Reaktion aneinander zu binden, ist ein anerkanntes Phänomen. Auf die ersten Beobachtungen des „Hybridisierungs"-Vorgangs durch Marmur and Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46: 453 (1960) und Doty et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 46: 461 (1960) folgte eine Verfeinerung dieses Prozesses zu einem essenziellen Hilfsmittel der modernen Biologie.

[0134] Was die Komplementarität anbelangt ist es bei manchen diagnostischen Anwendungen wichtig zu bestimmen, ob die Hybridisierung eine vollständige oder partielle Komplementarität darstellt. Wenn beispielsweise gewünscht ist, einfach das Vorhandensein bzw. das Nichtvorhandensein einer Pathogen-DNA (beispielsweise eines Virus, Bakteriums, Pilzes, von Mykoplasmen oder Protozoen) nachzuweisen, ist es nur wichtig, dass das Hybridisierungsverfahren eine Hybridisierung sicherstellt, wenn die relevante Sequenz vorhanden ist; es können Bedingungen ausgewählt werden, bei denen sowohl partiell komplementäre Sonden als auch vollständig komplementäre Sonden hybridisieren. Andere diagnostische Anwendungen können allerdings erfordern, dass das Hybridisierungsverfahren zwischen partieller und vollständiger Komplementarität unterscheidet. Es kann relevant sein, genetische Polymorphismen nachzuweisen. Beispielsweise setzt sich Humanhämoglobin partiell aus vier Polypeptidketten zusammen. Zwei dieser Ketten sind identische Ketten von 141 Aminosäuren (Alphaketten) und zwei dieser Ketten sind identische Ketten von 146 Aminosäuren (Betaketten). Es ist bekannt, dass das Gen, welches die Betakette codiert, polymorph ist. Das normale Allel codiert eine Betakette mit einer Glutaminsäure an Position sechs. Das mutante Allel codiert eine Betakette mit einem Valin an Position sechs. Dieser Aminosäureunterschied hat einen grundlegenden (am grundlegendsten, wenn das Individuum für das mutante Allel homozygot ist) physiologischen Einfluss, der klinisch als Sicherzellenanämie bekannt ist. Es ist gut bekannt, dass die genetische Basis des Aminosäureaustausches einen einzelnen Basenunterschied zwischen der DNA-Sequenz des normalen Allels und der DNA-Sequenz des mutanten Allels umfasst.

[0135] Das Komplement einer Nukleinsäuresequenz, wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Oligonukleotid, das es sich, wenn es mit der Nukleinsäuresequenz derart ausgerichtet ist, dass das 5'-Ende einer Sequenz eine Paarung mit dem 3'-Ende der anderen Sequenz eingeht, in einer „antiparallelen Verbindung" befindet. In den Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung können bestimmte, in natürlichen Nukleinsäuren selten vorkommende Basen vorhanden sein und umfassen beispielsweise Inosin und 7-Deazaguanin. Komplementarität braucht nicht perfekt zu sein; stabile Doppelstränge können fehlgepaarte Basenpaare oder Basen ohne Paarung aufweisen. Ein Fachmann aus dem Bereich der Nukleinsäuretechnologie kann Doppelstrangstabilität empirisch ermitteln, indem eine Reihe von Variablen, einschließlich beispielsweise die Länge des Oligonukleotids, die Basenzusammensetzung und die Sequenz des Oligonukleotids, die Ionenstärke und Inzidenz von Basenpaaren mit Fehlpaarung, berücksichtigt wird.

[0136] Die Stabilität eines Nukleinsäuredoppelstranges wird durch die Schmelztemperatur oder „T_m" gemessen. Die T_m eine bestimmten Nukleinsäuredoppelstranges unter spezifischen Bedingungen ist die Temperatur, bei der durchschnittlich die Hälfte der Basenpaare dissoziiert ist.

[0137] Der Begriff „Marker", wie hierin verwendet, bezieht sich auf jedes Atom oder Molekül, das verwendet werden kann, um ein nachweisbares (vorzugsweise quantifizierbares) Signal bereit zu stellen, das an eine Nukleinsäure oder Protein angebracht werden kann. Marker können Signale liefern, die durch Fluoreszenz, Radioaktivität, Kolorimetrie, Gravimetrie, Röntgenbeugung oder Absorption, Magnetismus, enzymatische Aktivität und dergleichen nachweisbar sind. Ein Marker kann eine geladene Einheit (positive oder negative Ladung)

oder alternativ ladungsneutral sein.

[0138] Der Begriff „Spaltungsstruktur", wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine Struktur, die durch die Wechselwirkung eines Sondenoligonukleotids und einer Zielnukleinsäure gebildet wird, um einen Doppelstrang auszubilden, wobei die resultierende Struktur von einem Spaltungsmittel gespalten werden kann, einschließlich, aber nicht ausschließlich, eines Enzyms. Die Spaltungsstruktur ist ein Substrat für eine spezifische Spaltung durch das Spaltungagens, im Gegensatz zu einem Nukleinsäuremolekül, das ein Substrat für eine unspezifische Spaltung durch Mittel wie Phosphodiesterasen ist, welche Nukleinsäuremoleküle ohne Berücksichtigung der Sekundärstruktur spalten (d. h. es ist keine Ausbildung einer Doppelstrangstruktur erforderlich).

[0139] Der Begriff „Spaltungsagens", wie hierin verwendet, bezieht sich auf alle Mittel, die eine Spaltungsstruktur spalten können, einschließlich, aber nicht ausschließlich, Enzyme. Das Spaltungsagens kann native DNAPs mit 5'-Nukleaseaktivität umfassen (z. B. Taq-DNA-Polymerase, E. coli-DNA-Polymerase I) und insbesondere modifizierte DNAPs mit 5'-Nukleaseaktivität, aber ohne synthetische Aktivität. Die Fähigkeit von 5'-Nukleasen zur Spaltung natürlich vorkommender Strukturen in Nukleinsäurevorlagen (strukturspezifische Spaltung) ist geeignet, um interne Sequenzunterschiede in Nukleinsäuren ohne vorherige Kenntnis der spezifischen Sequenz der Nukleinsäure durchzuführen. Auf diese Weise sind sie strukturspezifische Enzyme. „Strukturspezifische Nukleasen" oder „strukturspezifische Enzyme" sind Enzyme, die spezifische Sekundärstrukturen in einem Nukleinmolekül erkennen und diese Strukturen spalten. Das erfindungsgemäße Spaltungsagens spaltet ein Nukleinsäuremolekül als Reaktion auf die Ausbildung von Spaltungsstrukturen; es ist nicht erforderlich, dass das Spaltungsagens die Spaltungsstruktur an einer bestimmten Stelle innerhalb der Spaltungsstruktur spaltet.

[0140] Das Spaltungsagens ist nicht auf Enzyme mit alleiniger 5'-Nukleaseaktivität beschränkt. Das Spaltungsagens kann Nukleaseaktivität umfassen, die von verschiedenen Quellen bereit gestellt wird, einschließlich den Cleavase®-Enzymen, den FEN-1-Endonukleasen (einschließlich der Proteine RAD2 und XPG), Taq-DNA-Polymerase und E. coli-DNA-Polymerase.

[0141] Der Begriff „thermostabil" zeigt bei Verwendung in Bezug auf ein Enzym wie beispielsweise eine 5'-Nuklease an, dass das Enzym bei einer erhöhten Temperatur (d. h. bei etwa 55°C oder höher) funktional oder aktiv ist (d. h., es kann eine Katalyse durchführen).

[0142] Der Begriff „Spaltungsprodukte", wie hierin verwendet, bezieht sich auf Produkte, die durch die Reaktion eines Spaltungsagens mit einer Spaltungsstruktur (d. h. die Behandlung einer Spaltungsstruktur mit einem Spaltungsagens) erzeugt werden.

[0143] Der Begriff „Zielnukleinsäure" bezieht sich auf ein Nukleinsäuremolekül, das eine Sequenz enthält, welche wenigstens partielle Komplementarität mit wenigstens einem Sondenoligonukleotid aufweist und auch wenigstens partielle Komplementarität mit einem Invader™-Oligonukleotid aufweisen kann. Die Zielnukleinsäure kann einzel- oder doppelsträngige DNA oder RNA umfassen.

[0144] Der Begriff „Sondenoligonukleotid" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, das mit einer Zielnukleinsäure wechselwirkt, um in Gegenwart oder Abwesenheit eines Invader™-Oligonukleotids eine Spaltungsstruktur zu bilden. Wenn es durch eine Annealing-Reaktion an die Zielnukleinsäure gebunden wird, formen das Sondenoligonukleotid und die Zielnukleinsäure eine Spaltungsstruktur, und innerhalb des Sondenoligonukleotids findet eine Spaltung statt. In Gegenwart des Invader™-Oligonukleotids stromaufwärts von dem Sondenoligonukleotid entlang der Zielnukleinsäure verschiebt die Spaltungsstelle innerhalb des Sondenoligonukleotids (relativ zu der Spaltungsstelle in Abwesenheit des Invaders™).

[0145] Der Begriff „Nicht-Ziel-Spaltungsprodukt" bezieht sich auf ein Produkt einer Spaltungsreaktion, das nicht von der Zielnukleinsäure stammt. Wie oben erläutert, findet die Spaltung der Spaltungsstruktur in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung innerhalb des Sondenoligonukleotids statt. Die Fragmente des Sondenoligonukleotids, die durch diese Zielnukleinsäure-abhängige Spaltung erzeugt werden, werden als „Nicht-Ziel-Spaltungsprodukte" bezeichnet.

[0146] Der Begriff „Invader™-Oligonukleotid" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, das eine Sequenz an seinem 3'-Ende enthält, die im Wesentlichen der Sequenz am 5'-Ende eines Sondenoligonukleotids entspricht. Diese Bereiche konkurrieren um die Hybridisierung an dasselbe Segment entlang einer komplementären Zielnukleinsäure.

[0147] Der Begriff „im Wesentlichen einzelsträngig" bedeutet bei Verwendung in Bezug auf ein Nukleinsäuresubstrat, dass das Substratmoleküle primär als ein Nukleinsäure-Einzelstrang existiert, im Gegensatz zu einem doppelsträngigen Substrat, das als zwei Nukleinsäurestränge existiert, welche durch Basenpaarungswechselwirkungen zwischen den Strängen zusammen gehalten werden.

[0148] Der Begriff „Sequenzvariation", wie hierin verwendet, bezieht sich auf Unterschiede in der Nukleinsäuresequenz zwischen zwei Nukleinsäuren. Beispielsweise können sich die Sequenzen eines Wildtyp-Strukturgens und einer mutanten Form dieses Wildtyp-Strukturgens durch das Vorhandensein einzelner Basensubstitutionen und/oder -deletionen oder Insertionen eines oder mehrere Nukleotide unterscheiden. Diese beiden Formen des Strukturgens unterscheiden sich dann voneinander in der Sequenz. Es kann eine zweite mutante Form des Strukturgens existieren. Diese zweite mutante Form unterscheidet sich dann in der Sequenz sowohl vom Wildtypgen als auch von der ersten mutanten Form des Gens.

[0149] Der Begriff „frei setzend", wie hierin verwendet, bezieht sich auf die Freisetzung eines Nukleinsäurefragments von einem größeren Nukleinsäurefragment, wie beispielsweise eines Oligonukleotids, indem eine 5'-Nuklease derart wirkt, dass das frei gesetzte Fragment nicht länger kovalent an den Rest des Oligonukleotids gebunden ist.

[0150] Der Begriff „K_m", wie hierin verwendet, bezieht sich auf die Michaelis-Menten-Konstante für ein Enzym und ist definiert als die Konzentration des spezifischen Substrates, bei der ein bestimmtes Enzym eine Hälfte seiner maximalen Geschwindigkeit bei einer enzymkatalysierten Reaktion erreicht.

[0151] Der Begriff „Nukleotidanalog", wie hierin verwendet, bezieht sich auf modifizierte oder nicht-natürlich vorkommende Nukleotide wie beispielsweise 7-Deazapurine (d. h. 7-Deaza-dATP und 7-Deaza-dGTP). Nukleotidanaloga umfassen Basenanaloga und umfassen modifizierte Formen von Desoxyribonukleotiden sowie Ribonukleotide.

[0152] Der Begriff „polymorpher Lokus" ist ein Lokus, der in einer Population vorhanden ist und Variationen zwischen den Mitgliedern der Population zeigt (d. h. das häufigste Allel hat eine Häufigkeit von weniger als 0,95). Ein „monomorpher Lokus" ist dagegen ein genetischer Lokus, auf dem wenig oder gar keine Variationen zwischen Mitgliedern der Population vorhanden sind (dies ist im Allgemeinen ein Lokus, bei dem das häufigste Allel eine Häufigkeit von mehr als 0,95 im Genpool der Population aufweist).

[0153] Der Begriff „Mikroorganismus", wie hierin verwendet, bedeutet einen Organismus, der zu klein ist, um mit dem Auge ohne Hilfsmittel beobachtet zu werden, und umfasst Viren, Protozoen, Pilze und Ziliaten, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0154] Der Begriff „mikrobielle Gensequenzen" bezieht sich auf Gensequenzen, die von einem Mikroorganismus abstammen.

[0155] Der Begriff „Bakterien" bezieht sich auf jede Bakterienart, einschließlich Arten der Eubakterien und Archaebakterien.

[0156] Der Begriff „Virus" bezieht sich auf obligate, im Ultramikroskop sichtbare, intrazelluläre Parasiten, die keine autonome Replikation durchführen können (d. h. die Replikation erfordert die Verwendung der Maschinerie der Wirtszelle).

[0157] Der Begriff „mit Multidrug-Resistenz" oder „mehrfach arzneimittelresistent" bezieht sich auf einen Mikroorganismus, der gegen mehr als eines der bei der Behandlung des Mikroorganismus verwendeten Antibiotika oder antimikrobiellen Mittel resistent ist.

[0158] Der Begriff „Probe" in der vorliegenden Beschreibung und den Ansprüchen wird in seinem weitesten Sinn verwendet. Einerseits soll er sich auf ein Präparat oder eine Kultur beziehen (z. B. auf mikrobiologische Kulturen). Andererseits soll er sich auf biologische Proben und Umweltproben beziehen.

[0159] Biologische Proben können von einem Tier stammen, einschließlich dem Menschen, flüssig, fest (z. B. Stuhl) oder Gewebe sein, sowie flüssige und feste Nahrungsmittel und Futterprodukte und Inhaltsstoffe wie Milchprodukte, Gemüse, Fleisch und Fleischnebenprodukte und Abfall. Biologische Proben können aus allen verschiedenen Familien von Haustieren stammen, sowie aus verwilderten Tieren oder Wildtieren, einschließlich, aber nicht ausschließlich, von Tieren wie Huftieren, Bär, Fisch, Nagerähnliche, Nager, etc.

[0160] Umweltproben umfassen Umweltmaterial wie Oberflächenmaterial, Erde, Wasser und industrielle Proben sowie Proben, die aus Nahrungsmittel oder Milch verarbeitenden Instrumenten, Apparaten, Ausrüstung, Gebrauchsgegenständen, Einweg- und Mehrwegartikeln erhalten werden. Diese Beispiele sollen die auf die vorliegende Erfindung anwendbaren Probentypen nicht einschränken.

[0161] Der Begriff „Quelle einer Zielnukleinsäure" bezieht sich auf jede Probe, die Nukleinsäuren (RNA oder DNA) enthält. Besonders bevorzugte Quellen von Zielnukleinsäuren sind biologische Proben, einschließlich, aber nicht ausschließlich, Blut, Speichel, Liquor, Pleuraflüssigkeit, Milch, Lymphe, Sputum und Samen.

[0162] Ein Oligonukleotid gilt als „im Überschuss" vorhanden, relativ zu einem anderen Oligonukleotid (oder einer Zielnukleinsäuresequenz), wenn dieses Oligonukleotid in einer höheren molaren Konzentration als das andere Oligonukleotid (oder die Zielnukleinsäuresequenz vorhanden ist). Wenn ein Oligonukleotid wie beispielsweise ein Sondenoligonukleotid in einer Spaltungsreaktion relativ zu der Konzentration der komplementären Zielnukleinsäuresequenz im Überschuss vorhanden ist, kann die Reaktion verwendet werden, um die Menge an vorhandener Zielnukleinsäure anzuzeigen. Wenn im Überschuss vorhanden, ist das Sondenoligonukleotid typischerweise in einem 100-fachen molaren Überschuss vorhanden; typischerweise würde wenigstens 1 pmol jedes Sondenoligonukleotids verwendet, wenn die Zielnukleinsäuresequenz in einer Menge von etwa 10 fmol oder weniger vorhanden ist.

[0163] Eine Probe, bei der „angenommen wird, dass sie" eine erste und eine zweite Zielnukleinsäure „enthält", kann entweder eines der beiden, beide oder keines der beiden Zielnukleinsäuremoleküle enthalten.

[0164] Der Begriff „ladungsausgeglichenes" Oligonukleotid bezieht sich auf ein Oligonukleotid (das Eingabe-Oligonukleotid in einer Reaktion), das derart modifiziert wurde, dass das modifizierte Oligonukleotid eine Ladung trägt, so dass, wenn das modifizierte Oligonukleotid gespalten (d. h. gekürzt) oder verlängert wird, ein resultierendes Produkt eine andere Ladung trägt als das Eingabe-Oligonukleotid (das „ladungsunausgeglichene" Oligonukleotid), was die Trennung des Eingabe-Oligonukleotids und des umgesetzten Oligonukleotids auf der Basis der Ladung ermöglicht. Der Begriff „ladungausgeglichen" impliziert nicht, dass das modifizierte oder ausgeglichene Oligonukleotid eine neutrale Nettoladung aufweist (obwohl dies der Fall sein kann). Ladungsausgleich bezieht sich darauf, dass ein Oligonukleotid derart ausgeführt und modifiziert ist, dass ein spezifisches Reaktionsprodukt, das aus diesem Eingabe-Oligonukleotid erzeugt wird, auf der Basis der Ladung von dem Eingabe-Oligonukleotid getrennt werden kann.

[0165] Bei einer Invader™-gesteuerten Spaltung, bei dem das Sondenoligonukleotid die Sequenz: 5'-TTCTTTTCACCAGCGAGACGGG-3'-trägt (d. h. SEQ ID Nr.: 50 ohne die modifizierten Basen) und zwischen dem zweiten und dritten Rest eine Spaltung stattfindet, wäre beispielsweise eine mögliche ladungsausgeglichene Version dieses Oligonukleotids: 5'-Cy3-AminoT-Amino-TCTTTTCACCAGCGAGACGGG-3'. Dieses modifizierte Oligonukleotid trägt eine negative Nettoladung. Nach der Spaltung werden folgende Oligonukleotide erzeugt: 5'-Cy3-AminoT-Amino-T-3'- und 5'-CTTTTCACCAGCGAGACGGG-3'-(Rest 3–22 von SEQ ID Nr.: 50). 5'-Cy3-AminoT-Amino-T-3'-trägt eine nachweisbare Einheit (den positiv geladenen Farbstoff Cy3) und zwei aminomodifizierte Basen. Die aminomodifizierten Basen und der Farbstoff Cy3 steuern positive Ladungen im Überschuss zu den von den Phosphatgruppen beigesteuerten negativen Ladungen bei, und deshalb hat das 5'-Cy3-AminoT-Amino-T-3'-Oligonukleotid eine positive Nettoladung. Das andere längere Spaltungsfragment trägt wie die Eingabesonde eine negative Nettoladung. Da das 5'-Cy3-AminoT-Amino-T-3'-Fragment auf der Basis der Ladung von der Eingabesonde (dem ladungsausgeglichenen Oligonukleotid) getrennt werden kann, wird es als ladungsunausgeglichenes Oligonukleotid bezeichnet. Das längere Spaltungsprodukt lässt sich nicht auf der Basis der Ladung von dem Eingabe-Oligonukleotid trennen, da beide Oligonukleotide eine negative Nettoladung tragen; das längere Spaltungsprodukt ist daher kein ladungsunausgeglichenes Oligonukleotid.

[0166] Der Begriff „neutrale Nettoladung" zeigt bei Verwendung in Bezug auf ein Oligonukleotid, einschließlich modifizierte Oligonukleotide, an, dass die Summe der vorhandenen Ladungen (d. h. R-NH^{3+}-Gruppen an Thymidinen, des N3-Stickstoffs von Zytosin, des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins von Phosphatgruppen, etc.) unter den gewünschten Reaktionsbedingungen im Wesentlichen null ist. Ein Oligonukleotid mit einer neutralen Nettoladung würde in einem elektrischen Feld nicht wandern.

[0167] Der Begriff „positive Nettoladung" zeigt bei Verwendung in Bezug auf ein Oligonukleotid, einschließlich modifizierte Oligonukleotide, an, dass die Summe der vorhandenen Ladungen (d. h. R-NH^{3+}-Gruppen an Thymidinen, des N3-Stickstoffs von Zytosin, des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins von Phosphatgruppen, etc.) unter den gewünschten Reaktionsbedingungen +1 oder größer ist. Ein Oligonukleotid mit einer po-

sitiven Nettoladung würde in einem elektrischen Feld zur negativen Elektrode wandern.

[0168] Der Begriff „negative Nettoladung" zeigt bei Verwendung in Bezug auf ein Oligonukleotid, einschließlich modifizierte Oligonukleotide, an, dass die Summe der vorhandenen Ladungen (d. h. R-NH^{3+}-Gruppen an Thymidinen, des N3-Stickstoffs von Zytosin, des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins von Phosphatgruppen, etc.) unter den gewünschten Reaktionsbedingungen –1 oder kleiner ist. Ein Oligonukleotid mit einer negativen Nettoladung würde in einem elektrischen Feld zur positiven Elektrode wandern.

[0169] Der Begriff „Polymerisierungsmittel" bezieht sich auf jedes Mittel, das die Addition von Nukleosidtriphosphaten an ein Oligonukleotid ermöglichen kann. Bevorzugte Polymerisierungsmittel umfassen DNA-Polymerasen.

[0170] Der Begriff „Ligierungsagens" bezieht sich auf jedes Agens, das in der Lage ist, eine Ligation zu ermöglichen (d. h. die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-OH und einem 5'-P zu ermöglichen, die sich an den Enden zweier Nukleinsäurestränge befinden). Bevorzugte Ligierungsmittel umfassen DNA-Ligasen und RNA-Ligasen.

[0171] Der Begriff „Reaktionspartner" wird hierin in seinem weitesten Sinn verwendet. Der Reaktionspartner kann einen enzymatischen Reaktionspartner, einen chemischen Reaktionspartner oder ultraviolettes Licht umfassen (es ist bekannt, dass ultraviolettes Licht, insbesondere ultraviolettes Licht kurzer Wellenlänge Oligonukleotidketten aufbricht). Jedes Mittel, das mit einem Oligonukleotid reagieren kann, um das Oligonukleotid entweder zu verkürzen (d. h. zu spalten) oder zu verlängern, ist im Begriff „Reaktionspartner" eingeschlossen.

[0172] Der Begriff „Addukt" wird hierin in seinem weitesten Sinn verwendet, um jede Verbindung oder Element anzuzeigen, das einem Oligonukleotid hinzugefügt werden kann. Ein Addukt kann geladen (positiv oder negativ) sein oder ladungsneutral sein. Ein Addukt kann einem Oligonukleotid über kovalente oder nicht-kovalente Verknüpfungen hinzugefügt werden. Beispiele von Addukten umfassen, jedoch nicht ausschließlich, Indodicarbocyanin-Farbstoffe (z. B. Cy3 und Cy5), aminosubstituierte Nukleotide, Ethidiumbromid, Ethidiumhomodimer, (1,3-Propandiamino)propidium, (Diethylentriamino)propidium, Thiazolorange, (N-N'-Tetramethyl-1,3-propandiamino)propylthiazolorange, (N-N'-Tetramethyl-1,2-ethandiamino)propylthiazolorange, Thiazolorange-Thiazolorange-Homodimer (TOTO), Thiazolorange-Thiazolblau-Heterodimer (TOTAB), Thiazolorange-Ethidium-Heterodimer 1 (TOED1), Thiazolorange-Ethidium-Heterodimer 2 (TOED2) und Floreszein-Ethidium-Heterodimer (FED), Psoralene, Biotin, Streptavidin, Avidin, etc.

[0173] Wenn ein erstes Oligonukleotid zu einem Bereich einer Zielnukleinsäure komplementär ist und ein zweites Oligonukleotid Komplementarität zu demselben Bereich (oder einem Anteil dieses Bereichs) aufweist, existiert entlang der Zielnukleinsäure ein „Bereich der Überlappung". Der Grad der Überlappung variiert je nach der Art der Komplementarität (siehe z. B. Bereich „X" in **Fig. 25** und **Fig. 56** und die begleitenden Diskussionen).

[0174] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „gereinigt" oder „reinigen" auf das Entfernen von Verunreinigungen aus einer Probe. Beispielsweise werden rekombinante Cleavase®-Nukleasen in bakteriellen Wirtszellen exprimiert, und die Nukleasen werden durch das Entfernen von Wirtszellproteinen gereinigt; Der Prozentanteil dieser rekombinanten Nukleasen wird daher in der Probe erhöht.

[0175] Der Begriff „rekombinantes DNA-Molekül", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein DNA-Molekül, das aus Segmenten von DNA zusammengesetzt ist, die mittels molekularbiologischer Techniken miteinander verbunden sind.

[0176] Der Begriff „rekombinantes Protein" oder „rekombinantes Polypeptid", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Proteinmolekül, das von einem rekombinanten DNA-Molekül exprimiert wird.

[0177] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Anteil", wenn er in Bezug auf ein Protein verwendet wird (wie in „ein Anteil eines bestimmten Proteins"), auf Fragmente dieses Proteins. Die Fragmente können von der Größe her von vier Aminosäureresten bis zur gesamten Aminosäuresequenz minus einer Aminosäure reichen.

[0178] „Nukleinsäuresequenz", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Oligonukleotid, Nukleotid oder Polynukleotid und Fragmente oder Anteile davon und auf DNA oder RNA genomischer oder synthetischer Herkunft, die einzel- oder doppelsträngig sein kann, und stellt den Sense- oder Antisense-Strang dar. Entsprechend bezieht sich „Aminosäuresequenz" wie hierin verwendet, auf eine Peptid- oder Proteinsequenz.

[0179] „Peptidnukleinsäure" („PNA"), wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Molekül, das ein Oligomer umfasst, dem ein Aminosäurerest, beispielsweise ein Lysin, und eine Aminogruppe hinzugefügt wurden. Diese kleinen Moleküle, auch als Anti-Genmittel bezeichnet, brechen die Verlängerung des Transkripts ab, indem sie an dessen komplementären Nukleinsäurestrang binden (Nielsen et al., Anticancer Drug Des. 8: 53–63 [1993]).

[0180] Wie hierin verwendet, beziehen sich die Begriffe „gereinigt" oder „im Wesentlichen gereinigt" auf Moleküle, entweder Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen, die aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt, isoliert oder getrennt werden und wenigstens zu 60% frei, vorzugsweise zu 75% frei und am meisten bevorzugt zu 90% frei sind von anderen Verbindungen, mit denen sie natürlicherweise assoziiert sind. Ein „isoliertes Polynukleotid" oder ein „isoliertes Oligonukleotid" ist daher ein im Wesentlichen gereinigtes Polynukleotid.

[0181] Ein isoliertes Oligonukleotid (oder Polynukleotid), das eine FEN-1-Endonuklease von Pyrococcus woesei (Pwo) codiert, die einen Bereich aufweist, der in der Lage ist, an SEQ ID Nr.: 80 zu hybridisieren, ist ein Oligonukleotid, das Sequenzen enthält, welche wenigstens den aminoterminalen Anteil der FEN-1-Endonuklease von Pwo codiert. Ein isoliertes Oligonukleotid (oder Polynukleotid), das eine FEN-1-Endonuklease von Pwo codiert, die einen Bereich aufweist, der in der Lage ist, an SEQ ID Nr.: 81 zu hybridisieren, ist ein Oligonukleotid, das Sequenzen enthält, welche wenigstens den carboxyterminalen Anteil der FEN-1-Endonuklease von Pwo codiert. Ein isoliertes Oligonukleotid (oder Polynukleotid), das eine FEN-1-Endonuklease von Pwo codiert, die einen Bereich aufweist, der in der Lage ist, an SEQ ID Nr.: 82 und 83 zu hybridisieren, ist ein Oligonukleotid, das Sequenzen enthält, welche wenigstens Anteile des FEN-1-Endonukleaseproteins von Pwo codiert, die innerhalb des Amino- oder des Carboxyterminus des FEN-1-Endonukleaseproteins von Pwo liegen.

[0182] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Fusionsprotein" auf ein chimäres Protein, das das relevante Protein (d. h. Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease und Anteile oder Fragmente davon) verknüpft mit einem Fragment eines exogenen Proteins enthält (der Fusionspartner, der aus einem Nicht-Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease-Protein besteht). Der Fusionspartner kann die Löslichkeit des rekombinanten chimären Proteins (z. B. der Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease) bei Expression in einer Wirtszelle erhöhen, kann einen Affinitätsmarker (z. B. einen His-Marker) bereit stellen, um die Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins aus der Wirtszelle oder dem Kulturüberstand oder beiden zu ermöglichen. Falls gewünscht, kann das Fusionsprotein aus dem relevanten Protein (z. B. der Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease oder Fragmenten davon) mithilfe verschiedener, aus dem Stand der Technik bekannter enzymatischer oder chemischer Mittel entfernt werden.

[0183] Der Begriff „gereinigte Pfu FEN-1-Endonuklease mit einem Molekulargewicht von etwa 38,7 Kilodalton" bezieht sich auf eine FEN-1-Endonuklease, die aus Pyrococcus woesei isoliert ist und im SDS-PAGE-Gel ein Molekulargewicht von etwa 38,7 kDa aufweist, wenn die SDS-PAGE unter den in Beispiel 28 beschriebenen Bedingungen durchgeführt wird. Ein Fachmann versteht, dass bei Auftragung derselben Proteinpräparation auf separate Gele mit augenscheinlich derselben Zusammensetzung geschätzte Molekulargewichte erhalten werden können, die sich etwas voneinander unterscheiden (um etwa 5~15%).

[0184] Der Begriff „kontinuierlicher Nukleinsäurestrang", wie hierin verwendet, soll einen Nukleinsäurestrang bezeichnen, der eine kontinuierliche, kovalent verknüpfte Gerüststruktur ohne Einzelstrangbrüche oder Doppelstrangbrüche aufweist. Die Art des Basenanteils jedes Nukleotids, unabhängig davon ob es einer Basenpaarung unterliegt, einzelsträngig oder fehlgepaart ist, ist kein Element der Definition eines kontinuierlichen Stranges. Das Gerüst des kontinuierlichen Stranges ist nicht auf die Ribosephosphat- oder Desoxyribosephosphatzusammensetzungen beschränkt, die in natürlich vorkommenden, nicht modifizierten Nukleinsäuren gefunden werden. Eine Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung kann Modifikationen in der Struktur des Gerüstes aufweisen, einschließlich, aber nicht ausschließlich, Phosphorothioat-Reste, Phosphonat-Reste, 2'-substituierte Ribosereste (z. B. 2'-O-Methylribose) und alternative Zucker (z. B. Arabinose)-haltige Reste.

[0185] Der Begriff „kontinuierlicher Doppelstrang", wie hierin verwendet, bezieht sich auf einen Bereich einer doppelsträngigen Nukleinsäure, in dem es keine Unterbrechung der Fortsetzung von Basenpaaren innerhalb des Doppelstranges gibt (d. h. die Basenpaare entlang des Doppelstrangs sind nicht verzerrt, um eine Lücke, eine Ausstülpung oder eine Fehlpaarung innerhalb der Grenzen des Bereichs des kontinuierlichen Doppelstranges zu ergeben). Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff nur auf die Anordnung der Basenpaare innerhalb des Doppelstranges, ohne eine Kontinuität des Gerüstanteils des Nukleinsäurestranges zu implizieren. Doppelstrang-Nukleinsäuren mit ununterbrochener Basenpaarung, aber mit Einzelstrangbrüchen in einem oder in beiden Strängen, sind in der Definition eines kontinuierlichen Doppelstranges eingeschlossen.

[0186] Der Begriff „Doppelstrang" bezieht sich auf den Zustand von Nukleinsäuren, bei dem die Basenanteile

der Nukleotide auf einem Strang durch Wasserstoffbrückenbindungen an ihre komplementären Basen auf einem zweiten Strang gebunden sind. Der Zustand des Vorliegens in Form eines Doppelstranges spiegelt den Zustand der Basen einer Nukleinsäure wider. Infolge der Basenpaarung nehmen die Nukleinsäurestränge im Allgemeinen die Tertiärstruktur einer Doppelhelix mit einer großen und einer kleinen Rinne an. Die Annahme der helikalen Form ist im Vorgang der Ausbildung eines Doppelstranges eingeschlossen.

[0187] Der Begriff „Doppelstrang-abhängige Proteinbindung" bezieht sich auf die Bindung von Proteinen an eine Nukleinsäure, die davon abhängig ist, dass die Nukleinsäure in Form eines Doppelstranges bzw. einer Helix vorhanden ist.

[0188] Der Begriff „Doppelstrang-abhängige Proteinbindungsstellen oder -bereiche", wie hierin verwendet, bezieht sich auf diskrete Bereiche oder Sequenzen innerhalb einer Nukleinsäure, die mit besonderer Affinität von spezifischen Doppelstrang-abhängigen Nukleinsäurebindungsproteinen gebunden werden. Dem gegenüber steht die allgemeine Doppelstrang-abhängige Bindung von Proteinen, die nicht positionsspezifisch sind, beispielsweise der Histonproteine, die Chromatin mit wenig Bezug auf spezifische Sequenzen oder Stellen binden.

[0189] Der Begriff „Proteinbindungsbereich", wie hierin verwendet, bezieht sich auf einen Nukleinsäurebereich, der durch eine Sequenz oder Struktur als an ein bestimmtes Protein oder Proteinklasse bindend identifiziert wird. Im Umfang dieser Definition sind solche Bereiche eingeschlossen, die ausreichend genetische Informationen enthalten, um Identifikationen des Bereichs durch Vergleich mit bekannten Sequenzen zu erlauben, die aber nicht die für eine tatsächliche Bindung erforderliche Struktur aufweisen (z. B. ein Einzelstrang einer Doppelstrang-abhängigen Nukleinsäurebindungsproteinstelle). Wie hierin verwendet, schließt „Proteinbindungsbereich" Restriktionsendonuklease-Bindungsbereiche aus.

[0190] Der Begriff „vollständiger doppelsträngiger Poteinbindungsbereich", wie hierin verwendet, bezieht sich auf den Mindestbereich eines kontinuierlichen Doppelstranges, der erforderlich ist, um eine Bindung oder eine andere Aktivität eines Doppelstrang-abhängigen Proteins zuzulassen. Diese Definition soll die Beobachtung einschließen, dass manche Doppelstrang-abhängigen Nukleinsäurebindungsproteine mit voller Aktivität mit Doppelstrangbereichen wechselwirken können, die kürzer als ein kanonischer Proteinbindungsbereich, wie beobachtet in einem oder dem anderen der beiden Einzelstränge, sind. In anderen Worten können eines oder mehrere Nukleotide in dem Bereich ungepaart bleiben, ohne die Bindung zu unterdrücken. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „vollständiger doppelsträngiger Poteinbindungsbereich auf die Mindestsequenz, die die Bindungsfunktion ermöglicht. Da einige solcher Bereiche an mehreren Stellen, wenngleich nicht zwingend gleichzeitig, nicht-doppelsträngige Sequenzen tolerieren können, kann ein einzelner Proteinbindungsbereich mehrere kürzere Unterbereiche aufweisen, die bei Vorliegen als Doppelstrang für Proteinbindung vollständig kompetent sind.

[0191] Der Begriff „Vorlage" bezieht sich auf einen Nukleinsäurestrang, auf dem durch die Aktivität einer vorlagenabhängigen Nukleinsäurepolymerase eine komplementäre Kopie aus Nukleosidtriphosphaten erstellt wird. Innerhalb eines Doppelstranges ist der Vorlagenstrang konventionsgemäß als der „untere" Strang dargestellt und beschrieben. Entsprechend ist der Nicht-Vorlagenstrang häufig als der „obere" Strang dargestellt und beschrieben.

[0192] Der Begriff „vorlagenabhängige RNA-Polymerase" bezieht sich auf eine Nukleinsäurepolymerase, die neue RNA-Stränge durch Kopieren eines Vorlagenstranges, wie oben definiert, herstellt und in Abwesenheit einer Vorlage keine RNA synthetisiert. Dem gegenüber steht die Aktivität der vorlagenunabhängigen Nukleinsäurepolymerasen, die Nukleinsäuren ohne Bezug auf eine Vorlage synthetisieren oder verlängern, wie beispielsweise die terminale Desoxynucleotidyltransferase oder die Poly-A-Polymerase.

[0193] Der Begriff „Arrestor™" bezieht sich auf ein Agens, das einer invasiven Spaltungsreaktion zugegeben wird oder darin enthalten ist, um einen oder mehrere Reaktionsbestandteile davon abzuhalten, an einer späteren Aktion oder Reaktion teilzunehmen. Dies kann durch Absonderung oder Inaktivierung einiger Reaktionsbestandteile erfolgen (z. B. durch Bindung oder Basenpaarung eines Nukleinsäurebestandteils oder durch Bindung an einen Proteinbestandteil). Der Begriff „Arrestor™-Oligonukleotid" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, das in einer invasiven Spaltungsreaktion vorhanden ist, um einen oder mehrerer Aspekte einer Reaktion zu beenden oder anzuhalten (d. h. die erste Reaktion und/oder eine der anschließenden Reaktionen oder Aktionen; es ist nicht beabsichtigt, dass das Arrestor™-Oligonukleotid auf eine bestimmte Reaktion oder einen bestimmten Reaktionsschritt beschränkt ist). Dies kann durch Absonderung einiger Reaktionsbestandteile erfolgen (z. B. durch Basenpaarung an eine andere Nukleinsäure oder durch Bindung an einen Proteinbestandteil).

Der Begriff soll jedoch nicht nur auf Situationen beschränkt sein, in denen ein Reaktionsbestandteil abgesondert wird.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0194] Die vorliegende Erfindung ist in den Ansprüchen definiert und betrifft Verfahren und Zusammensetzungen für das Behandlung von Nukleinsäuren und insbesondere Verfahren und Zusammensetzungen für den Nachweis und die Charakterisierung von Nukleinsäuresequenzen und -sequenzänderungen.

[0195] Die vorliegende Erfindung betrifft Mittel zum positionsspezifischen Spalten einer Nukleinsäurespaltungsstruktur Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Spaltungsenzym mit 5'-Nukleaseaktivität ohne Beeinflussung der Synthesefähigkeit der Nukleinsäure.

[0196] Diese Erfindung stellt 5'-Nukleases bereit, die von thermostabilen DNA-Polymerasen abgeleitet sind, welche gegenüber nativen thermostabilen DNA-Polymerasen veränderte DNA-Syntheseaktivität aufweisen. Die 5'-Nukleaseaktivität der Polymere bleibt erhalten, während die Syntheseaktivität reduziert oder nicht vorhanden ist. Solche 5'-Nukleasen können die strukturspezifische Spaltung von Nukleinsäuren in Abwesenheit beeinflussender Syntheseaktivität katalysieren. Die fehlende Syntheseaktivität während einer Spaltungsreaktion führt zu Nukleinsäurespaltungsprodukten einheitlicher Größe.

[0197] Die neuartigen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Nukleasen bilden die Grundlage eines Verfahrens des Nachweisens spezifischer Nukleinsäuresequenzen. Dieses Verfahren beruht auf der Amplifizierung des Nachweismoleküls und nicht auf der Amplifizierung der Zielsequenz selbst, wie es bei bestehenden Verfahren des Nachweises spezifischer Zielsequenzen der Fall ist.

[0198] DNA-Polymerasen (DNAPs), beispielsweise solche, die aus E. coli oder aus thermophilen Bakterien der Gattung Thermus isoliert sind, sind Enzyme, die neue DNA-Stränge synthetisieren. Einige der bekannten DNAPs weisen außer der Syntheseaktivität des Enzyms assoziierte Nukleaseaktivitäten auf.

[0199] Es ist bekannt, dass einige DNAPs Nukleotide vom 5'- und 3'-Ende von DNA-Ketten entfernen (Kornberg, DNA Replication, W. H. Freeman und Co., San Francisco, S. 127–139 [1980]). Diese Nukleaseaktivität wird in der Regel als 5'-Exonuklease- bzw. 3'-Exonukleaseaktivität bezeichnet. Die sich in der N-terminalen Domäne mehrerer DNAPs befindende 5'-Exonukleaseaktivität ist an dem Entfernen von RNA-Primern während der Rückwärtsstrang-Synthese bei der DNA-Replikation und beim Entfernen beschädigter Nukleotide bei der Reparatur beteiligt. Manche DNAPS wie beispielsweise die E. coli-DNA-Polymerase (DNAPEc1) weisen auch eine 3'-Exonukleaseaktivität auf, die für das Korrekturlesen während der DNA-Synthese zuständig ist (Kornberg, oben).

[0200] Eine aus Thermus aquaticus isolierte DNAP, die als Taq-DNA-Polymerase (DNAPTaq) bezeichnet wird, weist eine 5'-Exonukleaseaktivität auf, verfügt aber nicht über eine funktionale exonukleolytische 3'-Domäne (Tindall and Kunkell, Biochem., 27; 6008 [1988]). Derivate von DNAPEc1 und DNAPTaq, die als Klenow- bzw. als Stoffelfragment bezeichnet werden, verfügen als Resultat enzymatischer oder genetischer Manipulationen nicht über 5'-Exonukleasedomänen (Brutlag et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 37; 982 [1969]; Erlich et al., Science 252; 1643 [1991]; Setlow and Kornberg, J. Biol. Chem. 247: 232 [1972]).

[0201] Es wurde berichtet, dass die 5'-Exonukleaseaktivität von DNAPTaq eine gleichzeitige Synthese erfordert (Gelfand, in PCR Technology – Principles und Applications for DNA Amplification Erlich, (Hrsg.). Stockton Press, New York, S. 19 [1989]). Obgleich unter den Verdauungsprodukten der 5'-Exonukleasen von DNAPTaq und DNAPEcl Mononukleotide dominieren, können auch kurze Oligonukleotide (≤ 12 Nukleotide) auftreten, was nahelegt, dass diese so genannten 5'-Exonukleasen endonukleolytisch arbeiten können (Setlow, oben; Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88; 7276 [1991]).

[0202] In WO 92/06200 zeigen Gelfand et al., dass verschobene einzelsträngige DNA das bevorzugte Substrat der 5'-Exonukleaseaktivität der thermostabilen DNA-Polymerasen ist. Zwischen der verschobenen einzelsträngigen DNA und der Doppelhelix-DNA findet eine Hydrolyse der Phosphodiesterbindung statt, wobei die bevorzugte Exonuklease-Spaltungsstelle eine Phosphodiesterbindung im Doppelhelixbereich ist. Die für gewöhnlich mit DNAPs in Verbindung gebrachte 5'-Exonukleaseaktivität ist also eine strukturabhängige, einzelsträngige Endonuklease und wird korrekter als eine 5'-Nuklease bezeichnet. Exonukleasen sind Enzyme, die Nukleotidmoleküle von den Enden des Nukleinsäuremoleküls spalten. Endonukleasen sind dagegen Enzyme, welche das Nukleinsäuremolekül intern und nicht endständig spalten. Die Nukleaseaktivität in Verbindung mit

manchen thermostabilen DNA-Polymerasen spaltet endonukleolytisch, aber diese Spaltung erfordert den Kontakt mit den 5'-Ende des zu spaltenden Moleküls. Diese Nukleasen werden daher als 5'-Nukleasen bezeichnet.

[0203] Wenn eine 5'-Nukleaseaktivität mit einer DNA-Polymerase vom eubakteriellen Typ A verknüpft ist, befindet sie sich im Drittel des N-terminalen Bereiches des Proteins als eine unabhängige funktionale Domäne. Die C-terminalen zwei Drittel des Moleküls stellen die Polymerisierungsdomäne, die für die Synthese der DNA zuständig ist. Einige DNA-Polymerasen vom Typ A weisen auch 3'Exonukleaseaktivität in Verbindung mit dem C-terminalen Zwei-Drittel-Bereich des Moleküls auf.

[0204] Die 5'-Exonukleaseaktivität und die Polymerisierungsaktivität von DNAPs sind durch proteolytische Spaltung oder genetische Manipulation des Polymerasemoleküls getrennt worden. Heutige thermostabile DNAPs sind modifiziert worden, um die Menge an 5'-Nukleaseaktivität zu entfernen oder zu reduzieren, während die Polymeraseaktivität intakt belassen wurde.

[0205] Das Klenowfragment bzw. das durch proteolytische Spaltung entstandene große Fragment von DNAPEcI enthält die Polymerase- und 3'-Exonukleaseaktivität, aber nicht die 5'-Nukleaseaktivität. Dem Stoffel-Fragment der DNAPTaq (DNAPStf) fehlt die 5'-Nukleaseaktivität aufgrund einer genetischen Manipulation, durch welche die N-terminalen 289 Aminosäuren des Polymerasemoleküls entfernt wurden (Erlich et al., Science 252: 1643 [1991]). WO 92/06200 beschreibt eine thermostabile DNAP mit einem veränderten Maß an 5'- zu 3'-Exonuklease. Das US-Patent Nr. 5,108,892 beschreibt eine Thermus-aquaticus-DNAP ohne eine 5'- zu 3'-Exonuklease. Im Stand der Technik der Molekularbiologie fehlt aber eine thermostabile DNA-Polymerase mit einem geringen Maß an Syntheseaktivität.

[0206] Die vorliegende Erfindung stellt 5'-Nukleasen bereit, die aus thermostabilen DNA-Polymerasen vom Typ A abgeleitet sind, deren 5'-Nukleaseaktivität erhalten geblieben ist, die aber reduzierte oder fehlende Syntheseaktivität aufweisen. Die Möglichkeit der Entkopplung der Syntheseaktivität des Enzyms von der 5'-Nukleaseaktivität beweist, dass die 5'-Nukleaseaktivität keine begleitende DNA-Synthese benötigt, wie zuvor berichtet worden ist (Gelfand, PCR Technology, oben).

[0207] Die Beschreibung der Erfindung teilt sich folgendermaßen auf: I. Erzeugung von 5'-Nukleasen, die aus thermostabilen DNA-Polymerasen abgeleitet sind; II. Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen mithilfe von 5'-Nukleasen in einer Invader™-gesteuerten Spaltung; III. Vergleich der invasiven Spaltung und der primergesteuerten Spaltung; IV. Fraktionierung spezifischer Nukleinsäuren durch selektive Ladungsumkehrung; V. Invader™-gesteuerte Spaltung unter Verwendung von Minisonden und Sonden im mittleren Bereich; VI. Signalverstärkung durch Tailing von Reaktionsprodukten bei der Invader™-gesteuerten Spaltung; VII. Verbesserte Enzyme zur Verwendung bei Invader™-gesteuerten Spaltungsreaktionen; VIII. Signalverstärkung durch Vervollständigung einer aktivierten Proteinbindungsstelle; IX. Signalverstärkung durch Einbau der Produkte einer invasiven Spaltungsreaktion in eine anschließende invasive Spaltungsreaktion; X. Nachweis von viraler DNA des humanen Zytomegalievirus durch invasive Spaltung; und XI. Effekt von Arrestor™-Oligonukleotiden auf Signal und Hintergrund bei aufeinander folgenden invasiven Spaltungsreaktionen.

I. Erzeugung von 5'-Nukleasen aus thermostabilen DNA-Polymerasen

[0208] Die Gene, die DNA-Polymerasen vom Typ A codieren, teilen auf der Ebene der DNA-Sequenz untereinander eine Homologie von etwa 85%. Bevorzugte Beispiele thermostabiler Polymerasen umfassen die aus Thermus aquaticus, Thermus flavus und Thermus thermophilus isolierten. Es sind aber auch andere thermostabile Typ-A-Polymerasen mit 5'-Nukleaseaktivität geeignet. **Fig.** 1 und 2 vergleichen die Nukleotid- und die Aminosäuresequenz der drei oben erwähnten Polymerasen. In **Fig.** 1 und 2 ist die Konsensus- oder Mehrheitssequenz aus einem Vergleich der Nukleotid- (**Fig.** 1) oder Aminosäure- (**Fig.** 2) Sequenz der drei thermostabilen DNA-Polymerasen in der oberen Zeile gezeigt. In der Sequenz jeder dieser drei Polymerasen erscheint an jeder Stelle, an der ein Aminosäurerest in einer bestimmten Sequenz identisch zu dem in der Aminosäure-Konsensussequenz vorhandenen ist, ein Punkt. Striche werden verwendet, um Lücken einzuführen, um die Ausrichtung (das Alignment) zwischen den angezeigten Sequenzen zu maximieren. Wenn an einer bestimmten Position kein Konsensusnukleotid oder keine Konsensusaminosäure vorhanden ist, wurde ein „X" in der Konsensussequenz platziert. SEQ ID Nr.: 1–3 zeigen die Nukleotidsequenzen und SEQ ID Nr.: 4–6 zeigen die Aminosäuresequenzen der drei Wildtyppolymerasen. SEQ ID Nr.: 1 entspricht der Nukleinsäuresequenz des Wildtyp-Gens der DNA-Polymerase von Thermus aquaticus, isoliert aus dem Stamm YT-1 (Lawyer et al., J. Biol. Chem., 264: 6427 [1989]). SEQ ID Nr.: 2 entspricht der Nukleinsäuresequenz des Wildtyp-Gens der DNA-Polymerase von Thermus flavus (Akhmetzjanov and Vakhitov, Nucl. Acids Res., 20: 5839 [1992]). SEQ ID Nr.: 3 entspricht der Nukleinsäuresequenz des Wildtyp-Gens der DNA-Polymerase von Thermus thermo-

philus (Gelfand et al., WO 91/09950 [1991]). SEQ ID Nr.: 7–8 zeigt die Nukleotid- bzw. die Aminosäure-Konsensussequenz für die obigen drei DNAPs (auch gezeigt in der obersten Zeile in **Fig.** 2 und Fig. 3).

[0209] Die aus thermostabilen Polymerasen abgeleiteten erfindungsgemäßen 5'-Nukleasen haben reduzierte Synthesefähigkeit, aber behalten im Wesentlichen dieselbe 5'-Exonukleaseaktivität bei wie die native DNA-Polymerase. Der Begriff „im Wesentlichen dieselbe 5'-Exonukleaseaktivität", wie hierin verwendet, bedeutet, dass die 5'-Nukleaseaktivität des modifizierten Enzyms die Fähigkeit behält, als eine strukturabhängige Einzelstrangendonuklease zu wirken, jedoch nicht zwingend mit derselben Spaltungsrate im Vergleich zum unmodifizierten Enzym. DNA-Polymerasen von Typ A können auch derart modifiziert werden, dass sie ein Enzym produzieren, welches erhöhte 5'-Nukleaseaktivität und gleichzeitig ein reduziertes Maß an Syntheseaktivität aufweist. Modifizierte Enzyme mit reduzierter Syntheseaktivität und erhöhter 5'-Nukleaseaktivität werden von der vorliegenden Erfindung ebenfalls in Betracht gezogen.

[0210] Mit dem Begriff „reduzierte Syntheseaktivität", wie hierin verwendet, ist gemeint, dass das modifizierte Enzym ein geringeres Maß an Syntheseaktivität aufweist, wie in dem unmodifizierten oder „nativen" Enzym vorhanden ist. Das modifizierte Enzym kann keine Syntheseaktivität mehr aufweisen oder kann eine Syntheseaktivität in einem Ausmaß aufweisen, welches die Verwendung des modifizierten Enzyms in dem unten beschriebenen Nachweistest nicht beeinträchtigt. Die 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung sind in Situationen vorteilhaft in denen die Spaltungsaktivität der Polymerase, aber nicht die Syntheseaktivität gewünscht ist (beispielsweise bei dem erfindungsgemäßen Nachweistest).

[0211] Wie oben erwähnt, ist nicht beabsichtigt, dass die Erfindung durch die Art der Veränderung eingeschränkt ist, die erforderlich ist, um die Polymerase synthesedefizient zu machen. Die vorliegende Erfindung zieht verschiedene Verfahren in Betracht, einschließlich, aber nicht ausschließlich: 1) Proteolyse; 2) rekombinante Konstrukte (einschließlich Mutanten) und 3) physikalische und/oder chemische Modifizierung und/oder Hemmung.

1. Proteolyse

[0212] Thermostabile DNA-Polymerasen, die ein reduziertes Maß an Syntheseaktivität aufweisen, werden hergestellt, indem das unmodifizierte Enzym von proteolytischen Enzymen physikalisch gespalten wird, um Fragmente des Enzyms hervorzubringen, die keine Syntheseaktivität aufweisen, aber noch über 5'-Nukleaseaktivität verfügen. Nach dem proteolytischen Verdau werden die resultierenden Fragmente mittels Standardchromatographietechniken getrennt und hinsichtlich der Fähigkeit getestet, DNA zu synthetisieren und als 5'-Nuklease zu wirken. Die Tests zur Bestimmung der Syntheseaktivität und der 5'-Nukleaseaktivität sind unten beschrieben.

2. Rekombinante Konstrukte

[0213] Die Beispiele unten beschrieben ein bevorzugtes Verfahren zum Erzeugen eines Konstruktes, das eine 5'-Nuklease codiert, welche aus einer thermostabilen DNA-Polymerase abgeleitet ist. Da die DNA-Polymerasen von Typ A eine ähnliche DNA-Sequenz aufweisen, sind die für die Polymerasen von Thermus aquaticus und flavus verwendeten Klonierungsstrategien auch auf andere thermostabile Typ-A-Polymerasen anwendbar. Allgemein wird eine thermostabile DNA-Polymerase kloniert, indem genomische DNA mithilfe molekularbiologischer Verfahren aus einem Bakterium mit einer thermostabilen DNA-Polymerase vom Typ A isoliert wird. Diese genomische DNA wird Primern ausgesetzt, die das Polymerasegen durch PCR amplifizieren können.

[0214] Diese amplifizierte Polymerasesequenz wird dann einem Standarddeletionsprozess unterzogen, um den Polymeraseanteil des Gens zu entfernen. Geeignete Deletionsprozesse sind unten in den Beispielen beschrieben.

[0215] Das Beispiel unten erörtert die Strategie, die verwendet wird um zu bestimmen, welche Anteile der DNAPTaq-Polymerase-Domäne entfernt werden können, ohne die 5'-Nukleaseaktivität zu beseitigen. Die Deletion von Aminosäuren aus dem Protein kann entweder durch Deletion des codierenden genetischen Materials oder durch Einfügen eines Stopp-Codons für die Translation durch Mutation oder Verschiebung des Leserasters (Frame Shift) erfolgen. Darüber hinaus kann eine proteolytische Behandlung des Proteinmoleküls durchgeführt werden, um Segmente des Proteins zu entfernen.

[0216] In den Beispielen unten wurden folgende spezifische Veränderungen des Taq-Gens vorgenommen:

eine Deletion zwischen Nukleotid 1601 und 2502 (dem Ende des Codierungsbereichs), eine Insertion von 4 Nukleotiden an Position 2043 und Deletionen zwischen Nukleotid 1614 und 1848 und zwischen Nukleotid 875 und 1778 (Nummerierung wie in SEQ ID Nr.: 1). Diese modifizierten Sequenzen sind unten in den Beispielen und in SEQ ID Nr.: 9–12 beschrieben.

[0217] Einem Fachmann ist klar, dass einzelne Basenpaarveränderungen in Bezug auf Enzymstruktur und -funktion harmlos sein können. Entsprechend können kleine Additionen und Deletionen vorhanden sein, ohne die Exonuklease- oder Polymerasefunktion dieser Enzyme wesentlich zu verändern.

[0218] Es sind auch andere Deletionen geeignet, um die 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung zu erzeugen. Es ist bevorzugt, dass die Deletion die Polymeraseaktivität der 5'-Nukleasen auf ein Maß reduziert, bei dem eine Syntheseaktivität nicht den Gebrauch der 5'-Nuklease in dem Nachweistest der Erfindung beeinträchtigt. Am meisten bevorzugt ist, dass keine Syntheseaktivität vorhanden ist. Modifizierte Polymerasen werden wie in den unten beschrieben Tests auf das Vorhandensein von Syntheseaktivität und 5'-Nukleaseaktivität getestet. Die sorgfältige Überlegung dieser Tests erlaubt die Untersuchung von Kandidatenenzymen, deren Struktur bislang noch unbekannt ist. In anderen Worten kann Konstrukt „X" nach dem unten beschriebenen Protokoll untersucht werden um zu bestimmen, ob es der Funktionsdefinition und nicht der Strukturdefinition nach ein Mitglied der Gattung von 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung ist.

[0219] In dem Beispiel unten hatte das PCR-Produkt der amplifizierten genomischen DNA von Thermus aquaticus nicht die identische Nukleotidstruktur der nativen genomischen DNA und nicht dieselbe Synthesefähigkeit des Ursprungsklons. Auch Basenpaarveränderungen, die aufgrund der Ungenauigkeit (Infidelity) der DNAPTaq-Polymerase während der PCR-Amplifizierung eines Polymerasegens resultieren, sind ein Verfahren, mit dem die Synthesefähigkeit eines Polymerasegens inaktiviert werden kann. Die Beispiele unten und **Fig.** 3A und 4A weisen auf Bereiche in den nativen DNA-Polymerasen von Thermus aquaticus und flavus hin, die für die Synthesefähigkeit wichtig sein könnten. Es gibt andere Basenpaarveränderungen und -substitutionen, welche die Polymerase ebenfalls inaktivieren könnten.

[0220] Allerdings ist es nicht erforderlich, dass der Prozess der Herstellung einer 5'Nuklease aus einer DNA-Polymerase mit einem solchen mutierten amplifizierten Produkt gestartet wird. Dies ist das Verfahren, nach dem die Beispiele unten durchgeführt wurden, um die synthese-defizienten DNAPTaq-Mutanten herzustellen, aber ein Fachmann versteht, dass eine DNA-Polymerase-Wildtypsequenz als Ausgangsmaterial für die Einführung von Deletionen, Insertionen und Substitutionen verwendet werden kann, um eine 5'-Nuklease herzustellen. Beispielsweise wurden zur Erzeugung der synthese-defizienten DNAP-Tfl-Mutante die in SEQ ID Nr. 13–14 aufgeführten Primer verwendet, um das DNA-Polymerase-Wildtypgen von Thermus flavus, Stamm AT-62, zu amplifizieren. Das amplifizierte Polymerasegen wurden dann einem Verdau mit Restriktionsenzymen unterzogen, um einen großen Anteil der Domäne zu entfernen, welche die Syntheseaktivität codiert.

[0221] Die vorliegende Erfindung zieht in Betracht, dass das Nukleinsäurekonstrukt der vorliegenden Erfindung in einem geeigneten Wirt exprimiert werden kann. Ein Fachmann kennt Verfahren zum Anbringen verschiedener Promotoren und 3'-Sequenzen an eine Genstruktur, um eine effiziente Expression zu erreichen. Die Beispiele unten beschreiben zwei geeignete Vektoren und sechs geeignete Vektorkonstrukte. Natürlich gibt es andere Promotor/Vektor-Kombinationen, die geeignet wären. Es ist nicht erforderlich, dass für die Expression eines erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes ein Wirtsorganismus verwendet wird. Beispielsweise kann die Expression des von einem Nukleinsäurekonstrukt codierten Proteins durch Verwendung eines zellfreien In-vitro-Transkriptions-/Translationssystems erreicht werden. Ein Beispiel eines solchen zellfreien Systems ist das im Handel erhältliche TnT™-Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega).

[0222] Sobald ein geeignetes Nukleinsäurekonstrukt hergestellt worden ist, kann die 5'-Nuklease aus dem Konstrukt produziert werden. Die Beispiele unten und Standardlehren aus der Molekularbiologie ermöglichen die Manipulation des Konstruktes anhand von verschiedenen geeigneten Verfahren.

[0223] Sobald die 5'-Nuklease exprimiert wurde, wird die Polymerase hinsichtlich einer Synthese- und Nukleaseaktivität wie unten beschrieben getestet.

3. Physikalische und/oder chemische Modifizierung und/oder Hemmung

[0224] Die Syntheseaktivität einer thermostabilen DNA-Polymerase lässt sich durch chemische und/oder physikalische Mittel reduzieren. In einer Ausführungsform wird die von der 5'-Nukleaseaktivität der Polymerase katalysierte Spaltungsreaktion unter Bedingungen durchgeführt, welche bevorzugt die Syntheseaktivität der

Polymerase hemmen. Das Maß der Syntheseaktivität braucht nur auf das Maß an Aktivität reduziert zu werden, das Spaltungsreaktionen, die keine wesentliche Syntheseaktivität erfordern, nicht beeinträchtigt.

[0225] Wie in den Beispielen unten gezeigt ist, hemmen Konzentrationen von Mg^{++} über 5 mM die Polymerisierungsaktivität der nativen DNAPTaq. Die Fähigkeit der 5'-Nuklease, unter Bedingungen zu arbeiten, bei denen die Syntheseaktivität gehemmt ist, wird getestet, indem die unten beschriebenen Tests hinsichtlich der Synthese- und 5'-Nukleaseaktivität in Gegenwart eines Mg^{++}-Konzentrationsbereichs durchgeführt werden (5 bis 10 mM). Der Effekt einer bestimmten Konzentration von Mg^{++} wird durch Quantifizierung der Menge an Synthese und Spaltung in der Testreaktion im Vergleich zu der Standardreaktion für jeden Test bestimmt.

[0226] Der hemmende Effekt anderer Ionen, Polyamine, Denaturierungsmittel wie Harnstoff, Formamid, Dimethylsulfoxid, Glycerin und nicht-ionischen Detergenzien (Triton X-100 und Tween-20), Nukleinsäure-bindender Chemikalien wie Actinomycin D, Ethidiumbromid und Psoralene, wird durch deren Zugabe zu den Standardreaktionspuffern für die Synthese- und 5'-Nukleasetests untersucht. Verbindungen, die einen bevorzugten hemmenden Effekt auf die Syntheseaktivität einer thermostabilen Polymerase aufweisen, werden anschließend verwendet, um Reaktionsbedingungen zu schaffen, bei denen 5'-Nukleaseaktivität (Spaltung) erhalten bleibt, während die Syntheseaktivität reduziert oder beseitigt ist.

[0227] Physikalische Mittel können verwendet werden, um die Syntheseaktivität einer Polymerase bevorzugt zu hemmen. Beispielsweise wird die Syntheseaktivität thermostabiler Polymerasen zerstört, wenn die Polymerase längere Zeit (20 Minuten oder mehr) extremer Wärme (typischerweise 96 bis 100°C) ausgesetzt wird. Obwohl dies in Bezug auf die spezifische Wärmetoleranz jedes Enzyms kleine Unterschiede sind, lassen sich diese leicht bestimmen. Polymerasen werden unterschiedliche lange mit Wärme behandelt, und die Wirkung der Wärmebehandlung auf die Synthese- und 5'-Nukleaseaktivität wird bestimmt.

II. Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen mithilfe von 5'-Nukleasen in einer Invader™-gesteuerten Spaltung

[0228] Die vorliegende Erfindung stellt Mittel zum Ausbilden einer Nukleinsäurespaltungsstruktur bereit, die von dem Vorhandensein einer Zielnukleinsäure abhängt, und zum Spalten der Nukleinsäurespaltungsstruktur auf eine Weise, um unverwechselbare Spaltungsprodukte freizusetzen. 5'-Nukleaseaktivität wird verwendet, um die zielabhängige Spaltungsstruktur zu spalten, und die resultierenden Spaltungsprodukte zeigen das Vorhandensein spezifischer Zielnukleinsäuresequenzen in der Probe an.

[0229] Die vorliegende Erfindung stellt des Weiteren Testverfahren bereit, in denen die Zielnukleinsäure während mehrerer Hybridisierungsrunden mit Oligonukleotidsonden und Spaltung wieder verwendet oder regeneriert wird, ohne dass Temperaturzyklen (d. h. zur periodischen Denaturierung von Zielnukleinsäuresträngen) oder Nukleinsäuresynthese (d. h. zur Verdrängung von Zielnukleinsäuresträngen) erforderlich sind. Durch die Wechselwirkung des Spaltungsagens (z. B. einer 5'-Nuklease) mit einem stromaufwärts gelegenen Oligonukleotid kann das Spaltungsagens veranlasst werden, ein stromabwärts gelegenes Oligonukleotid an einer internen Stelle so zu spalten, dass sich die resultierenden Fragmente des stromabwärts gelegenen Oligonukleotids von der Zielnukleinsäure lösen, was diesen Bereich der the Zielnukleinsäure für die Hybridisierung an eine andere nicht gespaltene Kopie des stromabwärts gelegenen Oligonukleotids verfügbar macht.

[0230] Wie in **Fig. 25** gezeigt, verwendet das Verfahren der vorliegenden Erfindung wenigstens ein Paar von Oligonukleotiden, die mit einer Zielnukleinsäure wechselwirken, um eine Spaltungsstruktur für eine strukturspezifische Nuklease auszubilden. Insbesondere umfasst die Spaltungsstruktur: i) eine Zielnukleinsäure, die entweder einzelsträngig oder doppelsträngig sein kann (wenn eine doppelsträngige Zielnukleinsäure verwendet wird, kann sie einzelsträngig gemacht werden (z. B. durch Erwärmen); ii) ein erstes Oligonukleotid, als „Sonde" bezeichnet, welches einen ersten Bereich der Zielnukleinsäuresequenz definiert, indem es das Komplement dieses Bereichs darstellt (Bereich X und Z des in **Fig. 25** gezeigten Ziels), und iii) ein zweites Oligonukleotid, als „Invader™" bezeichnet, dessen 5'-Teil einen zweiten Bereich derselben Zielnukleinsäuresequenz (Bereich Y und X in **Fig. 25**) definiert, der stromabwärts unmittelbar auf den ersten Zielbereich (Bereich X und Z) folgt, und dessen zweiter Teil mit dem Bereich überlappt, der von dem ersten Oligonukleotid definiert wird (Bereich X zeigt den Überlappungsbereich). Die resultierende Struktur ist in **Fig. 25** als Diagramm dargestellt.

[0231] Ohne die Erfindung oder diese Diskussion im Hinblick auf einen bestimmten Wirkungsmechanismus einzuschränken, stellt das Diagramm in **Fig. 25** den Effekt an der Spaltungsstelle dar, die von dieser Art von Anordnung eines Oligonukleotidpaares verursacht wird. Der Entwurf eines solchen Oligonukleotidpaares ist unten ausführlich beschrieben. In **Fig. 25** sind die 3'-Enden der Nukleinsäuren (d. h. der Zielnukleinsäure und

der Oligonukleotide) durch Verwendung der Pfeilspitzen an den Enden der Zeilen angezeigt, welche die Nukleinsäurestränge darstellen (und diese Enden sind auch mit „3'" gezeichnet, wenn es der Platz erlaubt). Die beiden Oligonukleotide (der Invander™ und die Sonde) sind relativ zueinander parallel ausgerichtet, während sich der Zielnukleinsäurestrang relativ zu den beiden Oligonukleotiden in antiparalleler Ausrichtung befindet. Des Weiteren versteht sich, dass sich das Invader™-Oligonukleotid stromaufwärts von dem Sondenoligonukleotid befindet und dass sich in Bezug auf den Zielnukleinsäurestrang der Bereich Z stromaufwärts von Bereich X und sich Bereich X stromaufwärts von Bereich Y befindet (das bedeutet, dass sich Bereich Y stromabwärts von Bereich X und Bereich X sich stromabwärts von Bereich Z befindet). Bereiche der Komplementarität zwischen den gegenüber liegenden Strängen sind durch kurze vertikale Linien angezeigt. Ohne die genaue Position der Stelle(n) der Spaltung anzeigen zu wollen, wird der Bereich, an den die Spaltungsstelle innerhalb des Sondenoligonukleotid durch das Vorhandensein des Invader™-Oligonukleotids verlagert wird, durch die ausgefüllte vertikale Pfeilspitze angezeigt. Eine alternative Darstellung der Ziel/Invader™/Sonden-Spaltungsstruktur ist in **Fig.** 28C gezeigt. Keines der Diagramme (d. h. **Fig. 25** oder **Fig.** 28C) soll den eigentlichen Wirkungsmechanismus oder die physikalische Anordnung der Spaltungsstruktur anzeigen, und es ist ferner nicht beabsichtigt, dass das Verfahren der vorliegenden Erfindung auf einen bestimmten Wirkungsmechanismus beschränkt ist.

[0232] Es kann in Betracht gezogen werden, dass die Bindung dieser Oligonukleotide die Zielnukleinsäure in drei unterscheidbare Bereiche aufteilt: in einen Bereich, der nur zu der Sonde komplementär ist (gezeigt als „Z"); in einen Bereich, der nur zu dem Invader™ komplementär ist (gezeigt als „Y") und in einen Bereich, der zu beiden Oligonukleotiden komplementär ist (gezeigt als „X").

[0233] Der Entwurf dieser Oligonukleotide (d. h. des Invader™ und der Sonde) erfolgt anhand von Standardvorgehensweisen aus dem Stand der Technik. Sequenzen, die derart Selbst-Komplementarität aufweisen, dass die resultierenden Oligonukleotide sich auf Kosten der Bindung an die Zielnukleinsäure entweder zu sich selbst falten oder miteinander hybridisieren, werden im Allgemeinen vermieden.

[0234] Eine Überlegung bei der Auswahl einer Länge für diese Oligonukleotide ist die Komplexität der Probe, welche die Zielnukleinsäure enthält. Beispielsweise hat das menschliche Genom eine Länge von etwa 3×10^9 Basenpaaren. Eine beliebige Sequenz mit 10 Nukleotiden kommt in einem zufälligen Strang von Nukleotiden mit einer Häufigkeit von $1:4^{10}$ bzw. 1:1.048.576 vor, was etwa 2,861 Mal in 3 Milliarden Basenpaaren entspricht. Ein Oligonukleotid dieser Länge hätte daher innerhalb eines Ziels mit einer Sequenz von der Größe des menschlichen Genoms eindeutig eine schlechte Chance einer spezifischen Bindung an einen Bereich von 10 Nukleotiden. Wenn die Zielsequenz in einem Plasmid von 3 kb liegt, könnte ein solches Oligonukleotid jedoch eine sehr vernünftige Chance einer spezifischen Bindung haben. Anhand derselben Berechnung ist erkennbar, dass ein Oligonukleotid von 16 Nukleotiden (d. h. ein 16-Mer) die Mindestlänge einer Sequenz darstellt, die von der mathematischen Wahrscheinlichkeit her in 3×10^9 Basenpaaren einmal vorkommt.

[0235] Eine zweite Überlegung bei der Auswahl der Oligonukleotidlänge ist der Temperaturbereich, in dem die Oligonukleotide funktionieren sollen. Ein 16-Mer mit durchschnittlichem Basengehalt (50% G-C-Basenpaare) hat eine berechnete T_m (die Temperatur, bei der die Sequenz zu 50% dissoziiert ist) von etwa 41°C, unter Anderem je nach der Konzentration des Oligonukleotids und seinem Ziel, dem Salzgehalt der Reaktion und der genauen Reihenfolge der Nukleotide. Aus praktischen Gründen werden in der Regel längere Oligonukleotide gewählt, um die Spezifität der Hybridisierung zu erhöhen. Häufig werden Oligonukleotide mit einer Länge von 20 bis 25 Nukleotiden gewählt, da bei diesen eine höhere Wahrscheinlichkeit der Spezifität vorliegt, wenn sie in Reaktionen verwendet werden, die bei Temperaturen nahe bei ihren T_m-Werten stattfinden (innerhalb etwa 5° der T_m). Darüber hinaus werden solche Oligonukleotide (d. h. 20- bis 25-Mere) mit einer berechneten T_m im Bereich von 50°C bis 70°C geeigneterweise in Reaktionen verwendet, die von thermostabilen Enzymen katalysiert werden, welche häufig optimale Aktivität in der Nähe dieses Temperaturbereichs zeigen.

[0236] Die maximale Länge des gewählten Oligonukleotids beruht auch auf der gewünschten Spezifität. Es sollten keine Sequenzen ausgewählt werden, die so lang sind, dass für sie ein hohes Risiko der stabilen Bindung an partielle Komplemente besteht oder dass sie, wenn gewünscht, nicht einfach entfernt werden können (z. B. keine Dissoziation vom Ziel nach der Spaltung).

[0237] Der ersten Schritt des Entwurfs und der Auswahl der Oligonukleotide für die Invader™-gesteuerte Spaltung entspricht diesen allgemeinen Probenprinzipien. Jedes Oligonukleotid wird individuell als sequenzspezifische Sonde betrachtet und kann nach den oben aufgeführten Richtlinien ausgewählt werden. Jedes Oligonukleotid ist im Allgemeinen lang genug, damit in angemessener Weise davon ausgegangen werden kann, dass es in einer komplexen Probe nur an die beabsichtigte Zielsequenz hybridisiert, in der Regel im Bereich

von 20 bis 40 Nukleotiden. Da die Invader™-gesteuerte Spaltung auf der gemeinsamen Wirkung dieser Oligonukleotide beruht, kann die gemeinsame Länge der beiden Oligonukleotide, welche die Bereiche X, Y, Z umspannen/binden, alternativ so ausgewählt werden, dass sie in diesen Bereich fällt, wobei jedes einzelne Oligonukleotid im Bereich von etwa 13 bis 17 Nukleotiden liegt. Ein solcher Entwurf kann verwendet werden, wenn bei der Reaktion ein nicht-thermostabiles Spaltungsagens verwendet wird, weshalb die Reaktionen bei einer niedrigeren Temperatur durchgeführt werden müssen als bei Verwendung eines thermostabilen Spaltungsagens. In manchen Fällen kann es wünschenswert sein, dass diese Oligonukleotide mehrmals innerhalb einer Zielnukleinsäure binden (z. B. die an mehrere Varianten oder mehrere ähnliche Sequenzen innerhalb eines Ziels binden). Es ist nicht beabsichtigt, dass das Verfahren der vorliegenden Erfindung auf eine bestimmte Größe der Sonde oder des Invader™-Oligonukleotids beschränkt ist.

[0238] Der zweite Schritt des Entwerfens eines Oligonukleotidpaares für dieses Testverfahren besteht darin auszuwählen, in welchem Maß die stromaufwärts gelegene Invader™-Oligonukleotidsequenz mit der stromabwärts gelegenen „Sonden"-Oligonukleotidsequenz überlappt, und demnach der Größen, in welche die Sonde gespalten wird. Ein Schlüsselmerkmal dieses Verfahrens ist, dass das Sondenoligonukleotid dazu veranlasst werden kann, sich „umzusetzen" (turn over), das heißt, die gespaltene Sonde kann dazu veranlasst werden, sich zu entfernen, was die Bindung und Spaltung weiterer Kopien des Sondenmoleküls möglich macht, ohne dass eine Wärmedenaturierung oder eine Verdrängung durch Polymerisierung erforderlich wären. Obwohl in einer Ausführungsform dieses Verfahrens die Sondenumsetzung durch einen exonukleolytischen Verdau durch das Spaltungsagens ermöglicht werden kann, ist es ausschlaggebend für die vorliegende Erfindung, dass für die Umsetzung diese exonukleolytische Aktivität nicht erforderlich ist.

[0239] Auswahl des Überlappungsgrades (Länge des Bereichs X) Eine Möglichkeit, eine solche Umsetzung zu erreichen, ist durch Inbetrachtziehen des Diagramms in **Fig. 25**. Es ist zu sehen, dass die T_m jedes Oligonukleotids eine Funktion der vollen Länge dieses Oligonukleotids ist (d. h. die T_m des Invader™ = $T_{m(Y+X)}$ und die T_m der Sonde = $T_{m(X+Y)}$ für die Sonde). Wenn die Sonde gespalten wird, wird der Bereich X freigesetzt, wobei Bereich Z übrig bleibt. Wenn die T_m von Z niedriger als die Reaktionstemperatur ist und die Reaktionstemperatur niedriger ist als $T_{m(X+Z)}$, führt die Spaltung der Sonde zum Entfernen von Z, wodurch ein neues (X + Z) hybridisieren kann. Aus diesem Beispiel ist ersichtlich, dass der Bereich X ausreichend lang sein muss, dass die Freisetzung von X die T_m des verbleibenden Sondenabschnittes unter die Reaktionstemperatur fallen lässt: ein G-C-reicher X-Abschnitt kann viel kürzer sein als ein A-T-reicher X-Abschnitt und dennoch diese Stabilitätsverschiebung erreichen.

Entwurf von Oligonukleotiden, die mit den Bereichen Y und Z wechselwirken

[0240] Wenn die Bindung des Invader™ Oligonukleotids an die Zielnukleinsäure stabiler als die Bindung der Sonde ist (z. B. wenn es lang ist oder viele G-C-Basenpaare im Bereich Y aufweist), dann könnte die mit dem Invader™ assoziierte Kopie von X bei der Konkurrierung um die Bindung an den Bereich X der Zielnukleinsäure begünstigt sein, und die Sonde könnte deshalb ineffizient hybridisieren und das Verfahren könnte ein schwaches Signal erzeugen. Wenn alternativ die Sondenbindung im Bereich Z besonders stark ist, bewirkt der Invader™ dennoch eine interne Spaltung, da diese von dem Enzym vermittelt wird, aber ein Anteil des an den Bereich Z gebundenen Sondenoligonukleotids würde sich möglicherweise bei der Reaktionstemperatur nicht ablösen, die Umsetzung könnte nicht ausreichend sein und das Verfahren wiederum ein schwaches Signal erzeugen.

[0241] Für die Anteile des Oligonukleotids, die mit den Bereichen Y und Z wechselwirken, ist es eindeutig von Vorteil, eine solch ähnliche Stabilität aufzuweisen (d. h. sie müssen ähnliche Schmelztemperaturen aufweisen). Das heißt nicht, dass diese Bereiche dieselbe Länge aufweisen müssen. Wie oben erwähnt, wird die Schmelztemperatur außer von der Länge von dem Basengehalt und der spezifischen Sequenz dieser Basen beeinflusst. Die spezifische Stabilität, mit welcher der Invader™ ausgestattet wurde, und die Sondensequenz richten sich nach der Temperatur, bei der die Reaktion durchgeführt werden soll.

[0242] Diese Diskussion soll zeigen, dass (innerhalb der oben erörterten grundlegenden Richtlinien für die Spezifität eines Oligonukleotids) das Gleichgewicht, das zwischen der Stabilität der Sequenzen der Sonde und des Invaders™ und den Sequenzen ihrer Bestandteile X und Y besteht, die Hauptüberlegung bei der Auswahl der Sequenz der Sonde und des Invaders™ sein sollte und nicht die absoluten Werte dieser Stabilitäten.

Entwurf der Reaktionsbedingungen

[0243] Zielnukleinsäuren, die anhand der Verfahren der vorliegenden Erfindung analysiert werden können

und die eine 5'-Nuklease als Spaltungsagens verwenden, umfassen viele Arten von RNA und DNA. Solche Nukleinsäuren können durch molekularbiologische Standardtechniken erhalten werden. Beispielsweise lassen sich Nukleinsäuren (RNA oder DNA) aus einer Gewebeprobe (z. B. einem Biopsiepräparat), Gewebekulturzellen, Proben, die Bakterien und/oder Viren enthalten (einschließlich Kulturen von Bakterien und/oder Viren), etc. isolieren. Die Zielnukleinsäure kann auch in vitro von einer DNA-Vorlage transkribiert oder chemisch synthetisiert oder in einer PCR erzeugt werden. Darüber hinaus können Nukleinsäuren aus einem Organismus isoliert werden, entweder als genomisches Material oder als ein Plasmid oder als ähnliche extrachromosomale DNA, oder sie können ein Fragment eines solchen Materials sein, das durch Behandlung mit einer Restriktionsendonuklease oder anderen Spaltungsmitteln erzeugt wird, oder kann synthetisch sein.

[0244] Die Verbindung von Ziel, Sonde und Invader™-Nukleinsäuren in der Spaltungsreaktion der vorliegenden Erfindung wendet Prinzipien an, die beim Entwurf von Oligonukleotid-basierten enzymatischen Verfahren gängig sind, beispielsweise Didesoxynukleotidsequenzierung und Polymerasekettenreaktion (PCR). Wie es bei diesen Verfahren der Fall ist, werden die Oligonukleotide in ausreichendem Überschuss bereit gestellt, dass die Rate der Hybridisierung mit der Zielnukleinsäure sehr schnell ist. Diese Verfahren werden im Allgemeinen mit 50 fmol bis 2 pmol jedes Oligonukleotids je µl Reaktionsmischung durchgeführt. In den hierin beschriebenen Beispielen wurden Oligonukleotidmengen im Bereich von 250 fmol bis 5 pmol je µl verwendet. Diese Werte wurden zum Zweck der einfachen Demonstration gewählt und sollen die Leistung der vorliegenden Erfindung nicht auf diese Konzentrationen beschränken. Andere (z. B. geringere) Oligonukleotidkonzentrationen, die bei anderen molekularbiologischen Reaktionen üblicherweise verwendet werden, werden ebenfalls in Betracht gezogen.

[0245] Es ist wünschenswert, dass ein Invader™-Oligonukleotid unmittelbar verfügbar ist, um die Spaltung jedes Sondenoligonukleotids zu steuern, das mit einer Zielnukleinsäure hybridisiert. Aus diesem Grund ist in den hierin beschriebenen Beispielen das Invader™-Oligonukleotid im Überschuss zum Sondenoligonukleotid bereitgestellt; häufig handelt es sich um einen 10-fachen Überschuss. Dies ist zwar ein effektives Verhältnis, aber die Praxis der vorliegenden Erfindung soll nicht auf ein bestimmtes Verhältnis von Invader™ zu Sonde beschränkt werden (es wird ein Verhältnis von 2- bis 100-Fach in Betracht gezogen).

[0246] Es müssen Pufferbedingungen gewählt werden, die sowohl mit der Hybridisierung von Oligonukleotid und Zielnukleinsäure als auch mit der Aktivität des Spaltungsagens kompatibel sind. Die optimalen Pufferbedingungen für Nukleinsäuremodifikationsenzyme und insbesondere DNA-Modifikationsenzyme, enthielten im Allgemeinen ausreichende mono- und divalente Salze, damit eine Assoziation von Nukleinsäuresträngen durch Basenpaarung möglich war. Wenn das Verfahren der vorliegenden Erfindung mithilfe eines enzymatischen Spaltungsagens durchgeführt wird, bei dem es sich nicht um die hierin spezifisch Beschriebenenen handelt, können die Reaktionen im Allgemeinen in jedem Puffer durchgeführt werden, von dem dokumentiert ist, dass er für die Nukleasefunktion des Spaltungsagens optimal ist. Zur Testung der Eignung eines Spaltungsagens in diesem Verfahren werden im Allgemeinen Testverfahren durchgeführt, bei denen das relevante Spaltungsagens in dem MOPS/$MnCl_2$/KCl-Puffer oder Mg-haltigen Puffern, die hierin beschrieben sind, und in einem beliebigen Puffer getestet, von dem in einem Datenblatt des Herstellers, einem Fachartikel oder durch persönlicher Mitteilung dokumentiert ist, dass er zur Verwendung mit diesem Agens geeignet ist.

[0247] Die Produkte der Invader™-gesteuerten Spaltungsreaktion sind Fragmente, die durch strukturspezifische Spaltung der Eingabe-Oligonukleotide erzeugt werden. Die resultierenden gespaltenen und/oder ungespaltenen Oligonukleotide können mit einer Reihe von Verfahren analysiert und aufgetrennt werden, einschließlich Elektrophorese (auf verschiedenen Trägern, wie beispielsweise Acrylamid- oder Agarosegelen, Papier, etc.), Chromatographie, Fluoreszenzpolarisierung, Massenspektroskopie und Chip-Hybridisierung. Die Erfindung ist anhand einer elektrophoretischen Auftrennung für die Analyse der Produkte der Spaltungsreaktionen veranschaulicht. Die Auftrennung der Spaltungsprodukte ist jedoch nicht auf Elektrophorese beschränkt. Elektrophorese wurde gewählt, um das erfindungsgemäße Verfahren zu veranschaulichen, da Elektrophorese im Stand der Technik weithin praktiziert und dem durchschnittlichen Ausführenden einfach zugänglich ist.

[0248] Die Sonden- und Invader™-Oligonukleotide können einen Marker enthalten, der bei ihrem Nachweis nach der Spaltungsreaktion behilflich ist. Der Marker kann ein Radioisotop sein (z. B. ein ^{32}P- oder ^{35}S-markiertes Nukleotid), das sich am 5'-Ende oder am 3'-Ende des Oligonukleotids befindet, oder alternativ kann der Marker im ganzen Oligonukleotid verteilt sein (d. h. ein gleichmäßig markiertes Oligonukleotid). Der Marker kann eine nicht-isotope nachweisbare Einheit sein, wie beispielsweise ein Fluorophor, das direkt nachweisbar ist, oder eine reaktive Gruppe, die eine spezifische Erkennung durch ein sekundäres Agens erlaubt. Beispielsweise können biotinylierte Oligonukleotide nachgewiesen werden, indem sie einem Streptavidinmolekül als

Sonde ausgesetzt werden, das an einen Indikator gekoppelt ist (z. B. alkalische Phosphatase oder ein Fluorophor), oder ein Hapten, wie beispielsweise Digoxigenin, kann mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, der an einen ähnlichen Indikator gekoppelt ist.

Optimierung von Reaktionsbedingungen

[0249] Die Invader™-gesteuerte Spaltungsreaktion ist geeignet, um das Vorhandensein spezifischer Nukleinsäuren nachzuweisen. Zusätzlich zu den oben aufgeführten Überlegungen zur Auswahl und zum Entwurf der Invader™- und Sondenoligonukleotide können die Bedingungen, unter denen die Reaktion durchzuführen ist, zum Nachweis einer spezifischen Zielsequenz optimiert werden.

[0250] Ein Ziel bei der Optimierung der Invader™-gesteuerte Spaltung ist es, den spezifischen Nachweis der wenigsten Kopien einer Zielnukleinsäure zu ermöglichen. Dazu ist es wünschenswert, dass die kombinierten Elemente der Reaktion derart mit der maximalen Effizienz wechselwirken, dass die Reaktionsrate (z. B. die Anzahl von Spaltungsereignissen je Minute) maximiert ist. Elemente, die zu der Gesamteffizienz der Reaktion beitragen, umfassen die Rate der Hybridisierung, die Spaltungsrate und die Effizienz der Freisetzung der gespaltenen Sonde.

[0251] Die Spaltungsrate ist eine Funktion des gewählten Spaltungsagens und kann nach den Anleitungen des Herstellers optimiert werden, wenn kommerzielle Präparationen von Enzymen verwendet werden, oder wie in den Beispielen hierin beschrieben. Die anderen Elemente (Hybridisierungsrate, Effizienz der Freisetzung) hängen von der Ausführung der Reaktion ab, und die Optimierung dieser Elemente ist unten diskutiert.

[0252] Drei Elemente der Spaltungsreaktion, welche die Rate der Nukleinsäurehybridisierung wesentlich beeinflussen, sind die Konzentration der Nukleinsäuren, die Temperatur, bei der die Spaltungsreaktion durchgeführt wird, und die Konzentration von Salzen und/oder anderen ladungsabschirmenden Ionen in der Reaktionslösung.

[0253] Die Konzentrationen, bei denen Oligonukleotidsonden in Verfahren dieser Art verwendet werden, sind aus dem Stand der Technik gut bekannt und oben erläutert. Ein Beispiel eines gängigen Ansatzes zur Optimierung einer Oligonukleotidkonzentration ist es, eine Oligonukleotid-Ausgangsmenge für Pilotversuche zu wählen; 0,01 bis 2 μM ist ein Konzentrationsbereich, der in vielen Oligonukleotid-basierten Verfahren verwendet wird. Wenn die ersten Spaltungsreaktionen durchgeführt werden, können auf Grundlage der Daten folgende Fragen gestellt werden: Ist die Reaktion, die in Abwesenheit der Zielnukleinsäure durchgeführt wird, im Wesentlichen frei von Spaltungsprodukt? Ist die Spaltungsstelle in Übereinstimmung mit dem Entwurf des Invader™-Oligonukleotid spezifisch verschoben? Ist das spezifische Spaltungsprodukt in Gegenwart der ungespaltenen Sonde leicht nachweisbar (oder überwältigt die Menge an ungespaltenem Material das gewählte Visualisierungsverfahren)?

[0254] Eine negative Antwort auf eine beliebige diese Fragen würde vermuten lassen, dass die Sondenkonzentration zu hoch ist und dass eine Reihe von Reaktionen unter Verwendung einer Verdünnungsreihe der Sonde durchgeführt werden sollte, bis die geeignete Menge identifiziert ist. Ist diese für eine bestimmte Zielnukleinsäure in einem bestimmten Probentyp (z. B. gereinigte genomische DNA, Körperflüssigkeitsextrakt, lysierter Bakterienextrakt) identifiziert, wäre es nicht notwendig, sie erneut zu optimieren. Der Probentyp ist wichtig, da die Komplexität des vorhandenen Materials das Sondenoptimum beeinflussen könnte.

[0255] Wenn dagegen die gewählte Anfangskonzentration der Sonde zu niedrig ist, könnte die Reaktion aufgrund einer uneffizienten Hybridisierung zu langsam sein. Tests mit steigenden Sondenmengen identifizieren den Punkt, an dem die Konzentration das Optimum übersteigt. Da die Hybridisierung durch Sondenüberschuss erleichtert wird, ist es wünschenswert, aber nicht erforderlich, dass die Reaktion mit Sondenkonzentrationen knapp unterhalb dieses Punktes durchgeführt wird.

[0256] Die Konzentration von Invader™-Oligonukleotid kann auf der Grundlage von Entwurfsüberlegungen gewählt werden, wie sie oben erläutert sind. In einer bevorzugten Ausführungsform liegt das Invader™-Oligonukleotid im Überschuss zum Sondenoligonukleotid vor. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform, ist der Invader™ etwa 10-mal häufiger als die Sonde.

[0257] Temperatur ist bei der Hybridisierung von Oligonukleotiden ebenfalls ein wichtiger Faktor. Der getestete Temperaturbereich hängt weitestgehend vom Entwurf der Oligonukleotide ab, wie oben erläutert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Reaktionen bei Temperaturen durchgeführt, die leicht unter der

T_m des am wenigsten stabilen Oligonukleotids in der Reaktion durchgeführt. Schmelztemperaturen des Oligonukleotids und dessen Komponentenbereiche (X, Y und Z, Fig. 25) lassen sich mithilfe von Rechnersoftware oder, für eine etwas ungenauere Annäherung, durch Zuweisung des Wertes von 2°C je A-T-Basenpaar und von 4°C je G-C-Basenpaar und durch Ermittlung der Summe über einen Nukleinsäurebereich schätzen. Letzteres Verfahren kann für Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 10–30 Nukleotiden verwendet werden. Da selbst eine Rechnervorhersage der T_m einer Nukleinsäure nur eine Näherung ist, sollte die Reaktionstemperatur, die für Anfangstests gewählt wird, die berechnete T_m umfassen. Obwohl Optimierungen nicht darauf beschränkt sind, sind bei diesen Optimierungstests Testintervalle von 5°C praktisch.

[0258] Werden Temperaturen getestet, können die Ergebnisse auf die gleiche Weise wie für die Oligonukleotidkonzentrationsbestimmungen auf Spezifität analysiert werden (die ersten beiden der oben aufgeführten Fragen). Unspezifische Spaltung (d. h. Spaltung der Sonde an vielen oder allen Positionen entlang ihrer Länge) würde auf unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Sonde und dem Probenmaterial hinweisen und würde andeuten, dass eine höhere Temperatur verwendet werden sollte. Im Gegensatz dazu würde wenig oder keine Spaltung andeuten, dass sogar die beabsichtigte Hybridisierung verhindert wird, und würde die Verwendung niedrigerer Temperaturen empfehlen. Durch Testung mehrerer Temperaturen ist es möglich, ein ungefähres Temperaturoptimum zu identifizieren, bei dem die Rate der spezifischen Spaltung der Sonde am höchsten ist. Wenn die Oligonukleotide wie oben beschrieben entworfen sind, sollte die T_m des Bereiches Z des Sondenoligonukleotids unterhalb dieser Temperatur liegen, so dass eine Umsetzung sichergestellt ist.

[0259] Eine dritte Determinante der Hybridisierungseffizienz ist die Salzkonzentration der Reaktion. Die Auswahl der Lösungsbedingungen richtet sich größtenteils nach den Anforderungen des Spaltungsagens, und bei kommerziell erhältlichen Reagenzien sind die Anleitungen des Herstellers eine Quelle für diese Informationen. Bei der Entwicklung eines Verfahrens, bei dem ein bestimmtes Spaltungsagens verwendet wird, sollten die oben beschriebenen Optimierungen von Oligonukleotid und Temperatur in den Pufferbedingungen erfolgen, die für das Spaltungsagens am besten geeignet sind.

[0260] Eine „nicht-enzymatische" Kontrolle erlaubt die Bestimmung der Stabilität der markierten Oligonukleotide unter bestimmten Reaktionsbedingungen oder in Gegenwart der zu testenden Probe (d. h. bei der Beurteilung der Probe auf kontaminierende Nukleasen). Auf diese Weise werden das Substrat und die Oligonukleotide in ein Röhrchen gegeben, das alle Reaktionsbestandteile enthält, außer dem Enzym, und gleich wie die enzymhaltigen Reaktionen behandelt werden. Es können noch weitere Kontrollen enthalten sein. Beispielsweise dient eine Reaktion mit allen Bestandteilen außer der Zielnukleinsäure dazu, die Abhängigkeit der Spaltung vom Vorhandensein der Zielsequenz zu bestätigen.

Untersuchung auf mehrere Allele

[0261] Die Invader™-gesteuerte Spaltungsreaktion ist auch bei dem Nachweis und bei der Quantifizierung einzelner Varianten oder Allele in einer gemischten Probenpopulation geeignet. Beispielsweise besteht ein solcher Bedarf bei der Analyse von Tumormaterial für Mutationen in Genen in Verbindung mit Krebs. Biopsiematerial aus einem Tumor kann eine signifikante Ergänzung von normalen Zellen darstellen, so dass es wünschenswert ist, Mutationen auch dann nachzuweisen, wenn sie in der Probe in weniger als 5% der Kopien der Zielnukleinsäure vorhanden sind. In diesen Fall ist es auch wünschenswert zu messen, welche Fraktion der Population die Mutation trägt. Es können ähnliche Analysen durchgeführt werden, um Allelvariation in anderen Gensystemen zu untersuchen, und es ist nicht beabsichtigt, dass das Verfahren der vorliegenden Erfindung auf die Analyse von Tumoren beschränkt ist.

[0262] Wie unten gezeigt, können Reaktionen unter Bedingungen durchgeführt werden, welche die Spaltung von Sonden verhindern, die einen Unterschied von nur einer einzigen Nukleotidfehlpaarung innerhalb des als „Z" bezeichneten Bereichs der Zielnukleinsäure in Fig. 25 aufweisen, die aber eine Spaltung einer ähnlichen Sonde erlauben, welche zum Ziel in diesem Bereich vollständig komplementär ist. Das Verfahren kann daher verwendet werden, um einzelne Varianten oder Allele in einem Probengemisch zu quantifizieren.

[0263] Es wird auch die Verwendung mehrerer unterschiedlich markierter Sonden in einem solchen Verfahren in Betracht gezogen. Zur Bestimmung des Vorhandenseins verschiedener Varianten oder Allele in einer Probe würde man ein Sondengemisch derart bereitstellen, dass es für jedes nachzuweisende Allel oder jede nachzuweisende Variante eine spezifische Sonde (d. h. eine, die perfekt zu dem Bereich Z der Zielsequenz passt) mit einem einmaligen Marker (d. h. in einer einzelnen Reaktion würden keine zwei Variantensonden mit demselben Marker verwendet werden) gäbe. Diese Sonden würden im Voraus charakterisiert werden um sicherzustellen, dass sie im Rahmen eines einzelnen Satzes von Reaktionsbedingungen dieselbe Rate von Sig-

nalansammlung ergeben können, wenn sie mit ihren entsprechenden Zielnukleinsäuren gemischt werden. Die Zusammenstellung einer Spaltungsreaktion, welche den gemischten Sondensatz, ein entsprechendes Invader™-Oligonukleotid, die Zielnukleinsäureprobe und das entsprechende Spaltungsagens umfasst, zusammen mit der Leistung der Spaltungsreaktion unter derartigen Bedingungen, dass nur die gepaarten Sonden gespalten würden, würde eine unabhängige Quantifizierung jede der vorhandenen Arten erlauben und daher deren relatives Vorhandensein in der Zielprobe anzeigen.

III. Vergleich der invasiven Spaltung und der primergesteuerten Spaltung

[0264] Wie hierin erörtert, bezeichnen die Begriffe „invasive" oder „Invader™-gesteuerte" Spaltung spezifisch die Verwendung eines ersten stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids, wie unten definiert, um eine spezifische Spaltung an einer Stelle innerhalb einer zweiten stromabwärts gelegenen Sequenz zu bewirken. Damit eine solche Steuerung der Spaltung zu einem Bereich innerhalb eines Doppelstranges bewirkt wird, ist es erforderlich, dass die ersten und zweiten Oligonukleotide von der Sequenz her überlappen. Das bedeutet, dass ein Anteil des stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids, als „Invader™" bezeichnet, wesentliche Homologie zu einem Anteil des stromabwärts gelegenen „Sonden"-Oligonukleotids aufweist, so dass diese Bereiche dazu neigen, mit demselben komplementären Bereich der nachzuweisenden Zielnukleinsäure Basenpaarungen einzugehen. Es wäre davon auszugehen, dass sich die überlappenden Bereiche in ihrer Besetzung der gemeinsamen Hybridisierungsstelle abwechseln, wobei die vorliegende Erfindung nicht auf einen bestimmten Mechanismus beschränkt wird. Wenn das Sondenoligonukleotid durch eine Annealing-Reaktion vollständig an die Zielnukleinsäure gebunden wird und damit den 3'-Bereich des Invaders™ dazu zwingt, ungepaart zu bleiben, ist die so gebildete Struktur kein Substrat für die 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung. Ist dagegen das Gegenteil der Fall, ist die so gebildete Struktur ein Substrat für diese Enzyme, wodurch Spaltung und Freisetzung des Anteils des Sondenoligonukleotids möglich werden, das von dem Invader™-Oligonukleotid verdrängt wird. Die Verschiebung der Spaltungsstelle zu einem Bereich, in dem das Sondenoligonukleotid andernfalls Basenpaarung mit der Zielsequenz eingehen würde, ist ein Kennzeichen der invasiven Spaltung (d. h. der Invader™-gesteuerten Spaltung) der vorliegenden Erfindung.

[0265] Es ist an dieser Stelle von Vorteil, die invasive Spaltung, wie oben beschrieben, mit zwei anderen Formen der Sondenspaltung zu vergleichen, die zu einer internen Spaltung eines Sondenoligonukleotids führen können, aber keine invasive Spaltung umfassen. Im ersten Fall kann man eine hybridisierte Sonde derart von einer 5'- zu 3'-Exonuklease „anknabbern" lassen, dass das Oligonukleotid vom 5'-Ende her verkürzt wird, bis es nicht am Ziel gebunden bleiben kann (siehe z. B. Beispiel 5–7 und Fig. 26–Fig. 28). Die Stelle, an der ein solches Anknabbern aufhört, scheint diskret zu sein, und, je nach der Differenz zwischen der Schmelztemperatur einer Volllängensonde und der Reaktionstemperatur, kann die Stoppstelle eines oder mehrere Nukleotide entfernt innerhalb der Sequenz des Sondenoligonukleotids liegen. Ein solches „Anknabbern" wird häufig durch Vorhandensein einer „Leiter" längerer Produkte mit steigender Größe bis zur vollen Länge der Sonde angezeigt, aber dies ist nicht immer der Fall. Obgleich jedes Produkt einer solchen Knabber-Reaktion in Größe und Spaltungsstelle den Produkten einer invasiven Spaltungsreaktion angepasst werden kann, würde die Erzeugung dieser Knabber-Produkte in höchster Weise von der Reaktionstemperatur und der Art des Spaltungsagens abhängen, wäre aber unabhängig von der Einwirkung eines stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids und wäre daher nicht so auszulegen, als dass eine invasive Spaltung beteiligt wäre.

[0266] Eine zweite Spaltungsstruktur, die in Betracht gezogen werden kann, ist eine, in der ein Sondenoligonukleotid mehrere Bereiche einer Komplementarität mit der Zielnukleinsäure aufweist, in die einer oder mehrere Bereiche oder Nukleotide von Nichtkomplementarität eingestreut sind. Diese nicht komplementären Bereiche kann man sich als „Blasen" innerhalb des Nukleinsäuredoppelstranges vorstellen. Wenn die Temperatur erhöht wird, sollten die Komplementaritätsbereiche in der Reihenfolge ihrer Stabilität schmelzen, angefangen bei den Bereichen mit niedrigster Stabilität bis zu den Bereichen mit höchster Stabilität. Wenn sich ein Bereich niedriger Stabilität in der Nähe des Endes eines Abschnittes des Doppelstranges befindet und der nächste Bereich der Komplementarität entlang des Strangs eine höhere Schmelztemperatur aufweist, lässt sich eine Temperatur finden, die bewirkt, dass der terminale Bereich des Doppelstrangs zuerst schmilzt, wodurch die erste Blase geöffnet und dadurch eine bevorzugte Substratstruktur der Spaltung durch die 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung geschaffen wird (**Fig.** 36A). Die Stelle einer solchen Spaltung sollte im 5'-Arm liegen, innerhalb von 2 Nukleotiden von der Verbindungsstelle zwischen den einzel- und doppelsträngigen Bereichen (Lyamichev et al., supra, und US-Patent Nr. 5,422,253).

[0267] Es kann ein weiteres Oligonukleotid eingesetzt werden, um entlang der Zielnukleinsäure Basenpaarung einzugehen, und würde eine ähnliche Wirkung hinsichtlich der Öffnung dieser Blase für die anschließende Spaltung des ungepaarten 5'-Arms haben (**Fig.** 36B und Fig. 6). In diesem Fall werden die 3'-terminalen Nuk-

leotide des stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids durch eine Annealing-Reaktion auf solche Weise entlang der Zielnukleinsäuresequenz gebunden, dass sich das 3'-Ende innerhalb des „Blasen"-Bereichs befindet. Je nach dem genauen Ort des 3'-Endes dieses Oligonukleotids kann sich die Spaltungsstelle entlang dem neuen ungepaarten 5'-Arm befinden oder an der Stelle, die für die thermisch geöffnete Blasenstruktur wie oben beschrieben erwartet würde. Im ersteren Fall befindet sich die Spaltung nicht innerhalb eines Doppelstrangbereiches und ist daher keine invasive Spaltung, während im letzteren Fall das Oligonukleotid nur als Hilfe bei der Induktion der Spaltung an einer Stelle dient, die sonst nur durch die Verwendung von Temperatur freigelegt werden würde (d. h. in Abwesenheit des zusätzlichen Oligonukleotids), und daher nicht als invasive Spaltung gilt.

[0268] Insgesamt lässt sich jede Anordnung von Oligonukleotiden, die für den spaltungsbasierten Nachweis einer Zielsequenz verwendet werden, analysieren um zu bestimmen, ob die Anordnung eine invasive Spaltungsstruktur ist, wie sie hierin in Betracht gezogen wird. Eine invasive Spaltungsstruktur unterstützt die Spaltung der Sonde in einem Bereich, der in Abwesenheit eines stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids mit der Zielnukleinsäure Basenpaarungen eingehen dürfte.

[0269] Beispiel 26 unten liefert weitere Leitlinien für den Entwurf und die Ausführung von Versuchen, welche es erlauben zu bestimmen, ob eine bestimmte Anordnung eines Paares von stromaufwärts und stromabwärts gelegenen (d. h. der Sonden-) Oligonukleotiden eine invasive Spaltungsstruktur ausbilden würden, wenn sie durch eine Annealing-Reaktion an eine Zielnukleinsäure gebunden werden.

IV. Fraktionierung spezifischer Nukleinsäuren durch selektive Ladungsumkehrung

[0270] Einige nukleinsäurebasierte Nachweisverfahren umfassen die Verlängerung und/oder Verkürzung von Oligonukleotidsonden. Beispielsweise umfassen, wie hierin beschrieben, die primergesteuerte, primerunabhängige und Invader™-gesteuerte Spaltung sowie das „Knabber"-Verfahren sämtlich die Spaltung (d. h. Verkürzung) von Oligonukleotiden als ein Mittel zum Nachweis des Vorhandenseins einer Zielnukleinsäuresequenz. Beispiele andere Nachweisverfahren, welche die Kürzung einer Oligonukleotidsonde beinhalten, umfassen das „TaqMan"- oder „Nick-Translation"-PCR-Verfahren, beschrieben in US-Patent Nr. 5,210,015 an Gelfand et al., die in US-Patent Nr. 4,775,619 und 5,118,605 an Urdea beschriebenen Verfahren, das katalytische Hybridisierungs-Amplifizierung-Verfahren, beschrieben in US-Patent Nr. 5,403,711 an Walder and Walder, und das Zyklussondenverfahren, beschrieben in US-Patent Nr. 4,876,187 und 5,011,769 an Duck et al. Beispiele von Nachweisverfahren, welche die Verlängerung einer Oligonukleotidsonde (oder eines Primers) beinhalten, umfassen die Polymerasekettenreaktion (PCR), beschrieben in US-Patent Nr. 4,683,195 und 4,683,202 an Mullis and Mullis et al., und die Ligasekettenreaktion (LCR), beschrieben in US-Patent Nr. 5,427,930 und 5,494,810 an Birkenmeyer et al. und Barany et al. Die obigen Beispiele sollen nukleinsäurebasierte Nachweisverfahren veranschaulichen, welche die Verlängerung und/oder Verkürzung von Oligonukleotidsonden umfassen, und liefern keine erschöpfende Liste.

[0271] Nukleinsäurebasierte Nachweisverfahren, welche die Verlängerung und/oder Verkürzung von Oligonukleotidsonden umfassen, erfordern in der Regel eine Analyse nach der Reaktion, um die Produkte der Reaktion nachzuweisen. Häufig müssen die spezifischen Reaktionsprodukte von den anderen Reaktionsbestandteilen getrennt werden, einschließlich von der Eingabe- bzw. nicht umgesetzten Oligonukleotidsonde. Ein Nachweisverfahren umfasst die elektrophoretische Auftrennung der umgesetzten und nicht umgesetzten Oligonukleotidsonde. Wenn das Verfahren die Spaltung oder Verkürzung der Sonde umfasst, ist das nicht umgesetzte Produkt länger als das umgesetzte oder gespaltene Produkt. Wenn das Verfahren die Verlängerung der Sonde (oder des Primers) umfasst, sind die Reaktionsprodukte länger als die Eingabe. Gelbasierte Elektrophorese einer Probe, die Nukleinsäuremoleküle verschiedener Längen enthält, trennt diese Fragmente hauptsächlich auf der Basis der Größe. Dies liegt daran, dass Nukleinsäuren mit sehr unterschiedlichen Größen (d. h. Molekulargewichten) in Lösungen mit neutralem oder alkalischem pH-Wert sehr ähnliche Ladungs-zu-Masse-Verhältnisse aufweisen und sich nicht auftrennen (Andrews, Electrophoresis, 2. Auflage, Oxford University Press (1986), S. 153–154]. Die Gelmatrix wirkt als molekulares Sieb und ermöglicht die Trennung von Nukleinsäuren auf der Basis von Größe und Form (z. B. linear, entspannt zirkulär oder als kovalent geschlossene Ringe mit Supercoiled-Form).

[0272] Nicht modifizierte Nukleinsäuren haben aufgrund des Vorhandenseins negativ geladener Phosphatgruppen, die innerhalb des Zucker-Phosphat-Gerüstes der Nukleinsäure vorhanden sind, eine negative Nettoladung. Typischerweise wird das Gel in der Nähe des negativen Pols auf das Gel aufgetragen, und die Nukleinsäurefragmente wandern in das Gel zum positiven Pol, wobei die kleinsten Fragmente am schnellsten durch das Gel wandern.

[0273] Die vorliegende Erfindung stellt ein neuartiges Mittel zur Fraktionierung von Nukleinsäurefragmenten auf der Basis der Ladung bereit. Diese neuartige Auftrennungstechnik bezieht sich auf die Beobachtung, das positiv geladene Addukte das elektrophoretische Verhalten kleiner Oligonukleotide beeinflussen können, da die Ladung des Adduktes relativ zu der Ladung des gesamten Komplexes signifikant ist. Außer der Verwendung positiv geladener Addukte (z. B. Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5, die positiv geladenen heterodimeren DNA-bindenden Farbstoffe, die in Fig. 66 gezeigt sind, etc.) kann das Oligonukleotid Aminosäuren (besonders geeignete Aminosäuren sind die geladenen Aminosäuren: Lysin, Arginin, Aspartat, Glutamat), modifizierte Basen wie beispielsweise aminomodifizierte Basen und/oder ein Phosphonatgerüst enthalten (an allen oder einer Untergruppe der Positionen). Darüber hinaus können, wie unten weiter beschrieben ist, ein neutraler Farbstoff oder eine Nachweiseinheit (z. B. Biotin, Streptavidin, etc.) anstelle eines positiv geladenen Adduktes in Verbindung mit der Verwendung aminomodifizierter Basen und/oder einem vollständigen oder partiellen Phosphonatgerüst verwendet werden.

[0274] Dieser beobachtete Effekt ist besonders bei Verfahren nützlich, die auf der Spaltung von DNA-Molekülen basieren. Indem die hierin beschriebenen Verfahren als Beispiel verwendet werden, kann die positive Ladung dazu veranlasst werden, nicht nur die negative Nettoladung signifikant zu reduzieren, wenn ein Oligonukleotid durch die Einwirkung eines Cleavase®-Enzyms oder eines anderen Spaltungsagens verkürzt wird, sondern diese tatsächlich zu übertreffen, wodurch die Nettoladung der markierten Einheit wirksam „umgedreht" wird. Diese Ladungsumkehrung erlaubt, dass die Produkte einer zielspezifischen Spaltung durch extrem einfache Mittel von ungespaltener Sonde getrennt werden.

[0275] Beispielsweise kann man die Spaltungsprodukte zu einer negativen Elektrode wandern lassen, sie sich an einem beliebigen Punkt in einem Reaktionsgefäß befindet, um einen fokussierten Nachweis ohne gelbasierte Elektrophorese durchzuführen. Beispiel 24 liefert Beispielvorrichtungen, die für einen fokussierten Nachweis ohne gelbasierte Elektrophorese geeignet sind. Wird ein Flachgel (Slab-Gel) verwendet, lassen sich die Probenvertiefungen in der Mitte des Gels positionieren, so dass die gespaltenen und ungespaltenen Sonden beobachtet werden können, wie sie in entgegen gesetzte Richtungen wandern. Alternativ kann ein herkömmliches vertikales Gel verwendet werden, wobei aber die Elektroden relativ zu gewöhnlichen DNA-Gelen umgekehrt sind (d. h. die positive Elektrode befindet sich oben und die negative Elektrode unten), so dass die gespaltenen Moleküle in das Gel eindringen, während die ungespaltenen sich im oberen Tank mit Elektrophoresepuffer verteilen.

[0276] Ein wichtiger Vorteil dieser Art von Analyse ist die Absolutheit der Trennung von Produkten von Substraten (d. h. die Auftrennung liegt praktisch bei 100%). Das bedeutet, dass sehr viel ungespaltene Sonde zugegeben werden kann, um den Hybridisierungsschritt des sondenbasierten Nachweises anzutreiben, und wobei dennoch im Wesentlichen die nicht verbrauchte (d. h. nicht umgesetzte) Sonde vom Ergebnis abgezogen werden kann, um den Hintergrund aufgrund der Tatsache zu reduzieren, dass die nicht umgesetzte Sonde nicht zum gleichen Pol wandert wie das spezifische Reaktionsprodukt.

[0277] Durch die Verwendung mehrere positiv geladener Addukte lassen sich synthetische Moleküle konstruieren, die ausreichend modifiziert sind, dass der normalerweise negativ geladene Strang fast neutral gemacht wird. Bei einer solchen Konstruktion können das Vorhandensein oder das Nichtvorhandensein einer einzelnen Phosphatgruppe den Unterschied zwischen einer negativen oder einer positiven Nettoladung bedeuten. Diese Beobachtung ist besonders nützlich, wenn eine Aufgabe darin besteht, zwischen enzymatisch erzeugten Fragmenten von DNA ohne 3'-Phosphat und den Produkten des wärmebedingten Zerfalls, die noch über ein 3'-Phosphat (und daher über zwei zusätzliche negative Ladungen) verfügen, zu unterscheiden. Beispiel 22 und 23 zeigen, dass es möglich ist, positiv geladene Reaktionsprodukte von einem Substratoligonukleotid mit negativer Nettoladung zu trennen. Wie in diesen Beispielen erläutert, können Oligonukleotide von Verbindungen mit negativer Nettoladung zu Verbindungen mit positiver Nettoladung verwandelt werden. In Beispiel 23 wurde der positiv geladene Farbstoff Cy3 am 5'-Ende eines 22-Mers (SEQ ID Nr.: 50) eingebaut, das außerdem an dem 5'-Ende des Oligonukleotids zwei aminosubstituierte Reste enthielt; diese Oligonukleotidsonde trägt eine negative Nettoladung. Nach der Spaltung, die 2 Nukleotide innerhalb der Sonde stattfand, wurde folgendes markiertes Oligonukleotid freigesetzt: 5'-Cy3-AminoT-AminoT-3' (sowie die verbleibenden 20 Nukleotide von SEQ ID Nr.: 50). Dieses kurze Fragment trägt eine positive Nettoladung, während der Rest des gespaltenen Oligonukleotids und das nicht umgesetzte Oligonukleotid bzw. das Eingabeoligonukleotid negative Nettoladungen tragen.

[0278] Die vorliegende Erfindung zieht Ausführungsformen in Betracht, bei denen das spezifische Reaktionsprodukt, das durch eine Spaltung eines Oligonukleotids produziert wird, so entworfen werden kann, dass es eine positive Nettoladung trägt, während die nicht umgesetzte Sonde ladungsneutral ist oder eine negative

Nettoladung trägt. Die vorliegende Erfindung zieht außerdem Ausführungsformen in Betracht, bei denen das frei gesetzte Produkt so entworfen sein könnte, dass es eine negative Nettoladung trägt, während die Eingabenukleinsäure eine positive Nettoladung trägt. Je nach der Länge des nachzuweisenden frei gesetzten Produktes können positiv geladene Farbstoffe an dem einen Ende der Sonde eingebaut und modifizierte Basen derart entlang des Oligonukleotids platziert werden, dass bei einer Spaltung das frei gesetzte Fragment, welches den positiv geladenen Farbstoff trägt, eine positive Nettoladung trägt. Aminomodifizierte Basen können verwendet werden, um die Ladung des frei gesetzten Fragments in Fällen auszugleichen, in denen das Vorhandensein des positiv geladenen Adduktes (z. B. des Farbstoffes) alleine nicht ausreichend ist, um dem frei gesetzten Fragment eine positive Nettoladung zu verleihen. Darüber hinaus kann das Phosphatgerüst durch ein Phosphonatgerüst in einem Maß ersetzt werden, das ausreichend ist, um eine positive Nettoladung zu verleihen (dies ist besonders nützlich, wenn die Sequenz des Oligonukleotids nicht für die Verwendung aminosubstituierter Basen geeignet ist). **Fig. 45** und **Fig. 46** zeigen die Struktur kurzer Oligonukleotide mit einer Phosphonatgruppe am zweiten T-Rest. Ein Oligonukleotid, das ein vollständig durch Phosphonat ersetztes Gerüst enthält, wäre ladungsneutral (Fehlen von modifizierten geladenen Resten, die eine Ladung tragen, oder Vorhandensein eines geladenen Adduktes) aufgrund des Fehlens der negativ geladenen Phosphatgruppen. Phosphonat-haltige Nukleotide (z. B. Methylphosphonat-haltige Nukleotide) sind einfach erhältlich und lassen sich während der Synthese an jeder beliebigen Position eines Oligonukleotids anhand von aus dem Stand der Technik gut bekannten Techniken einbauen.

[0279] Die Erfindung zieht im Wesentlichen die Verwendung einer ladungsbasierten Trennung in Betracht, um die Trennung spezifischer Reaktionsprodukte von den Eingabe-Oligonukleotiden in nukleinsäurebasierten Nachweisverfahren zu ermöglichen. Die Grundlage dieser neuartigen Trenntechnik ist der Entwurf und die Verwendung von Oligonukleotidsonden (im Fall der PCR typischerweise als „Primer" bezeichnet), die „ladungsausgeglichen" sind, so dass die Sonde bei Spaltung oder Verlängerung „ladungsunausgeglichen" wird, und sich die spezifischen Reaktionsprodukte auf der Basis der Nettoladung von den Eingabe-Reaktionspartnern trennen lassen.

[0280] Im Zusammenhang mit Verfahren, welche die Verlängerung einer Oligonukleotidsonde (d. h. eines Primers) umfassen, wie es bei der PCR der Fall ist, sind die Eingabeprimer so entworfen, dass sie eine positive Nettoladung tragen. Verlängerung des kurzen Oligonukleotidprimers während der Polymerisation erzeugt PCR-Produkte, die nun eine negative Nettoladung tragen. Die spezifischen Reaktionsprodukte können anschließend unabhängig von den Eingabeprimern einfach getrennt und eingeengt werden, wobei die hierin beschriebene ladungsbasierte Trenntechnik angewandt wird (die Elektroden sind relativ zu der Beschreibung in Beispiel 23 umgekehrt, da das zu trennende und einzuengende Produkt nach einer PCR eine negative Ladung trägt).

V. Invader™-gesteuerte Spaltung unter Verwendung von Minisonden und Sonden im mittleren Bereich

[0281] Wie in Abschnitt III oben erläutert, kann die Invader™-gesteuerte Spaltung mit Invader™- und Sondenoligonukleotiden durchgeführt werden, die eine Länge von etwa 13–25 Nukleotiden aufweisen (typischerweise 20–25 Nukleotide). Es wird auch in Betracht gezogen, dass die Oligonukleotide, welche die Bereiche X, Y und Z umspannen (siehe **Fig. 25**), die Invader™- und die Sondenoligonukleotide selbst aus kürzeren Oligonukleotidsequenzen zusammengesetzt sind, die entlang eines Zielstranges ausgerichtet sind, aber nicht kovalent verknüpft sind. Das bedeutet, dass es einen Einzelstrangbruch (Nick) im Zucker-Phosphat-Gerüst des verbundenen Oligonukleotids gibt, aber es im Verlauf basengepaarter Nukleotide in dem resultierenden Doppelstrang keine Unterbrechung gibt. Wenn kurze Nukleinsäurestränge fortlaufend entlang einem längeren Strang ausgerichtet sind, wird die Hybridisierung eines jeden durch die Hybridisierung der benachbarten Fragmente stabilisiert, da sich die Basenpaare entlang der Helix so aufreihen können, als wäre das Gerüst eigentlich ununterbrochen. Diese Kooperativität der Bindung kann jedem Segment eine Stabilität im Hinblick auf Wechselwirkungen verleihen, die über der liegt, die anzunehmen wäre, wenn das Segment alleine an die längere Nukleinsäure hybridisieren würde. Eine Anwendung dieser Beobachtung war es, aus Sätzen von drei Hexamer-Oligonukleotiden, die entworfen sind, um auf diese Art und Weise zu hybridisieren, Primer für DNA-Sequenzierung zusammenzustellen, typischerweise mit einer Länge von etwa 18 Nukleotiden (Kotler et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4241 [1993]). Die resultierenden Primer mit Doppelstrangbruch lassen sich enzymatisch in Reaktionen verlängern, die bei Temperaturen durchgeführt werden, bei denen anzunehmen ist, dass sie die Hybridisierung von Hexameren, aber nicht die von 18-Meren, stören.

[0282] Die Verwendung von verbundenen oder geteilten Oligonukleotiden wird erfolgreich bei der Invader™-gesteuerten Spaltung angewandt. Das Sondenoligonukleotid kann in zwei Oligonukleotide geteilt werden, welche durch eine Annealing-Reaktion in fortlaufender und unmittelbar aufeinander folgender Weise ent-

lang einem Zieloligonukleotid gebunden werden, wie in Fig. 57 als Diagramm gezeigt ist. In dieser Figur wird das stromabwärts gelegene Oligonukleotid (analog zu der Sonde von Fig. 25) aus zwei kleineren Stücken zusammengesetzt: einem kurzen Segment von 6–10 Nukleotiden (wird als „Minisonde" bezeichnet), das im Verlauf der Nachweisreaktion gespalten werden soll, und einem Oligonukleotid, das unmittelbar stromabwärts von der Minisonde hybridisiert (als „Stacker" bezeichnet), das dazu dient, die Hybridisierung der Sonde zu stabilisieren. Zur Ausbildung der Spaltungsstruktur wird ein stromaufwärts gelegenes Oligonukleotid (das „Invader™-Oligo) bereit gestellt, um die Spaltungsaktivität zu dem gewünschten Bereich der Minisonde zu steuern. Das Zusammensetzen der Sonde aus nicht verknüpften Nukleinsäurestücken (d. h. der Minisonde und dem Stacker) erlaubt, dass Bereiche von Sequenzen verändert werden können, ohne das eine erneute Synthese der gesamten bewiesenen Sequenz erforderlich ist, was die Kosten und die Flexibilität des Nachweissystems verbessert. Darüber hinaus macht die Verwendung nicht verknüpfter verbundener Oligonukleotide das System stringenter in seiner Anforderung einer perfekt aufeinander passenden Hybridisierung, um eine Signalerzeugung zu erreichen, weshalb dies als empfindliches Mittel zum Nachweis von Mutationen oder Veränderungen in den Zielnukleinsäuresequenzen verwendet werden kann.

[0283] Wie in Fig. 57 veranschaulicht verwendet das Verfahren der vorliegenden Erfindung in einer Ausführungsform wenigstens drei Oligonukleotide, die mit einer Zielnukleinsäure wechselwirken, um eine Spaltungsstruktur für eine strukturspezifische Nuklease zu bilden. Die Spaltungsstruktur umfasst insbesondere i) eine Zielnukleinsäure, die entweder einzelsträngig oder doppelsträngig sein kann (wenn eine doppelsträngige Zielnukleinsäure verwendet wird, kann sie z. B. durch Erwärmen einzelsträngig gemacht werden); ii) ein erstes Oligonukleotid, „Stacker" genannt, das einen ersten Bereich der Zielnukleinsäuresequenz definiert, indem es das Komplement dieses Bereiches darstellt (Bereich W der Zielnukleinsäure wie gezeigt in Fig. 57); iii) ein zweites Oligonukleotid, „Minisonde" genannt, das einen zweiten Bereich der Zielnukleinsäuresequenz definiert, indem es das Komplement dieses Bereichs darstellt (Bereich X und Z der Zielnukleinsäure wie gezeigt in Fig. 57); iv) ein drittes Oligonukleotid, „Invader™" genannt, dessen 5'-Teil einen dritten Bereich derselben Zielnukleinsäuresequenz definiert (Bereich Y und X in Fig. 57), der stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Zielbereich (Bereich X und Z) folgt, und dessen zweiter oder 3'-Teil mit dem von dem zweiten Oligonukleotid definierten Bereich überlappt (Bereich X zeigt den Überlappungsbereich). Die resultierende Struktur ist in Fig. 57 als Diagramm gezeigt.

[0284] Obwohl die Erfindung oder diese Diskussion nicht auf einen bestimmten Wirkungsmechanismus beschränkt sind, stellt das Diagramm in Fig. 57 die Wirkung auf die Spaltungsstelle an, welche von dieser Art von Anordnung von drei Oligonukleotiden verursacht wird. Der Entwurf dieser drei Oligonukleotide ist unten ausführlich beschrieben. In Fig. 57 sind die 3'-Enden der Nukleinsäuren (d. h. der Zielnukleinsäure und der Oligonukleotide) anhand von Pfeilspitzen an den Enden der Zeilen angezeigt, welche die Nukleinsäurestränge darstellen (und, wenn es der Platz erlaubt, sind diese Enden außerdem als „3'" gekennzeichnet). Es ist leicht verständlich, dass die drei Oligonukleotide (der Invader™, die Minisonde und der Stacker) in paralleler Ausrichtung relativ zueinander angeordnet sind, während der Zielnukleinsäurestrang relativ zu den drei Oligonukleotiden in antiparalleler Ausrichtung angeordnet ist. Des Weiteren versteht es sich, dass sich das Invader™-Oligonukleotid stromaufwärts von dem Minisonden-Oligonukleotid befindet und dass sich das Minisonden-Oligonukleotid stromaufwärts vom Stacker-Oligonukleotid befindet und dass sich Bereich W in Bezug auf den Zielnukleinsäurestrang stromaufwärts von Bereich Z befindet, sich Bereich Z stromaufwärts von Bereich X befindet und sich Bereich X stromaufwärts von Bereich Y befindet (das heißt, Bereich Y befindet sich stromabwärts von Bereich X, Bereich X befindet sich stromabwärts von Bereich Z und Bereich Z befindet sich stromabwärts von Bereich W). Bereiche von Komplementarität zwischen den gegenüber liegenden Strängen sind durch kurze vertikale Linien angezeigt. Ohne die genaue Stelle der Spaltungsstelle(n) anzeigen zu wollen, wird der Bereich, zu dem die Spaltungsstelle innerhalb des Minisondenoligonukleotids durch das Vorhandensein des Invader™-Oligonukleotids verschoben wird, durch die ausgefüllte vertikale Pfeilspitze angezeigt. Fig. 57 soll nicht den eigentlichen Wirkungsmechanismus oder die physikalische Anordnung der Spaltungsstruktur darstellen, und das Verfahren der vorliegenden Erfindung soll darüber hinaus nicht auf einen bestimmten Wirkungsmechanismus beschränkt sein.

[0285] Es kann in Betracht gezogen werden, dass die Bindung dieser Oligonukleotide die Zielnukleinsäure in vier distinkte Bereiche aufteilt: einen Bereich, der nur zum Stacker komplementär ist (gezeigt als „W"); einen Bereich, der nur zu der Minisonde komplementär ist (gezeigt als „Z"); einen Bereich, der nur zu dem Invader™-Oligo komplementär ist (gezeigt als „Y"); und einen Bereich, der sowohl zum Invader™- als auch zu dem Minisondenoligonukleotid komplementär ist (gezeigt als „X").

[0286] Außer den oben genannten Vorteilen räumt die Verwendung von verbunden entworfenen Oligonukleotiden, welche die Spaltungsstruktur ausbilden, mehr Freiheit beim Entwurf der Reaktionsbedingungen zur

Durchführung der Invader™-gesteuerten Spaltung ein. Wenn eine längere Sonde (z. B. 16 bis 25 Nukleotide), wie in Abschnitt III oben beschrieben, für den Nachweis bei Reaktionen verwendet wird, die bei Temperaturen unterhalb der T_m dieser Sonde durchgeführt werden, kann die Spaltung der Sonde eine wesentliche Rolle bei der Destabilisierung des Doppelstranges spielen, dessen Teil sie ist, was eine Umsetzung und die Wiederverwendung der Erkennungsstelle auf der Zielnukleinsäure ermöglicht. Bei Minisonden dagegen bedeuten Reaktionstemperaturen, die der T_m der Sonde entsprechen oder darüber liegen, dass die Sondenmoleküle schnell hybridisieren und sich selbst ohne Spaltung der Sonde vom Ziel ablösen. Wenn ein stromaufwärts gelegenes Invader™-Oligonukleotid und ein Spaltungsagens bereit gestellt sind, wird die Minisonde spezifisch gespalten, aber die Spaltung ist für die Umsetzung der Minisonde nicht erforderlich. Wenn eine längere Sonde (z. B. 16 bis 25 Nukleotide) auf diese Weise verwendet werden würde, wären die zum Erreichen dieses Zustands erforderlichen Temperaturen recht hoch, d. h. etwa 65 bis 70°C für ein 25-Mer mit durchschnittlicher Basenzusammensetzung. Die Erforderlichkeit der Verwendung solch erhöhter Temperaturen beschränkt die Auswahl an Spaltungsmitteln auf solche, die sehr thermostabil sind, und könnte, je nach Nachweismittel, durch wärmebedingten Zerfall des Sondenoligonukleotids zum Hintergrund in den Reaktionen beitragen. Deshalb sind die kürzeren Sonden für eine derartige Verwendung bevorzugt.

[0287] Die Minisonde der vorliegenden Erfindung kann in ihrer Größe je nach der gewünschten Anwendung variieren. In einer Ausführungsform kann die Sonde relativ kurz sein im Vergleich zu einer Standardsonde (z. B. 16 bis 25 Nukleotide), d. h. im Bereich von 6 bis 10 Nukleotiden. Bei Verwendung einer solch kurzen Sonde können Reaktionsbedingungen gewählt werden, welche eine Hybridisierung der Minisonde in Abwesenheit des Stacker-Oligonukleotids verhindern. Auf diese Weise kann die kurze Sonde die statistische Spezifität und Selektivität einer längeren Sequenz annehmen. Bei einer Störung der kooperativen Bindung der Minisonde und der Stacker-Nukleinsäuren, wie sie durch eine Fehlpaarung innerhalb der kurzen Sequenz (d. h. des Bereiches „Z", bei dem es sich um den Bereich der Minisonde handelt, der nicht mit dem Invader™ überlappt) oder an der Verbindungsstelle zwischen den kontigen Doppelsträngen verursacht werden könnte, könnte diese Kooperativität verloren gehen, was die Stabilität des kürzeren Oligonukleotids (d. h. der Minisonde) drastisch senkt und damit die Menge an gespaltenem Produkt in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung reduziert.

[0288] Es wird auch in Betracht gezogen, dass Sonden mittlerer Größe verwendet werden. Solche Sonden, im Bereich von 11 bis 15 Nukleotiden, können einige der Merkmale in Verbindung mit den längeren Sonden, wie sie ursprünglich beschrieben sind, integrieren, wobei diese Merkmale die Hybridisierungsfähigkeit sowie die Fähigkeit umfassen, ohne die Hilfe eines Stacker-Oligonukleotids gespalten zu werden. Bei Temperaturen unterhalb der erwarteten T_m solcher Sonden könnte der Mechanismus des Umsetzens (Turnover) sein wie oben für Sonden im Bereich von 20 Nukleotiden erläutert und zur Destabilisierung und Zyklusausbildung vom Entfernen der Sequenz im Bereich „X" abhängen.

[0289] Die Sonden im mittleren Größenbereich lassen sich auch bei höheren Temperaturen einsetzen, die ihren erwarteten T_m entsprechen oder darüber liegen, damit ein Umsetzen der Sonde durch Schmelzen anstatt durch Spaltung ermöglich wird. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen längeren Sonden sind die Temperaturen, die erforderlich sind, um die Verwendung einer solchen thermisch angetriebenen Umsetzung zuzulassen, viel niedriger (etwa 40 bis 60°C), wodurch sowohl das Spaltungsagens als auch die Nukleinsäuren in der Reaktion vor wärmebedingtem Zerfall geschützt sind. Auf diese Weise arbeiten die Sonden im mittleren Größenbereich in mancherlei Weise wie die oben beschriebenen Minisonden. Eine zusätzliche Ähnlichkeit zu den Minisonden ergibt sich dadurch, dass die Ansammlung von Spaltungssignal von einer Sonde im mittleren Größenbereich unter manchen Reaktionsbedingungen durch Vorhandensein eines Stackers unterstützt werden kann.

[0290] Insgesamt profitiert eine Sonde mit Standardlänge nicht vom Vorhandensein eines stromabwärts gelegenen Stacker-Oligonukleotids (wobei solche Fälle, in denen ein solches Oligonukleotid auch Strukturen in der Zielnukleinsäure unterbrechen kann, die in die Sondenbindung eingreifen, die Ausnahme darstellen) und wird in der Regel unter Bedingungen verwendet, in denen mehrere Nukleotide entfernt werden müssen, damit das Oligonukleotid wirksam von der Zielnukleinsäure freigesetzt wird.

[0291] Die Minisonde ist sehr klein und arbeitet optimal bei Vorhandensein eines stromabwärts gelegenen Stacker-Oligonukleotids. Die Minisonden eignen sich gut für Reaktionsbedingungen, welche die Reaktionstemperatur verwenden, um einen schnellen Austausch der Sonden auf der Zielnukleinsäure anzutreiben, unabhängig davon, ob etwaige Basen gespalten worden sind. Bei Reaktionen mit ausreichender Menge an Spaltungsagens werden die Sonden, die binden, schnell gespalten, bevor sie wegschmelzen.

[0292] Die Sonde im mittleren Größenbereich oder die Minisonde kombiniert Merkmale dieser Sonden und

kann bei ähnlichen Reaktionen wie bei solchen, die für lange Sonden entworfen sind, eingesetzt werden, mit längeren Überlappungsbereichen („X"-Bereichen), um die Probenumsetzung bei niedriger Temperatur anzutreiben. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Proben im mittleren Größenbereich bei Temperaturen verwendet, die ausreichend hoch sind, damit die Sonden an die Zielnukleinsäure hybridisieren und unabhängig von einer Spaltung rasch frei gesetzt werden. Dies entspricht dem bekannten Verhalten von Oligonukleotiden an der oder in der Nähe ihrer Schmelztemperatur. Diese Art der Umsetzung entspricht eher der bei Kombinationen aus Minisonde/Stacker verwendeten als der bei langen Sonden verwendeten. Die Sonde im mittleren Größenbereich kann unter manchen Umständen in Gegenwart eines Stackers bessere Leistung aufweisen. Beispielsweise würde das Vorhandensein eines Stackers bei Verwendung einer Sonde im unteren Ende des mittleren Größenbereichs (z. B. 11 Nukleotiden) oder einer mit ungewöhnlichem A/T-Gehalt bei einer Reaktion, die deutlich über der T_m der Sonde (z. B. > 10°C darüber) durchgeführt wird, die Leistung der Sonde wahrscheinlich erhöhen, während die Sonde bei gemäßigteren Temperaturen auf einen Stacker wahrscheinlich nicht reagieren würde.

[0293] Die Unterscheidungen zwischen den Minisonden, den Midisonden (d. h. der Sonden mit mittleren Größenbereich) und langer Sonden sollen nicht unflexibel sein und beruhen allein auf der Länge. Die Leistung einer beliebigen Sonde kann je nach ihrer spezifischen Sequenz, der Auswahl der Lösungsbedingungen, der Auswahl der Temperatur und dem ausgewählten Spaltungsagens variieren.

[0294] In Beispiel 18 ist gezeigt, dass die Zusammensetzung von Oligonukleotiden, aus denen die Spaltungsstruktur der vorliegenden Erfindung zusammengesetzt ist, gegenüber Fehlpaarungen zwischen der Sonde und der Zielnukleinsäure empfindlich ist. Die in Beispiel 18 verwendete Stelle der Fehlpaarung liefert ein Beispiel, und soll die Stelle einer Fehlpaarung, welche die Spaltung beeinflusst, nicht einschränken. Es wird außerdem in Betracht gezogen, dass eine Fehlpaarung zwischen dem Invader™-Oligonukleotid und der Zielnukleinsäure verwendet werden kann, um verwandte Zielsequenzen zu unterscheiden. In dem System mit 3 Oligonukleotiden, welches einen Invader™, eine Sonde und ein Stacker-Oligonukleotid umfasst, wird in Betracht gezogen, dass sich Fehlpaarungen in einem beliebigen Bereich des zwischen diesen Oligonukleotide und der Zielsequenz ausgebildeten Doppelstranges befinden können. In einer bevorzugten Ausführungsform befindet sich eine nachzuweisende Fehlpaarung in der Sonde. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform befindet sich die Fehlpaarung in der Sonde an dem Basenpaar, das stromaufwärts unmittelbar (d. h. 5') auf die Stelle folgt, die gespalten wird, wenn die Sonde keine Fehlpaarung mit der Zielnukleinsäure aufweist.

[0295] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform befindet sich eine nachzuweisende Fehlpaarung in dem Bereich „Z", definiert durch die Hybridisierung einer Minisonde. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform befindet sich die Fehlpaarung in der Minisonde an dem Basenpaar, das stromaufwärts unmittelbar (d. h. 5') auf die Stelle folgt, die gespalten wird, wenn die Minisonde keine Fehlpaarung mit der Zielnukleinsäure aufweist.

[0296] Es wird auch in Betracht gezogen, dass in einer einzelnen Reaktion unterschiedliche Sequenzen nachgewiesen werden. Sonden, die für die unterschiedlichen Sequenzen spezifisch sind, können unterschiedlich markiert sein. Beispielsweise können die Sonden unterschiedliche Farbstoffe oder andere nachweisbare Einheiten oder unterschiedliche Längen aufweisen, oder sie können Unterschiede in der Nettoladung der Produkte nach der Spaltung aufweisen. Liegt eine unterschiedliche Markierung auf eine dieser Arten vor, kann der Beitrag jeder spezifischen Zielsequenz zum Endprodukt nachverfolgt werden. Dies findet Anwendung beim Nachweis der Mengen unterschiedlicher Versionen eines Gens in einem Gemisch. Bei nachzuweisenden und zu quantifizierenden unterschiedlichen Genen in einem Gemisch kann es sich um Wildtypgene und mutante Gene handeln (z. B. wie sie gegebenenfalls in einer Tumorprobe, wie beispielsweise eine Biopsie, zu finden sind). In dieser Ausführungsform lassen sich die Sonden für genau dieselbe Stelle entwerfen, aber eine Sonde passt zu der Wildtypsequenz und eine passt zu der Mutante. Ein quantitativer Nachweis der Produkte der Spaltung aus einer Reaktion mit festgelegter Dauer liefert das Verhältnis der beiden Gene in dem Gemisch. Eine solche Analyse kann auch mit nicht verwandten Genen in einem Gemisch durchgeführt werden. Diese Art der Analyse soll nicht auf zwei Gene beschränkt sein. Auf ähnliche Weise lassen sich viele Varianten innerhalb eines Gemisches messen.

[0297] Alternativ können verschiedene Stellen auf einem einzelnen Gen überwacht und quantifiziert werden, um die Messung dieses Gens zu verifizieren. Man würde erwarten, dass das Signal von jeder Sonde in dieser Ausführungsform gleich ist.

[0298] Es wird auch in Betracht gezogen, dass mehrere Proben verwendet werden, die nicht unterschiedlich markiert sind, damit das Gesamtsignal gemessen wird. Dies ist wünschenswert, wenn viele Proben verwendet

werden, die entworfen sind, um ein einzelnes Gen nachzuweisen, um das Signal dieses Gens zu verstärken. Diese Konfiguration kann auch zum Nachweis nicht verwandter Sequenzen in einem Gemisch verwendet werden. In Blutbanken ist es beispielsweise wünschenswert zu wissen, ob in einer Blutprobe ein Wirt infektiöser Erreger vorhanden ist. Da das Blut verworfen wird, egal, welcher Erreger vorhanden ist, wären in einer solchen Anwendung der vorliegenden Erfindung keine unterschiedlichen Signale auf den Sonden erforderlich, und eigentlich aus Gründen des Datenschutzes nicht wünschenswert.

[0299] Wie für das System aus zwei Oligonukleotiden oben beschrieben, wird die Spezifität der Nachweisreaktion durch die Gesamtlänge der an der Hybridisierung des vollständigen Satzes der Nachweisoligonukleotide beteiligten Zielnukleinsäuresequenzen beeinflusst. Es kann beispielsweise Anwendungen geben, bei denen es wünschenswert ist, einen einzelnen Bereich in einem komplexen Genom nachzuweisen. In einem solchen Fall kann der Satz von Oligonukleotiden so gewählt werden, dass er eine genaue Erkennung durch Hybridisierung eines längeren Segmentes einer Zielnukleinsäure erfordert, häufig im Bereich von 20 bis 40 Nukleotiden. In anderen Fällen kann es wünschenswert sein, dass der Satz von Oligonukleotiden mit mehreren Stellen innerhalb einer Zielprobe wechselwirkt. In diesen Fällen bestünde ein Ansatz darin, einen Satz von Oligonukleotiden zu verwenden, die ein kleineres oder daher statistisch häufigeres Segment der Zielnukleinsäuresequenz erkennen.

[0300] In einer bevorzugten Ausführungsform können die Invader™- und Stacker-Oligonukleotide entworfen sein, um derart maximal stabil zu sein, dass sie für längere Zeiträume während der Reaktion an der Zielsequenz gebunden bleiben. Dies kann durch eine aus einer Reihe von Maßnahmen erreicht werden, die einem Fachmann gut bekannt sind, beispielsweise durch Hinzufügen zusätzlicher Hybridisierungssequenzen zur Länge des Oligonukleotids (bis zu einer Gesamtlänge von etwa 50 Nukleotiden) oder durch Verwendung von Resten mit verminderter negativer Ladung, wie beispielsweise Phosphorothioate oder Peptid-Nukleinsäure-Reste, so dass die komplementären Stränge einander nicht in dem Maß abstoßen, wie es bei natürlichen Strängen der Fall ist. Solche Modifikationen können auch dazu dienen, diese flankierenden Oligonukleotide gegenüber kontaminierenden Nukleasen resistent zu machen, wodurch ihr fortgesetztes Vorhandensein auf dem Zielstrang im Verlauf der Reaktion weiter sichergestellt ist. Darüber hinaus können die Invader™- und Stacker-Oligonukleotide kovalent mit der Zielnukleinsäure verknüpft sein (z. B. durch Verwendung einer Psoralen-Vernetzung).

[0301] Die Verwendung der Reaktionstemperatur an oder in der Nähe der T_m des Sondenoligonukleotids anstatt der für die Spaltung verwendeten, um die Umsetzung des Sondenoligonukleotids in diesen Nachweisreaktionen anzutreiben, bedeutet, dass die Menge des gespaltenen Sondenoligonukleotids erheblich reduziert werden kann, ohne die Umsetzungsrate negativ zu beeinflussen. Es wurde festgestellt, dass die Beziehung zwischen dem 3'-Ende des stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids und der gewünschten Spaltungsstelle in der Sonde sorgfältig entworfen werden muss. Es ist bekannt, dass die bevorzugte Spaltungsstelle für die hierin verwendeten Arten strukturspezifischer Endonukleasen ein Basenpaar innerhalb eines Doppelstranges liegt (Lyamichev et al., oben). Zuvor war man davon ausgegangen, dass das Vorhandensein eines stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids oder Primers erlaubt, dass die Spaltungsstelle von dieser bevorzugten Stelle weg in einen einzelsträngigen Bereich auf dem 5'-Arm verlagert werden könnte (Lyamichev et al., oben und US-Patent Nr. 5,422,253). Im Gegensatz zu diesem früher vorgeschlagenen Mechanismus und ohne die vorliegende Erfindung auf einen bestimmten Mechanismus zu beschränken, wird angenommen, dass das Nukleotid unmittelbar 5' bzw. stromaufwärts gelegen von der Spaltungsstelle in der Sonde (einschließlich Minisonde und Sonde im mittleren Größenbereich) in der Lage sein muss, eine Basenpaarung mit der Zielsequenz einzugehen, damit eine wirksame Spaltung stattfinden kann. Im Fall der vorliegenden Erfindung wäre dies das Nukleotid in der Sondensequenz unmittelbar stromaufwärts von der beabsichtigten Spaltungsstelle. Darüber hinaus wurde, wie hierin beschrieben, beobachtet, dass das stromaufwärts gelegene Oligonukleotid seine 3'-Base (d. h. sein 3'-Nukleotid) unmittelbar stromaufwärts von der vorgesehenen Spaltungsstelle der Sonde haben muss, um die Spaltung zu dieser Stelle in der Sonde zu steuern. Dies platziert das 3'-terminale Nukleotid des stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids und die Base des Sondenoligonukleotids 5' von der Spaltungsstelle in Konkurrenz um eine Paarung mit den entsprechenden Nukleotid des Zielstranges.

[0302] Zur Untersuchung des Ergebnisses dieser Konkurrenz (d. h. welche Base während eines erfolgreichen Spaltungsereignisses gepaart wird) wurden in den Sonden- und in den Invader™-Oligonukleotiden derart Substitutionen vorgenommen, dass entweder das Sonden- oder das Invader™-Oligonukleotid an dieser Position Fehlpaarungen mit der Zielsequenz aufweisen. Es wurden die Effekte beider Anordnungen auf die Spaltungsraten untersucht. Wenn das Invader™ Oligonukleotid am 3'-Ende ungepaart ist, war die Spaltungsrate nicht reduziert. Wurde diese Base entfernt, wurde die Spaltungsstelle jedoch nach stromaufwärts von der beabsichtigten Stelle verschoben. Wenn dagegen das Sondenoligonukleotid knapp stromaufwärts von der Stelle, an die

das Invader™ Oligonukleotid die Spaltung steuert, keine Basenpaarung mit der Zielsequenz aufweist, war die Spaltungsrate drastisch reduziert, was darauf hinweist, dass bei Vorliegen einer Konkurrenz das Sondenoligonukleotid das Molekül war, das an dieser Position eine Basenpaarung eingehen soll.

[0303] Es scheint, dass das 3'-Ende des stromaufwärts gelegenen Invader™-Oligonukleotids während der Spaltung ungepaart ist und dennoch für eine genaue Positionierung der Spaltung erforderlich ist. Um zu untersuchen, welche(r) Teile(e) des 3'-terminalen Nukleotids für die Position der Spaltung erforderlich sind, wurden Invader™-Oligonukleotide entworfen, die an diesem Ende mit Nukleotiden enden, welche auf unterschiedliche Weise verändert waren. Zu den untersuchten Zuckern gehörten 2'-Desoxyribose mit einer 3'-Phosphatgruppe, eine Didesoxyribose, 3'-Desoxyribose, 2'-O-Methylribose, Arabinose und Arabinose mit einem 3'-Phosphate. Es wurde abasische Ribose mit und ohne 3'-Phosphat getestet. Es wurden synthetische „universelle" Basen wie beispielsweise 3-Nitropyrrol und 5-3-Nitroindol an Ribosezuckern getestet. Schließlich wurde eine basenähnliche aromatische Ringstruktur, Acridin, verknüpft mit dem 3'-Ende des vorangehenden Nukleotids ohne eine Zuckergruppe, getestet. Die erhaltenen Ergebnisse stützen die Schlussfolgerung, dass der aromatische Ring der Base (am 3'-Ende des Invader™-Oligonukleotids) die Einheit ist, die erforderlich ist, um die Spaltung an die gewünschte Stelle innerhalb der stromabwärts gelegenen Sonde zu steuern.

VI. Signalverstärkung durch Tailing von Reaktionsprodukten bei der Invader™-gesteuerten Spaltung

[0304] Es wurde festgestellt, dass bei Verwendung von Oligonukleotidsonden bei Spaltungsnachweisverfahren bei erhöhter Temperatur ein gewisser Bruchteil der trunkierten Sonden durch unspezifischen wärmebedingten Zerfall verkürzt wird, und dass solche Abbruchprodukte die Analyse der Daten zur zielspezifischen Spaltung erschweren können. Der wärmebedingte Zerfall, der im Hintergrund eine Leiter von Banden erzeugt, wenn die Sonden der vorliegenden Erfindung länger als einige Minuten bei einer hohen Temperatur behandelt werden, läuft in einem aus zwei Schritten bestehenden Prozess ab. Im ersten Schritt bricht die N-Glycosylbindung, was im DNA-Strang eine basenlose Stelle zurücklässt. An der abasischen Stelle ist die DNA-Kette geschwächt und durchläuft durch eine Beta-Eliminierung eine spontane Spaltung. Es wurde festgestellt, dass Purinbasen etwa 20 Mal anfälliger für Bruch sind als Pyrimidinbasen (Lindahl, Nature 362: 709 [1993]). Daraus lässt sich schließen, dass die Auswahl von Zielsequenzen, welche die Verwendung pyrimidinreicher Sonden erlauben, eine Möglichkeit darstellt, den Hintergrund bei Verfahren zu reduzieren, bei denen Oligonukleotide bei erhöhten Temperaturen verwendet werden. Wo möglich, ist es bevorzugt, Oligonukleotide zu verwenden, die ausschließlich aus Pyrimidinresten zusammengesetzt sind. Werden ein Purin oder einige Purine verwendet, erscheinen die Hintergrundbrüche überwiegend an den entsprechenden Stellen, und diese Banden (infolge eines wärmebedingten Zerfalls) könnten mit den beabsichtigen Spaltungsprodukten verwechselt werden, wenn bei der Datenanalyse nicht sorgfältig vorgegangen wird (d. h. es müssen geeignete Kontrollen mitgeführt werden).

[0305] Hintergrundspaltung infolge eines wärmebedingten Zerfalls der Sondenoligonukleotide kann die Genauigkeit der Quantifizierung der Zielnukleinsäuren auf der Basis der Menge des akkumulierten Produktes in einem festgelegten Zeitrahmen verringern, wenn sie nicht von spezifischen Spaltungsprodukten unterschieden wird. Ein Mittel zur Unterscheidung der spezifischen von den unspezifischen Produkten ist oben beschrieben und beruht auf der Aufteilung der Produkte dieser Reaktionen durch Unterschiede in den von den verschiedenen Molekülarten bei der Reaktion getragenen Nettoladungen. Wie in dieser Beschreibung erwähnt, behalten die Produkte eines wärmebedingten Zerfalls nach dem Zerfall in der Regel 3'-Phosphate, während dies bei enzymgespaltenen Produkten nicht der Fall ist. Die beiden negativen Ladungen am Phosphat erleichtern die ladungsbasierte Aufteilung der Produkte.

[0306] Das Fehlen eines 3'-Phosphats an der gewünschten Untergruppe der Sondenfragmente kann auch in enzymatischen Verfahren zum Vorteil genutzt werden. Nukleinsäurepolymerasen, sowohl nicht-vorlagenabhängige (z. B. terminale Desoxynucleotidyltransferase, Poly-A-Polymerase) als auch vorlagenabhängige (z. B. DNA-Polymerasen vom Typ Pol I) brauchen eine verfügbare 3'-Hydroxylgruppe, um weitere Nukleotide anzubringen. Diese enzymatische Auswahl einer Struktur am 3'-Ende kann als wirksames Mittel zur Aufteilung spezifischer Produkte von unspezifischen Produkten verwendet werden.

[0307] Zusätzlich zu den Vorteilen der oben beschriebenen Aufteilung bietet das Hinzufügen von Nukleotiden zum Ende des spezifischen Produktes einer Invader™-spezifischen Spaltung eine Möglichkeit, den Produkten Marker hinzuzufügen, um fassbare Schwanzregionen hinzuzufügen, um Auslesesysteme auf Basis eines festen Trägers zu unterstützen, oder um dies beides gleichzeitig durchzuführen. Einige mögliche Ausführungsformen dieses Konzeptes sind in **Fig. 56** veranschaulicht.

[0308] In Fig. 56 ist eine Invader™-Spaltungsstruktur, umfassend ein Invader™-Oligonukleotid mit einem blockierten oder nicht verlängerbaren 3'-Ende (z. B. einem 3'-Didesoxynucleotid) und einem Sondenoligonukleotid mit einem blockierten oder nicht verlängerbaren 3'-Ende (der offene Ring an dem 3'-Ende der Oligonukleotide stellt ein nicht verlängerbares Nukleotid dar) und eine Zielnukleinsäure, gezeigt; das Sondenoligonukleotid kann einen Marker am 5'-Ende wie beispielsweise einen Biotin- oder ein Fluoreszeinmarker enthalten (angezeigt durch die Sterne) (Spaltungsstrukturen, die eine 5'-biotinmarkierte Sonde oder eine 5'-fluoreszeinmarkierte Sonde enthalten, sind unterhalb des großen Diagramms der Spaltungsstruktur links bzw. rechts gezeigt). Nach der Spaltung der Sonde (der Ort der Spaltung ist durch die große Pfeilspitze gezeigt) wird die gespaltene biotin-markierte Sonde mithilfe einer vorlagenunabhängigen Polymerase (z. B. TdT) und fluoreszeinierten Nukleosidtriphosphaten verlängert. Das gespaltene Sondenmolekül mit Fluoreszein-Schwanz wird dann durch Bindung über seinen 5'-Biotinmarker an Streptavidin erfasst und die Fluoreszenz wird gemessen. Alternativ wird nach der Spaltung einer 5'-fluoreszeinierten Sonde die gespaltene Sonde mithilfe einer vorlagenunabhängigen Polymerase (z. B. TdT) und dATP verlängert. Das polyadenylierte (mit A-Schwanz) gespaltene Sondenmolekül wird dann durch Bindung über den Poly-A-Schwanz an Oligo-dT, angebracht an einen festen Träger, erfasst.

[0309] Die in Fig. 56 beschriebenen Beispiele beruhen auf der Verwendung von TdT, um die Produkte der Invader™-gesteuerten Spaltung mit einem Schwanz (Tail) zu versehen. Die Beschreibung der Verwendung dieses bestimmten Enzyms ist nur als Beispiel gegeben und soll keine Einschränkung darstellen (wenn vielmehr RNA-umfassende Sondenoligos verwendet werden, können gespaltene RNA-Sonden mit Poly-A-Polymerase verlängert werden). Es wird in Betracht gezogen, dass ein Verfahren dieses Typs konfiguriert werden könnte, um eine vorlagenabhängige Polymerase zu verwenden, wie oben beschrieben. Obwohl dies das Vorhandensein einer geeigneten Vorlagenkopie erfordern würde, die sich von der Zielnukleinsäure unterscheidet, auf der das trunkierte Oligonukleotid die Synthese beginnen könnte, ist vorstellbar, dass eine Sonde, die vor der Spaltung aufgrund einer Fehlpaarung oder Modifikation des 3'-Endes nicht verlängerbar wäre, als ein Primer aktiviert wird, wenn sie durch eine Invader™-gesteuerte Spaltung gespalten wird. Eine vorlagengesteuerte Reaktion zum Anbringen einer Schwanzregion hat auch den Vorteil, dass sie eine größere Selektion und Kontrolle der eingebauten Nukleotide zulässt.

[0310] Die Anbringung einer Schwanzregion ohne Vorlage erfordert nicht das Vorhandensein zusätzlicher Nukleinsäuren in der Nachweisreaktion, wodurch ein Schritt der Verfahrensentwicklung und Fehlersuche vermieden wird. Darüber hinaus eliminierte die Verwendung einer Synthese ohne Vorlage den Schritt der Hybridisierung, was das Verfahren möglicherweise beschleunigt. Das TdT-Enzym ist außerdem schnell und kann Substratoligonukleotiden innerhalb einer 15-minütigen Reaktion mindestens > 700 Nukleotide hinzufügen.

[0311] Wie oben erwähnt, können die hinzugefügten Schwanzregionen auf vielerlei Weise verwendet werden. Sie können als direkter Weg für das Hinzufügen markierter Einheiten zu dem Spaltungsprodukt verwendet werden, um das Signal jedes Spaltungsereignisses zu verstärken. Eine solche Reaktion ist auf der linken Seite von Fig. 66 dargestellt. Die markierten Einheiten können alle sein, die bei Anbringung an ein Nukleotid von dem Tailing-Enzym hinzugefügt werden können, beispielsweise Farbstoffmoleküle, Haptene wie beispielsweise Digoxigenin oder andere Bindungsgruppen wie Biotin.

[0312] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ein Mittel zum spezifischen Erfassen oder Aufteilen der mit einer Schwanzregion versehenen Produkte der Invader™-gesteuerten Spaltung in dem Gemisch. Es ist ersichtlich, dass Zielnukleinsäuren in dem Gemisch während der Reaktion mit einer Schwanzregion versehen werden können. Wenn ein Marker hinzugefügt wird, ist es wünschenswert, die mit einer Schwanzregion versehenen Produkte der Invader™-gesteuerten Spaltung von diesen anderen markierten Molekülen zu unterscheiden, um Hintergrund in den Ergebnissen zu vermeiden. Dies ist leicht möglich, wenn nur das Spaltungsprodukt erfasst werden kann. Beispielsweise ist ein Spaltungsverfahren der vorliegenden Erfindung möglich, in dem die verwendete Sonde ein Biotin am 5'-Ende aufweist und hinsichtlich der Verlängerung am 3'-Ende blockiert ist und der während der Anbringung der Schwanzregion ein Farbstoff hinzugefügt wird. Weiter ist möglich, dass die Produkte über die Biotineinheit auf einen Träger erfasst werden, und der erfasste Farbstoff gemessen wird, um das Vorhandensein der Zielnukleinsäure zu bestimmen. Wenn der Marker durch Anbringung der Schwanzregion hinzugefügt wird, werden nur die spezifisch gespaltenen Sonden markiert. Die übrigen ungeschnittenen Sonden können im abschließenden Erfassungsschritt zwar noch binden, tragen aber nicht zum Signal bei. In derselben Reaktion können Einzelstrangbrüche und Einschnitte in der Zielnukleinsäure von dem Enzym mit einer Schwanzregion versehen werden und werden so mit einem Farbstoff markiert. Bei der abschließenden Erfassung binden diese markierten Ziele nicht an den Träger und tragen damit, obwohl sie markiert sind, nicht zu dem Signal bei. Wenn in Betracht gezogen wird, dass das spezifische Endprodukt aus zwei Anteilen, dem von der Sonde abstammenden Anteil und dem Schwanzanteil, besteht, ist aus dieser Dis-

kussion ersichtlich, dass es besonders bevorzugt ist, dass der Marker mit dem Schwanzanteil assoziiert ist, wenn der von der Sonde abstammende Anteil für eine spezifische Erfassung verwendet wird, sei es durch Hybridisierung, Biotin/Streptavidin oder ein anderes Verfahren. Wenn dagegen ein Marker an dem von der Sonde abstammenden Anteil angebracht ist, kann der Schwanzanteil geeignet für eine Erfassung verwendet werden, wie auf der rechten Seite von **Fig. 66** gezeigt. Schwanzregionen können auf unterschiedliche Weise erfasst werden, einschließlich Hybridisierung, Biotineinbau mit Streptavidin-Erfassung, oder aufgrund der Tatsache, dass die längeren Moleküle vorhersagbarer und effizienter an eine Reihe von Nukleinsäurebindungsmatritzen binden, "wie beispielsweise Nitrocellulose, Nylon oder Glas, in Membran-, Papier-, Harzform oder einer anderen Form. Obwohl für dieses Verfahren nicht erforderlich, erlaubt diese Trennung von Funktionen einen wirksamen Ausschluss von dem Signal der nicht umgesetzten Sonde und der mit einer Schwanzregion versehenen Zielnukleinsäure.

[0313] Die mit einer Schwanzregion versehenen Produkte können nicht nur von den oben beschriebenen Trägern erfasst werden, sondern auf jedem Träger, der eine geeignete Erfassungseinheit enthält. Beispielsweise werden biotinylierte Produkte im Allgemeinen mit avidinbehandelten Flächen erfasst. Diese Avidinflächen können sich in Vertiefungen von Mikrotiterplatten, auf Kügelchen, auf Tauchstäben (Dipsticks) befinden, um nur einige der Möglichkeiten zu nennen. Solche Flächen können auch modifiziert sein, um spezifische Oligonukleotide zu enthalten, die eine Erfassung des Hybridisierungsproduktes erlauben. Erfassungsflächen, wie hierin beschrieben, sind einem Fachmann im Allgemeinen bekannt, und umfassen Nitrocellulose-Dipsticks (z. B. GeneComb™, BioRad, Hercules, CA, USA).

VII. Verbesserte Enzyme zur Verwendung in Invader™-gesteuerten Spaltungsreaktionen

[0314] Eine Spaltungsstruktur ist hierin als eine Struktur definiert, die durch die Wechselwirkung eines Sondenoligonukleotids und einer Zielnukleinsäure zur Ausbildung eines Doppelstranges gebildet wird, wobei die resultierende Struktur von einem Spaltungsagens, einschließlich, aber nicht ausschließlich einem Enzym, gespalten werden kann. Die Spaltungsstruktur ist weiter definiert als ein Substrat für eine spezifische Spaltung durch das Spaltungsagens im Gegensatz zu einem Nukleinsäuremolekül, das eine Substrat für eine unspezifische Spaltung durch Mittel wie beispielsweise Phosphodiesterasen ist. Beispiele einiger möglicher Spaltungsstrukturen sind in **Fig. 15** gezeigt. Wenn man Verbesserungen enzymatischer Spaltungsmittel in Betracht zieht, kann man die Wirkung der Enzyme auf eine beliebige dieser Strukturen und auf beliebige andere Strukturen in Betracht ziehen, die in die Definition einer Spaltungsstruktur fallen. Die Spaltungsstellen, die auf den Strukturen in **Fig. 15** angezeigt sind, sind nur als Beispiel gegeben. Es wird eine spezifische Spaltung an jeder Stelle innerhalb einer solchen Struktur in Betracht gezogen.

[0315] Verbesserungen in einem Enzym können eine erhöhte oder verminderte Rate der Spaltung eines oder mehrerer Strukturtypen sein. Verbesserungen können auch zu mehr oder weniger Spaltungsstellen auf einer oder mehreren der Spaltungsstrukturen führen. Bei der Entwicklung einer Bibliothek neuer strukturspezifischer Nukleasen zur Verwendung bei Nukleinsäurespaltungsverfahren können Verbesserungen viele verschiedene Ausführungsformen aufweisen, jede in Bezug auf die spezifische Substratstruktur, die in einem bestimmten Verfahren zur Anwendung kommt.

[0316] Als Beispiel kann eine Ausführungsform der Invader™-gesteuerten Spaltung der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen werden. Bei der Invader™-gesteuerten Spaltung wird die Ansammlung gespaltenen Materials durch mehrere Eigenschaften des Enzymverhaltens beeinflusst. Sehr wichtig bei der Bestimmung der Menge an Material, die während des Verlaufs einer Reaktion verarbeitet wird, ist die Umsetzungsrate oder die Anzahl an Strukturen, die von einem einzelnen Enzymmolekül in einem bestimmten Zeitraum gespalten werden können, was nicht überraschend ist. Wenn ein Enzym lange Zeit benötigt, um ein Substrat zu erkennen (z. B. wenn es mit einer suboptimalen Struktur vorliegt), oder wenn es lange Zeit benötigt, um die Spaltung auszuführen, ist die Rate der Produktansammlung niedriger als wenn diese Schritte schnell ablaufen. Wenn diese Schritte schnell sind, das Enzym sich aber dennoch an der gespaltenen Struktur „festhält" und nicht sofort mit einer anderen ungespaltenen Struktur fortfährt, wird die Rate negativ beeinflusst.

[0317] Die Enzymumsetzung (Turnover) ist nicht der einzige Weg, auf dem das Enzymverhalten die Rate der Produktansammlung negativ beeinflussen kann. Wenn das Mittel, das zur Visualisierung oder Messung von Produkt verwendet wird, für ein präzise definiertes Produkt spezifisch ist, könnten Produkte, die von dieser Definition abweichen, dem Nachweis entfliehen, und die Rate der Produktansammlung wäre daher niedriger als eigentlich der Fall. Wenn man bei der Invader™-gesteuerten Spaltung der vorliegenden Erfindung einen empfindlichen Detektor für Trinukleotide hätte, der Di- oder Tetranukleotide bzw. alle Oligonukleotide, die nicht aus 3 Resten bestehen, nicht erkennt, würde jede fehlerhafte Spaltung das Nachweissignal proportional verrin-

gern. Aus den hierin präsentierten Spaltungsdaten ist ersichtlich, dass es häufig Produkte gibt, die aus einer Spaltung von einem oder mehreren Nukleotiden entfernt von der primären Spaltungsstelle hervorgehen, obwohl es in einer Sonde in der Regel eine Stelle gibt, die für eine Spaltung bevorzugt wird. Dabei handelt es sich um Produkte, die zielabhängig sind und bei denen es sich daher um unspezifischen Hintergrund handelt. Wenn ein anschließendes Visualisierungssystem nur das Primärprodukt erkennen kann, stellen diese dennoch einen Signalverlust dar. Ein Beispiel eines solchen selektiven Visualisierungssystems ist die hierin präsentierte Ladungsumkehrungs-Anzeige, bei der das Gleichgewicht von positiven und negativen Ladungen das Verhalten der Produkte bestimmt. In einem solchen System kann das Vorhandensein eines zusätzlichen Nukleotids oder das Fehlen eines erwarteten Nukleotids bewirken, dass ein legitimes Spaltungsprodukt im letztendlichen Nachweis nicht erfasst wird, weil dieses Produkt dadurch ein falsches Ladungsgleichgewicht erhält. Es ist leicht erkennbar, dass jedes Verfahren, das den Nukleotidgehalt eines Oligonukleotids empfindlich unterscheiden kann, beispielsweise eine stringente Standardhybridisierung, Einbußen der Empfindlichkeit erleidet, wenn ein bestimmter Bruchteil des legitimen Produktes nicht für einen erfolgreichen Nachweis durch dieses Verfahren infrage kommt.

[0318] Diese Diskussionen deuten auf zwei sehr wünschenswerte Merkmale eines beliebigen Enzyms hin, das bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung zu verwenden ist. Erstens, je schneller das Enzym eine vollständige Spaltungsreaktion, einschließlich Erkennung, Spaltung und Freisetzung, durchführt, desto mehr Signal kann möglicherweise bei der Invader™-gesteuerten Spaltung erzeugt werden. Zweitens, je erfolgreicher ein Enzym dabei ist, sich auf eine einzelne Spaltungsstelle innerhalb einer Struktur zu konzentrieren, desto mehr von dem Spaltungsprodukt kann in einer selektiven Anzeige erfolgreich nachgewiesen werden.

[0319] Die oben genannte Begründung, um Verbesserungen der bei einer Invader™-gesteuerten Spaltung zu verwendenden Enzyme vorzunehmen, soll als Beispiel einer Richtung dienen, in der Verbesserungen angestrebt werden könnten, soll aber weder die Art noch die Anwendungen verbesserter Enzymaktivitäten einschränken. Als eine andere Richtung einer Aktivitätsveränderungen, die geeigneterweise als Verbesserung in Betracht gezogen werden kann, können die DNAP-assoziierten 5'-Nukleasen als Beispiel dienen. Bei der Herstellung einiger der hierin beschriebenen polymerasedefizienten 5'-Nukleasen stellte sich heraus, dass solche, die durch Deletion wesentlichen Anteile der Polymerasedomäne hergestellt wurden, wie in **Fig. 4** dargestellt, Aktivitäten annahmen, die schwach oder bei den Elternproteinen nicht vorhanden waren. Diese Aktivitäten umfassten die Fähigkeit, die nicht gegabelte Struktur, gezeigt in **Fig.** 15D, zu spalten, eine stark erhöhte Fähigkeit, Nukleotide exonukleolytisch von den 5'-Enden von Doppelsträngen zu entfernen und eine naszierende Fähigkeit, zirkuläre Moleküle zu spalten, ohne ein günstiges freies 5'-Ende zu schaffen.

[0320] Außer den von DNA-Polymerasen abstammenden 5'-Nukleasen zieht die vorliegende Erfindung auch die Verwendung strukturspezifischer Nukleasen in Betracht, die nicht von DNA-Polymerasen abgeleitet sind. Beispielsweise wurde eine Klasse von eukaryontischen und archaebakteriellen Endonukleasen identifiziert, die eine ähnliche Substratspezifität für 5'-Nukleasen von DNA-Polymerasen vom Typ Pol I aufweisen. Dabei handelt es sich um die Proteine FEN1 (Flap Endonuklease), RAD2 und XPG (Xeroderma Pigmentosa-Komplementgruppe G). Diese Proteine sind an der DNA-Reparatur beteiligt, und es ist gezeigt worden, dass sie die Spaltung von Strukturen begünstigen, die einem 5'-Arm ähnlich sind, der von einem Verlängerungsprimer während der Polymerisation verdrängt wurde, ähnlich wie bei dem in **Fig.** 15B gezeigten Modell. Ähnliche DNA-Reparaturenzyme sind aus einzelnen Zellen und höheren Eukaryonten und aus Archaebakterien isoliert worden, und es gibt verwandte DNA-Reparaturproteine in Eubakterien. Ähnliche 5'-Nukleasen sind mit Bakteriophagen wie T5 und T7 assoziiert worden.

[0321] Kürzlich sind die 3-dimensionalen Strukturen der DNAPTaq-5'-Exonuklease und der 5'-Exonuklease des Phagen T5 (**Fig. 58**) durch Röntgenbeugung bestimmt worden (Kim et al., Nature 376: 612 [1995]; und Ceska et al., Nature 382: 90 [1995]). Die beiden Enzyme haben sehr ähnliche 3-dimensionale Strukturen, trotz beschränkter Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz. Das außergewöhnlichste Merkmal der Struktur der 5'-Exonuklease des Phagen T5 ist das Vorhandensein einer dreieckigen Öffnung, die vom aktiven Zentrum des Proteins und zwei Alphahelices gebildet wird (**Fig. 58**). Derselbe Bereich der DNAPTaq ist in der Kristallstruktur ungeordnet, was darauf hindeutet, dass dieser Bereich flexibel ist, und ist daher nicht in der veröffentlichen 3-dimensionalen Struktur gezeigt. Die 5'-Nukleasedomäne von DNAPTaq hat aber wahrscheinlich dieselbe Struktur, wenn man von ihrer allgemeinen 3-dimensionalen Ähnlichkeit mit der 5'-Exonuklease des Phagen T5 ausgeht, und davon, dass die Aminosäuren in dem ungeordneten Bereich des DNAPTaq-Proteins diejenigen sind, die mit der Ausbildung einer Alphahelix assoziiert sind. Das Vorhandensein einer solchen Öffnung oder Vertiefung in der 5'-Nukleasedomäne von DNAPTaq wurde ausgehend von ihrer Substratspezifität vorhergesagt (Lyamichev et al., oben).

[0322] Es wurde vorgeschlagen, dass der 5'-Arm einer Spaltungsstruktur durch den oben beschriebene Helixbogen einfädeln muss, um die Struktur für die Spaltung korrekt zu positionieren (Ceska et al., oben). Eine der Modifikationen der hierin beschriebenen 5'-Nukleasen öffnete den Helixbogenanteil des Proteins, um eine verbesserte Spaltung von Strukturen zu ermöglichen, die schlecht oder gar nicht geschnitten wurden (z. B. Strukturen auf zirkulären DNA-Zielen, die ein solches Einfädeln eines 5'-Arms ausschließen würden). Das Genkonstrukt, das als Modell zur Testung dieses Ansatzes ausgewählt wurde, war das als Cleavase® BN bezeichnete, das aus DNAPTaq abgeleitet ist, aber keine Polymerasedomäne enthält (Beispiel 2). Es umfasst die gesamte 5'-Nukleasedomäne von DNAPTaq und sollte daher weitgehend der Struktur der 5'-Exonuklease von T5 entsprechen. Diese 5'-Nuklease wurde gewählt, um das Prinzip einer solchen physikalischen Modifikation auf Proteine dieser Art zu zeigen. Die Bogenöffnungs-Modifikation der vorliegenden Erfindung soll nicht auf die 5'-Nukleasedomänen von DNA-Polymerasen beschränkt sein und wird für die Anwendung bei jeder strukturspezifischen Nuklease in Betracht gezogen, welche eine Öffnung als eine Einschränkung der Spaltungsaktivität aufweist. Die vorliegende Erfindung zieht die Insertion einer Thrombinspaltungsstelle in den Helixbogen von DNAPs in Betracht, die von der Gattung Thermus abgeleitet sind, sowie von 5'-Nukleasen, die aus DNAPs abgeleitet sind, welche von der Gattung Thermus abgeleitet sind. Das spezifische, hierin gezeigte Beispiel bei dem die Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease verwendet wird, veranschaulicht das Konzept des Öffnens des Helixbogens, der sich in einer Nukleasedomäne befindet. Da die Aminosäuresequenz von DNAPs, die von der Gattung Thermus abgeleitet sind, hoch konserviert ist, ermöglichen die Lehren der vorliegenden Erfindung das Einsetzen einer Thrombinstelle in den Helixbogen, der in diesen DNAPs und den 5'-Nukleasen, die von diesen DNAPs abgeleitet sind, vorhanden ist.

[0323] Das Öffnen des Helixbogens wurde durch Einsetzen einer Proteasestelle in den Bogen erreicht. Dies ermöglichte einen posttranslationalen Verdau des exprimierten Proteins mit der geeigneten Protease, um den Bogen an seiner Spitze zu öffnen. Proteasen dieses Typs erkennen kurze Abfolgen einer spezifischen Aminosäuresequenz. Solche Proteasen umfassen Thrombin und Faktor Xa. Spaltung eines Proteins mit einer solchen Protease hängt vom Vorhandensein dieser Stelle in der Aminosäuresequenz des Proteins ab und von der Zugänglichkeit dieser Stelle in dem gefalteten intakten Protein. Selbst mit einer Kristallstruktur kann es schwierig sein, die Anfälligkeit eines bestimmten Bereiches eines Proteins für Proteasespaltung vorherzusagen. Ohne Kristallstruktur muss sie empirisch bestimmt werden.

[0324] Bei der Auswahl einer Protease für eine positionsspezifische Spaltung eines Proteins, das modifiziert worden ist, um eine Proteasespaltungsstelle zu enthalten, besteht ein erster Schritt darin, das unmodifizierte Protein an alternativen Stellen auf Spaltung zu testen. Beispielsweise wurden DNAPTaq und Cleavase® BN-Nuklease beide unter Proteasespaltungsbedingungen mit den Proteasen Faktor Xa und Thrombin inkubiert. Beide Nukleasen wurden innerhalb der 5'-Nukleasedomäne durch Faktor Xa geschnitten, aber mit großen Mengen von Thrombin wurde keine der Nukleasen verdaut. Thrombin wurde daher für erste Tests zur Öffnung des Bogens des Cleavase® BN-Enzyms ausgewählt.

[0325] Bei den hierin beschriebenen Protease/Cleavase®-Modifikationen spaltete die Protease Faktor Xa stark an einer nicht annehmbaren Position in dem unmodifizierten Nukleaseprotein in einem Bereich, der wahrscheinlich die Aktivität des Endproduktes beeinträchtigen würde. Andere unmodifizierte Nukleasen, die hierin in Betracht gezogen werden, sind möglicherweise nicht für Faktor Xa anfällig, aber vielleicht für Thrombin oder andere solche Proteasen. Alternativ könnten sie für diese oder andere solcher Proteasen an Stellen anfällig sein, die für die Funktion der zu modifizierenden Nuklease unwesentlich sind. Wird ein Protein zur Modifikation durch Hinzufügen einer Proteasespaltungsstelle in Betracht gezogen, sollte das unmodifizierte Protein mit den in Betracht kommenden Proteasen getestet werden um zu bestimmen, welche Proteasen ein annehmbares Maß an Spaltung in anderen Bereichen ergeben.

[0326] Beim Arbeiten mit dem klonierten Segment von DNAPTaq, von dem aus das Cleavase® BN-Protein exprimiert wird, wurden Nukleotide, die eine Thrombinspaltungsstelle codieren, im Leseraster in der Nähe der Sequenz eingesetzt, die Aminosäure 90 des Nukleasegens codiert. Durch Bezugnahme auf die 3-dimensionale Struktur von DNAPTaq und die Struktur der 5'-Exonuklease von T5 wurde festgestellt, dass diese Position an oder in der Nähe der Spitze des Helixbogens liegt. Die codierte Aminosäuresequenz LVPRGS wurde durch positionsspezifische Mutagenese des Nukleasegens in die Spitze des Helixbogens eingesetzt. Das Prolin (P) in der Thrombinspaltungsstelle wurde positioniert, um ein Prolin zu ersetzen, das normalerweise an dieser Position in der Cleavase® BN vorhanden ist, da es sich bei Prolin um eine Aminosäure handelt, die Alphahelices unterbricht und die für die 3-dimensionale Struktur dieses Bogens wichtig sein könnte. Dieses Konstrukt wurde exprimiert, gereinigt und mit Thrombin verdaut. Das verdaute Enzym wurde hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Spaltung einer Zielnukleinsäure, genomischer DNA des Bakteriophagen M13, getestet, die keine freien 5'-Enden zur Erleichterung der Spaltung durch das Einfädelungsmodell bereit stellt.

[0327] Der Helixbogen in dieser Nuklease wurde zwar durch Proteasespaltung geöffnet, aber es wird in Betracht gezogen, dass eine Reihe anderer Techniken angewandt werden können, um zum selben Ergebnis zu kommen. Beispielsweise könnte die Nukleotidsequenz derart neu angeordnet werden, dass das resultierenden Protein bei Expression so konfiguriert werden würde, dass die Spitze des Helixbogens (Aminosäure 90) am Aminoterminus des Proteins zu liegen kommt, die natürlichen Carboxyl- und Aminotermini der Proteinsequenz verbunden wären und der neue Carboxylterminus sich bei der natürlichen Aminosäure 89 befinden würde. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass keine Fremdsequenzen eingeführt werden und es sich bei dem Enzym um eine einzelne Aminosäurekette handelt, das daher stabiler ist als die gespaltene 5'-Nuklease. In der Kristallstruktur von DNAPTaq liegen die Amino- und Carboxytermini der 5'-Nukleasedomäne nahe beieinander, was darauf hindeutet, dass die Enden direkt verbunden sind, ohne Verwendung einer flexiblen Linkerpeptidsequenz, wie es bisweilen erforderlich ist. Eine solche Neuordnung des Gens mit anschließendem Klonieren und anschließender Expression ließe sich durch PCR-Standardrekombinations- und -klonierungtechniken erreichen, die einem Fachmann bekannt sind.

[0328] Die vorliegende Erfindung zieht auch die Verwendung von Nukleasen in Betracht, die aus einem Organismus isoliert sind, welcher unter verschiedenen Bedingungen wächst. Die Gene für die Enzymklasse FEN-1/XPG kommen in Organismen von Bakteriophagen bis zum Menschen bis zu den Extremophilen des Königreiches der Archaea vor. Für Verfahren, bei denen hohe Temperatur verwendet werden soll, wird in Betracht gezogen, dass aus Extremophilen isolierte Enzyme die Thermostabilität aufweisen könnten, die für ein solches Verfahren benötigt wird. Für Verfahren, bei denen es wünschenswert ist, dass die Enzymaktivität bei gemäßigten Temperaturen einen Höchstwert erreicht, oder bei denen es wünschenswert sein könnte, das Enzym durch erhöhte Temperatur zu zerstören, könnten Enzyme aus Organismen, die gemäßigtere Temperaturen für das Wachstum vorziehen, von besonderem Wert sein.

[0329] Eine Anordnung einer Sammlung von FEN-1-Proteinsequenzen von Anderen ist in **Fig. 59A**–E gezeigt (SEQ ID Nr.: 135–145). Aus dieser Anordnung ist ersichtlich, dass es einige Bereiche der Konservierung in dieser Proteinklasse gibt, was darauf hinweist, dass sie in Bezug auf Funktion und gegebenenfalls in Bezug auf die Struktur verwandt sind. Bereiche einer Ähnlichkeit auf der Ebene der Aminosäuresequenz lassen sich verwenden, um Primer für eine In-vitro-Amplifizierung (PCR) durch ein Verfahren der Rücktranslation der Aminosäuresequenz in mögliche Nukleinsäuresequenzen zu entwerfen, wobei anschließend Primer mit den wenigsten möglichen Variationen innerhalb der Sequenzen ausgewählt werden. Diese können in einer PCR mit niedriger Stringenz eingesetzt werden, um nach verwandten DNA-Sequenzen zu suchen. Dieser Ansatz erlaubt die Amplifizierung von DNA, die eine FEN-1-Nuklease codiert, ohne vorher die eigentliche DNA-Sequenz zu kennen.

[0330] Aus dieser Anordnung ist auch ersichtlich, dass es Bereiche in den Sequenzen gibt, die nicht vollständig konserviert sind. Der Grad der beobachteten Unterschiede deutet an, dass die Proteine subtile oder distinkte Unterschiede im Hinblick auf Substratspezifität aufweisen könnten. In anderen Worten könnten sie ein unterschiedliches Maß an Spaltungsaktivität bei den Spaltungsstrukturen der vorliegenden Erfindung aufweisen. Wenn eine bestimmte Struktur mit einer höheren Rate als die anderen gespalten wird, wird diese als ein bevorzugtes Substrat bezeichnet, während eine Struktur, die langsam gespalten wird, als weniger bevorzugtes Substrat gilt. Die Bezeichnung von bevorzugten oder weniger bevorzugten Substraten in diesem Zusammenhang soll die vorliegende Erfindung nicht einschränken. Es wird in Betracht gezogen, dass einige Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung die Wechselwirkungen eines Enzyms mit einem weniger bevorzugten Substrat nutzen. Kandidatenenzyme werden mithilfe der unten beschriebenen Verfahren hinsichtlich der Eignung in den Spaltungsverfahren der vorliegenden Erfindung getestet.

1. Strukturspezifisches Nukleaseverfahren

[0331] Die Testung von Kandidatennukleasen auf strukturspezifische Aktivitäten in diesen Verfahren erfolgt auf überwiegend dieselbe Weise wie zur Testung modifizierter DNA-Polymerasen in Beispiel 2 beschrieben, aber unter Verwendung einer anderen Bibliothek von Strukturmodellen. Außer der Bestimmung der Enzymleistung bei der primerunabhängigen und primergesteuerten Spaltung wird ein Satz von synthetischen Haarnadeln verwendet, um die Länge des Doppelstrangs stromabwärts von der von dem Enzym bevorzugten Spaltungsstelle zu untersuchen.

[0332] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten 5'-Nukleasen FEN-1 und XPG müssen hinsichtlich der Aktivität in den Verfahren, bei denen sie verwendet werden sollen, getestet werden, einschließlich, aber nicht ausschließlich bei dem Invader™-gesteuerten Spaltungsnachweisverfahren der vorliegenden Erfindung und dem CFLP®-Verfahren der Charakterisierung von Nukleinsäuren (das CFLP®-Verfahren ist beschrieben in der

ebenfalls angemeldeten Anmeldung mit der Seriennr. 08/337,164, 08/402,601, 08/484,956 und 08/520,946). Das Invader™-Verfahren verwendet eine Spaltungsart, die als „primergesteuert" oder „primerabhängig" bezeichnet wird, um den Einfluss eines Oligonukleotids, das stromaufwärts von der Spaltungsstelle an die Zielnukleinsäure hybridisiert, wiederzugeben. Im Gegensatz dazu beruht die CFLP®-Reaktion auf der Spaltung einer Faltstruktur oder von Haarnadeln innerhalb der Zielnukleinsäure in Abwesenheit eines hybridisierenden Oligonukleotids. Die hierin beschriebenen Tests sollen nicht auf die Analyse von Nukleasen mit einer bestimmten Spaltungsstelle oder auf die Art der Erkennung von Substratstrukturen beschränkt sein. Es wird in Betracht gezogen, dass Enzyme als 3'-Nukleasen beschrieben werden können, die das 3'-Ende als Bezugspunkt zur Erkennung von Strukturen verwenden oder einen ganz anderen Erkennungsmodus aufweisen. Darüber hinaus soll der Begriff 5'-Nukleasen die Erwägung nicht auf Enzyme beschränken, welche die Spaltungsstrukturen an einer bestimmten Stelle spalten. Er bezieht sich auf eine allgemeine Klasse von Enzymen, die einen gewissen Bezug oder Zugang zu einem 5'-Ende brauchen, um die Spaltung einer Struktur zu bewirken.

[0333] Es wurde ein Satz von Spaltungsstrukturmodellen geschaffen, um die Bestimmung der Spaltungsfähigkeit unbekannter Enzyme bei solchen Strukturen zu ermöglichen. Jedes Strukturmodell besteht aus einem oder mehreren synthetischen Oligonukleotiden, die durch DNA-Synthesestandardchemie hergestellt werden. Beispiele solcher synthetischer Substratstrukturmodelle sind in **Fig. 26** und **Fig. 60** gezeigt. Diese sollen nur die allgemeine Faltkonfiguration darstellen, die bei solchen Teststrukturen wünschenswert ist. Obwohl in den Figuren eine Sequenz gezeigt ist, die eine solche Struktur annehmen würde, gibt es zahlreiche andere Sequenzanordnungen von Nukleotiden, bei denen davon auszugehen ist, dass sie sich auf diese Weise falten. Die wesentlichen Merkmale, die in einen Satz von Oligonukleotiden hinein entworfen werden müssen, um die hierin beschriebenen Tests durchzuführen, sind das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines ausreichend langen 3'-Armes, damit die Hybridisierung einer zusätzlichen Nukleinsäure zur Testung der Spaltung in einem „primergesteuerten" Modus möglich ist, und die Länge des Doppelstrangbereiches. In dem in **Fig. 60** dargestellten Satz ist die Doppelstranglänge der Strukturen S-33 und 11-8-0 12 bzw. 8 Basenpaare. Dieser Unterschied der Länge der Testmoleküle erleichtert den Nachweis der Unterscheidung zwischen längeren und kürzeren Doppelsträngen durch die Kandidatennukleasen. Es können Ergänzungen dieser Reihe verwendet werden, welche den Bereich der den Enzymen präsentierten Doppelstrangmoleküle, sowohl kürzere als auch längere, erweitern. Die Verwendung einer stabilisierenden DNA-Tetraschleife (Antao et al., Nucl. Acids Res., 19: 5901 [1991]) oder -Dreifachschleife (Hiraro et al., Nuc. Acids Res., 22: 576 [1994]) am geschlossenen Ende des Doppelstranges trägt dazu bei, die Ausbildung der erwarteten Struktur durch das Oligonukleotid sicherzustellen.

[0334] Das Substratmodell zum Testen einer primergesteuerten Spaltung, die „S-60-Haarnadel" (SEQ ID Nr.: 40) ist in Beispiel 11 beschrieben. Bei Fehler eines Primers wird diese Haarnadel für gewöhnlich gespalten, um 5'-Arm-Fragmente mit einer Länge von 18 und 19 Nukleotiden frei zu setzen. Ein Oligonukleotid mit der Bezeichnung P-14 (5'-CGAGAGACCACGCT-3'; SEQ ID Nr.: 108), dass sich bis zur Basis des Doppelstranges verläuft, wenn es mit dem 3'-Arm der S-60-Haarnadel hybridisiert, ergibt Spaltungsprodukte derselben Größe, aber bei einer höheren Spaltungsrate.

[0335] Zur Testung der invasiven Spaltung wird ein anderer Primer verwendet, der als P-15 bezeichnet wird (5'-CGAGAGACCACGCTG-3'; SEQ ID Nr.: 30). Bei einer erfolgreichen invasiven Spaltung verlagert das Vorhandensein dieses Primers die Spaltungsstelle von S-60 in den Doppelstrangbereich, wobei in der Regel Produkte mit einer Länge von 21 und 22 Nukleotiden freigesetzt werden.

[0336] Die S-60-Haarnadel kann auch verwendet werden, um die Effekte von Modifikationen der Spaltungsstruktur auf entweder die primergesteuerte oder die invasive Spaltung zu testen. Solche Modifikationen umfassen, jedoch nicht ausschließlich, die Verwendung von Fehlpaarungen oder Basenanalogen in dem Haarnadeldoppelstrang an einer, einigen oder allen Positionen, ähnliche Unterbrechungen oder Modifikationen in dem Doppelstrang zwischen dem Primer und dem 3'-Arm von S-60, chemische oder andere Modifikationen an einem Ende oder an beiden Enden der Primersequenz oder Anbringung von Einheiten an den 5'-Arm der Struktur oder andere Modifikationen am 5'-Arm der Struktur. Bei allen Analysen, bei denen die hierin beschriebene S-60-Haarnadel oder eine ähnliche Haarnadel verwendet werden, kann die Aktivität mit und ohne Primer unter Verwendung derselben Haarnadelstruktur verglichen werden.

[0337] Die Zusammenstellung dieser Testreaktionen, einschließlich geeigneter Mengen von Haarnadel, Primer und Nukleasekandidaten sind in Beispiel 2 beschrieben. Wie darin erwähnt, ist das Vorhandensein von Spaltungsprodukten durch das Vorhandensein von Molekülen angezeigt, die bei einem niedrigeren Molekulargewicht wandern als die ungespaltene Teststruktur. Wenn die Umkehrung der Ladung eines Markers verwendet wird, tragen die Produkte eine andere Nettoladung als das ungespaltene Material. Jedes dieser Spaltungs-

produkte zeigt an, dass die Kandidatennuklease die gewünschte strukturspezifische Nukleaseaktivität aufweist. Mit „gewünschte strukturspezifische Nukleaseaktivität" ist nur gemeint, dass die Kandidatennuklease eines oder mehr Testmoleküle spaltet. Es ist nicht notwendig, dass die Kandidatennuklease mit einer bestimmten Rate oder an einer bestimmten Spaltungsstelle spaltet, um als erfolgreiche Spaltung zu gelten.

VIII. Signalverstärkung durch Vervollständigung der Bindungsstelle eines aktivierten Proteins

[0338] Neben der oben beschriebenen DNA-Polymerase-Tailingreaktion zieht die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der Produkte der invasiven Spaltungsreaktion zur Ausbildung aktivierter Proteinbindungsstellen in Betracht, beispielsweise RNA-Polymerase-Promotor-Doppelstränge, wodurch die Wechselwirkung der vervollständigten Stelle als Anzeiger für das Vorhandensein der Nukleinsäure verwendet werden, welche das Ziel der invasiven Spaltungsreaktion ist. Wenn beispielsweise ein RNA-Polymerase-Promotor-Doppelstrang durch Vervollständigung durch die Hybridisierung des Oligonukleotidproduktes der invasiven Spaltungsreaktion aktiviert wird (d. h. er wird über dem Anteil des für die Polymerasebindung erforderlichen Promotorbereiches doppelsträngig gemacht), kann die Synthese von RNA als ein solcher Anzeiger verwendet werden.

[0339] Es ist nicht beabsichtigt, dass die Transkriptionsreaktion der vorliegenden Erfindung auf die Verwendung einer bestimmten RNA-Polymerase oder eines bestimmten RNA-Polymerase-Promotorbereichs beschränkt ist. Promotorsequenzen sind für mehrere Bakteriophagen gut charakterisiert, einschließlich für Bakteriophage SP6, T7 und T3. Darüber hinaus sind Promotorsequenzen für eine Reihe von eukaryontischen und prokaryontischen RNA-Polymerasen gut charakterisiert. In einer bevorzugten Ausführungsform ermöglicht der verwendete Promotor die Transkription durch eine Bakteriophagen-RNA-Polymerase. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ermöglicht der verwendet Promotor die Transkription durch T7-RNA-Polymerase. Aus dem Stand der Technik sind Mittel zum Durchführen einer Transkription in vitro gut bekannt, und es sind kommerzielle Kits erhältlich, um eine Transkription mit eukaryontischen, prokaryontischen RNA-Polymerasen und Bakteriophagen-RNA-Polymerasen durchzuführen (z. B. von Promega).

[0340] Die Proteinbindungsbereiche der vorliegenden Erfindung sind nicht auf die oben beschriebenen Bakteriophagen-RNA-Polymerase-Promotoren beschränkt. Andere in Betracht gezogene Promotorsequenzen sind solche von Prokaryonten und Eukaryonten. Beispielsweise werden viele Stämme von Bakterien und Pilzen für die Expression heterologer Proteine verwendet. Die minimalen Promotoren, die für eine Transkription durch die RNA-Polymerasen von Organismen wie Hefen und anderen Pilzen, Eubakterien, Nematoden und kultivierten Säugerzellen erforderlich sind, sind in der Literatur und in den Katalogen kommerzieller Anbieter von DNA-Vektoren für die Expression von Fremdproteinen in diesen Organismen gut beschrieben.

[0341] Die Bindungsstellen für andere Arten von Nukleinsäure (z. B. DNA)-Bindungsproteinen werden für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen. Beispielsweise üben Proteine, die an der Genregulation beteiligt sind, ihre Wirkung durch Bindung an die DNA in der Nähe des Promotors aus, von dem aus die RNA dieses Gens transkribiert wird. Der lac-Operator von E. coli ist ein Beispiel eines besonders gut charakterisierten und allgemein verwendeten Genregulationssystems, bei dem das lac-Repressorprotein an spezifische Sequenzen bindet, welche den Promotor für die Gene, die unter der Kontrolle des Repressors stehen, überlappen und damit blockieren (Jacob and Monad, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biol. XXVI: 193–211 [1961]). Es sind in Bakterien viele ähnliche Systeme beschrieben worden, einschließlich der regulatorischen Systeme trp und AraC. In Anbetracht der großen Menge an Information, die über bakterielle Promotoren zur Verfügung steht, können die unten beschriebenen Schritte für den Entwurf geeigneter partieller Promotoren für die Bakteriophagen-RNA-Polymerasen einfach an den Entwurf von Nachweissystemen auf der Basis dieser anderen Promotoren angepasst werden.

[0342] Wie oben erwähnt, stehen viele der bakteriellen Promotoren unter der Kontrolle eines Repressors oder eines anderen regulatorischen Proteins. Es soll im Umfang der vorliegenden Erfindung liegen, die Schaffung zusammengesetzter Bindungsstellen für diese regulatorischen Proteine durch Bereitstellen eines Nukleinsäurefragmentes (z. B. ein Nicht-Zielspaltungsprodukt, das in einer invasiven Spaltungsreaktion erzeugt wird) einzuschließen. Die Bindung des regulatorischen Proteins an die vervollständigte Proteinbindungsregion (z. B. die zusammengesetzte Bindungsregion) lässt sich durch ein beliebiges aus einer Reihe von Mitteln bestimmen, einschließlich durch elektrophoretische Migration entweder des Proteins oder des DNA-Fragments oder durch eine Konformationsänderung des Proteins oder der DNA bei der Bindung. Darüber hinaus kann die Transkription von einem stromabwärts gelegenen Promotor hinsichtlich einer Regulierung nach oben oder unten als Ergebnis der Bindung des regulatorischen Proteins an den vervollständigten Proteinbindungsbereich überwacht werden.

[0343] Es hat sich herausgestellt, dass, außer den oben beschriebenen bakteriellen Systemen, viele Gene in eukaryontischen Systemen unter der Kontrolle spezifischer Proteine stehen, die an bestimmte Bereiche von Doppelstrang-DNA binden. Beispiele umfassen, aber nicht ausschließlich, die Proteine OCT-1, OCT-2 und AP-4 bei Säugern und die Proteine GAL4 und GCN4 bei Hefen. Solche regulatorischen Proteine weisen in der Regel ein Strukturmotiv auf, das mit der Bindung an doppelsträngige Nukleinsäuren verknüpft ist, beispielsweise Helix-Kehre-Helix (Helix-Turn-Helix), einen Zinkfinger oder einen Leucin-Zipper [eine Übersicht findet sich in Molecular und Cellular Biology, Wolfe (Hrsg.), Wadsworth Publishing Co., Belmont, CA, S. 694–715 [1993]).

[0344] Aus Gründen der Einfachheit bezieht sich die hier beschriebene Testreaktion auf die T7-RNA-Polymerase und deren Promotor. Die Erfindung soll nicht auf die Verwendung dieser RNA-Polymerase beschränkt sein, und ein Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie wäre in der Lage, diesen beschriebenen Test leicht an die Untersuchung eines bzw. einer Beliebigen der oben beschriebenen DNA-Bindungsproteine, RNA-Polymerasen und deren Bindung oder Promotorstellen anzupassen.

[0345] Aus dem Stand der Technik ist bekannt, dass durch die Hybridisierung zweier Oligonukleotide, von denen jedes den oberen oder unteren Strang der Promotorsequenz aufweist, derart aktive T7-Promotoren gebildet werden können, dass ein vollständiger Doppelstrangpromotor ohne Einzelstrangbruch ausgebildet wird (Milligan et al., Nucl. Acids Res., 15: 21, 8783–8798 (1987)]. Die vorliegende Erfindung zeigt, dass eine Möglichkeit, den Beginn der Transkription von den Produkten einer invasiven Spaltungsreaktion abhängig zu machen, ist, die Sonde für die Spaltungsreaktion derart zu entwerfen, dass ein Anteil eines RNA-Polymerasepromotors als Produkt frei gesetzt wird. Das verbleibende DNA-Stück bzw. die verbleibenden DNA-Stücke, die benötigt werden, um einen Promotor-Doppelstrang zusammenzusetzen, können entweder als Elemente in dem Reaktionsgemisch bereit gestellt werden oder sie können durch andere invasive Spaltungsereignisse produziert werden. Wenn die Oligonukleotidstücke entworfen sind, um geeignete Bereiche von Komplementarität zu umfassen, können sie Basenpaarung eingehen, um einen vollständigen Promotor-Doppelstrang zu bilden, der aus drei oder mehreren Nukleinsäurefragmenten zusammengesetzt ist, wie in **Fig. 88B** gezeigt. Ein auf diese Weise zusammengesetzter Promotor hat Einzelstrangbrüche im Gerüst eines Stranges oder beider Stränge. In einer Ausführungsform können diese Einzelstrangbrüche durch Verwendung eines DNA-Ligaseenzyms kovalent geschlossen werden. In einer bevorzugten Ausführungsform sind diese Einzelstrangbrüche derart positioniert, dass eine Transkription ohne Ligation ablaufen kann. Bei der Auswahl der Stelle eines Einzelstrangbruches, der durch Zusammensetzen des partiellen Promotorfragments erzeugt wird, sollte wenigstens ein Einzelstrangbruch innerhalb des Promotorbereichs liegen, der von der zu verwendenden RNA-Polymerase erkannt wird. Wird ein Bakteriophagenpromotor verwendet, sollte ein Einzelstrangbruch zwischen Nukleotid –17 und –1 liegen, gemessen ab der Stelle des Beginns der Transkription bei +1. In einer bevorzugten Ausführungsform befindet sich ein Einzelstrangbruch zwischen Nukleotid –13 und –8. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform befindet sich ein Einzelstrangbruch zwischen Nukleotid –12 und –10 auf dem Nicht-Zielstrang des Bakteriophagenpromotors.

[0346] Sollen Einzelstrangbrüche unrepariert bleiben (d. h. nicht mit einer DNA-Ligase kovalent geschlossen werden), ist es wichtig, den Effekt der Stelle des Einzelstrangbruchs auf den Grad der Transkription ausgehend von dem zusammengesetzten Promotor zu bestimmen. Ein einfacher Test besteht darin, das Oligonukleotid, das die separaten Anteile des Promotors umfasst, mit einem Oligonukleotid zu kombinieren, das einen gesamten Strang des zusammenzusetzenden Promotors umfasst, wodurch ein Doppelstrang-Promotors mit einem Einzelstrangbruch in einem Strang gebildet wird. Wenn sich der Einzelstrangbruch im oberen Strang bzw. im Nicht-Vorlagenstrang des Promotors befindet, umfasst das Oligonukleotid, das den vollständigen Promotor aufweist, zusätzliche Nicht-Promotorsequenzen an seinem 5'-Ende, um als eine Vorlage zu dienen, die bei der Transkription kopiert wird. Diese Anordnung ist in **Fig. 88B** gezeigt. Befindet sich der Einzelstrangbruch im unteren Strang bzw. im Vorlagenstrang des Promotors, umfasst das partielle Promotoroligonukleotid, das die +1-Position, die Transkriptionsstartstelle, abdeckt, die zusätzliche Vorlagensequenz. Diese Anordnung ist in **Fig. 95A**–D gezeigt (diese Figur zeigt mehrere verschiedene Ausführungsformen, bei denen eine geschnittene Sonde oder ein Nicht-Ziel-Spaltungsprodukt verwendet wird, um einen zusammengesetzten Promotor zu bilden, der einen oder mehrere Einzelstrangbrüche im Vorlagenstrang enthält). In jedem Fall werden die separaten Oligonukleotide kombiniert, um den vollständigen Promotor zu bilden, und die Zusammensetzung wird bei einer Transkriptionsreaktion zur Erzeugung von RNA verwendet.

[0347] Zur Messung des Effektes des Einzelstrangbruches wird durch Hybridisierung der beiden Oligonukleotide, die jeweils einen Strang des Promotors in voller Länge aufweisen, ein im Wesentlichen identisches Promotorfragment erzeugt, um eine Version desselben Promotors ohne Einzelstrangbruch zu schaffen. Diese beiden Molekülanordnungen werden in parallelen Transkriptionsreaktionen getestet, und die Menge der erwarteten RNA, die in jeder Reaktion produziert wird, wird sowohl im Hinblick auf Größe als auch im Hinblick auf Aus-

beute gemessen. Ein bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung der Größe der RNA ist durch Elektrophorese mit anschließender Visualisierung. Wenn ein markiertes Nukleotid (z. B. ^{32}P-GTP oder Fluoreszein-UTP) bei der Transkription verwendet wird, kann die RNA durch Autoradiographie, Fluoreszenzbildgebung oder durch Übertragung auf eine Trägermembran mit anschließendem Nachweis (z. B. durch Antikörper oder Sondenhybridisierung) nachgewiesen und quantifiziert werden. Wird alternativ nicht markierte RNA produziert, können die Mengen durch andere aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren bestimmt werden, beispielsweise durch Spektrophotometrie oder durch Elektrophorese mit anschließendem Färben und Vergleich mit bekannten Standards.

[0348] Wenn die Größe der RNA von der Vorlagensequenz vorhergesagt wird oder wenn sie der von dem Kontrollpromotor Produzierten entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass die Transkription an derselben Stelle im Komplex begonnen wurde und dass im Wesentlichen dasselbe RNA-Produkt produziert wurde. Wenn das Produkt viel kürzer ist, beginnt die Transkription entweder an einer internen Stelle oder wird vorzeitig abgebrochen (Schenborn and Mierendorf, Nucl. Acids Res., 13: 17] 6223 [1985]; und Milligan et al., oben.). Dies zeigt zwar nicht an, dass die getestete Anordnung für das Verfahren gänzlich ungeeignet ist, aber die partiellen Transkripte verringern die Gesamtmenge an erzeugter RNA, was möglicherweise das Testsignal beeinträchtigen könnte, und solche Produkte würden eine weitere Charakterisierung (z. B. Fingerprinting oder Sequenzierung) erfordern, um den Nukleotidgehalt des Produktes zu identifizieren. Es ist bevorzugt, dass die Größe der hergestellten RNA der Größe der RNA entspricht, die in der Kontrollreaktion produziert wird.

[0349] Die Ausbeute der Reaktion wird ebenfalls untersucht. Es ist nicht erforderlich, dass das Maß der Transkription dem der Kontrollreaktion entspricht. In manchen Fällen (siehe Bsp. 41, unten) kann der Promotor mit Einzelstrangbruch eine erhöhte Transkriptionsrate aufweisen, während die Transkription bei anderen Anordnungen verringert sein kann (relativ zu der Rate der Promotoranordnung ohne Einzelstrangbruch). Es ist lediglich erforderlich, dass die Menge an Produkt innerhalb der Nachweisgrenzen des mit dem Testpromotor zu verwendenden Verfahrens liegt.

[0350] Es ist dokumentiert, dass Transkription von einem Bakteriophagen-Promotor 200 bis 1000 Kopien jeder Transkriptionsvorlage (Vorlage plus aktiver Promotor) in einer Reaktion produzieren kann. Dieses Maß an Transkription ist in der vorliegenden Erfindung nicht erforderlich. Reaktionen, bei denen für jede Vorlage eine RNA produziert wird, werden ebenfalls in Betracht gezogen.

[0351] Der oben beschriebene Test ermöglicht, dass ein Promotor mit einem Einzelstrangbruch an einer beliebigen Position hinsichtlich seiner Eignung in diesem Verfahren beurteilt wird. Es ist eine Aufgabe dieser Erfindung, eines oder mehrere der Oligos bereit zu stellen, die einen partiellen Promotorbereich durch (ein) invasive(s) Spaltungsereignis(se) aufweisen. In dieser Ausführungsform sind die partiellen Promotorsequenzen bei der invasiven Spaltung an das Sondenoligonukleotid angebracht und werden durch Spaltung an einer bestimmten Stelle frei gesetzt, was von dem Invader™-Oligonukleotid gesteuert wird. Es ist auch beabsichtigt, dass Transkription in Abwesenheit der korrekt gespaltenen Sonde sehr schlecht oder nicht existent ist. Zur Beurteilung des Erfolgs eines Entwurfs eines Oligonukleotids hinsichtlich der Lösung dieser Aufgabe, können mehrere Transkriptionsreaktionstests durchgeführt werden.

[0352] Für eine Promotoranordnung, die im Nicht-Vorlagenstrang einen Einzelstrangbruch aufweist, sind mehrere partielle Anordnungen, die getestet werden sollten, in Fig. 86A–D gezeigt. Als Beispiel, aber nicht als Einschränkung zeigt diese Figur die Tests für einen Promotor mit Einzelstrangbruch, bei dem der stromaufwärts gelegene bzw. 5'-Anteil des Nicht-Vorlagenstrangs durch die invasive Spaltung bereitgestellt wird. Dieses Fragment ist in Fig. 86A mit der Bezeichnung „geschnittene Sonde" zu sehen. Transkriptionsreaktionen, die in Gegenwart des in Fig. 86A gezeigten Doppelstranges inkubiert werden, testen die Fähigkeit des stromaufwärts gelegenen partiellen Promotors, bei Hybridisierung an einen unteren Strang, als „Kopienvorlage" bezeichnet, den Beginn der Transkription zuzulassen. Entsprechend testet eine Reaktion, die in Gegenwart des in Fig. 86B gezeigten Doppelstrangs durchgeführt wird, die Fähigkeit des partiellen Promotorfragments, das der Initiationsstelle (der +1-Stelle, wie in **Fig.** 85B gezeigt) am nächsten liegt, die Transkription der Kopienvorlage zu unterstützen. Es ist ein wichtiges Merkmal der vorliegenden Erfindung, dass keiner dieser partiellen Promotordoppelstränge in der Lage ist, die Transkription in gleichem Maß zu unterstützen, wie es bei einer Transkription von einem intakten Promotor, wie gezeigt in **Fig.** 85B, aus der Fall wäre. Es ist bevorzugt, dass keiner dieser partiellen Promotoren ausreichend ist, um während der Dauer einer durchschnittlichen Transkriptionsreaktion (d. h. innerhalb von etwa einer Stunde der Inkubation) eine nachweisbare Transkription zu initiieren.

[0353] Fig. 86C und Fig. 86D zeigen zwei andere Doppelstranganordnungen, die entworfen sind, um die Wir-

kung einer ungeschnittenen Sonde während der Transkriptionsreaktion zu testen. Fig. 86C zeigt den zwischen nur der ungeschnittenen Sonde und der Kopienvorlage gebildeten Doppelstrang, während Fig. 86D den anderen Anteil des Promotors enthält. Der 3'-Bereich der Sonde ist zu der Promotorsequenz nicht komplementär und produziert daher eine ungepaarte Verzweigung in der Mitte des Promotors. Es ist ein wichtiges Merkmal der vorliegenden Erfindung, dass keiner dieser verzweigten Promotordoppelstränge in der Lage ist, die Transkription in gleichem Maß zu unterstützen, wie es bei einer Transkription von einem intakten Promotor, wie gezeigt in **Fig.** 85B, aus der Fall wäre. Es ist bevorzugt, dass keiner dieser verzweigten Promotoren ausreichend ist, um während der Dauer einer durchschnittlichen Transkriptionsreaktion (d. h. innerhalb von etwa einer Stunde der Inkubation) eine nachweisbare Transkription zu initiieren.

[0354] In einer Ausführungsform des Transkriptionssystems der vorliegenden Erfindung wird die Initiierung der Transkription von der Kopienvorlage in Abwesenheit eines vollständigen Promotors oder in Gegenwart eines verzweigten Promotors durch die sinnvolle Platzierung des Einzelstrangbruchs oder von Einzelstrangbrüchen in dem zusammengesetzten Promotor verhindert. Wie in den Beispielen unten gezeigt ist, erlaubt die Platzierung eines Einzelstrangbruches zwischen den Nukleotiden –12 und –11 des Nicht-Vorlagenstranges des Promotors des Bakteriophagen T7 beispielsweise, dass die Transkription nur stattfindet, wenn die Sonde erfolgreich geschnitten wurde, wie bei einer invasiven Spaltungsreaktion. In manchen Fällen, bei denen die invasive Spaltungsreaktion den stromaufwärts gelegenen Anteil des Nicht-Vorlagenstranges des Promotors bereit stellen soll (z. B. wie in Fig. 88B dargestellt), kann es dagegen notwendig oder wünschenswert sein, den Einzelstrangbruch aus anderen Gründen als zur Bereitstellung eines optimal zusammengesetzten Promotors (d. h. eines Promotors, der in Abwesenheit eines der Promotor-Stücke inaktiv ist) in diesem Strang an einer bestimmten Position zu platzieren. Es kann erforderlich oder wünschenswert sein, den Einzelstrangbruch so zu platzieren, dass die Erzeugung eines verzweigten vollständigen Promotors (Fig. 86D) ein unerwünschtes Maß an Transkription aufweist, was die Abhängigkeit einer RNA-Produktion von dem Erfolg des invasiven Spaltungsschrittes reduziert. In den Beispielen unten ist gezeigt, dass Transkription von einem solchen verzweigten Promotor aus durch eine Modifikation des stromabwärts gelegenen Nicht-Vorlagen-Promotorstückes, gezeigt als das „partielle Promotor-Oligonukleotid" in **Fig.** 86, 88, Fig. 90 und Fig. 95D, unterdrückt werden kann. Wie in Fig. 90 dargestellt, kann das partielle Promotor-Oligonukleotid mit einem 5'-„Schwanz" von Nukleotiden ausgestattet werden, die nicht zu dem Vorlagenstrang des Promotors komplementär sind, aber zum 3'-Anteil des Sondenoligonukleotids komplementär sind, das bei der invasiven Spaltungsreaktion entfernt wird. Wenn eine ungeschnittene Sonde an die Kopienvorlage mit dem gebundenen partiellen Promotor-Oligonukleotid mit 5'-Schwanz hybridisiert, kann der 5'-Schwanz Basenpaarungen mit dem 3'-Bereich der Sonde eingehen, wodurch eine Drei-Wege-Verbindung ausgebildet wird, wie in **Fig.** 90A gezeigt. Dadurch kann die Transkription wirksam ausgeschaltet werden, wie unten gezeigt ist. Wenn eine geschnittene Sonde hybridisiert, wie in **Fig.** 90B gezeigt, wird ein Promotor mit einer kleinen Verzweigung gebildet, und es ist hierin gezeigt, dass solch ein verzweigter Promotor die Transkription initiieren kann. Wenn darüber hinaus die Sequenz des 5'-Schwanzes sorgfältig ausgewählt wird (d. h. wenn es sich bei der ersten ungepaarten Base um dasselbe Nukleotid wie bei Nukleotid 3' der geschnittenen Sonde handelt, so dass sie um die Hybridisierung an derselben Vorlagenstrangbase konkurrieren), kann die resultierende verzweigte Struktur auch von einer der strukturspezifischen Nukleasen der vorliegenden Erfindung gespalten werden, wodurch der in **Fig.** 90C gezeigte unverzweigte Promotor geschaffen wird, wodurch, in manchen Fällen, die Transkription über die mit dem Promotor in **Fig.** 90B beobachteten hinaus erhöht wird.

[0355] Der Promotordoppelstrang, der in dieser Ausführungsform durch die erfolgreiche Durchführung der Invader™-gesteuerten Spaltung erzeugt werden soll, umfasst sowohl die „ungeschnittene Sonde" als auch das partielle Promotor-Oligonukleotid, das in Fig. 86A und B dargestellt ist, ausgerichtet auf einer Einzelkopie einer Vorlagennukleinsäure. Die Testung der Effizienz der Transkription eines solchen Promotorsegments mit Einzelstrangbruch im Vergleich zu dem intakten Promotor ist oben beschrieben. Alle Oligonukleotide, die für diese Testmoleküle beschrieben sind, lassen sich mithilfe von Standardsynthesechemie herstellen.

[0356] Der in **Fig.** 86 gezeigte Satz von Testmolekülen wurde entworfen, um die Transkriptionsfähigkeit der unterschiedlichen Strukturen zu bestimmen, die in Reaktionen vorhanden sein können, in denen der 5'-Anteil des Nicht-Vorlagenstranges des Promotors durch die Invader™-gesteuerte Spaltung bereit gestellt werden soll. Es ist auch vorstellbar, dass ein anderer Anteil des partiellen Promotors durch die invasive Spaltungsreaktion bereit gestellt wird (z. B. das stromabwärts gelegene Segment des Nicht-Vorlagenstranges des Promotors), wie in Fig. 94 gezeigt ist. Anteile des Vorlagenstranges des Promotors können auch von der geschnittenen Sonde bereit gestellt werden, wie in Fig. 95A–D gezeigt ist. Es kann ein analoger Satz von Testmolekülen, einschließlich „geschnittenen" und ungeschnittenen Versionen der Sonde, die bei der invasiven Spaltung verwendet werden sollen, hergestellt werden, um etwaige alternative Entwürfe zu testen, unabhängig davon, ob sich der Einzelstrangbruch auf dem Vorlagen- oder auf dem Nicht-Vorlagenstrang des Promotors befinden soll.

[0357] Die transkriptionsbasierten Visualisierungsverfahren der vorliegenden Erfindung können auch in vielfacher Art verwendet werden. Reaktionen können derart konstruiert werden, dass das Vorhandensein eines bestimmten Ziels zu einer Transkription einer Art von Promotor führt, während das Vorhandensein einer anderen Zielsequenz (z. B. einer Mutanten oder Variante) oder eines anderen Ziels, das möglicherweise vorhanden sein könnte, zur Transkription von einer anderen (d. h. einer zweiten) Art von Promotor führen kann. In einer solchen Ausführungsform könnte die Identität des Promotors, von dem aus die Transkription initiiert wurde, aus der Art oder der Größe der produzierten RNA abgeleitet werden.

[0358] Als Beispiel, aber nicht als Einschränkung, können die Bakteriophagenpromotoren mit solch einer in Betracht gezogenen Anwendung verglichen werden. Die Promotoren für den Phagen T7, T3 und SP6, sind recht ähnlich, wobei jeder eine Länge von etwa 15 bis 20 Basenpaaren hat und zwischen den Nukleotiden –17 und –1, relativ zum Ausgangspunkt der Transkription, eine Ähnlichkeit von etwa 45% teilt. Trotz dieser Ähnlichkeiten sind die RNA-Polymerasen dieses Phagen für die von ihnen erkannten Promotoren so hoch spezifisch, dass die anderen Promotoren in einer Reaktion vorhanden sein können, aber nicht transkribiert werden (Chamberlin and Ryan, Enzymes XV: 87–108 [1982]). Weil diese Promotoren in Bezug auf die Größe und auf die Art und Weise der Erkennung durch ihre Polymerasen ähnlich sind (Li et al., Biochem. 35: 3722 [1996]), lassen sich durch Analogie zu den hierin beschriebenen Beispielen, welche den T7-Promotor verwenden, ähnliche Versionen mit Einzelstrangbruch der Promotoren zur Verwendung in der Verfahren der vorliegenden Erfindung entwerfen.

[0359] Aufgrund des hohen Spezifitätsgrades der RNA-Polymerasen können diese Promotoren mit Einzelstrangbruch gemeinsam verwendet werden, um in einer einzelnen Reaktion mehrere Ziele nachzuweisen. Es gibt viele Fälle, in denen es sehr wünschenswert wäre, mehrere Nukleinsäureziele in einer einzigen Reaktion nachzuweisen, einschließlich der Fälle, in denen mehrere Infektionserreger vorhanden sein können oder in denen Varianten eines einzigen Typs von Ziel identifiziert werden müssen. Alternativ ist es häufig wünschenswert, eine Kombination von Sonden zu verwenden, um sowohl eine Zielsequenz als auch eine interne Kontrollsequenz nachzuweisen, um die Effekte von Probenverunreinigungen auf das Verfahrensergebnis zu beurteilen. Die Verwendung mehrere Promotoren ermöglicht die Beurteilung der Reaktion sowohl hinsichtlich der Effizienz der invasiven Spaltung als auch hinsichtlich der Robustheit der Transkription.

[0360] Wie oben festgestellt, wurden die Phagenpromotoren ausführlich als ein Beispiel geeigneter Proteinbindungsbereiche (z. B. die zur Herstellung eines zusammengesetzten Promotors verwendet werden können) zur Verwendung in den Verfahren der vorliegenden Erfindung beschrieben. Die Erfindung ist nicht auf die Verwendung von Phagen-RNA-Polymerase-Promotorbereiche im Speziellen und auf RNA-Polymerase-Promotorbereiche im Allgemeinen beschränkt. Geeignete, spezifische, gut charakterisierte Promotoren kommen auch in prokaryontischen und eukaryontischen Systemen vor.

[0361] Die RNA, die auf eine Weise produziert wird, die von dem erfolgreichen Nachweis der Zielnukleinsäure in der invasiven Spaltungsreaktion abhängig ist, lässt sich auf vielerlei Weise nachweisen. Wenn ein markiertes Nukleotid während der Transkription in die RNA eingebaut wird, lässt sich die RNA direkt nach der Fraktionierung nachweisen (z. B. durch Elektrophorese oder Chromatographie). Die markierte RNA kann auch auf einem festen Träger wie beispielsweise einer Mikrotiterplatte, einem Kügelchen oder einem Tauchstab (Dipstick) erfasst werden (z. B. durch Hybridisierung, Antikörpererfassung oder durch eine Affinitätswechselwirkung wie beispielsweise der zwischen Biotin und Avidin). Eine Erfassung kann das Messen des eingebauten Markers erleichtern oder es kann sich dabei um einen Zwischenschritt vor der Sondenhybridisierung oder einem ähnlichen Nachweismittel handeln. Soll die Höchstmenge eines Markers in jedes Transkript eingebaut werden, ist es bevorzugt, dass die Kopienvorlage sehr lang ist, d. h. etwa 3 bis 10 Kilobasen, damit jedes RNA-Molekül viele Marker trägt. Alternativ könnte erwünscht sein, dass eine einzelne Stelle oder eine eingeschränkte Anzahl an Stellen innerhalb des Transkripts spezifisch markiert wird. In diesem Fall wäre es wünschenswert, eine kurze Kopienvorlage mit nur einem Rest oder einigen wenigen Resten zu haben, die einen Einbau des markierten Nukleotids ermöglichen.

[0362] Die Kopienvorlage kann auch ausgewählt werden, um RNAs zu produzieren, die spezifizierte Funktionen durchführen. Wenn in einem einfachen Fall ein doppelstrangabhängiger interkalierender Fluorophor zum Nachweis des RNA-Produktes verwendet werden soll, kann es wünschenswert sein, eine RNA zu transkribieren, von der bekannt ist, dass sie doppelsträngige Sekundärstrukturen ausbildet, beispielsweise eine ribosomale RNA oder eine tRNA. In einer anderen Ausführungsform kann die RNA entworfen werden, um spezifisch oder mit besonderer Affinität mit einer anderen Substanz zu interagieren. Es ist gezeigt worden, dass ein Prozess alternierender Schritte der Auswahl (z. B. durch Bindung an eine Zielsubstanz) und In-vitro-Amplifizierung (z. B. durch PCR) verwendet werden kann, um Nukleinsäureliganden mit neuartigen und sinnvollen Eigen-

schaften zu identifizieren (Tuerk and Gold, Science 249: 505 [1990]). Dieses System wurde verwendet, um RNAs zu identifizieren, die Liganden oder Aptamere genannt werden, welche fest und spezifisch an Proteine und andere Molekülarten binden, wie beispielsweise an Antibiotika (Wang et al., Biochem. 35: 12338 [1996]) und Hormone. Es lassen sich sogar RNAs auswählen, die durch andere als Watson-Crick-Wechselwirkungen an andere RNAs binden (Schmidt et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 782: 526 [1996]). Ein RNA-Ligand kann verwendet werden, um die Aktivität eines Moleküls, an die er bindet, zu inaktivieren oder zu verstärken. Jedes RNA-Segment, das durch einen solchen Prozess identifiziert wird, kann auch mit den Verfahren der vorliegenden Erfindung produziert werden, so dass die Beobachtung der Aktivität des RNA-Liganden als spezifisches Zeichen des Vorhandenseins des Zielmaterials bei der invasiven Spaltungsreaktion verwendet werden kann. Die Bindung des Liganden an seinen spezifischen Partner kann auch als andere Möglichkeit zur Erfassung eines Auslesesignals auf einen festen Träger verwendet werden.

[0363] Das RNA-Produkt kann auch entworfen werden, um eine katalytische Funktion aufzuweisen (z. B., um als Ribozym zu wirken), was ermöglicht, dass die Spaltung eines anderen Moleküls den Erfolg der primären invasiven Spaltungsreaktion anzeigt (Uhlenbeck, Nature 328: 596 [1987]). In einer anderen Ausführungsform kann die RNA ausgeführt sein, um eine Peptidsequenz zu codieren. Bei Kopplung an ein In-vitro-Translationssystem (z. B. das S-30-System, das von E. coli abgeleitet ist [Lesley, Methods Mol. Biol., 37: 265 (1985)], oder an ein Kaninchen-Retikulozytenlysat-System [Dasso and Jackson, Nucleic Acids Res. 17: 3129 (1989)], erhältlich von Promega) lässt sich die Produktion des entsprechenden Proteins nachweisen. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die produzierten Proteine solche, die einen kolorimetrischen oder lumineszenten Nachweis ermöglichen, beispielsweise respektive Beta-Galactosidase (lac-Z) oder Luziferase.

[0364] Der Schwerpunkt der obigen Diskussion lag auf der Verwendung der vorliegenden Transkriptionsvisualisierungsverfahren im Zusammenhang mit dem Invader™-gesteuerten Spaltungsverfahren (d. h. die Nicht-Ziel-Spaltungsprodukte, die in dem Invader™-Verfahren produziert wurden, wurden verwendet, um einen Proteinbindungsbereich, wie beispielsweise einen Promotorbereich, zu vollständigen und zu aktivieren). Die Transkriptionsvisualisierungsverfahren sind jedoch nicht auf diesen Zusammenhang beschränkt. Jedes Verfahren, das ein Oligonukleotidprodukt mit relativ diskreten Enden aufweist, kann in Verbindung mit den vorliegenden Transkriptionsvisualisierungsverfahren verwendet werden. Beispielsweise produziert das in US-Patent Nr. 5,210,015 beschriebene, homogene Verfahren kurze Oligonukleotidfragmente als Ergebnis der Spaltung einer Sonde, besonders, wenn es unter Bedingungen durchgeführt wird, in denen keine Polymerisierung stattfinden kann. Wenn dieses Verfahren unter Bedingungen durchgeführt wird, bei denen eine Polymerisierung stattfindet, lässt sich die Stelle der Spaltung der Sonde durch Verwendung von Nukleotidanaloga einengen, die an bestimmten Positionen innerhalb der Sonde nicht spaltbare Verknüpfungen aufweisen. Diese kurzen Oligonukleotide können auf eine Weise analog zu der geschnittenen Sonde oder zu Nicht-Zielspaltungsprodukten verwendet werden, die bei den invasiven Spaltungsreaktionen der vorliegenden Erfindung produziert werden. Aus dem Stand der Technik sind weitere Verfahren bekannt, die geeignete Oligonukleotidprodukte erzeugen. Geeignet wären beispielsweise die Nicht-Zielspaltungsprodukte, die in Verfahren wie der „Zyklussondenreaktion" (Duck et al., BioTech., 9: 142 [1990] und US-Patent Nr., 4,876,187 und 5,011,769) produziert werden, in denen kürzere Oligonukleotide nach Hybridisierung an eine Zielsequenz aus längeren Oligonukleotiden frei gesetzt werden, sowie kurze Restriktionsfragmente, die in Verfahren frei gesetzt werden, in denen eine Sonde entworfen wird, um gespalten zu werden, wenn sie erfolgreich an eine entsprechende Restriktionserkennungssequenz hybridisiert (US-Patent Nr. 4,683,194).

[0365] Auch Verfahren, die kurze Oligonukleotide mit „unregelmäßigen" (d. h. nicht diskreten) 3'-Enden erzeugen, können erfolgreich in den Transkriptionsreaktionen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wenn die durch diese Nicht-Transkriptionsreaktion bereit gestellten Oligonukleotide verwendet werden, um einen Anteil des Promotorbereiches bereit zu stellen, der sich stromabwärts von dem Oligonukleotid bzw. den Oligonukleotiden befindet, das bzw. die erforderlich sind, um den Promotorbereich zu vervollständigen (dabei kann ein 3'-Schwanzregion oder eine ungepaarte Verlängerung toleriert werden, wenn das Oligo als „geschnittene Sonde" wie in **Fig. 94** und **Fig. 95A** verwendet wird).

IX. Signalverstärkung durch Einbau der Produkte einer invasiven Spaltungsreaktion in eine anschließende invasive Spaltungsreaktion

[0366] Wie oben erwähnt, lässt sich das Oligonukleotidprodukt, das durch die invasive Spaltung frei gesetzt wird, anschließend in jeder Reaktion bzw. in jedem Ausleseverfahren einsetzen, welches Oligonukleotide in dem Größenbereich eines Spaltungsproduktes verwendet. Außer den Reaktionen, die Primerverlängerung und Transkription umfassen und oben beschrieben sind, ist die invasive Spaltungsreaktion eine weitere enzymatische Reaktion, die Oligonukleotide verwendet. Die vorliegende Erfindung stellt Mittel zur Verwendung des

bei einer primären invasiven Spaltungsreaktion freigesetzten Oligonukleotids als Bestandteil zum Vervollständigen einer Spaltungsstruktur bereit, um eine zweite invasive Spaltungsreaktion zu ermöglichen. Eine mögliche Konfiguration einer primären Spaltungsreaktion, die einen Bestandteil für eine zweite Spaltungsstruktur liefert, ist in **Fig. 96** als Diagramm dargestellt. Es ist nicht beabsichtigt, dass die aufeinander folgende Verwendung des invasiven Spaltungsproduktes auf einen einzigen zusätzlichen Schritt beschränkt ist. Es wird in Betracht gezogen, dass viele distinkte invasive Spaltungsreaktionen nacheinander durchgeführt werden können.

[0367] Die Polymerasekettenreaktion verwendet ein DNA-Replikationsverfahren, um Kopien eines Zielsegmentes einer Nukleinsäure mit einer logarithmischen Akkumulierungsrate zu erzeugen. Dies ist aufgrund der Tatsache möglich, dass bei einer Trennung der DNA-Stränge jeder Einzelstrang ausreichende Informationen enthält, um die Zusammensetzung eines neuen komplementären Stranges zu ermöglichen. Werden die neuen Stränge synthetisiert, hat sich die Anzahl identischer Moleküle verdoppelt. Innerhalb von 20 Wiederholungen dieses Prozesses kann das Original 1 Million Mal kopiert werden, was sehr seltene Sequenzen leicht nachweisbar macht. Die mathematische Potenz einer Verdopplungsreaktion hat Eingang in eine Reihe von Amplifizierungsverfahren gefunden, von denen einige in Tabelle 1 genannt sind.

[0368] Durch die Durchführung mehrerer aufeinander folgender invasiver Spaltungsreaktionen nutzt das Verfahren der vorliegenden Erfindung einen exponentiellen mathematischen Vorteil ohne zusätzliche Kopien des Zielanalyten herzustellen. Bei einer einfachen invasiven Spaltungsreaktion entspricht die Ausbeute Y einfach der Umsetzungsrate (Turnover-Rate) K, multipliziert mit der Reaktionsdauer t (d. h. Y = (K) (t)). Wenn Y verwendet wird, um die Ausbeute einer einfachen Reaktion darzustellen, lässt sich die Ausbeute einer zusammengesetzten Reaktion (d. h. einer mehrfachen, aufeinander folgenden Reaktion) unter der Annahme, dass jeder der einzelnen invasiven Spaltungsschritte dieselbe Umsetzungsrate aufweist, einfach als Y^n darstellen, wobei n die Anzahl an invasiven Spaltungsreaktionen ist, die in der Reihe durchgeführt wurden. Wenn die Ausbeuten jedes Schritts unterschiedlich sind, lässt sich die Endausbeute als das Produkt der Multiplikation der Ausbeuten jeder Einzelreaktion in der Reihe darstellen. Wenn beispielsweise eine primäre invasive Spaltungsreaktion eintausend Produkte in 30 Minuten produzieren und jedes dieser Produkte wiederum an 1000 weiteren Reaktionen teilnehmen kann, gibt es in einer zweiten Reaktion 1000^2 Kopien (1000 × 1000) des Endproduktes. Wird der Reihe eine dritte Reaktion hinzugefügt, ist die theoretische Ausbeute 1000^3 (1000 × 1000 × 1000). In den Verfahren der vorliegenden Erfindung stammt der Exponent aus der Anzahl an invasiven Spaltungsreaktionen in der Kaskade. Dem gegenüber stehen die oben beschriebenen Amplifizierungsverfahren (z. B. PCR), bei denen Y infolge der Anzahl an Strängen im DNA-Doppelstrang auf 2 beschränkt ist und der Exponent n der Anzahl an durchgeführten Zyklen entspricht, so dass viele Wiederholungen notwendig sind, um große Produktmengen zu akkumulieren.

[0369] Zur Unterscheidung der oben beschriebenen exponentiellen Amplifizierungen von denen der vorliegenden Erfindung lassen sich Erstere als Reziprokreaktionen bezeichnen, da die Reaktionsprodukte wieder in dieselbe Reaktion eingehen (z. B. führt Ereignis eins zu einer gewissen Anzahl von Ereignissen 2, und jedes Ereignis 2 führt wieder zurück zu einer gewissen Anzahl von Ereignissen 1). Die Ereignisse der vorliegenden Erfindung sind dagegen sequenziell (z. B. führt Ereignis 1 zu einer gewissen Anzahl von Ereignissen 2; jedes Ereignis 2 führt zu einer gewissen Anzahl von Ereignissen 3, etc., und kein Ereignis kann zu einem früheren Ereignis in der Kette beitragen).

[0370] Die Empfindlichkeit der Reziprokverfahren ist auch eine der größten Schwächen, wenn diese Verfahren verwendet werden um festzustellen, ob eine Zielnukleinsäuresequenz in einer Probe vorhanden oder nicht vorhanden ist. Da das Produkt dieser Reaktionen eine nachweisbare Kopie des Ausgangsmaterials ist, kann die Kontamination einer neuen Reaktion mit den Produkten einer früheren Reaktion zu falsch positiven Ergebnissen führen (d. h. zu dem augenscheinlichen der Zielnukleinsäure in Proben, die eigentlich keinen Zielanalyten enthalten). Weil die Konzentration des Produktes in jeder positiven Reaktion so hoch ist, können darüber hinaus DNA-Mengen, die ausreichend sind, um ein starkes falsch positives Signal zu erzeugen, sehr leicht an neue Reaktion weitergegeben werden, entweder durch Kontakt mit kontaminierten Instrumenten oder durch Aerosole. Im Gegensatz zu den Reziprokverfahren ist das am Produkt der sequenziellen Reaktion mit der höchsten Konzentration (d. h. das Produkt, das im letztendlichen invasiven Spaltungsereignis frei gesetzt wird) nicht in der Lage, eine ähnliche Reaktion oder Kaskade in Gang zu setzen, wenn es auf eine frische Testprobe übertragen wird. Dies ist ein deutlicher Vorteil gegenüber den oben beschriebenen exponentiellen Amplifizierungsverfahren, da die Reaktionen der vorliegenden Erfindung ohne die kostspieligen Eingrenzungsanordnungen (z. B. durch Spezialinstrumente oder durch einen separaten Laborraum) durchgeführt werden können, die bei einer Reziprokreaktion erforderlich sind. Die Produkte eines vorletzten Ereignisses können zwar unbeabsichtigt übertragen werden, um einen Hintergrund des Endproduktes in Abwesenheit des Zielanalyten zu produzieren, aber die Kontamination müsste ein viel größeres Volumen haben, um ein äquivalentes Risiko eines

falsch positiven Ergebnisses zu liefern.

[0371] Wenn der Begriff „aufeinander folgend" oder „sequenziell" verwendet wird, soll die Erfindung nicht auf Konfigurationen beschränkt sein, in denen die eine invasive Spaltungsreaktion bzw. das eine invasive Spaltungsverfahren vor Beginn einer anschließenden Reaktion zur invasiven Spaltung einer anderen Sonde beendet sein muss. Der Begriff bezieht sich vielmehr auf die Reihenfolge von Ereignissen, die stattfinden würden, wenn nur Einzelkopien jeder Oligonukleotidart in einem Verfahren verwendet werden würden. Die primäre invasive Spaltungsreaktion bezieht sich auf diejenige, die zuerst, als Reaktion auf die Bildung der Spaltungsstruktur auf der Zielnukleinsäure, stattfindet. Anschließende Reaktionen lassen sich als sekundär, tertiär und so weiter bezeichnen und können künstliche „Ziel"-Stränge umfassen, die nur zum Zusammensetzen einer Spaltungsstruktur dienen und die nicht mit dem relevanten Nukleinsäureanalyten verwandt sind. Während das vollständige Verfahren, falls gewünscht, konfiguriert werden kann, dass jeder Schritt der invasiven Spaltung entweder räumlich (z. B. in verschiedenen Reaktionsgefäßen) oder zeitlich (z. B. durch Anwendung einer Verschiebung der Reaktionsbedingungen, beispielsweise Temperatur, Enzymidentität oder Lösungsbedingung, um die späteren Spaltungsereignisse zu ermöglichen) getrennt ist, wird auch in Betracht gezogen, dass alle Reaktionsbestandteile derart gemischt werden, dass sekundäre Reaktionen ausgelöst werden, sobald das Produkt aus einer primären Spaltung verfügbar wird. In einem solchen Format können primäre, sekundäre und anschließende Spaltungsereignisse, die verschiedene Kopien der Spaltungsstrukturen beinhalten, gleichzeitig stattfinden.

[0372] Es sind mehrere Stufen dieser Art von linearer Amplifizierung vorstellbar, bei der jede nachfolgende Spaltungsrunde ein Oligonukleotid produziert, das in anschließenden Runden an der Spaltung einer anderen Sonde teilnehmen kann. Die primäre Reaktion wäre für den relevanten Analyten spezifisch, wobei sekundäre (und tertiäre, etc.) Reaktionen verwendet werden würden, um Signal zu erzeugen, während sie gleichzeitig in Bezug auf die Initiierung von der primären Reaktion abhängig sind.

[0373] Das freigesetzte Produkt kann bei der Teilnahme an den anschließenden Reaktionen mehrere Funktionen haben. Eine der möglichen Varianten ist in **Fig. 96** gezeigt, bei der das Produkt einer invasiven Spaltungsreaktion zu dem Invader™-Oligonukleotid wird, um die spezifische Spaltung einer anderen Sonde in einer zweiten Reaktion zu steuern. In **Fig. 96** wird die erste invasive Spaltungsstruktur durch das Annealing des Invader™-Oligonukleotids („Invader") und des Sondenoligonukleotids („Sonde 1") an die erste Zielnukleinsäure („Ziel 1") gebildet. Die Zielnukleinsäure ist in drei Bereiche eingeteilt, basierend darauf, welche Anteile des Invader™- und des Sondenoligonukleotids an das Ziel hybridisieren können (wie oben erörtert und wie in **Fig. 25** gezeigt). Bereich 1 (Bereich Y in **Fig. 25**) des Ziels ist nur zu dem Invader™-Oligonukleotid komplementär; Bereich 3 (Bereich Z in **Fig. 25**) des Ziels ist nur zu der Sonde komplementär und Bereich 2 (Bereich X in **Fig. 25**) des Ziels weist Komplementarität sowohl zu dem Invader™- als auch zu dem Sondenoliqonukleotid auf. Die als Diagramm in **Fig. 96** dargestellte sequenzielle invasive Spaltungsreaktion verwendet ein Invader™- und ein Sondenoligonukleotid; die sequenzielle Spaltungsreaktion ist nicht auf die Verwendung einer solchen ersten Spaltungsstruktur beschränkt. Die erste Spaltungsstruktur in der sequenziellen Reaktion kann auch ein Invader™-Oligonukleotid, eine Minisonde und ein Stacker-Oligonukleotid verwenden, wie in Abschnitt V oben erläutert ist.

[0374] In **Fig. 96** setzt die Spaltung von Sonde 1 die „geschnittene Sonde 1" frei (angezeigt durch die schraffierte Linie in der gespaltenen und ungespaltenen Sonde 1 in **Fig. 96**). Die frei gesetzte Sonde 1 wird dann bei der zweiten Spaltung als Invader™-Oligonukleotid verwendet. Die zweite Spaltungsstruktur wird durch dass Annealing der geschnittenen Sonde 1, einem zweiten Sondenoligonukleotid („Sonde 2") und einer zweiten Zielnukleinsäure („Ziel 2") gebildet. Sonde 2 kann markiert sein (angezeigt durch den Stern in **Fig. 96**), und der Nachweis der Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur kann durch Nachweisen der markierten geschnittenen Sonde 2 erreicht werden; der Marker kann ein Radioisotop (z. B. ^{32}P, ^{35}S), ein Fluorophor (z. B. Fluoreszein), eine reaktive Gruppe, die mit einem sekundären Agens nachgewiesen werden kann (z. B. Biotin, Streptavidin), ein positiv geladenes Addukt, das den Nachweis durch selektive Ladungsumkehrung ermöglicht (wie in Abschnitt IV oben erläutert), etc. sein. Alternativ kann die geschnittene Sonde 2 bei einer Tailing-Reaktion (wie in Abschnitt VI oben erläutert) verwendet werden oder kann verwendet werden, um eine Proteinbindungsstelle zu vervollständigen oder zu aktivieren (wie in Abschnitt VIII oben erläutert).

[0375] Eine weitere mögliche Konfiguration zur Durchführung einer sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion ist als Diagramm in **Fig. 97** dargestellt. In diesem Fall können Sondenoligonukleotide, die in dem primären Bereich gespalten werden, entworfen werden, um sich auf sich selbst rückzufalten (d. h. sie enthalten einen Bereich der Selbst-Komplementarität), um ein Molekül zu schaffen, das sowohl als Ziel- als auch als Invader™-Oligonukleotid dienen kann (hier als „IT"-Komplex bezeichnet). Der IT-Komplex ermöglicht dann die

Spaltung einer anderen, in der sekundären Reaktion vorhandenen Sonde. Einschluss eines Überschusses des sekundären Sondenmoleküls („Sonde 2") ermöglicht, dass jedes IT-Molekül als Plattform für die Herstellung mehrerer Kopien der gespaltenen sekundären Sonde dient. In Fig. 97 sind die Bereiche der Selbst-Komplementarität in dem 5'-Anteil des Invader™-Oligonukleotids durch die schraffierten Ovale angezeigt; der Pfeil zwischen diesen beiden Ovalen zeigt an, dass diese beiden Bereiche mit sich selbst Paarungen eingehen können (wie gezeigt in der „geschnittenen Sonde 1"). Die Zielnukleinsäure ist in drei Bereiche eingeteilt, basierend darauf, welche Anteile des Invader™- und des Sondenoligonukleotids an das Ziel hybridisieren können (wie oben erläutert, und das Ziel kann in vier Bereiche eingeteilt werden, wenn ein Stacker-Oligonukleotid verwendet wird). Die zweite Spaltungsstruktur wird durch das Annealing der zweiten Sonde („Sonde 2") an das Fragment von Sonde 1 („geschnittene Sonde 1") gebildet, das durch Spaltung der ersten Spaltungsstruktur frei gesetzt wurde. Die geschnittene Sonde 1 bildet eine Haarnadel- oder Stamm/Schleife-Struktur in der Nähe ihres 3'-Endes durch das Annealing an Selbst-Komplementaritätsbereiche in der geschnittenen Sonde 1 (diese geschnittene Sonde 1, die mit sich selbst eine Annealing-Reaktion eingeht, bildet den IT-Komplex). Der IT-Komplex (geschnittene Sonde 1) ist in drei Bereiche eingeteilt: Bereich 1 des IT-Komplexes weist Komplementarität zu dem 3'-Anteil von Sonde 2 auf; Bereich 2 weist Komplementarität zum 3'-Ende der geschnittenen Sonde 1 und dem 5'-Anteil von Sonde 2 auf (analog zu dem Überlappungsbereich „X", gezeigt in Fig. 25) und Bereich 3 enthält den Bereich der Selbst-Komplementarität (d. h. Bereich 3 ist komplementär zu dem 3'-Anteil der geschnittenen Sonde 1). Was den IT-Komplex (d. h. die geschnittene Sonde 1) anbelangt, befindet sich Bereich 1 stromaufwärts von Bereich 2 und Bereich 2 befindet sich stromaufwärts von Bereich 3.

[0376] Die Spaltungsprodukte der sekundären invasiven Spaltungsreaktion (d. h. geschnittene Sonde 2) können entweder nachgewiesen oder wiederum so entworfen werden, um noch einen weiteren integrierten Invader™-Zielkomplex zu bilden, der mit einem dritten Sondenmolekül, wiederum nicht verwandt mit den vorherigen Zielen, verwendet werden kann.

[0377] Die vorliegende Erfindung ist nicht auf die in Fig. 96 und Fig. 97 als Diagramm dargestellten Konfigurationen beschränkt. Es ist vorgesehen, dass das Oligonukleotidprodukt einer primären Spaltungsreaktion die Rolle eines der hierin beschriebenen Oligonukleotide einnimmt (z. B. kann es als Zielstrang ohne eine angebrachte Invader™-Oligonukleotid-ähnliche Sequenz dienen, oder es kann als Stacker-Oligonukleotid, wie oben beschrieben, dienen), um die in der sekundären Reaktion beobachtete Umsetzungsrate durch Stabilisieren der Sondenhybridisierung durch koaxiales Stacking (Stapeln) zu erhöhen.

[0378] In einer bevorzugten Ausführungsform wird jede anschließende Reaktion derart durch das Produkt der vorherigen Spaltung ermöglicht (d. h. ist abhängig davon), so dass das Vorhandensein des Endproduktes als Indikator des Vorhandenseins des Zielanalyten dienen kann. Spaltung in der zweiten Reaktion braucht aber nicht von der Anwesenheit des Produktes der primären Spaltungsreaktion abhängig zu sein; das Produkt der primären Spaltungsreaktion kann lediglich die Rate der zweiten Spaltungsrektion messbar erhöhen.

[0379] Insgesamt handelt es sich bei den Invader™-Kaskadenverfahren (d. h. den sequenziellen invasiven Spaltungsreaktionen) der vorliegenden Erfindung um eine Kombination von zwei oder mehreren linearen Verfahren, welche die Akkumulierung des Endproduktes bei einer exponentiellen Rate, aber ohne signifikantes Risiko einer Verschleppungskontaminierung ermöglicht.

[0380] Die sequenzielle invasive Spaltungsamplifizierung der vorliegenden Erfindung kann als eine Zwischenverstärkung eines der Nachweisverfahren (z. B. gelbasierte Analyse, entweder durch Standard oder durch Ladungsumkehrung), Polymerase-Tailing und Einbau in eine Proteinbindungsregion, wie hierin beschrieben, verwendet werden. Bei Verwendung in solchen Kombinationen reduziert die erhöhte Produktion eines spezifischen Spaltungsproduktes in dem invasiven Spaltungsverfahren die Ansprüche an Empfindlichkeit und Spezifität der Auslesesysteme, wodurch deren Verwendung vereinfacht wird.

[0381] Die Kaskadenstrategie ermöglicht nicht nur verschiedene Nachweisplattformen, sondern eignet sich darüber hinaus für Multiplex-Analysen einzelner Analyte (d. h. einzelner Zielnukleinsäuren) in einer einzelnen Reaktion. Das Multiplex-Format kann in zwei Typen von Kategorien eingeteilt werden. In einem Fall ist es wünschenswert, die Identität (und Menge) eines jeden der Analyte, die in einer klinischen Probe vorhanden sein können, oder die Identität eines jeden der Analyte sowie eine interne Kontrolle zu kennen. Zur Identifizierung des Vorhandenseins mehrerer einzelner Analyte in einer einzigen Probe können mehrere distinkte sekundäre Amplifizierungssysteme eingeschlossen werden. Jede Sonde, die als Reaktion auf das Vorhandensein einer bestimmten Zielsequenz (oder internen Kontrolle) gespalten wird, kann entworfen werden, um eine andere Kaskade auszulösen, die an unterschiedliche nachweisbare Einheiten gekoppelt ist, beispielsweise unterschiedliche Sequenzen, die von einer DNA-Polymerase verlängert werden sollen, oder verschiedene Farbstof-

fe in einem FET-Format. Dadurch kann der Beitrag jeder spezifischen Zielsequenz zum Endprodukt nachverfolgt werden, was einen quantitativen Nachweis verschiedener Gene oder Allele in einer Probe ermöglicht, die eine Mischung von Genen/Allelen aufweist.

[0382] In der zweiten Konfiguration ist es wünschenswert zu bestimmen, ob von den verschiedenen Analyten welche in einer Probe vorhanden sind, aber die exakte Identität eines jeden muss nicht bekannt sein. In Blutbanken ist es beispielsweise wünschenswert zu wissen, ob in einer Blutprobe ein Wirt infektiöser Erreger vorhanden ist. Da das Blut verworfen wird, egal, welcher Erreger vorhanden ist, wären in einer solchen Anwendung der vorliegenden Erfindung keine unterschiedlichen Signale auf den Sonden erforderlich, und eigentlich aus Gründen des Datenschutzes nicht wünschenswert. In diesem Fall wären die 5'-Arme (d. h. der 5'-Anteil, der nach Spaltung frei gesetzt wird) der verschiedenen analytspezifischen Sonden identisch und würden daher dieselbe sekundäre Signalkaskade auslösen. Eine ähnliche Konfiguration würde erlauben, dass mehrere Sonden, die zu einem einzelnen Gen komplementär sind, verwendet werden, um das Signal dieses Gens zu verstärken, oder um Inklusivität sicherzustellen, wenn zahlreiche Allele eines nachzuweisenden Gens vorhanden sind.

[0383] In der primären Invader™-Reaktion gibt es zwei potenzielle Quellen von Hintergrund. Die erste stammt aus der Invader™-unabhängigen Spaltung einer Sonde, die durch eine Annealing-Reaktion an das Ziel oder an sich selbst oder an eines der anderen in der Reaktion vorhandenen Oligonukleotide gebunden ist. Indem Fig. 96 und Fig. 97 in Betracht gezogen werden, ist ersichtlich, dass die dargestellten Sonden der primären Spaltungsreaktion entworfen sind, um Bereiche der Komplementarität mit den anderen an den anschließenden Reaktionen beteiligten Oligonukleotiden aufzuweisen, und wie in Fig. 97 dargestellt ist, zu anderen Bereichen desselben Moleküls. Die Verwendung eines Enzyms, das eine Struktur ohne Primer nicht wirksam spalten kann (z. B. das die in **Fig.** 16A oder 16D als Diagramm dargestellten Strukturen nicht spalten kann), ist aus diesem Grund bevorzugt. Wie in Fig. 99 und Fig. 100 gezeigt ist, ergibt das Enzym Pfu FEN-1 in Abwesenheit des stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids oder selbst bei Vorhandensein eines stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids, das nicht in den Sonde-Ziel-Komplex eingreifen kann, keine nachweisbare Spaltung. Dies zeigt an, dass die Pfu FEN-1-Endonuklease ein geeignetes Enzym zur Verwendung in den Verfahren der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0384] Auch andere strukturspezifischen Nukleasen können geeignet sein. Wie in dem ersten Beispiel erläutert, können manche 5'-Nukleasen unter Bedingungen verwendet werden, die diese primerunabhängige Spaltung signifikant reduzieren. Beispielsweise wurde gezeigt, dass bei Verwendung der 5'-Nuklease von DNAP-Taq zur Spaltung von Haarnadeln die primerunabhängige Spaltung deutlich verringert ist, wenn die Reaktion ein monovalentes Salz enthält (Lyamichev, et al. [1993], oben).

Test auf Invader™-Oligonukleotid-unabhängige Spaltung

[0385] Für jedes Enzym in Kombination mit jedem Reaktionspuffer lässt sich ein einfacher Test durchführen, um das Ausmaß der Invader™-unabhängigen Spaltung, die bei der jeweiligen Kombination zu erwarten ist, zu messen. Ein einfaches haarnadelähnliches Testmolekül, das mit oder ohne einen an einen 3'-Arm hybridisierten Primer verwendet werden kann, das S-60-Molekül, ist in Fig. 30 gezeigt. Das S-60-Molekül und das Oligonukleotid P15 sind ein praktischer Satz von Molekülen, um die Eignung eines Enzyms hinsichtlich der Anwendung in der vorliegenden Erfindung zu testen, und Bedingungen zur Verwendung dieser Moleküle sind in Beispiel 11 beschrieben. Es können andere ähnliche Haarnadeln verwendet werden, oder es kann eine Spaltungsstruktur aus separaten Oligonukleotiden zusammengesetzt werden, wie als Diagramm in **Fig.** 99A–E dargestellt ist. In Beispiel 45 sind Reaktionen beschrieben, welche diese Strukturen verwenden, um die Aktivität des Pfu FEN-1-Enzyms in Gegenwart oder Abwesenheit eines stromaufwärts gelegenen überlappenden Oligonukleotids zu untersuchen, und die Ergebnisse sind in Fig. 100 gezeigt. Zur Testung einer bestimmten Kombination von Enzym und Spaltungsbedingungen lassen sich ähnliche Reaktionen zusammensetzen. Außerhalb der Variablen an Reaktionsbedingungen, die für ein bestimmtes Enzym zu testen sind (z. B. Salzempfindlichkeit, Bedarf an divalenten Kationen), sollten bei den Testreaktionen alle bekannten Einschränkungen des Testenzyms berücksichtigt werden. Beispielsweise sollten die Testreaktionen bei einer Temperatur durchgeführt werden, die innerhalb des Arbeitstemperaturbereiches des Kandidatenenzyms liegen, falls dieser bekannt ist.

[0386] Es ist nicht erforderlich, mehrere Überlappungslängen für jedes Kandidatenenzym aufzuzeigen, aber es sollte die Aktivität des Enzyms in Abwesenheit eines stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids (wie gezeigt in **Fig.** 99A) und in Gegenwart eines Oligonukleotids, das nicht überlappt (**Fig.** 99B), bestimmt werden. Es ist bevorzugt, dass Strukturen ohne ein stromaufwärts gelegenes Oligonukleotid bei weniger als der Hälfte der

Rate gespalten werden, die in Gegenwart eines stromaufwärts gelegenen überlappenden Oligonukleotids beobachtet wird. Es ist mehr bevorzugt, dass diese Strukturen bei weniger als etwa einem Zehntel der Rate der invasiven Spaltungsstruktur gespalten werden. Es ist am meisten bevorzugt, dass die Spaltung dieser Strukturen bei weniger als einem Prozent der Rate der invasiven Spaltungsstruktur stattfindet.

[0387] Wenn das gespaltene Produkt in einer anschließenden Spaltungsreaktion als ein stromaufwärts gelegenes Oligonukleotid dienen soll, wie in Fig. 96 als Diagramm gezeigt, wird die schnellste Reaktion erreicht, wenn die anderen Bestandteile der zweiten Spaltungsstruktur (d. h. Ziel 2 und Sonde 2 in Fig. 96) derart im Überschuss bereit gestellt sind, dass die Spaltung sofort fortfahren kann, nachdem das stromaufwärts gelegene Oligonukleotid (d. h. geschnittene Sonde 1 in Fig. 96) verfügbar gemacht wurde. Zur Bereitstellung großer Mengen des zweiten Zielstranges (Ziel 2 in Fig. 96) kann eine isolierte natürliche Nukleinsäure verwendet werden, beispielsweise Bakteriophage M13-DNA, oder es kann ein synthetisches Oligonukleotid verwendet werden. Wird als zweite Zielsequenz ein synthetisches Oligonukleotid gewählt, muss die verwendete Sequenz im Hinblick auf Selbst-Komplementaritätsbereiche untersucht werden (ähnliche Überlegungen gelten für kurze isolierte natürliche Nukleinsäuren, wie beispielsweise Restriktionsenzymfragmente oder PCR-Produkte; natürliche Nukleinsäurestränge, deren 3'-Ende sich ≥ 100 Nukleotide stromabwärts von der Sondenbindungsstelle auf dem Zielstrang befindet, sind ausreichend lang, um den unten erläuterten Entwurfsüberlegungen vorzubeugen). Insbesondere muss sichergestellt sein, dass das 3'-Ende des synthetischen Oligonukleotids stromaufwärts von der Sonde nicht an den Zielstrang hybridisiert (d. h. dass eine Intrastranghybridisierung stattfindet), was eine unbeabsichtigte Spaltung auslösen würde. Eine einfache Untersuchung der Sequenz des synthetischen Oligonukleotids sollte zeigen, ob das 3'-Ende genügend Komplementarität zu dem Bereich des Ziels stromaufwärts von der Sondenbindungsstelle aufweist, um ein Problem darzustellen (d. h. es würde sich zeigen, ob das synthetische Oligonukleotid an seinem 3'-Ende eine Haarnadel ausbilden kann, welche als ein Invasions-Oligonukleotid dienen könnte, um eine Spaltung der Sonde in Abwesenheit einer Hybridisierung des beabsichtigten Invader™-Oligonukleotids (d. h. des Spaltungsproduktes aus der ersten invasiven Spaltungsreaktion) zu bewirken). Wenn 3 oder mehrere der letzten 4 bis 7 Nukleotide (der 3'-terminale Bereich) des synthetischen Zieles stromaufwärts von der Sonde derart Basenpaarungen eingehen können, dass es eine Invasion in den Sonden-Ziel-Doppelstrang gibt, oder dass die von dem synthetischen Zielstrang mit seinem eigenen 3'-terminalen Bereich und mit der angrenzenden Sonde ausgebildeten Doppelstränge ohne Lücke und der 3'-terminale Bereich zusätzliche 1 oder 2 ungepaarte Nukleotide am äußersten 3'-Ende des synthetischen Ziels aufweisen, dann sollte die Sequenz des synthetischen Zieloligonukleotids modifiziert werden. Die Sequenz kann geändert werden, um die Wechselwirkung des 3'-terminalen Bereichs zu unterbrechen oder um den Abstand zwischen der Sondenbindungsstelle und den Bereichen, an denen der 3'-Terminus bindet, zu erhöhen. Alternativ kann das 3'-Ende modifiziert werden, um seine Fähigkeit zur Steuerung der Spaltung zu vermindern (z. B. durch Hinzufügen eines 3'-Phosphats während der Synthese) (siehe Bsp. 35, Tabelle 3), oder durch Hinzufügen mehrerer zusätzlicher Nukleotide, die keine Basenpaarungen infolge einer Selbst-Komplementaritär eingehen (d. h. sie nehmen nicht an der Ausbildung einer Haarnadelstruktur teil).

[0388] Wenn das Produkt einer ersten invasiven Spaltungsreaktion entworfen ist, um ein Ziel auszubilden, dass sich mit sich selbst falten kann, um die Spaltung einer zweiten Sonde zu steuern, d. h. des IT-Komplexes, wie in Fig. 97 als Diagramm dargestellt, muss der Entwurf der Sequenz, die verwendet wird, um Stamm/Schleife des IT-Komplexes zu bilden, Überlegungen unterzogen werden. Beim Entwurf einer solchen Sonde ist folgendes zu berücksichtigen: 1) die Länge des Bereiches der Selbst-Komplementarität, 2) die Länge des Überlappungsbereiches (Bereich „X" in Fig. 25) und 3) die Stabilität der Haarnadel oder der Stamm/Schleife-Struktur, wie sie durch die Watson-Crick-Basenpaarung und durch Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer besonderes stabilen Schleifensequenz prognostiziert würde (z. B. einer Vierfachschleife [Tinoco et al., oben] oder einer Dreifachschleife [Hirao et al., oben]). Es ist wünschenswert, dass diese Sequenz Nukleotide aufweist, die derart Basenpaarungen eingehen können (innerhalb des Stranges), dass die zweite Runde der invasiven Spaltung stattfinden kann, aber dass die Struktur nicht so stark ist, dass ihr Vorhandensein die Spaltung der Sonde in der primären Reaktion verhindert (d. h. Sonde 1 in Fig. 96). Wie hierin gezeigt, kann das Vorhandensein einer Sekundärstruktur im 5'-Arm einer Spaltungsstruktur, die von einer strukturspezifischen Nuklease gespalten wird, die Spaltung durch einige strukturspezifische Nukleasen hemmen (Bsp. 1).

[0389] Die Länge des Bereiches der Selbst-Komplementarität innerhalb von Sonde 1 bestimmt die Länge des Doppelstrangbereiches stromaufwärts von Sonde 2 in der zweiten Spaltungsstruktur (siehe Fig. 97). Bei unterschiedlichen Enzymen bestehen unterschiedliche Anforderungen an die Länge dieses Doppelstranges, damit eine effiziente invasive Spaltung stattfindet. Beispielsweise sind die Enzyme Pfu FEN-1 und Mja FEN-1 anhand des Satzes an Ziel/Invader™-Oligonukleotidmolekülen, gezeigt in Fig. 98 (d. h. SEQ ID Nr.: 118, 119, 147–151) hinsichtlich des Effektes dieser Doppelstranglänge getestet worden. Die invasiven Spaltungsreaktionen wurden für 5 Min. wie in Beispiel 38 beschrieben durchgeführt, wobei 1 pM IT3 (SEQ ID Nr.: 118), 2 µM

Sonde PR1 (SEQ ID Nr.: 119) verwendet wurden, und die Spaltungsraten sind in Tabelle 2 gezeigt.

TABELLE 2

Länge des Doppelstranges	*Pfu* FEN-1 Umsetzung je Minute	*Mja* FEN-1 Umsetzung je Minute
0	0	0
3	1	29
4	10	57
6	44	51
8	45	46

[0390] Die in Tabelle 2 gezeigten Daten zeigen, dass das Pfu FEN-1-Enzym mit Stämmen von 3 oder 4 Basen verwendet werden kann, aber dass die Spaltungsrate maximiert ist, wenn der Stamm eine Länge von mehr als 4 Basenpaaren aufweist. Tabelle 2 zeigt, dass das Mja FEN-1-Enzym bei Verwendung kürzerer Stämme wirksam spalten kann; da dieses Enzym eine Sonde aber auch in Abwesenheit eines stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids spalten kann, ist Mja FEN-1 nicht zur Verwendung in den Verfahren der vorliegenden Erfindung bevorzugt.

[0391] Ein ähnlicher Test kann unter Verwendung eines beliebigen Kandidatenenzyms durchgeführt werden um zu bestimmen, wie viel Selbst-Komplementarität in Sonde 1 hinein entworfen werden kann. Die Verwendung eines kürzeren Stammes bedeutet, dass die Gesamtsonde gegebenenfalls kürzer ist. Dies ist von Vorteil, da kürzere Sonden preisgünstiger synthetisiert werden können und da kürzere Sonden weniger Sequenzen aufweisen, die unbeabsichtigte Intrastrangstrukturen ausbilden könnten. Bei der Bestimmung der Aktivität eines Kandidatenenzyms in Bezug auf die Strukturen, wie beispielsweise auf solche, die in Fig. 98 gezeigt sind, ist es nicht erforderlich, dass die gewählte Stammlänge ein Stattfinden der Spaltung bei maximaler Rate zulässt. Wenn man den Fall der Pfu FEN-1 in Betracht zieht, überwiegen im Zusammenhang mit einem bestimmten Experiment die Vorteile der Verwendung eines Stammes aus 4 Basenpaaren (z. B. Kosten oder Sequenzeinschränkungen) bei einer Spaltungsrate von 10 Spaltungen je Minute den Vorteil, der sich in Bezug auf die Rate bei Verwendung eines längeren Stammes aus 6 Basenpaaren (44 Spaltungen/Min.) ergibt. Der Umfang der vorliegenden Erfindung schließt ein, dass manche Elemente, die zur Verwendung in dem Verfahren ausgewählt sind, für die Leistung des jeweiligen Elementes suboptimal sind, wenn die Verwendung eines suboptimalen Entwurfs den Aufgaben des entsprechenden Experimentes als Ganzes zu Gute kommt.

[0392] Beim Entwerfen von Oligonukleotiden, die als Sonde eingesetzt werden sollen, die nach Spaltung eine Stamm-Schleife-Struktur ausbildet, wie in Fig. 97 als Diagramm dargestellt (d. h. Sonde 1 in Fig. 97), wurde festgestellt, dass die Stabilität der Schleife keinen Faktor in Bezug auf die Effizienz der Spaltung von Sonde 1 oder Sonde 2 darstellt. Getestete Schleifen umfassten auch stabile Dreifachschleifen, Schleifen von 3 und 4 Nukleotiden, für welche die Prognose nicht auf besondere Stabilität hinwies (d. h. die Stabilität wird von der Doppelstrangsequenz bestimmt und nicht von zusätzlichen stabilisierenden Wechselwirkungen innerhalb der Schleife), und große Schleifen mit bis zu 25 Nukleotiden.

X. Nachweis von viraler DNA des humanen Zytomegalievirus durch invasive Spaltung

[0393] Das humane Zytomegalievirus (HCMV) verursacht viele verschiedene Krankheiten des Menschen bzw. ist mit vielen verschiedenen Krankheiten des Menschen assoziiert (Tabelle 3). Mehr als 90% der Knochenmark- oder Nierentransplantatempfänger (immunkomprimierte Wirte) entwickeln HCMV-Infektionen, von denen die meisten auf eine Reaktivierung von latentem Virus durch Immunsuppressiva sowie auf die Transmission von Virus durch latent infiziertes Spendergewebe oder -blut zurückzuführen sind (Ackerman et al., Transplant. Proc., 20 (S1): 468 [1988]; und Peterson et al., Medicine 59: 283 [1980]).

TABELLE 3 Krankheiten, die von dem humanen Zytomegalievirus verursacht werden

Einschlusskörperchenkrankheit/CID (Cytomegalic Inclusion Disease)
Infektiöse Mononukleose bei Neugeborenen ohne heterophile Antikörper
Mononukleose
Interstitielle Pneumonie
Pneumonitis
Retinitis
Hepatitis
Pankreatitis
Meningoenzephalitis
Magen-Darm-Erkrankungen
Septikämie

[0394] Es gibt Fälle, in denen eine schnelle, empfindliche und spezifische Diagnose einer HCMV-Erkrankung stattfinden muss. In den letzten Jahren ist die Anzahl der Patienten, bei denen eine Organ- oder Gewebetransplantation vorgenommen wird, deutlich gestiegen. HCMV ist die häufigste Todesursache bei immunkomprimierten Transplantatempfängern, was belegt, das ein Bedarf für eine schnelle und zuverlässige Labordiagnostik vorhanden ist. Lymphozyten, Monozyten und möglicherweise arterielle Endothel- oder Glattmuskelzellen sind Orte, an denen latente HCMV-Viren vorhanden sein können. Die Vorbeugung von HCMV-Infektionen bei immunkomprimierten Individuen (z. B. bei Transplantatempfängern) umfasst daher die Verwendung HCMV-negativer Blutprodukte und Organe. Darüber hinaus kann HCMV über die Plazenta und an Neugeborene weiter gegeben werden, indem sie während der Geburt mit infizierten Zervixsekret in Berührung kommen. Ein schnelles, empfindliches und spezifisches Verfahren zum Nachweisen von HCMV in Körperflüssigkeiten oder -absonderungen wäre daher als ein Mittel zur Infektionsüberwachung wünschenswert, und um so die Notwendigkeit eines Kaiserschnittes zu bestimmen.

[0395] Die Diagnose von HCMV-Infektionen kann anhand klassischer Zellkulturen mit Humanfibroblasten, mit Zellkulturverfahren nach dem „Shell-Vial"-Prinzip unter Verwendung monoklonaler Antikörper und Immunfluoreszenzfärbetechniken, mit serologischen Verfahren, mit dem HCMV-Antigenämieverfahren, das einen monoklonalen Antikörper zum Nachweis von HCMV-Antigen in peripheren Blutleukozyten (PBL) verwendet, oder durch Nukleinsäurehybridisierungsverfahren durchgeführt werden. Diese verschiedenen Verfahren haben ihre Vorteile und Einschränkungen. Klassische Zellkultur ist empfindlich, aber langsam, da es 30 oder mehr Tage dauern kann, bis sich ein zytopathischer Effekt (CPE) entwickelt. Zellkulturverfahren nach dem „Shell-Vial"-Prinzip sind schneller, erfordert aber immer noch 24–48 Stunden, bis erste Ergebnisse erhalten werden. Beide Kulturverfahren werden von einer antiviralen Therapie beeinflusst. Bei immunkomprimierten Patienten ist die Fähigkeit der Entwicklung einer IgG- und/oder IgM-Antikörperantwort auf eine HCMV-Infektion beeinträchtigt, und serologische Verfahren sind daher unter diesen Bedingungen nicht zuverlässig. Alternativ können IgM-Antikörper nach Auflösen der Infektion monatelang persistieren, und ihr Vorhandensein zeigt nicht zwingend eine aktive Infektion an. Die HCMV-Antigenämie-Verfahren sind arbeitsaufwändig und lassen sich nur auf PBL-Präparate anwenden.

[0396] Kürzlich erzielte Fortschritte in der Molekularbiologie haben die Verwendung von DNA-Sonden in Versuchen, ein schnelleres, empfindlicheres und spezifischeres Verfahren zum Nachweis von HCMV in klinischen Präparaten bereit zu stellen, vorangetrieben. Beispielsweise sind radioaktiv markierte DNA-Sonden verwendet worden, um an Gewebekulturen zu hybridisieren, die mit oder von HCMV infiziert waren, oder in klinischen Proben, die im Verdacht standen, HCMV zu enthalten („Hybridisierungsverfahren"). Die Untersuchung von Gewebekulturen erfordert aber ein Wachstum von wenigstens 18–24 Stunden, um das nachzuweisende Antigen (HCMV), falls vorhanden, zu amplifizieren, und weitere Zeit für die Entwicklung autoradiografischer Nachweis-

systeme. Der Verwendung von Hybridisierungsverfahren zum Testen klinischer Präparate auf HCMV kann es jedoch an Empfindlichkeit mangeln, je nach dem Titer des Virus und der getesteten klinischen Probe. Wie berichtet wurde, wurde zum Nachweis von HCMV in klinischen Proben die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet, um HCMV-DNA enzymatisch zu amplifizieren. Verfahren unter Verwendung der PCR schneiden bei einem Vergleich mit Virusisolation, In-situ-Hybridisierungsverfahren und Southern Blotting vorteilhaft ab; Siehe z. B. Bamborschke et al,. J. Neurol., 239: 205 [1992]; Drouet et al., J. Virol. Meth., 45: 259 [1993]; Einsele et al., Blood 77: 1104–1110 [1991]: Einsele et al., Lancet 338: 1170 [1991]; Lee et al., Aust. NZ J. Med., 22: 249 [1992]: Miller et al., J. Clin. Microbiol., 32: 5 [1994]; Rowley et al., Transplant. 51: 1028 [1991]; Spector et al. J. Clin. Microbiol., 30: 2359 [1992] und Stanier et al., Mol. Cell. Probes 8: 51 (1992]). Andere, die das HCMV-Antigenämieverfahren mit PCR-Verfahren verglichen haben, haben PCR-Verfahren gefunden, die beim Nachweis von HCMV genauso effizient oder etwas effizienter sind (van Dorp et al. (1992) Transplant. 54: 661, Gema et al. (1991) J. Infect. Dis. 164: 488; Vleiger et al. (1992) Bone Marrow Transplant. 9: 247; Zipeto et al. (1992) J. Clin. Microbiol. 30: 527). Darüber hinaus haben PCR-Verfahren hohe Empfindlichkeit gezeigt, wenn andere Präparate als PBLs untersucht wurden (Natori et al., Kansenshogaku Zasshi 67: 1011 [1993]; Peterson et al., Medicine 59: 283 [1980]; Prosch et al., J. Med. Virol., 38: 246 [1992]: Ratnamohan et al., J, Med. Virol. 38: 252 [1992]). Aufgrund der Gefahren falsch positiver Reaktionen erfordern diese PCR-basierten Verfahren jedoch strenge Kontrollen, um eine Kontaminierung und Verschleppung zu verhindern (Ehrlich et al., in PCR-Based Diagnostics in Infectious Diseases, Ehrlich and Greenberg (Hrsg), Blackwell Scientific Publications, [1994], S. 3–18). Es besteht daher ein Bedarf für ein schnelles, empfindliches und spezifisches Verfahren für HCMV, bei dem das Risiko falsch positiver Ergebnisse infolge einer Kontaminierung mit aus anderen Proben verschleppten Reaktionsprodukten verringert ist.

[0397] Wie hierin gezeigt, ist das Invader™-gesteuerte Spaltungsverfahren schnell, empfindlich und spezifisch. Da die akkumulierten Produkte nicht zur weiteren Akkumulierung von Signal beitragen, können Reaktionsprodukte, die von einem standardmäßigen (d. h. nicht sequenziellen) Invader™-gesteuerten Spaltungsverfahren zu einem anderen verschleppt werden, keine falsch positiven Ergebnisse bewirken. Die Verwendung mehrerer sequenzieller Invader™-gesteuerter Spaltungsverfahren erhöht die Empfindlichkeit des HCMV-Nachweises weiter, ohne diese Vorteile zu verlieren.

XI. Effekt von Arrestor™-Oligonukleotiden auf Signal und Hintergrund bei aufeinander folgenden invasiven Spaltungsreaktionen

[0398] Wie oben beschrieben und in Beispiel 36 gezeigt, kann die Konzentration der Sonde, die gespalten wird, verwendet werden, um die Rate der Signalakkumulation zu erhöhen, wobei höhere Sondenkonzentrationen ein höheres Endsignal ergeben. Allerdings kann das Vorhandensein großer Mengen an ungespaltener Restsonde Probleme für die anschließende Verwendung der gespaltenen Produkte zum Nachweis oder zur weiteren Amplifikation darstellen. Wenn es sich bei dem Anschlussschritt um einen einfachen Nachweis handelt (z. B. durch Gelauftrennung), kann das überschüssige ungeschnittene Material durch Streifenbildung oder Streuung von Signal oder durch Überforderung eines Detektors (z. B. Überbelichtung eines Films im Fall von Radioaktivität oder Überschreiten der quantitativen Nachweisgrenzen eines Fluoreszenzimagers) Hintergrund verursachen. Dies lässt sich überwinden, indem das Produkt von der ungeschnittenen Sonde abgetrennt wird (z. B. durch Verwendung des im Beispiel 22 verwendeten Ladungsumkehrungsverfahrens).

[0399] Bei komplexeren Nachweisverfahren kann beabsichtigt sein, dass das gespaltene Produkt mit einer anderen Einheit wechselwirkt, um eine Spaltung anzuzeigen. Wie oben erwähnt, lässt sich das gespaltene Produkt in jeder Reaktion verwenden, die Oligonukleotide einsetzt, beispielsweise bei Hybridisierung, Primerverlängerung, Ligation oder der Steuerung einer invasiven Spaltung. In all diesen Fällen muss das Schicksal der restlichen ungeschnittenen Sonde beim Entwerfen der Reaktion berücksichtigt werden. Bei einer Primerverlängerungsreaktion kann die ungeschnittene Sonde zur Verlängerung an eine Vorlage hybridisieren. Ist eine Spaltung erforderlich, um das korrekte 3'-Ende für die Verlängerung zu erhalten, wird die hybridisierte ungeschnittene Sonde nicht verlängert. Allerdings konkurriert sie mit dem gespaltenen Produkt um die Vorlage. Liegt die Vorlage im Überschuss zur Kombination von gespaltener und ungespaltener Sonde vor, dann sollten beide der Letztgenannten in der Lage sein, eine Vorlagenkopie zur Bindung zu finden. Ist dagegen die Vorlage limitierend, verringert das Konkurrieren den Anteil der gespaltenen Sonde, der erfolgreich an die verfügbare Vorlage binden kann. Wurde ein großer Überschuss an Sonde verwendet, um die anfängliche Reaktion anzutreiben, kann der Rest auch in großem Überschuss zum Spaltungsprodukt vorhanden sein, und daher einen sehr effektiven Kompetitor darstellen, was die Menge an Reaktionsendprodukt (z. B. der Verlängerung) für den abschließenden Nachweis verringert.

[0400] Auch die Teilnahme des ungeschnittenen Sondenmaterials an einer sekundären Reaktion kann zum

Hintergrund in diesen Reaktionen beitragen. Obgleich die Präsentation einer gespaltenen Sonde für eine Anschlussreaktion ein ideales Substrat für das im nächsten Schritt zu verwendende Enzym darstellen kann, könnten manche Enzyme ebenfalls in der Lage sein, auch auf die ungeschnittene Sonde einzuwirken, wenn auch nicht effizient. In Beispiel 43 wurde gezeigt, dass sich Transkription auch dann von einem Promotor mit Einzelstrangbruch aus starten lässt, wenn eine Seite des Einzelstrangbruches zusätzliche ungepaarte Nukleotide aufweist (wird in diesem Beispiel als „verzweigter Promotor" bezeichnet). Soll es sich entsprechend bei der Anschlussreaktion um eine invasive Spaltungsstruktur handeln, kann die ungespaltene Sonde an die Elemente binden, welche die zweite Spaltungsstruktur mit der gespaltenen Sonde bilden sollen. Zwei der möglichen Konfigurationen sind in **Fig. 105** und **Fig. 106** schematisch gezeigt. Die rechte Struktur im zweiten Schritt in jeder Figur zeigt eine mögliche Konfiguration, die von den sekundären Reaktionselementen (z. B. sekundäre Ziele und/oder Sonden) und der ungespaltenen primären Sonde ausgebildet wird. In all diesen Fällen wurde festgestellt, dass die hierin beschriebenen 5'-Nukleasen eine Spaltung dieser defekten Strukturen in gewissem Maß steuern können. Selbst auf niedrigem Niveau kann die anomale Spaltung als positives zielspezifisches Spaltungssignal fehlinterpretiert werden.

[0401] In Anbetracht dieser negativen Effekte auf das Übermaß an ungeschnittener Sonde liegt ein eindeutiger Bedarf für ein Verfahren zum Verhindern dieser Interaktionen vor. Wie oben erwähnt, ist es möglich, das gespaltene Produkt nach der primären Reaktion durch herkömmliche Verfahren von der ungeschnittenen Sonde zu trennen. Diese Verfahren sind aber häufig zeitaufwändig, können teuer sein (z. B. Einwegsäulen, Gele, etc.) und könnten das Risiko einer falschen Handhabung oder Kontaminierung der Probe erhöhen. Es ist bei Weitem bevorzugt, die sequenziellen Reaktionen so zu konfigurieren, dass die ursprüngliche Probe für die Anschlussreaktion nicht in ein neues Gefäß überführt werden muss.

[0402] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Verringern der Wechselwirkungen zwischen der primären Sonde und allen anschließenden Reaktionspartnern bereit. Dieses Verfahren stellt ein Mittel bereit, um die ungespaltenen Sonden spezifisch von einer Teilnahme an den Anschlussreaktionen abzuhalten. Dieses Abhalten wird erreicht, indem im nächsten Reaktionsschritt ein Agens eingeschlossen wird, das entworfen ist, um spezifisch mit der ungespaltenen primären Sonde zu interagieren. Während aus praktischen Gründen die primäre Sonde in einer invasiven Spaltungsreaktion in Betracht gezogen wird, könnten auch, wie erforderlich oder gewünscht für den Entwurf eines Verfahrens, in jedem Reaktionsschritt innerhalb einer Kette von invasiven Spaltungsschritten die Arrestors™ verwendet werden. Es ist nicht beabsichtigt, dass die Arrestors™ der vorliegenden Erfindung auf einen bestimmten Schritt beschränkt sind.

[0403] Das Verfahren des Abhaltens der restlichen ungeschnittenen Sonden von einer primären Reaktion nutzt Mittel, die spezifisch entworfen oder ausgewählt werden können, um mit höherer Affinität an die ungespaltenen Sondenmoleküle zu binden als an die gespaltenen Sonden, wodurch die gespaltenen Sondenarten effektiv um die Elemente der Anschlussreaktionen konkurrieren können, selbst wenn die ungeschnittene Sonde in großem Überschuss vorhanden ist. Diese Mittel wurden als „Arrestors™" bezeichnet, da sie die Funktion haben, die primäre Sonde von einer Teilnahme an der späteren Reaktion ab- oder aufzuhalten. In verschiedenen Beispielen unten ist ein Oligonukleotidmolekül in einem invasiven Spaltungsverfahren als Arrestor™ bereit gestellt. Jedes Molekül oder jede Chemikalie, die zwischen der ungeschnittenen Sonde in voller Länge und der gespaltenen Sonde unterscheiden und die ungespaltene Sonde binden oder auf andere Weise inaktivieren kann, kann vorzugsweise konfiguriert werden, um innerhalb der Bedeutung der vorliegenden Erfindung als Arrestor™ zu wirken. Beispielsweise lassen sich Antikörper mit einer solchen Spezifität ableiten sowie die „Aptamere", die durch mehrere Schritte einer In-vitro-Amplifizierung (z. B. „SELEX", US-Patent Nr. 5,270,163 und 5,567,588) und spezifische Runden einer Erfassung oder ein anderes Auswahlmittel ausgewählt werden können.

[0404] In einer Ausführungsform ist der Arrestor™ ein Oligonukleotid. In einer anderen Ausführungsform ist der Oligonukleotid-Arrestor™ ein zusammen gesetztes Oligonukleotid, das zwei oder mehrere kurze Oligonukleotide umfasst, die nicht kovalent verknüpft sind, aber kooperativ binden und durch koaxiales Stapeln (Stacking) stabilisiert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Oligonukleotid modifiziert, um Wechselwirkungen mit den Spaltungsmitteln der vorliegenden Erfindung zu verringern. Wenn ein Oligonukleotid als Arrestor™ verwendet wird, ist beabsichtigt, dass es nicht an den anschließenden Reaktionsschritten teilnimmt. Inbetrachtziehen der schematischen Diagramme in **Fig. 105** und **Fig. 106**, insbesondere der Figur ganz rechts in Schritt 2b jeder Figur, zeigt, dass die Bindung des Arrestors™ an die primäre Sonde entweder mit oder ohne Beteiligung des sekundären Ziels eine gegabelte Struktur erzeugen kann, die ein Substrat für die Spaltung durch die 5'-Nukleasen darstellt, die in einigen Ausführungsformen der Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die Ausbildung solcher Strukturen würde zu einem gewissen Maß an unbeabsichtigter Spaltung führen, die zum Hintergrund beitragen, das spezifische Signal reduzieren oder um das

Enzym konkurrieren könnte. Es ist bevorzugt, Arrestors™ bereit zu stellen, die keine solchen Spaltungsstrukturen erzeugen. Ein Verfahren, um dies zu erreichen, ist es, dem Arrestor™ solche Modifikationen hinzuzufügen, bei denen festgestellt wurde, dass sie die Aktivität der Invader™-Oligonukleotide verringern, weil die Invader™-Oligonukleotide innerhalb der Spaltungsstruktur eine ähnliche Position einnehmen (d. h. das 3'-Ende des Invader™-Oligonukleotide positioniert die Spaltungsstelle eines ungepaarten 5'-Arms). In Beispiel 35 wurde eine Modifikation des 3'-Endes der Invader™-Oligonukleotide hinsichtlich der Effekte auf die Spaltung untersucht; es stellte sich heraus, dass eine Reihe der getesteten Modifikationen die Funktion des Invader™-Oligonukleotids wesentlich abschwächt. Andere, hierin nicht beschriebene Modifikationen können leicht charakterisiert werden, indem ein solcher Test unter Verwendung des bei der Reaktion, für die der Arrestor™ bestimmt ist, zu verwendenden Spaltungsenzyms durchgeführt wird.

[0405] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Gerüst eines Oligonukleotid-Arrestors™ modifiziert. Dies kann mit dem Ziel erfolgen, den Widerstand gegenüber einem Abbau durch Nukleasen oder Temperatur zu erhöhen oder um eine Doppelstrangstruktur bereit zu stellen, die ein weniger günstiges Substrat für das zu verwendende Enzym darstellt (z. B. Doppelstrang mit Form A gegenüber Doppelstrang mit Form B). In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das gerüstmodifizierte Oligonukleotid des Weiteren eine 3'-terminale Modifikation. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Modifikationen eine 2'-O-Methyl-Substitution des Nukleinsäuregerüstes, während das 2'-O-Methyl-modifizierte Oligonukleotid in einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Weiteren eine 3'-terminale Amingruppe umfasst.

[0406] Der Arrestor™ hat den Zweck zuzulassen, dass die Minderheitspopulation an gespaltener Sonde effektiv mit der ungespaltenen Sonde um die Bindung aller im nächsten Schritt zu verwendenden Elemente konkurriert. Ein Arrestor™, der absolut zwischen den beiden Sondenarten unterscheiden kann (d. h. der nur an die ungeschnittene und niemals an die geschnittene Sonde bindet) wäre in manchen Ausführungsformen zwar von größtem Vorteil, aber es ist beabsichtigt, dass die Arrestors™ der vorliegenden Erfindung in vielen Anwendungen, einschließlich den hierin beschriebenen sequenziellen Invader™-Verfahren, die beabsichtigte Funktion mit lediglich partieller Unterscheidung ausüben. Wenn eine gewisse Interaktion zwischen dem Arrestor™ und der gespaltenen Sonde vorliegt, könnte dieser einen Nachweis einiger Anteile dieser Spaltungsprodukte verhindern, was die absolute Menge an Signal, die von einer bestimmten Menge an Zielmaterial erzeugt wird, verringert. Wenn derselbe Arrestor™ gleichzeitig den Effekt der Reduzierung des Hintergrundes der Reaktion (d. h. der unspezifischen Spaltung) um einen Faktor besitzt, der größer ist als der Faktor der Reduzierung des spezifischen Signals, ist die Signifikanz des Signals (d. h. das Verhältnis von Signal zu Hintergrund) erhöht, selbst bei der geringeren Menge an absolutem Signal. Jeder potenzielle Arrestor™-Entwurf kann auf einfache Weise getestet werden, indem die Menge an Hintergrundsignal und spezifischem Signal aus Reaktionen, die keinen Arrestor™ aufweisen, mit der Menge an Hintergrundsignal und spezifischem Signal aus Reaktionen, die Arrestor™ aufweisen, verglichen wird. Jede der in Beispiel 49–53 beschriebenen Reaktionen zeigt die Verwendung solcher Vergleiche, und diese können von einem Fachmann leicht auf andere Arrestors™ und Zielausführungsformen angepasst werden. Was ein annehmbares Maß an Einbuße an absolutem Signal zugunsten von Spezifität darstellt, variiert bei verschiedenen Anwendungen (z. B. Zielmaß, Ausleseempfindlichkeit, etc.) und lässt sich anhand der Verfahren der vorliegenden Erfindung von jedem Anwender bestimmen.

EXPERIMENTELLER TEIL

[0407] Die folgenden Beispiele dienen dazu, bestimmte bevorzugte Ausführungsformen und Aspekte der vorliegenden Erfindung zu veranschaulichen, und sind nicht als deren Umfang einschränkend zu betrachten.

[0408] In der folgenden Beschreibung gelten folgende Abkürzungen: Afu (Archaeoglobus fulgidus); Mth (Methanobacterium thermoautotrophicum); Mja (Methanococcus jannaschii); Pfu (Pyrococcus furiosus); Pwo (Pyrococcus woesei); Taq (Thermus aquaticus); Taq DNAP, DNAPTaq und Taq Pol I (T. aquaticus DNA-Polymerase I); DNAPStf (das Stoffel-Fragment von DNAPTaq); DNAPEc1 (E. coli-DNA-Polymerase I); Tth (Thermus thermophilus); Bsp. (Beispiel); Fig. (Figur); GC (Grad Celsius); g (Gravitationsfeld); Std. (Stunde); Min (Minute); Oligo (Oligonukleotid); Rxn (Reaktion); Vol (Volumen); Gew./Vol. (Gewicht je Volumen); Vol./Vol. (Volumen je Volumen); BSA (bovines Serumalbumin); CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid); HPLC (High Pressure Liquid Chromatography); DNA (Desoxyribonukleinsäure); p (Plasmid); µl (Mikroliter); ml (Milliliter); µg (Mikrogramm); mg (Milligramm); M (Molar); mM (Millimolar); µM (Mikromolar); pmol (Pikomol): amol (Attomol); zmol (Zeptomol); nm (Nanometer); kDa (Kilodalton); OD (optische Dichte); EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure); FITC (Fluoreszeinisothiocyanat); SDS (Sodiumdodecylsulfat); $NaPO_4$ (Natriumphosphat); NP-40 (Nonidet P-40); Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan); PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid); TBE (Tris-Borat-EDTA, d. h. Tris-Puffer titriert mit Borsäure anstatt HCl und EDTA enthaltend); PBS (phosphatgepufferte Salzlösung); PPBS (phosphatgepufferte Salzlösung mit 1 mM PMSF); PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese); Tween

(Polyoxyethylensorbitan); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA); DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig); Ambion (Ambion, Inc., Austin, TX; USA); Boehringer (Boehringer Mannheim Biochemical, Indianapolis, IN, USA); MJ Research (MJ Research, Watertown, MA, USA; Sigma (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA); Dynal (Dynal A. S., Oslo, Norwegen); Gull (Gull Laboratories, Salt Lake City, UT, USA); Epicentre (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA); MJ Research (MJ Research, Watertown, MA, USA); National Biosciences (National Biosciences, Plymouth, MN, USA); NEB (New England Biolabs, Beverly, MA, USA); Novagen (Novagen, Inc., Madison, WI, USA); Perkin Elmer (Perkin-Elmer/ABI, Norwalk, CT, USA); Promega (Promega, Corp., Madison, WI, USA); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA): Clonetech (Clonetech, Palo Alto, CA, USA) Pharmacia (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA); Milton Roy (Milton Roy, Rochester, NY, USA); Amersham (Amersham International, Chicago, IL, USA) und USB (U.S. Biochemical, Cleveland, OH, USA).

[0409] Beispiel 46 bis 53 betreffen Ausführungsformen, die Teil der Ansprüche sind. Beispiel 1 bis 45 betreffen Ausführungsformen, die nicht Teil der Ansprüche sind.

BEISPIEL 1

Eigenschaften nativer thermostabiler DNA-Polymerasen

A. 5'-Nuklease-Aktivität von DNAPTaq

[0410] Während der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al., Science 239: 487 [1988]; Mullis und Faloona, Meth. Enzymol. 155: 335 [1987]) kann DNAPTaq viele, aber nicht alle, DNA-Sequenzen amplifizieren. Eine Sequenz, die sich nicht mit DNAPTaq amplifizieren lässt, ist in der **Fig. 5** gezeigt (die Haarnadelstruktur ist Seq.-ID Nr. 15; **Fig. 5** zeigt auch einen Primer: Seq.-ID Nr. 17). Diese DNA-Sequenz hat die Unterscheidungseigenschaft, dass sie sich ebenfalls auf sich selbst falten kann, so dass eine Haarnadel mit zwei einzelsträngigen Armen erhalten wird, die den in der PCR verwendeten Primern entsprechen.

[0411] Zur Untersuchung, ob dieses Versagen bei der Amplifikation aufgrund von 5'-Nukleaseaktivität des Enzyms beruht, wurden die Fähigkeiten von DNAPTaq und DNAPStf zur Amplifikation dieser DNA-Sequenz während 30 PCR-Zyklen verglichen. Die synthetischen Oligonukleotide wurden erhalten von The Biotechnology Center an der Universität von Wisconsin-Madison. Die DNAPTaq und DNAPStf wurden von Perkin Elmer erhalten (d. h. Amplitaq™ DNA-Polymerase und das Stoffelfragment der Amplitaq™ DNA-Polymerase). Die Substrat-DNA umfasste die in **Fig. 6** gezeigte Haarnadelstruktur, die in einer doppelsträngigen Form in pUC19 kloniert ist. Die bei dieser Amplifikation verwendeten Primer sind in den Seq.-ID Nr. 16 bis 17 aufgeführt. Der Primer Seq.-ID Nr. 17 ist in der **Fig. 5** an den 3'-Arm der Haarnadelstruktur hybridisiert gezeigt. Primer Seq.-ID Nr. 16 ist in **Fig. 5** als die ersten 20 Nukleotide in Fett gedruckt auf dem 5'-Arm der Haarnadel gezeigt.

[0412] Die Polymeraskettenreaktionen umfassten 1 ng superhelikale Plasmid-Ziel-DNA, jeweils 5 pmol Primer, jeweils 40 µM dNTPs, und 2,5 Units DNAPTaq oder DNAPStf, in 50 µl Lösung aus 10 mM Tris-Cl pH-Wert 8,3. Die DNAPTaq-Reaktionen enthielten 50 mM KCl und 1,5 mM $MgCl_2$. Das Temperaturprofil war 95°C für 30 s, 55°C für 1 min und 72°C für 1 min, über 30 Zyklen. 10 Prozent jeder Reaktion wurde durch Gelelektrophorese auf 6% Polyacrylamid (vernetzt 29:1) in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA analysiert.

[0413] Die Ergebnisse sind in der **Fig. 6** gezeigt. Das erwartete Produkt wurde durch DNAPStf (einfach angegeben als "S"), aber nicht durch DNAPTaq (angegeben als "T") hergestellt. Es wurde geschlossen, dass die 5'-Nuklease-Aktivität der DNAPTaq für das Fehlen der Amplifikation dieser DNA-Sequenz verantwortlich ist.

[0414] Zur Untersuchung, ob die 5'-ungepaarten Nukleotide im Substratbereich dieser strukturierten DNA durch DNAPTaq entfernt wurden, wurde das Schicksal des endmarkierten 5'-Arms während vier PCR-Zyklen mit den gleichen zwei Polymerasen verglichen (**Fig. 7**). Die Haarnadelmatrizen, wie diejenige, die in der **Fig. 5** beschrieben ist, wurden hergestellt mittels DNAPStf und einem ^{32}P-5'-endmarkierten Primer. Das 5'-Ende der DNA wurden als sehr große Fragmente durch DNAPTaq, aber nicht durch DNAPStf freigesetzt. Die Größen dieser Fragmente (auf der Basis ihrer Mobilitäten) zeigen, dass sie einen Großteil oder den gesamten ungepaarten 5'-Arm der DNA enthalten. Somit erfolgt eine Spaltung an oder nahe der Basis des gegabelten Doppelstrangs. Diese freigesetzten Fragmente enden mit 3'-OH-Gruppen, wie durch direkte Sequenzanalyse und die Fähigkeiten der Fragmente bewiesen wurde, die durch terminale Desoxynukleotidyl-Transferase verlängert werden sollen.

[0415] Die **Fig.** 8 bis 10 zeigen die Ergebnisse der Experimente, die dazu ausgelegt sind, dass sie die durch DNAPTaq katalysierte Spaltungsreaktion charakterisieren sollen. Wenn nicht anders angegeben umfassten die Spaltungsreaktionen 0,01 pmol hitzedenaturierte endmarkierte Haarnadel-DNA (wobei der unmarkierte komplementäre Strang ebenfalls zugegen war), 1 pmol Primer (komplementär zum 3'-Arm) und 0,5 Units DNAPTaq (geschätzt auf 0,026 pmol) in einem Gesamtvolumen von 10 µl 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5, 50 mM KCl und 1,5 mM $MgCl_2$. Wie angezeigt, hatten einige Reaktionen verschiedene KCl-Konzentrationen, und die genauen Zeiten und Temperaturen, die in jedem Experiment verwendet werden, sind in einzelnen Figuren angegeben. Die Reaktionen, die einen Primer enthielten, verwendeten den in **Fig. 5** gezeigten Primer (Seq.-ID Nr. 17). In einigen Fällen wurde der Primer zu Verbindungsstelle verlängert, indem Polymerasen und ausgewählte Nukleotide bereitgestellt wurden.

[0416] Die Reaktionen wurden bei der endgültigen Reaktionstemperatur durch Zugabe von $MgCl_2$ oder Enzym gestartet. Die Reaktionen wurden bei ihren Inkubationstemperaturen durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen gestoppt. Die aufgeführten T_m-Berechnungen erfolgten mit der Oligo™-Primer-Analyse-Software von National Biosciences, Inc. Diese wurden bestimmt mit einer DNA-Konzentration von 0,25 µM, bei entweder 15 oder 65 mM Gesamt-Salz (1,5 mM $MgCl_2$ in sämtlichen Reaktionen wurde ein Wert von 15 mM Salz für diese Berechnungen gegeben.

[0417] **Fig.** 8 ist ein Autoradiogramm, das die Ergebnisse einer Reihe von Experimenten und Bedingungen an der Spaltstelle enthält. **Fig. 8A** ist eine Bestimmung der Reaktionskomponenten, die die Spaltung ermöglichen. Die Inkubation von 5'-endmarkierter Haarnadel-DNA erfolgte für 30 min bei 55°C mit den angegebenen Komponenten. Die Produkte wurden durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgelöst, und die Längen der Produkte in Nukleotiden sind angegeben. **Fig. 8B** beschreibt die Wirkung der Temperatur an der Spaltstelle in Abwesenheit von zugefügtem Primer. Die Reaktionen wurden in Abwesenheit von KCl für 10 min bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Die Längen der Produkte in Nukleotiden sind angegeben.

[0418] Überraschenderweise erfordert die Spaltung durch DNAPTaq weder einen Primer noch dNTPs (siehe **Fig. 8A**). Somit kann die 5'-Nuklease-Aktivität von der Polymerisation entkoppelt werden. Die Nuklease-Aktivität erfordert Magnesiumionen, obgleich sie gegen Manganionen ersetzt werden können, wenngleich mit potentiellen Änderungen in Spezifität und Aktivität. Weder Zink- noch Calciumionen unterstützen die Spaltungsreaktion. Die Reaktion erfolgt über einen breiten Temperaturenbereich von 25°C bis 85°C wobei die Spaltungsrate bei höheren Temperaturen ansteigt.

[0419] In der **Fig.** 8 wird der Primer nicht in Abwesenheit zugefügter dNTPs verlängert. Der Primer beeinflusst jedoch die Stelle und die Spaltrate der Haarnadel. Die Änderung in der Spaltstelle (**Fig. 8A**) beruht offensichtlich auf der Unterbrechung eines kurzen Doppelstrangs, der zwischen den Armen des DNA-Substrates gebildet wird. In Abwesenheit des Primers konnten sich die Sequenzen, die durch Unterstreichen in **Fig. 5** angezeigt wurden, paaren und einen verlängerten Doppelstrang bilden. Die Spaltung an dem Ende des verlängerten Doppelstrangs setzt das 11 Nukleotide große Fragment frei, das in den Spuren von **Fig. 8A** gezeigt ist, ohne zugefügten Primer. Die Zugabe von überschüssigem Primer (**Fig. 8A**, Spuren 3 und 4) oder die Inkubation bei einer erhöhten Temperatur (**Fig. 8B**) unterbricht die kurze Extension des Doppelstrangs und führt zu einem längeren 5'-Arm und somit zu längeren Spaltprodukten.

[0420] Die Stelle des 3'-Endes des Primers kann die genaue Spaltstelle beeinflussen. Elektrophoreseanalyse ergab, dass in Abwesenheit von Primer (**Fig. 8B**) die Spaltung am Ende des Substrat-Doppelstrangs (je nach der Temperatur entweder die verlängerte oder verkürzte Form) zwischen den ersten und zweiten Basenpaaren erfolgt. Wird der Primer bis zur Basis des Doppelstrangs verlängert, erfolgt die Spaltung auch ein Nukleotid in den Doppelstrang hinein. Existiert jedoch eine Lücke von vier oder sechs Nukleotiden zwischen dem 3'-Ende des Primers und dem Substrat-Doppelstrang, wird die Spaltstelle vier bis sechs Nukleotide in 5'-Richtung verschoben.

[0421] **Fig.** 9 beschreibt die Kinetiken der Spaltung in der Gegenwart (**Fig. 9A**) oder Abwesenheit (**Fig. 9b**) eines Primer-Oligonukleotids. Die Reaktionen erfolgten bei 55°C entweder mit 50 mM KCl (**Fig. 9A**) oder 20 mM KCl (**Fig. 9B**). Die Reaktionsprodukte wurden durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgelöst, und die Längen der Produkte in Nukleotiden sind angegeben. "M" steht für Marker und ist ein 5'-endmarkiertes 19-nt-Oligonukleotid. Unter diesen Salzbedingungen zeigen die **Fig. 9A** und **Fig. 9B**, dass die Reaktion etwa 20 Mal schneller in Gegenwart der Primer abläuft als in Abwesenheit der Primer. Diese Auswirkung auf die Effizienz kann der richtigen Ausrichtung und Stabilisierung des Enzyms auf dem Substrat zugeordnet werden.

[0422] Der relative Einfluss des Primers auf die Spaltraten wird viel größer, wenn beide Reaktionen in 50 mM KCl erfolgen. In Anwesenheit von Primer steigt die Spaltrate mit der KCl-Konzentration auf etwa 50 mM. Die Hemmung dieser Reaktion in der Gegenwart von Primer ist jedoch bei 100 mM offensichtlich und bei 150 mM KCl beendet. In Abwesenheit von Primer ist dagegen die Rate durch eine KCl-Konzentration bis zu 20 mM erhöht, wird aber bei Konzentrationen über 30 mM reduziert. Bei 50 mM KCl wird die Reaktion fast vollständig gehemmt. Die Hemmung der Spaltung durch KCl in Abwesenheit von Primer wird durch die Temperatur beeinflusst und ist bei niedrigeren Temperaturen stärker betont.

[0423] Die Erkennung des 5'-Endes des zu spaltenden Arms scheint eine wichtige Eigenschaft der Substraterkennung zu sein. Substrate, die kein freies 5'-Ende haben, wie zirkuläre M13-DNA, können unter keiner der untersuchten Bedingungen gespalten werden. Sogar mit Substraten mit definierten 5'-Armen wird die Spaltrate durch DNAPTaq durch die Länge des Arms beeinflusst. In der Gegenwart von Primer und 50 mM KCl ist die Spaltung der 27 Nukleotide langen 5'-Extension im wesentlichen in 2 min bei 55°C beendet. Die Spaltung von Molekülen mit 5'-Armen von 84 und 188 Nukleotiden sind nach 20 min dagegen nur etwa zu 90% und 40% vollständig. Die Inkubation bei höheren Temperaturen reduziert die inhibitorischen Wirkungen der langen Extensionen, was zeigt, dass die Sekundärstruktur im 5'-Arm oder eine wärmelabile Struktur in dem Enzym die Reaktion hemmen kann. Ein Mischungsexperiment, das unter Bedingungen von Substratüberschuss läuft, zeigt, dass Moleküle mit langen Armen das verfügbare Enzym nicht vorzugsweise in nicht-produktiven Komplexen bindet. Diese Ergebnisse können zeigen, dass die 5'-Nuklease-Domäne Zugang zur Spaltstelle am Ende des gegabelten Doppelstrangs erhält, indem der 5'-Arm von einem Ende zum anderen abwärts bewegt wird. Längere 5'-Arme haben erwartungsgemäß zufälligere Sekundärstrukturen (insbesondere bei hohen KCl-Konzentrationen), was wahrscheinlich diese Bewegung behindert.

[0424] Die Spaltung scheint nicht durch lange 3'-Arme des Substrat-Strang-Zielmoleküls oder Pilot-Nukleinsäure mit mindestens bis zu 2 Kilobasen gehemmt zu werden. Bei dem anderen Extrem können 3'-Arme der Pilot-Nukleinsäure mit nur 1 Nukleotid Länge die Spaltung in einer Primer-unabhängigen Reaktion unterstützen, wenn auch ineffizient. Vollständig gepaarte Oligonukleotide lösen keine Spaltung der DNA-Matrizen während der Primer-Extension aus.

[0425] Die Fähigkeit der DNAPTaq zur Spaltung der Moleküle, selbst wenn der Komplementärstrang nur ein ungepaartes 3'-Nukleotid enthält, kann bei der Optimierung der allelspezifischen PCR geeignet sein. PCR-Primer mit ungepaarten 3'-Enden wirken als Pilot-Oligonukleotide, die die selektive Spaltung ungewünschter Matrizen während der Präinkubation potentieller Matrize-Primer-Komplexe mit DNAPTaq in Abwesenheit von Nukleosid-Triphosphaten leiten.

B. 5'-Nuklease-Aktivitäten anderer DNAPs.

[0426] Zur Bestimmung, ob andere 5'-Nukleasen in anderen DNAPs sich für die vorliegende Erfindung eignen, wurde eine Reihe von Enzymen, von denen mehrere der Literatur zufolge frei von offensichtlicher 5'-Nuklease-Aktivität waren, untersucht. Die Fähigkeit dieser anderen Enzyme zur Spaltung von Nukleinsäuren in einer strukturspezifischen Weise wurde mit dem in der **Fig. 5** gezeigten Haarnadelsubstrat unter Bedingungen untersucht, die Berichten zufolge optimal für die Synthese durch jedes Enzym waren.

[0427] DNAPEc1 und DNAP-Klenow wurden von Promega erhalten; die DNAP von Pyrococcus furiosus ("Pfu", Bargseid et al., Strategies 4: 34 [1991]) stammte von Stratagene; die DNAP von Thermococcus litoralis ("Til", Vent™ (Exo-), Perler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5577 [1992] stammte von New England Biolabs; die DNAP von Thermus flavus ("Tfl", Kaledin et al., Biokhimiya 46: 1576 [1981] stammte von Epicentre Technologies; und die DNAP von Thermus thermophilus ("Tth", Carballeira et al., Biotechn., 9: 276 [1990]; Myers et al., Biochem., 30: 7661 (1991)] stammte von US Biochemicals.

[0428] 0,5 Units jeder DNA-Polymerase wurden in einer 20 µl-Reaktion untersucht, wobei entweder die vom Hersteller gelieferten Puffer für die primerabhängigen Reaktionen verwendet wurden, oder 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5, 1,5 mM $MgCl_2$, und 20 mM KCl. Die Reaktionsgemische wurden bei 72°C gehalten, bevor Enzym zugegeben wurde.

[0429] **Fig.** 10 ist ein Autoradiogramm, das die Ergebnisse dieser Tests aufzeigt. **Fig. 10A** veranschaulicht die Reaktionen der Endonukleasen von DNAPs verschiedener thermophiler Bakterien. Die Reaktionen wurden für 10 min bei 55°C in Anwesenheit von Primer, oder für 30 min bei 72°C in Abwesenheit von Primer inkubiert, und die Produkte wurden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgelöst. Die Längen der Produkte, in Nukleotiden, sind angegeben. Die **Fig. 10B** veranschaulicht die endonukleolytische Spaltung

durch die 5'-Nuklease von DNAPEc1. Die DNAPEc1- und DNAP-Klenow-Reaktionen wurden für 5 min bei 37°C inkubiert. Man beachte die leichte Bande der Spaltprodukte von 25 und 11 Nukleotiden in den DNAPEc1-Spuren (hergestellt in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von Primer). Die Fig. 8A zeigt auch die DNAPTaq-Reaktionen in Anwesenheit (+) oder in Abwesenheit (–) von Primer. Diese Reaktionen erfolgten in 50 mM bzw. 20 mM KCl und wurden für 10 min bei 55°C inkubiert.

[0430] Der Fig. 10A zufolge spalten die DNAPs aus den Eubakterien Thermus thermophilus und Thermus flavus das Substrat an der gleichen Stelle wie DNAPTaq, und zwar in Anwesenheit und in Abwesenheit von Primer. DNAPs aus den Archaebakterien Pyrococcus furiosus und Thermococcus litoralis können dagegen das Substrat nicht endonukleolytisch spalten. Die DNAPs aus Pyrococcus furiosus und Thermococcus litoralis haben wenig Sequenzhomologie zu eubakteriellen Enzymen (Ito et al., Nucl. Acids Res. 19: 4045 (1991); Mathur et al., Nucl. Acids. Res. 19–6952 (1991); siehe ebenfalls Perler et al.). Der Fig. 10B zufolge spaltet DNAPEc1 auch das Substrat, aber die erhaltenen Spaltprodukte sind schwer nachzuweisen, wenn die 3'-Exonuklease nicht gehemmt wird. Die Aminosäuresequenzen der 5'-Nuklease-Domänen von DNAPEc1 und DNAPTaq sind zu etwa 38% homolog (Gelfand, siehe oben).

[0431] Die 5'-Nuklease-Domäne von DNAPTaq hat etwa 19% Homologie zur 5'-Exonuklease, die von Gen 6 des Bakteriophagen T7 codiert wird (Dunn et al., J. Mol. Biol., 166: 477 [1983]). Diese Nuklease, die nicht kovalent an eine DNA-Polymerisations-Domäne gebunden ist, kann DNA auch endonukleolytisch spalten, und zwar an einer Stelle ähnlich oder identisch zu der Stelle, die von den oben beschriebenen 5'-Nukleasen in Abwesenheit zugefügter Primer gespalten wird.

C. Transspaltung

[0432] Die Fähigkeit einer 5'-Nuklease zur Leitung einer effizienten Spaltung an einer spezifischen Sequenz wurde im folgenden Experiment aufgezeigt. Ein partiell komplementäres Oligonukleotid mit der Bezeichnung "Pilot-Oligonukleotid" wurde an Sequenzen an der gewünschten Spaltstelle hybridisiert. Der nichtkovalente Teil des Pilot-Oligonukleotids ergab eine Struktur analog zum 3'-Arm der Matrize (siehe Fig. 5), wohingegen die 5'-Region des Substratstranges zum 5'-Arm wurde. Ein Primer wurde bereitgestellt durch Konstruieren des 3'-Bereichs des Pilot-Oligonukleotids, so dass er sich auf sich selbst falten und eine kurze Haarnadel mit einem stabilisierenden Tetra-Loop erzeugen würde (Antao et al., Nucl. Acids. Res. 19: 5901 [1991]. Zwei Pilot-Oligonukleotide sind in der Fig. 11A gezeigt. Die Oligonukleotide 19-12 (Seq.-ID Nr. 18), 30-12 (Seq.-ID Nr. 19) und 30-0 (Seq.-ID Nr. 20) sind 31, 42 bzw. 30 Nukleotide lang. Die Oligonukleotide 19-12 (Seq.-ID Nr. 18) und 34-19 (Seq.-ID Nr. 19) haben nur 19 bzw. 30 Nukleotide, die komplementär zu verschiedenen Sequenzen im Substratstrang sind. Die Pilot-Oligonukleotide werden so berechnet, dass ihre komplementären Stränge bei etwa 50°C (19-12) und etwa 75°C (30-12) abschmelzen. Beide Pilot-Oligonukleotide haben 12 Nukleotide an ihren 3'-Enden, die als 3'-Arme wirken, wobei die basengepaarten Primer gebunden sind.

[0433] Zur Demonstration, dass die Spaltung von einem Pilot-Oligonukleotid erfolgen konnte, wurde eine einzelsträngige Ziel-DNA mit DNAPTaq in Anwesenheit von zwei potentiellen Pilot-Oligonukleotiden inkubiert. Die Transspaltungsreaktionen, wo die Ziel und Pilot-Nukleinsäuresequenzen nicht kovalent gebunden sind, umfassen 0,01 pmol einzelsträngige endmarkierte Substrat-DNA, 1 Unit DNAPTaq und 4 pmol Pilot-Oligonukleotid in einem Volumen von 20 µl der gleichen Puffer. Diese Komponenten wurden während einer 1-minütigen Inkubation bei 95°C vereinigt, so dass die PCR-erzeugte doppelsträngige Substrat-DNA denaturiert wurde, und die Temperaturen der Reaktionen wurden dann auf ihre endgültigen Inkubationstemperaturen reduziert. Die Oligonukleotide 30-12 und 19-12 können an Bereiche der Substrat-DNAs hybridisieren, welche 85 und 27 Nukleotide vom 5'-Ende des Zielstrangs entfernt sind.

[0434] Die Fig. 19 zeigt die vollständige 206-mer-Sequenz (Seq.-ID Nr. 27). Das 206-mer wurde durch PCR erzeugt. Der M13/pUC-24-mer Umkehr-Sequenzierungs-Primer (–48) und der M13/pUC-Sequenzierungs-Primer (–47) von NEB (Katalog-Nr. 1233 bzw. 1224) wurden verwendet (jeweils 50 pmol) mit dem pGEM3z(f+)-Plasmidvektor (Promega) als Matrize (10 ng), der die Zielsequenzen enthält. Die PCR-Bedingungen waren folgendermaßen: jeweils 50 µM dNTPs und 2, 5 Units Taq-DNA-Polymerase in 100 µl 20 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl mit 0,05% Tween-20 und 0,05% NP-40. Die Reaktionen erfolgten in 35 Zyklen bei 95°C für 45 sec, 63°C für 45 sec, dann 72°C für 75 sec. Nach den Zyklen wurden die Reaktionen abgeschlossen mit einer Inkubation bei 72°C für 5 min. Das resultierende Fragment wurde gereinigt durch Elektrophorese über ein 6%iges Polyacrylamidgel (29:1 Vernetzung) in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA, sichtbar gemacht durch Ethidiumbromid-Färbung oder Autoradiographie, aus dem Gel ausgeschnitten, durch passive Diffusion eluiert und durch Ethanol-Fällung eingeengt.

[0435] Die Spaltung der Substrat-DNA erfolgte in Anwesenheit des Pilot-Oligonukleotids 19-12 bei 50°C (Fig. 11B, Spuren 1 und 7), aber nicht bei 75°C (Spuren 4 und 10). In Anwesenheit von Oligonukleotid 30-12 wurde Spaltung bei beiden Temperaturen beobachtet. Die Spaltung erfolgte nicht in Abwesenheit von zugefügten Oligonukleotiden (Spuren 3, 6 und 12) oder bei etwa 80°C, obschon bei 50°C zufällige Strukturen im Substrat eine primerunabhängige Spaltung in Abwesenheit von KCl ermöglichten (Fig. 11B, Spur 9). Ein nichtspezifisches Oligonukleotid ohne Komplementarität zur Substrat-DNA leitete bei 50°C in Anwesenheit oder in Abwesenheit von 50 mM KCl (Spuren 13 und 14) keine Spaltung. Somit kann die Spezifität der Spaltungsreaktionen durch das Ausmaß der Komplementarität zum Substrat und durch die Inkubationsbedingungen gesteuert werden.

D. Spaltung von RNA

[0436] Eine verkürzte RNA-Version der in den vorstehend erläuterten Transspaltungsexperimenten verwendeten Sequenz wurde auf ihre Fähigkeit untersucht, ob sie als Substrat in der Reaktion dienen kann. Die RNA wird an der erwarteten Stelle gespalten, in einer Reaktion, die von der Anwesenheit des Pilot-Oligonukleotids abhängt. Das RNA-Substrat, hergestellt durch T7-RNA-Polymerase in Anwesenheit von (α-^{32}P)UTP entspricht einer verkürzten Version des in der Fig. 11B verwendeten DNA-Substrates. Die Reaktionsbedingungen waren ähnlich denjenigen, die für die vorstehend beschriebenen DNA-Substrate verwendet wurden, mit 50 mM KCl; die Inkubation erfolgte für 40 min bei 55°C. Das verwendete Pilot-Oligonukleotid hat die Bezeichnung 30-0 (Seq.-ID Nr. 20) und ist in der Fig. 12A) gezeigt.

[0437] Die Ergebnisse der Spaltreaktion sind in der **Fig.** 13B gezeigt. Die Reaktion erfolgte entweder in Anwesenheit oder in Abwesenheit von DNAPTaq oder Pilot-Oligonukleotid, wie in der Fig. 12B angegeben.

[0438] Bei der RNA-Spaltung ist überraschenderweise kein 3'-Arm für das Pilot-Oligonukleotid erforderlich. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass diese Spaltung auf der vorher beschriebenen RNaseH beruht, die Erwartungen zufolge die RNA an verschiedenen Stellen entlang des 30 Basenpaare langen RNA-DNA-Doppelstrangs spaltet. Die 5'-Nuklease der DNAPTaq ist eine strukturspezifische RNaseH, die die RNA an einer einzigen Stelle nahe dem 5'-Ende des Heteroduplexbereichs spaltet.

[0439] Es ist überraschend, dass ein Oligonukleotid ohne 3'-Arm bei der Leitung der effizienten Spaltung eines RNA-Ziels als Pilot-Oligonukleotid wirken kann, da solche Oligonukleotide keine effiziente Spaltung von DNA-Zielen mit nativen DNAPs leiten können. Einige erfindungsgemäße 5'-Nukleasen (beispielsweise die Klone E, F und G von Fig. 4) können jedoch die DNA in Abwesenheit eines 3'-Arms spalten. Mit anderen Worten ist eine nicht-verlängerbare Spaltstruktur zur spezifischen Spaltung mit einigen erfindungsgemäßen 5'-Nukleasen, die von thermostabilen DNA-Polymerasen hergeleitet sind, nicht erforderlich.

[0440] Es erfolgten dann Tests, um zu bestimmen, ob die Spaltung einer RNA-Matrize durch DNAPTaq in Anwesenheit eines vollständig komplementären Primers erklären konnte, warum DNAPTaq ein DNA-Oligonukleotid auf einer RNA-Matrize nicht verlängern konnte, in einer Reaktion ähnlich wie bei der reversen Transkriptase. Eine weitere thermophile DNAP, DNAPTth, kann die RNA als Matrize verwenden, aber nur in Anwesenheit von Mn^{++}, so wurde vorhergesagt, dass dieses Enzym RNA in Anwesenheit dieses Kations nicht spalten kann. Folglich wurde ein RNA-Molekül mit einem geeigneten Pilot-Oligonukleotid in Anwesenheit von DNAPTaq oder DNAPTth in Puffer, der entweder Mg^{++} oder Mn^{++} enthielt, inkubiert. Erwartungsgemäß spalteten beide Enzyme die RNA in Anwesenheit von Mg^{++}. DNAPTaq, jedoch nicht DNAPTth, bauten die RNA in Anwesenheit von Mn^{++} ab. Es wurde geschlossen, dass die 5'-Nuklease-Aktivitäten vieler DNAPs zu ihrer Unfähigkeit zur Verwendung von RNA als Matrizen beitragen können.

BEISPIEL 2

Erzeugung von 5'-Nukleasen aus thermostabilen DNA-Polymerasen

[0441] Thermostabile DNA-Polymerasen wurden erzeugt, welche eine reduzierte Syntheseaktivität aufwiesen, eine Aktivität, die eine ungewünschte Nebenreaktion bei der DNA-Spaltung in dem erfindungsgemäßen Nachweistest ist, aber dennoch eine thermostabile Nukleaseaktivität beibehielten. Das Ergebnis ist eine thermostabile Polymerase, die Nukleinsäure-DNA mit äußerster Spezifität spaltet.

[0442] Die DNA-Polymerasen vom Typ A aus Eubakterien der Gattung Thermus haben eine extensive Proteinsequenz-Identität (90% in der Polymerisations-Domäne zueinander, wobei das Lipman-Pearson-Verfahren in der DNA-Analyse-Software von DNA-Star, WI verwendet wurde) und verhalten sich in Polymerisations- und

Nuklease-Tests ähnlich. Daher werden die Gene für die DNA-Polymerase von Thermus aquaticus (DNAPTaq) und Thermus flavus (DNAPTfl) als Repräsentanten für diese Klasse verwendet. Polymerase-Gene von anderen eubakteriellen Organismen, wie Thermus thermophilus, Thermus sp., Thermotoga maritima, Thermosipho africanus und Bacillus stearothermophilus sind gleichermaßen geeignet. Die DNA-Polymerasen von diesen thermophilen Organismen können überleben und bei erhöhten Temperaturen arbeiten und können somit in Reaktionen verwendet werden, bei denen die Temperatur als Selektion gegen nicht-spezifische Hybridisierung von Nukleinsäuresträngen verwendet wird.

[0443] Die für die nachstehend beschriebene Deletionsmutagenese verwendeten Restriktionsstellen wurden der Einfachheit halber ausgewählt. Verschiedene Stellen, die eine ähnliche Einfachheit aufweisen, sind im Thermus thermophilus-Gen erhältlich und können zur Herstellung ähnlicher Konstrukte mit anderen Typ-A-Polymerase-Genen von verwandten Organismen verwendet werden.

Herstellung von 5'-Nukleasekonstrukten

1. Modifizierte DNAPTaq-Gene

[0444] Der erste Schritt war das Platzieren eines modifizierten Gens für die Taq-DNA-Polamerase auf einem Plasmid unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Das modifizierte Taq-Polymerase-Gen wurde folgendermaßen isoliert: Das Taq-DNA-Polymerasegen wurde durch die Polymerasekettenreaktion aus der genomischen DNA von Thermus aquaticus, Stamm YT-1 (Lawyer et al., siehe oben) amplifiziert, wobei als Primer die in den Seq.-ID Nr. 13–14 beschriebenen Oligonukleotide verwendet wurden. Das resultierende DNA-Fragment hat eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI am 5'-Ende der codierenden Sequenz und eine BglII-Sequenz am 3'-Ende. Die Spaltung mit BglII ergibt einen 5'-Überhang oder ein "klebriges Ende", das mit dem Ende kompatibel ist, das von BamHI erzeugt wird. Die PCR-amplifizierte DNA wurde mit EcoRI und BamHI gespalten. Das 2512-Bp-Fragment, das den codierenden Bereich für das Polymerase-Gen enthielt, wurde über Gel gereinigt und dann in ein Plasmid ligiert, das einen induzierbaren Promotor enthält.

[0445] Bei einer erfindungsgemäßen Ausführungsform wurde der pTTQ18-Vektor, der den Hybrid-trp-lac(tac)-Promotor enhält, verwendet (Stark, Gene 5: 255 [1987] und ist in der Fig. 13 gezeigt. Der tac-Promotor steht unter der Kontrolle des E. coli-lac-Repressors. Die Repression ermöglicht, dass die Synthese des Genprodukts unterdrückt wird, bis das gewünschte Niveau des Bakterienwachstums erreicht wird, wobei an diesem Punkt die Repression durch Zugabe eines spezifischen Induktors, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) aufgehoben wird. Ein solches System ermöglicht die Expression von Fremdproteinen, die das Wachstum von Transformanten verlangsamen oder verhindern können.

[0446] Bakterielle Promotoren, wie tac, brauchen nicht angemessen unterdrückt zu werden, wenn sie auf einem Multi-Copy-Plasmid vorhanden sind. Wird ein hochtoxisches Protein unter die Kontrolle eines solchen Promotors platziert, kann eine kleine durchsickernde Expressionsmenge schädlich für die Bakterien sein. Bei einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform wurde eine weitere Option zur Unterdrückung der Synthese eines klonierten Genprodukts verwendet. Der nichtbakterielle Promotor aus dem Bakteriophagen T7, der sich in Plasmid-Vektor der Reihe pET-3 befindet, wurde zum Exprimieren der klonierten mutierten Taq-Polymerase-Gene verwendet (Fig. 15; Studier und Moffatt, J. Mol. Biol., 189; 113 [1986]). Dieser Promotor startet die Transkription nur durch T7-RNA-Polymerase. In einem geeigneten Strang, wie BL21 (DE3)pLYS befindet sich das Gen für diese RNA-Polymerase auf dem Bakteriengenom unter der Kontrolle des lac-Operators. Diese Anordnung hat den Vorteil, dass die Expression des Multi-Copy-Gens (auf dem Plasmid) vollständig von der Expression der T7-RNA-Polymerase abhängt, die leicht unterdrückt wird, weil sie in einer Einzelkopie vorliegt.

[0447] Zur Ligierung in den pTTQ18-Vektor (Fig. 13) wurde die PCR-Produkt-DNA, die den Taq-Polymerase-codierenden Bereich enthielt (mut Taq, Klon 4B, Seq.-ID Nr. 21) mit EcoRI und BglII gespalten, und dieses Fragment wurde unter Standard-Bedingungen für "klebrige Enden" (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, S. 1,63–1,69 [1989]) in die EcoRI- und BamHI-Stellen des Plasmid-Vektors pTTQ18 ligiert. Die Expression dieses Konstrukts ergibt ein Translationsfusionsprodukt, in dem die ersten beiden Reste des nativen Proteins (Met-Arg) durch drei aus dem Vektor (Met-Asn-Ser) ersetzt sind, aber der Rest des natürlichen Proteins ändert sich nicht. Das Konstrukt wurde in den E. coli JM109-Stamm transfomiert, und die Transformanten wurden unter unvollständigen Repressionsbedingungen plattiert, die kein Wachstum der Bakterien ermöglichen, die das native Protein exprimieren. Diese Plattierungsbedingungen ermöglichen die Isolation der Gene, die vorher existierende Mutationen enthalten, wie diejenigen, die aus der Ungenauigkeit der Taq-Polymerase während des Amplifikationsverfahrens hervorgehen.

[0448] Mit diesem Amplifikations-Selektionsprotokoll wurde ein Klon (gezeigt in der **Fig.** 3B), der ein mutiertes Taq-Polymerase-Gen enthielt (mut Taq, Klon 3B) isoliert. Die Mutante wurde zuerst durch ihren Phänotyp erfasst, bei dem die temperaturstabile 5'-Nuklease-Aktivität in einem rohen Zellextrakt normal war, aber die Polymerisationsaktivität fast fehlte (kleiner als ungefähr 1% der Wild-Typ-Taq-Polymerase-Aktivität).

[0449] Die DNA-Sequenzanalyse des rekombinanten Gens zeigte, dass es Änderungen in der Polymerase-Domäne aufwies, die zu zwei Aminosäure-Austauschen führten: ein A zu G-Austausch an Nukleotid-Position 1394 bewirkt einen Austausch von Glu nach Gly an der Aminosäure-Position 465 (nummeriert nach den natürlichen Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen Seq.-ID Nr. 1 und 4), und ein weiterer A zu G-Austausch an der Nukleotid-Position 2260 bewirkt eine Änderung von Gln zu Arg an der Aminosäure-Position 754. Da die Mutation von Gln nach Gly an einer nichtkonservierten Position erfolgte und da die Mutation von Glu nach Arg eine Aminosäure verändert, die nahezu in allen bekannten Polymerasen vom Typ A konserviert ist, ist diese letztere Mutation höchstwahrscheinlich diejenige, die für das Einschränken der Syntheseaktivität dieses Proteins verantwortlich ist. Die Nukleotidsequenz für das Konstrukt von **Fig. 3B** ist in der Seq.-ID Nr. 21 gegeben. Das von dieser Sequenz codierte Enzym wird als Cleavase® A/G bezeichnet.

[0450] Nachfolgende Derivate der DNAPTaq-Konstrukte wurden hergestellt aus dem mut Taq-Gen, somit tragen alle diese Aminosäure-Substitutionen neben ihren anderen Änderungen, wenn nicht diese bestimmten Bereiche deletiert wurden. Dieses mutierten Stellen sind durch schwarze Kästen an diesen Stellen in den Diagrammen in **Fig. 3** hervorgehoben. In **Fig. 3** steht die Bezeichnung "3'-Exo" für die Stelle der 3'-Exonuklease-Aktivität, die mit den Typ-A-Polymerasen einhergeht, welche nicht in der DNAPTaq zugegen ist. Sämtliche Konstrukte außer den in **Fig.** 3E, F und G gezeigten Genen wurden im pTTQ18-Vektor hergestellt.

[0451] Der für die Gene in den **Fig.** 3E und F verwendete Klonierungsvektor stammte von der vorstehend beschriebenen kommerziell erhältlichen pET-3-Reihe. Diese Vektor-Reihe hat zwar nur eine BamHI-Stelle zum Klonieren stromabwärts des T7-Promotors, jedoch enthält die Reihe Varianten, die eine Klonierung in jedem der drei Leseraster ermöglicht. Zur Klonierung des vorstehend beschriebenen PCR-Produktes wurde die als pET-3c bezeichnete Variante verwendet (**Fig. 14**). Der Vektor wurde mit BamHI gespalten, mit Kalbs-Intestinum-Phosphatase dephosphoryliert und die klebrigen Enden wurden mit Klenow-Fragment von DNAPEc1 und dNTPs aufgefüllt. Das Gen für die in **Fig.** 3B gezeigte mutierte TaqDNAP (mut Taq, Klon 3B) wurde aus pTTQ18 durch Spaltung mit EcoRI und SalI entfernt, und die "klebrigen Enden" wurde genauso wie beim Vektor aufgefüllt. Das Fragment wurde unter Standard-Bedingungen für stumpfe Enden an den Vektor ligiert (Sambrook et al., Molecular Cloning, siehe oben), das Konstrukt wurde in den BL21 (DE3)pLYS-Stamm von E. coli transformiert, und die Isolate wurden gescreent, um diejenigen zu identifizieren, die mit dem Gen in der richtigen Orientierung in Bezug auf den Promotor ligiert waren. Diese Konstruktion ergibt ein weiteres Translations-Fusionsprodukt, bei dem die ersten beiden Aminosäuren der DNAPTaq (Met-Arg) durch 13 aus dem Vektor plus zwei aus dem Primer ersetzt sind (Met-Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly-Arg-Ile-Asn-Ser) (Seq.-ID Nr. 24).

[0452] In diesen Experimenten war das Ziel die Erzeugung von Enzymen, denen die Fähigkeit zur Synthese von DNA fehlte, die aber die Fähigkeit zur Spaltung von Nukleinsäuren mit einer 5'-Nuklease-Aktivität behielten. Der Vorgang der geprimten Matrizen-Synthese von DNA ist tatsächlich eine koordinierte Serie von Ereignissen, so dass man die DNA-Synthese durch Unterbrechen eines Ereignisses abschalten kann, während zugleich die anderen nicht beeinträchtigt werden. Diese Schritte umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf, Primer-Erkennung und -Bindung, dNTP-Bindung und Katalyse der Inter-Nukleotid-Phosphodiester-Bindung. Einige der Aminosäuren in der Polymerisationsdomäne von DNAPEc1 wurden mit diesen Funktionen in Zusammenhang gebracht, aber die genauen Mechanismen sind bisher kaum definiert.

[0453] Ein Weg zur Zerstörung der Polymerisationsfähigkeit einer DNA-Polymerase ist die vollständige oder partielle Deletion des Gensegmentes, das diese Domäne für das Protein codiert, oder ansonsten das Unfähigmachen des Gens zur Herstellung einer vollständigen Polymerisations-Domäne. Einzelne mutierte Enzyme können sich hinsichtlich der Stabilität und Löslichkeit innerhalb und außerhalb der Zellen voneinander unterscheiden. Im Gegensatz zur 5'-Nuklease-Domäne von DNAPEc1, das in einer aktiven Form aus der Polymerisations-Domäne durch sanfte Proteolyse freigesetzt werden kann (Setlow und Kornberg, J. Biol. Chem., 247: 232 [1972]), wird die Thermus-Nuklease-Domäne, wenn sie entsprechend behandelt wird, weniger löslich, und die Spaltungsaktivität geht oft verloren.

[0454] Mit dem in **Fig.** 3B gezeigten mutierten Gen als Ausgangsmaterial wurden verschiedene Deletions-Konstrukte erzeugt. Sämtliche Klonierungsverfahren waren Standard (Sambrook et al., siehe oben) und werden folgendermaßen kurz zusammengefasst:

Fig. 3C: Das mut Taq-Konstrukt wurde mit PstI gespalten, das einmal in der Polymerase-codierenden Region spaltet, wie angezeigt, und sofort stromabwärts des Gens in der Mehrfachklonierungsstelle des Vektors spaltet. Nach der Freisetzung des Fragmentes zwischen diesen beiden Stellen wurde der Vektor religiert, was eine 894-Nukleotid-Deletion erzeugt, und ein Stop-Codon 40 Nukleotide stromabwärts der Verbindungsstelle im Leseraster eingebracht. Die Nukleotidsequenz dieser 5'-Nuklease (Klon 4C) ist in der Seq.-ID Nr. 9 angegeben).
Fig. 3D: Das mut-Taq-Konstrukt wurde mit NheI gespalten, das einmal in dem Gen an der Position 2047 spaltet. Die resultierenden vier Nukleotide großen 5'-überhängenden Enden wurden wie vorstehend beschrieben aufgefüllt, und die stumpfen Enden wurden religiert. Die resultierende vier Nukleotide große Insertion ändert das Leseraster und verursacht eine Termination der Translation zehn Aminosäuren stromabwärts der Mutation. Die Nukleotidsequenz dieser 5'-Nuklease (Klon 3D) ist in der Seq.-ID Nr. 10 angegeben.
Fig. 3E: Das gesamte mut Taq-Gen wurde aus pTTQ18 mit EcoRI und SalI gespalten und in pET-3c wie oben beschrieben kloniert. Dieser Klon wurde mit BstXI und XcmI an einzelnen Stellen gespalten, die sich an den in der **Fig. 3** gezeigten Stellen befinden. Die DNA wurde mit dem Klenow-Fragment von DNAPEc1 und dNTPs behandelt, was zu 3'-überhängenden Enden beider Seiten führte, die auf stumpfe Enden geschnitten wurden. Diese stumpfen Enden wurden miteinander ligiert, was zu einer Deletion aus dem Leseraster von 1540 Nukleotiden führte. Ein im Raster befindliches Terminations-Codon erfolgt 18 Tripletts hinter der Verbindungsstelle. Die Nukleotidsequenz dieser 5'-Nuklease (Klon 3E) ist in der Seq.-ID Nr. 11 gegeben, wobei die geeignete Leitsequenz in Seq.-ID Nr. 25 angegeben ist. Diese wird auch als Cleavase® BX bezeichnet.
Fig. 3F: Das gesamte mut Taq-Gen wurde aus pTTQ18 mit EcoRI und SalI gespalten und in pET-3c kloniert, wie oben beschrieben. Dieser Klon wurde mit BstXI und BamHI an einzelnen Stellen gespalten, die sich an den im Diagramm gezeigten Stellen befinden. Die DNA wurde mit dem Klenow-Fragment von DNAPEc1 und dNTPs behandelt, was zu 3'-überhängenden Enden der BstXI-Stelle führte, die zu einem stumpfen Ende geschnitten wurden, wohingegen das 5'-überhängende Ende der BamHI-Stelle zur Erzeugung eines stumpfen Endes aufgefüllt wurde. Diese Enden wurden miteinander ligiert, was eine Deletion im Leseraster von 903 Nukleotiden ergab. Die Nukleotid-Sequenz der 5'-Nuklease (Klon 3F) ist in Seq.-ID Nr. 12 angegeben. Diese wird auch als Cleavase® BB bezeichnet.
Fig. 3G: Diese Polymerase ist eine Variante von der in **Fig.** 4E gezeigten. Sie wurde in den Plasmidvektor pET-21 (Novagen) kloniert. Der in diesem Vektor befindliche nichtbakterielle Promotor aus Bakteriophage T7 startet die Transkription nur durch T7-RNA-Polymerase. Siehe Studier und Moffatt, siehe oben. In einem geeigneten Stamm, wie (DES)pLYS befindet sich das Gen für diese RNA-Polymerase auf dem Bakterien-Genom unter der Kontrolle des lac-Operators. Diese Anordnung hat den Vorteil, dass die Expression des Multi-Copy-Gens (auf dem Plasmid) vollständig von der Expression der T7-RNA-Polymerase abhängt, die leicht unterdrückt wird, da sie in einer einzelnen Kopie vorliegt. Da die Expression dieser mutierten Gene unter einem fest kontrollierten Promotor steht, sind potentielle Probleme bezüglich Toxizität der exprimierten Proteine für die Wirtszelle weniger bedeutend.

[0455] Der pET-21-Vektor hat auch einen "His*Tag", einen Bereich von sechs aufeinanderfolgenden Histidin-Resten, die am Carboxy-Terminus der exprimierten Proteine addiert sind. Die resultierenden Proteine können dann in einem einzigen Schritt durch Metall-Chelatbildungs-Chromatographie gereinigt werden, wobei ein kommerziell erhältliches (Novagen) Säulenharz mit immobilisierten Ni^{++}-Ionen verwendet wird. Die 2,5-ml-Säulen sind wiederverwendbar und können bis zu 20 mg des Zielproteins unter nativen oder denaturierenden Bedingungen (Guanidin*HCl oder Harnstoff) binden.

[0456] E. coli (DES)pLYS-Zellen werden mit den vorstehend beschriebenen Konstrukten mittels Standard-Transformationstechniken transformiert und zum Animpfen eines Standard-Wachstums-Mediums (Luria-Bertani-Brühe) verwendet. Die Herstellung von T7-RNA-Polymerase wird während des Wachstums in der Log-Phase durch Zugabe von IPTG induziert, und es wird weitere 12 bis 17 Std. inkubiert. Aliquots der Kultur werden vor und nach der Induktion entnommen, und die Proteine werden durch SDS-PAGE untersucht. Das Färben mit Coomassie-Blau ermöglicht ein Sichtbarmachen der Fremdproteine, wenn sie etwa 3 bis 5% des Zellproteins ausmachen und nicht mit irgendeiner der Hauptproteinbanden wandern. Die Proteine, die mit dem Haupt-Wirtsprotein wandern, müssen als mehr als 10% des Gesamtproteins exprimiert werden, das sich an dieser Analysestufe beobachten lässt.

[0457] Einige mutierte Proteine werden durch die Zellen in Einschlusskörper sequestriert. Diese sind Granula, die sich im Cytoplasma bilden, wenn Bakterien veranlasst werden, hohe Spiegel von Fremdprotein zu exprimieren, und sie können aus einem rohen Lysat gereinigt werden, und durch SDS-PAGE analysiert werden, damit ihr Proteingehalt bestimmt wird. Wird das klonierte Protein in den Einschlusskörpern gefunden, muss es freigesetzt werden, damit die Spaltungs- und Polymerase-Aktivitäten untersucht werden. Verschiedene Solubilisierungsverfahren können für verschiedene Proteine geeignet sein, und eine Anzahl von Verfahren ist bekannt (siehe beispielsweise Builder & Ogez, US-Patent Nr. 4,511,502 (1985); Olson, US-Patent Nr. 4,518,526

(1985); Olson & Pai, US-Patent Nr. 4,511,503 (1985), und Jones et al., US-Patent Nr. 4,512,922 (1985)).

[0458] Das solubilisierte Protein wird dann auf der Ni^{++}-Säule wie vorstehend beschrieben gereinigt, wobei die Angaben des Herstellers (Novagen) befolgt werden. Die gewaschenen Proteine werden aus der Säule durch eine Kombination von Imidazol-Kompetitor (1 M) und Hochsalz (0,5 M NaCl) eluiert und dialysiert, so dass der Puffer ausgetauscht wird und damit sich denaturierte Proteine zurückfalten können. Übliche Ausbeuten führen zu etwa 20 µg spezifisches Protein pro ml Ausgangskultur. Die DNAP-Mutante wird als Cleavase® BN-Nuklease bezeichnet, und die Sequenz ist in der Seq.-ID Nr. 26 angegeben (die Aminosäuresequenz der Cleavase® BN-Nuklease wird erhalten durch Translatieren der DNA-Sequenz von Seq.-ID Nr. 26).

2. Modifiziertes DNAPTfl-Gen

[0459] Das DNA-Polymerase-Gen von Thermus flavus wurde isoliert aus dem "T. flavus" AT-62-Stamm, erhalten von der American Type Tissue-Collection (ATCC 33923). Dieser Stamm hat eine andere Reatriktionskarte als der T. flavus-Stamm, der zur Erzeugung der Sequenz verwendet wird, die von Akhmetzjanov und Vakhitov, siehe oben, veröffentlicht wurde. Die veröffentlichte Sequenz ist als Seq.-ID Nr. 2 aufgeführt. Keine Sequenzdaten wurden für das DNA-Polymerase-Gen aus dem AT-62-Stamm von T. flavus veröffentlicht.

[0460] Genomische DNA aus T. flavus wurde mit den gleichen Primern amplifiziert, die zur Amplifikation des T. aquaticus DNA-Polymerase-Gens (Seq.-ID Nr. 13–14) verwendet wurde. Das etwa 2500 Basenpaare große PCR-Fragment wurde mit EcoRI und BamHI gespalten. Die überhängenden Enden wurden mit dem Klenow-Fragment von DNAPEc1 und dNTPs stumpfendig gemacht. Das resultierende etwa 1800 Basenpaare große Fragment, das den codierenden Bereich für den N-Terminus enthielt, wurde in pET-3c wie vorstehend beschrieben ligiert. Das Konstrukt, Klon 4B, ist in der Fig. 4B gezeigt. Das Wildtyp-T. flavus-DNA-Polymerase-Gen ist in der **Fig.** 4A gezeigt. Der 4B-Klon hat die gleiche Leader-Aminosäuren wie die DNAP-Taq-Klone 4E und F, die in pET-3c kloniert wurden; es ist nicht genau bekannt, wo die Translationstermination erfolgt, aber der Vektor hat ein starkes Transkriptionsterminationssignal unmittelbar stromabwärts der Klonierungsstelle.

B. Wachstum und Induktion transformierter Zellen.

[0461] Bakterienzellen wurden mit den vorstehend beschriebenen Konstrukten mittels Standard-Transformationstechniken transformiert und zum Animpfen von 2 ml Standard-Wachstumsmedium (beispielsweise Luria-Bertani-Brühe) verwendet. Die resultierenden Kulturen wurden wie geeignet für den jeweils verwendeten Stamm inkubiert, und erforderlichenfalls für ein bestimmtes Expressionssystem induziert. Für sämtliche in den Fig. 3 und Fig. 4 gezeigten Konstrukte wurden die Kulturen in einer optischen Dichte (bei 600 nm Wellenlänge) von 0,5 OD gezüchtet.

[0462] Zur Induktion der Expression der klonierten Gene wurden die Kulturen auf eine Endkonzentration von 0,4 mM IPTG gebracht, und die Inkubationen wurden für 12 bis 17 Std. fortgesetzt. Dann wurden 50 µl Aliquote jeder Kultur vor und nach der Induktion entfernt und wurden mit 20 µl eines Standard-Gelbeladungspuffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) vereinigt. Nachfolgendes Färben mit Coomassie-Blau (Sambrook et al., siehe oben) ermöglicht die Sichtbarmachung der Fremdproteine, wenn sie etwa 3 bis 5% des Zellproteins ausmachen und nicht mit einer der Haupt-E. coli-Protein-Banden comigrieren. Proteine, die mit einem Haupt-Wirtsprotein comigrieren, müssen als mehr als 10% des Gesamtproteins exprimiert werden, das sich in dieser Analysestufe beobachten lässt.

C. Wärmelyse und Fraktionierung

[0463] Exprimierte thermostabile Proteine (d. h. die 5'-Nukleasen) wurden isoliert durch Erwärmen von rohen Bakterien-Zellextrakten, so dass eine Denaturierung und Fällung der weniger stabilen E. coli-Proteine erfolgte. Die gefällten E. coli-Proteine wurden dann zusammen mit anderen Zelltrümmern durch Zentrifugation entfernt. Dann wurden 1,7 ml der Kultur durch Mikrozentrifugation bei 12000 bis 14000 U/min für 30 bis 60 sec pelletiert. Nach der Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 400 µl Puffer A (50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9, 50 mM Dextrose, 1 mM EDTA) resuspendiert, erneut zentrifugiert und dann in 80 µl Puffer A mit 4 mg/ml Lysozym resuspendiert. Die Zellen wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit 80 µl Puffer B (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% Tween-20, 0,5% Nonidet-P40) vereinigt.

[0464] Das Gemisch wurde 1 Std. bei 75°C inkubiert, so dass die Wirtsproteine denaturiert und gefällt wurden. Dieser Zellextrakt wurde 15 min bei 4°C und 14000 U/min zentrifugiert, und der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt. Ein Aliquot von 0,5 bis 1 µl dieses Überstands wurde direkt in jeder Testreaktion verwen-

det, und der Proteingehalt des Extraktes wurde bestimmt durch Unterwerfen von 7 µl einer Elektrophoreseanalyse wie oben erwähnt. Die native rekombinante Taq-DNA-Polymerase (Engelke, Anal. Biochem., 191: 396 [1990]) und das in der **Fig.** 3B gezeigte Protein mit der doppelten Punktmutation sind beide an dieser Stelle löslich und aktiv.

[0465] Das Fremdprotein kann nach den Wärmebehandlungen aufgrund einer Sequestrierung von Fremdprotein durch die Zellen in Einschlusskörper nicht erfasst werden.

[0466] Diese sind Granula, die sich im Cytoplasma bilden, wenn Bakterien veranlasst werden, hohe Spiegel eines Fremdproteins zu exprimieren, und sie können aus einem rohen Lysat gereinigt werden, und durch SDS-PAGE analysiert werden, so dass der Proteingehalt bestimmt wird. Viele Verfahren wurden in der Literatur beschrieben, und ein Ansatz ist nachstehend beschrieben.

D. Isolation und Solubilisierung von Einschlusskörpern

[0467] Eine kleine Kultur wurde gezüchtet und wie oben beschrieben induziert. Ein 1,7 ml Aliquot wurde durch kurze Zentrifugation pelletiert, und die Bakterienzellen wurden in 100 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) resuspendiert. Dann wurden 2,5 µl 20 mM PMSF auf eine Endkonzentration von 0,5 mM dazugegeben, und Lysozym wurde auf eine Konzentration von 1,0 mg/ml zugegeben. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert, Desoxycholsäure wurde auf 1 mg/ml (1 µl einer 100 mg/ml Lösung) zugegeben, und das Gemisch wurde weiter bei 37°C für etwa 15 min inkubiert, bis es viskos war. DNAse I wurde auf 10 µg/ml zugegeben, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für etwa 30 min inkubiert oder solange, bis es nicht länger viskos war.

[0468] Aus diesem Gemisch wurden die Einschlusskörper durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 15 min bei 4°C gesammelt, und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Lysepuffer mit 10 mM EDTA (pH-Wert 8,0) und 0,5% Triton-X-100 resuspendiert. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden die Einschlusskörper wie zuvor pelletiert, und der Überstand wurde zur späteren Analyse aufbewahrt. Die Einschlusskörper wurden in 50 µl destilliertem Wasser resuspendiert, und 5 µl wurden mit SDS-Gelbeladungspuffer (der die Einschlusskörper löst) vereinigt und zusammen mit einem Aliquot des Überstands elektrophoretisch analysiert.

[0469] Wird das klonierte Protein in den Einschlusskörpern gefunden, kann es freigesetzt werden, damit man die Spaltungs- und Polymeraseaktivitäten untersucht, und das Solubilisierungsverfahren muss mit der jeweiligen Aktivität kompatibel sein. Verschiedene Solubilisierungsverfahren können sich für verschiedene Proteine eignen und eine Anzahl von Verfahren sind in Molecular Cloning (Sambrook et al., siehe oben) erörtert. Es folgt eine Anpassung, die für verschiedene Isolate verwendet wird, die bei der Entwicklung der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0470] 20 µl der Einschlusskörper-Wasser-Suspension wurden durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 4 min bei Raumtemperatur pelletiert, und der Überstand wurde verworfen. Zum weiteren Waschen der Einschlusskörper wurde das Pellet in 20 µl Lysepuffer mit 2 M Harnstoff resuspendiert, und bei Raumtemperatur eine Std. inkubiert. Die gewaschenen Einschlusskörper wurden dann in 2 µl Lysepuffer mit 8 M Harnstoff resuspendiert, die Lösung klärte sich sichtbar als die Einschlusskörper sich lösten. Ungelöste Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 4 min bei Raumtemperatur entfernt, und der Extrakt-Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt.

[0471] Zur Reduktion der Harnstoff-Konzentration wurde der Extrakt in KH_2PO_4 verdünnt. Ein frisches Röhrchen wurde hergestellt, das 180 µl 50 mM KH_2PO_4, pH-Wert 9, 5, 1 mM EDTA und 50 mM NaCl enthielt. Ein 2 µl Aliquot des Extrakts wurden zugegeben und kurz im Vortexgerät gemischt. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis der gesamte Extrakt für insgesamt 10 Zugaben zugegeben wurde. Das Gemisch wurde 15 min bei Raumtemperatur sitzen gelassen, während dieser Zeit bildet sich oft etwas Niederschlag. Die Niederschläge wurden durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 15 min bei Raumtemperatur entfernt, und der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt. Zu den 200 µl Protein in der KE_2PO_4-Lösung wurden 140–200 µl gesättigtes $(NH_4)_2SO_4$ zugegeben, so dass das resultierende Gemisch etwa 41% bis 50% gesättigtes $(NH_4)_2SO_4$ enthielt. Das Gemisch wurde 30 min auf Eis gekühlt, so dass das Protein gefällt werden konnte, und das Protein wurde dann durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 4 min bei Raumtemperatur gesammelt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 20 µl Puffer C (20 mM HEPES, pH-Wert 7,9, 1 mM EDTA, 0,5% PMSF, 25 mM KCl und jeweils 0,5% von Tween-20 und Nonidet P40) gelöst. Die Protein-Lösung wurde wiederum für 4 min zentrifugiert, um unlösliche Materialien zu pelletieren, und der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen

entfernt. Der Proteingehalt der auf diese Weise hergestellten Extrakte wurde sichtbar gemacht durch Auflösen von 1 bis 4 µl durch SDS-PAGE; 0,5 bis 1 µl Extrakt wurden bei Spaltungs- und Polymerisationstests wie beschrieben untersucht.

E. Proteinanalyse auf die Anwesenheit von Nuklease- und Synthese-Aktivität

[0472] Die vorstehend beschriebenen und in den Fig. 3 und Fig. 4 gezeigten 5'-Nukleasen wurden durch die folgenden Verfahren analysiert.

1. Strukturspezifischer Nuklease-Test

[0473] Eine modifizierte Kandidaten-Polymerase wird durch Untersuchen ihrer Fähigkeit zur Katalyse strukturspezifischer Spaltungen auf 5'-Nukleaseaktivität getestet. Der hier verwendete Begriff "Spaltstruktur" steht für eine Nukleinsäurestruktur, die ein Substrat für die Spaltung durch die 5'-Nuklease-Aktivität von DNAP ist.

[0474] Die Polymerase wird Testkomplexen ausgesetzt, die die in der Fig. 15 gezeigten Strukturen haben. Das Testen auf 5'-Nuklease-Aktivität beinhaltet 3 Reaktionen: 1) eine primergerichtete Spaltung (**Fig.** 15B) erfolgt, weil sie gegenüber Variationen der Salzkonzentration der Reaktion relativ unempfindlich ist, und kann daher in beliebigen Lösungsbedingungen durchgeführt werden, die das modifizierte Enzym für die Aktivität benötigt; dies sind gewöhnlich die gleichen Bedingungen, die für unmodifizierte Polymerasen bevorzugt sind; (2) eine ähnliche primergerichtete Spaltung erfolgt in einem Puffer, der eine primerunabhängige Spaltung ermöglicht (d. h. Niedrigsalzpuffer), so dass gezeigt wird, dass das Enzym unter diesen Bedingungen lebensfähig ist; und 3) eine primerunabhängige Spaltung (**Fig.** 15A) erfolgt im gleichen Niedrigsalzpuffer.

[0475] Der gegabelte Doppelstrang wird zwischen einem Substratstrang und einem Matrizenstrang wie in der Fig. 15 gezeigt gebildet. Der Begriff "Substratstrang", wie er hier verwendet wird, steht für den Nukleinsäure-Strang, in dem die durch 5'-Nuklease-Aktivität vermittelte Spaltung erfolgt. Der Substratstrang ist immer als der obere Strang in dem gegabelten Komplex angezeigt, der als Substrat für die 5'-Nuklease-Spaltung (Fig. 15) dient. Der Begriff "Matrizenstrang", wie er hier verwendet wird, steht für den Nukleinsäure-Strang, der zumindest partiell komplementär ist zum Substratstrang und der an den Substratstrang hybridisiert, so dass die Spaltstruktur erhalten wird. Der Matrizenstrang ist immer als der untere Strang der gegabelten Spaltstruktur angegeben (Fig. 15). Wird ein Primer (ein kurzes Oligonukleotid von 19 bis 30 Nukleotiden Länge) zu dem Komplex gegeben, wie wenn die primerabhängige Spaltung getestet wird, ist er so ausgelegt, dass er an den 3'-Arm des Matrizenstrangs hybridisiert (**Fig.** 15B). Ein solcher Primer wird am Matrizenstrang verlängert, wenn die in der Reaktion verwendete Polymerase Syntheseaktivität hat.

[0476] Die Spaltstruktur kann als einzelnes Haarnadelmolekül hergestellt werden, wobei das 3'-Ende des Ziels und das 5'-Ende des Pilots als Schleife wie in der **Fig.** 15E gezeigt verbunden sind. Ein Primer-Oligonukleotid, das zum 3'-Arm komplementär ist, wird ebenfalls für diese Tests benötigt, so dass die Empfindlichkeit des Enzyms auf die Anwesenheit eines Primers untersucht werden kann.

[0477] Nukleinsäuren, die zur Herstellung der Test-Spaltstrukturen verwendet werden, können chemisch synthetisiert werden oder können durch Standard-DNA-Rekombinations-Techniken erzeugt werden. Durch das letztere Verfahren kann der Haarnadel-Abschnitt des Moleküls erzeugt werden, indem Duplikatkopien eines kurzen DNA-Segmentes nebeneinander, jedoch in entgegengesetzter Orientierung, in einen Klonierungsvektor eingebracht werden. Das doppelsträngige Fragment, das diese Umkehrwiederholung umfasst und das genügend flankierende Sequenz aufweist, dass kurze (etwa 20 Nukleotide) ungepaarte 5'- und 3'-Arme erhalten werden, kann dann aus dem Vektor durch Restriktionsenzymspaltung freigesetzt werden, oder durch eine PCR, die mit einem Enzym durchgeführt wird, dem eine 5'-Exonuklease fehlt (beispielsweise das Stoffel-Fragment der Amplitag™-DNA-Polymerase, Vent™-DNA-Polymerase).

[0478] Die Test-DNA kann an beiden Enden oder mittendrin markiert werden, und zwar entweder mit einem Radioisotop oder mit einer nichtisotopen Markierung. Unabhängig davon, ob die Haarnadel-DNA ein synthetischer Einzelstrang oder ein klonierter Doppelstrang ist, wird die DNA vor der Verwendung erwärmt, um sämtliche Doppelstränge zu schmelzen. Beim Kühlen auf Eis entsteht die in der **Fig.** 16E gezeigte Struktur und ist solange stabil, dass man diese Tests durchführen kann.

[0479] Zur Untersuchung auf primergerichtete Spaltung (Reaktion 1) wird eine nachweisbare Menge des Testmoleküls (gewöhnlich 1 bis 100 fmol ^{32}P-markiertes Haarnadelmolekül) und ein 10- bis 100fach molarer Überschuss von Primer in einem Puffer untergebracht, der bekanntlich mit dem Testenzym kompatibel ist. Für

die Reaktion 2, bei der die primergerichtete Spaltung unter einer Bedingung erfolgt, bei der eine primerunabhängige Spaltung möglich ist, werden die gleichen Mengen der Moleküle in einer Lösung untergebacht, die dem in Reaktion 1 verwendeten Puffer in Bezug auf pH-Wert, Enzym-Stabilisatoren (beispielsweise Rinderserumalbumin, nichtionische Detergenzien, Gelatine) und Reduktionsmittel (beispielsweise Dithiothreitol, 2-Mercaptoethanol) entsprechen, die aber jedes einwertige Kationensalz mit 20 mM KCl ersetzen; 20 mM KCl ist das offensichtliche Optimum für eine primerunabhängige Spaltung. Puffer für Enzyme, wie DNAPEc1, die gewöhnlich in Abwesenheit von Salz arbeiten, werden nicht angereichert, um diese Konzentration zu erzielen. Zur Untersuchung auf primerunabhängige Spaltung (Reaktion 3) werden die gleichen Mengen Testmolekül, aber ohne Primer, unter den gleichen Pufferbedingungen wie für Reaktion 2 vereinigt.

[0480] Alle drei Testreaktionen werden dann genug Enzym ausgesetzt, dass das Molverhältnis von Enzym zu Testkomplex etwa 1:1 ist. Die Reaktionen werden in einem Temperaturenbereich bis zu, aber nicht größer als diejenige Temperatur, die entweder durch die Enzymstabilität oder Komplexstabilität ermöglicht wird, die jedoch niedriger als bis zu 80°C für Enzyme aus Thermophilen ist, für eine hinreichende Zeit inkubiert, dass eine Spaltung ermöglicht wird (10 bis 60 min). Die Produkte der Reaktionen 1, 2 und 3 werden durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgelöst, und durch Autoradiographie oder durch ein vergleichbares Verfahren sichtbar gemacht, das sich für das verwendete Markierungssystem eignet. Zusätzliche Markierungssysteme umfassen den Chemilumineszenz-Nachweis, Silber oder andere Färbungen, Blotting und Probing und dergleichen. Die Anwesenheit der Spaltprodukte wird durch die Anwesenheit von Molekülen angezeigt, die bei einem niedrigeren Molekulargewicht wandern als die ungespaltene Teststruktur. Diese Spaltprodukte zeigen, dass die Kandidaten-Polymerase eine strukturspezifische 5'-Nukleaseaktivität aufweist.

[0481] Zur Bestimmung, ob eine modifizierte DNA-Polymerase im Wesentlichen die gleiche 5'-Nukleaseaktivität hat wie die native DNA-Polymerase, werden die Ergebnisse der vorstehend beschriebenen Tests mit den Ergebnissen verglichen, die aus diesen Tests erhalten wurden, die mit der nativen DNA-Polymerase durchgeführt wurden. Der Begriff "im Wesentlichen die gleiche 5'-Nuklease-Aktivität" bedeutet, dass die modifizierte Polymerase und die native Polymerase die Testmoleküle auf die gleiche Weise spalten. Es ist nicht nötig, dass die modifizierte Polymerase mit der gleichen Rate spaltet, wie die native DNA-Polymerase.

[0482] Einige Enzyme oder Enzympräparate können andere assoziierte oder kontaminierende Aktivitäten aufweisen, die unter den vorstehend beschriebenen Spaltungsbedingungen funktionell sind, und die den 5'-Nuklease-Nachweis stören können. Die Reaktionsbedingungen können unter Berücksichtigung dieser anderen Aktivitäten, damit die Zerstörung des Substrates vermieden wird, oder einer anderen Maskierung der 5'-Nuklease-Spaltung und ihrer Produkte modifiziert werden. Die DNA-Polymerase I von E. coli (Pol I) hat neben ihrer Polymerase- und 5'-Nukleaseaktivitäten eine 3'-Exonuklease, die die DNA in 3'→5'-Richtung abbauen kann. Wenn das Molekül in der **Fig.** 15E dieser Polymerase unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen ausgesetzt wird, entfernt die 3'-Exonuklease folglich rasch den ungepaarten 3'-Arm, zerstört die gegabelte Struktur, die ein Substrat für die 5'-Exonukleas-Spaltung haben muss, und es wird keine Spaltung nachgewiesen. Die wahre Fähigkeit von Pol I zur Spaltung des Produkts kann enthüllt werden, wenn die 3'-Exonuklease durch eine Änderung von Bedingungen (beispielsweise pH-Wert), Mutation oder durch Zugabe eines Kompetitors für die Aktivität gehemmt wird. Die Zugabe von 500 pmol eines einzelsträngigen Kompetitor-Oligonukleotids, das nicht mit der in der **Fig.** 15E gezeigten Struktur verwandt ist, zu der Spaltungsreaktion mit Pol I hemmt effizient die Spaltung des 3'-Arms der Struktur von **Fig.** 15E, ohne dass die 5'-Exonuklease-Freisetzung des 5'-Arms gestört wird. Die Konzentration des Kompetitors ist nicht entscheidend, jedoch sollte sie so hoch sein, dass die 3'-Exonuklease für die Dauer der Reaktion besetzt wird.

[0483] Eine ähnliche Zerstörung des Testmoleküls kann durch Kontaminationen in dem Kandidaten-Polymerase-Präparat verursacht werden. Mehrere Sätze der strukturspezifischen Nukleasereaktionen können durchgeführt werden, um die Reinheit der Kandidaten-Nuklease zu bestimmen und um das Fenster zwischen Unter- und Überexposition des Testmoleküls zum untersuchten Polymerase-Präparat zu finden.

[0484] Die vorstehend beschriebenen modifizierten Polymerasen wurden folgendermaßen auf 5'-Nukleaseaktivität untersucht: Die Reaktion 1 wurde in einem Puffer aus 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5 bei 20°C, 1,5 mM $MgCl_2$ und 50 mM KCl durchgeführt, und in der Reaktion 2 wurde die KCl-Konzentration auf 20 mM reduziert. In den Reaktionen 1 und 2 wurden 10 fmol des in der **Fig.** 15E gezeigten Testsubstratmoleküls mit 1 pmol des angegebenen Primers und 0,5 bis 1,0 µl des Extrakts vereinigt, der die modifizierte Polymerase (hergestellt wie oben beschrieben) enthält. Dieses Gemisch wurde dann 10 min bei 55°C inkubiert. Für sämtliche untersuchten mutierten Polymerasen reichten diese Bedingungen aus, dass eine vollständige Spaltung erhalten wurde. Wenn das in der **Fig.** 15E gezeigte Molekül am 5'-Ende markiert wurde, wurde das freigesetzte 5'-Fragment mit 25 Nukleotiden Länge geeignet auf einem 20%igen Polyacrylamid-Gel (19:1 vernetzt) mit 7 M Harn-

stoff in einem Puffer, der 45 mM Tris-Borat pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA enthielt, aufgelöst. Die Klone 3C–F, und 4B wiesen eine strukturspezifische Spaltung auf, die mit der der unmodifizierten DNA-Polymerase vergleichbar ist. Zudem haben die Klone 3E, 3F und 3G die zusätzliche Fähigkeit zur Spaltung von DNA in Abwesenheit eines 3'-Arms wie oben erörtert. Veranschaulichende Spaltreaktionen sind in der Fig. 16 gezeigt.

[0485] Für die in der Fig. 16 gezeigten Reaktionen wurden die mutierten Polymerase-Klone 3E (Taq-Mutante) und 4B (Tfl-Mutante) auf ihre Fähigkeit zur Spaltung des in der **Fig.** 15E gezeigten Haarnadel-Substrats untersucht. Das Substratmolekül wurde am 5'-Ende mit ^{32}P markiert. 10 fmol hitzedenaturierte, endmarkierte Substrat-DNA und 0,5 Units DNAPTaq (Spur 1) oder 0,5 µl 3E oder 4B-Extrakt (Fig. 16, Spuren 2–7, Extrakt wurde hergestellt wie oben beschrieben) wurden in einem Puffer gemischt, der 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5, 50 mM KCl und 1,5 mM $MgCl_2$ enthielt. Das endgültige Reaktionsvolumen betrug 10 µl. Die in den Spuren 4 und 7 gezeigten Reaktionen enthalten zudem 50 µM von jedem dNTP. Die in den Spuren 3, 4, 6 und 7 gezeigten Reaktionen enthalten 0,2 µM des Primer-Oligonukleotids (komplementär zum 3'-Arm des Substrats und in der **Fig.** 15E gezeigt). Die Reaktionen wurden für 4 min bei 55°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 8 µl 95% Formamid gestoppt, das 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffe pro 10 µl Reaktionsvolumen enthielt. Die Proben wurden dann auf 12%ige denaturierende Acrylamidgele aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele autoradiographisch erfasst. Die Fig. 16 zeigt, dass die Klone 3E und 4B eine ähnliche Spaltungsaktivität aufweisen, wie die native DNAPTaq. Man beachte, dass eine gewisse Spaltung in diesen Reaktionen in Abwesenheit von Primer erfolgt. Werden lange Haarnadelstrukturen, wie die hier verwendeten (**Fig.** 15E) in den Spaltreaktionen verwendet, die in Puffern mit 50 mM KCl durchgeführt werden, wird ein geringes Ausmaß an primerunabhängiger Spaltung beobachtet. Höhere KCl-Konzentrationen unterdrücken die primerunabhängige Spaltung unter diesen Bedingungen, eliminieren diese aber nicht.

2. Test auf Synthese-Aktivität

[0486] Die Fähigkeit des modifizierten Enzyms oder der proteolytischen Fragmente wird untersucht durch das modifizierte Enzym auf ein Test-System, in dem ein Primer an eine Matrize hybridisiert wird, und die DNA-Synthese wird durch das zugefügte Enzym katalysiert. Viele Standard-Labor-Techniken setzen einen solchen Test ein. Eine Nick-Translation und Enzym-Sequenzierung beinhalten beispielsweise eine Verlängerung eines Primers an einer DNA-Matrize durch ein Polymerasemolekül.

[0487] In einem bevorzugten Test zur Bestimmung der Syntheseaktivität eines modifizierten Enzyms wird ein Oligonukleotid-Primer an eine einzelsträngige DNA-Matrize (beispielsweise Bakteriophagen-M13-DNA) hybridisiert, und der Doppelstrang aus Primer und Matrize wird in der Gegenwart der modifizierten fraglichen Polymerase, der Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und des Puffers und der Salze inkubiert, von denen bekannt ist, dass sie für das unmodifizierte oder native Enzym geeignet sind. Der Nachweis der Primer-Extension (durch denaturierende Gelelektrophorese) oder des dNTP-Einbaus (durch saure Fällung oder Chromatographie) zeigt eine aktive Polymerase an. Eine Markierung, die entweder isotopisch oder nicht-isotopisch ist, ist vorzugsweise entweder im Primer oder als dNTP vorhanden, so dass der Nachweis der Polymerisationsprodukte erleichtert wird. Die Syntheseaktivität wird als Menge an freiem Nukleotid quantifiziert, die in die wachsende DNA-Kette eingebaut wird, und ist ausgedrückt als Menge, die je Zeiteinheit unter spezifischen Reaktionsbedingungen eingebaut wird.

[0488] Veranschaulichende Ergebnisse eines Tests für die Synthese-Aktivität sind in der Fig. 17 gezeigt. Die Synthese-Aktivität der mutierten DNAPTaq-Klone 3B–F wurde folgendermaßen getestet: Ein Mastergemisch des folgenden Puffers wurde hergestellt: 1,2 × PCR-Puffer (1 × PCR-Puffer enthält 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,5 und jeweils 0,05% Tween 20 und Nonidet P40), jeweils 50 µM von dGTP, dATP und dTTP, 5 µM dCTP und 0,125 µM α-^{32}P-dCTP bei 600 Ci/mmol. Vor dem Einstellen dieses Gemischs auf sein Endvolumen wurde es in zwei gleiche Aliquote unterteilt. Eins erhielt destilliertes Wasser bis zu einem Volumen von 50 µl, so dass die oben genannten Konzentrationen erhalten wurden. Das andere erhielt 5 µg einzelsträngige M13mp18-DNA (etwa 2,5 pmol oder 0,05 µM Endkonzentration) und 250 pmol des M13-Sequenzierungs-Primers (5 µM Endkonzentration) und destilliertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 50 µl. Jeder Cocktail wurde für 5 min auf 75°C erwärmt und dann auf Raumtemperatur gekühlt. Dies gestattet, dass die Primer an die DNA in den DNA-haltigen Gemischen hybridisieren.

[0489] Für jeden Test wurden 4 µl des Cocktails mit der DNA mit 1 µl der mutierten Polymerase kombiniert, hergestellt wie beschrieben, oder 1 Unit DNAPTaq (Perkin Elmer) in 1 µl dH_2O. Eine Kontrolle "ohne DNA" erfolgte in der Gegenwart von DNAPTaq (Fig. 17, Spur 1) und eine Kontrolle "ohne Enzym" erfolgte mit Wasser anstelle von Enzym (Spur 2). Jede Reaktion wurde gemischt, dann bei Raumtemperatur (etwa 22°C) für 5 min, dann bei 55°C für 2 min, dann bei 72°C für 2 min, inkubiert. Dieser Inkubationsschritt erfolgte zum Nachweisen

der Polymerisation in jeglichen Mutanten, die optimale Temperaturen unter 72°C haben. Nach der letzten Inkubation wurden die Röhrchen kurz zentrifugiert, so dass jegliche Kondensation aufgefangen wird, und wurden dann auf Eis untergebracht. Ein µl jeder Reaktion wurde an einen Ursprung 1,5 cm vom unteren Rand einer Polyethylenimin-(PEI)-Cellulose-Dünnschicht-Chromatographieplatte punktförmig aufgetragen und trocknen gelassen. Die Chromatographieplatte wurde in 0,75 M NaH_2PO_4, pH-Wert 3,5, getrennt, bis sich die Pufferfront etwa 9 cm vom Ursprung weg bewegt hatte. Die Platte wurde getrocknet, in Plastikfolie eingehüllt, mit Leuchtfarbe beschriftet und mit einem Röntgenfilm belegt. Der Einbau wurde nachgewiesen als Zählimpulse, die am ursprünglichen Auftragungsort zurückblieben, während die nicht eingebauten Nukleotide durch die Salzlösung vom Ursprung befördert wurden.

[0490] Der Vergleich der Stellen der Zählimpulse mit den beiden Kontrollspuren bestätigten das Fehlen der Polymerisationsaktivität in den Mutantenpräparaten. Unter den modifizierten DNAPTaq-Klonen behält nur Klon 3B jegliche restliche Syntheseaktivität bei, wie in **Fig. 17** gezeigt.

BEISPIEL 3

5'-Nukleasen, hergeleitet von thermostabilen DNA-Polymerasen, können kurze Haarnadel-Strukturen mit Spezifität spalten.

[0491] Die Fähigkeit der 5'-Nukleasen zur Spaltung der Haarnadelstrukturen zur Erzeugung einer gespaltenen Haarnadelstruktur, die sich als Nachweismolekül eignet, wurde untersucht. Die Struktur und die Sequenz des Haarnadel-Testmoleküls sind in der **Fig. 18A** (Seq.-ID Nr. 15) gezeigt. Das Oligonuklid (in den **Fig. 18A** als "Primer" bezeichnet, Seq.-ID Nr. 22) ist im hybridisierten Zustand an seine komplementäre Sequenz am 3'-Arm des Haarnadeltestmoleküls gezeigt. Das Haarnadel-Testmolekül wurde an einem Ende mit ^{32}P markiert, wobei ein markierter T7-Promotor-Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion verwendet wurde. Die Markierung ist am 5'-Arm des Haarnadel-Testmoleküls zugegen, und ist in der **Fig. 18A** durch den Stern veranschaulicht.

[0492] Die Spaltungsreaktion erfolgte durch Zugabe von 10 fmol hitzedenaturiertem, endmarkiertem Haarnadeltestmolekül, 0,2 µM Primer-Oligonukleotid (komplementär zum 3'-Arm der Haarnadel), jeweils 50 µM dNTP und 0,5 Units DNAPTaq (Perkin Elmers) oder 0,5 µl Extrakt, das eine 5'-Nuklease (hergestellt wie vorstehend beschrieben) enthielt, in einem Gesamtvolumen von 10 µl in einem Puffer, der 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5, 50 mM KCl und 1,5 mM $MgCl_2$ enthielt. Die in den Spuren 3, 5 und 7 gezeigten Reaktionen erfolgten in Abwesenheit von dNTPs.

[0493] Die Reaktionen wurden 4 min bei 55°C inkubiert. Die Reaktionen wurden bei 55°C durch die Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05 Markerfarbstoffe in 10 µl Reaktionsvolumen gestoppt. Die Proben wurden nicht erhitzt, bevor sie auf denaturierende Polyacrylamidgele (10% Polyacrylamid, 19:1 Vernetzung, 7 M Harnstoff, 89 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 2,8 mM EDTA) geladen wurden. Die Proben wurden nicht erhitzt, so dass die Auflösung einzelsträngiger und wieder doppelsträngig gemachter ungespaltener Haarnadel-Moleküle ermöglicht wurde.

[0494] Die **Fig. 18B** zeigt, dass veränderte Polymerasen, denen jegliche nachweisbare Syntheseaktivität fehlt, eine Haarnadelstruktur spalten, wenn ein Oligonukleotid an den einzelsträngigen 3'-Arm der Haarnadel hybridisiert wird, so dass eine einzelne Spezies Spaltprodukt erhalten wird (**Fig. 18B**, Spuren 3 und 4). 5'-Nukleasen, wie Klon 3D, gezeigt in den Spuren 3 und 4, erzeugen selbst in der Gegenwart von dNTPs ein einzelnes Spaltprodukt. 5'-Nukleasen, die eine restliche Menge Syntheseaktivität (weniger als 1% der Wild-Typ-Aktivität) aufrechterhalten, erzeugen mehrfache Spaltprodukte, da die Polymerase das Oligonukleotid verlängern kann, das an den 3'-Arm der Haarnadel hybridisiert ist, wodurch die Spaltstelle (Klon 3B, Spuren 5 und 6) bewegt wird. Native DNA Taq erzeugt sogar noch mehr Spaltproduktspezies als Polymerasemutanten, die restliche Syntheseaktivität behalten und wandelt zusätzlich die Haarnadelstruktur in Anwesenheit von dNTPs in eine doppelsträngige Form um, und zwar aufgrund der hohen Spiegel der Syntheseaktivität in der nativen Polymerase (**Fig. 18B**, Spur 8).

BEISPIEL 4

Spaltung linearer Nukleinsäuresubstrate

[0495] Aus dem Vorstehenden geht hervor, dass thermostabile native (d. h. "Wildtyp-") DNA-Polymerasen Haarnadelstrukturen auf spezifische Weise spalten können, und dass diese Entdeckung mit Erfolg auf einen

Nachweistest angewendet werden kann. In diesem Beispiel werden die erfindungsgemäßen DNAP-Mutanten gegen drei verschiedene Spaltstrukturen untersucht, die in der Fig. 20A gezeigt sind. Die Struktur 1 in Fig. 20A ist ein einfaches einzelsträngiges 206-mer (dessen Herstellungs- und Sequenz-Information in Beispiel 1C erörtert sind). Die Strukturen 2 und 3 sind Doppelstränge; die Struktur 2 ist die gleiche Haarnadelstruktur wie in Fig. 11A gezeigt (unten), wohingegen bei der Struktur 3 der Haarnadelabschnitt der Struktur 2 entfernt ist.

[0496] Die Spaltprodukte umfassten 0,01 pmol der resultierenden Substrat-DNA und 1 pmol des Pilot-Oligonukleotids in einem Gesamt-Volumen von 10 µl 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3, 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$. Die Reaktionen wurden für 30 min bei 55°C inkubiert, und durch die Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen gestoppt. Die Proben wurden 2 min auf 75°C erhitzt, unmittelbar vor der Elektrophorese durch ein 10% Polyacrylamid-Gel (19:1 Vernetzung) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA.

[0497] Die Ergebnisse wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und sind wie in der Fig. 20B gezeigt, mit den folgendermaßen angegebenen Enzymen: I ist native Taq-DNAP, II ist native Tfl-DNAP; III ist die in der **Fig.** 3E gezeigte Cleavase® BX; IV ist die in der **Fig.** 3F gezeigte Cleavase® BB; V ist die in der **Fig.** 4B gezeigte Mutante; und VI ist die in der **Fig.** 3G gezeigte Cleavase® BN.

[0498] Die Struktur 2 wurde zum "Normalisieren" des Vergleichs verwendet. Es wurde beispielsweise entdeckt, dass man 50 ng Taq-DNAP und 300 ng Cleavase® BN benötigte, um ähnliche Mengen Spaltung von Struktur 2 in dreißig (30) min zu erhalten. Unter diesen Bedingungen kann die native Taq-DNAP die Struktur 3 nicht in signifikantem Maße spalten. Die native Tfl-DNAP spaltet die Struktur 3 auf eine Weise, die mehrfache Produkte erzeugt.

[0499] Sämtliche untersuchte Mutanten spalten dagegen den linearen Doppelstrang von Struktur 3. Dieser Befund zeigt, dass diese Eigenschaft der mutierten DNA-Polymerasen mit thermostabilen Polymerasen über die thermophilen Spezies übereinstimmt.

BEISPIEL 5

5'-Exonukleolytische Spaltung ("Nibbling") durch thermostabile DNAPs

[0500] Es stellte sich heraus, dass thermostabile DNAPs, einschließlich der erfindungsgemäßen, eine wahre 5'-Exonuklease aufweisen, die zum Nibbling des 5'-Endes linearer doppelsträngiger Nukleinsäurestrukturen fähig ist. In diesem Beispiel wird wiederum das 206 Basenpaar große DNA-Doppelstrang-Substrat eingesetzt (siehe Beispiel 1C). In diesem Fall wurde es hergestellt durch die Verwendung von einem ^{32}P-markierten Primer und einem unmarkierten Primer in einer Polymerasekettenreaktion. Die Spaltungsreaktionen umfassten 0,01 pmol hitzedenaturierte endmarkierte Substrat-DNA (wobei auch der unmarkierte Strang zugegen war), 5 pmol Pilot-Oligonukleotid (siehe Pilot-Oligonukleotide in der Fig. 11A) und 0,5 Units DNAPTaq oder 0,5 µ Cleavase® BB in dem E. coli-Extrakt (siehe oben), in einem Gesamtvolumen von 10 µl 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$.

[0501] Die Reaktionen wurden bei 65°C durch die Zugabe von vorgewärmtem Enzym gestartet, dann auf die endgültige Inkubationstemperatur für 30 min gebracht. Die Ergebnisse sind in der Fig. 21A gezeigt. Die Proben in den Spuren 1 bis 4 sind die Ergebnisse mit der nativen Taq-DNAP, wohingegen die Spuren 5 bis 8 die Ergebnisse mit Cleavase® BB zeigen. Die Reaktionen für die Spuren 1, 2, 5 und 6 wurden durchgeführt bei 65°C, und die Reaktionen für die Spuren 3, 4, 7, und 8 wurden bei 50°C durchgeführt, und alle Reaktionen wurden bei der Temperatur durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen gestoppt. Die Proben wurden 2 min auf 75°C erwärmt, direkt vor der Elektrophorese durch ein 10% Acrylamidgel (19:1 vernetzt), mit 7 M Harnstoff in einem Puffer von 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA. Das erwartete Produkt in den Reaktionen 1, 2, 5 und 6 ist 85 Nukleotide lang; in den Reaktionen 3 und 7 ist das erwartete Produkt 27 Nukleotide lang. Die Reaktionen 4 und 8 wurden ohne Pilot-Oligonukleotid durchgeführt und sollten bei 206 Nukleotiden verbleiben. Die schwache Bande, die man bei 24 Nukleotiden beobachtet, ist restlicher endmarkierter Primer aus der PCR.

[0502] Das überraschende Ergebnis ist, dass Cleavase® BB unter diesen Bedingungen bewirkt, dass sämtliche Markierung in sehr kleinen Spezies erscheint, was die Möglichkeit nahe legt, dass das Enzym das Substrat vollständig hydrolysierte. Zur Bestimmung der Zusammensetzung der am schnellsten laufenden Bande, die in den Spuren 5 bis 8 beobachtet wird (den Reaktionen, die mit der Deletionsmutante durchgeführt wurden), wurden die Proben des 206 Basenpaar großen Doppelstrangs entweder mit T7-Gen 6-Exonuklease (USB) oder

mit alkalischer Phosphatase aus Kalbs-Intestinum (Promega) gemäß den Herstellerangaben behandelt, so dass entweder markiertes Mononukleotid (Spur a von Fig. 21B) bzw. freies ^{32}P-markiertes anorganisches Phosphat (Spur b von Fig. 21B) erhalten wurde. Diese Produkte zusammen mit den Produkten in der Spur 7 von Feld A wurden durch kurze Elektrophorese durch ein 20% Acrylamidgel (19:1 vernetzt), mit 7 M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA, aufgelöst. Cleavase® BB kann somit das Substrat in Mononukleotide umwandeln.

BEISPIEL 6

Das Nibbling ist Doppelstrang-abhängig

[0503] Das Nibbling durch Cleavase® BB ist vom Doppelstrang abhängig. Bei diesem Beispiel werden intern markierte Einzelstränge des 206-mers produziert durch 15 Zyklen Primer-Verlängerung mittels Einbau von α-^{32}P-markiertem dCTP, kombiniert mit allen vier unmarkierten dNTPs, wobei ein unmarkiertes 206 Bp-Fragment als Matrize verwendet wurde. Einzel- und doppelsträngige Produkte wurden durch Elektrophorese durch ein nicht-denaturierendes 6% Polyacrylamidgel (29:1 Vernetzung) in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3 1,4 mM EDTA, durch Autoradiographie sichtbar gemacht, aus dem Gel ausgeschnitten, durch passive Diffusion eluiert, und durch Ethanolfällung konzentriert.

[0504] Die Spaltbedingungen umfassten 0,04 pmol Substrat-DNA, und 2 µl Cleavase® BB (in einem E. coli-Extrakt, wie oben beschrieben) in einem Gesamtvolumen von 40 µl 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von vorgewärmtem Enzym gestartet; 10 µl Aliquots wurden bei 5, 10, 20 und 30 min entnommen, und in präparierte Röhrchen überführt, die 8 µl 95% Formamid mit 30 mM EDTA und 0,05 Markerfarbstoffe enthielten. Die Proben wurden 2 min auf 75°C unmittelbar vor der Elektrophorese durch ein 10% Acrylamidgel (19:1 vernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA erwärmt. Die Ergebnisse wurden durch Autoradiographie wie in der **Fig.** 22 gezeigt sichtbar gemacht. Die Spaltung durch Cleavase® BB hängt von einer Doppelstrang-Struktur ab; keine Spaltung der Einzelstrangstruktur wird nachgewiesen, wohingegen die Spaltung des 206-mer-Doppelstrangs vollständig ist.

BEISPIEL 7

Das Nibbling kann zielgerichtet erfolgen.

[0505] Die Nibbling-Aktivität der erfindungsgemäßen DNAPs kann erfolgreich in einem Nachweis-Test eingesetzt werden. Eine Ausführungsform eines solchen Tests ist in der Fig. 23 gezeigt. In diesem Test wird ein markiertes Oligonukleotid eingesetzt, das für eine Zielsequenz spezifisch ist. Das Oligonukleotid ist gegenüber dem Ziel im Überschuss, so dass die Hybridisierung rasch verläuft. In dieser Ausführungsform enthält das Oligonukleotid zwei Fluorescein-Markierungen, deren Nähe auf dem Oligonukleotid bewirkt, dass ihre Emission gequencht wird. Können die DNAP das Oligonukleotid anknabbern, trennen sich die Markierungen und sind nachweisbar. Der verkürzte Doppelstrang wird destabilisiert und dissoziiert. Das Ziel kann bedeutenderweise jetzt frei mit einem intakten markierten Oligonukleotid reagieren. Die Reaktion kann so lang verlaufen, bis das gewünschte Maß an Nachweis erzielt ist. Ein analoger, jedoch unterschiedlicher Typ des Cycling-Tests wurden beschrieben. Dieser setzt Lambda-Exonuklease ein. Siehe C. G. Copley und C. Boot, BioTechniques 13: 888 (1982).

[0506] Der Erfolg eines solchen Tests hängt von der Spezifität ab. Mit anderen Worten muss das Oligonukleotid an das spezifische Ziel hybridisieren. Es ist auch bevorzugt, dass der Test empfindlich ist; das Oligonukleotid sollte Idealerweise kleine Mengen des Ziels nachweisen. Die Fig. 24A zeigt einen am 5'-Ende ^{32}P-markierten Primer, der an eine Plasmid-Zielsequenz gebunden ist. In diesem Fall war das Plasmid pUC19 (kommerziell erhältlich), das hitzedenaturiert wurde durch zwei (2) min Kochen und dann Blitzkühlen. Der Primer ist ein 21-mer (Seq.-ID Nr. 28). Das eingesetzte Enzym war Cleavase® BX (eine Verdünnung, äquivalent zu 5 × 10^{-3} µl Extrakt) in 100 µl mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,3, 2 mM $MnCl_2$. Die Reaktion erfolgte bei 55°C für sechzehn (16) Std. mit oder ohne genomische Hintergrund-DNA (aus Hühnerblut). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und Marker-Farbstoffen gestoppt.

[0507] Die Produkte der Reaktion wurden durch PAGE (10% Polyacylamid, 19:1 vernetzt, 1 × TBE) aufgelöst, wie in der Fig. 24B ersichtlich ist. Die Spur "M" enthält das markierte 21-mer. Die Spuren 1 bis 3 enthalten kein spezifisches Ziel, obgleich die Spuren 2 und 3 100 ng bzw. 200 ng genomische DNA enthalten. Die Spuren 4, 5 und 6 enthalten spezifisches Ziel entweder mit 0 ng, 100 ng, bzw. 200 ng genomischer DNA. Es ist klar, dass

die Umwandlung in Mononukleotide in den Spuren 4, 5 und 6 erfolgt, und zwar unabhängig von der Anwesenheit oder der Menge von Hintergrund-DNA. Somit kann das Nibbling zielgerichtet und spezifisch sein.

BEISPIEL 8

Cleavase-Reinigung

[0508] Wie vorstehend erwähnt, wurden exprimierte thermostabile Proteine (d. h. die 5'-Nukleasen) durch rohe Bakterienzellextrakte isoliert. Die gefällten E. coli-Proteine wurden dann zusammen mit anderen Zelltrümmern durch Zentrifugation entfernt. In diesem Beispiel wurden die Zellen, die die BN-Klone exprimieren, gezüchtet und gesammelt (500 g). Für jedes g (Feuchtgewicht) E. coli wurden 3 ml Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 1 mM EDTA, 100 µM NaCl) zugegeben. Die Zellen wurden mit 200 µg/ml Lysozym bei Raumtemperatur für 20 min lysiert. Danach wurde Desoxycholsäure zugegeben, so dass eine 0,2% Endkonzentration erhalten wurde, und das Gemisch wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

[0509] Das Lysat wurde für etwa 6 bis 8 min bei 0°C ultraschallbehandelt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (39000 × g für 20 min) entfernt. Es wurde Polyethylenimin (0,5%) zum Überstand zugegeben, und das Gemisch wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde zentrifugiert (5000 × g für 15 min) und der Überstand wurde erhalten. Dieser wurde für 30 min bei 60°C erhitzt, und dann erneut zentrifugiert (5000 × g für 15 min), und der Überstand wurde wieder behalten.

[0510] Der Überstand wurde mit 35% Ammoniumsulfat für 15 min bei 4°C gefällt. Das Gemisch wurde dann zentrifugiert (5000 g für 15 min) und der Überstand wurde entfernt. Das Präzipitat wurde dann in 0,25 M KCl, 20 Tris pH-Wert 7,6, 0,2% Tween und 0,1 EDTA) gelöst und dann gegen Bindungspuffer (8 × Bindungspuffer umfasst: 40 mM Imidazol, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9) dialysiert.

[0511] Das solubilisierte Protein wird dann auf der Ni^{++}-Säule (Novagen) gereinigt. Der Bindungspuffer wird oben über das Säulenbett gespült, und dann wird die Säule mit dem präparierten Extrakt beladen. Eine Fließgeschwindigkeit von etwa 10 Säulenvolumen pro Std. ist für eine effiziente Reinigung optimal. Ist die Fließgeschwindigkeit zu groß, kontaminieren mehr Verunreinigungen die eluierte Fraktion.

[0512] Die Säule wird dann mit 25 ml (10 Volumina) 1 × Bindungspuffer und dann mit 15 ml (6 Volumina) 1 × Waschpuffer (8 × Waschpuffer umfasst: 480 mM Imidazol, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9) gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 15 ml (6 Volumina) IX-Elutionspuffer (4 × Elutionspuffer umfasst: 4 mM Imidazol, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9) eluiert. Das Protein wird dann mit 35% Ammoniumsulfat wie oben erneut gefällt. Das Präzipitat wurde dann gelöst und dialysiert gegen 20 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM EDTA. Diese Lösung wurde auf jeweils 0,1% Tween 20 und NP-40 gebracht und bei 4°C aufbewahrt.

BEISPIEL 9

Die Verwendung verschiedener zweiwertiger Kationen bei der Spaltungsreaktion beeinflusst die Natur der resultierenden Spaltprodukte

[0513] Beim Vergleich der 5'-Nukleasen, die durch die Modifikation und/oder Deletion der C-terminalen Polymerisationsdomäne von Thermos aquaticus DNA-Polymerase (DNAPTaq) erzeugt wurde, wie es in der **Fig.** 3B–G schematisch gezeigt ist, wurden signifikante Unterschiede in der Stärke der Wechselwirkungen dieser Proteine mit dem 3'-Ende der Primer beobachtet, die sich stromaufwärts der Spaltstelle (wie in **Fig. 5** gezeigt) befinden. Bei der Beschreibung der Spaltung dieser Strukturen durch Pol-1-DNA-Polymerasen (siehe Beispiel 1 und Lyamichev et al., Science 260: 778 [1993]) wurde beobachtet, dass bei Fehlen eines Primers die Stelle der Verbindung zwischen dem doppelsträngigen Bereich und den einzelsträngigen 5'- und 3'-Armen, bestimmt an der Spaltstelle, jedoch in Anwesenheit eines Primers, die Stelle des 3'-Endes des Primers der bestimmende Faktor für die Spaltstelle wurde. Es wurde postuliert, dass diese Affinität für das 3'-Ende der Synthesefunktion der DNA-Polymerase entsprach.

[0514] Die in der **Fig. 20A** gezeigte Struktur 2 wurde verwendet, um die Wirkungen des 3'-Endes proximal zur Spaltstelle in Spaltreaktionen zu untersuchen, die mehrere verschiedene Lösungen (beispielsweise Lösungen, die verschiedene Salze [KCl oder NaCl], verschiedene zweiwertige Kationen [Mn^{2+} oder Mg^{2+}] usw.) sowie die Verwendung verschiedener Temperaturen für die Spaltreaktion umfassten. Waren die Reaktionsbedingungen derart, dass die Bindung des Enzyms (beispielsweise eine DNAP, die eine 5'-Nuklease, eine modifizierte DNAP oder eine 5'-Nuklease umfasste) am 3'-Ende (des Pilot-Oligonukleotids) nahe der Spaltstelle stark war,

wird die gezeigte Struktur an der in Fig. 20A gezeigten Stelle gespalten. Diese Spaltstelle setzt den ungepaarten 5'-Arm frei und hinterlässt einen Bruch zwischen dem verbleibenden Abschnitt der Ziel-Nukleinsäure und dem gefalteten 3'-Ende des Pilot-Oligonukleotids. Sind dagegen die Reaktionsbedingungen derart, dass die Bindung der DNAP (umfassend eine 5'-Nuklease) an das 3'-Ende schwach war, war die anfängliche Spaltung wie oben beschrieben, jedoch wurde nach der Freisetzung des 5'-Arms der verbleibende Doppelstrang durch die Exonuklease-Funktion der DNAP gespalten.

[0515] Ein Weg zur Schwächung der Bindung der DNAP an das 3'-Ende ist die Entfernung der gesamten oder eines Teils der Domäne, der mindestens ein gewisser Teil dieser Funktion zugeordnet wurde. Einige der 5'-Nukleasen, die durch Deletion der Polymerisationsdomäne von DNAPTaq erzeugt wurden, haben eine gesteigerte wahre Exonuklease-Funktion, wie in Beispiel 5 gezeigt.

[0516] Die Affinität dieser Typen von Enzymen (d. h. der 5'-Nukleasen, die mit DNAPs einhergehen oder davon hergeleitet sind) für ausgesparte 3'-Enden können ebenfalls durch die Identität der zweiwertigen Kationen beeinflusst werden, die in der Spaltreaktion zugegen sind. Es wurde von Longley et al., (Nucl. Acids Res. 18: 7317 [1990]) gezeigt, dass die Verwendung von $MnCl_2$ in einer Reaktion mit DNAPTaq ermöglichte, dass die Polymerase die Nukleotide vom 5'-Ende des Primers entfernte, der an eine Matrize hybridisierte, wenn auch ineffizient. Durch Untersuchung der mit Hilfe der Struktur aus Fig. 20A erzeugten Spaltprodukte, wie oben beschrieben, in einer Reaktion, die entweder DNAPTaq oder die Cleavase® BB-Nuklease enthielt, wurde beobachtet, dass der Austausch von $MgCl_2$ gegen $MnCl_2$ in der Spaltreaktion zum exonukleolytischen "Nibbling" des Doppelstrangs stromabwärts der anfänglichen Spaltstelle führte. Die Erfindung wird zwar nicht auf einen bestimmten Mechanismus eingeschränkt, jedoch nimmt man an, dass der Austausch von $MgCl_2$ gegen $MnCl_2$ in der Spaltreaktion die Affinität dieser Enzyme für ausgesparte 3'-Enden verringert.

[0517] In sämtlichen Fällen steigert $MnCl_2$ die 5'-Nukleasefunktion und im Fall der Cleavase® BB-Nuklease wird eine 50- bis 100fache Stimulation der 5'-Nukleasefunktion beobachtet. Somit wurde zwar die Exonukleaseaktivität dieser Enzyme oben in Anwesenheit von $MgCl_2$ beobachtet, die nachstehend beschriebenen Tests zeigen eine vergleichbare Menge Exonukleaseaktivität mit 50 bis 100fach weniger Enzym, wenn $MnCl_2$ anstelle von $MgCl_2$ verwendet wird. Wenn diese reduzierten Mengen Enzym in einem Reaktionsgemisch verwendet werden, das $MgCl_2$ enthält, ist die Nibbling- oder Exonuklease-Aktivität viel weniger offensichtlich als es in den Beispielen 5 bis 7 beobachtet wird.

[0518] Ähnliche Effekte werden in der Leistung des Nukleinsäure-Nachweistests beobachtet, der in den nachstehenden Beispielen 10 bis 39 beschrieben ist, wenn die Reaktionen, die in Anwesenheit von $MgCl_2$ oder $MnCl_2$ durchgeführt werden, verglichen werden. In Anwesenheit eines der beiden zweiwertigen Kationen zwingt die Anwesenheit des Invader™-Oligonukleotids (nachstehend beschrieben) die Spaltstelle in den Sonden-Doppelstrang, jedoch kann in Anwesenheit von $MnCl_2$ der Sonden-Doppelstrang viel weiter einem Nibbling unterliegen, so dass eine Leiter von Produkten erhalten wird, die sichtbar ist, wenn eine 3'-Endmarkierung am Sonden-Oligonukleotid vorhanden ist. Wird das Invader™-Oligonukleotid aus einer Reaktion weggelassen, die Mn^{2+} enthält, wird die Sonde vom 5'-Ende abgeknabbert. Reaktionen auf der Basis von Mg^{2+} zeigen ein minimales Nibbling des Sonden-Oligonukleotids. In all diesen Fällen hängt die Spaltung der Sonde von der Anwesenheit der Ziel-Nukleinsäure ab. Bei den nachstehenden Beispielen wird die Leiter, die durch die gesteigerte Nibbling-Aktivität erzeugt wird, welche in Anwesenheit von Mn^{2+} beobachtet wird, als positiver Indikator dafür verwendet, dass das Sonden-Oligonukleotid an die Zielsequenz hybridisierte.

BEISPIEL 10

Invasive 5'-endonukleolytische Spaltung durch thermostabile 5'-Nukleasen bei fehlender Polymerisation.

[0519] Wie in den vorstehenden Beispielen beschrieben spalten die 5'-Nukleasen nahe der Verbindung zwischen den einzelsträngigen und basengepaarten Bereichen in einem gegabelten Doppelstrang, gewöhnlich etwa ein Basenpaar in den basengepaarten Bereich. In diesem Beispiel wird gezeigt, dass die thermostabilen 5'-Nukleasen, einschließlich derjenigen der vorliegenden Erfindung (beispielsweise Cleavase® BN-Nuklease, Cleavase® A/G-Nuklease) die Fähigkeit zur Spaltung weiter in den basengepaarten Bereich hinein haben, wenn ein stromaufwärts befindliches Oligonukleotid zur Verfügung steht, das einen 3'-Bereich trägt, der zu einem 5'-Bereich des Gegenstands-Doppelstrangs, wie in der Fig. 26 gezeigt, homolog ist.

[0520] Die Fig. 26 zeigt ein synthetisches Oligonukleotid, das derart ausgelegt war, dass es sich auf sich selbst faltet, bestehend aus der folgenden Sequenz: 5'-GTTCTCTGCTCTCTGGTCGCTGTCTCGCTTGTG-AAACAAGCGAGACAGCGTGGTC TCTCG-3' (Seq.-ID Nr. 29). Dieses Oligonukleotid wird als "S-60-Haarna-

del" bezeichnet. Die durch dieses Oligonukleotid hergestellte 15-Basenpaar-Haarnadel wird weiterhin stabilisiert durch eine "Dreierschleifen"-Sequenz im Schleifenende (d. h. drei Nukleotide bilden den Schleifenanteil der Haarnadel) (Hiraro et al., Nucleic Acids Res., 22 (4): 576 [1994]). Die Fig. 26 zeigt ebenfalls die Sequenz des P-15-Oligonukleotids und die Stelle des Komplementaritätsbereichs, den die P15- und S-60 Oligonukleotide gemeinsam haben. Die Sequenz des P-15-Oligonukleotids ist 5'-CGAGAGACCACGCTG-3' (Seq.-ID Nr. 30). Wie nachstehend eingehend erläutert, zeigen die ausgefüllten schwarzen Pfeilspitzen in der Fig. 26 die Spaltstellen der S-60-Haarnadel in Abwesenheit des P-15-Oligonukleotids und die hohlen Pfeilspitzen zeigen die Spaltstellen in Anwesenheit des P15-Oligonukleotids. Die Größe der Pfeilspitze zeigt die relative Nutzung einer bestimmten Stelle.

[0521] Das S-60-Haarnadel-Molekül wurde an seinem 5'-Ende mit Biotin für den anschließenden Nachweis markiert. Die S-60-Haarnadel wurde in Anwesenheit einer thermostabilen 5'-Nuklease in Anwesenheit oder Abwesenheit des P-15-Oligonukleotids inkubiert. Die Anwesenheit des vollständigen Doppelstranges, der sich durch die S-60-Haarnadel bilden kann, wird durch Spaltung mit der Cleavase® BN-5'-Nuklease auf eine primerunabhängige Weise nachgewiesen (d. h. in Abwesenheit des P-15-Oligonukleotids). Die Freisetzung von 18- und 19-Nukleotid-Fragmenten aus dem 5'-Ende des S-60-Haarnadelmoleküls zeigte, dass die Spaltung nahe der Verbindung zwischen den einzel- und doppelsträngigen Bereichen erfolgte, wenn nichts an den 3'-Arm der S-60-Haarnadel hybridisierte (Fig. 27; Spur 2).

[0522] Die in der Fig. 27 gezeigten Reaktionen wurden folgendermaßen durchgeführt. 20 fmol der 5'-Biotin-markierten Haarnadel-DNA (Seq.-ID Nr. 29) wurden mit 0,1 ng des Cleavase® BN-Enzyms und 1 µl 100 mM MOPS (pH-Wert 7,5) mit jeweils 0,5% Tween-20 und NP-40 in einem Gesamtvolumen von 9 µl vereinigt. In der in Spur 1 gezeigten Reaktion wurde das Enzym weggelassen, und das Volumen wurde durch Zusatz von destilliertem Wasser erreicht (dies diente als ungeschnittene Kontrolle oder als Kontrolle ohne Enzym). Die in der Spur 3 von Fig. 27 gezeigte Reaktion enthielt auch 0,5 pmol des P15-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 30), das an den ungepaarten 3'-Arm der S-60-Haarnadel hybridisieren kann (Seq.-ID Nr. 29, wie in der Fig. 26 schematisch dargestellt.

[0523] Die Reaktionen wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, 15 sec auf 95°C erwärmt, dann auf 37°C gekühlt, und die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 10 mM $MnCl_2$ zu jedem Röhrchen gestartet. Nach 5 min wurden die Reaktionen durch die Zugabe von 6 µl 95% Formamid gestoppt, das 20 mM EDTA und 0,05% Marker-Farbstoffe enthielt. Die Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese durch ein 15% Acrylamidgel (19:1 vernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA, 2 min auf 75°C erhitzt.

[0524] Nach der Elektrophorese wurden die Platten getrennt, so dass das Gel eben auf einer Platte verblieb. Eine positiv geladene Nylonmembran mit 0,2 mm Poren (NYTRAN, Schleicher & Schüll, Keene, NH), vorbenetzt in H_2O, wurde oben auf das exponierte Gel gelegt. Sämtliche Luftblasen wurden entfernt. Zwei Stücke 3 MM Filterpapier (Whatman) wurden dann oben auf der Membran untergebracht, die andere Glasplatte wurde ausgetauscht und das Sandwich wurde mit Heftklammern festgeklammert. Die Übertragung konnte über Nacht fortlaufen. Nach der Übertragung wurde die Membran vorsichtig von dem Gel geschält, und an der Luft trocknen gelassen. Nach dem vollständigen Trocknen wurde die Membran in 1,2 × Sequenase-Images-Blocking-Puffer (United States Biochemical) mit 0,3 ml Puffer/cm^2 Membran gewaschen. Das Waschen erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Ein Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat (SAAP, United-States Biochemical) wurde zu einer 1:4000 Verdünnung direkt zur Blockierungslösung gegeben, und 15 min gerührt. Die Membran wurde kurz mit H_2O gespült und dreimal für 5 min je Waschschritt mit 0,5 ml/cm^2 1 × SAAP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH-Wert 10, 50 mM NaCl) mit 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS) gewaschen. Die Membran wurde kurz mit H_2O zwischen jedem Waschschritt gespült. Die Membran wurde dann einmal in 1 × SAAP-Puffer gewaschen, der 1 mM $MgCl_2$ ohne SDS enthielt, sorgfältig entwässert, und in einem wärmeverschließbaren Kunststoffbeutel untergebacht.

[0525] Mit einer sterilen Pipette wurden 5 ml CDP-Star™ (Tropix, Bedford, MA) chemilumineszierendes Substrat für alkalische Phosphatase in den Beutel gegeben und über die gesamte Membran für 2 bis 3 min verteilt. Die mit CDP-Star-™-behandelte Membran wurde für eine Anfangsexpositionszeit von 10 min einem XRP-Röntgenfilm (Kodak) ausgesetzt.

[0526] Das resultierende Autoradiogramm ist in der Fig. 27 gezeigt. In der Fig. 27 enthält die mit "M" bezeichnete Spur das biotinylierte P-15-Oligonukleotid, das als Marker diente. Die Größen (in Nukleotiden) der ungespaltenen S-60-Haarnadel (60 Nuk.; Spur 1), des Markers (15 Nuk; Spur "M") und der durch die Spaltung der S-60-Haarnadel in Anwesenheit (Spur 3) oder Abwesenheit (Spur 2) von P-15-Oligonukleotid erzeugten Spalt-

produkte sind angezeigt.

[0527] Da sich die Komplementaritätsbereiche der S-60-Haarnadel auf dem gleichen Molekül befinden, sollte im Wesentlichen keine Verzögerungszeit benötigt werden, damit eine Hybridisierung ermöglicht wird (d. h. zur Bildung des Doppelstrang-Bereichs der Haarnadel). Diese Haarnadelstruktur bildet sich Erwartungen zufolge lange bevor das Enzym das Molekül lokalisieren und spalten kann. Die Spaltung in Abwesenheit von Primer-Oligonukleotid war erwartungsgemäß an oder nahe bei der Verbindung zwischen den Doppelstrang- und Einzelstrangbereichen, so dass der ungepaarte 5'-Arm freigesetzt wird (**Fig. 27**, Spur 2). Die resultierenden Spaltprodukte hatten 18 und 19 Nukleotide Länge.

[0528] Es wurde erwartet, dass die Stabilität der S-60-Haarnadel mit der Dreierschleife verhindern kann, dass das P-15-Oligonukleotid die Spaltung in der in Beispiel 1 oben beschreibenen primergerichteten Weise spaltet, weil das 3'-Ende des "Primers" ungepaart bleibt. Überraschenderweise wurde gefunden, dass das Enzym eine "Invasion" durch den P-15-Primer in den Doppelstrang-Bereich der S-60-Haarnadel vermittelt, wie es durch ein Verschieben der Spaltstelle 3 bis 4 Basenpaare weiter in den Doppelstrang-Bereich beweisen wird, wobei die größeren Produkte (22 und 21 Nuk.) freigesetzt werden, die in der Spur 3 von **Fig. 27** zu sehen sind.

[0529] Die genauen Spaltstellen der S-60-Haarnadel sind schematisch an der Struktur in der **Fig. 26** gezeigt, wobei die ausgefüllten Pfeilspitzen die Spaltstellen in Abwesenheit von P-15-5-Oligonukleotid anzeigen, und die hohlen Pfeilspitzen die Spaltstellen in Anwesenheit von P-15 anzeigen.

[0530] Diese Daten zeigen, dass die Anwesenheit auf dem 3'-Arm eines Oligonukleotids mit etwas Sequenzhomologie zu den ersten Basen des ähnlich orientierten Strangs des Doppelstrangs stromabwärts ein dominanter Faktor bei der Bestimmung der Spaltstelle von 5'-Nukleasen sein kann. Da das Oligonukleotid, das eine gewisse Sequenzhomologie zu mehreren ersten Basen des ähnlich orientierten Strangs des Doppelstrangs stromabwärts aufweist, in den Doppelstrang-Bereich der Haarnadel einzudringen (oder diesen zu verdrängen) scheint, wird es als "Invader™"-Oligonukleotid bezeichnet. Wie in den nachstehenden Beispielen gezeigt, scheint ein Invader™-Oligonukleotid in einen Bereich aus doppelsträngiger Nukleinsäure einzudringen oder diesen zu verdrängen, unabhängig davon, ob der Doppelstrang-Bereich auf dem gleichen Molekül zugegen ist oder nicht (d. h. auf der Haarnadel) oder ob der Doppelstrang zwischen zwei getrennten Nukleinsäure-Strängen gebildet wird.

BEISPIEL 11

Das Invader™-Oligonukleotid verschiebt die Spaltstelle in einem vorgeformten Sonden/Ziel-Doppelstrang

[0531] In dem Beispiel 10 wurde gezeigt, dass ein Invader™-Oligonukleotid die Stelle verschieben kann, an der eine 5'-Nuklease einen Doppelstrang-Bereich spaltet, der sich auf einem Haarnadel-Molekül befindet. In diesem Beispiel wurde die Fähigkeit eines Invader™-Oligonukleotids zur Verschiebung der Spaltstelle in einem Doppelstrang-Bereich untersucht, der zwischen zwei getrennten Nukleinsäure-Molekülen gebildet wurde.

[0532] Eine einzelsträngige Ziel-DNA, umfassend das einzelsträngige zirkuläre M13mp19-Molekül und ein markiertes (Fluorescein) Sonden-Oligonukleotid, wurden in Anwesenheit des Reaktionspuffers gemischt, der Salz (KCl) und zweiwertige Kationen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}) enthielt, so dass die Doppelstrang-Bildung gefördert wurde. Das Sonden-Oligonukleotid betrifft ein markiertes Oligonukleotid, das komplementär zu einem Bereich des Zielmoleküls ist (beispielsweise M13mp19). Ein zweites Oligonukleotid (unmarkiert) wurde zu der Reaktion gegeben, nachdem die Sonde und das Ziel hybridisieren konnten. Das zweite Oligonukleotid bindet an einen Bereich des Ziels, der sich stromabwärts des Bereichs befindet, an den das Sonden-Oligonukleotid bindet. Dieses zweite Oligonukleotid enthält Sequenzen, die zu einem zweiten Bereich des Zielmoleküls komplementär sind. Enthält das zweite Oligonukleotid einen Bereich, der komplementär ist zu einem Bereich der Sequenzen längs des Ziels, an den das Sonden-Oligonukleotid auch bindet, wird das zweite Oligonukleotid auch als Invader™-Oligonukleotid bezeichnet (siehe **Fig.** 28c).

[0533] **Fig. 32** zeigt die Hybridisierung der beiden Oligonukleotide an Bereiche längs des M13mp19-Zielmoleküls (unterer Strang ist in allen drei Strukturen gezeigt). In der **Fig. 28** ist nur ein Bereich mit 52 Nukleotiden des M13mp19-Moleküls gezeigt; diese Sequenz mit 52 Nukleotiden ist in der Seq.-ID Nr. 31 aufgeführt. Das Sonden-Oligonukleotid enthält eine Fluoresceinmarkierung am 3'-Ende. Die Sequenz der Sonde ist 5'-AGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG-3' (Seq.-ID Nr. 32). In der **Fig. 28** sind die Sequenzen, die das zweite Oligonukleotid umfassen, einschließlich des Invader™-Oligonukleotids, unterstrichen. In der **Fig.** 28a ist das zweite Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-GACGGGGAAAGCCGGCGAACG-3' (Seq.-ID Nr. 33) komplementär

zu einem anderen und stromabwärts gelegenen Bereich des Zielmoleküls als das Sonden-Oligonukleotid (markiert mit Fluorescein oder "Fluor"); es gibt eine Lücke zwischen dem zweiten stromaufwärts gelegenen Oligonukleotid und der Sonde für die in der **Fig.** 28a gezeigten Struktur. In der **Fig.** 28b ist das zweite stromaufwärts gelegene Oligonukleotid, das die Sequenz 5'-GAAAGCCGGCGAACGTGGCG-3' (Seq.-ID Nr. 34) aufweist, komplementär zu einem anderem Bereich des Zielmoleküls, als das Sonden-Oligonukleotid, aber in diesem Fall stoßen das zweite Oligonukleotid und das Sonden-Oligonukleotid aneinander (d. h. das 3'-Ende des zweiten stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids ist unmittelbar neben dem 5'-Ende der Sonde, so dass keine Lücke zwischen diesen beiden Oligonukleotiden existiert). In der **Fig.** 28c weisen das stromaufwärts gelegene Oligonukleotid (5'-GGCGAACGTGGCGAGAAAGGA-3' [Seq.-ID Nr. 35]) und das Sonden-Oligonukleotid einen komplementären Bereich zu dem Zielmolekül auf. Somit hat das stromaufwärts gelegene Oligonukleotid einen 3'-Arm, der eine identische Sequenz zur mehreren ersten Basen der stromabwärts gelegenen Sonde aufweist. In dieser Situation wird das stromaufwärts gelegene Oligonukleotid als Invader™-Oligonukleotid bezeichnet.

[0534] Die Wirkung des Vorhandenseins eines Invader™-Oligonukleotids auf das Spaltmuster in einem Sonden/Ziel-Doppelstrang, der vor der Zugabe des Invader™-Oligonukleotids gebildet wurde, wurde untersucht. Das Invader™-Oligonukleotid und das Enzym wurden zugegeben, nachdem die Sonde an das Ziel hybridisieren konnte, und die Position und das Ausmaß der Spaltung der Sonde wurden untersucht, um zu bestimmen, a) ob das Invader™ die Spaltstelle zu einem bestimmten internen Bereich der Sonde verschieben konnte, und b) ob die Reaktion bestimmte Spaltprodukte mit der Zeit anreichern konnte, und zwar in Abwesenheit von thermischen Zyklen, Polymerisation oder Exonuklease-Entfernung der Sondensequenz.

[0535] Die Reaktionen wurden folgendermaßen durchgeführt. Jeweils 20 µl der beiden Enzymgemische wurden hergestellt, welche 2 µl Cleavase® A/G-Nukleaseextrakt (hergestellt wie in Beispiel 2) mit oder ohne 50 pmol des Invader™-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 35) wie angegeben, je 4 µl des Gemischs enthielten. Für jede der in der **Fig. 29** gezeigten acht Reaktionen wurden 150 fmol M13mp19 Einzelstrang-DNA (erhältlich von Life Technologies, Inc.) mit 5 pmol Fluorescein-markierter Sonde (Seq.-ID Nr. 32) vereinigt, so dass die in der **Fig.** 28c gezeigte Struktur erzeugt wurde, jedoch ohne vorhandenes Invader™-Oligonukleotid (das Sonden/Ziel-Gemisch). Eine Hälfte (4 Röhrchen) der Sonden/Ziel-Gemische wurde vereinigt mit 1 µl 100 mM MOPS, pH-Wert 7,5 mit jeweils 0,5% Tween-20 und NP-40, 0,5 µl 1 M KCl und 0,25 µl 80 mM $MnCl_2$, und destilliertes Wasser, auf ein Volumen von 6 µl. Der zweite Satz der Sonden/Ziel-Gemische wurde vereinigt mit 1 µl 100 mM MOPS, pH-Wert 7,5 mit jeweils 0,5% Tween 20 und NP-40, 0,5 µl 1 M KCl und 0,25 µl 80 mM $MgCl_2$. Der zweite Satz der Gemische enthielt daher $MgCl_2$ anstelle des in dem ersten Gemischsatz vorhandenen $MnCl_2$.

[0536] Die Gemische (mit Sonde/Ziel, mit Puffer, KCl und zweiwertigem Kation) wurden mit einem Tropfen ChillOut®-Verdampfungssperre überschichtet und wurden für 5 min auf 60°C gebracht, so dass Hybridisierung ermöglicht wurde. 4 µl der vorstehenden Enzym-Gemische ohne das Invader™-Oligonukleotid wurden zu den Reaktionen gegeben, deren Produkte in den Spuren 1, 3, 5 und 7 der **Fig. 29** gezeigt sind. Die Reaktionen, deren Produkte in den Spuren 2, 4, 6 und 8 der **Fig. 29** gezeigt sind, erhielten die gleiche Menge Enzym im Gemisch mit dem Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35). Die Reaktionen 1, 2, 5 und 6 wurden für 5 min bei 60°C inkubiert, und die Reaktionen 3, 4, 7 und 8 wurden für 15 min bei 60°C inkubiert.

[0537] Sämtliche Reaktionen wurden durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen gestoppt. Die Proben wurde wurden unmittelbar vor der Elektrophorese durch ein 20% Acrylamidgel (19:1 vernetzt), das 7 M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA enthielt, für 1 min auf 90°C erhitzt. Nach der Elektrophorese wurden die Reaktionsprodukte durch Verwendung eines Hitachi FMBIO-Fluoreszenz-Imagers sichtbar gemacht, dessen Ausgang in der **Fig. 29** gezeigt ist. Das in allen Spuren sichtbare Fluoreszenzmaterial mit sehr niedrigem Molekulargewicht bei oder in der Nähe der Salzfront in **Fig. 29** und andere Fluor-Imager-Bilder werden beobachtet, wenn fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide elektrophoretisch aufgetrennt und auf einem Fluor-Imager dargestellt werden. Dieses Material ist kein Produkt der Spaltungsreaktion.

[0538] Die Verwendung von $MnCl_2$ in diesen Reaktionen (Spuren 1 bis 4) stimuliert die wahre Exonuklease- oder "Nibbling-"Aktivität des Cleavase®-Enzyms wie in Beispiel 6 beschrieben, was eindeutig in den Spuren 1 und 3 der **Fig. 29** zu sehen ist. Dieses Nibbling des Sonden-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 32) in Abwesenheit des Invader™-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 35) bestätigt, dass das Sonden-Oligonukleotid einen Doppelstrang mit der Zielsequenz bildet. Die leiterartigen Produkte, die durch diese Nibbling-Reaktion erzeugt werden, können vom Abbau der Sonde durch Nukleasen, die in einer klinischen Probe zugegen sein könnten, schwer zu unterscheiden sein. Das Einbringen des Invader™-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 35) verursacht dagegen eine

ausgeprägte Verschiebung der Spaltung der Sonde, wobei die Spaltstelle 6 bis 7 Basen in die Sonde verschoben wird, was das Hybridisieren der beiden Oligonukleotide bestätigt. In der Gegenwart von $MnCl_2$ kann das Exonuklease-"Nibbling" nach dem Invader™-Oligonukleotid-gerichteten Ereignis erfolgen, bis der restliche Doppelstrang destabilisiert wird und abfällt.

[0539] Bei der Spaltungsreaktion auf Magnesium-Basis (Spuren 5 bis 8) ist die Nibbling- oder wahre Exonuklease-Funktion der Cleavase® A/G enzymsupprimiert (aber die endonukleolytische Funktion des Enyzms ist im Wesentlichen unverändert), so dass das Sonden-Oligonukleotid in Abwesenheit von Invader™-Oligonukleotid nicht abgebaut wird (Fig. 29, Spuren 5 und 7). Wird Invader™-Oligonukleotid zugegeben, ist es klar, dass das Invader™-Oligonukleotid eine Verschiebung der endonukleolytischen Spaltung der hybridisierten Sonde bewirkt. Ein Vergleich der Produkte der 5- und 15-min-Reaktionen mit Invader™-Oligonukleotid (Spuren 6 und 8 in der Fig. 29) zeigt, dass zusätzliche Sonde mit dem Ziel hybridisiert und gespalten wird. Die berechnete Schmelztemperatur (T_m) des Anteils der Sonde, die nicht eingedrungen ist (d. h. die Nukleotide 9 bis 26 von Seq.-ID Nr. 32) ist 56°C, so dass der beobachtete Umsatz (wie nachgewiesen durch die Anreicherung der Spaltprodukte mit zunehmender Reaktionszeit) nahe legt, dass die Volllänge des Sondenmoleküls mit einer berechneten T_m von 76°C an den nachfolgenden Sonden-Hybridisierungsereignissen in dieser 60°C-Reaktion beteiligt sein muss.

BEISPIEL 12

Die Überlappung der 3'-Invader™-Oligonukleotid-Sequenz mit dem 5'-Bereich der Sonde verursacht eine Verschiebung der Spaltstelle

[0540] In Beispiel 11 wurde die Fähigkeit des Invader™-Oligonukleotids zur Verschiebung der Spaltstelle einer Sonde untersucht, die an ein Zielmolekül hybridisierte. In diesem Beispiel wurden die Experimente durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Anwesenheit eines Oligonukleotids stromaufwärts der Sonde dafür reichte, dass es zu einer Verschiebung der Spaltstelle(n) längs der Sonde kam oder ob die Anwesenheit von Nukleotiden am 3'-Ende des Invader™-Oligonukleotids, die die gleiche Sequenz haben wie die ersten Nukleotide am 5'-Ende des Sonden-Oligonukleotids, erforderlich war, um die Verschiebung der Spaltung zu fördern.

[0541] Zur Untersuchung dieses Punktes werden die Spaltprodukte, erhalten aus drei verschiedenen Anordnungen zielspezifischer Oligonukleotide, verglichen. Ein Diagramm dieser Oligonukleotide und der Weg, auf dem sie an eine Test-Nukleinsäure M13mp19 hybridisiert, ist in der Fig. 28 gezeigt. In der **Fig.** 28a befindet sich das 3'-Ende des stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 33) stromaufwärts des 5'-Endes des Stromabwärts-"Sonden"-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 32), so dass ein Bereich der M13-Ziel vorhanden ist, der mit keinem Oligonukleotid gepaart ist. In **Fig.** 28b ist die Sequenz des stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 34) direkt oberhalb der Sonde (Seq.-ID Nr. 32), so dass weder eine Lücke noch eine Überlappung zwischen den Sequenzen vorhanden ist. Die **Fig.** 28c veranschaulicht die Anordnung der in dem erfindungsgemäßen Test verwendeten Substrate, was zeigt, dass das stromaufwärts gelegene "Invader™-Oligonukleotid" (Seq.-ID Nr. 35) die gleiche Sequenz auf einem Abschnitt auf seinem 3'-Bereich aufweist, der in dem 5'-Bereich der stromabwärts gelegenen Sonde (Seq.-ID Nr. 32) vorhanden ist. Das heißt, dass diese Bereiche um die Hybridisierung an das gleiche Segment der M13-Ziel-Nukleinsäure konkurrieren.

[0542] In diesen Experimenten wurden vier Enzymgemische folgendermaßen hergestellt (unter Planung von 5 µl pro Spaltung): Gemisch 1 enthielt 2,25 µl Cleavase® A/G-Nuklease-Extrakt (hergestellt wie in Beispiel 2) je 5 µl Gemisch in 20 mM MOPS, pH-Wert 7,5 mit jeweils 0,1% Tween 20 und NP-40, 4 mM $MnCl_2$ und 100 mM KCl. Das Gemisch 2 enthielt 11,25 Units Taq-DNA-Polymerase (Promega) je 5 µl Gemisch in 20 mM MOPS, pH-Wert 7,5 mit jeweils 0,1% Tween 20 und NP-40, 4 mM $MnCl_2$ und 100 mM KCl. Das Gemisch 3 enthielt 2,25 µl Cleavase® A/G-Nuklease-Extrakt pro 5 µl Gemisch in 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,5, 4 mM $MgCl_2$ und 100 mM KCl. Das Gemisch 4 enthielt 11,25 Units Taq-DNR-Polymerase je 5 µl Gemisch in 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,5, 4 mM $MgCl_2$ und 100 mM KCl.

[0543] Für jede Reaktion wurden 50 fmol M13mp19 Einzelstrang-DNA (die Ziel-Nukleinsäure) mit 5 pmol des Sonden-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 32, das am 3'-Ende eine Fluorescein-Markierung enthielt) und 50 pmol von einem der drei stromaufwärts gelegenen Oligonukleotide, die in der Fig. 28 schematisch gezeigt sind (d. h. eine der Seq.-ID Nr. 33 bis 35) in einem Gesamtvolumen von 5 µl destilliertem Wasser vereinigt. Die Reaktionen wurden mit einem Tropfen ChillOut™-Verdampfungssperre überschichtet und auf 62°C erwärmt. Die Spaltungsreaktionen wurden durch die Zugabe von 5 µl eines Enzymgemischs in jedes Röhrchen gestartet, und die Reaktionen wurden 30 min bei 62°C inkubiert. Die in den Spuren 1 bis 3 der Fig. 30 gezeigten Reaktionen erhielten Gemisch 1; die Reaktionen 4 bis 6 erhielten Gemisch 2; die Reaktionen 7 bis 9 erhielten Ge-

misch 3 und die Reaktionen 10 bis 12 erhielten Gemisch 4.

[0544] Nach 30 min bei 62°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Marker-Farbstoffen gestoppt. Die Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese durch ein 20% Acrylamidgel (19:1 vernetzt) mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA, für 2 min auf 75°C erwärmt.

[0545] Nach der Elektrophorese wurden die Produkte der Reaktionen durch Verwendung eines Hitachi-FM-BIO-Fluoreszenz-Imagers sichtbar gemacht, dessen Ausgang in der Fig. 30 gezeigt ist. Die in den Spuren 1, 4, 7 und 10 von Fig. 30 gezeigten Reaktionsprodukte stammten aus Reaktionen, die die Seq.-ID Nr. 33 als stromaufwärts gelegenes Oligonukleotid enthielten (siehe **Fig.** 28a). Die in den Spuren 2, 5, 8 und 11 der Fig. 30 gezeigten Reaktionsprodukte stammten aus Reaktionen, die Seq.-ID Nr. 34 als stromaufwärts gelegenes Oligonukleotid enthielten (siehe **Fig.** 28b). Die in den Spuren 3, 6, 9 und 12 von Fig. 30 gezeigten Reaktionsprodukte stammten aus Reaktionen, die Seq.-ID Nr. 35, das Invader™-Oligonukleotid, als stromaufwärts gelegenes Oligonukleotid enthielten (siehe **Fig.** 28c).

[0546] Die Untersuchung der Reaktionen auf Mn^{2+}-Basis mit Cleavase® A/G-Nuklease oder DNAPTaq als Spaltmittel (Spuren 1 bis 3 bzw. 4 bis 6), zeigt, dass beide Enzyme eine aktive Exonuklease-Funktion in diesen Puffer-Bedingungen haben. Die Verwendung einer 3'-Markierung am Sonden-Oligonukleotid ermöglicht, dass die Produkte der Nibbling-Aktivität markiert bleiben, und daher in diesem Test sichtbar bleiben. Die in den Spuren 1, 2, 4 und 5 beobachteten Leitern bestätigen, dass die Sonde an die Ziel-DNA wie beabsichtigt hybridisiert. Diese Spuren zeigen auch, dass die Stelle der nicht-invasiven Oligonukleotide wenig Wirkung auf die erhaltenen Produkte hat. Die in diesen Spaltungen erzeugten gleichförmigen Leitern sind schwer von einer Leiter zu unterscheiden, die durch verunreinigende Nuklease verursacht wird, wie man es bei einer klinischen Probe vorfinden kann. Die in den Spuren 3 und 6 gezeigten Produkte, bei denen ein Invader™-Oligonukleotid zur Steuerung der Spaltung verwendet wurde, zeigten eine sehr ausgeprägte Verschiebung, so dass das primäre Spaltprodukt kleiner ist als diejenigen, die man bei der nicht-invasiven Spaltung beobachtet. Dieses Produkt unterliegt bei diesen Bedingungen einem weiteren Nibbling, wie es durch die kürzeren Produkten in diesen Spuren angezeigt wird. Diese Invader™-gerichteten Spaltprodukte lassen sich sehr leicht von einem Hintergrund von nichtspezifischem Abbau des Sonden-Oligonukleotids unterscheiden.

[0547] Wird Mg^{2+} als zweiwertiges Kation verwendet, sind die Ergebnisse noch ausgeprägter. In den Spuren 7, 8, 10 und 11 der Fig. 30, wo die stromaufwärts gelegenen Oligonukleotide nicht invasiv waren, wird minimales Nibbling beobachtet. Die Produkte in den DNAPTaq-Reaktionen zeigen etwas Anreicherung der Sonde, die am 5'-Ende um ein oder zwei Nukleotide verkürzt ist, was mit der vorherigen Untersuchung der Wirkung des Enzyms an genickten Substraten übereinstimmt (Longley et al., siehe oben). Ist das stromaufwärts gelegene Oligonukleotid invasiv, wird jedoch die Erscheinung der deutlich verschobenen Sondenbande beobachtet. Diese Daten zeigen klar, dass der invasive 3'-Anteil des stromaufwärts gelegenen Oligonukleotids für die Fixierung der Spaltstelle der stromabwärts gelegenen Sonde verantwortlich ist.

[0548] Somit zeigen die vorstehenden Ergebnisse, dass es das Vorhandensein der freien oder anfangs nicht-hybridisierten Nukleotide am 3'-Ende des Invader™-Oligonukleotids, die die Verschiebung der Spaltstelle vermitteln, und nicht bloß das Vorhandensein eines Oligonukleotids, das stromaufwärts der Sonde hybridisiert ist. Nukleinsäure-Erfassungstests, die die Verwendung eines Invader™-Oligonukleotids einsetzen, werden als Invader™-gerichtete Spaltungs-Tests bezeichnet.

BEISPIEL 13

Die Invader™-Oligonukleotid-gerichtete Spaltung erkennt Einzel- und Doppelstrang-Zielmoleküle in einem Hintergrund von Nicht-Ziel-DNA-Molekülen.

[0549] Damit ein Nukleinsäure-Erfassungsverfahren weithin verwendet wird, muss es ein spezifisches Ziel in einer Probe erfassen, die große Mengen anderer DNA (beispielsweise bakterielle oder menschliche Chromosomen-DNA) enthalten kann. Die Fähigkeit des Invader™-gerichteten Spaltungs-Tests zur Erkennung und Spaltung von einzel- oder doppelsträngigen Zielmolekülen in der Gegenwart großer Mengen von Nicht-Ziel-DNA wurde untersucht. In diesen Experimenten wurde eine Modell-Ziel-Nukleinsäure M13 in einzel- oder doppelsträngiger Form (einzelsträngige M13mp18 ist erhältlich von Life Technologies, und doppelsträngige M13mp19 ist erhältlich von NEB) mit menschlicher genomischer DNA (Novagen) vereinigt, und dann in Invader™-gerichteten Spaltungsreaktionen verwendet. Vor dem Start der Spaltungsreaktion wurden die DNAs für 15 min auf 95°C erhitzt, um die Proben vollständig zu denaturieren, wie es Standard-Praxis in Tests ist, wie

bei der Polymerase-Kettenreaktion oder enzymatischen DNA-Sequenzierung, die eine Lösungshybridisierung von Oligonukleotiden an doppelsträngige Zielmoleküle beinhalten.

[0550] Für jede der in den Spuren 2 bis 5 von Fig. 31 gezeigten Reaktionen wurde die Ziel-DNA (25 fmol der ssDNA oder 1 pmol der dsDNA) mit 50 pmol Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35) vereinigt; für die in der Spur 1 gezeigte Reaktion wurde die Ziel-DNA weggelassen. Die Reaktionen 1, 3 und 5 enthielten auch 470 ng menschliche genomische DNA. Diese Gemische wurden auf ein Volumen von 10 µl mit destilliertem Wasser gebracht, mit einem Tropfen ChillOut™-Verdampfungssperre überschichtet, und für 15 min auf 95°C gebracht. Nach diesem Inkubationszeitraum und immer noch bei 95°C erhielt jeder Tropfen 10 µl eines Gemischs aus 2,25 µl Cleavase® A/G-Nuklease-Extrakt (hergestellt wie in Beispiel 2 beschrieben) und 5 pmol Sonden-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 32), in 20 mM MOPS, pH-Wert 7,5, mit jeweils 0,1% Tween 20 und NP-40, 4 mM $MnCl_2$ und 100 mM KCl. Die Reaktionen wurden für 15 min auf 62°C gebracht und durch die Zugabe von 12 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen gestoppt. Die Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese durch ein 20% Acrylamidgel (19:1 vernetzt), mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA für 2 min auf 75°C erwärmt. Die Produkte der Reaktionen wurden durch die Verwendung eines Hitachi-FMBIO-Fluoreszenz-Imagers sichtbar gemacht. Die Ergebnisse sind in der Fig. 31 gezeigt.

[0551] In der Fig. 31 enthält die Spur 1 die Produkte der Reaktion, die die Sonde (Seq.-ID Nr. 32), das Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35) und menschliche genomische DNA enthält. Die Untersuchung der Spur 1 zeigt, dass die Sonde und die Invader™-Oligonukleotide spezifisch für die Zielsequenz sind, und dass die Anwesenheit der genomischen DNA keine signifikante Hintergrund-Spaltung verursacht.

[0552] In der Fig. 31 enthalten die Spuren 2 und 3 Reaktionsprodukte aus den Reaktionen, die die einzelsträngige Ziel-DNA-(M13mp18), die Sonde (Seq.-ID Nr. 32), und das Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35) in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von humaner genomischer DNA enthalten. Die Untersuchung der Spuren 2 und 3 zeigt, dass der Invader™-Erfassungstest zur Erfassung der Anwesenheit einer spezifischen Sequenz auf einem einzelsträngigen Zielmolekül in Anwesenheit oder Abwesenheit eines großen Überschusses an Kompetitor-DNA (humaner genomischer DNA) verwendet werden kann.

[0553] In Fig. 31 enthalten die Spuren 4 und 5 Reaktionsprodukte aus den Reaktionen, die die doppelsträngige Ziel-DNA (M13mp19), die Sonde (Seq.-ID Nr. 32) und das Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35) in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von humaner genomischer DNA enthalten. Die Untersuchung der Spuren 4 und 5 zeigt, dass die doppelsträngigen Zielmoleküle äußerst wichtig für Invader™-Oligonukleotid-gerichtete Erfassungsreaktionen sind. Der Erfolg dieser Reaktion mit einem kurzen doppelsträngigen Molekül, M13mp19 als Ziel in einem Hintergrund aus einem großen Überschuss von genomischer DNA ist besonders bewerkenswert, da es geschätzt wird, dass die kürzeren und weniger komplexen-M13-DNA-Stränge ihren komplementären Strang leichter finden als die Stränge der komplexeren humanen genomischen DNA. Wenn die M13-DNA rehybridisiert, bevor Sonde und/oder Invader™-Oligonukleotide an die Zielsequenzen längs der M13-DNA binden können, wird die Spaltungsreaktion verhindert. Da zudem die denaturierte genomische DNA potentiell Bereiche, die komplementär zur Sonde sind und/oder Invader™-Oligonukleotide enthält, war es möglich, dass die Anwesenheit von genomischer DNA die Reaktion durch Bindung dieser Oligonukleotide hemmt, wodurch ihre Hybridisierung an das M13-Ziel verhindert wird. Die vorstehenden Ergebnisse zeigten, dass diese theoretischen Belange unter den vorstehend eingesetzten Reaktionsbedingungen kein Problem sind.

[0554] Es wurde gezeigt, dass der Invader™-Erfassungs-Test zwar zur Erfassung von Sequenzen verwendet werden kann, die in einem doppelsträngigen Ziel zugegen sind, aber diese Daten zeigen auch, dass die Anwesenheit einer großen Menge Nicht-Ziel-DNA (470 ng/20 µl Reaktion) die Spaltspezifität nicht verringert. Diese Menge an DNA zeigt zwar etwas Einfluss auf die Rate der Produktansammlung, möglicherweise durch Bindung eines Anteils des Enzyms, die Beschaffenheit der Zielsequenz, je nachdem ob es sich um doppelsträngige Nukleinsäure handelt, beschränkt die Anwesenheit dieses Tests nicht.

BEISPIEL 14

Signalanreicherung in dem Invader™-gerichteten Spaltungs-Test als Funktion der Zielkonzentration

[0555] Zur Untersuchung, ob der Invader™-gerichtete Spaltungstest verwendet werden kann, um die Menge der Ziel-Nukleinsäure in einer Probe anzuzeigen, wurde das folgende Experiment durchgeführt. Spaltungsreaktionen wurden durchgeführt, welche ein Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35), eine markierte Sonde (Seq.-ID Nr. 32) und eine Ziel-Nukleinsäure, M13mp19, enthielt. Eine Reihe von Reaktionen, die immer klei-

nere Mengen der M13-Ziel-DNA enthielten, wurde eingesetzt, um zu untersuchen, ob die Spaltprodukte sich in einer Weise anreichern, die die Menge der Ziel-DNA, die in der Reaktion vorhanden ist, wiederspiegelt.

[0556] Die Reaktionen wurden folgendermaßen durchgeführt. Ein Mastermix mit Enzym und Puffer wurde zusammengestellt. Jeweils 5 µl des Master-Mixes enthielten 25 ng Cleavase® BN-Nuklease in 20 mM MOPS (pH-Wert 7,5) mit jeweils 0,1% Tween 20 und NP-40, 4 mM $MnCl_2$ und 100 mM KCl. Für jede der in den Spuren 4 bis 13 von Fig. 32 gezeigten Spaltungsreaktionen wurde ein DNA-Gemisch hergestellt, das 5 pmol des Fluorescein-markierten Sonden-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 32), 50 pmol Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35) und 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 oder 0,005 fmol einzelsträngige M13mp19 für jeweils 5 µl DNA-Gemisch enthielt. Die DNA-Lösungen wurden mit einem Tropfen ChillOut®-Verdampfungssperre überschichtet und auf 61°C gebracht. Die Spaltungsreaktionen wurden durch die Zugabe von 5 µl Enzymgemisch zu jedem Röhrchen gestartet (das Endreaktionsvolumen betrug 10 µl). Nach 30 min bei 61°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen beendet. Die Proben wurden direkt vor der Elektrophorese durch ein 20% denaturierendes Acrylamidgel (19:1 vernetzt) mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer, der 45 mM Tris-Borat (pH-Wert 8,3), 1,4 mM EDTA enthielt für 1 min auf 90°C erhitzt. Als Referenzen (d. h. Standards) wurden 1,0, 0,1 und 0,01 pmol-Aliquots von Fluorescein-markiertem Sonden-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 32) mit der vorstehenden Formamid-Lösung auf ein Endvolumen von 18 µl verdünnt. Diese Referenzmarker wurden jeweils in die Spuren 1 bis 3 des Gels geladen. Die Produkte der Spaltungsreaktionen (sowie der Referenzstandards) wurden nach der Elektrophorese durch die Verwendung eines Hitachi-FMBIO-Fluoreszenz-Imagers sichtbar gemacht. Die Ergebnisse sind in der Fig. 32 angezeigt.

[0557] In der Fig. 32 erscheinen Kästen rund um die fluoresceinhaltige Nukleinsäure (d. h. die gespaltenen und ungespaltenen Sondenmoleküle) und die Menge an in jedem Kasten enthaltenem Fluorescein ist unter dem Kasten angegeben. Die Hintergrund-Fluoreszenz des Gels (siehe Kasten mit der Bezeichnung "Hintergrund") wurde durch den Fluor-Imager subtrahiert, so dass jeder Wert erzeugt wird, der unter einem Kasten angezeigt wird, der gespaltene oder ungespaltene Sondenprodukte enthält (die Kästen sind oben links mit 1 bis 14 bezeichnet, wobei ein V und eine nachfolgende Zahl unter dem Kasten erscheinen). Die mit "M" bezeichnete Spur enthält fluoresceinierte Oligonukleotide, die als Marker dienten.

[0558] Die in der Fig. 32 gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die Anreicherung von gespaltenen Sondenmolekülen in einer Inkubationsperiode mit fester Länge die Menge an Ziel-DNA widerspiegelt, die in der Reaktion vorhanden ist. Die Ergebnisse zeigen auch, dass sich die gespalteten Sondenprodukte im Überschuss der Kopienzahl des Ziels anreichern. Dies wird eindeutig gezeigt durch Vergleich der in Spur 3 gezeigten Ergebnisse, in denen 10 fmol (0,01 pmol) ungeschnittene Sonde gezeigt sind, mit den in 5 gezeigten Ergebnissen, wo diejenigen Produkte gezeigt sind, die sich in Reaktion auf die Anwesenheit von 10 fmol Ziel-DNA anreicherten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Reaktion Hunderte Sonden-Oligonukleotid-Moleküle für jedes vorhandene Zielmolekül spalten kann, was das zielspezifische Signal, das in der Invader™-gerichteten Spaltungsreaktion erzeugt wird, drastisch amplifiziert.

BEISPIEL 15

Wirkung von Speichelextrakt auf den Invader™-gerichteten Spaltungs-Test

[0559] Damit sich ein Nukleinsäure-Nachweisverfahren in einem medizinischen (d. h. diagnostischen) Rahmen eignet, darf es nicht durch Materialien und Kontaminationen gehemmt werden, die man wahrscheinlich in einer üblichen klinischen Probe vorfindet. Zur Untersuchung der Empfänglichkeit des Invader™-gerichteten Spaltungs-Tests auf verschiedene Materialien, einschließlich, aber nicht eingeschränkt auf Nukleinsäuren, Glycoproteine und Kohlenhydrate, die man wahrscheinlich in einer klinischen Probe vorfindet, wurde ein Probe von menschlichem Speichel auf eine Weise hergestellt, die mit den Praktiken im Kliniklabor übereinstimmt, und der erhaltene Speichelextrakt wurde zu dem Invader™-gerichteten Spaltungs-Test gegeben. Die Wirkung des Speichel-Extraktes auf die Hemmung der Spaltung und auf die Spezifität der Spaltungsreaktion wurde untersucht.

[0560] 1,5 ml Human-Speichel wurden gesammelt und einmal mit einem gleichen Volumen eines Gemischs extrahiert, das Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) enthielt. Das resultierende Gemisch wurde in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, so dass die wässrigen und organischen Phasen getrennt wurden. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Röhrchen überführt. 1/10 Volumen von 3 M NaOAc wurden dazu gegeben, und der Inhalt des Röhrchens wurde gemischt. Zwei Volumina 100% Ethylalkohol wurden zu dem Gemisch gegeben, und die Probe wurde gemischt und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert, so dass sich ein Niederschlag bilden konnte. Die Probe wurde in einer Mikrozentrifuge bei 13000 U/min für 5 min zentrifugiert,

und der Überstand wurde entfernt und verworfen. Ein milchiges Pellet war leicht sichtbar. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gespült, unter Vakuum getrocknet und in 200 µl 100 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 0,1 mM EDTA, gelöst (dies macht den Speichelextrakt aus). Jeder µl des Speichelextrakts war äquivalent zu 7,5 µl Speichel. Die Analyse des Speichelextrakts durch Raster-Ultraviolett-Spektralphotometrie zeigte eine Peak-Extinktion bei etwa 260 nm und deutete die Anwesenheit von etwa 45 ng Gesamt-Nukleinsäure pro µl Extrakt an.

[0561] Die Wirkung der Anwesenheit von Speichelextrakt auf die folgenden Enzyme wurde untersucht: Cleavase® BN-Nuklease, Cleavase® A/G-Nuklease und drei Verschiedene Gruppen DNAPTaq: AmpliTaq® (Perkin Elmer, eine rekombinante Form von DNAPTaq), AmpliTaq® LD (Perkin Elmer, ein rekombinantes DNAP-Taq-Präparat mit sehr niedrigen Spiegeln DNA) und Taq-DNA-Polymerase (Fischer). Für jedes untersuchte Enzym wurde ein Enyzm/Sonden-Gemisch hergestellt, welches die gewählte Menge Enzym mit 5 pmol Sonden-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 32) in 10 µl 20 mM MOPS (pH-Wert 7,5) mit jeweils 0,1% Tween 20 und NP-40, 4 mM $MnCl_2$, 100 mM KCl und 100 µg/ml BSA enthielt. Die folgenden Mengen Enzym wurden verwendet: 25 ng Cleavase® BN, hergestellt wie in Beispiel 8 beschrieben; 2 µl Cleavase® A/G-Nuklease-Extrakt, hergestellt wie in Beispiel 2 beschrieben; 2,25 µl (11,25 Polymerase-Units) der folgenden DNA-Polymerasen: AmpliTaq® DNA-Polymerase (Perkin Elmer); AmpliTaq® DNA-Polymeras LD (Low DNA; von Perkin Elmer); TaqDNA-Polymerase (Fisher Scientific).

[0562] Für jede der in Fig. 33 gezeigten Reaktionen außer für diejenige, die in der Spur 1 gezeigt ist, wurde die Ziel-DNA (50 fmol einzelsträngige M13mp19DNA) mit 50 pmol Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35) und 5 pmol des Sonden-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 32) vereinigt; die Ziel-DNA wurde in Reaktion 1 (Spur 1) weg gelassen. Die Reaktionen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 enthielten 1,5 µl Speichel-Extrakt. Diese Gemische wurden mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 5 µl gebracht, mit einem Tropfen ChillOut®-Verdampfungsperre überschichtet, und für 10 min auf 95°C gebracht. Die Spaltungsreaktionen wurden dann durch Zugabe von 5 µl des gewünschten Enzym-Sondengemischs gestartet; die Reaktionen 1, 4 und 5 erhielten Cleavase® A/G-Nuklease. Die Reaktionen 2 und 3 erhielten Cleavase® BN; die Reaktionen 6 und 7 erhielten Ampli-Taq®; die Reaktionen 8 und 9 erhielten AmpliTaq® LD, und die Reaktionen 10 und 11 erhielten TaqDNA-Polymerase von Fisher Scientific.

[0563] Die Reaktionen wurden für 30 min bei 63°C inkubiert und durch die Zugabe von 6 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen gestoppt. Die Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese durch ein 20% Acrylamidgel (19:1 vernetzt), mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer von 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA für 2 min auf 75°C erhitzt. Die Reaktionsprodukte wurde durch die Verwendung eines Hitachi FMBIO-Fluoreszenz-Imagers sichtbar gemacht, und die Ergebnisse sind in der Fig. 33 gezeigt.

[0564] Ein paarweise erfolgender Vergleich der in Fig. 33 gezeigten Spuren ohne und mit dem Speichelextrakt, der mit jedem der Enzyme behandelt wurden, zeigt, dass der Speichelextrakt jeweils unterschiedliche Auswirkungen auf die Enzyme hat. Die Cleavase® BN-Nuklease und die AmpliTaq® werden zwar signifikant bezüglich der Spaltung bei diesen Bedingungen gehemmt, die Cleavase® A/G-Nuklease und die AmpliTaq® LD zeigen jedoch wenig Unterschied bei der Ausbeute an gespaltener Sonde. Die Präparation der Taq-DNA-Polymerase von Fisher Scientific zeigt eine Zwischenreaktion, mit einer partiellen Reduktion der Ausbeute an gespaltenem Produkt. Vom Standpunkt der Polymerisation sollten die drei DNAP-Taq-Varianten äquivalent sein; diese sollten das gleiche Protein mit der gleichen Menge an Syntheseaktivität sein. Es ist möglich, dass die beobachteten Unterschiede auf Variationen in der Menge der Nuklease-Aktivität beruht, die in jedem Präparat zugegen ist, was durch verschiedene Handhabung bei der Reinigung verursacht wird, oder durch verschiedene Reinigungsprotokolle. In jedem Fall ist es unwahrscheinlich, dass Qualitätskontroll-Tests, die dazu ausgelegt sind, dass sie die Polymerisationsaktivität in kommerziellen DNAP-Präparaten bestimmen, die Abweichung der Menge an vorhandener Nukleaseaktivität ergeben. Wurden Präparate der DNAPTaq auf vollständige 5'-Nuklease-Aktivität untersucht (d. h. wenn die Nukleaseaktivität spezifisch quantifiziert wurde) ist es wahrscheinlich, dass die Präparate Empfindlichkeiten (gegenüber Speichelextrakt) zeigen, die mehr mit derjenigen übereinstimmen, die man bei der Verwendung von Cleavase® A/G-Nuklease beobachtet, von der die DNAPTaq um einige wenige Aminosäuren abweicht.

[0565] Es ist bemerkenswert, dass es selbst in den verlangsamten Reaktionen der Cleavase® BN- und der DNAPTaq-Varianten keinen nachweisbaren Anstieg der nichtspezifischen Spaltung des Sonden-Oligonukleotids aufgrund ungeeigneter Hybridisierung oder aus dem Speichel hervorgehenden Nukleasen gibt.

BEISPIEL 16

Vergleich der zusätzlichen 5'-Nukleasen in dem Invader™-gerichteten Spaltungs-Test

[0566] Eine Reihe von Eubakterien-Typ-A-DNA-Polymerasen (d. h. Pol-I-Typ DNA-Polymerasen) hat die Funktion als strukturspezifische Endonukleasen (siehe Beispiel 1 und Lyamichev et al., siehe oben). In diesem Beispiel wurde gezeigt, dass die Enzyme dieser Klasse ebenfalls hergestellt zur Katalyse der erfindungsgemäßen Invader™-gerichteten Spaltung werden können, obschon diese nicht so effizient sind, wie die Cleavase®-Enzyme.

[0567] Cleavase BN-Nuklease und Cleavase® A/G-Nuklease wurden neben drei verschiedenen thermostabilen DNA-Polymerasen untersucht; Thermus aquaticus-DNA-Polymerase (Promega), Thermus thermophilus- und Thermus flavus-DNA-Polymerasen (Epicentre). Die Enzymgemische, die in den in Spuren 1 bis 11 von Fig. 34 gezeigten Reaktionen verwendet wurden, enthielten folgende Substanzen in einem Volumen von 5 µl; Spur 1: 20 mM MOPS (pH-Wert 7,5) mit jeweils 0,1% Tween 20 und NP-40, 4 mM $MnCl_2$, 100 mM KCl; Spur 2; 25 ng Cleavase® BN-Nuklease in der gleichen Lösung, die für Spur 1 beschrieben ist; Spur 3; 2,25 µl Cleavase® A/G-Nuklease-Extrakt (hergestellt wie in Beispiel 2 beschrieben) in der gleichen Lösung, wie für Spur 1 beschrieben; Spur 4; 2,25 µl Cleavase® A/G-Nuklease-Extrakt in 20 mM Tris-Cl, (pH-Wert 8,5), 4 mM $MgCl_2$ und 100 mM KCl; Spur 5; 11,25 Polymerase-Units Taq-DNA-Polymerase in dem gleichen Puffer, der für Spur 4 beschrieben wurde; Spur 6: 11,25 Polymerase-Units der Tth-DNA-Polymerase in dem gleichen Puffer, der für Spur 1 beschrieben ist; Spur 7: 11,25 Polymerase-Units Tth-DNA-Polymerase in einer 2×-Konzentration des vom Hersteller gelieferten Puffers, angereichert mit 4 mM $MnCl_2$; Spur 8: 11,25 Polymerase-Units Tth-DNA-Polymerase in einer 2× Konzentration des vom Hersteller gelieferten Puffers, angereichert mit 4 mM $MgCl_2$; Spur 9; 2,25 Polymerase-Units Tfl-DNA-Polymerase im gleichen Puffer, der für Spur 1 beschrieben ist; Spur 10: 2,25 Polymerase-Units-Tfl-Polymerase in einer 2× Konzentration des vom Hersteller gelieferten Puffers, angereichert mit 4 mM $MnCl_2$; Spur 11: 2,25 Polymerase-Units Tfl-DNA-Polymerase in einer 2×-Konzentration des vom Hersteller gelieferten Puffers, angereichert mit 4 mM $MgCl_2$.

[0568] Hinreichend Ziel-DNA, Sonde und Invader™ für sämtliche 11 Reaktionen wurden in einem Master-Mix vereinigt. Dieser Mix enthielt 550 fmol Einzelstrang-M13mp19-DNA, 550 pmol Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35) und 55 pmol Sonden-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 32) wie es jeweils in der **Fig.** 28c veranschaulicht ist. In 55 µl destilliertem Wasser wurden 5 µl DNA-Gemisch in jedes der 11 markierten Röhrchen vorgelegt und mit einem Tropfen ChillOut®-Verdampfungssperre überschichtet. Die Reaktionen wurden auf 63°C gebracht, und die Spaltung wurde durch Zugabe von 5 µl des geeigneten Enzymgemischs gestartet. Die Reaktionsgemische wurden dann für 15 min bei 63°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Marker-Farbstoffen gestoppt. Die Proben wurden direkt vor der Elektrophorese durch ein 20% Acrylamidgel (19:1 vernetzt), mit 7 M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat (pH-Wert 8,3), 1,4 mM EDTA, für 1 min auf 90°C erhitzt. Nach der Elektrophorese wurden die Produkte der Reaktionen durch die Verwendung eines Hitachi-FMBIO-Fluoreszenz-Imagers sichtbar gemacht, und die Ergebnisse sind in der Fig. 34 angezeigt. Die Untersuchung der in Fig. 34 gezeigten Ergebnisse zeigt, dass sämtliche untersuchten 5'-Nukleasen die Fähigkeit zur Katalyse der Invader™-gerichteten Spaltung in mindestens einem der untersuchten Puffersysteme hatten. Diese Spaltungsmittel wurden hier zwar nicht optimiert, jedoch eignen sie sich zur Verwendung bei den erfindungsgemäßen Verfahren.

BEISPIEL 17

Der Invader™-gerichtete Spaltungstest kann einzelne Basenunterschiede in Ziel-Nukleinsäure-Sequenzen nachweisen

[0569] Die Fähigkeit des Invader™-gerichteten Spaltungstests zum Nachweisen von Einzelbasen-Mismatch-Mutationen wurde untersucht. Zwei Ziel-Nukleinsäuren, welche Cleavase®-Enzym-beständige Phosphorthioat-Gerüste enthielten, wurden chemisch synthetisiert und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt. Ziele, die Phosphorthioat-Gerüste umfassten, wurden zur Verhinderung des exonukleolytischen Nibblings des Ziels verwendet, wenn es mit einem Oligonukleotid einen Doppelstrang bildete. Ein Ziel-Oligonukleotid, das eine Zielsequenz bereit stellt, das vollständig komplementär zum Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35) und zum Sonden-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 32) ist, enthielt die folgende Sequenz:
5'-CCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGC-3' (Seq.-ID Nr. 36). Eine zweite Zielsequenz mit einem Einzelbasenaustausch relativ zu Seq.-ID Nr. 36 wurde synthetisiert: 5'-CCTTTCGCTCTCTT-CCCTTCCTTTCTCGCC ACGTTCGCCGGC-3' (Seq.-ID Nr. 37; der Einzelbasenaustausch relativ zu Seq.-ID Nr. 36 ist als fett gedruckter und unterstrichener Buchstabe gezeigt). Der sich ergebende Mismatch tritt in der

"Z"-Region des Ziels auf, wie dargestellt in der Fig. 25.

[0570] Zur Unterscheidung zwischen zwei Zielsequenzen, die sich um die Anwesenheit eines einzelnen Mismatches unterscheiden, wurden Invader™-gerichtete Spaltungsreaktionen mit zwei verschiedenen Reaktionstemperaturen (55°C und 60°C) durchgeführt. Gemische, die 200 fmol Seq.-ID Nr. 36 oder Seq.-ID Nr. 37, 3 pmol fluoresceinmarkiertes Sonden-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 32), 7,7 pmol Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 35) und 2 µl Cleavase® A/G-Nuklease-Extrakt (hergestellt wie in Beispiel 2 beschrieben) in 9 µl 10 mM MOPS (pH-Wert 7,4) mit 50 mM KCl enthielten, wurden hergestellt, mit einem Tropfen ChillOut®-Verdampfungssperre überschichtet, und auf eine geeignete Reaktionstemperatur gebracht. Die Spaltungsreaktionen wurden durch Zugabe von 1 µl 20 mM $MgCl_2$ gestartet. Nach 30 min bei 55°C oder 60°C wurden 10 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen dazugegeben, um die Reaktionen zu stoppen. Die Reaktionsgemische wurden dann vor dem Auftragen von 4 µl auf 20% denaturierende Polyacralamid-Gele für 1 min auf 90°C erhitzt. Die aufgelösten Reaktionsprodukte wurden mit einem Hitachi FMBIO-Fluoreszenz-Imager sichtbar gemacht. Das resultierende Bild ist in der **Fig.** 35 gezeigt.

[0571] In der **Fig.** 35 zeigen die Spuren 1 und 2 die Produkte aus den bei 55°C durchgeführten Reaktionen; die Spuren 3 und 4 zeigen die Produkte aus den bei 60°C durchgeführt Reaktionen. Die Spuren 1 und 3 enthielten die Produkte aus den Reaktionen, die die Seq.-ID Nr. 36 (genaue Übereinstimmung zur Sonde) als Ziel enthielten. Die Spuren 2 und 4 enthielten Produkte aus den Reaktionen, die die Seq.-ID Nr. 37 (Einzelbasen-Mismatch mit der Sonde) als Ziel enthielten. Das Ziel, das keine genaue Hybridisierungs-Übereinstimmung (d. h. eine vollständige Komplementarität) mit der Sonde aufweist, bindet nicht so stark (d. h. die T_m des Doppelstrangs ist niedriger als die T_m des gleichen Bereichs, der genau passt). Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die Reaktionsbedingungen so variiert werden können, dass entweder der Mismatch beseitigt wird (beispielsweise durch Senken der Temperatur der Reaktion) oder durch Ausschluss der Bindung der fehlgepaarten Sequenz (beispielsweise durch Erhöhen der Reaktionstemperatur).

[0572] Die in der **Fig.** 35 gezeigten Ergebnisse zeigen, dass das spezifische Spaltungsereignis, das in Invader™-gerichteten Spaltungsreaktionen vorkommt, durch die Anwesenheit einer einzelnen Basenfehlpaarung zwischen dem Sonden-Oligonukleotid und der Zielsequenz eliminiert werden kann. Die Reaktionsbedingungen können somit derart gewählt werden, dass die Hybridisierung fehlgepaarter Invader™-gerichteter Spaltungssonden die Spaltung der Sonde reduziert oder sogar unterbindet. Bei einer Verlängerung dieses Testsystems können auch mehrfache Spaltungssonden, die jeweils ein getrenntes Reportermolekül (d. h. eine einzigartige Markierung) besitzen, ebenfalls in einer einzelnen Spaltungsreaktion verwendet werden, damit simultan auf zwei oder mehr Varianten in dem gleichen Zielbereich untersucht wird. Die Produkte einer solchen Reaktion ermöglichen nicht nur die Erfassung von Mutationen, die in einem Zielmolekül existieren, sondern ermöglichen auch eine Bestimmung der relativen Konzentrationen jeder Sequenz (d. h. Mutante und Wildtyp oder mehrfach unterschiedliche Mutanten), die in Proben vorhanden sind, die ein Gemisch aus Zielsequenzen enthalten. Bei der Bereitstellung in gleichen Mengen, jedoch in starkem Überschuss (beispielsweise mindestens einem 100fach molaren Überschuss, gewöhnlich wird mindestens 1 pmol jedes Sonden-Oligonukleotids verwendet, wenn etwa 10 fmol oder weniger Ziel-Sequenz zugegen ist) gegenüber dem Ziel und unter Verwendung unter optimierten Bedingungen. Wie vorstehend erläutert beeinflussen jegliche Unterschiede der relativen Mengen der Zielvarianten die Hybridisierungskinetiken nicht, so dass das Ausmaß der Spaltung jeder Sonde die relativen Mengen jeder Variante in der Reaktion wiederspiegelt.

[0573] Die in dem Beispiel gezeigten Ergebnisse zeigen klar, dass die Invader™-gerichtete Spaltungsreaktion zum Nachweis eines Einzelbasenaustauschs zwischen Nukleinsäuren verwendet werden kann.

BEISPIEL 18

Die Invader™-gerichtete Spaltungsreaktion ist gegenüber großen Änderungen der Reaktionsbedingungen unempfindlich

[0574] Die oben gezeigten Ergebnisse zeigten, dass die Invader™-gerichtete Spaltungsreaktion zur Erfassung der Ziel-Nukleinsäuren verwendet werden kann, und dass dieser Test zur Erfassung eines Einzelbasenunterschieds zwischen Ziel-Nukleinsäuren verwendet werden kann. Diese Ergebnisse zeigten, dass die 5'-Nukleasen (beispielsweise Cleavase® BN, Cleavase® A/G, DNAPTaq, DNAPTth, DNAPTfl) zusammen mit einem Paar überlappender Oligonukleotide als effizienter Weg zur Erkennung von Nukleinsäure-Zielen verwendet werden kann. Bei den nachstehenden Experimenten wird gezeigt, dass eine invasive Spaltungsreaktion relativ unempfindlich gegenüber großen Änderungen der Bedingungen ist, wodurch sich das Verfahren zur Praxis in klinischen Laboratorien eignet.

[0575] Die Wirkungen der Abwandlung der Bedingungen der Spaltungsreaktion wurde auf ihre Wirkung(en) auf die Spezifität der invasiven Spaltung und auf die Menge an Signal untersucht, das sich im Verlauf der Reaktion anreicherte. Zum Vergleich der Variationen in der Spaltungsreaktion wurde zuerst eine "Standard"-Invader™-Spaltungsreaktion definiert. In jedem Fall wurde wenn nicht anders angegeben, der angegebene Reaktionsparameter variiert, wohingegen die Invarianten Aspekte eines bestimmten Tests diejenigen dieser Standard-Reaktion waren. Die Ergebnisse dieser Tests sind wie in den Fig. 38 bis Fig. 40 gezeigt, oder wie die nachstehend beschriebenen Ergebnisse.

a) Die Standard-Invader™-gerichtete Spaltungsreaktion.

[0576] Die Standard-Reaktion umfasste definitionsgemäß 1 fmol M13mp18-Einzelstrang-Ziel-DNA (NEB), 5 pmol markiertes Sonden-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 38), 10 pmol des stromaufwärts gelegenen Invader™-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 39) und 2 Units Cleavase® A/G in 10 µl 10 mM MOPS, pH-Wert 7,5 mit 100 mM KCl, 4 mM $MnCl_2$, und jeweils 0,05 Tween 20 und Nonidet P40. Für jede Reaktion wurden die Puffer, Salze und Enzym in einem Volumen von 5 µl vereinigt; die DNAs (das Ziel und die beiden Oligonukleotide) wurden in 5 µl dH_2O vereinigt und mit einem Tropfen ChillOut®-Verdampfungssperre überschichtet. Bei der Durchführung mehrerer Reaktionen in den gleichen Reaktionsbestandteilen, wurden diese Formulierungen proportional vergrößert.

[0577] Wenn nicht anders angegeben, wurden die Probenröhrchen mit den DNA-Gemischen auf 61°C erwärmt, und die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Enyzmgemisch gestartet. Nach 20 min bei dieser Temperatur wurden die Reaktionen durch die Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen gestoppt. Die Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese durch ein 20% Acrylamid-Gel (19:1 vernetzt), mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA, für 2 min auf 75°C erhitzt. Die Produkte der Reaktionen wurden durch die Verwendung eines Hitachi-FM-BIO-Fluoreszenz-Imagers sichtbar gemacht. In jedem Fall war das ungeschnittene Sondenmaterial als intensive schwarze Bande oder Klecks sichtbar, und zwar gewöhnlich in der oberen Hälfte des Feldes, wobei die gewünschten Produkte der Invader™-spezifischen Spaltung als ein oder zwei schmalere Banden sichtbar waren, gewöhnlich in der unteren Hälfte des Feldes. Unter einigen Reaktionsbedingungen, insbesondere unter erhöhten Salzbedingungen, ist ebenfalls ein sekundäres Spaltprodukt sichtbar (so dass man ein Dublett erhält). Leitern der heller grauen Banden zeigen gewöhnlich entweder ein Exonuklease-Nibbling des Sonden-Oligonukleotids oder einen wärmeinduzierten unspezifischen Bruch der Sonde.

[0578] Die Fig. 37 zeigt die Hybridisierung der Sonde und der Invader™-Oligonukleotide an Bereichen längs des M13mp18-Zielmoleküls (an dem unteren Strang). In der Fig. 37 ist nur ein 52 Nukleotide großer Abschnitt des M13mp18-Moleküls gezeigt; diese 52-Nukleotid-Sequenz ist in der Seq.-ID Nr. 31 aufgeführt (diese Sequenz ist identisch bei M13mp18 und M13mp19). Das Sonden-Oligonukleotid (oberer Strang) enthält eine Cy3-Amidit-Markierung am 5'-Ende; die Sequenz der Sonde ist 5'-AGAAAGGAAGGGAAGAAAGCG-AAAGGT-3' (Seq.-ID Nr. 38. Der fett gedruckte Buchstabe zeigt das Vorhandensein einer modifizierten Base an (2'-O-CH_3)). Cy3-Amidit (Pharmacia) ist ein Indodicarbocyanin-Farbstoff-Amidit, das an einer beliebigen Position während der Synthese der Oligonukleotide eingebaut werden kann; Cy3 fluoresziert im gelben Bereich (dem Anregungs- und Emissions-Maximum von 554 bzw. 568 nm). Das Invader™-Oligonukleotid (mittlerer Strang) hat die folgende Sequenz: 5'-GCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGA-3' (Seq.-ID Nr. 39).

b) KCl-Titration

[0579] Die Fig. 38 zeigt die Ergebnisse der Variation der KCl-Konzentration in Kombination mit der Verwendung von 2 mM $MnCl_2$ in einer ansonsten Standard-Reaktion. Die Reaktionen wurden doppelt zur Bestätigung der Beobachtungen durchgeführt; die in den Spuren 1 und 2 gezeigten Reaktionen enthielten kein zusätzliches KCl, die Spuren 3 und 4 enthielten KCl bei 5 mM; die Spuren 5 und 6 enthielten 25 mM KCl, die Spuren 7 und 8 enthielten 50 mM KCl, die Spuren 9 und 10 enthielten 100 mM KCl und die Spuren 11 und 12 enthielten 200 mM KCl. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einschluss von KCl die Erzeugung eines spezifischen Spaltprodukts ermöglicht. Das stärkste Signal wird zwar bei der 100 mM-KCl-Konzentration beobachtet, die Spezifität des Signals in den anderen Reaktionen mit KCl bei oder über 25 mM zeigt, dass die Konzentrationen im vollen Bereich (d. h. 25 bis 200 mM) ausgewählt werden können, wenn es für bestimmte Reaktionsbedingungen so gewünscht wird.

[0580] Wie in der Fig. 38 gezeigt erfordert die Invader™-gerichtete Spaltungsreaktion die Anwesenheit von Salz (beispielsweise KCl), damit eine effiziente Spaltung erfolgt. Es hat sich herausgestellt, dass KCl in anderen Reaktionen die Aktivität bestimmter Cleavase®-Enzyme hemmen kann, wenn diese bei Konzentrationen

über etwa 25 mM zugegen sind. Bei Spaltungsreaktionen, die beispielsweise das in der Fig. 26 gezeigte S-60-Oligonukleotid in Abwesenheit von Primer verwenden, verliert das Cleavase®-Enzym etwa 50% seiner Aktivität in 50 mM KCl. Daher wurde die Verwendung alternativer Salze in der Invader™-gerichteten Spaltungsreaktion untersucht. In diesen Experimenten wurden das Kaliumion entweder gegen Na^+ oder Li^+ ersetzt, oder das Chloridion wurde gegen Glutaminsäure ersetzt. Der Austausch von KCl gegen alternative Salze ist nachstehend in den Abschnitten c–e beschrieben.

c) NaCl-Titration

[0581] NaCl wurde anstelle von KCl bei 75, 100, 150 oder 200 mM in Kombination mit der Verwendung von 2 mM $MnCl_2$ in einer ansonsten Standard-Reaktion verwendet. Diese Ergebnisse zeigten, dass NaCl als Ersatz für KCl in der Invader™-gerichteten Spaltungsreaktion verwendet werden kann, wobei ähnliche Konzentrationen ähnlich Ergebnisse ergeben (d. h. die Anwesenheit von NaCl steigert wie KCl die Produktanreicherung).

d) LiCl-Titration

[0582] LiCl wurde anstelle von KCl in ansonsten Standard-Reaktionen verwendet. Die untersuchten Konzentrationen waren 25, 50, 75, 100, 150 und 200 mM LiCl. Die Reaktionen zeigten, dass LiCl als geeigneter Ersatz für KCl in der Invader™-gerichteten Spaltungsreaktion verwendet werden kann (d. h. die Anwesenheit von LiCl steigert wie KCl die Produktanreicherung) in Konzentrationen von etwa 10 mM oder höher.

e) KGlu-Titration

[0583] Die Ergebnisse der Verwendung eines Glutamatsalzes von Kalium (KGlu) anstelle des üblicher verwendeten Chlorid-Salzes (KCl) in Reaktionen, die über einen weiten Temperaturenbereich durchgeführt wurden, wurden untersucht. Es wurde gezeigt, dass KGlu eine sehr effiziente Salzquelle für einige enzymatische Reaktionen ist, die einen breiteren Bereich an Konzentrationen zeigen, die eine maximale Enzym-Aktivität ermöglichen (Leirmo et al., Biochem., 26; 2095 [1987]). Die Fähigkeit von KGlu zur Erleichterung der Hybridisierung der Sonde und der Invader™-Oligonukleotide an die Ziel-Nukleinsäure wurde mit der von LiCl verglichen. In diesen Experimenten wurden die Reaktionen 15 min durchgeführt, und nicht über standardgemäße 20 min, in Standard-Reaktionen, bei denen KCl gegen 200 mM, 300 mM oder 400 mM KGlu ersetzt wurde. Die Reaktionen erfolgten bei 65°C, 67°C, 69°C oder 71°C. Die aufgeführten Ergebnisse zeigten, dass KGlu sehr effizient als Salz bei den invasiven Spaltungsreaktionen war, wobei eine vollständige Aktivität sogar bei 400 mM KGlu auftrat, obgleich die Spaltung bei der niedrigsten Temperatur bei 300 mM KGlu um etwa 30% und bei 400 mM KGlu um etwa 90% reduziert war.

f) $MnCl_2$- und $MgCl_2$-Titration und Fähigkeit zum Ersatz von $MgCl_2$ gegen $MnCl_2$

[0584] In einigen Fällen möchte man die invasive Spaltungsreaktion in Anwesenheit von Mg^{2+}, entweder neben oder anstelle von Mn^{2+} als notwendiges zweiwertiges Kation durchführen, das für die Aktivität des eingesetzten Enzyms erforderlich ist. Einige übliche Verfahren zur Herstellung von DNA aus Bakterienkulturen oder Geweben nutzen $MgCl_2$ in Lösungen, die zur Erleichterung der Ansammlung von DNA durch Fällung verwendet werden. Zudem können erhöhte Konzentrationen (d. h. größer als 5 mM) an zweiwertigem Kation zur Erleichterung der Hybridisierung von Nukleinsäuren verwendet werden, und zwar auf die gleiche Weise, auf die die einwertigen Salze oben verwendet wurden, wodurch die invasive Spaltungsreaktion verstärkt wurde. In diesem Experiment wurden die Toleranz der invasiven Spaltungsreaktion untersucht auf 1) den Austausch von $MgCl_2$ gegen $MnCl_2$ und auf die Fähigkeit zur Produktion von spezifischem Produkt in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen $MgCl_2$ und $MnCl_2$.

[0585] Die Fig. 39 zeigt die Ergebnisse der Abwandlung der Konzentration von $MnCl_2$ von 2 mM auf 8 mM, das Ersetzen von $MgCl_2$ gegen $MnCl_2$ bei 2 bis 4 mM oder die Verwendung dieser Komponenten in Kombination in einer ansonsten standardgemäßen Reaktion. Die in den Spuren 1 und 2 analysierten Reaktionen enthielten jeweils 2 mM $MnCl_2$ und $MgCl_2$, die Spuren 3 und 4 enthielten nur 2 mM $MnCl_2$, die Spuren 5 und 6 enthielten 3 mM $MnCl_2$, die Suren 7 und 8 enthielten 4 mM $MnCl_2$, die Spuren 9 und 10 enthielten 8 mM $MnCl_2$. Die in den Spuren 11 und 12 analysierten Reaktionen enthielten 2 mM $MgCl_2$, und die Spuren 13 und 14 enthielten 4 mM $MgCl_2$. Diese Ergebnisse zeigen, dass $MnCl_2$ und $MgCl_2$ als nötiges zweiwertiges Kation verwendet werden kann, das die Spaltungsaktivität des Cleavase® A/G-Enzyms in diesen Reaktionen ermöglicht, und dass die invasive Spaltungsreaktion einen breiten Bereich an Konzentrationen diese Komponenten tolerieren kann.

[0586] Neben der Untersuchung der Wirkungen der Salzumgebung auf die Rate der Produktanreicherung in der invasiven Spaltungsreaktion wurde die Verwendung der Reaktionsbestandteile untersucht, die sich bei der Steigerung der Nukleinsäure-Hybridisierung entweder bei Standard-Hybridisierungstests (beispielsweise Blot-Hybridisierung) oder in Ligierungsreaktionen als wirksam erwiesen haben. Diese Komponenten können als Volumen-Excluder wirken, die wirksame Konzentration der Nukleinsäuren von Interesse steigern und somit die Hybridisierung verstärken, oder sie können als Ladungs-Abschirmungsmittel zur Minimierung der Abstoßung zwischen den hochgeladenen Gerüsten der Nukleinsäure-Stränge wirken. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den Abschnitten g und h unten beschrieben.

g) Wirkung der CTAB-Zugabe

[0587] Das polykationische Detergenz Cetyltriethylammoniumbromid (CTAB) steigert drastisch die Hybridisierung von Nukleinsäuren (Pontius und Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USR 88: 8237 [1991]). Die Wirkung der Zugabe des Detergenz CTAB in Konzentrationen von 100 mM bis 1 mM auf invasive Spaltungsreaktionen, worin 150 mM LiCl anstelle von KCl in ansonsten Standard-Reaktionen verwendet wurde, wurde auch untersucht. Diese Ergebnisse zeigten, dass 200 mM CTAB eine sehr mäßige Steigerungswirkung unter diesen Bedingungen haben kann, und die Anwesenheit von CTAB im Überschuss von etwa 500 µM war für die Anreicherung von spezifischem Spaltprodukt spezifisch.

h) Wirkung der PEG-Zugabe

[0588] Die Wirkung der Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) bei 4,8 oder 12% (w/v) Konzentrationen auf ansonsten Standard-Reaktionen wurde ebenfalls untersucht. Die Wirkungen der Steigerung der Reaktionstemperatur der PEG-haltigen Reaktionen wurde untersucht durch Durchführung von doppelten Sätzen der PEG-Titrationsreaktionen bei 61°C und 65°C. Die Ergebnisse zeigten, dass bei allen untersuchten Prozentsätzen und bei beiden untersuchten Temperaturen der Einschluss von PEG die Produktion von spezifischem Spaltungsbrodukt spezifisch eliminierte.

[0589] Außerdem hatte die Anwesenheit von 1 × Denhardts in dem Reaktionsgemisch Befunden zufolge keine nachteilige Wirkung auf die Spaltungsreaktion (50 × Denhardts enthält pro 500 ml: 5 g Ficoll, 5 g Polyvinylpyrrolidon, 5 g BSA). Zudem wurde die Anwesenheit jeder Komponente von Denhardts einzeln (d. h. Ficoll allein, Polyvinylpyrrolidon allein, BSA allein) auf die Wirkung auf Invader™-Oligonukleotid-gerichtete Spaltungsreaktion untersucht; es wurde keine nachteilige Wirkung beobachtet.

i) Wirkung der Zugabe von Stabilisationsmitteln

[0590] Ein weiterer Ansatz der Steigerung des Ausgangs der invasiven Spaltungsreaktion ist die Steigerung der Aktivität des eingesetzten Enzyms, und zwar entweder durch Steigern von dessen Stabilität in der Reaktionsumgebung oder durch Steigern von dessen Umsatzrate. Ohne Bezug auf den genauen Mechanismus, durch den verschiedene Mittel bei der invasiven Spaltungsreaktion arbeiten, wurde eine Reihe von Mitteln, die gemeinhin zur Stabilisierung der Enzyme während einer verlängerten Speicherung verwendet wurden, auf die Fähigkeit zur Steigerung der Anreicherung spezifischer Spaltprodukte in der invasiven Spaltungsreaktion untersucht.

[0591] Die Wirkungen der Zugabe von 15% Glycerin und der Zugabe der Detergenzien Tween-20 und Nonidet P40 bei 1,5% allein oder in Kombination, in ansonsten Standard-Reaktionen wurde ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass unter diesen Bedingungen diese Addukte wenig oder keinen Einfluss auf die Anreicherung spezifischer Spaltprodukte hatte.

[0592] Die Wirkungen der Zugabe von Gelatine, in denen die Salzidentität und die Konzentration der Standard-Reaktion variiert wurde, wurde ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass in Abwesenheit von Salz die Gelatine eine mäßig steigernde Wirkung auf die Anreicherung eines spezifischen Spaltproduktes hatte, jedoch wenn entweder Salz (KCl oder LiCl) zu den unter diesen Bedingungen durchgeführten Reaktionen gegeben wurden, reduzierte eine Steigerung der Gelatinemengen die Produktanreicherung.

j) Wirkung der Zugabe großer Mengen Nicht-Ziel-Nukleinsäure

[0593] Bei der Erfassung spezifischer Nukleinsäuresequenzen in den Proben ist es wichtig zu bestimmen, ob die Anwesenheit von zusätzlichem genetischem Material (d. h. Nicht-Ziel-Nukleinsäuren) einen negativen Einfluss auf die Spezifität des Tests hat. In diesem Experiment wurde die Wirkung der Aufnahme großer Mengen

Nicht-Ziel-Nukleinsäure, d. h. DNA oder RNA, auf die Spezifität der invasiven Spaltungsreaktion untersucht. Die Daten wurden entweder auf eine Veränderung der erwarteten Spaltstelle oder auf einen Anstieg des nichtspezifischen Abbaus des Sonden-Oligonukleotids untersucht.

[0594] Die Fig. 40 zeigt die Wirkungen der Zugabe von Nicht-Ziel-Nukleinsäure (beispielsweise genomische DNA oder tRNA) auf eine invasive Spaltungsreaktion, die bei 65°C mit 150 mM LiCl anstelle von KCl in der Standard-Reaktion durchgeführt wird. Die in den Spuren 1 und 2 enthaltenen Reaktionen enthielten 235 bzw 470 ng genomische DNA. Die in den Spuren 3, 4, 5 und 6 analysierten Reaktionen enthielten 100 ng, 200 ng, 500 ng bzw. 1 µg tRNA. Die Spur 7 veranschaulicht eine Kontrollreaktion, die keine zusätzliche Nukleinsäure jenseits der in der Standard-Reaktion verwendeten Mengen enthielt. Die in der Fig. 40 gezeigten Ergebnisse zeigen, dass der Einschluss von Nicht-Ziel-Nukleinsäure in großen Mengen die Anreicherung von spezifischem Spaltprodukt sichtbar verlangsamte (während die Erfindung nicht auf einen bestimmten Mechanismus eingeschränkt war, nimmt man an, dass die zusätzliche Nukleinsäure um die Bindung des Enzyms mit den spezifischen Reaktionskomponenten konkurriert). Bei zusätzlichen Experimenten stellte sich heraus, dass die Wirkung der Zugabe großer Mengen Nicht-Ziel-Nukleinsäure durch Erhöhen von Enzym in der Reaktion kompensiert werden kann. Die in der Fig. 40 gezeigten Daten zeigen auch, dass ein Schlüsselmerkmal der invasiven Spaltungsreaktion, die Spezifität des Nachweises, nicht durch die Anwesenheit großer Mengen Nicht-Ziel-Nukleinsäure beeinträchtigt wurde.

[0595] Neben den vorstehend gezeigten Daten wurden die Spaltungsreaktionen mit Succinat-Puffer bei pH-Wert 5,9 anstelle von MOPS-Puffer durchgeführt, der in der "Standard"-Reaktion verwendet wurde; es wurden keine nachteiligen Wirkungen beobachtet.

[0596] Die in den Fig. 38 bis Fig. 40 gezeigten und oben beschriebenen Daten zeigen, dass die invasive Spaltungsreaktion durchgeführt werden kann, indem eine große Vielzahl von Reaktionsbedingungen verwendet wird, und sie eignet sich daher für die Praxis in klinischen Laboratorien.

BEISPIEL 19

Nachweis von RNA-Zielen durch Invader™-gerichtete Spaltung

[0597] Neben dem klinischen Bedarf zur Erfassung der spezifischen DNA-Sequenzen für infektiöse und genetische Erkrankungen besteht ein Bedarf an Technologien, die die Ziel-Nukleinsäuren, welche aus RNA bestehen, quantitativ nachweisen können. Zum Beispiel hat eine Reihe von viralen Erregern, wie Hepatitis-C-Virus (HCV) und Immunschwächevirus beim Menschen (HIV) genomisches RNA-Material, dessen quantitative Erfassung als Maß der Viruslast in einer Patientenprobe verwendet werden kann. Solche Information kann von entscheidendem diagnostischen oder prognostischen Wert sein.

[0598] Eine Infektion mit Hepatitis-C-Virus (HCV) ist die Hauptursache für eine Non-A-, Non-B-(NANB)-Hepatitis nach der Transfusion in der Welt. Zudem ist HCV der hauptsächliche etiologische Erreger von hepatocellulärem Karzinom (HCC) und chronischer Lebererkrankung weltweit. Das HCV-Genom ist ein kleines (9,4 kb) RNA-Molekül. In Untersuchungen der Übertragung von HCV durch Bluttransfusion wurde die Anwesenheit von HCV-Antikörpern gefunden, wie es in Standard-Immunologie-Tests gemessen wurde, und dass diese nicht immer mit der Infektiosität der Probe korreliert, wohingegen das Vorhandensein von HCV-RNA in einer Blutprobe stark mit der Infektiosität korreliert. Serologische Tests können dagegen in immununterdrückten infizierten Individuen negativ bleiben, wohingegen HCV-RNA leicht erfasst werden kann (Cuthbert, Clin. Microbiol. Rev. 7: 505 [1994]).

[0599] Der Bedarf an und der Wert der Entwicklung eines Tests auf Sonden-Basis für den Nachweis der HCV-RNA ist klar. Die Polymerasekettenreaktion wurde zum Nachweis der HCV in klinischen Proben verwendet, aber die Probleme, die mit Übertragungskontamination von Proben einhergeht, ist von Belang. Der direkte Nachweis der Virus-RNA ohne den Bedarf zur Durchführung der reversen Transkription oder Amplifikation ermöglicht die Eliminierung einiger Punkte, bei denen gängige Tests versagen können.

[0600] Das Genom des positiv-strängigen RNA-Hepatitis-C-Virus umfasst mehrere Bereiche, einschließlich 5'- und 3'-nicht-codierende Bereiche (d. h. 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche) und einen Polyprotein-codierenden Bereich, der das Kern-Protein (C) codiert, zwei Hüll-Glycoproteine (E1 und E2/NS1) und sechs nichtstrukturelle Glycoproteine (NS2-NS5b). Molekularbiologische Analyse des HCV-Genoms hat ergeben, dass einige Bereiche des Genoms zwischen den Isolaten sehr stark konserviert sind, wohingegen andere Bereiche ziemlich rasch austauschbar sind. Der 5'-nichtcodierende Bereich (NCR) ist die am höchsten konservierte Region

im HCV. Diese Analysen ermöglichten, dass diese Viren in sechs grundlegende Genotypgruppen unterteilt werden und dann weiter in mehr als ein Dutzend Subtypen unterteilt werden (die Nomenklatur und die Unterteilung der HCV-Genotypen entwickelt sich; siehe Altamirano et al., J. Infekt. Dis., 171: 1034 (1995) für ein neueres Klassifikationsschema).

[0601] Zur Entwicklung eines raschen und genauen Verfahrens zum Nachweisen von HCV in infizierten Individuen, wurde die Fähigkeit der Invader™-gerichteten Spaltungsreaktion zum Nachweisen von HCV-RNA untersucht. Plasmide mit DNA, die von dem konservierten 5'-untranslatierten Bereich von 6 verschiedenen HCV-RNA-Isolaten hergeleitet wurde, wurden zur Erzeugung von Matrizen für eine In-vitro-Transkription verwendet. Die HCV-Sequenzen, die in diesen sechs Plasmiden enthalten waren, veranschaulichen Genotypen 1 (vier Subtypen, dargestellt; 1a, 1b, 1c und Δ1c), 2 und 3. Die Nomenklatur der HCV-Genotypen, die hier verwendet wurde, ist diejenige von Simmonds et al., (wie beschrieben in Altamirano et al., siehe oben). Der Δ1c-Subtyp-wurde in der vorstehend beschriebenen Modell-Nachweisreaktion verwendet.

a) Erzeugung von Plasmiden, die HCV-Sequenzen enthalten

[0602] Sechs DNA-Fragmente, die von HCV hergeleitet wurden, wurden durch RT-PCR mittels RNA erzeugt, das aus Serumproben von Blut-Donatoren extrahiert wurde; diese PCR-Fragmente waren ein Geschenk von Dr. M. Altamirano (Universität von British Columbia, Vancouver). Diese PCR-Fragmente repräsentieren HCV-Sequenzen, die von den HCV-Genotypen 1a, 1b, 1c, Δ1c, 2c und 3a hergeleitet sind.

[0603] Die RNA-Extraktion, reverse Transkription und PCR wurden durchgeführt mittels Standard-Techniken (Altamirano et al., siehe oben). Die RNA wurde kurz gesagt aus 100 µl Serum mittels Guanidin-Isothiocyanat, Natriumlaurylsarkosat und Phenol-Chloroform extrahiert (Inchauspe et al., Hepatol, 14: 595 [1991]). Die reverse Transkription erfolgte gemäß den Hersteller-Angaben mittels GenAmp rTh-reverse Transkriptase-Kit (Perkin-Elmer) in Anwesenheit eines externen Antisense-Primers, HCV342. Die Sequenz des HCV342-Primers ist 5'-GGTTTTTCTTTGAGGTTTAG-3' (Seq.-ID Nr. 40). Nach der Beendigung der RT-Reaktion wurden der Sense-Primer HCV7 (5'-GCGACACTCCACCATAGAT-3' [Seq.-ID Nr. 41]) und Magnesium zugegeben, und eine erste PCR wurde durchgeführt. Aliquote der ersten PCR-Produkte wurden in einer zweiten (nested) PCR in Anwesenheit der Primer HCV46 (5'-CTGTCTTCACGCAGAAAGC-3' (Seq.-ID Nr. 42]) und HCV308 (5'-GCACGGTCTACGAGACCTC-3' [Seq.-ID Nr. 43]) verwendet. Die PCRs erzeugten ein 281 Bp Produkt, das einem konservierten 5'-nichtcodierenden (NCR) Bereich von HCV zwischen den Positionen –284 und –4 des HCV-Genoms entspricht (Altramirano et al., siehe oben).

[0604] Die sechs 281 Bp großen PCR-Fragmente wurden direkt zum Klonieren verwendet oder sie wurden einem zusätzlichen Amplifikationsschritt mittels 50 µl PCR unterworfen, die etwa 100 fmol DNA, die HCV46- und HCV308-Primer bei 0,1 µM, jeweils 100 µM der vier dNTPs und 2,5 Units Taq-DNA-Polymerase in einem Puffer umfassen, der 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$ und 0,1% Tween 20 enthielt. Die PCRs wurden 25 Zyklen bei 96°C für 45 s, 55°C für 45% und 72°C für 1 min unterworfen. Jeweils 2 µl der ursprünglichen DNA-Proben oder der reamplifizierten PCR-Produkte wurden zur Klonierung in den linearen pT7-Blue-T-Vektor (Novagen) gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Nach dem Ligieren der PCR-Produkte in den pT7-Blue-T-Vektor wurde das Ligations-Reaktionsgemisch zur Transformation der kompetenten JM109-Zellen (Promega) verwendet. Klone, die den pT7Blue-T-Vektor mit einem Insert enthielten, wurden durch die Anwesenheit von Kolonien mit einer weißen Farbe auf LB-Platten selektiert, die 40 µg/ml X-Gal, 40 µg/ml IPTG und 50 µg/ml Ampicillin enthielten. Vier Kolonien für jede PCR-Probe wurden ausgestochen und über Nacht in 2 ml LB-Medium gezüchtet, das 50 µg/ml Carbenicillin enthielt. Die Plasmid-DNA wurde mit dem folgenden alkalischen Minipräp-Protokoll isoliert. Zellen aus 1,5 ml der Übernachtkultur wurden durch Zentrifugation für 2 min in einer Mikrozentrifuge (14000 U/min) gesammelt, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 50 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNAse A (Pharmacia) resuspendiert. 100 µl einer Lösung, die 0,2 N NaOH, 1% SDS enthielt, wurde zugegeben, und die Zellen wurden 2 min lysiert. Das Lysat wurde vorsichtig mit 100 µl 1,32 M Kaliumacetat, pH-Wert 4,8 gemischt, und das Gemisch wurde für 4 min in einer Mikrozentrifuge (14000 U/min) zentrifugiert; das Pellet, das die Zelltrümmer enthielt, wurde verworfen. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand mit 200 µl Ethanol gefällt und durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifugation (14000 U/min) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde an der Luft für 15 min getrocknet, und dann in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tric-HCl, pH-Wert 7,8, 1 mM EDTA) erneut gelöst.

b) Reamplifikation der HCV-Klone zum Zufügen des Phagen-T7-Promotors für die anschließende In-vitro-Transkription

[0605] Zur Gewährleitung, dass das RNA-Produkt der Transkription ein bestimmtes 3'-Ende hat, war es nötig,

lineare Transkriptionsmatrizen zu erzeugen, die am Ende der HCV-Sequenz stoppten. Diese Fragmente wurden herkömmlicherweise gestoppt, wobei die PCR zur Reamplifikation des Segmentes des Plasmids verwendet wurde, das die PhagenPromotorsequenz und das HCV-Insert enthielt. Für diese Untersuchungen wurde der Klon von HCV Typ Δ1c reamplifiziert, wobei ein Primer verwendet wurde, der an die T7-Promotor-Sequenz hybridisiert: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (Seq.-ID Nr. 44; der "T7-Promotor-Primer") (Novagen) in Kombination mit dem 3'-terminalen HCV-spezifischen Primer HCV308 (Seq.-ID Nr. 43). Für diese Reaktionen wurden 1 µl Plasmid-DNA (etwa 10 bis 100 ng) in einer 200 µl PCR mit den T7- und HCV308-Primern wie oben beschrieben reamplifiziert, ausgenommen, dass 30 Amplifikationszyklen eingesetzt wurden. Das resultierende Amplikon war 345 Bp lang. Nach der Amplifikation wurde das PCR-Gemisch in ein frisches 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt, das Gemisch wurde auf eine Endkonzentration von 2 M NH_4OAc gebracht, und die Produkte wurden durch die Zugabe von 1 Volumen 100% Isopropanol gefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Präzipitate durch Zentrifugation gesammelt, einmal mit 80% Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Das gesammelte Material wurde in 100 µl nukleasefreiem destilliertem Wasser (Promega) gelöst.

[0606] Die RNA-Segmente wurden aus diesem Amplikon durch In-vitro-Transkription mit dem RiboMAX™-RNA-Produktionssystem im Großmaßstab (Promega) gemäß den Herstellerangaben, unter Verwendung von 5,3 µg des oben beschriebenen Amplikons in einer 100 µ Reaktion produziert. Die Transkriptionsreaktion wurde für 3,75 Std. inkubiert, wonach die DNA-Matrize durch die Zugabe von 5 bis 6 µl RQ1 RNAse freier DNAse (1 Unit/µl) gemäß den RiboMAX™-Kit-Angaben zerstört wurde. Die Reaktion wurde zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:48:2) extrahiert, und die wässrige Phase wurde in ein frisches Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt. Die RNA wurde dann durch Zugabe von 10 µl 3 M NH_4OAc, pH-Wert 5,2 und 110 µl 100 Isopropanol gesammelt. Nach einer 5 min Inkubation bei 4°C wurde das Präzipitat durch Zentrifugation gesammelt, einmal mit 80% Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die Sequenz des resultierenden RNA-Transkriptes (HCV1.1-Transkript) ist in der Seq.-ID Nr. 45 aufgeführt.

c) Nachweis des HCV1.1-Transkriptes in dem Invader™-gerichteten Spaltungstest

[0607] Der Nachweis des HCV1.1-Transkriptes wurde in dem Invader™-gerichteten Spaltungstest getestet, wobei ein HCV-spezifisches Sonden-Oligonukleotid (5'-CCGGTCGTCCTGGCAATXCC-3' [Seq.-ID Nr. 46]); X zeigt die Anwesenheit eines Fluorescein-Farbstoffs auf einem abasischen Linker an) und ein HCV-spezifisches Invader™-Oligonukleotid (5'-GTTTATCCAAGAAAGGACCCGGTC-3' [Seq.-ID Nr. 47]) verwendet wurde, das eine invasive 6-Nukleotid-Spaltung bewirkt.

[0608] Jeweils 10 µl des Reaktionsgemischs umfassten 5 pmol des Sonden-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 46) und 10 pmol Invader™-Oligonukleotid (Seq.-ID Nr. 47) in einem Puffer von 10 mM MOPS, pH-Wert 7,5, mit 50 mM KCl, 4 mM $MnCl_2$, jeweils 0,05% Tween-20 und Nonidet P40 und 7,8 Units RNAsin® Ribonuklease-Inhibitor (Promega). Die eingesetzten Spaltungsmittel waren Cleavase® A/G (verwendet bei 5,3 ng/10 µl Reaktion) oder DNAPTth (verwendet bei 5 Polymerase-Units/10 µl Reaktion). Die Menge des RNA-Ziels wurde wie oben angegeben variiert. Wenn eine RNAse-Behandlung angezeigt ist, wurden die Ziel-RNAs mit 10 µg RNAse A (Sigma) für 30 min bei 37°C vorbehandelt, so dass gezeigt wurde, dass der Nachweis spezifisch für die RNA in der Reaktion war und nicht aufgrund der Anwesenheit von jeglicher Restmatrize aus der Transkription. RNAse-behandelte Aliquots der HCV-RNA wurden direkt ohne dazwischen erfolgende Reinigung verwendet.

[0609] Für jede Reaktion wurden die Ziel-RNAs in den Reaktionslösungen wie oben beschrieben suspendiert, aber ohne das Spaltungsreagenz und das $MnCl_2$ für ein Endvolumen von 10 µl mit dem Invader™-Oligonukleotid und Sonde bei den oben aufgeführten Konzentrationen. Die Reaktionen wurden auf 46°C erwärmt und die Reaktionen wurden durch Zugabe eines Gemischs des geeigneten Enzyms mit $MnCl_2$ gestartet. Nach der Inkubation für 30 min bei 46°C wurden die Reaktionen durch die Zugabe von 8 µl 95% Formamid, 10 mM EDTA und 0,02 Methylviolett (Methylviolett-Ladepuffer) gestoppt. Die Proben wurden dann durch Elektrophorese durch ein 15% denaturierendes Polyacrylamid-Gel (19:1 vernetzt), das 7 M Harnstoff enthielt, in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA aufgelöst. Nach der Elektrophorese wurden die markierten Produkte mit dem FMBIO-100-Image-Analysator (Hitachi) sichtbar gemacht, wobei der resultierende Imager-Scan in der **Fig. 41** gezeigt ist.

[0610] In der **Fig. 41** enthielten die in den Spuren 1 bis 4 analysierten Proben 1 pmol des RNA-Ziels, die in den Spuren 5 bis 8 gezeigten Reaktionen enthielten 100 fmol des RNA-Ziels und die in den Spuren 9 bis 12 gezeigten Reaktionen enthielten 10 fmol des RNA-Ziels. Alle ungradzahligen Spuren zeigen Reaktionen, die mit Cleavase® A/G-Enzym durchgeführt wurden, und alle gradzahligen Spuren veranschaulichen Reaktionen, die mittels DNAPTth durchgeführt wurden. Die in den Spuren 1, 2, 5, 6, 9 und 10 analysierten Reaktionen ent-

hielten RNA, die mit RNAse A vorgespalten wurde. Diese Daten zeigen, dass die invasive Spaltungsreaktion effizient RNA-Ziele nachweist, und zudem bestätigt die Abwesenheit von jeglichem spezifischen Spaltungssignal in den RNAse-behandelten Proben, dass das in den anderen Spuren beobachtete spezifische Spaltprodukt von der Anwesenheit der eingegebenen RNA abhängt.

BEISPIEL 20

Das Schicksal der Ziel-RNA in den Invader™-gerichteten Spaltungsreaktion

[0611] In diesem Beispiel wurde das Schicksal der Invader™-gerichteten Spaltungsreaktion untersucht. Wie vorstehend in Beispiel 1D gezeigt, wenn RNAs an DNA-Oligonukleotide hybridisiert wurden, können die 5'-Nukleasen, die mit den DNA-Polymerasen einhergehen, zur Spaltung der RNAs verwendet werden; eine solche Spaltung kann unterdrückt werden, wenn der 5'-Arm lang ist oder wenn er stark strukturiert ist (Lyamichev et al., Science 260: 778 [1993], und US-Patent Nr. 5,422,253. In diesem Experiment wurde das Ausmaß untersucht, in dem das RNA-Ziel durch die Spaltungsmittel gespalten wird, wenn es an die Nachweis-Oligonukleotide (d. h. die Sonde und die Invader™-Oligonukleotide) hybridisiert wurde, wobei ähnliche Reaktionen verwendet wurden, wie in Beispiel 20 beschrieben, die mit Hilfe von fluoresceinmarkierter RNA als Ziel ausgeführt wurden.

[0612] Die Transkriptionsreaktionen erfolgten wie in Beispiel 19, mit der Ausnahme, dass 2% des UTP in der Reaktion ersetzt wurden gegen Fluorescein-12-UTP (Boehringer Mannheim), und 5,3 µg des Amplikons wurden in einer 100 µl-Reaktion verwendet. Die Transkriptionsreaktion wurde 2,5 Std. inkubiert, wonach das DNA-Template durch Zugabe von 5 bis 6 µl RQ1 RNAsefreier DNAse (1 Unit/µl) gemäß den Angaben des RiboMAX™-Kits zerstört wurde. Die organische Extraktion wurde unterlassen, und die RNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3 M NaOAc, pH-Wert 5,2 und 110 µl 100 Isopropanol gesammelt. Nach 5 min Inkubation bei 4°C wurde das Präzipitat durch Zentrifugation gesammelt, einmal mit 80% Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die resultierende RNA wurde in 100 µl nukleasefreiem Wasser gelöst. Die Hälfte (d. h. 50%) der Probe wurde durch Elektrophorese durch ein 8% denaturierendes Polyacrylamid-Gel (19:1 vernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA gereinigt. Das Gelstück, das das Volllängenmaterial enthielt, wurde ausgeschnitten, und die RNA wurde eluiert, indem das Stück über Nacht bei 4°C in 200 µl 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,0, 0,1 mM EDTA und 0,3 M NaOAc getränkt wurde. Die RNA wurde dann durch Zugabe von 2,5 Volumen 100% Ethanol gefällt. Nach Inkubation bei –20°C für 30 min wurden die Präzipitate durch Zentrifugation gesammelt, einmal mit 80% Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die RNA wurde in 25 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und dann durch UV-Extinktion bei 260 nm quantifiziert.

[0613] Die Proben des gereinigten RNA-Ziels wurden 5 oder 30 min in Reaktionen inkubiert, bei denen die Cleavase® A/G und DNAPTtha-Invader™-Oligonukleotid-Reaktionen, beschrieben in Beispiel 20, verdoppelt wurden, ausgenommen, dass die Reaktionen keine Sonden- und Invader™-Oligonukleotide aufwiesen. Eine anschließende Analyse der Produkte zeigte, dass die RNA sehr stabil war, mit einem sehr leichten Hintergrund von unspezifischem Abbau, der als grauer Hintergrund in der Gelspur erscheint. Der Hintergrund hing nicht von der Anwesenheit des Enzyms in der Reaktion ab.

[0614] Die Invader™-Nachweisreaktionen mit dem gereinigten RNA-Ziel wurde mit dem Sonden/Invader™-Oligonukleotid-Paar durchgeführt, das in Beispiel 19 beschrieben ist (Seq.-ID Nr. 46 und 47). Jede Reaktion enthielt 500 fmol Ziel-RNA, 5 pmol fluoresceinmarkierte Sonde und 10 pmol Invader™-Oligonukleotid in einem Puffer aus 10 mM MOPS, pH-Wert 7,5 mit 150 mM LiCl, 4 mM $MnCl_2$, jeweils 0,05% Tween-20 und Nonidet P40 und 39 Units RNAsin® (Promega). Diese Komponenten wurden vereinigt, und auf 50°C erwärmt, und die Reaktionen wurden durch Zugabe von 53 ng Cleavase® A/G oder 5 Polymerase-Units DNAPTth gestartet. Das endgültige Reaktionsvolumen betrug 10 µl. Nach 5 min bei 50°C, wurden 5 µl jeder Reaktion in Röhrchen überführt, die 4 µl 95% Formamid, 10 mM EDTA und 0,02% Methylviolett enthielten. Das verbleibende Aliquot erhielt einen Tropfen ChillOut®-Verdampfungssperre und wurde für weitere 25 min inkubiert. Diese Reaktionen wurden dann durch Zugabe von 4 µl der vorstehenden Formamid-Lösung gestoppt. Die Produkte dieser Reaktionen wurden durch Elektrophorese durch getrennte 20% denaturierende Polyacrylamidgele (19:1 vernetzt) aufgelöst, die 7 M Harnstoff, in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA enthielten. Nach der Elektrophorese wurden die markierten Reaktionsprodukte mit dem FMBIO-100 Image-Analysator (Hitachi) sichtbar gemacht, wobei die resultierenden Imager-Scans in der **Fig. 42A** (5 min Reaktionen) und **Fig. 42B** (30 min Reaktionen) gezeigt sind.

[0615] In der **Fig. 53** wird die Ziel-RNA nahe des oberen Randes jeder Spur beobachtet, wohingegen die mar-

kierte Sonde und deren Spaltprodukte unterhalb der Mitte jedes Feldes beobachtet werden. Der FMBIO-100 Image-Analysator wurde zum Quantifizieren des Fluoreszenzsignals in den Sondenbanden verwendet. In jedem Feld enthält die Spur 1 Produkte aus Reaktionen, die in Abwesenheit eines Spaltungsmittels durchgeführt wurden, Spur 2 enthält Produkte aus Reaktionen, die mit Cleavase® A/G durchgeführt wurden, und Spur 3 enthält Produkte aus Reaktionen, die mit DNAPTth durchgeführt wurden.

[0616] Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals in den Sondenbanden ergab, dass nach einer 5 min Inkubation 12% oder 300 fmol der Sonde durch die Cleavase® A/G gespalten wurden, und 29% oder 700 fmol durch die DNAPTth gespalten wurden. Nach 30 min Inkubation hatte die Cleavase® A/G 32% der Sondenmoleküle gespalten und DNAPTth hatte 70% der Sondenmoleküle gespalten. (Die in den Fig. 42A und Fig. 42B gezeigten Bilder wurden mit der eingestellten Intensität gedruckt, um die geringe Menge Hintergrund aus dem RNA-Abbau zu zeigen, so dass die Banden, die starke Signale enthalten, gesättigt sind, und daher spiegeln diese Bilder nicht genau die Unterschiede der gemessenen Fluoreszenz wider).

[0617] Die in der **Fig.** 42 gezeigten Daten zeigen klar, dass, unter invasiven Spaltungsbedingungen, die RNA-Moleküle hinreichend stabil sind, dass sie als Ziel nachgewiesen können, und dass jedes RNA-Molekül viele Runden der Sondenspaltung unterstützen kann.

BEISPIEL 21

Titration der Ziel-RNA im Invader™-gerichteten Spaltungstest

[0618] Einer der Hauptvorteile des Invader™-gerichteten Spaltungstests als Maßnahme zum Nachweisen der Anwesenheit spezifischer Nukleinsäuren ist die Korrelation zwischen der Menge Spaltungsprodukt, die in einer eingestellten Zeitspanne erzeugt wird, und die Menge der interessierenden Nukleinsäure, die in der Reaktion vorhanden ist. Die Vorteile des quantitativen Nachweises der RNA-Sequenzen wurden in Beispiel 19 erörtert. In diesem Beispiel wurde die quantitative Beschaffenheit des Nachweistests durch die Verwendung verschiedener Mengen Ziel-Ausgangsmaterial aufgezeigt. Neben der Demonstration der Korrelation zwischen den Mengen von eingegebenem Ziel und erhaltenem Spaltprodukt zeigen diese Daten graphisch den Grad, mit dem das RNA-Ziel in diesem Test rezykliert werden kann.

[0619] Das in diesen Reaktionen verwendete RNA-Ziel war das fluoresceinmarkierte Material, das in Beispiel 20 beschrieben ist (d. h. Seq.-ID Nr. 45). Da die Effizienz des Einbaus von Fluorescein-12-UTP durch die T7-RNA-Polymerase nicht bekannt war, wurde die Konzentration der RNA durch die Messung der Extinktion bei 260 nm und nicht durch die Fluoreszenzintensität bestimmt. Jede Reaktion umfasste 5 pmol der fluoresceinmarkierten Sonde (Seq.-ID Nr. 46) und 10 pmol des Invader™-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 47) in einem Puffer aus 10 mM MOPS, pH-Wert 7,5 mit 150 mM LiCl, 4 mM $MnCl_2$, jeweils 0,05% Tween 20 und Nonidet P40 und 39 Units RNAsin® (Promega). Die Menge Ziel-RNA wurde von 1 bis 100 fmol variiert, wie nachstehend gezeigt. Diese Komponenten wurden vereinigt, mit ChillOut®-Verdampfungssperre überschichtet, und auf 50°C erwärmt; die Reaktionen wurden durch Zugabe von 53 ng Cleavase® A/G oder 5 Polymerase-Units DNAPTth auf ein Endvolumen von 10 µl gestartet. Nach 30 min bei 50°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid, 10 mM EDTA und 0,02% Methylviolett gestoppt. Die nicht umgesetzten Marker in den Spuren 1 und 2 wurden in dem gleichen Gesamtvolumen (18 µl) verdünnt. Die Proben wurden für 1 min auf 90°C erwärmt und 2,5 µl von jeder dieser Reaktionen wurde durch Elektrophorese durch ein 20% denaturierendes Polyacrylamid-Gel (19:1 vernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA, aufgelöst, und die markierten Reaktionsprodukte wurden mittels FMBIO-100 Image-Analysator (Hitachi) sichtbar gemacht, wobei die erhaltenen Imager-Scans in der Fig. 43 gezeigt sind.

[0620] In der Fig. 43 zeigen die Spuren 1 und 2 5 pmol ungeschnittene Sonde bzw. 500 fmol unbehandelte RNA. Die Sonde ist ein sehr dunkles Signal nahe der Mitte des Feldes, wohingegen die RNA die dünne Linie nahe der Oberseite des Feldes ist. Diese RNAs wurden mit einer 2%igen Substitution von Fluoreszein-12-UTP für natürliches UTP in der Transkriptionsreaktion transkribiert. Das resultierende Transkript enthält 74 U-Reste, die ein Mittel von 1,5 Fluorescein-Markierungen pro Molekül ergeben. Mit einem Zehntel der molaren Menge der RNA, die in Spur 2 aufgetragen ist, sollte das Signal in der Spur 2 etwa 1/7 (0,15×) der Fluoreszenz-Intensität der Sonde in Spur 1 haben. Die Messungen zeigten, dass die Intensität näher an 1/40 war, was eine Effizienz des Markierungseinbaus von etwa 17% zeigt. Da die RNA-Konzentration durch A260-Messung verifiziert wurde, verändert dies nicht die nachstehenden Experimentalbedingungen, jedoch beachte man, dass das Signal von der RNA und der Sonden nicht genau die relativen Mengen in den Reaktionen widerspiegeln.

[0621] Die in den Spuren 3 bis 7 analysierten Spuren enthielten 1, 5, 10, 50 bzw. 100 fmol Ziel, wobei die

Spaltung der Sonde durch Cleavase® A/G erzielt wurde. Die in den Spuren 8 bis 12 analysierten Reaktionen wiederholten die gleiche Anordnung der Zielmengen, wobei die Spaltung der Sonde durch DNAPTth erzielt wurde. Die Kästen um die Produktbanden zeigen den Bereich des Scans, in dem die Fluoreszenz für jede Reaktion gemessen wurde. Die Anzahl der Fluoreszenzeinheiten, die in jedem Kasten erfasst wurden, ist unter jedem Kasten angezeigt; die Hintergrundfluoreszenz wurde ebenfalls gemessen.

[0622] Es ist ersichtlich durch Vergleich der nachgewiesenen Fluoreszenz in jeder Spur, dass die Menge Produkt, die sich in diesen 30 min-Reaktionen gebildet hat, mit der Menge des Zielmaterials korreliert ist. Diese Anreicherung von Produkt unter diesen Bedingungen ist leicht verstärkt, wenn DNAPTth als Spaltungsmittel verwendet wird, aber die Korrelation mit der Menge an vorhandenem Ziel bleibt. Dies zeigt, dass der Invader™-Test als Maßnahme zum Messen der Menge an Ziel-RNA in einer Probe verwendet werden kann.

[0623] Der Vergleich der Fluoreszenzintensität der Eingangs-RNA mit der des gespaltenen Produkt zeigt, dass der Invader™-gerichtete Spaltungstest ein Signal im Überschuss der Menge Ziel erzeugt, so dass das Signal, das als gespaltene Sonde sichtbar ist, viel intensiver ist, als es die Ziel-RNA veranschaulicht. Die bestätigt weiter die in Beispiel 20 beschriebenen Ergebnisse, worin gezeigt wurde, dass jedes RNA-Molekül mehrmals verwendet werden kann.

BEISPIEL 22

Nachweis von DNA durch Ladungs-Umkehr

[0624] Der Nachweis spezifischer Ziele ist in dem Invader™-gerichteten Spaltungstest durch die Spaltung des Sonden-Oligonukleotids erreicht. Neben den in den vorhergehenden Beispielen beschriebenen Verfahren kann die gespaltene Sonde von der ungespaltenen Sonde getrennt werden, wobei die nachstehend beschriebenen Ladungsumkehrtechnik verwendet wird. Diese neue Trenntechnik betrifft die Beobachtung, dass positiv geladene Addukte das Elektrophoreseverhalten kleiner Oligonukleotide beeinträchtigen können, weil die Ladung des Addukts im Vergleich zur Ladung des ganzen Komplexes signifikant ist. Beobachtungen bezüglich einer aberranten Beweglichkeit aufgrund geladener Addukte wurden in der Literatur beschrieben, aber in allen gefundenen Fällen beinhalteten die Anwendungen, die von anderen Wissenschaftlern durchgeführt wurden, ein Vergrößern der Oligonukleotide durch Enzymextension. Wenn die negativ geladenen Nukleotide zugegeben werden, wird der positive Einfluss des Adduktes bis zur Bedeutungslosigkeit reduziert. Die Effekte positiv geladener Addukte werden demnach aufgegeben, und sie haben einen winzigen Beitrag in der gängigen Literatur erhalten.

[0625] Diese beobachtete Wirkung ist von besonderer Bedeutung in Tests auf der Basis der Spaltung von DNA-Molekülen. Wird ein Oligonukleotid durch die Wirkung des Cleavase®-Enzyms oder eines anderen Spaltungsmittels gekürzt, kann die positive Ladung nicht nur die negative Nettoladung signifikant reduzieren, sondern tatsächlich diese überrennen, wobei die Nettoladung der markierten Unit effizient "geschnippt" wird. Diese Ladungsumkehr ermöglicht, dass die Produkte der zielspezifischen Spaltung von der ungespaltenen Sonde durch äußerst einfache Maßnahmen getrennt werden kann. Die Spaltprodukte können beispielsweise veranlasst werden, zu einer negativen Elektrode zu wandern, die sich an einer beliebigen Stelle in einem Reaktionsgefäß befindet, für eine konzentrierte Erfassung ohne Elektrophorese auf Gelbasis. Wird ein Plattengel verwendet, können die Probentaschen in der Mitte des Gels positioniert werden, so dass man beobachtet, dass die gespaltenen und ungespaltenen Sonden in entgegengesetzten Richtungen wandern. Alternativ kann ein herkömmliches Vertikalgel verwendet werden, wobei aber die Elektroden gegenüber normalen DNA-Gelen umgekehrt sind (d. h. die positive Elektrode befindet sich am oberen Ende und die negative Elektrode am unteren Ende), so dass die gespaltenen Moleküle in das Gel eintreten, wohingegen die ungespalteten im oberen Reservoir des Elektrophoresepuffers dispergieren.

[0626] Ein zusätzlicher Vorteil dieser Art von Auslesung ist, dass die absolute Natur der Trennung der Produkte von Substraten bedeutet, dass eine Abundanz von ungespaltener Sonde dazu dienen kann, den Hybridisierungsschritt des Tests auf Sondenbasis anzutreiben, und dennoch kann unverbrauchte Sonde von dem Ergebnis zur Reduktion des Hintergrundes subtrahiert werden.

[0627] Durch die Verwendung mehrfach positiv geladener Addukte können die synthetischen Moleküle mit einer hinreichenden Modifikation konstruiert werden, dass der normal negativ geladene Strang fast neutral gemacht ist. Derart kontruiert kann die Anwesenheit oder Abwesenheit einer einzelnen Phosphatgruppe den Unterschied zwischen einer negativen oder positiven Nettoladung bedeuten. Diese Beobachtung ist besonders geeignet, wenn eine Aufgabe die Unterscheidung zwischen enzymatisch erzeugten Fragmenten der DNA ist,

denen ein 3'-Phosphat fehlt, und den Produkte des thermischen Abbaus, die ein 3'-Phosphat (und somit zwei zusätzliche negative Ladungen) behalten.

a) Charakterisierung der Produkte des thermischen Bruchs der DNA-Oligonukleotide

[0628] Die thermische Zersetzung der DNA-Sonden führt zu einem hohen Hintergrund, der Signale verdecken kann, die durch spezifische enzymatische Spaltung erzeugt werden, was das Signal-Rauschen-Verhältnis senkt. Zum besseren Verständnis der Beschaffenheit der thermischen DNA-Zersetzungsprodukte wurden die 5'-Tetrachlorfluorescein (TET)-markierten Oligonukleotide 78 (Seq.-ID Nr. 48) und 79 (Seq.-ID Nr. 49) (jeweils 100 pmol) in 50 µl 10 mM $NaCO_3$ (pH-Wert 10,6), 50 mM NaCl bei 90°C für 4 Std. inkubiert. Zur Verhinderung der Verdampfung der Proben wurde das Reaktionsgemisch mit 50 µl ChillOut®-Flüssigwachs überschichtet. Die Reaktionen wurden dann in zwei gleiche Aliquots (A und B) unterteilt. Aliquot A wurde mit 25 µl Methylviolett-Ladepuffer gemischt, und Aliquot B wurde dephosphoryliert durch Zugabe von 2,5 µl 100 mM $MgCl_2$ und 1 µl Unit/µl alkalische Phosphatase aus Kalbsintestinum (CIAP) (Promega), unter Inkubation bei 37°C für 30 min, wonach 25 µl Methylviolett-Ladepuffer zugegeben wurde. Ein Mikroliter jeder Probe wurde durch Elektrophorese durch ein 12%iges denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgelöst und wie in Beispiel 21 sichtbar gemacht; es wurde ein 585 nm Filter mit dem FMBIO-Bild-Analysator verwendet. Der resultierende Imager-Screen ist in der Fig. 44 gezeigt.

[0629] In der Fig. 44 enthalten die Spuren 1 bis 3 das TET-markierte Oligonukleotid 78, und die Spuren 4 bis 6 enthalten die TET-markierten Oligonukleotide 79. Die Spuren 1 und 4 enthalten Produkte von Reaktionen, die nicht wärmebehandelt wurden. Die Spuren 2 und 5 enthalten Produkte aus Reaktionen, die wärmebehandelt wurden, und die Spuren 3 und 6 enthalten Produkte aus Reaktionen, die wärmebehandelt und einer Phosphatasebehandlung unterworfen wurden.

[0630] Der Fig. 44 zufolge verursacht die Wärmebehandlung einen signifikanten Abbruch der 5'-TET-markierten DNA, was eine Leiter von Zersetzungsprodukten erzeugt (Fig. 44, Spuren 2, 3, 5 und 6). Die Bandenintensitäten korrelieren mit den Purin- und Pyrimidin-Basenpositionierung in den Oligonukleotid-Sequenaen, was zeigt, dass die Gerüsthydrolyse über die Bildung abasischer Zwischenprodukte erfolgen kann, die schnellere Raten für Purine als für Pyrimidine haben (Lindahl und Karlström, Biochem., 12: 5151 [1973]).

[0631] Die Dephosphorylierung senkt die Beweglichkeit aller Produkte, die durch den thermischen Abbauprozess erzeugt wurden, wobei der am stärksten betonte Effekt für die kürzeren Produkte beobachtet wird (Fig. 44, Spuren 3 und 6). Dies zeigt, dass die thermisch abgebauten Produkte eine 3'-terminale Phosphorylgruppe besitzen, die durch Dephosphorylierung mit CIAP entfernt werden kann. Die Entfernung der Phosphorylgruppe senkt die Gesamt-Nettoladung um 2. Daher werden kürzere Produkte, die eine kleine Anzahl von negativen Ladungen aufweisen, zu einem größeren Grad bei der Entfernung der beiden Ladungen beeinflusst. Dies führt zu einer größeren Beweglichkeitsverschiebung in den kürzeren Produkten als man es für die größere Spezies beobachtet.

[0632] Die Tatsache, dass der Großteil der thermisch zersetzten DNA-Produkte 3'-End-Phosphatgruppen enthält, und die Cleavase®-Enzym-erzeugten Produkte jedoch nicht, ermöglichte die Entwicklung einfacher Isolationsverfahren für Produkte, die in dem Invader™-gerichteten Spaltungstest erzeugt wurden. Die zusätzlichen zwei Ladungen, die man bei thermischen Zersetzungesprodukten findet, existieren nicht in den spezifischen Spaltungsprodukten. Wenn man Tests entwickelt, die spezifische Produkte erzeugen, welche eine positive Nettoladung von 1 oder 2 aufweisen, dann sind ähnliche thermische Abbauprodukte daher entweder negativ oder neutral. Der Unterschied kann verwendet werden, um spezifische Produkte durch Umkehrladungsverfahren wie nachstehend gezeigt zu isolieren.

b) Dephosphorylierung kurzer aminomodifizierter Oligonukleotide kann die Nettoladung des markierten Produktes umkehren

[0633] Zur Demonstration, wie die Oligonukleotide von Verbindungen mit negativer Nettoladungen zu solchen mit positiver Nettoladung umgewandelt werden können, wurden die vier kurzen aminomodifizierten Oligonukleotide, bezeichnet als 70, 74, 75 und 76, die in den Fig. 45 bis Fig. 47 gezeigt sind, synthetisiert (die Fig. 45 zeigt beide Oligonukleotide 70 und 74). Alle vier modifizierten Oligonukleotide besitzen Cy-3-Farbstoffe, die am 5'-Ende positioniert sind, und die jeweils positiv geladen sind, unter Reaktions- und Isolationsbedingungen, die in diesem Beispiel beschrieben sind. Die Verbindungen 70 und 74 enthalten zwei aminomodifizierte Thymidine, die unter Reaktionsbedingungen positiv geladene R-NH_3^+-Gruppen aufweisen, die an der C5-Position über einen C_{10}- bzw. C_6-Linker gebunden sind. Weil die Verbindungen 70 und 74 3'-endphosphoryliert sind, be-

stehen sie aus vier negativen Ladungen und drei positiven Ladungen. Die Verbindung 75 unterscheidet sich von 74 dahingehend, dass das interne C_6-Amino-modifizierte Thymidinphosphat in 74 ersetzt ist durch ein Thymidinmethylphosphonat. Das Phosphonat-Gerüst ist ungeladen, und so gibt es insgesamt drei negative Ladungen an der Verbindung 75. Dies gibt Verbindung 75 eine negative Nettoladung von 1. Die Verbindung 76 unterscheidet sich von 70 dahingehend, dass das interne aminomodifizierte Thymidin ersetzt ist durch ein internes Cytosinphosphonat. Der pK_a des N3-Stickstoffs von Cytosin kann von 4 bis 7 reichen. Somit können die Nettoladungen dieser Verbindung von –1 bis 0 reichen, was vom pH-Wert der Lösung abhängt. Zur Vereinfachung der Analyse ist jeder Gruppe eine Gesamtzahl von Ladungen zugeordnet, obwohl man realisiert, dass sich je nach dem pK_a der jeweiligen chemischen Gruppe und des Umgebungs-pH-Werts eine tatsächliche Ladung unterscheiden kann von der zugeordneten Gesamtzahl. Man nimmt an, dass dieser Unterschied über dem Bereich der in den hier untersuchten Enzymreaktionen verwendeten pH-Werte nicht signifikant ist.

[0634] Die Dephosphorylierung dieser Verbindungen oder die Entfernung der 3'-terminalen Phosphorylgruppe führt zu einer Eliminierung der beiden negativen Ladungen und erzeugt Produkte, die eine negative Nettoladung von 1 haben. Bei diesem Experiment wurde das Verfahren der isoelektrischen Fokussierung (IEF) verwendet, um einen Wechsel von einer negativen zu einer positiven Nettoladung für die beschriebenen Substrate während der Dephosphorylierung zu zeigen.

[0635] Die Substrate 70, 74, 75 und 76 wurden durch Standard-Phosphoramidit-Chemien synthetisiert und die Schutzgruppen für 24 Std. bei 22°C in 14 M wässriger Ammoniumhydroxid-Lösung entfernt, wonach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Die getrockneten Pulver wurden in 200 µl H_2O resuspendiert und durch 0,2 µM Filter filtriert. Die Konzentration der Ausgangslösungen wurde durch UV-Extinktion bei 261 nm von Proben bestimmt, die 200fach in H_2O verdünnt wurden, wobei ein Spektralphotometer (Spectronic Genesys 2, Milton Roy, Rochester, NY) verwendet wurde.

[0636] Die Dephosphorylierung der Verbindungen 70 und 74, 75 und 76 erfolgte durch Behandeln von 10 µl der rohen Stammlösungen (im Bereich von etwa 0,5 bis 2 mM) mit 2 Units CIAP in 100 µl CIAP-Puffer (Promega) bei 37°C für 1 Std. Die Reaktionen wurden dann für 15 min auf 75°C erwärmt, damit das CIAP inaktiviert wurde. Zur Erklärung werden die dephosphrslierten Verbindungen mit 'dp' bezeichnet. Nach der Dephosphorylierung wird das Substrat 70 beispielsweise zu 70dp.

[0637] Zur Herstellung von Proben für IEF-Experimente wurde die Konzentration der Stammlösungen von Substrat und dephosphoryliertem Produkt so eingestellt, dass sich eine gleichmäßige Extinktion von $8{,}5 \times 10^{-3}$ bei 532 nm durch Verdünnen mit Wasser ergab. 2 µl jeder Probe wurden durch IEF mit einer PhastSystem-Elektrophoreseeinheit (Pharmacia) und PhastGel IEF 3-9-Medium (Pharmacia) gemäß dem Herstellerprotokoll analysiert. Die Trennung wurde durchgeführt bei 15°C mit dem folgenden Programm: Vorlauf: 2000 V, 2,5 mA, 3, 5 W, 75 Vh; Last; 200 V, 2, 5 mA, 3, 5 W, 15 Vh; Lauf; 2000 V; 2,5 mA; 3,5 W, 130 Vh. Nach der Trennung wurden die Proben durch Verwendung des FMBIO-Image-Analysators (Hitachi) sichtbar gemacht, der mit einem 585 nm Filter ausgerüstet war. Der resultierende Imager-Scan ist in der **Fig. 48** gezeigt.

[0638] Die **Fig. 48** zeigt die Ergebnisse der IEF-Trennung der Substrate 70, 74, 75 und 76 und ihre dephosphorylierten Produkte. Der Pfeil, der mit "Proben-Ladeposition" bezeichnet ist, zeigt eine Beladungslinie, das '+'-Zeichen zeigt die Position der positiven Elektrode, und das '–'-Zeichen zeigt die Position der negativen Elektrode.

[0639] Die in der **Fig. 48** gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die Substrate 70, 74, 75 und 76 zur positiven Elektrode wanderten, wohingegen die dephosphorylierten Produkte 70dp, 74dp, 75dp und 76dp zur negativen Elektrode wanderten. Die beobachteten Unterschiede in der Wanderungsrichtung entsprachen der vorhergesagten Nettoladung der Substrate (minus 1) und der Produkte (plus 1). Kleine Störungen in den Beweglichkeiten der phosphorylierten Verbindungen zeigen, dass die Gesamt-pls variieren. Dies galt ebenfalls für die dephosphorylierten Verbindungen. Die Anwesenheit von Cytosin in 76dp beispielsweise bewegte diese Verbindung weiter zur negativen Elektrode, was eine höhere Gesamt-pl relativ zu den anderen dephsophorylierten Verbindung anzeigte. Es ist wichtig zu bemerken, dass zusätzliche positive Ladungen durch Verwendung einer Kombination von natürlichen aminomodifizierten Basen (70dp und 74dp) zusammen mit ungeladenen Methylphosphonatbrücken (Produkte 75dp und 76dp) erhalten werden können.

[0640] Die oben gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die Entfernung einer einzelnen Phosphatgruppe die Nettoladung eines Oligonukleotids so umwechseln kann, dass eine Umkehr des elektrischen Feldes erfolgt, was eine einfache Trennung der Produkte ermöglicht, und dass die genaue Basis-Zusammensetzung der Oligonukleotide eine absolute Beweglichkeit beeinträchtigt, aber nicht die Ladungs-Umschalt-Wirkung.

BEISPIEL 23

Nachweis der spezifischen Spaltprodukte in der Invader™-gerichteten Spaltungsreaktion durch Ladungsumkehr

[0641] Bei diesem Beispiel wurde die Fähigkeit zur Isolation von Produkten, die in dem Invader™-gerichteten Spaltungstest erzeugt wurden, von allen anderen in dem Reaktions-Cocktail vorhandenen Nukleinsäuren, mittels Ladungsumkehr aufgezeigt. Dieses Experiment nutzte das folgende Cy3-markierte Oligonukleotid: 5'-Cy3-AminoT-AminoT-CTTTTCACCAGCGAGACGGG-3' (Seq.-ID Nr. 50; bezeichnet als "Oligo 61"). Oligo 61 war so ausgelegt, dass es beim Spalten ein markiertes Produkt mit einer positiven Nettoladung freisetzt. Zur Untersuchung, ob ein 5'-endmarkiertes Produkt mit positiver Nettoladung durch die Cleavase®-Enyzme in dem Invader™-gerichteten Spaltungstestformat erkannt wird oder nicht, wurden das Sonden-Oligo 61 (Seq.-ID Nr. 50) und das invasive Oligonukleotid 67 (Seq.-ID Nr. 51) auf einem DNA-Synthesegerät (ABI 391) chemisch synthetisiert, wobei Standard-Phosphoramidit-Chemien und Reagenzien verwendet wurden, die von Glen Research (Sterling VA) erhalten wurden.

[0642] Jede Testreaktion umfasste 100 fmol M13mp18-Einzelstrang-DNA, 10 pmol Sonden- (Seq.-ID Nr. 50) und Invader™-(Seq.-ID Nr. 51)-Oligonukleotide und 20 Units Cleavase® A/G in einer 10 µl-Lösung von 10 mM MOPS, pH-Wert 7,4 mit 100 mM KCl. Die Proben wurden mit Mineralöl überschichtet, um Verdampfung zu verhindern. Die Proben wurden auf 50°C, 55°C, 60°C oder 65°C gebracht, und die Spaltung wurde durch Zugabe von 1 µl 40 mM $MnCl_2$ gestartet. Die Reaktionen konnten 25 min fortlaufen und wurden dann durch Zugabe von 10 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,02% Methylviolett beendet. Das negative Kontrollexperiment hatte kein Ziel-M13mp18, und erfolgte bei 60°C. 5 µl jeder Reaktion wurden in getrennten Taschen eines 20% denaturierenden Polyacrylamidgels (vernetzt 29:1) mit 8 M Harnstoff in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH-Wert 8,3) und 1,4 mM EDTA aufgetragen. Ein elektrisches Feld mit 20 Watt wurde für 30 min angelegt, wobei die Elektroden wie in der **Fig.** 49B orientiert waren (d. h. in umgekehrter Richtung). Die Produkte dieser Reaktionen wurden mit dem FMBIO-Fluoreszenz-Imager sichtbar gemacht, und der resultierende Imager-Scan ist in der **Fig.** 49B gezeigt.

[0643] Die **Fig.** 49A stellt eine schematische Darstellung einer Ausrichtung von Invader™ (Seq.-ID Nr. 50) und Sonde (Seq.-ID Nr. 51) längs der Ziel-M13mp18-DNA bereit; nur 53 Basen der M13mp18-Sequenz sind gezeigt (Seq.-ID Nr. 52). Die Sequenz des Invader™-Oligonukleotids ist unter dem M13mp18-Ziel gezeigt, und ein Pfeil über der M13mp18-Sequenz zeigt die Position des Invader™-Oligonukleotids relativ zu Sonde und Ziel an. Der **Fig.** 49A zufolge haben Invader™- und Sonden-Oligonukleotide eine gemeinsame 2 Base-Region-Überlappung.

[0644] In der **Fig.** 49B enthalten die Spuren 1 bis 6 Reaktionen, die bei 50°C, 55°C, 60°C bzw. 65°C durchgeführt werden; die Spur 5 enthielt die Kontrollreaktion (ohne Ziel). In der **Fig.** 49B sind die Spaltprodukte als dunkle Banden in der oberen Hälfte des Feldes zu sehen; die beobachtete schwache untere Bande erscheint im Verhältnis zur Menge des erzeugten Primärproduktes und kann, ohne dass man die Erfindung auf einen bestimmten Mechanismus einschränken möchte, die Spaltung ein Nukleotid in den Doppelstrang veranschaulichen. Die ungespaltene Sonde tritt nicht in das Gel ein und ist somit nicht sichtbar. Die Kontrollspur zeigte kein sichtbares Signal gegenüber dem Hintergrund (Spur 5). In einer invasiven Spaltungsreaktion war die Rate der Anreicherung von spezifischem Spaltungsprodukt erwartungsgemäß temperaturabhängig. Mit diesen bestimmten Oligonukleotiden und Ziel wurde die schnellste Anreicherungsrate von Produkt bei 55°C (Spur 2) beobachtet, und sehr wenig Produkt wurde bei 65°C beobachtet (Spur 4).

[0645] Bei Inkubation für längere Zeit bei hoher Temperatur können DNA-Sonden unspezifisch brechen (d. h. eine thermische Zersetzung erleiden), und die resultierenden Fragmente ergeben einen störenden Hintergrund für die Analyse. Die Produkte eines solchen thermischen Abbaus sind von einzelnen Nukleotiden bis hin zur Vollängen-Sonde verteilt. In diesem Experiment ermöglicht die Fähigkeit einer auf der Ladung beruhenden Trennung der Spaltprodukte (d. h. Ladungsumkehr) die empfindliche Trennung der spezifischen Produkte der zielabhängigen Spaltung von Sondenfragmenten, die durch thermische Zersetzung erzeugt wurden, und diese wurde untersucht.

[0646] Zur Untersuchung der Empfindlichkeitsgrenze dieses Nachweisverfahrens wurde die Ziel-M13mp18-DNA über einen Bereich von 1 fmol bis 1 amol 10fach seriell verdünnt. Die Invader™- und Sonden-Oligonukleotide waren wie oben beschrieben (d. h. Seq.-ID Nr. 50 und 51). Die invasiven Spaltungsreaktionen wurden wie vorstehend beschrieben mit den folgenden Abwandlungen durchgeführt. die Reaktionen erfolgten bei 55°C, 250 mM oder 100 mM KGlu wurde anstelle von 100 mM KCl verwendet, und nur 1 pmol In-

vader™-Oligonukleotid wurde zugegeben. Die Reaktionen wurden wie oben beschrieben gestartet und konnten für 12,5 Std. erfolgen. Eine negative Kontrollreaktion ohne zugefügte M13mp18-Ziel-DNA wurde ebenfalls durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 10 µl 95% Formamid mit 20 mM EDT und 0,02 Methylviolett beendet, und 5 µl dieser Gemische wurden elektrophoretisch aufgetrennt und wie oben beschrieben sichtbar gemacht. Der resultierende Imager-Scan ist in der Fig. 50 gezeigt.

[0647] In der Fig. 50 enthält die Spur 1 die negative Kontrolle; die Spuren 2 bis 5 enthalten Reaktionen, die mit 100 mM KGlu durchgeführt wurde; die Spuren 6 bis 9 enthalten Reaktionen, die mit 250 mM KGlu durchgeführt wurden. Die Reaktionen, die in den Spuren 2 und 6 aufgelöst wurden, enthielten 1 fmol Ziel-DNA; diejenigen in den Spuren 3 und 7 enthielten 100 amol Ziel; diejenigen in den Spuren 4 und 8 enthielten 10 amol Ziel, und diejenigen in den Spuren 5 und 9 enthielten 1 amol Ziel. Die in der Fig. 50 gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die Nachweisgrenze mittels Ladungsumkehr zum Nachweisen der Produktion der spezifischen Spaltprodukte in einer invasiven Spaltungsreaktion bei oder unter 1 Attomol oder etwa $6{,}02 \times 10^5$ Zielmolekülen ist. Es wurde kein nachweisbares Signal in der Kontrollspur beobachtet, was zeigt, dass unspezifische Hydrolyse- oder andere Abbauprodukte nicht in der gleichen Richtung wandern, wie die enzymspezifischen Spaltungsprodukte. Die Anregungs- und Emissionsmaxima für Cy3 sind 554 bzw. 568, wohingegen das FM-BIO-Imager-Analysegerät bei 532 anregt und bei 585 nachweist. Daher kann die Nachweisgrenze der spezifischen Spaltprodukte durch die Verwendung einer genauer passenden Anregungsquelle und genauer passender Nachweisfilter verbessert werden.

BEISPIEL 24

Vorrichtungen und Verfahren zur Trennung und zum Nachweis von geladenen Reaktionsprodukten

[0648] Dieses Beispiel betrifft Verfahren und Vorrichtungen zum Isolieren und Konzentrieren spezifischer Reaktionsprodukte, die durch in Lösung durchgeführte enzymatische Reaktionen hergestellt wurden, wobei die Reaktionen geladene Produkte, entweder aus einem ladungsneutralen Substrat oder einem Substrat, das die entgegengesetzte, durch das spezifische Reaktionsprodukt hervorgebrachte Ladung trägt, erzeugen. Die Verfahren und Vorrichtungen dieses Beispiels erlauben die Isolierung von beispielsweise den Produkten, die durch das Invaders™-directed-cleavage-Test der vorliegenden Erfindung erzeugt wurden.

[0649] Die Verfahren und Vorrichtungen dieses Beispiels basieren auf dem Prinzip, dass beim Anlegen eines elektrischen Felds an eine Lösung von geladenen Teilchen die Wanderung der Moleküle zur entgegengesetzt geladenen Elektrode sehr schnell auftritt. Wenn eine Matrix oder ein hemmendes Material zwischen die geladenen Moleküle und die entgegengesetzt geladene Elektrode eingeführt wird, so dass diese schnelle Wanderung drastisch verlangsamt wird, werden die ersten Moleküle, die die Matrix erreichen beinahe gestoppt, und erlauben es so den nacheilenden Molekülen aufzuholen. Auf diese Weise kann eine in Lösung verteilte Population von geladenen Molekülen wirksam in einem kleineren Volumen konzentriert werden. Durch Markieren der Moleküle mit einem nachweisbaren Rest (z. B. ein fluoreszierender Farbstoff) wird der Nachweis sowohl durch die Konzentrierung als auch die Lokalisierung der Analyten vereinfacht. Dieses Beispiel veranschaulicht zwei Ausführungsformen von erfindungsgemäßen Vorrichtungen; natürlich werden Änderungen dieser Vorrichtungen für den Fachmann ersichtlich sein und entsprechen dem Geist und dem Anwendungsbereich der vorliegenden Erfindung.

[0650] Fig. 51 stellt eine Ausführungsform eines Geräts zum Konzentrieren der positiv geladenen Produkte, die unter Verwendung der Verfahren der vorliegenden Erfindung erzeugt wurden, dar. Wie in Fig. 51 gezeigt, besteht die Vorrichtung aus einem Reaktionsröhrchen (**10**), das die Reaktionslösung (**11**) enthält. Ein Ende von jedem der zwei dünnen Kapillarröhrchen (oder andere Röhrchen mit einem hohlen Kern) (**13A** und **13B**) werden in die Reaktionslösung (**11**) eingetaucht. Die Kapillarröhrchen (**13A** und **13B**) können in die Reaktionslösung (**11**) herabhängen, so dass sie nicht in Kontakt mit dem Reaktionsröhrchen an sich sind; ein geeignetes Verfahren die Kapillarröhrchen herabzuhängen ist, sie mit Klammern zu platzieren (nicht gezeigt). Ersatzweise können die Kapillarröhrchen in die Reaktionslösung (**11**) herabhängen, so dass sie in Kontakt mit dem Reaktionsröhrchen selbst sind. Geeignete Kapillarröhrchen umfassen Glaskapillarröhrchen, die allgemein erhältlich von wissenschaftlichen Zulieferfirmen (z. B. Fisher Scientific oder VWR Scientific) sind oder von medizinischen Zulieferfirmen, die Material zur Blutentnahme und -analyse führen. Obgleich die vorliegende Erfindung nicht auf Kapillarröhrchen eines bestimmten Innendurchmessers beschränkt sind, werden Röhrchen mit einem Innendurchmesser bis zu etwa 1/8 Inch (circa 3 mm) insbesondere für die Verwendung mit der vorliegenden Erfindung bevorzugt, zum Beispiel, Kimble-Röhrchen Nr. 73811-99 (VWR Scientific) haben einen Innendurchmesser von 1,1 mm und sind der geeignete Typ von Kapillarröhrchen. Obwohl die Kapillarröhrchen der Vorrichtung im Allgemeinen aus Glas bestehen, ist jedes nichtleitende Röhrchenmaterial, entweder starr oder fle-

xibel, das entweder ein leitendes oder ein Trapping-Material enthalten kann, für die erfindungsgemäße Verwendung geeignet. Ein Beispiel für ein geeignetes flexibles Röhrchen ist ein klares Tygon®-Plastikröhrchen (Teilenr. R3603; Innendurchmesser = 1/16 Inch; Außendurchmesser = 1/8 Inch).

[0651] Wie in Fig. 51 dargestellt, ist das Kapillarröhrchen **13A** mit der positiven Elektrode eines Netzanschlussgeräts (**20**) verbunden (z. B. ein einstellbares Netzanschlussgerät, das bei vorstehend aufgezählten Laborausstattern erhältlich ist oder bei Elektroniklieferanten wie Radio Shack) und das Kapillarröhrchen **13B** mit der negativen Elektrode des Netzanschlussgeräts (**20**). Das Kapillarröhrchen **13B** ist mit Trapping-Material (**14**) gefüllt, das fähig ist die positiv geladenen Reaktionsprodukte durch Zulassen von geringer Wanderung der Produkte, die in das Trapping-Material (**14**) eingedrungen sind, einzufangen. Geeignetes Trapping-Material umfasst, ist aber nicht beschränkt auf, hochprozentiges Acrylamid (z. B. etwa 20%) in einem Hochsalzpuffer (0,5 M oder höher konzentriert Natriumacetat oder ähnliches Salz); solch eine hochprozentige Polyacrylamidmatrix verlangsamt drastisch die Wanderung positiv geladener Reaktionsprodukte. Ersatzweise kann das Trapping-Material eine feste, negativ geladene Matrix umfassen, wie negativ geladene Latexkugeln, welche die eintretenden positiv geladenen Produkte binden kann. Es sollte beachtet werden, dass jede Menge von Trapping-Material (**14**), die fähig ist die positiv geladenen Produkte zu hemmen und zu konzentrieren, verwendet werden kann. Während das Kapillarröhrchen **13B** in Fig. 51 nur Trapping-Material im unteren untergetauchten Teil des Röhrchens enthält, so kann das Trapping-Material (**14**) im gesamten Kapillarröhrchen (**13B**) anwesend sein; ebenso kann weniger Trapping-Material (**14**) als das in Fig. 51 gezeigte anwesend sein, weil sich die positiv geladenen Reaktionsprodukte im Allgemeinen in einem sehr kleinen Teil am Boden des Kapillarröhrchens (**13B**) ansammeln. Die Menge an Trapping-Material muss nur ausreichend sein, um einen Kontakt mit der Reaktionslösung (**11**) herzustellen und um die Kapazität zu besitzen die Reaktionsprodukte zu sammeln. Wenn das Kapillarröhrchen **13B** nicht vollständig mit dem Trapping-Material gefüllt ist, kann der verbleibende Raum mit jedem leitenden Material (**15**) gefüllt werden; geeignete leitende Materialien werden nachstehend diskutiert.

[0652] Im Vergleich kann das Kapillarröhrchen (**13A**), das an die positive Elektrode des Netzanschlussgeräts **20** angeschlossen ist, mit jedem leitenden Material (**15**; durch die schraffierte Linie in Fig. 51 angezeigt) gefüllt werden. Dies kann der Probenreaktionspuffer sein (z. B. 10 mM MOPS, pH 7,5 mit 150 mM LiCl, 4 mM $MnCl_2$), ein Standard-Elektrophoresepuffer (z. B. 45 mM Tris-Borat, pH 8,3, 1,4 mM EDTA) oder die Reaktionslösung (**11**) selbst. Das leitende Material (**15**) ist häufiger eine Flüssigkeit, aber ein halbfestes Material (z. B. ein Gel) oder ein anderes geeignetes Material kann einfacher zu verwenden sein und liegt im Schutzumfang der vorliegenden Erfindung. Zudem kann das Trapping-Material, das in dem anderen Kapillarröhrchen (d. h. Kapillarröhrchen **13B**) verwendet wird, als leitendes Material verwendet werden. Umgekehrt sollte beachtet werden, dass das gleiche leitende Material, das im Kapillarröhrchen (**13A**), das an die positive Elektrode angeschlossen ist, verwendet wird, auch im Kapillarröhrchen **13B** verwendet werden kann, um den Raum über der Region, die das Trapping-Material (**14**) enthält, aufzufüllen (siehe Fig. 51).

[0653] Das obere Ende von jedem Kapillarröhrchen (**13A** und **13B**) wird an die passende Elektrode des Netzanschlussgeräts angeschlossen. Feiner Platindraht (z. B. 0,1 bis 0,4 mm, Aesar Johnson Matthey, Ward Hill, MA) wird im Allgemeinen als leitender Draht verwendet, weil er unter Elektrophoresebedingungen nicht verrostet. Der Elektrodendraht (**18**) kann an die Kapillarröhrchen (**13A** und **13B**) mit einem nichtleitenden Klebemittel angeschlossen sein, wie die Silikonkleber, die im Allgemeinen in Haushaltswarengeschäften verkauft werden, um Installationsvorrichtungen abzudichten. Wenn die Kapillarröhrchen aus einem flexiblen Material hergestellt sind, kann der Elektrodendraht (**18**) mit einer kleinen Schlauchklemme oder einem einschnürenden Draht (nicht gezeigt) gesichert werden, um die Öffnungen der Kapillarröhrchen um den Elektrodendraht zusammenzupressen. Wenn das leitende Material (**15**) ein Gel ist, kann ein Elektrodendraht (**18**) direkt in das Gel in dem Kapillarröhrchen eingebettet werden.

[0654] Die Spaltungsreaktion wird im Reaktionsröhrchen (**10**) vereint und darf darin fortfahren, wie in den Fortführungsbeispielen (z. B. Beispiele 22–23) beschrieben. Obwohl das Volumen der Reaktionslösung (**11**) nicht auf ein besonderes Volumen beschränkt ist, ist ein bevorzugtes Volumen weniger als 10 ml und bevorzugter weniger als 0,1 ml. Das Volumen muss nur ausreichend sein, um Kontakt mit beiden Kapillarröhrchen zu erlauben. Nachdem die Spaltungsreaktion beendet ist, wird ein elektrisches Feld an die Kapillarröhrchen durch Anschalten der Stromquelle (**20**) angelegt. Demzufolge wandern die positiv geladenen Produkte, die im Verlauf der Invader™-gerichteten Spaltungsreaktion erzeugt wurden, die ein Oligonukleotid einsetzt, das, wenn es gespalten wird ein positiv geladenes Fragment (beschrieben in Beispiel 23) erzeugt, wenn es nicht gespalten wird, trägt es eine negative Nettoladung, zum negativen Kapillarröhrchen, wo ihre Wanderung durch das Trapping-Material (**14**) verlangsamt oder gestoppt wird, und die negativ geladenen ungespaltenen und thermisch abgebauten Moleküle wandern zur positiven Elektrode. Durch die Verwendung dieser oder einer

ähnlichen Vorrichtung werden die positiv geladenen Produkte der invasiven Spaltungsreaktion von dem anderen Material getrennt (d. h. ungespaltene und thermisch abgebaute Sonde) und aus einem großen Volumen konzentriert. Die Konzentrierung des Produkts in einer kleinen Menge Trapping-Materials (**14**) erlaubt die Vereinfachung des Nachweises, mit einem sehr viel höheren Signal-Rauschverhältnis als möglich beim Nachweis im ursprünglichen Volumen. Da das konzentrierte Produkt mit einer detektierbaren Unit, wie ein fluoreszierender Farbstoff, markiert wird, kann ein kommerziell erhältlicher Fluoreszenz-Plattenleser (nicht gezeigt) verwendet werden, um die Menge des Produkts zu bestimmen. Geeignete Plattenleser umfassen beides, Top- und Bottom-Laserleser. Kapillarröhrchen **13B** kann in dem Reaktionsröhrchen (**10**) on jeder gewünschten Stelle positioniert sein um entweder einen Top- oder Bottom-Leser unterzubringen.

[0655] In einer ersatzweisen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, dargestellt in Fig. 52, wird das vorstehend beschriebene Verfahren durch Nutzung nur eines Kapillarröhrchens (**13B**) ausgeführt. Das Kapillarröhrchen (**13B**) enthält das vorstehend beschriebene Trapping-Material (**14**) und ist an Elektrodendraht (**18**) angeschlossen, der wiederum an die negative Elektrode des Netzanschlussgeräts (**20**) angeschlossen ist. Das Reaktionsröhrchen (**10**) hat eine Elektrode (**25**) in seine Oberfläche eingebettet, so dass eine Oberfläche der Elektrode der Innenseite des Reaktionsröhrchens (**10**) ausgesetzt ist und die andere Oberfläche der Außenseite des Reaktionsröhrchens ausgesetzt ist. Die Oberfläche der Elektrode (**25**) auf der Außenseite des Reaktionsröhrchens ist in Kontakt mit einer leitenden Oberfläche (**26**), die mit der positiven Elektrode des Netzanschlussgeräts (**20**) über einen Elektrodendraht (**18**) verbunden ist. Abwandlungen der in Fig. 52 dargestellten Anordnung sind auch durch die vorliegende Erfindung in Erwägung gezogen. Zum Beispiel kann die Elektrode (**25**) in Kontakt mit der Reaktionslösung (**11**) sein, durch Anwendung eines kleinen Lochs im Reaktionsröhrchen (**10**); weiter kann der Elektrodendraht (**18**) direkt an den Elektrodendraht (**18**) angeschlossen werden, wobei die leitende Oberfläche (**26**) ausgeschlossen wird.

[0656] Wie in Fig. 52 dargestellt, ist die Elektrode (**25**) am Grund des Reaktionsröhrchens (**10**) eingebettet, so dass ein oder mehrere Reaktionsröhrchen auf die leitende Oberfläche (**26**) gesetzt werden können. Diese leitende Oberfläche kann als eine negative Elektrode für viele Reaktionsröhrchen dienen; solch eine Oberfläche mit ausreichend Kontakten kann durch die Verwendung von Metallfolien (z. B. Kupfer oder Platin, Aesar Johnson Matthey, Ward Hill, MA) in der gleichen Weise angewendet werden, wie Kontakte auf Leiterbahnen aufgetragen werden. Weil solch ein Oberflächenkontakt der Reaktionsprobe nicht direkt ausgesetzt würde, könnte weniger teures Metall, wie das Kupfer, verwendet werden, um elektrische Verbindungen herzustellen.

[0657] Die vorstehenden Vorrichtungen und Verfahren sind nicht auf die Trennung und Konzentrierung von positiv geladenen Oligonukleotiden beschränkt. Es wird für den Fachmann offensichtlich sein, dass negativ geladene Produkte von neutralen oder positiv geladenen Reaktanten unter Verwendung der vorstehenden Vorrichtung und Verfahren getrennt werden können, mit der Ausnahme, dass Kapillarröhrchen (**13B**) an die positive Elektrode des Geräts (**20**) angeschlossen ist und Kapillarröhrchen **13A**, oder ersatzweise Elektrode **25**, an die negative Elektrode des Netzanschlussgeräts (**20**) angeschlossen ist.

BEISPIEL 25

Primer-gerichtete und Primer-unabhängige Spaltung tritt an der gleichen Stelle auf, wenn sich der Primer auf die 3'-Seite einer ungepaarten Blase der Stromabwärts-Duplex-DNA erstreckt

[0658] Wie vorstehend in Beispiel 1 diskutiert, kann die Anwesenheit eines Primers stromaufwärts einer gegabelten Duplex-DNA die Spaltungsstelle beeinflussen und die Anwesenheit einer Lücke zwischen dem 3'-Ende eines Primers und der Basis der Duplex-DNA kann eine Verschiebung der Spaltungsstelle bis zum ungepaarten 5'-Arm der Struktur verursachen (siehe auch Lyamichev et al., vorstehend und U.S. Nr. 5,422,253). Die entstandene nicht invasive Verschiebung der Spaltungsstelle als Antwort auf einen Primer wird in den **Fig.** 8, 9 und 10 gezeigt, in denen der verwendete Primer eine Lücke von 4 Nukleotiden hinterlässt (relativ zur Basis der Duplex-DNA). In den **Fig.** 8–10 ergeben alle der "Primer-gerichteten" Spaltungsrektionen ein Produkt von 21 Nukleotiden, während die Primer-unabhängigen Spaltungsreaktionen ein Produkt von 25 Nukleotiden ergeben. Die Spaltungsstelle, die erhalten wurde, wenn der Primer sich zur Basis der Duplex-DNA erstreckte ohne eine Lücke zu hinterlassen, wurde untersucht. Die Ergebnisse sind in Fig. 53 gezeigt (Fig. 53 ist eine Nachbildung von Fig. 2C in Lyamichev et al.) Diese Daten, gezeigt in Fig. 5, wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden aus der Spaltung der Struktur erhalten. Sofern nicht anders festgelegt, umfassen die Spaltungsreaktionen 0,01 pmol hitzedenaturierter, endmarkierter Hairpin-DNA (wobei der unmarkierte komplementäre Strang auch anwesend ist), 1 pmol Primer (komplementär zum 3'-Arm, gezeigt in Fig. 5 und mit der Sequenz: 5'-GAATTCGATTTAGGTGACACTATAGAATACA [Seq.-ID Nr. 53] und 0,5 Units von DNAPTaq (auf 0,026 pmol geschätzt) in einem Gesamtvolumen von 10 µl 10 mM Tris-Cl, pH 8,5, und 1,5 mM $MgCl_2$ und 50 mM KCl. Der

Primer wurde, gezeigt in der ersten Spur der Fig. 53, in der Reaktion weggelassen und in Spur zwei zugefügt. Diese Reaktionen wurden 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Die Reaktionen wurden bei der Endreaktionstemperatur durch Zugabe von entweder $MgCl_2$ oder Enzym gestartet. Die Reaktionen wurden bei ihren Inkubationstemperaturen durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoff gestoppt.

[0659] Fig. 53 ist eine Autoradiogramm, das die Wirkungen auf die Spaltstellen einer gegabelten Duplexstruktur in Anwesenheit eines Primers, der sich bis zur Basis der Hairpin-Duplex-DNA erstreckt, zeigt. Die Größe des freigesetzten Spaltproduktes ist links gezeigt (d. h. 25 Nukleotide). Eine Didesoxynukleotid-Sequenzleiter des Spaltsubstrats ist rechts als Marker gezeigt (Spuren 3–6).

[0660] Diese Daten zeigen, dass die Anwesenheit eines Primers, der stromabwärts zu einer Duplex-DNA (Spur 2) benachbart ist, eine Spaltung an derselben Stelle verursacht, wie bei Reaktionen beobachtet, die in Abwesenheit des Primers (Spur 1) durchgeführt wurden. (Siehe Fig. 8A und B, Fig. 9B und Fig. 10A für zusätzliche Vergleiche). Wenn die terminalen 3'-Nukleotide des Oligonukleotids stromaufwärts mit dem Templatestrang basenpaaren können, aber nicht homolog zum verdrängten Strang in der Region unmittelbar stromaufwärts der Spaltstelle sind (d. h. wenn das Stromaufwärts-Oligonukleotid eine "Blase" in der Duplex-DNA öffnet) ist die Stelle, zu der die Spaltung offensichtlich verschoben wird, nicht vollständig abhängig von der Anwesenheit eines Stromaufwärts-Oligonukleotids.

[0661] Wie vorstehend im Hintergrund und in Tabelle 1 beschrieben, stellt die Vorgabe, dass 2 unabhängige Sequenzen in einem Test erkannt werden, einen sehr erwünschten Spezifitätslevel bereit. Bei den invasiven Spaltungsreaktionen der vorliegenden Erfindung muss der Invader™ und Sondenoligonukleotide an die Zielnukleinsäure mit der richtigen Orientierung und Abstand hybridisieren, um die Herstellung des richtigen Spaltprodukts zu ermöglichen. Sobald das charakteristische Spaltmuster nicht abhängig von der erfolgreichen Anlagerung der beiden Oligonukleotide im Nachweissystem ist, gehen diese Vorteile der unabhängigen Erkennung verloren.

BEISPIEL 26

Invasive Spaltung und Primer-gerichtete Spaltung wenn nur partielle Homologie in der überlappenden "X"-Region besteht

[0662] Während die vorliegende Erfindung nicht auf einen bestimmten Mechanismus beschränkt ist, tritt die invasive Spaltung auf, wenn die Spaltstelle zu einer Stelle innerhalb der Duplex-DNA verschoben wird, die zwischen der Sonde und der Zielnukleinsäure in einer Weise gebildet wird, die abhängig von der Anwesenheit eines Stromaufwärts-Oligonukleotids ist, das eine überlappende Region mit dem Sondenoligonukleotid stromabwärts teilt. In einigen Fällen kann die 5'-Region des Stromaufwärts-Oligonukleotids nicht vollständig komplementär zur Zielnukleinsäure sein. In diesen Fällen kann die Spaltung der Sonde an einer internen Seite in der Sonde auftreten, auch in Abwesenheit eines Stromaufwärts-Oligonukleotids (im Gegensatz zu dem Base-zu-Base-Nibbling, das beobachtet wird, wenn eine vollständig gepaarte Sonde ohne einen Invader™ verwendet wird). Invasive Spaltung ist durch eine offensichtliche Verschiebung der Spaltstelle an eine Stelle in einer Stromabwärts-Duplex-DNA gekennzeichnet, die abhängig von der Anwesenheit des Invader™-Oligonukleotids ist.

[0663] Ein Vergleich zwischen invasiver Spaltung und Primer-gerichteter Spaltung kann veranschaulicht werden durch Vergleich der erwarteten Spaltstellen eines Satzes von Sondenoligonukleotiden mit sinkenden Komplementaritätsgraden an den Zielstrang in der 5'-Region der Sonde (d. h. die Region, die mit dem Invader™ überlappt). Ein einfacher Test, ähnlich zu dem der mit der vorstehenden Hairpin-Struktur (Bsp. 25) durchgeführt wurde, kann durchgeführt werden, um die invasive Spaltung mit der nicht invasiven, Primer-gerichteten vorstehend beschriebenen Spaltung zu vergleichen. Solch ein Satz von Testoligonukleotiden ist in Fig. 54 graphisch dargestellt. Die in Fig. 54 gezeigten Strukturen sind zu Paaren gruppiert, bezeichnet "a", "b", "c" und "d". Jedes Paar hat die gleiche Probensequenz hybridisiert an den Zielstrang (Seq.-ID Nr. 54), aber die Anfangsstruktur jeden Paares ist ohne ein Stromaufwärts-Oligonukleotid gezeichnet, während die Endstruktur dieses Oligonukleotid umfasst (Seq.-ID Nr. 55). Die Sequenzen der Sonden, die in den **Fig.** 54a–54d gezeigt sind, sind in Seq.-ID Nr. 32, 56, 57 beziehungsweise 58 aufgeführt. Mögliche Spaltstellen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet (es ist zu beachten, dass die genaue Spaltstelle an jeder dieser Strukturen sich ändern kann, abhängig von der Wahl des Spaltungsmittels und anderer experimenteller Variablen. Diese besonderen Stellen sind nur für Erläuterungszwecke bereitgestellt).

[0664] Um diesen Test durchzuführen wird die Spaltstelle jeder Sonde sowohl in Anwesenheit als auch in Ab-

wesenheit des Stromaufwärts-Oligonukleotids bestimmt, bei Reaktionsbedingungen, wie solche, die in Beispiel 18 beschrieben werden. Die Produkte jedes Reaktionspaars werden dann verglichen, um zu bestimmen, ob das Fragment, das aus dem 5'-Ende der Sonde freigesetzt wurde, an Größe zunimmt, wenn das Stromaufwärts-Oligonukleotid in die Reaktion einbezogen wird.

[0665] Die in **Fig.** 54a gezeigte Anordnung, bei der das Sondenmolekül vollständig komplementär zum Zielstrang ist, ähnelt der in Fig. 28 gezeigten. Die Behandlung der Anfangsstruktur mit der 5'-Nuklease einer DNA-Polymerase würde exonukleolytisches Nibbling der Sonde (d. h. in Abwesenheit des Stromaufwärts-Oligonukleotids) bewirken. Dagegen würde der Einschluss eines Invader™-Oligonukleotids eine ausgeprägte Verschiebung der Spaltung verursachen, ähnlich der, die in Fig. 29 beobachtet wurde.

[0666] Die in den **Fig.** 54b und 54c gezeigten Anordnungen haben die gleiche Menge an ungepaarter Sequenz am 5'-Terminus der Sonde (3 beziehungsweise 5 Basen). Diese kleinen 5'-Arme sind geeignete Spaltungssubstrate für die 5'-Nukleasen und würden 2 Nukleotide entfernt von der Verbindungsstelle zwischen der Einzelstrangregion und der Duplex-DNA spalten. In diesen Anordnungen teilen die 3'-Enden der Stromaufwärts-Oligonukleotide Identität mit einem Teil der 5'-Region der Sonde, die komplementär zur Zielsequenz ist (das bedeutet, das 3'-Ende des Invader™ muss mit einem Teil des 5'-Endes der Sonde um die Bindung an der Zielsequenz konkurrieren). Wenn das Upstram-Oligonukleotid eingeschlossen ist, wird daher angenommen, dass es eine Verschiebung der Spaltstelle in die Stromabwärts-Duplex-DNA vermittelt (obgleich die vorliegende Erfindung nicht auf irgendeinen besonderen Wirkungsmechanismus eingeschränkt ist) und dies würde daher invasive Spaltung festlegen. Wenn die äußersten 5'-Nukleotide der ungepaarten Region der Sonde fähig wären an den Zielstrang zu hybridisieren, könnte sich die Spaltstelle in Abwesenheit des Invader™ ändern, aber die Zugabe des Invader™-Oligonukleotids würde immer noch die Spaltstelle an die korrekte Position verschieben.

[0667] Schließlich teilen in den in **Fig.** 54d gezeigten Anordnungen die Sonde und die Stromaufwärts-Oligonukleotide keine bemerkenswerten Homologieregionen und die Anwesenheit der Stromaufwärts-Oligonukleotide würde nicht mit der Sonde um die Bindung an die Zielsequenz konkurrieren. Die Spaltung der in **Fig.** 54d gezeigten Strukturen würde an der gleichen Stelle mit oder ohne Stromaufwärts-Oligonukleotide auftreten und das würde folglich nicht invasive Spaltung festlegen. Durch Untersuchung jedes Stromaufwärts-Oligonukleotids/Sondenpaars auf diese Weise, kann leicht nachgewiesen werden, ob die entstandene Spaltung invasiv oder lediglich Primer-gerichtet ist. Solche Analyse ist insbesondere nützlich, wenn die Sonde nicht vollständig komplementär zur Zielnukleinsäure ist, so dass das erwartete Ergebnis nicht offensichtlich durch einfache Betrachtung der Sequenzen sein kann.

BEISPIEL 27

Modifizierte Cleavase®-Enzyme

[0668] Um Nukleasen mit nützlichen Aktivitäten für die Spaltung von Nukleinsäuren zu entwickeln, wurden die folgenden modifizierten Nukleasen hergestellt.

a) Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease

i) Klonierung und Expression von Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease

[0669] Ortsgerichtete Mutagenese wurde verwendet, um eine Proteinsequenz, die durch Proteasethrombin erkannt wird, in die Region der Cleavase® BN-Nuklease einzuführen, von der man denkt, dass sie den helikalen Bogen des Proteins bildet, durch den die einzelsträngige DNA, die gespalten wird, voraussichtlich passieren muss. Die Mutagenese wurde unter Verwendung des Transformer™-Mutagenesekits (Clontech, Palo Alto, CA) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt, und unter Verwendung des mutagenen Oligonukleotids 5'-GGGAAAGTCCTCGCAGCCGCGCG GGACGAGCGTGGGGGCCCG (Seq.-ID Nr. 59). Nach der Mutagenese wurde die DNA sequenziert, um die Insertion der Thrombin-Spaltstelle zu bestätigen. Die DNA-Sequenz, die für die Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease codiert, wird in Seq.-ID Nr. 60 bereitgestellt; die Aminosäuresequenz der Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease wird in Seq.-ID Nr. 61 bereitgestellt.

[0670] Eine Großansatzherstellung der Thrombin-Mutante (d. h. Cleavase® BN/Thrombin) wurde unter Verwendung von E. coli-Zellen, die Cleavase® BN/Thrombin, wie in Beispiel 28 beschrieben, überexprimieren, ausgeführt.

ii) Thrombinspaltung von Cleavase® BN/Thrombin

[0671] 6,4 mg der gereinigten Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease wurde 4 Stunden bei 23°C oder 37°C mit 0,4 U Thrombin (Novagen) gespalten. Die vollständige Spaltung wurde durch Elektrophorese auf einem 15% SDS-Polyacrylamidgel, gefolgt von Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R, bestätigt. Die Wildtyp-Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease wurde als Kontrolle auch mit Thrombin gespalten. Das resultierende Gel ist in **Fig.** 61 gezeigt.

[0672] In **Fig.** 61 enthält Spur 1 die Molekulargewichtmarker (Protein-Molekulargewichtmarker Low-Range; Promega), Spur 2 enthält ungespaltene Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease, Spuren 3 und 4 enthalten Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease, 2 beziehungsweise 4 Stunden gespalten mit Thrombin bei 37°C. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease ein ersichtliches Molekulargewicht von 36,5 Kilodalton besitzt und von Thrombin effizient gespalten wird. Zusätzlich haben die Thrombin-Spaltprodukte Molekulargewichte von ungefähr 27 Kilodalton und 9 Kilodalton, die erwartete Größe, die auf der Position der integrierten Thrombinstelle in der Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease basiert.

[0673] Um den Grad der Hairpin-Spaltungsaktivität von gespaltener und ungespaltener Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease zu bestimmen, wurden Verdünnungen hergestellt und verwendet, um einen Testhairpin mit einer 5'-Fluoresceinmarkierung zu spalten. Verschiedene Mengen gespaltener und ungespaltener Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease wurden mit 5 µM Oligonukleotid S-60-Hairpin (Seq.-ID Nr. 29; siehe **Fig. 26**) in 10 mM MOPS (pH 7,5), 0,05% Tween-20, 0,05% NP-40 und 1 mM MnCl 5 Minuten bei 60°C inkubiert. Die gespaltene Mischung wurde auf einem 20% Acrylamidgel einer Elektrophorese unterworfen und auf einem Fluoroimager Hitachi FMBIO 100 sichtbar gemacht. Das entstandene Bild ist in **Fig. 62** gezeigt.

[0674] In **Fig. 62** enthält die Spur 1 die Kontrolle ohne Enzym, die Spur 2 enthält die Reaktionsprodukte, die unter Verwendung von 0,01 ng Cleavase® BN-Nuklease hergestellt wurden. Die Spuren 3, 4 und 5 enthalten Reaktionsprodukte, die unter Verwendung von 0,01 ng, 0,04 ng beziehungsweise 4 ng ungespaltener Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease hergestellt wurden und die Spuren 6, 7 und 8 enthalten Produkte, die unter Verwendung von 0,01 ng, 0,04 ng beziehungsweise 4 ng Thrombin-gespaltener Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease hergestellt wurde. Die in **Fig. 62** gezeigten Ergebnisse verdeutlichten, dass das Einfügen einer Thrombin-Spaltstelle die Spaltungsaktivität etwa 200-fach reduzierte (relativ zur Aktivität der Cleavase® BN-Nuklease), dass aber Spaltung mit Thrombin die Aktivität nicht signifikant reduzierte.

[0675] Einzelsträngige M13-DNA wurde als ein Substrat zur Spaltung durch Cleavase® BN-Nuklease und durch gespaltene und ungespaltene Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease verwendet. Siebzehn Nanogramm einzelsträngiger M13-DNA (NEB) wurden in 10 mM MOPS, pH 7,5, 0,05% Tween 20, 0,05% NP-40, 1 mM $MgCl_2$ oder 1 mM $MnCl_2$ mit 8 ng Cleavase® BN-Nuklease, ungespaltener Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease oder gespaltener Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Mit den Reaktionsmischungen wurde eine Elektrophorese auf einem 0,8% Agarosegel durchgeführt und dann mit einer Lösung gefärbt, die 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) enthält, um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Ein Negativbild des EtBr-gefärbten Gels ist in **Fig. 63** gezeigt.

[0676] In **Fig. 63** enthält Spur 1 die Kontrolle ohne Enzym, Spur 2 enthält Reaktionsprodukte, die unter Verwendung von Cleavase® BN-Nuklease und 1 mM $MgCl_2$ hergestellt wurden, Spur 3 enthält Reaktionsprodukte, die unter Verwendung von Cleavase® BN-Nuklease und 1 mM $MnCl_2$ hergestellt wurden, Spur 4 enthält Reaktionsprodukte, die unter Verwendung von ungespaltener Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease und 1 mM $MgCl_2$ hergestellt wurden und Spur 7 enthält Reaktionsprodukte, die unter Verwendung von Thrombin-gespaltener Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease und 1 mM $MnCl_2$ hergestellt wurden. Die in **Fig. 63** gezeigten Ergebnisse zeigten, dass die Cleavase® BN/Thrombin-Nuklease eine höhere Neigung zeigte, zirkuläre DNA zu spalten (und folglich einen geringeren Bedarf für die Anwesenheit eines freien 5'-Endes) im Vergleich zu Cleavase® BN-Nuklease.

[0677] Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass der helikale Bogen dieser Proteine geöffnet werden kann, ohne das Enzym oder seine Fähigkeit besondere Spaltungsstrukturen zu erkennen zu zerstören. Die Cleavase® BN/Thrombin-Mutante hat eine erhöhte Neigung zu spalten, ohne die Notwendigkeit eines 5'-Endes, wie vorstehend diskutiert. Die Fähigkeit solche Strukturen zu spalten, wird auch die Spaltung langer Moleküle, wie genomische DNA, die, während sie häufig nicht zirkular ist, viele erwünschte Spaltstellen bieten kann, die weit entfernt von jedem verfügbaren 5'-Ende sind, ermöglichen. Spaltungsstrukturen können sich an solchen Stellen entweder durch Falten der Stränge (d. h. CFLP®-Spaltung) oder durch Einführung strukturbildender Oligonukleotide (U.S. Patent Nr. 5,422,253) bilden. Die 5'-Enden der Nukleinsäuren können nicht verfügbar gemacht

werden durch Bindung einer Substanz, die zu groß ist um sich durch den helikalen Bogen zu fädeln. Solche Bindungseinheiten können Proteine umfassen, wie Streptavidin oder Antikörper oder feste Träger, wie Kugeln oder die Wände eines Reaktionsgefäßes. Ein Spaltungsenzym mit einer Öffnung in der Schleife des helikalen Bogens wird fähig sein DNA's zu spalten, die in dieser Weise konfiguriert sind, wobei die Zahl der Wege, bei denen Reaktionen solche Enzyme verwenden, formatiert werden können.

b) Cleavase®-DN-Nuklease

i) Konstruktion und Expression der Cleavase®-DN-Nuklease

[0678] Eine polymerisationsdefiziente Mutante der TaqDNA-Polymerase, bezeichnet als Cleavase®-DN-Nuklease, wurde konstruiert. Cleavase®-DN-Nuklease enthält einen Asparaginrest anstelle des Wildtyp Asparaginsäurerests an Position 785 (D785N).

[0679] DNA, die Cleavase®-DN-Nuklease codiert, wurde aus dem Gen, das Cleavase®-A/G (mut Taq, Ex. 2) codiert, in 2 Runden ortsgerichteter Mutagenese konstruiert. Zuerst wurde das G an Position 1397 und das G an Position 2264 des Cleavase®-A/G-Gens (Seq.-ID Nr. 21) an jeder Position gegen A ausgetauscht, um ein Wildtyp DNAPTaq-Gen wieder herzustellen. In der zweiten Runde der Mutagenese wurde das Wildtyp DNAP-Taq-Gen zu einem Cleavase®-DN-Gen durch Ändern des G an Position 2356 in A umgewandelt. Diese Manipulationen wurden wie nachstehend beschrieben durchgeführt.

[0680] DNA, die Cleavase®-A/G-Nuklease codiert, wurde von dem Plasmid pTTQ18 (Bsp. 2) in das Plasmid pTrc99A (Pharmacia) in einem Zweischrittverfahren rekloniert. Zuerst wurde der Vektor pTrc99A durch Entfernen des G an Position 270 der pTrc99A-Karte modifiziert, wobei der Klonierungsvektor pTrc99G gebildet wurde. Zu diesem Zweck wurde die Plasmid-DNA pTrc99A mit NcoI gespalten und die rezessiven 3'-Enden wurden unter Verwendung des Klenow-Fragments der E. coli Polymerase I in Anwesenheit aller vier dNTPs bei 37°C 15 min aufgefüllt. Nach Inaktivierung des Klenow-Fragments durch Inkubation für 10 min bei 65°C, wurde die Plasmid-DNA mit EcoRI gespalten, die Enden wiederum unter Verwendung des Klenow-Fragments in Anwesenheit alle vier dNTPs bei 37°C 15 min aufgefüllt. Das Klenow-Fragment wurde dann durch Inkubation bei 65°C für 10 min inaktiviert. Die Plasmid-DNA wurde ethanolgefällt, durch Ligation rezirkularisiert und verwendet um E. coli JM 109 Zellen (Promega) zu transformieren. Die Plasmid-DNA wurde von Einzelkolonien isoliert und die Deletion des G an Position 270 der pTrc99A-Karte wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

[0681] Als ein zweiter Schritt wurde die DNA, die für die Cleavase®-A/G-Nuklease codiert aus dem Plasmid pTTQ18 unter Verwendung von EcoRI und SalI entfernt und das DNA-Fragment, welches das Cleavase®-A/G-Nukleasegen trägt, wurde auf einem 1%igen Agarosegel abgetrennt und mit einem Geneclean II Kit (Bio 101, Vista, CA) isoliert. Das gereinigt Fragment wurde in den Vektor pTrc99G ligiert, der mit EcoRI und SalI gespalten worden war. Das Ligationsgemisch wurde verwendet um kompetente E. coli JM 109 Zellen (Promega) zu transformieren. Die Plasmid-DNA wurde von Einzelkolonien isoliert und die Insertion des Cleavase®-A/G-Nukleasegens wurde durch Restriktionsanalysen mit EcoRI und SalI bestätigt.

[0682] Die Plasmid-DNA pTrcAG, die das Cleavase®-A/G-Nukleasegen, kloniert in den Vektor pTrc99A, trägt, wurde von 200 ml JM 109 Übernachtkulturen unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (QIAGEN, Chatsworth, CA) gemäß dem Herstellerprotokoll gereinigt. Die Plasmid-DNA pTrcAG wurde unter Verwendung zweiter mutagener Primer E465 (Seq.-ID Nr. 62) (Integrated DNA Technologies, Iowa) und R754Q (Seq.-ID Nr. 63) (Integrated DNA Technologies) und dem Selektionsprimer TransOligoAlwNI/SpeI (Clontech, Palo Alto, CA, Katalog Nr. 6488-1) gemäß des Protokolls für den Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit mutagenisiert um ein wiederhergestelltes Wildtyp DNAPTaq-Gen (pTrcWT) herzustellen.

[0683] Die Plasmid-DNA pTrcWT, die das Wildtyp DNAPTaq-Gen trägt, das in den Vektor pTrc99A kloniert wurde, wurde von 200 ml JM 109 Übernachtkulturen unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (QIAGEN, Chatsworth, CA) gemäß dem Herstellerprotokoll gereinigt. pTrcWT wurde dann unter Verwendung des mutagenen Primers D785N (Seq.-ID Nr. 64) (Integrated DNA Technologies) und des Selektionsprimers SwitchOligoSpeI/AlwNI (Clontech, Katalog Nr. 6373-1) gemäß des Protokolls für den Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit mutagenisiert um ein Plasmid herzustellen, das DNA umfasst, welche die Cleavase®-DN-Nuklease codiert. Die DNA-Sequenz, welche die Cleavase®-DN-Nuklease codiert wird in Seq.-ID Nr. 65 bereitgestellt; die Aminosäuresequenz der Cleavase®-DN-Nuklease wird in Seq.-ID Nr. 66 bereitgestellt.

[0684] Eine Großansatzherstellung der Cleavase®-DN-Nuklease wurde unter Verwendung von E. coli Zellen, welche die Cleavase®-DN-Nuklease überexprimierten, wie in Beispiel 28 beschrieben, durchgeführt.

c) Cleavase®-DA-Nuklease und Cleavase®-DV-Nuklease

[0685] Zwei polymerisationsdefiziente Mutanten der TaqDNA-Polymerase, als Cleavase®-DA-Nuklease und Cleavase®-DV-Nuklease bezeichnet, wurden konstruiert. Die Cleavase®-DA-Nuklease enthält einen Alaninrest anstelle des Wildtyp Asparaginsäurerests an Position 610 (D785A). Die Cleavase®-DV-Nuklease enthält einen Valinrest anstelle des Wildtyp Asparaginsäurerests an Position 610 (D610V).

i) Konstruktion und Expression der Cleavase®-DA- und Cleavase®-DV-Nukleasen

[0686] Um Vektoren zu konstruieren, die Cleavase®-DA- und Cleavase®-DV-Nukleasen codieren, wurde das Cleavase®-A/G-Nukleasegen, das in pTrcAG enthalten ist, mit zwei mutagenen Primern, R754Q (Seq.-ID Nr. 63) und D610AV (Seq.-ID Nr. 67) und dem Selektionsprimer Trans Oligo AlwNI/SpeI (Clontech, Katalog Nr. 6488-1) gemäß des Protokolls für den Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech) mutagenisiert, um ein Plasmid herzustellen, das DNA enthält, welche die Cleavase®-DA- oder Cleavase®-DV-Nuklease codiert. Das D610AV Oligonukleotid wurde so synthetisiert, dass es ein Purin, A oder G, an Position 10 vom 5'-Ende des Oligonukleotids besitzt. Nach der Mutagenese wurde die Plasmid-DNA von Einzelkolonien isoliert und der Typ der vorliegenden Mutation, DA oder DV, wurde durch DNA-Sequenzierung bestimmt. Die DNA-Sequenz, welche die Cleavase®-DA-Nuklease codiert, ist in Seq.-ID Nr. 69 bereitgestellt. Die DNA-Sequenz, welche die Cleavase®-DV-Nuklease codiert, ist in Seq.-ID Nr. 70 bereitgestellt; die Aminosäuresequenz der Cleavase®-DV-Nuklease ist in Seq.-ID Nr. 71 bereitgestellt.

[0687] Eine Großansatzherstellung der Cleavase®-DA- und Cleavase®-DV-Nukleasen wurde unter Verwendung von E. coli Zellen, welche die Cleavase®-DA-Nuklease und Cleavase®-DV-Nuklease überexprimierten, wie in Beispiel 28 beschrieben, durchgeführt.

BEISPIEL 28

Klonierung und Expression von thermostabilen FEN-1-Endonukleasen

[0688] Sequenzen, die thermostabile FEN-1-Nuklease codieren, die von drei Archaebakterienspezies stammen, wurden in E. coli kloniert und überexprimiert. Dieses Beispiel umfasst a) Klonierung und Expression von einer FEN-1-Endonuklease aus Methanococcus jannaschii; b) Klonierung und Expression von einer FEN-1-Endonuklease aus Pyrococcus furiosus; c) Klonierung und Expression von einer FEN-1-Endonuklease aus Pyrococcus woesei; d) Klonierung und Expression von einer FEN-1-Endonuklease aus Archaeglobus fulgidus e) Großansatzherstellung eines rekombinaten, thermostabilen FEN-1-Proteins; und f) Aktivitätsassays unter Verwendung von FEN-1-Nukleasen.

a) Klonierung und Expression einer FEN-1-Endonuklease aus Methanococcus jannaschii

[0689] DNA, die FEN-1-Endonuklease aus Methanococcus jannaschii (M, jannaschii) codiert, wurde aus M. jannaschii-Zellen isoliert und in ein Plasmid unter transkriptioneller Kontrolle eines induzierbaren Promotors folgendermaßen inseriert. Genomische DNA wurde aus einem Fläschchen lebender M. jannaschii-Bakterien (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland Nr. 2661) mit dem DNA-XTRAX-Kit (Gut1 Laboratories, Salt Lake City, UT) nach der Herstellervorschrift hergestellt. Das letzte DNA-Pellet wurde in 100 µl TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Ein Mikroliter der DNA-Lösung wurde in einer PCR unter Verwendung des Advantage™-cDNA-PCR-Kits (Clontech) eingesetzt; die PCR wurde gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Der 5'-Endprimer (Seq.-ID Nr. 72) ist komplementär zu dem 5'-Ende des offenen Leserahmens Mja FEN-1 mit einer Einbasensubstitution, um eine NcoI-Restriktionsstelle zu schaffen (ein Fragment des M. jannaschii-Genoms, das das Gen enthält, das M. jannaschii (Mja) FEN-1 codiert, ist von GenBank Zugang Nr. U67585 erhältlich). Der 3'-Endprimer (Seq.-ID Nr. 73) ist komplementär zu einer Sequenz etwa 15 Basenpaare stromabwärts vom 3'-Ende des offenen Leserahmens Mja-FEN-1 mit 2-Basensubstitutionen, um eine SalI-Restriktionsstelle zu schaffen. Die Sequenzen des 5'-End- und 3'-Endprimers sind: 5'-GGGATACCA TGGGAGTGCAGTTTGG-3' (Seq.-ID Nr. 72) beziehungsweise 5'-GGTAAATTTTTCTCGTCGA CATCCCAC-3' (Seq.-ID Nr. 73). Die PCR-Reaktion ergab die Amplifikation (d. h. Herstellung) einer einzelnen Hauptbande von etwa 1 kb Länge. Der offene Leserahmen (ORF), der die Mja-FEN-1-Endonuklease codiert, wird in Seq.-ID Nr. 74 bereitgestellt; die Aminosäuresequenz, die von diesem ORF codiert wird, ist in Seq.-ID Nr. 75 bereitgestellt.

[0690] Nach der PCR-Amplifikation, wurde die gesamte Reaktion einer Elektrophorese auf einem 1% Agarosegel unterworfen und die Hauptbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des Gene-

cleanII-Kits (Bio101, Vista, CA) gemäß den Herstellervorschriften gereinigt. Annähernd 1 µg des gelgereinigten Mja-FEN-1-PCR-Produkts wurde mit NcoI und SalI gespalten. Nach der Spaltung wurde die DNA unter Verwendung das GenecleanII-Kits gemäß den Herstellervorschriften gereinigt. Ein Mikrogramm des pTrc99a-Vektors (Pharmacia) wurde mit NcoI und SalI als Vorbereitung für die Ligierung mit dem gespaltenen PCR-Produkt gespalten. 100 Nanogramm gespaltener pTrc99a-Vektor und 250 ng gespaltenes Mja-FEN-1-PCR-Produkt wurden vereint und ligiert, um pTrc99-MJFEN1 zu bilden. pTrc99-MJFEN1 wurde verwendet, um kompetente E. coli JM109-Zellen (Promega) unter Verwendung von herkömmlichen Verfahren zu transformieren.

b) Klonierung und Expression einer FEN-1-Endonuklease aus Pyrococcus furiosus

[0691] DNA, die FEN-1-Endonuklease aus Pyrococcus furiosus (P. furiosus) codiert, wurde durch PCR-Amplifikation unter Verwendung eines Plasmids mit DNA, welche die P. furiosus(Pfu)-FEN-1-Endonuklease codiert erhalten (erhalten von Dr. Frank Robb, Center of Marine Biotechnology, Baltimore, MD). DNA-Sequenzen, die einen Teil der Pfu-FEN-1-Endonuklease codieren, können von GenBank als Zugangsnr. AA113505 und W36094 erhalten werden. Das amplifizierte Pfu-FEN-1-Gen wurde in den pTrc99a-Expressionsverktor (Pharmacia) inseriert, um das Pfu-FEN-1-Gen unter die transkriptionelle Kontrolle des induzierbaren trc-Promotors zu setzen. Die PCR-Amplifikation wurde folgendermaßen durchgeführt. Reaktionen von einhundert Mikroliter enthielten 50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgCl_2$, 50 µM dNTPs, 50 pmol jeden Primers, 1 U Tfl-Polymerase (Epicenter Technologies, Madison, WI) und 1 ng der Plasmid-DNA, die das FEN-1-Gen enthält. Der 5'-Endprimer (Seq.-ID Nr. 76) ist komplementär zum 5'-Ende des offenen Leserahmens des Pfu-FEN-1-Gens aber mit zwei Substitutionen, um eine NcoI-Stelle zu schaffen und der 3'-Endprimer (Seq.-ID Nr. 77) ist komplementär zu einer Region, die etwa 30 Basenpaare stromabwärts des offenen Leserahmens FEN-1 lokalisiert ist, mit zwei Substitutionen, um eine PstI-Stelle zu schaffen. Die Sequenzen des 5'-End- und 3'-Endprimers sind: 5'-GAGGTGATACCRTG GGTGTCC-3' (Seq.-ID Nr. 76) beziehungsweise 5'-GAAACTCTGCAGCGCGTCAG-3' (Seq.-ID Nr. 77). Die PCR-Reaktion ergab die Amplifikation einer einzelnen Hauptbande von 1 Kilobase Länge. Der offene Leserahmen (ORF), der die Pfu-FEN-1-Endonuklease codiert, wird in Seq.-ID Nr. 78 bereitgestellt; die Aminosäuresequenz, die von diesem ORF codiert wird, ist in Seq.-ID Nr. 79 bereitgestellt.

[0692] Nach der PCR-Amplifikation wurde die gesamte Reaktion einer Elektrophorese auf einem 1% Agarosegel unterworfen und die Hauptbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des GenecleanII-Kits (Bio101, Vista, CA) gemäß den Herstellervorschriften gereinigt. Annähernd 1 µg des gelgereinigten Pfu-FEN-1-PCR-Produkts wurde mit NcoI und PstI gespalten. Nach der Spaltung wurde die DNA unter Verwendung des Geneclean-II-Kits (Bio101, Vista, CA) gemäß den Herstellervorschriften gereinigt. Ein Mikrogramm des pTrc99a-Vektors (Pharmacia) wurde mit NcoI und PstI vor der Ligierung mit dem gespaltenen PCR-Produkt gespalten. Einhundert Nanogramm des gespaltenen pTrc99a-Vektors und 250 ng gespaltenen Pfu-FEN-1-PCR-Produkts wurden vereint und ligiert, um pTrc99-PFFEN1 zu bilden. pTrc99-PFFEN1 wurde verwendet, um kompetente E. coli JM109-Zellen (Promega) unter Verwendung von herkömmlichen Verfahren zu transformieren.

c) Klonierung und Überexpression einer FEN-1-Endonuklease aus Pyrococcus woesei

[0693] Für die Klonierung von DNA, welche die FEN-1-Endonuklease von Pyrococcus woesei (Pwo) codiert, wurde DNA aus lyophilisierten P. woesei-Bakterien (DSMZ Nr. 3773), wie beschrieben (Zwickl et al., J. Bact., 172: 4329 [1990]) mit einigen Änderungen hergestellt. In Kürze, ein Fläschchen P. woesei-Bakterien wurden in 0,5 ml LB (Luria Broth) rehydratisiert und resuspendiert. Die Zellen wurden bei 14,000 × g 1 min zentrifugiert und das Zellpellet wurde in 0,45 ml TE resuspendiert. Fünfzig Mikroliter 10% SDS wurden zugegeben und die Mischung wurde 5 min bei RT inkubiert. Das Zelllysat wurde dann dreimal mit 1:1 Phenol:Chloroform extrahiert und dreimal mit Chloroform. Fünfhundert Mikroliter Isopropanol wurde zu dem extrahierten Lysat gegeben und die DNA wurde durch Zentrifugation bei 14,000 × g 10 min pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 0,5 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut durch Zentrifugation bei 14,000 × g 5 min pelletiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 100 µl TE resuspendiert und für PCR-Reaktionen ohne weitere Reinigung verwendet.

[0694] Um ein FEN-1-Fragment von P. woesei für die Klonierung in einen Expressionsvektor zu erzeugen, wurde PCR niedriger Stringenz mit Primern, die komplementär zu den Enden des offenen Leserahmens des FEN-1-Gens von P. furiosus sind, versucht. Die Sequenzen des 5'-End- und 3'-Endprimers sind 5'-GATACCATGGGTGTCCCAATTGGTG-3' (Seq.-ID Nr. 80) beziehungsweise 5'-TCGACGTCGACTTATCTCTTGAACCAACTTTCAAGGG-3' (Seq.-ID Nr. 81). Das hohe Maß an Sequenzübereinstimmung der Proteinhomologen (d. h. andere Proteine als FEN-1-Proteine) von P. furiosus und P. woesei, zeigten an, dass es eine hohe Wahrscheinlichkeit gab, dass das FEN-1-Gen von P. woesei unter Verwendung von Primern mit Sequenzen, die

komplementär zum FEN-1-Gen des P. furiosus sind, amplifiziert werden könnte. Dieser Ansatz war jedoch unter verschiedenen unterschiedlichen PCR-Bedingungen erfolglos.

[0695] Die DNA-Sequenz der FEN-1-Gene von P. furiosus und M. jannaschii wurden alignt und Blöcke an Sequenzidentität zwischen den Genen wurden identifiziert. Diese Blöcke wurden verwendet, um interne Primer (d. h. Komplementarität zu Sequenzen, die intern an den 5'- und 3'-Enden des ORF lokalisiert sind) für das FEN-1-Gen zu erzeugen, die komplementär zum FEN-1-Gen von P. furiosus in solch konservierten Regionen sind. Die Sequenzen der internen 5'- und 3'-Primer sind 5'-AGCGAGGGAGAGGCCCAAGC-3' (Seq.-ID Nr. 82) beziehungsweise 5'-GCCTATGCCCTTTATTCCTCC-3' (Seq.-ID Nr. 83). Eine PCR, die diese internen Primer einsetzt, wurde unter Verwendung des Advantage™-PCR-Kits durchgeführt und ergab die Herstellung einer Hauptbande von 300 Bp.

[0696] Da die PCR mit den internen Primern erfolgreich war, wurden Reaktionen versucht, die Gemische von internen (Seq.-ID Nr. 82 und 83) und externen (Seq.-ID Nr. 80 und 81) Primern enthielten. Eine Reaktion mit dem externen 5'-Endprimer (Seq.-ID Nr. 80) und dem externen 3'-Endprimer (Seq.-ID Nr. 83) ergab die Herstellung einer 600 Bp-Bande und eine Reaktion mit dem internen 5'-Endprimer (Seq.-ID Nr. 82) und dem externen 3'-Endprimer (Seq.-ID Nr. 81) ergab die Herstellung einer 750 Bp-Bande. Diese überlappenden DNA-Fragmente wurden gelgereinigt und mit den externen Primern (Seq.-ID Nr. 80 und 81) in einer PCR-Reaktion vereint. Diese Reaktion erzeugte ein DNA-Fragment mit 1 kb, das den gesamten offenen Leserahmen des Pwo-FEN-1-Gens enthält. Das entstandene PCR-Produkt wurde gelgereinigt, gespalten und ligiert, genau wie vorstehend für das PCR-Produkt des Mja-FEN-1-Gens beschrieben. Das entstandene Plasmid wurde pTrc99-PWFEN1 bezeichnet. pTrc99-PWFEN1 wurde verwendet, um kompetente E. coli JM109-Zellen (Promega) unter Verwendung von herkömmlichen Verfahren zu transformieren.

c) Klonierung und Überexpression einer FEN-1-Endonuklease aus Archaeoglobus fulgidus

[0697] Die vorläufige Chromosomensequenz von 2,2 Millionen Basen der Archaeoglobus fulgidus (Afu) wurde von der Internetsite des TIGR (The Institute for Genomic Research) heruntergeladen und in ein Softwareprogramm (MacDNAsis) importiert, das verwendet wird, um DNA- und Proteinsequenzen zu analysieren und zu manipulieren. Die nicht bearbeitete Sequenz wurde in alle 6 der möglichen Leserahmen übersetzt, wobei jeder ungefähr 726000 Aminosäuren umfasst. Jeder Rahmen wurde einzeln auf die Anwesenheit der Aminosäuresequenz "VFDG" (Valin, Phenylalanin, Asparaginsäure, Glycin), eine Sequenz, die in der FEN-1-Familie konserviert ist, abgesucht. Die Aminosäuresequenz wurde in einem offenen Leserahmen, der andere konservierte Aminosäuresequenzen enthielt, die in der FEN-1-Familie konserviert sind und der die gleiche Größe hatte, wie die anderen FEN-1-Gene, gefunden. Die DNA-Sequenz des ORF ist in Seq.-ID Nr. 164 gezeigt, während die ORF-Proteinsequenz in Seq.-ID Nr. 165 gezeigt ist. Auf Basis der Position dieser Aminosäuresequenz innerhalb des offenen Leserahmens, wurde die DNA-Sequenz eines mutmaßlichen FEN-1-Gens identifiziert.

[0698] Die Sequenzinformation wurde verwendet, um Oliginukleotidprimer zu erzeugen, die für die PCR-Amplifikation der FEN-1-artigen Sequenz aus der genomischen DNA von A. fulgidus genutzt wurden. Genomische DNA wurde von A. fulgidus, wie in Beispiel 29a für M. jannaschii beschrieben, hergestellt, außer dass ein Fläschchen (ungefähr 5 ml Kultur) lebender A. fulgidus-Bakterien vom DSMZ (DSMZ Nr. 4304) verwendet wurde. Ein Mikroliter der genomischen DNA wurde, wie in Bsp. 29a beschrieben, für die PCR-Reaktion verwendet. Der 5'-Endprimer ist komplementär zum 5'-Ende des Afu-FEN-1-Gens bis auf eine Einbasenpaarsubstitution, um eine NcoI-Stelle zu schaffen. Der 3'-Endprimer ist komplementär zum 3'-Ende des Afu-FEN-1-Gens downstreanm des FEN-1-ORF, mit der Ausnahme, dass es eine Zweibasensubstitution enthält, um eine SalI-Stelle zu schaffen. Die Sequenzen des 5'- und 3'-Endprimers sind 5'-CCGTCAACATTTACCATGGGTGCGGA-3' (Seq.-ID Nr. 166) beziehungsweise 5'-CCGCCACCTCGTAGTCGACATCCTTTTCGTG (Seq.-ID Nr. 167).

[0699] Die Klonierung des entstandenen Fragments war wie vorstehend für das PfuFEN1-Gen beschrieben, um das Plasmid pTrc99-AFFEN1 herzustellen. Das Plasmid pTrcAfuHis wurde durch Modifizieren des pTrc99-AFFEN1 durch Zugabe eines Histidinschwanzes hergestellt, um die Reinigung zu vereinfachen. Um diesen Histidinschwanz anzufügen, wurden gewöhnliche PCR-Primer-gerichtete Mutageneseverfahren verwendet, um die codierende Sequenz für sechs Histidinreste zwischen dem letzten Aminosäurecodon der codierenden Region für pTrc99-AFFEN1 und dem Stoppcodon zu inserieren. Das entstandene Plasmid wurde pTrcAfuHis bezeichnet. Das Protein wurde dann wie in Beispiel 28e beschrieben exprimiert und durch Bindung an eine Ni^{++}-Affinitätkolonne, wie in Beispiel 8 beschrieben, gereinigt.

e) Großansatzherstellung der rekombinanten, thermostabilen FEN-1-Proteine

[0700] Die Mja-, Pwo-, Pfu-FEN-1-Proteine wurden durch folgendes Verfahren gereinigt, das aus einem Herstellungsprotokoll einer TaqDNA-Polymerase (Engelke et al., Anal. Biochem., 191: 396 [1990]) stammt wie folgt. E. coli-Zellen (Stamm JM109) mit entweder pTrc99-PFFEN1, pTrc99-PWFEN1 oder pTrc99-MJFEN1 wurden in 3 ml LB (Luria Broth) eingeimpft, das 100 µg/ml Ampicillin enthält und 16 Std. bei 37°C gezüchtet. Die gesamte Übernachtkultur wurde in 250 oder 300 ml LB überimpft, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt und unter kräftigem Schütteln bis zu einer A_{600} von 0,8 gezüchtet. IPTG (1 M Stocklösung) wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt und die Anzucht wurde 16 Std. bei 37°C fortgesetzt.

[0701] Die induzierten Zellen wurden pelletiert und das Zellpellet wurde gewogen. Ein gleichgroßes Volumen 2 × DG-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,1 mM EDTA) wurde zugesetzt und das Pellet wurde durch Schütteln resuspendiert. Fünfzig mg/ml Lysozym (Sigma, St. Louis, MO) wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugefügt und die Zellen wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Desoxycholsäure (10%ige Lösung) wurde tropfenweise bis zu einer Endkonzentration von 0,2% unter Vortexen zugegeben. Ein Volumen H_2O und 1 Volumen 2 × DG-Puffer wurde zugefügt und die entstandene Mischung wurde 2 min auf Eis beschallt, um die Viskosität der Mischung zu verringern. Nach der Beschallung wurde 3 M $(NH_4)_2SO_4$ bis zu einer 0,2 M Endkonzentration zugefügt und das Lysat wurde bei 14000 × g 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und bei 70°C 60 min inkubiert und zu diesem Zeitpunkt wurde 10% Polyethylimin (PEI) bis zu 0,25% zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Mischung bei 14000 × g 20 min bei 4°C zentrifugiert. An diesem Punkt wurde der Überstand entfernt und die FEN-1-Proteine wurden durch Zugabe von $(NH_4)_2SO_4$ folgendermaßen gefällt.

[0702] Für die Pwo und die Pfu-FEN-1-Herstellungen wurde das FEN-1-Protein durch Zugabe von 2 Volumen 3 M $(NH_4)_2SO_4$ gefällt. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 16 Std über Nacht inkubiert und das Protein wurde bei 14000 × g 20 min bei 4°C inkubiert. Das Proteinpellet wurde in 0,5 ml Q-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 0,1% Tween 20) resupendiert. Für die Mja-FEN-1-Herstellung wurde festes $(NH_4)_2SO_4$ bis zu einer Endkonzentration von 3 M (~75% gesättigt) zugegeben, die Mischung wurde dann 30 min auf Eis inkubiert und das Protein abzentrifugiert und wie vorstehend beschrieben resuspendiert.

[0703] Die resuspendierten Proteinpräparationen wurden durch Bestimmung der A_{279} quantifiziert und Aliquots mit 2–4 µg Gesamtprotein wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel (29:1 Acrylamid: Bisacrylamid) in gewöhnlichem Laemmli-Puffer (Laemmli, Nature 277: 680 [1970]) einer Elektrophorese unterworfen und mit Coomassie Brilliant Blue R gefärbt; die Ergebnisse sind in **Fig. 64** gezeigt.

[0704] In **Fig. 64** enthält Spur 1 Molekulargewichtmarker (Proteinmolekulargewichtmarker Mid Range; Promega); die Größe der Markerproteine ist auf der linken Seite des Gels angegeben. Spur 2 enthält gereinigte Cleavase® BN-Nuklease; Spuren 3–5 enthalten aus E. coli hergestellte Extrakte, die Pfu-, Pwo- beziehungsweise Mja-FEN-1-Nukleasen exprimieren, das berechnete Molekulargewicht (d. h. unter Verwendung einer Translation der DNA-Sequenz, die die Nuklease codiert) der Pfu-FEN-1-Nuklease ist 38.714 Dalton und das berechnete Molekulargewicht der Mja-FEN-1-Nuklease ist 37.503 Dalton. Die Pwo- und Pfu-FEN-1-Proteine wandern auf dem SDS-PAGE-Gel zusammen und daher wurde das Molekulargewicht der Pwo-FEN-1-Nuklease auf 38,7 kDa geschätzt.

f) Aktivitätsassays unter Verwendung der FEN-1-Endonukleasen

i) Mixed Hairpin Test

[0705] Die Cleavase® BN-Nuklease hat eine annähernd 60fach größere Affinität für eine Stem-Loopstruktur von 12 Basenpaaren als für eine Stem-Loopstruktur von 8 Basenpaaren. Als Test für Aktivitätsunterschiede zwischen Cleavase® BN-Nuklease und den FEN-1-Nukleasen wurde eine Mischung aus Oligonukleotiden mit entweder einer 8- oder 12 Bp-Stem-Loopstruktur (siehe **Fig. 60**, welche die S-33 und 11-8-0 Oligonukleotide darstellt) mit einem Extrakt, der aus E. coli-Zellen präpariert wurde, inkubiert, welche die Mja-FEN-1-Nuklease (hergestellt wie vorstehend beschrieben) überexprimierten. Die Reaktionen enthielten 0,05 µM Oligonukleotide 5-33 (Seq.-ID Nr. 84) und 11-8-0 (Seq.-ID Nr. 85) (beide Oligonukleotide enthielten 5'-Fluoresceinmarkierungen), 10 mM MOPS, pH 7,5, 0,05% Tween-20, 0,05% NP-40, 1 mM $MnCl_2$. Die Reaktionen wurden 10 Sekunden auf 90°C erhitzt, auf 55°C abgekühlt, dann wurde 1 µl Rohextrakt (Mja-FEN-1) oder gereinigtes Enzym (Cleavase® BN-Nuklease) zugegeben und die Mischung wurde 10 Minuten bei 55°C inkubiert; Eine Kontrolle ohne Enzym wurde ebenso angesetzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Formamid/EDTA gestoppt, die Proben wurden auf einem denaturierenden 20% Polyacrylamidgel einer Elektrophorese unterworfen und

auf einem Hitachi FMBIO 100 Fluoroimager sichtbar gemacht. Das entstandene Bild ist in Fig. 65 gezeigt.

[0706] In Fig. 65 enthält Spur 1 die Reaktionsprodukte, die durch Cleavase® BN-Nuklease erzeugt wurden, Spur 2 enthält die Reaktionsprodukte der Kontrollreaktion ohne Enzym und Spur 3 enthält die Reaktionsprodukte, die durch die Mja-FEN-1-Nuklease erzeugt wurden. Die in Fig. 76 gezeigten Daten veranschaulichten, dass die Cleavase® BN-Nuklease die S33-Struktur (12 Bp Stem-Loop) stark bevorzugt, während die Mja-FEN-1-Nuklease die Strukturen mit entweder 8 oder 12 Bp Stem-Loopstruktur mit annähernd der gleichen Effizienz spaltet. Dies zeigt, dass die Mja-FEN-1-Nuklease eine unterschiedliche Substratspezifität besitzt, als die Cleavase® BN-Nuklease, ein nützliches Merkmal für Invader™-Tests oder CFLP®-Analysen, wie in der Beschreibung der Erfindung diskutiert.

BEISPIEL 29

Terminale Desoxynucleotidyltransferase verlängert selektiv die Produkte der Invader-Directed Cleavage

[0707] Der Großteil der thermischen Abbauprodukte von DNA-Sonden wird ein Phosphat am 3'-Ende haben. Um zu untersuchen, ob die Matrizen-abhängige DNA-Polymerase, die terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) die vorstehend erwähnten 3'-Endphosphate (d. h. Nukleotidtriphosphate an das 3'-Ende anfügen) tailen oder polymerisieren kann, wurde das nachstehende Experiment durchgeführt.

[0708] Um eine Probe mit einem hohen Prozentanteil an thermisch degradierten Produkten zu erzeugen, wurde das 5'-Fluorescein-markierte Oligonukleotid 34-078-01 (Seq.-ID Nr. 86) (200 pmol) in 100 µl 10 mM $NaCO_3$ (pH 10,6), 50 mM NaCl 13 Stunden bei 95°C inkubiert. Um Abdampfen zu vermeiden, wurde die Reaktionsmischung mit 60 µl Flüssigwachs ChillOut™14 überschichtet. Das Reaktionsgemisch wurde dann in zwei gleich große Aliquots (A und B) geteilt. Das Aliquot A wurde mit einem Zehntelvolumen 3 M NaOAc gemischt, gefolgt von drei Volumen Ethanol, und bei –20°C aufbewahrt. Das Aliquot B wurde durch Zugabe von 0,5 µl 1 M $MgCl_2$ und 1 µl Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)(Promega) mit einer Inkubation für 30 Minuten bei 37°C dephosphoryliert. Ein gleich großes Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1) wurde zu der Probe zugegeben, gefolgt von Vortexen für eine Minute und Zentrifugieren für 5 Minuten bei höchster Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge, um die Phasen zu trennen. Die wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen umgefüllt, zu dem ein Zehntelvolumen 3 M NaOAc und drei Volumen Ethanol zugegeben wurden, gefolgt von Lagerung bei –20°C für 30 Minuten. Beide Aliquots (A und B) wurden dann für 10 Minuten bei höchster Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren. Jedes der Pellets wurde dann zweimal mit 80% Ethanol gewaschen und dann bis zur Trockenheit eingedampft. Die getrockneten Pellets wurden dann in je 70 µl ddH_2O gelöst.

[0709] Die TdT-Reaktionen wurden folgendermaßen durchgeführt. Sechs Mischungen wurden zusammengestellt, alle Mischungen enthielten 10 mM TrisORc (pH 7,5), 10 mM MgOAc, 50 mM KCl und 2 mM dATP. Die Gemische 1 und 2 enthielten ein pmol unbehandeltes 34-078-01 (Seq.-ID Nr. 86), Gemische 3 und 4 enthielten 2 µl des Aliquots A (vorstehend), Gemische 5 und 6 enthielten 2 µl des Aliquots B (vorstehend). Zu jedem Gemisch 1,3 und 5 von 9 µl wurde 1 µl ddH_2O zugefügt, zu jedem Gemisch 2, 4 und 6 von 9 µl wurde 1 µl von 20 Units/µl TdT (Promega) zugefügt. Die Mischungen wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert und die Reaktionen durch Zugabe von 5 µl 95% Formamid mit 10 mM EDTA und 0,05% Farbstoffmarker gestoppt. Fünf Mikroliter jeder Mischung wurden durch Elektrophorese auf einem 20% denaturierendem Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3), 1,4 mM EDTA aufgetrennt und unter Verwendung eines FMBIO Image Analyzers mit 505 nm Filter abgebildet. Der entstandene Imagerscan ist in Fig. 66 gezeigt.

[0710] In Fig. 66 enthalten die Spuren 1, 3 und 5 unbehandeltes 34-078-01, (Seq.-ID Nr. 86), hitzedenaturiertes 34-078-01 beziehungsweise hitzedenaturiertes, dephosphoryliertes 34-078-01, das in Abwesenheit von TdT inkubiert wurden. Die Spuren 2, 4 und 6 enthielten unbehandeltes 34-078-01, hitzedenaturiertes 34-078-01, beziehungsweise hitzedenaturiertes, dephosphoryliertes 34-078-01, das in Gegenwart von TdT inkubiert wurden.

[0711] Wie in Fig. 66, Spur 4 gezeigt, war TdT unfähig die thermischen Abbauprodukte, die eine 3'-Endphosphatgruppe enthalten, zu verlängern, und verlängert selektiv Moleküle, die eine 3'-Endhydroxylgruppe besitzen.

BEISPIEL 30

Spezifisches TdT-Tailing der Produkte einer Invader™-directed-cleavage mit anschließendem Einfangen und Nachweis auf Nitrocelluloseträgern

[0712] Wenn TdT verwendet wird, um die spezifischen Produkte der Spaltung zu verlängern, ist ein Mittel zum Nachweis der getailten Produkte, die Extensionsprodukte selektiv auf einem festen Träger vor der Sichtbarmachung aufzufangen. Dieses Beispiel zeigt, dass die Spaltungsprodukte selektiv durch Verwendung der TdT und Desoxynukleotidtriphosphate getailt werden können und dass die getailten Produkte durch Einfangen unter Verwendung eines komplementären Oligonukleotids, das an einen Nitrocelluloseträger gebunden ist, sichtbar gemacht werden können.

[0713] Um das Spaltungsprodukt, hergestellt in einer Invader™-directed-cleavage-Reaktion zu verlängern, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Drei Reaktionsmischungen wurden zusammengestellt, jede in einem Puffer von 10 mM MES (pH 6,5), 0,5% Tween-20, 0,5% NP-40. Das erste Gemisch enthielt 5 fmol der Ziel-DNA M13mp18, 10 pmol Sondenoligo 32-161-2 (Seq.-ID Nr. 87; dieses Sondenoligonukleotid enthielt 3'-ddC und eine Cy3-Amiditgruppe in der Nähe des 3'-Endes), und 5 pmol des Invader™-Oligonukleotids 32-161-1 (Seq.-ID Nr. 88; dieses Oligo enthält ein 3'-ddC). Das zweite Gemisch enthielt die Sonde und Invader™-Oligonukleotide ohne Ziel-DNA. Das dritte Gemisch war das gleiche wie das erste Gemisch und enthielt die gleiche Sondensequenz, aber mit einer 5'-Fluoresceinmarkierung (Oligo 32-161-4 [Seq.-ID Nr. 89]; dieses Oligo enthielt 3'-ddC, 5'-Fluoresceinmarkierung und eine Cy3-Farbstoffgruppe in der Nähe des 3'-Endes), so dass die Invader™-directed-cleavage-Produkte nach und vor der Spaltung durch Fluoreszenzimaging nachgewiesen werden konnten. Die Kontrollprobe mit Sonde allein enthielt 10 pmol des Oligos 32-161-2 (Seq.-ID Nr. 87). Jede 3 µl des Enzymgemischs enthielten 5 ng der Cleavase® DN-Nuklease in 7,5 mM $MgCl_2$. Die TdT-Mischung (je 4 µl): 10 U TdT (Promega), 1 mM $CoCl_2$, 50 mM KCl und 100 µM von dTTP. Die vorstehend beschriebenen Invaders™-cleavage-Reaktionsmischungen würden in dünnwandigen Röhrchen zusammengestellt und die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 µl des Cleavase® DN-Enzymgemischs gestartet. Die Reaktionen wurden 20 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf 37°C wurden 4 µl des TdT-Gemischs zugegeben und die Proben wurden 4 min bei 37°C inkubiert, dann wurde Biotin-16-UTP bis zu 100 µM zugegeben und die Proben wurden 50 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

[0714] Um die Wirksamkeit des Tailings zu untersuchen, wurden die Produkte auf einem Acrylamidgel laufen gelassen. Vier Mikroliter jeder Reaktionsmischung wurden mit 2,6 µl 95% Formamid, 10 mM EDTA und 0,05% Methylviolett gemischt, 1 min auf 90°C erhitzt und 3 µl wurden auf ein 20% denaturierendes Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff, in Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3), 1,4 mM EDTA geladen. Ein Marker (ΦX174-HinfI [Fluorescein-markiert]) wurde ebenso geladen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter Verwendung eines FMBIO-100 Image Analyzer (Hitachi), der ausgestattet mit einem 505 nm Filter war, analysiert. Der entstandene Scan ist in **Fig. 67** gezeigt.

[0715] In **Fig. 67** enthielt Spur 1 nur die Sonde 32-161-2, ohne irgendeine Behandlung. Die Spuren 2 und 3 enthielten die Reaktionsprodukte, die ohne Ziel-DNA liefen, mit beziehungsweise ohne nachfolgendes TdT-Tailing. Die Spuren 4 und 5 enthielten die Reaktionsprodukte, die mit Ziel-DNA, Sondenoligo 32-161-2 (Seq.-ID Nr. 87) und Invader™-Oligo 32-161-1 (Seq.-ID Nr. 88) liefen, ohne beziehungsweise mit anschließendem TdT-Tailing. Die Spuren 6 und 7 zeigen die Reaktionsprodukte mit Ziel-DNA, Sondenoligo 32-161-4 (Seq.-ID Nr. 89) und Invader™-Oligo 32-161-1 (Seq.-ID Nr. 88), mit beziehungsweise ohne anschließendes TdT Tailing. Spur M enthält den Marker ΦX174-HinfI.

[0716] Die Reaktionsprodukte in den Spuren 4 und 5 sind die gleichen, wie solche, die in den Spuren 6 und 7 gesehen wurden, mit der Ausnahme, dass das Fehlen eines 5'-Fluoresceins an der Sonde den Nachweis des freigesetzten 5'-Produkts verhindert (als "A" in der Nähe der unteren Seite des Gels angezeigt) oder des TdT verlängerten 5'-Produkts (als "B" in der Nähe der oberen Seite des Gels angezeigt). Die Cy3-markierten 3'-Teile der gespaltenen Sonde ist sichtbar in all diesen Reaktionen (Als "C" knapp unter der Gelmitte angezeigt).

[0717] Um den Nachweis der zielabhängigen Invader™-directed-cleavage-Produkte auf einem festen Träger zu demonstrieren, wurden die Reaktionen der Spuren 3 und 5 auf dem Universal Genecomb® (Bio-Rad) getestet, das eine herkömmliche Nitrocellulosematrix auf einem starren Nylonrückgrat ist, das in Kammform konstruiert ist, wie in **Fig. 68** dargestellt. Die Herstelleranweisungen wurden mit einer Modifikation befolgt: es wurden 10 µl der Invader™-directed-cleavage-Reaktionen anstatt der geforderten 10% der PCR verwendet. Um

die Spaltungsprodukte einzufangen, wurden 2,5 pmol des eingefangenen Oligos 59-28-1 (Seq.-ID Nr. 90) auf jeden Zahn getupft. Die Einfang- und Sichtbarmachungsschritte wurden gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Fig. 68 gezeigt.

[0718] In Fig. 68 zeigen die 6 und 7 nummerierten Zähne die Einfangergebnisse der durchgeführten Reaktionen mit und ohne anwesende Ziel-DNA. Zahn 8 zeigt die Kit-positive Kontrolle.

[0719] Die Dunkelheit des beobachteten Tupfens auf Zahn 7, wenn er mit Zahn 6 verglichen wurde, gibt eindeutig zu erkennen, dass die Produkte der Invader™-directed-cleavage-Tests spezifisch auf festen Trägern nachgewiesen werden können. Während der Universal Genecomb® verwendet wurde, um in diesem Fall das Einfangen mit festen Trägern aufzuzeigen, wären andere dem Fachmann bekannte Trägerfangverfahren gleichermaßen geeignet. Zum Beispiel können Kugeln oder die Oberflächen von Reaktionsgefäßen einfach mit Fangoligonukleotiden beschichtet werden, so dass sie in diesem Schritt verwendet werden können. Ersatzweise können ähnliche feste Träger einfach mit Streptavidin oder Antikörpern für das Einfangen der Biotin- oder Hapten-markierten Produkte der Spaltungs-/Tailing-Reaktion beschichtet werden. In jeder dieser Ausführungsformen können die Produkte zutreffend sichtbar gemacht werden, durch Nachweisen der entstandenen Fluoreszenz, der Chemilumineszenz, der colorimetrischen Veränderungen, der radioaktiven Emissionen, der Veränderungen der optischen Dichte oder jeden anderen unterscheidenden Merkmals des Produkts.

BEISPIEL 31

Vergleich des Einflusses der Invasionslänge und der 5'-Markierung der Sonde auf die Invader™-directed-cleavage durch die Cleavase® A/G und Pfu-FEN-1-Nukleasen

[0720] Um die Wirkung der Invasionslänge ebenso wie die Wirkung des Farbstofftyps auf die Fähigkeit der Pfu-FEN-1- und der Cleavase® A/G-Nuklease zu untersuchen, 5'-Arme zu spalten, wurden die folgenden Experimente durchgeführt. Drei Sonden ähnlicher Sequenzen, entweder mit Fluorescein, TET oder Cy3 markiert, wurden in Reaktionen mit drei Invader™-Oligonukleotiden vereint, die überlappende Zielhybridisierungsregionen von acht, fünf und drei Basen entlang der Zielnukleinsäure, M13mp18 bildeten.

[0721] Die Reaktionen wurden folgendermaßen durchgeführt. Alle Bedingungen wurden zweifach durchgeführt. Die Enzymgemische für Pfu-FEN-1- und Cleavase® A/G-Nuklease wurden vereint. Jede 2 µl des Pfu-FEN-1-Gemischs enthielt 100 ng Pfu-FEN-1 (hergestellt wie in Beispiel 28 beschrieben) und 7,5 mg $MgCl_2$. Jede 2 µl des Cleavase® A/G-Gemischs enthielt 5,3 ng der Cleavase® A/G-Nuklease und 4,0 mM $MnCl_2$. Sechs Grundmischungen mit Puffer, M13mp18 und Invader™-Oligonukleotiden wurden vereint. Jede 7 µl der Gemische 1–3 enthielten 1 fmol M13mp18, 10 pmol Invader™-Oligonukleotide (34-078-4 [Seq.-ID Nr. 39], 24-181-2 [Seq.-ID Nr. 91] oder 24-181-1 [Seq.-ID Nr. 92]) in 10 mM MOPS (pH 7,5), 150 mM LiCl. Jede 7 µl der Gemische 4–6 enthielten 1 fmol M13mp18, 10 pmol Invader™-Oligonukleotide (34-078-4 [Seq.-ID Nr. 39], 24-181-2 [Seq.-ID Nr. 91] oder 24-181-1 [Seq.-ID Nr. 92]) in 10 mM Tris (pH 8,0). Die Gemische 1–6 wurden dann in je drei Mischungen aufgeteilt, zu der entweder die Flourescein-markierte Sonde (Oligo 34-078-01, Seq.-ID Nr. 86), die Cy3-markierte Sonde (Oligo 43-20, Seq.-ID Nr. 93) oder die TET-markierte Sonde (Oligo 90; Seq.-ID Nr. 32, mit einer 5'-TET-Markierung) zugeben wurde. Jede 7 µl aller Gemische enthielten 10 pmol der entsprechenden Sonde. Die vorstehend beschriebenen DNA-Lösungen wurden mit 10 µl ChillOut®-Verdampfungssperrschicht überschichtet und auf 68°C erhitzt.

[0722] Die aus den Mischungen 1–3 hergestellten Reaktionen wurden mit 2 µl Cleavase® A/G-Nukleasegemisch gestartet. Nach 30 Minuten bei 68°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 10 mM EDTA und 0,05% Farbstoffmarker gestoppt. Die Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese auf einem 20% denaturierenden Gel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3), 1,4 mM EDTA, 1 Minute auf 90°C erhitzt. Die Produkte der Spaltungsreaktionen wurden im Anschluss an die Elektrophorese durch Verwendung eines Hitachi FMBIO Fluoreszenzimagers sichtbar gemacht. Die Ergebnisse der Florescein-markierten Sonde sind in Fig. 69 gezeigt, die Ergebnisse der Cy3-markierten Sonde in Fig. 70 und die Ergebnisse der TET-markierten Sonde in Fig. 71. In jeder dieser Figuren sind die Produkte der Spaltung durch Cleavase® A/G in den Spuren 1–6 gezeigt und die Produkte der Spaltung durch Pfu-FEN-1 sind in den Spuren 7–12 gezeigt. In jedem dieser Fälle erscheint das ungespaltene Material als eine sehr dunkle Bande in der Nähe des oberen Teils des Gels, als "U" auf der linken Seite angegeben. Die Produkte der durch Invader™-Oligonukleotide gerichteten Spaltung mit 8, 5 oder 3 überlappenden Basen (d. h. die "X"-Region war 8, 5 oder 3 nt lang) sind in dem ersten, zweiten beziehungsweise dritten Paar von Spuren in jedem Satz gezeigt und die freigesetzten, markierten 5'-Enden dieser Reaktionen sind durch die Zahlen 8, 5 und 3 auf der linken Seite angegeben. Beachte, dass bei den in Fig. 70 gezeigten Spaltungsreaktionen die Anwe-

senheit des positiv geladenen Cy3-Farbstoffs die kürzeren Produkte dazu veranlasst langsamer zu wandern, als die längeren Produkte. Diese Produkte enthalten keine zusätzlichen positiven Ladungen (z. B. Aminomodifikationen, wie in Beispiel 23 verwendet) und tragen folglich eine negative Nettoladung und wandern bei einem gewöhnlichen Elektrophoreselauf zur positiven Elektrode.

[0723] Es ist aus diesen Daten ersichtlich, dass die strukturspezifischen Cleavase® A/G- und Pfu-FEN-1-Nukleasen unterschiedlich auf die Farbstoffkennzeichen und auf die Größe des zu spaltenden Stückes von der Sonde reagieren. Die Pfu-FEN-1-Nuklease zeigte wesentlich weniger Schwankungen als Antwort auf die Farbstoffkennzeichen als es die Cleavase® A/G-Nuklease tat, womit gezeigt ist, dass jeder Farbstoff für die Verwendung mit diesem Enzym geeignet ist. Dagegen schwankte das Ausmaß der durch Cleavase® A/G-Nuklease katalysierten Spaltung im Wesentlichen wegen der Farbstoffkennzeichen. Die Verwendung des Fluoresceinfarbstoffs ergab Ergebnisse ähnlich denen, die mit der Pfu-FEN-1-Nuklease beobachtet wurden, während die Verwendung von Cy3 oder TET ein dramatisch geringeres Signal im Vergleich zu den Pfu-FEN-1-Reaktionen ergab. Die einzige Ausnahme dazu war die Spaltung eines 3 nt-Produkts, das einen TET-Farbstoff trägt (Spuren 5 und 6, **Fig. 71**), in der die Cleavase® A/G-Nuklease die gleiche Spaltungsrate wie die Pfu-FEN-1-Nuklease ergab. Diese Daten geben an, dass die Pfu-FEN-1-Nuklease eine bevorzugte Nuklease zur Spaltung von Cy3- und TET-markierten Sonden ist, während die Cleavase® A/G-Nuklease verwendet werden kann, um die, mit diesen anderen Farbstoffen markierten, Sonden zu spalten.

BEISPIEL 32

Untersuchung der Einflüsse einer positiven 5'-Ladung auf die Geschwindigkeit der invasiven Spaltung unter Verwendung der Cleavase® A/G- oder Pfu-FEN-1-Nukleasen

[0724] Um zu untersuchen, ob die positiven Ladungen am 5'-Ende der Sondenoligonukleotide mit positiv geladenen Addukt(en) (d. h. Charge-Reversal-Technology oder CRT-Sonden, wie in Bsp. 23 und 24 beschrieben) einen Einfluss auf die Fähigkeit der Cleavase® A/G- oder Pfu-FEN-1-Nukleasen haben, den 5'-Arm der Sonde zu spalten, wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

[0725] Zwei Sondenoligonukleotide mit folgenden Sequenzen wurden in Invader™-Reaktionen verwendet: Sonde 34-180-1: (N-Cy3) $T_{NH2}T_{NH2}$CCAGAGCCTAATTTGCC AGT(N-Fluorescein)A, wobei N einen Spacer mit entweder einer Cy3 oder Fluoresceingruppe (Seq.-ID Nr. 94) darstellt und Sonde 34-180-2: 5'-(N-TET)TTCCAGAGCC TAATTTGCCAGT-(N-Flourescein)A, wobei N einen Spacer mit entweder TET oder Fluoresceingruppe (Seq.-ID Nr. 95) darstellt. Die Sonde 34-180-1 hat Aminomodifikatoren an den zwei 5'-T-Endresten und eine Cy3-Markierung am 5'-Ende, die zusätzliche positive Ladungen am 5'-Ende erzeugen. Die Sonde 34-180-2 hat eine TET-Markierung am 5'-Ende ohne zusätzliche positive Ladungen. Die Fluoresceinmarkierung am 3'-Ende der Sonde 34-180-1 ermöglicht die Sichtbarmachung der 3'-gespaltenen Produkte und ungespaltener Sonden zusammen auf einem Acrylamidgellauf in die gewöhnliche Richtung (d. h. mit der DNA-Wanderung zur positiven Elektrode). Das 5'-gespaltene Produkt der Sonde 34-180-1 hat eine positive Nettoladung und wird nicht in dieselbe Richtung wie die ungespaltene Sonde wandern und wird folglich bei der Auflösung auf einem Gellauf in der entgegengesetzten Richtung sichtbar gemacht (d. h., dass diese DNA zur negativen Elektrode wandert).

[0726] Die Spaltungsreaktionen wurden folgendermaßen ausgeführt. Alle Bedingungen wurden zweifach durchgeführt. Jede 2 µl des Pfu-FEN-1-Gemischs enthielt 100 ng Pfu-FEN-1 (hergestellt wie in Beispiel 28 beschrieben) und 7,5 mg $MgCl_2$. Jede 2 µl des Cleavase® A/G-Gemischs enthielt 26,5 ng der Cleavase® A/G-Nuklease und 4,0 mM $MnCl_2$. Vier Grundmischungen mit Puffer, M13mp18 und Invader™-Oligonukleotiden wurden vereint. Jede 7 µl des Gemischs 1 enthielten 5 fmol M13mp18, 10 pmol Invader™-Oligonukleotide 123 (Seq.-ID Nr. 96) in 10 mM HEPES (pH 7,2). Jede 7 µl des Gemischs 2 enthielten 1 fmol M13mp18, 10 pmol Invader™-Oligonukleotide 123 in 10 mM HEPES (pH 7,2). Jede 7 µl des Gemischs 3 enthielten 5 fmol M13mp18, 10 pmol Invader™-Oligonukleotide 123 in 10 mM HEPES (pH 7,2), 250 mM KGlu. Jede 7 µl des Gemischs 4 enthielten 1 fmol M13mp18, 10 pmol Invader™-Oligonukleotide 123 in 10 mM HEPES (pH 7,2), 250 mM KGlu. Zu jeden 7 µl jeder Mischung wurden 10 pmol entweder von Sonde 34-180-1 (Seq.-ID Nr. 94) oder Sonde 34-180-2 (Seq.-ID Nr. 95) zugegeben. Die vorstehend beschriebenen DNA-Lösungen wurden mit 10 µl ChillOut®-Verdampfungssperrschicht überschichtet und auf 65°C erhitzt. Die aus den Gemischen 1–2 hergestellten Reaktionen wurden durch Zugabe von 2 µl Pfu-FEN-1-Gemisch gestartet und die aus den Mischungen 3–4 hergestellten Reaktionen wurden durch Zugabe von 2 µl Cleavase® A/G-Nuklease-Gemisch gestartet. Nach 30 Minuten bei 65°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 10 mM EDTA gestoppt. Die Proben wurden 1 Minute auf 90°C erhitzt, unmittelbar vor der Elektrophorese auf einem 20% denaturierenden Gel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3), 1,4 mM EDTA, und auf einem 20% nativen Acrylamidgel (29:1 quervernetzt) in einem Puffer mit 45 mM Tris-Bo-

rat (pH 8,3), 1,4 mM EDTA.

[0727] Die Produkte der Spaltungsreaktionen wurden im Anschluss an die Elektrophorese durch Verwendung eines Hitachi FMBIO Fluoreszenzimagers sichtbar gemacht. Die entstandenen Ergebnisse sind in **Fig.** 72A gezeigt. 72A zeigt das denaturierende Gel, das in die gewöhnliche Richtung laufengelassen wurde und **Fig.** 72B zeigt das native Gel, das in die entgegengesetze Richtung laufengelassen wurde. Die Reaktionsprodukte, die durch Pfu-FEN-1- und Cleavase® A/G-Nukleasen gebildet wurden, sind in den Spuren 1–8 beziehungsweise 9–16 gezeigt. Die Produkte der Reaktionen mit 5 fmol M13mp18 und 1 fmol M13mp18 sind in den Spuren 1–4, 9–12 (5 fmol) und 5–8, 13–16 (1 fmol) gezeigt. Die Sonde 34-180-1 ist in den Spuren 1–2, 5–6, 9–10, 13–14 und die Sonde 34-180-2 ist in den Spuren 3–4, 7–8, 11–12, 15–16.

[0728] Die Fluorescein-markierten 3'-Endfragmente aus allen Spaltungsreaktionen sind in **Fig.** 72A gezeigt, durch einen Hinweis "3" an der linken Seite angezeigt. Die 5'-TET-markierten 3 nt-Produkte sind in dieser Figur nicht sichtbar, während die 5'-Cy3-markierten Produkte in **Fig.** 72B gezeigt sind.

[0729] Die 3'-Endbanden in **Fig.** 72A können verwendet werden, um die Spaltungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Enzyme in Anwesenheit der verschiedenen 5'-Endmarkierungen zu vergleichen. Es ist aus diesen Banden ersichtlich, dass ungeachtet der Menge der anwesenden Zielnukleinsäure, sowohl die Pfu-FEN-1-Nuklease als auch die Cleavase® A/G-Nuklease mehr Produkt von der 5'-TET-markierten Sonde zeigen. Bei der Pfu-FEN-1-Nuklease ist diese Vorliebe gemäßigt, mit nur einem 25 bis 40% Anstieg des Signals. Im Fall der Cleavase® A/G-Nuklease jedoch gibt es eine starke Vorliebe für die 5'-TET-Markierung. Daher wird, auch wenn ein Charge-Reversal-Verfahren verwendet wird, um die Produkte aufzutrennen, eine beträchtliche Menge an Produkt aus den von Cleavase® A/G-Nuklease katalysierten Reaktionen festgestellt, die Pfu-FEN-1-Nuklease ist ein bevorzugtes Enzym zur Spaltung von Cy3-markierten Sonden.

BEISPIEL 33

Die Verwendung universeller Basen beim Nachweis von Mismatch-DNA durch Invader™-directed-cleavage

[0730] Der Begriff "degenerierte Base" bezieht sich auf eine Base an einem Nukleotid, das keine Wasserstoffbindung auf herkömmliche "Watson-Crick"-Weise zu einem spezifischen Basengegenstück eingeht (d. h. A an T, G an C). Die Inosinbase zum Beispiel kann über ein oder zwei Wasserstoffbindungen mit allen natürlichen Basen paaren (der "Wobble"-Effekt) und wird folglich als degeneriert bezeichnet. Ersatzweise kann eine degenerierte Base überhaupt nicht paaren; diese Art von Basen ist als eine "universale" Base bezeichnet worden, weil sie gegenüber von jedem Nukleotid in einer Duplex-DNA platziert werden kann und, während sie nicht durch Basenpaarung zur Stabilität beitragen kann, destabilisiert sie nicht aktiv durch Verdrängen der gegenüberliegenden Base. Die Duplex-Bereiche, die diese universalen Basen verwenden, werden nur durch Stapelwechselwirkungen stabilisiert. Zwei Beispiele für universale Basen, 3-Nitropyrrol und 5-Nitroindol, sind in Fig. 73 gezeigt. Bei einer Hybridisierung steigert die Platzierung eines 3-Nitropyrrols, 3 Basen von einer Mismatchposition, die unterschiedliche Erkennung von einem Einbasenmismatch. Die unterschiedliche Unterscheidung scheint von dem destabilisierenden Einfluss der unnatürlichen Base (d. h ein verändertes T_m in naher Nachbarschaft zum Mismatch) zu kommen. Um dieses gleiche Prinzip als einen Weg zum empfindlichen Nachweis von Mismatches unter Verwendung des Invader™-directed-cleavage-Tests in An- oder Abwesenheit eines natürlichen Mismatchs zu testen, wurden Invader™-Oligonukleotide unter Verwendung der universalen, in Fig. 73 gezeigten Basen entworfen. In diesen Experimenten wurde die Verwendung einzelner Nitropyrrolbasen oder Paare von Nitroindolbasen, welche die Seiten von Mismatches flankieren, geprüft.

[0731] Die Ziel-DNA, Sonde und Invader™-Oligonukleotide in diesen Tests sind in Fig. 74 gezeigt. Ein 43 Nukleotid-Oligonukleotid (Oligo 109; Seq.-ID Nr. 97) wurde als Ziel-DNA verwendet. Das Sondenoligonukleotid (Oligo 61; Seq.-ID Nr. 50) setzt ein positiv nettogeladenes Produkt bei der Spaltung frei. In Fig. 74 ist das Invader™-Oligonukleotid schematisch über dem Zieloligonukleotid als Pfeil gezeigt, der große Pfeil gibt den Ort des Mismatchs zwischen den Invader™-Oligos und dem Zieloligo an. Unter dem Zieloligonukleotid sind das vollständig komplementäre, komplett natürliche (d. h. ohne universale Basen) Invader™-Oligo (Oligo 67; Seq.-ID Nr. 51) und ein Verbund von Invader™-Oligos mit universalen Basen "X" auf jeder Seite des Mismatchs ("M") gezeigt. Die nachstehenden Invader™-Oligos wurden eingesetzt: Oligo 114 (Seq.-ID Nr. 98), das einen einzelnen nt-Mismatch enthält, Oligo 115 (Seq.-ID Nr. 99), das zwei 5-Nitroindolbasen und keinen Mismatch enthält; Oligo 116 (Seq.-ID Nr. 100), das zwei 5-Nitroindolbasen und einen Einzel-nt-Mismatch enthält; Oligo 112 (Seq.-ID Nr. 101), das eine 3-Nitropyrrolbase und keinen Mismatch enthält; Oligo 113 (Seq.-ID Nr. 102) das ein 5-Nitropyrrol und einen einzelnen nt-Mismatch enthält; und Oligo 67 (Seq.-ID Nr. 51), das vollständig komplementär zum Zieloligo ist.

[0732] Die Invader™-directed-cleavage-Reaktionen wurden in 10 µl 10 mM MOPS (pH 7,2), 100 mM KCl, mit 1 µM des entsprechenden Invaderoligonukleotids (Oligos 67, 112-116), 10 nM synthetisches Zieloligo 109, 1 µM Cy3-markierte Sonde 61 und 2 Units der Cleavase® DV (wie in Bsp. 27 hergestellt). Die Reaktionen wurden mit ChillOut®-Flüssigwachs überschichtet, auf die geeignete Temperatur, 52°C, 55°C oder 58°C gebracht und durch Zugabe von 1 µl 40 mM $MnCl_2$ gestartet. Die Reaktionen durften 1 Stunde fortfahren und wurden durch Zugabe von 10 µl Formamid gestoppt. Ein Viertel des Gesamtvolumens jeder Reaktion wurde auf 20% nicht-denaturierende Polyacrylamidgele geladen, mit denen eine Elektrophorese in umgekehrter Richtung durchgeführt wurde. Die Produkte wurden sichtbar gemacht unter Verwendung eines Hitachi FMBIO-100 Fluoreszenzscanners, der einen 585 nm-Filter verwendet. Die entstandenen Bilder sind in den **Fig.** 75A–C gezeigt. In jedem Panel enthalten die Spuren 1–6 Reaktionsprodukte von Reaktionen, die Invader™-Oligo 67, 114, 115, 116, 112 beziehungsweise 113 verwenden. Die Reaktionen, die bei 52°C, 55°C und 58°C abliefen, sind in den Panels A, B beziehungsweise C gezeigt.

[0733] Diese Daten zeigen, dass zwei flankierende 5-Nitroindole eine deutlich größere Unterscheidung zeigen, als es das eine 3-Nitropyrrolsystem tut und diese gesteigerte Empfindlichkeit ist nicht temperaturabhängig. Dies zeigt, dass die Verwendung universaler Basen ein nützliches Mittel zum empfindlichen Nachweis von Einzelbasen-Mismatchen zwischen der Zielnukleinsäure und dem Komplex der erfindungsgemäßen Nachweisoligonukleotide ist.

BEISPIEL 34

Nachweis von Punktmutationen im humanen Ras-Onkogen unter Verwendung einer Minisonde

[0734] Es wird hierin gezeigt, dass sehr kurze Sonden für den empfindlichen Nachweis von Zielnukleinsäuresequenzen verwendet werden können (Bsp. 37). In diesem Beispiel wird gezeigt, dass die kurzen Sonden sehr schlecht funktionieren wenn sie nur an die Ziel-DNA fehlangepasst sind und sie folglich verwendet werden können, um eine gegebene Nukleinsäuresequenz von einer nahverwandten mit nur einer einzigen Base Unterschied zu unterschieden. Um dieses System zu testen, wurden synthetische Zielsequenzen mit dem humanen Ras-Onkogen hergestellt, die sich von jeder anderen in einer Position unterschieden. Das Oligonukleotid 166 (Seq.-ID Nr. 103) stellte die Wildtyp Ras-Zielsequenz bereit. Oligonukleotid 165 (Seq.-ID Nr. 104) stellte die mutante Ras-Zielsequenz bereit. Die Sequenzen dieser Oligonukleotide sind in **Fig. 76** gezeigt und die Stelle der Sequenzveränderung an der Stelle, die Codon 13 des Ras-Gens entspricht, ist angezeigt. Das Invader™-Oligonukleotid (Oligo 162) hat die Sequenz: 5'-$G_SC_ST_SC_SA_SA_SG_SG_SC_S$ACTCTTGCC TACGA-3' (Seq.-ID Nr. 105) worin das "S" Thiolverknüpfungen anzeigt (d. h. diese sind 2'-Desoxynukleotid-5'-O-(1-thiomonophate)). Die Minisonde (Oligo 161) hat die Sequenz: 5'-(N-Cy3)$T_{NH2}T_{NH2}$CACCAG-3' (Seq.-ID Nr. 106) und ist entworfen um die mutante Ras-Zielsequenz nachzuweisen (d. h. sie ist vollständig komplementär zu Oligo 165). Das Stacker-Oligonukleotid (Oligo 164) hat die Sequenz: 5'-$C_ST_SC_SC_SA_SA_SC_S$ T_SA_SCCACAAGTT-TATATTCAG-3' (Seq.-ID Nr. 107). Ein Schema, das den Zusammentritt dieser Oligonukleotide in einer Spaltungsstruktur zeigt, ist in **Fig. 76** aufgezeigt.

[0735] Jede Spaltungsreaktion enthielt 100 nM sowohl des Invading- (Oligo 162) als auch des Stacking- (Oligo 164) Oligonukleotids, 10 µM Cy3-markierte Sonde (Oligo 161) 100 pmol von entweder Oligo 165 oder Oligo 166 (Ziel-DNA) in 10 µl 10 mM HEPES (pH 7,2), 200 mM KGlu, 4 mM $MnCl_2$. Die DNA-Mischungen wurden mit Mineralöl überschichtet, 15 sec auf 90°C erhitzt, dann auf eine Reaktionstemperatur von 47°C, 50°C, 53°C oder 56°C gebracht. Die Reaktion wurden durch Zugabe von 1 µl 100 ng/µl Pfu-FEN-1 gestartet. Die Reaktionen durften drei Stunden fortfahren und stoppten durch die Zugabe von 10 µl Formamid. Ein Viertel des Gesamtvolumens jeder Reaktion wurde auf 20% nicht-denaturierende Polyacrylamidgele geladen, mit denen eine Elektrophorese in umgekehrter Richtung durchgeführt wurde. Das Gel wurde unter Verwendung eines Hitachi FMBIO-100-Fluoreszenzscanners, ausgerüstet mit einem 585 nm-Filter, gescannt und das entstandene Bild ist in **Fig. 77** gezeigt.

[0736] In **Fig. 77** sind die Reaktionsprodukte für jede getestete Reaktionstemperatur, die entweder die mutante Ras-Zielsequenz (Oligo 165) oder den Wildtyp (Oligo 166) enthalten, gezeigt.

[0737] Diese Daten veranschaulichen, dass die Minisonde verwendet werden kann, um empfindlich zwischen Sequenzen zu unterscheiden, die sich in einem einzigen Nukleotid unterscheiden. Die Minisonde wurde gespalten, um ein starkes Signal in Anwesenheit der mutanten Zielsequenz zu erzeugen, aber es wurde nur wenig oder keine Minisonde in Gegenwart der Wildtyp-Zielsequenz gespalten. Weiter ist die Unterscheidung zwischen nah verwandten Zielnukleinsäuren über einen Temperaturbereich von mindestens 10°C wirksam, der ein wesentlich größerer Temperaturbereich ist, als er gewöhnlich akzeptiert werden kann, wenn die Selektion

allein auf Hybridisierung beruht (d. h. Hybridisierung mit ASOs). Dies legt nah, dass das Enzym ein Faktor bei der Unterscheidung sein kann, mit der perfekt passenden Minisonde als bevorzugtes Substrat im Vergleich zur fehlangepassten Minisonde. Folglich stellt dieses System einen empfindlichen und spezifischen Nachweis von Ziel-DNA-Sequenzen bereit.

BEISPIEL 35

Einflüsse der 3'-Identität auf die Spaltstelle einer Oligonukleotidmodellstruktur

[0738] Wie im vorstehenden Beispiel beschrieben, spalten die strukturspezifischen Nukleasen in der Nähe der Verbindung zwischen einzelsträngiger und basengepaarter Region in einer gegabelten Duplex-DNA, gewöhnlich etwa eine Base innerhalb der basengepaarten Region. Es wurde in Beispiel 10 gezeigt, dass thermostabile 5'-Nukleasen, einschließlich solcher der vorliegenden Erfindung (z. B. Cleavase® BN-Nuklease, Cleavase® A/G-Nuklease) die Fähigkeit besitzen nach einem größeren Abstand innerhalb der basengepaarten Region zu spalten, wenn ein Stromaufwärts-Oligonukleotid mit einer 3'-Region, die homolog zur 5'-Region der Testduplex-DNA ist, bereitgestellt wurde, wie in **Fig. 26** gezeigt. Es ist auch bestimmt worden, dass das 3'-terminale Nukleotid des Invader™-Oligonukleotids ungepaart an der Zielnukleinsäure sein kann und noch immer die Spaltung die gleiche Distanz in die Stromabwärts-Duplexregion verschiebt, als wenn es gepaart wäre. Es wird in diesem Beispiel gezeigt, dass der Basenteil des Nukleotids, nicht der Zucker oder das Phosphat, notwendig ist, um die Spaltung zu verschieben.

[0739] **Fig.** 78A und B zeigen ein synthetisches Oligonukleotid, das entworfen wurde, sich auf sich selbst zu falten und das aus nachstehender Sequenz besteht: 5'-GTTCTCTGCTCTCTGGTC GCTGTCTCGCTTGTG-AAACAAGCGAGACAGCGTGGTCTCTCG-3' (Seq.-ID Nr. 29). Dieses Oligonukleotid wird als "S-60-Hairpin" erwähnt. Der 15-Basenpaar-Hairpin, der durch dieses Oligonukleotid gebildet wird, wird zusätzlich durch eine "Triloop"-Sequenz am Loopende stabilisiert (d. h. drei Nukleotide bilden den Loopanteil des Hairpins) (Hiraro et al., Nucleic Acids Res., 22 (4): 576 [1994]), **Fig.** 78B zeigt die Sequenz des P-15-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 30) und den Ort der Komplementärregion, die von den P-15- und S-60-Oligonukleotiden geteilt wird. Zusätzlich zu den gezeigten P-15-Oligonukleotiden wurde die Spaltung in Anwesenheit des P-14-Oligonukleotids (Seq.-ID Nr. 108)(P-14 ist um eine Base am 3'-Ende kürzer im Vergleich zu P-15), des P-14 mit einem unbasischen Zucker (P-14d; Seq.-ID Nr. 109) und des P-14 mit einem unbasischen Zucker mit einem 3'-Phosphat (P-14dp; Seq.-ID Nr. 110) getestet. Ein P-15-Oligo mit einem 3'-Phosphat P-15p (Seq.-ID Nr. 111) wurde ebenfalls getestet. Die schwarzen in **Fig. 78** gezeigten Pfeile geben die Spaltstellen des S-60-Hairpins in Abwesenheit (obere Struktur; A) oder Anwesenheit (untere Struktur; B) des P-15-Oligonukleotids an.

[0740] Das S-60-Hairpinmolekül wurde an seinem 5'-Ende mit Fluorescein für den anschließenden Nachweis markiert. Der S-60-Hairpin wurde in Anwesenheit der thermostabilen 5'-Nuklease in Anwesenheit oder Abwesenheit des P-15-Oligonukleotids inkubiert. Die Anwesenheit der vollständigen Duplexstruktur, die durch den S-60-Hairpin gebildet werden kann, ist durch die Spaltung mit der Cleavase® BN-5'-Nuklease in einer primerunabhängigen Weise (d. h. in Abwesenheit des P-15-Oligonukleotids) gezeigt. Die Freisetzung der 18- und 19-Nukleotidfragmente vom 5'-Ende des S-60-Hairpinmoleküls zeigt, dass die Spaltung in der Nähe der Verbindung zwischen einzel- und doppelsträngigen Regionen auftrat, wenn nichts an den 3'-Arm des S-60-Hairpins hybridisierte (**Fig. 27**, Spur 2).

[0741] Die in **Fig.** 78C gezeigten Reaktionen wurden in 10 µl 1 × CFLP-Puffer mit 1 mM $MnCl_2$ und 50 mM K-Glutamat, in Anwesenheit von 0,02 µM S-60, 0,5 µM Invader™-Oligonukleotid und 0,01 ng pro µl Cleavase® BN-Nuklease durchgeführt. Die Reaktionen wurden 5 Minuten bei 40°C inkubiert und durch Zugabe von 8 µl Stopppuffer (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,02% Methylviolett) gestoppt. Die Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese auf einem 15% Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer von 45 mM Tris-Borat, pH 8,3, 1,4 mM EDTA, 2 min auf 75°C erhitzt. Die Gele wurden dann analysiert mit einem FM-BIO Image Analyzer (Hitachi), ausgestattet mit einem 505 nm Filter. Das entstandene Bild ist in **Fig.** 78C gezeigt.

[0742] In **Fig.** 78C enthält die Spur 1 Produkte der Kontrolle ohne Enzym, Spur 2 enthält Produkte eines Reaktionsablaufs in Abwesenheit eines Invader™-Oligos; die Spuren 3–6 enthalten Produkte vom Ablauf von Reaktionen in Anwesenheit der P-14d, P-14-dp, P-15 beziehungsweise der P-15p Invader™-Oligonukleotide.

[0743] Aus den in **Fig.** 78C gezeigten Daten kann gesehen werden, dass die Verwendung des P-15-Invader™-Oligonukleotids eine Verschiebung in die Spaltstelle erzeugt, während das P-14-Invader™-Oligonukleotid mit entweder einer Ribose (P14d) oder einer phosphorylierten Ribose (P14dp) das nicht bewirkt. Dies deutet

an, dass der 15. Rest des Invader™-Oligonukleotids, die Basengruppe gebunden haben muss, die die Verschiebung bei der Spaltung fördert. Interessanterweise kehrt die Addition eines Phosphats an das 3'-Ende des P-15-Oligonukleotids offensichtlich die Verschiebung der Spaltungsstelle um. Die Spaltung in dieser Spur kann in der Tat die Spaltung in Abwesenheit eines Invader™-Oligonukleotids sein, wie es bei Spur 2 beobachtet worden ist. In Experimenten mit 5'-Farbstoff-markierten Invader™-Oligonukleotiden mit 3'-Phosphatgruppen sind diese Oligonukleotide schwer bei der Gelwanderung verzögert, was darauf hinweist, dass entweder das Enzym oder ein anderer Bestandteil der Reaktion (z. B. BSA) fähig ist, das 3'-Phosphat zu binden, ungeachtet des Rests der Spaltungsstruktur. Wenn die Invader™-Oligonukleotide in der Tat von der Spaltungsstruktur abgesondert werden, würde die entstehende Spaltung des S-60-Hairpins in einer "primerunabhängigen" Weise auftreten und würde folglich nicht verschoben werden.

[0744] Zusätzlich zu den vorstehend zitierten Untersuchungen wurden die Einflüsse anderer Substituenten auf die 3'-Enden der Invader™-Oligonukleotide in Anwesenheit einiger verschiedener Enzyme und in Anwesenheit von entweder Mn^{++} oder Mg^{++} untersucht. Die Einflüsse dieser 3'-Endmodifikationen auf die Bildung gespaltenen Produkts sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst. Alle Modifikationen wurden während gewöhnlicher Oligonukleotidsynthesen unter Verwendung von CPG (Controlled Pore Glass)-Synthesekolonnen mit den aufgelisteten chemischen Resten, die auf dem Träger bereitgestellt wurden, als Synthesestartrest hergestellt. Alle dieser CPG-Substanzen wurden von der Glen Research Corp. (Sterling, VA) erhalten

TABELLE 4: Modifikationsstudien am 3'-Ende des Invader™-Oligos

3'-Endmodifikation	**Extension durch terminale Transferase**	**Einfluss auf die Invader™-Rxn. (als Invader™) Enzyme: Bedingungseinfluss**
3'-Phosphat-Glen part Nr. 20-2900-42	nein	A:5-hemmt Reaktion, keine nachweisbare Aktivität
3'-Acridin-Glen part Nr. 20-2973-42	ja, schlecht	A:5-Sinken der Aktivität, <10% B:5- Sinken der Aktivität, <10% B:4- Sinken der Aktivität, <10% C:1- Sinken der Aktivität, <10% C:2- Sinken der Aktivität, ~20% C:4- Sinken der Aktivität, ~50% C:3- Sinken der Aktivität, <5%
3'-Carboxylat-Glen part Nr. 20-4090-42	nein	A:1- Sinken der Aktivität, ~50% Aktivitätsverschiebung in die Spaltstelle C:3-reduziert Rate, <10% Aktivität
3'Nitropyrol-Glen part Nr.	ja	A:5- Anstieg der Aktivität, ~2X

20-2143-42		
3'-Nitroindol-Glen part Nr. 20-2144-42	ja	A:5- Sinken der Aktivität, ~33% Aktivität
3'-Arabinose-Glen part Nr. 10-4010-90	ja	A:5- Sinken der Aktivität, ~50% Aktivität
3'-DideoxyUTP-Flourescein	nein	A:5- Sinken der Aktivität, ~40% Aktivität
3'-3'-Verknüpfung Glen part Nr. 20-0002-01	nein	A:1-gleichwertige Spaltungsaktivitätsverschiebung in die Spaltstelle
3'-Glyceryl-Glen part Nr. 20-2902-42	ja, sehr schlecht	C:3- Sinken der Aktivität, ~30% Aktivitätsverlust der Spaltungsspezifität, 2 Stellen
3'-Amino-Modifizierer C7-Glen part Nr. 20-2957-4	ja	C:3- Sinken der Aktivität, ~30% Aktivitätsverlust der Spaltungsspezifität, viele Stellen
3'-Desoxy, 2'OH-Glen part Nr. 20-2104-42	ja, sehr schlecht	A:5- Sinken der Aktivität, <20% Aktivität B:5- Sinken der Aktivität, <20% Aktivität B:3- Sinken der Aktivität, <20% Aktivität C:1-gleichwertige Aktivität C:2-gleichwertige Aktivität C:4-?Anstieg der Aktivität C:3- Sinken der Aktivität, ~40% Aktivität

Enzyme:

A) Cleavase® DV-Nuklease
B) Cleavase® BN-Nuklease
C) Pfu FEN-1

Bedingungen:

1) 4 mM $MnCl_2$, 150 mM LiCl
2) 4 mM $MnCl_2$, 50 mM KCl
3) 7,5 mM $MgCl_2$, nicht einwertig
4) 4 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl

5) 10 mM MgOAc, 50 mM KCl

[0745] Aus diesen Daten kann ersehen werden, dass viele verschiedene Modifikationen am 3'-Ende des Invader™-Oligonukleotids ohne Nachteil verwendet werden können. In verschiedenen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können solche 3'-Endmodifikationen verwendet werden, um die Hybridisierungseigenschaften der Invader™-Oligonukleotide zu blockieren, zu erleichtern oder anderweitig zu verändern (z. B. die Unterscheidung von Mismatchen zu verbessern oder die Toleranz gegenüber Mismatchen zu steigern oder um die Bindung zwischen dem Invader™-Oligonukleotid und der Zielnukleinsäure zu verstärken). Einige Substituenten können verwendet werden, um das Verhalten des Enzyms bei der Erkennung und Spaltung innerhalb des zusammengefügten Komplexes zu verändern.

[0746] Veränderte 3'-Enden können auch verwendet werden, um die Verlängerung des Invader™-Oligonukleotids durch entweder Template-abhängige oder Template-unabhängige Nukleinsäurepolymerasen zu verhindern. Die Verwendung von andererseits unmodifizierten Didesoxynukleotiden (d. h. ohne gebundene Farbstoffe oder andere Reste) sind insbesondere bevorzugte Mittel der Blockierung der Extension der Invader™-Oligonukleotide, weil sie die Spaltungsaktivität nicht senken und vollkommen unverlängerbar sind.

BEISPIEL 36

Einfluss der Sondenkonzentration, Temperatur und eines Stacker-Oligonukleotides auf die Spaltung von Minisonden durch Invader™-directed Cleavage

[0747] Die Stacker-Oligonukleotide, eingesetzt um Spaltungsstrukturen zu bilden, können zwei Zwecken beim Nachweis einer Zielnukleinsäure unter Verwendung einer Minisonde dienen. Das Stacker-Oligonukleotid kann helfen die Wechselwirkung der Minisonde mit der Zielnukleinsäure zu stabilisieren, was zu einer größeren Anhäufung gespaltener Sonde führt. Zusätzlich verlängert die Anwesenheit dieses Oligos im Komplex die Duplex-DNA stromabwärts von der Spaltungsstelle, was die Spaltungsaktivität einiger Enzyme der vorliegenden Erfindung steigern kann. Ein Beispiel für die verschiedenen Vorlieben für die Länge dieser Duplex-Struktur von verschiedenen strukturspezifischen Nukleasen ist aus dem Vergleich der Spaltung von 8 Bp- und 12 Bp-Duplexregionen durch Cleavase® BN-Nuklease und Mja-FEN-1-Nuklease in **Fig. 65** ersichtlich. Erhöhte Affinität des Enzyms für die Spaltungsstruktur ergibt auch eine größere Anhäufung gespaltener Sonde während der über eine festgesetzte Zeit durchgeführten Reaktionen.

[0748] Die Menge der Minisonde, die an die Zielnukleinsäure bindet, wird auch durch die Konzentration der Minisonde in der Reaktionsmischung beeinflusst. Auch wenn eine Minisonde nur geringfügig wahrscheinlich zu hybridisieren ist (d. h. wenn die Reaktion bei Temperaturen über der erwarteten Schmelztemperatur der Sonde/Zielduplex-DNA durchgeführt wird), kann die Menge der Sonde an der Ziel-DNA zu jeder Zeit durch Verwendung hoher Konzentrationen der Minisonde erhöht werden.

[0749] Das Bedürfnis eines Stacker-Oligonukleotids die Spaltung der Minisonde zu aktivieren, wurde sowohl bei hohen als auch niedrigen Sondenkonzentrationen untersucht. Die Reaktionen wurden in 10 µl 10 mM HEPES (pH 7,2), 250 mM KGlu, 4 mM $MnCl_2$ mit 100 mM des Invading- (Oligo 135; Seq.-ID Nr. 112) als auch des Stacking-Oligonukleotids (Oligo 147; Seq.-ID Nr. 113) und 100 pmol ssM13-DNA durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit Mineralöl überschichtet, 15 sec auf 90°C erhitzt und dann auf Raumtemperatur gebracht. Die Reaktionen wurden bei 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C und 65°C durchgeführt. Die Spaltungsreaktionen wurden durch Zugabe von 1 µl 100 ng/µl Pfu-FEN-1 gestartet und 1 µl verschiedener Konzentrationen des Cy-3-markierten Minisondenoligonukleotids 142 (Seq.-ID Nr. 114). Die Reaktionen durften 1 Stunde fortfahren und stoppten durch die Zugabe von 10 µl Formaldehyd. Ein Viertel des Gesamtvolumens jeder Reaktion wurde auf 20% nicht-denaturierende Polyacrylamidgele geladen, mit denen eine Elektrophorese in die entgegengesetzte Richtung durchgeführt wurde. Die Gele wurden unter Verwendung eines Hitachi FMBIO-100-Fluoreszenzscanners mit einem 585 nm-Filter sichtbar gemacht. Die Fluoreszenz in jeder Produktbande wurde gemessen und die in **Fig. 80** gezeigte Grafik wurde unter Verwendung der Excel-Tabellenkalkulation von Microsoft erstellt.

[0750] Die in **Fig. 80** zusammengefassten Daten zeigten, dass die Konzentration der Minisonde einen erheblichen Einfluss auf die Endmessung des Produkts hatte, die drastische Anstiege zeigte, wenn die Konzentration anstieg. Konzentrationsanstiege der Minisonde verschoben auch die optimale Reaktionstemperatur nach oben. Es ist auf dem Fachgebiet bekannt, dass die Konzentration der komplementären Stränge in einer Hybridisierung die offensichtliche T_m der Duplex-Struktur zwischen ihnen beeinflussen wird. Bemerkenswerter an den Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung ist die Tatsache, dass die Anwesenheit

des Stacker-Oligonukleotids einen profunden Einfluss auf die Spaltungsgeschwindigkeit der Minisonde bei allen Konzentrationen hat. Bei jeder Sondenkonzentrationen wurde das Signal der Spaltungsprodukte durch die Anwesenheit des Stackers mehr als verdoppelt. Dies zeigte den Nutzen des Gebrauchs des Stacker-Oligonukleotids in Verbindung mit den hierin beschriebenen Minisonden.

BEISPIEL 37

Die Anwesenheit eines Mismatchs im Invader™-Oligonukleotid senkt die Spaltungsaktivität der Cleavase® A/G-Nuklease

[0751] In jedem Nukleinsäurenachweis-Test ist es ein zusätzlicher Vorteil, wenn der Test hergestellt werden kann, um empfindlich geringe Unterschiede zwischen verwandten Nukleinsäuren nachzuweisen. Im nachstehenden Experiment wurden Modellspaltungssubstrate verwendet, die identisch bis auf die An- oder Abwesenheit eines Mismatchs in der Nähe des 3'-Endes des Invader™-Oligonukleotids waren, wenn sie an die Modellzielnukleinsäure hybridisierten. Der Einfluss eines Mismatchs in dieser Region auf die Anhäufung gespaltener Sonde, wurde dann ausgewertet.

[0752] Um den Einfluss der Anwesenheit eines Mismatchs im Invader™-Oligonukleotid auf die Fähigkeit der Cleavase® A/G-Nuklease das Sondenoligonukleotid in einem Invader™-Test zu spalten zu zeigen, wurde das nachstehende Experiment durchgeführt. Die Spaltung der Testoligonukleotide IT-2 (Seq.-ID Nr. 115) in Anwesenheit der Invader™-Oligonukleotide IT-1 (Seq.-ID Nr. 116) und IT-1A4 (Seq.-ID Nr. 117). Das Oligonukleotid IT-1 ist vollständig komplementär zum 3'-Arm von IT-2, wohingegen Oligonukleotid IT-1A4 eine T→A-Substitution an der Position 4 vom 3'-Ende hat und das ergibt einen A/A-Mismatch in der Invader™-Zielduplex-DNA. Sowohl von den angepassten als auch von den nicht-angepassten Invader™-Oligonukleotiden würde erwartet, dass sie bei der Temperatur, bei der die folgende Reaktion durchgeführt wurde, hybridisieren. **Fig. 81** stellt eine schematische Darstellung bereit, die IT-1 hybridisiert an die gefaltete IT-2-Struktur zeigt und die IT-1A4 hybridisiert an die gefaltete IT-2-Struktur zeigt.

[0753] Die Reaktionen wurden folgendermaßen durchgeführt. Das Testoligonukleotid IT-2 (0,1 µM), am 5'-Ende mit Fluorescein (Integrated DNA Technologies) markiert, wurde mit 0,26 ng/µl Cleavase® A/G in 10 µl CFLP®-Puffer mit 4 mM $MgCl_2$ in Gegenwart von 1 µM IT-1 oder IT-1A4 10 min bei 40°C inkubiert; eine Kontrolle ohne Enzym wurde auch ausgeführt. Die Proben wurden mit 15 µl ChillOut®-Flüssigwachs überschichtet, um Verdampfung zu verhindern. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 4 µl Stopppuffer (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,02% Methylviolett) gestoppt. Die Spaltungsprodukte wurden auf einem 20% denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit dem FMBIO-100 Image Analyzer (Hitachi), ausgestattet mit einem 505 nm-Filter, analysiert. Das entstandene Bild ist in **Fig. 82** gezeigt.

[0754] In **Fig. 82** enthält Spur 1 Reaktionsprodukte der Kontrolle ohne Enzym und zeigt die Wanderung eines ungespaltenen IT-2-Oligos; die Spuren 2–4 enthalten Produkte von Reaktionen ohne Invader™-Oligonukleotid, mit dem IT-1-Invader™-Oligonukleotid beziehungsweise dem IT-1A4-Invader™-Oligonukleotid.

[0755] Diese Daten zeigen, dass die Spaltung durch die Anwesenheit des Mismatchs bemerkenswert reduziert wird, auch unter Bedingungen, bei denen von dem Mismatch nicht erwartet würde, dass er die Hybridisierung stört. Dies zeigt, dass die Invader™-Oligonukleotid-Bindungsregion eine der Regionen innerhalb des Komplexes ist, die für Mismatch-Nachweise verwendet werden kann, wie durch einen Abfall in der Spaltungsgeschwindigkeit offenbart.

BEISPIEL 38

Vergleich der Aktivität der Pfu-FEN-1- und Mja-FEN-1-Nukleasen in der Invader™-Reaktion

[0756] Um die Aktivität der Pfu-FEN-1- und Mja-FEN-1-Nukleasen in der Invader™-Reaktion zu vergleichen, wurden die folgenden Experimente durchgeführt. Ein Testoligonukleotid IT3 (Seq.-ID Nr. 118), das einen Invader™-Zielhairpin bildet und das am 5'-Ende mit Fluorescein (Integrated DNA Technologies) markierte Sondenoligonukleotid PR1 (Seq.-ID Nr. 119) wurden in Invader™-Tests unter Verwendung entweder der Pfu-FEN-1- oder der Mja-FEN-1-Nukleasen eingesetzt.

[0757] Die Tests wurden folgendermaßen durchgeführt. Pfu-FEN-1 (13 ng/µl) und Mja-FEN-1 (10 ng/µl) (wie in Bsp. 28 beschrieben hergestellt) wurden mit den IT3- (0,1 nM) und PR1- (2 und 5 µM) Oligonukleotiden in 10 µl CFLP®-Puffer, 4 mM $MgCl_2$, 20 mg/ml tRNA 41 min bei 55°C inkubiert. Die Proben wurden mit 15 µl Chil-

lOut®-Verdampfungssperrschicht überschichtet, um Verdampfung zu verhindern. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 70 µl Stopppuffer (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,02% Methylviolett) gestoppt. Die Reaktionsprodukte (1 µl) wurden auf einem 20% denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, unter Verwendung eines Fluoroimager sichtbar gemacht und die Banden, die der Sonde entsprachen und das Produkt wurden quantifiziert. Das entstandene Bild ist in **Fig. 83** gezeigt. In **Fig. 83** ist die Umsatzgeschwindigkeit pro Ziel-Molekül, pro Minute unter dem Bild für jede Nuklease bei jeder Konzentration von getesteten Sonden und Zielmolekülen.

[0758] Es wurde in Beispiel 32 gezeigt, dass die Verwendung der strukturspezifischen Pfu-FEN-1-Nuklease in der Invader™-directed-cleavage-Reaktion zu einer schnelleren Produktanhäufungsgeschwindigkeit führte, als die Verwendung der Cleavase® A/G es tat. Die vorgelegten Daten hier zeigen, dass die Verwendung der Mja-FEN-1-Endonuklease mit der Fluorescein-markierten Sonde die erzeugte Produktmenge weiter um durchschnittlich etwa 50% steigern, darauf hinweisend, dass zusätzlich zur Pfu-FEN-1-Nuklease, die Mja-FEN-1-Endonuklease eine bevorzugte strukturspezifische Nuklease für den Nachweis von Nukleinsäurezielen durch das Verfahren der vorgelegten Erfindung ist.

Beispiel 39

Nachweis der RNA-Zielnukleinsäuren unter Verwendung von Minisonde und Stacker-Oligonukleotiden

[0759] Zusätzlich zum vorstehend beschriebenen Nachweis der M13-Ziel-DNA wurde ein Minisonde/Stacker-System entwickelt, um die HCV-stämmigen, in Beispiel 19 beschriebenen RNA-Sequenzen nachzuweisen. Eine Sonde mittlerer Länge, entweder eine lange Sonde mittleren Bereichs oder eine kurze herkömmliche Sonde, wurde auch untersucht. Die verwendete Minisonde (Oligo 42-168-1) hat die Sequenz: 5'-TET-CCGGTCGTCCTGG-3' (Seq.-ID Nr. 120), das verwendete Stacker-Oligonukleotid (32-085) zu dieser Minisonde hat die Sequenz: 5'-CAATTCCGGTGTACTACCGGTTCC-3' (Seq.-ID Nr. 121). Die etwas längere Sonde, die ohne Stacker verwendet wurde (Oligo 42-088) hat die Sequenz: 5'-TET-CCGGTCGTCCTGG-CAA-3'. Das Invader™-Oligonukleotid, das mit beiden Sonden verwendet wird hat die Sequenz: 5'-GTTTATC-CAAGAAAGGACCCGGTC-3' (Seq.-ID Nr. 47). Die Reaktionen umfassten 50 fmol Ziel-RNA, 10 pmol Invader™-Oligonukleotid und 5 pmol des Minisondenoligonukleotids in 10 µl Puffer mit 10 mM MES, pH 6,5, mit 150 mM LiCl, 4 mM $MnCl_2$, je 0,05% Tween-20 und NP-40, und 39 Units RNAsin (Promega). Falls verwendet, wurden 10 pmol des Stacker-Oligonukleotids zugefügt. Diese Komponenten wurden vereint, mit Chillout®-Verdampfungssperrschicht überschichtet und auf 50°C erwärmt; die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 Polymeraseeinheiten der DNAPTth bis zu einem Endvolumen von 10 µl gestartet.

[0760] Nach 30 Minuten bei 50°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid, 10 mM EDTA und 0,02% Methylviolett gestoppt. Die Proben wurden 1 Minute auf 90°C erhitzt und 2,5 µl von jeder dieser Reaktionen wurde durch Elektrophorese auf einem 20% denaturierendem Polyacrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer von 45 mM Tris-Borat, pH 8,3, 1,4 mM EDTA aufgetrennt und die markierten Reaktionsprodukte wurden unter Verwendung des FMBIO-100 ImageAnalyzer (Hitachi) sichtbar gemacht. Das entstandene Bild ist in **Fig. 84** gezeigt.

[0761] In **Fig. 84** zeigen die Spuren 1 und 2 die Reaktionsprodukte mit HCV-Invader™-Oligonukleotid und der längeren Sonde (Oligo 42-088), ohne beziehungsweise mit der Ziel-RNA. Die Spuren 3, 4 und 5 zeigen die Reaktionsprodukte mit dem Invader™-Oligonukleotid und der kürzeren Sonde (Oligo 42-168-1). Spur 3 ist eine Kontrollreaktion ohne anwesende Ziel-RNA, während die Spuren 4 und 5 die Ziel-RNA haben, aber mit beziehungsweise ohne das Stacker-Oligonukleotid.

[0762] Unter diesen Bedingungen wurde das geringfügig längere (16 nt) Sondenoligonukleotid sehr einfach ohne die Hilfe eines Stacker-Oligonukleotids gespalten. Dagegen benötigte die kürzere (13 nt) Sonde die Anwesenheit eines Stacker-Oligonukleotids, um nachweisbare Spaltungslevel zu erzeugen. Diese Daten zeigen, dass das Minisondensystem des Zielnachweises durch Invader™-directed-cleavage gleichermaßen auf den Nachweis von RNA- und DNA-Zielen anwendbar ist. Zusätzlich ergibt der Vergleich der Spaltungsleistungsfähigkeit der längeren und kürzeren Sonden in Abwesenheit des Stacker-Oligonukleotids ein Beispiel für die Unterscheidung zwischen der Leistungsfähigkeit des Minisonden/Stacker-Systems und der Leistungsfähigkeit der mittellangen und langen Sonden beim Nachweis der Zielnukleinsäure.

BEISPIEL 40

Einfluss eines ungepaarten 3'-Schwanzes auf die Transkription eines vollständigen (ungenickten) Promotors

[0763] Beim Entwerfen des Verfahrens des transkriptionsbasierten Sichtbarmachens der Produkte der Invader™-directed-cleavage, war es zunächst notwendig den Einfluss des 3'-Schwanzes auf die Transkriptionseffizienz eines Volllänge-Promotors abzuschätzen. Die in diesem Beispiel untersuchten Duplexmoleküle sind in Fig. 93 unten und schematisch in den **Fig.** 85A–C gezeigt.

[0764] Die Transkriptionsreaktionen wurden unter Verwendung des MEGAshortscript™-Systems von Ambion, Inc. (Austin, TX) in Übereinstimmung mit den Herstellervorschriften mit der Ausnahme, dass ein Flourescein-markiertes Ribonukleotid zugegeben wurde, durchgeführt. Jede DNA-Probe wurde in 4 µl RNAse-freiem dH_2O vereint. Jede Reaktion 1–3 enthielt 10 pmol des Kopie-Template-Oligos 150 (Seq.-ID Nr. 123); Reaktion 2 enthielt 10 pmol des Promotor-Oligos 151 (Seq.-ID Nr. 124); Probe 3 enthielt 10 pmol des 3'-getailten Promotor-Oligos 073-065 (Seq.-ID Nr. 125); Probe 4 hatte keine zugesetzte DNA. Zu jeder Probe wurden 6 µl einer Lösung mit 1 µl 10 × Transkriptionspuffer, 7,5 mM jeden rNTPs, 0,125 mM Flourescein-12-UTP (Boehringer) und 1 µl T7 MEGAshortscript™-Enzymgemisch zugefügt. Die Proben wurden dann 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Ein Mikroliter RNAse-freie DNAse 1 (2 U/µl) wurde zu jeder Probe gegeben und die Proben wurden weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden dann durch Zugabe von 10 µl einer Lösung von 95% Formamid, 5 mM Na_2EDTA, mit Ladefarbstoff gestoppt. Alle Proben wurden 2 Minuten auf 95°C erhitzt und 4 µl jeder Probe wurden durch Elektrophorese auf einem 20% denaturierendem Polyacrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer von 45 mM Tris-Borat, pH 8,3, 1,4 mM EDTA aufgetrennt. Das Gel wurde mit einem FMBIO II Floureszenz-Imageanalyzer analysiert und das entstandene Bild ist in Fig. 93 gezeigt. Die durch erfolgreiche Transkription hergestellte RNA erscheint in der Mitte des Panels wie angezeigt ("RNA").

[0765] Die Auswertung der in den Spuren 2 und 3 gezeigten Transkriptionsprodukte zeigen, dass die Anwesenheit eines 3'-Schwanzes einen entgegengesetzten Einfluss auf die Transkriptionseffizienz des Volllängen-Promotors hat, aber ihn nicht völlig außer Kraft setzt. Da es die Aufgabe des transkriptionsbasierten Visualisierungs-Tests der vorliegenden Erfindung ist, zwischen ungespaltenen Sonden und den kürzeren Produkten des Invasive-Cleavage-Tests (gespaltene Sonde) zu unterscheiden, zeigen diese Daten, dass die Herstellung eines Volllängen-Promotors in der Spaltungsreaktion schwierig vom Hintergrund aufzulösen wäre, der durch Transkription von Promotoren, die die ungespaltene Sonde enthalten, entsteht, wenn keine anderen Oligonukleotide in den Test eingeschlossen wären. Die Mittel der Transkriptionsunterdrückung von solch einem verzweigten Promotor sind in der Beschreibung der Erfindung und nachstehend in Bsp. 43 diskutiert.

BEISPIEL 41

Auswertung des Einflusses der Position des Nicks auf die Transkriptionseffizienz von teilweisen und vollständig zusammengesetzten Bakteriophage-T7-Promotoren.

[0766] In der Beschreibung der Erfindung wird das Verfahren zum Testen voraussichtlicher Promotorstücke zur Eignung in einem Invasive-Cleavage-Linked-Test beschrieben. Ein Aspekt des Tests ist es, zu untersuchen welchen Einfluss eine gewählte Nickstelle auf die Transkriptionseffizienz des letzten zusammengesetzten Promotors hat. Zusätzlich wurden die einzelnen Teile des genickten Promotors auf die Transkriptionsaktivität in Gegenwart des ungenickten Volllängen-Strangs getestet. In diesem Experiment wurde ein Vergleich über diese Punkte, zwischen einem zusammengesetzten Promotor mit einem Nick im Nichtmatrizenstrang zwischen den Nukleotiden –11 und –10 bezogen auf die Initiationsstelle (+1) und einem Promotor mit einem Nick auf dem gleichen Strang, aber positioniert zwischen den Nukleotiden –8 und –7, angestellt. Die Figursnummern der schematischen Darstellungen der Inhalte jeder Reaktion sind unter jeder Spur (z. B., 85A = **Fig.** 85A) angegeben. Die Stelle, an welcher der Nick in einem vollständig zusammengebauten, zusammengesetzten Promotor unter Verwendung der Reaktionsoligonukleotide sein würde, ist auch unter jeder Spur angegeben ("–11/–10" und "–8/–7").

[0767] Die Transkriptionsreaktionen wurden unter Verwendung des MEGAshortscript™-Systems durchgeführt in Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers bis auf die Ausnahme, dass ein Fluorescein-markiertes Ribonukleotid zugegeben wurde. Jede DNA-Probe wurde in 4 µl RNAse-freiem dH_2O vereint. Reaktion 1 hatte keine zugesetzte DNA. Die Reaktionen 2–9 enthielten je 10 pmol des Kopie-Template-Oligos 150 (Seq.-ID Nr. 123). Die Reaktionen 3 und 4 enthielt 10 pmol der –11-"Spalt"-Sonde (Oligo 073-061-01; Seq.-ID Nr. 127) beziehungsweise 20 pmol des –10 partiellen Promotor-Oligos 073-061-02 (Seq.-ID Nr. 130)

und Reaktion 5 enthielt beide. Reaktionen 6 und 7 enthielten entweder 10 pmol der –8-"Spalt"-Sonde (Oligo 073-062-01; Seq.-ID Nr. 126) beziehungsweise 20 pmol des –7 partiellen Promotor-Oligos 073-062-02 (Seq.-ID Nr. 129) und Reaktion 8 enthielt sie beide. Reaktion 9 enthielt 10 pmol des intakten Promotor-Oligos 151 (Seq.-ID Nr. 124).

[0768] Die Transkriptionsreaktion wurden gestartet, inkubiert, gestoppt und die Reaktionsprodukte wurden aufgetrennt und abgebildet wie in Bsp. 40 beschrieben. Das entstandene Bild ist in **Fig. 92** gezeigt. Die Reaktionsnummern entsprechen der Spurnummer unter dem Bild. Die durch erfolgreiche Transkription erzeugte RNA erscheint im oberen Drittel des Bildes. Vergleich der positiven Kontrollreaktion (Rkt. 9) zeigt, dass die Volllängen-RNA, die durch jeden der zusammengesetzten Promotoren hergestellt wurde, die gleich Größe hat wie die in der Kontrollreaktion hergestellte, wodurch angezeigt wird, dass die Transkription an der gleichen Stelle in jeder Reaktion gestartet wird.

[0769] In **Fig. 92** vergleichen die Spuren 3, 4 und 5 die Transkription der 2 Arten von teilweise zusammengebauten Promotoren (siehe Schemata in den **Fig. 86A** und B) und vollständig zusammengebauten, zusammengesetzten Promotoren (**Fig. 88B**) mit einem Nick zwischen den Nukleotiden –11 und –10, bezogen auf den Start der Transkription. Aus diesen Daten kann gesehen werden, dass kein partieller Promotor (Spuren 3 und 4) fähig ist die Transkription der Matrizenkopie zu unterstützen, dass aber der zusammengesetzte Promotor (Spur 5) mit dieser Nick-Stelle stark transkribiert wird. Erstaunlicherweise zeigt der Vergleich mit der Kontrollreaktion (Spur 9), dass die Anwesenheit eines Nicks an dieser Stelle (–11/–10) tatsächlich die Transkription steigert. Um die vorliegende Erfindung nicht auf einen besonderen Mechanismus zu beschränken, wird angenommen, dass die Zunahme der Transkription ein Ergebnis, sowohl der Unterdrückung der Bildung der kürzeren fehlgeschlagenen Transkripte, als auch die Zulassung einer größeren Menge des Volllängenprodukts ist. Dieses Ergebnis ist höchst reproduzierbar.

[0770] In **Fig. 92** vergleichen die Spuren 6, 7 und 8 die Transkription eines ähnlichen Satzes partieller und vollständiger Promotoren, bei denen der Nick 3 Reste näher an die Transkriptionsstartstelle verschoben ist. Die Auswertung der Spur 6 zeigt, dass die Anwesenheit von 3 zusätzlichen Basen an der –8-"Spalt"-Sonde (verglichen mit der –11-"Spalt"-Sonde in Spur 3) es diesem partiellen Promotor erlauben, die Transkription zu starten. Dies weist darauf hin, dass die –8/–7-Stelle eine schlechte Wahl für die Verwendung in dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wäre.

[0771] Dieses Experiment zeigt das Verfahren zur Bestimmung der geeigneten Platzierung eines Nicks innerhalb einer Promotoranordnung, um das gewünschte Ergebnis zu erreichen. Ähnliche Tests können leicht zum Testen anderer Nicks im Bakteriophage-T7-Promotor, der in diesem Beispiel getestet wurde, oder zum Testen einer geeigneten Nickplatzierung in jedem gewünschten Phagen-, prokaryontischen oder eukaryontischen Promotor, entwickelt werden.

BEISPIEL 42

Nachweis der Produkte der Invader™-directed-cleavage durch Transkription eines zusammengesetzten Promotors

[0772] Die vorstehend beschriebenen Beispiele deuten darauf hin, dass ein kleines Oligonukleotid dazu verwendet werden kann, um den vollständigen Zusammenbau eines zusammengesetzten T7-Promotors zu vervollständigen und dadurch die Transkription von diesem Promotor ermöglicht. Frühere Beispiele zeigen, dass die invasive Spaltungsreaktion verwendet werden kann, um spezifische Oligonukleotidprodukte aus längeren Sondenoligonukleotiden freizusetzen. In diesem Beispiel wird gezeigt, dass diese zwei Beobachtungen verbunden werden können und dass die Produkte der invasiven Spaltungsreaktion dazu verwendet werden können, um einen Promotor zu vervollständigen und anschließende Transkription zu ermöglichen. Die schematischen Darstellungen der zusammengesetzten Promotoren, die in diesem Beispiel untersucht wurden, sind in **Fig.** 88 gezeigt.

[0773] Zwei invasive Spaltungsreaktionen wurden angesetzt, eine ohne (Rkt. 1) und eine mit (Rkt. 2) zugebener Ziel-DNA. Die Reaktionen (1 und 2) umfassten 10 mM MOPS (pH 7,5), 0,05 Tween-20, 0,05% NP-40 und 20 pmol Sondenoligo 073-067-01 (Seq.-ID Nr. 132) und 10 pmol Invader™-Oligo 073-073-02 (Seq.-ID Nr. 134) in einem Volumen von 14 µl. Reaktion 2 enthielt auch 100 fmol M13mp18-ssDNA. Die Proben wurden bei 60°C gehalten und 6 µl einer Lösung von 20 ng Mja-FEN-1 und 40 mM $MgCl_2$ wurden zu jeder Probe zugegeben, um die Reaktionen zu starten. Die Proben wurden 30 Minuten bei 60°C inkubiert und durch Zugabe von 3 µl 2,5 M NaoAc, 83 mM Na_2EDTA (pH 8,0) gestoppt. Jede Probe wurde in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhr-

chen überführt und die DNAs dann durch die Zugabe von 60 µl gekühlten 100% Ethanols gefällt und 20 Minuten bei –20°C gelagert. Die Pellets wurden durch Mikrozentrifugation gewonnen, einmal mit 80% Ethanol gewaschen, um überschüssiges Salz zu entfernen und dann unter Vakuum getrocknet. Das Produkt dieser invasiven Spaltungsreaktion ist ein 12 nt Oligonukleotid mit der Sequenz: 5'-CGARATTAATAC-3' (Seq.-ID Nr. 128), als –12-Spalt-Sonde bezeichnet (gleiche Sequenz wie 073-073-03).

[0774] Zur Transkription wurde jede getrocknete Probe in 4 µl einer Lösung mit 1 pmol Matrizenkopieoligo 150 und 2 pmol partielles –11-Promotoroligonukleotid 073-073-012 (Seq.-ID Nr. 131) gelöst. Kontrollproben 3 und 4 enthielten je 1 pmol des Matrizenkopieoligos 150; Probe 3 enthielt auch 1 pmol Sondenoligo 073-067-01 (Seq.-ID Nr. 132) und 2 pmol partielles –11-Promotoroligo 073-073-012 (siehe Struktur 88A); Probe 4 enthielt 1 pmol –12-Spalt-Sondenoligo 073-073-03 (Seq.-ID Nr. 128) und 2 pmol partielles –11-Promotoroligo 073-073-012 (siehe Struktur 88B). Diese sind die Strukturen, deren Vorhandensein bei Transkriptionsreaktionen der zwei vorstehend beschriebenen invasiven Spaltungsreaktionen erwartet würden.

[0775] Die Transkriptionsreaktionen wurden gestartet, inkubiert, gestoppt und die Produkte aufgelöst und abgebildet, wie in Bsp. 40 beschrieben. Das entstandene Bild ist in der rechten Hälfte der **Fig. 89** (Spuren 6–9) gezeigt. Die Proben 3 und 4 erscheinen in den Spuren 6 beziehungsweise 7, und die Reaktionen 1 und 2 von den invasiven Spaltungsreaktionsprodukten (durch Verwendung von "i" in Kleinbuchstaben angegeben) erscheinen in den Spuren 8 beziehungsweise 9. Die Zahl der Fig., welche die schematische Darstellung der erwarteten Promotorstruktur in jeder Reaktion zeigt, ist über jeder Spur angegeben und die Platzierung des Nicks ist auch angegeben. Die Großbuchstaben zeigen an, welche Struktur in der besonderen Figur für jede Reaktion zu untersuchen ist. Das "i" in Kleinbuchstaben über den Spuren 8 und 9 zeigt an, dass diese Transkriptionen von tatsächlichen invasiven Spaltungsreaktionen stammten. Diese Produkte werden mit der in der Kontrollreaktion hergestellten RNA in Spur 5 verglichen, das Verfahren, das in Bsp. 44 beschrieben ist. Die RNA, die durch erfolgreiche Transkription gebildet wurde, erscheint im oberen Drittel des Panels (durch "RNA" angegeben).

[0776] Die in Spur 6 gezeigte Reaktion zeigte keine Transkription. Dies machte deutlich, dass ein Nick zwischen den Nukleotiden –12 und –11 im am-Matrizenstrang des T7-Promotors die Transkription ausschaltete, wenn der Promotor aus ungespaltener Sonde aufgebaut ist, so wie das 3'-Ende der Sonde eine Abzweigung innerhalb der Promotorsequenz bildet. Das ist ein Gegensatz zu den Ergebnissen, die mit dem –11/–10-Nick, der nachstehend untersucht wird, gesehen werden. Zudem zeigt das in Spur 7 ersichtliche Transkript, dass ein unverzweigter Promotor mit einem Nick an der gleichen Stelle (–12/–11) die korrekte RNA erzeugt, mit wenigen fehlgeschlagenen Initiationsprodukten (siehe Spuren 2 und 5 von **Fig. 89**, beschrieben in Bsp. 44). Die Reaktionen in den Spuren 8 und 9 demonstrieren, dass derselbe Effekt beobachtet wird, wenn die invasive Spaltungsreaktion die einzige Quelle für das Stromaufwärts-Stück (–12-Spalt-Sonde) ist. Es ist bemerkenswert, dass der Promotor, der in Spur 8 transkribiert wird, vollständig in Anwesenheit von 1 pmol eines synthetischen "Spalt"-Sondenoligos gemacht wurde, ohne irgendeine ungespaltene Sonde in der Mischung, während der Promotor, der in Spur 9 transkribiert wird, durch das Produkt der invasiven Spaltungsreaktion vervollständigt wird, die nur 100 fmol der Ziel-DNA beinhaltete. Diese Reaktion umfasste auch die restliche ungespaltene Sonde (bis zu etwa 10 pmol), die um die Bindung an derselben Stelle konkurrieren könnte. Nichtsdestoweniger sind die Transkriptionen der invasiven Spaltungsreaktion nur leicht in ihrer Effizienz erniedrigt, und sind genauso frei von Hintergrundtranskription, wie es die "ohne Ziel-DNA"-Probe (Spur 8) ist. Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass die Spaltungsprodukte der invasiven Spaltungsreaktion in Verbindung mit einem partiellen Promotor verwendet werden können, um die Herstellung der RNA zu fördern, ohne durch die Anwesenheit der ungespaltenen Sonde erzeugte Hintergrundtranskription. Dieses RNA-Produkt ist eindeutig abhängig von der Anwesenheit des Zielmaterials in der invasiven Spaltungsreaktion.

BEISPIEL 43

Ausschalten der Transkription eines "lückenhaften", verzweigten, zusammengesetzten T7-Promotors durch die Verwendung eines partiellen Stromabwärts-Promotor-Oligonukleotids mit einem 5'-Schwanz

[0777] Das vorherige Beispiel zeigt, dass die Platzierung eines Nicks im Nicht-Matrizenstrangs eines Bakteriophage T7-Promotors zwischen –12 und –11 Nukleotiden, bezogen auf den Transkriptionsstart, die Transkription des verzweigten Promotors verhindert, während sie die Transkription zulässt, wenn der zusammengesetzte Promotor unter Verwendung der Spaltsonde zusammengebaut wird. Wenn der Nick an anderen Stellen des Promotors platziert wird, kann die Transkription von einem der Promotoren gestartet werden, obwohl sie gewöhnlich vom verzweigten Promotor weniger effizient ist. Dieses Beispiel zeigt, dass die Zugabe eines 5'-Schwanzes, der an die ungespaltene Sonde an dem partiellen Promotorstück stromabwärts paaren kann

(**Fig.** 90A), wirksam die Transkription blockiert, aber nicht die Transkription verhindert, wenn eine Spaltsonde den Promotor vervollständigt (**Fig.** 90B).

[0778] Zwei invasive Spaltungsreaktionen wurden angesetzt, eine ohne (Rkt. 7) und eine mit (Rkt. 8) zugegebener Ziel-DNA. Die Reaktionen (7 und 8) umfassten 10 mM MOPS (pH 7,5), 0,05% Tween-20, 0,05% Np-40 und 20 pmol Sondenoligo 073-067-01 (Seq.-ID Nr. 132) und 10 pmol Invader™-Oligo 073-067-02 (Seq.-ID Nr. 133) in einem Volumen von 14 µl. Reaktion 8 enthielt auch 100 fmol M13mp18-ssDNA. Die Proben wurden bei 60°C gehalten und 6 µl einer Lösung mit 20 ng Mja-FEN-1 und 40 mM $MgCl_2$ wurden zu jeder Probe zugegeben, um die Reaktionen zu starten. Die Proben wurden 30 Minuten bei 60°C inkubiert und dann durch Zugabe von 3 µl 2,5 M NaOAc, 83 mM Na_2EDTA (pH 8,0) gestoppt. Jede Probe wurde in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die DNAs wurden gefällt, gewaschen und getrocknet, wie in Bsp. 42 beschrieben. Das Produkt dieser invasiven Spaltungsreaktion ist eine 13 nt Oligonukleotidsequenz, 5'-CGAAATTAATACG-3' (Seq.-ID Nr. 127), als die –11-Spaltsonde bezeichnet (die gleiche Sequenz wie Oligo 073-061-01, das als die –11-"Spalt"-Sonde erwähnt wird, um anzudeuten, dass es nicht in einer invasiven Spaltungsreaktion hergestellt wurde).

[0779] In den Transkriptionsreaktionen wurden alle DNAs in 4 µl RNAse-freiem dH_2O gelöst. Probe 1 hatte keine zugesetzte DNA, Proben 2–8 enthielten 1 pmol des Matrizenkopieoligos 150 (Seq.-ID Nr. 123). Zusätzlich enthielt Probe 3 1 pmol des –11-"Spalt"-Sondenoligos 073-061-01 (Seq.-ID Nr. 127) und 2 pmol des partiellen –10-Promotoroligos 073-061-02 (Seq.-ID Nr. 130), Probe 4 enthielt 1 pmol des Sondenoligos 073-067-01 und 2 pmol des partiellen –10-Promotoroligos 073-061-02. Die Kontrollprobe 5 enthielt 1 pmol des Sondenoligos 073-067-01 und 2 pmol des partiellen Promotors w/5'tail-Oligo 073-074 (5'-TACTGACTCACTATAGGGTCTTCTATGGAG GTC-3' (Seq.-ID Nr. 146)(siehe Struktur in **Fig.** 90A) und Probe 6 enthielt 1 pmol des –11-"Spalt"-Sondenoligos 073-061-01 und 2 pmol des partiellen w/5'tail-Oligo 073-074 (siehe Struktur in **Fig.** 90B). Dies sind die Strukturen (d. h. 90A und 90B), deren Vorhandensein in den Transkriptionsreaktionen der vorstehend beschriebenen zwei invasiven Spaltungsreaktionen erwartet würden.

[0780] Die getrockneten Proben 7 und 8 der invasiven Spaltungsreaktionen (vorstehend) wurden in je 4 µl dH_2O mit 1 pmol Matrizenkopieoligo 150 und 2 pmol des partiellen w/5'tail-Oligo 073-074 gelöst. Die Transkriptionsreaktionen wurden gestartet, inkubiert, gestoppt und die Reaktionsprodukte wurden aufgetrennt und abgebildet, wie in Bsp. 40 beschrieben. Das entstandene Bild ist in **Fig. 91** gezeigt.

[0781] In **Fig. 91** entsprechen die Spurnummern den Probennummern; die Nummer der Figur, die die schematische Darstellung der erwarteten Promotorstruktur in jeder Reaktion zeigt, ist über jeder Spur angegeben ("88" und "90") und die Platzierung des Nicks ist auch angegeben ("–11/–10"). Die Großbuchstaben geben an, welche Struktur in der besonderen Figur für jede Reaktion zu untersuchen ist. Das "i" in Kleinbuchstaben über den Spuren 7 und 8 zeigt an, dass diese Transkriptionen von tatsächlichen invasiven Spaltungsreaktionen stammten. Die RNA, die durch erfolgreiche Transkription erzeugt wurde, erscheint im oberen Drittel des Panels, als ("RNA") angegeben.

[0782] Die Kontrollrektionen in den Spuren 1 und 2, die entweder keine DNA oder nur die Matrizenkopie haben, stellen keine RNA, wie erwartet, her. Das Produkt in Spur 4 zeigt, dass der verzweigte T7-Promotor mit einem Nick im Nicht-Matrizenstrang zwischen den Nukleotiden –11 und –10 die Transkription unterstützen kann, obgleich nicht so effizient, wie der unverzweigte Promotor mit dem Nick an derselben Stelle (Spur 3). Die Auswertung der Spur 5 zeigt, dass die Verwendung eines partiellen Promotoroligonukleotids mit einem kurzen 5'-Schwanz, der mit der ungespaltenen Sonde, wie in **Fig.** 90A dargestellt, basenpaaren kann, diese Transkription wirksam unterdrücken kann, aber die Transkription erlaubt, wenn die Sonde keine 3'-Schwanz hat (Spur 6; Schema **Fig.** 90B). Die Reaktionen in den Spuren 7 und 8 zeigen, dass der gleiche Einfluss beobachtet wird, wenn die invasive Spaltung die einzige Quelle des Stromaufwärts-Stücks (–11-Spaltsonde, Seq.-ID Nr. 127) des T7-Promotors ist. Es ist bemerkenswert, dass der Promotor, der in Probe 6 transkribiert wird, vollständig aus der Anwesenheit von 1 pmol einer synthetischen "Spaltsonde" gebildet ist, ohne irgendeine ungespaltene Sonde in der Mischung, während der Promotor, der in Probe 8 transkribiert wird, durch das Produkt einer invasiven Spaltung vervollständigt wird, die nur 100 fmol der Ziel-DNA enthielt. Diese Reaktion enthielt auch die restliche ungespaltene Sonde (bis zu etwa 19 pmol), die um die Bindung an derselben Stelle konkurrieren könnte. Nichtsdestoweniger sind die Transkriptionen der invasiven Spaltungsreaktion genauso stark und genauso frei von Hintergrund in den "Ohne Ziel-DNA"-Proben.

[0783] Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Spaltungsprodukte der invasiven Spaltungsreaktion in Kombination mit einem partiellen Promotoroligonukleotid mit einem 5'-Schwanz verwendet werden können, um die Herstellung der RNA, ohne durch die ungespaltene Sonde erzeugte Hintergrundtranskription, zu fördern.

[0784] Dieses RNA-Produkt ist offensichtlich abhängig von der Anwesenheit des Zielmaterials in der invasiven Spaltungsreaktion.

BEISPIEL 44

Bildung eines vollständigen Bakteriophage T7-Promotors durch DNA-Polymerase-vermittelte Extension einer gespaltenen Sonde, mit einem partiellen T7-Promotor.

[0785] Wie in den vorstehenden Beispielen gezeigt, kann die Transkription von dem T7-Promotor nicht stattfinden, außer eine vollständige Promotorregion ist anwesend. In den vorstehenden Beispielen wurde ein vollständiger Promotor mit einem Nick in einem Strang durch Hybridisieren einer Spaltsonde, die von einer invasiven Spaltungsreaktion an einer Matrizenkopie, die an ein partielles Promotoroligo hybridisiert war, erzeugt wurde, gebildet. Ein alternatives Mittel einen vollständigen Promotor in einer Weise zu bilden, die abhängig vom Nachweis einer Zielsequenz in einer invasiven Spaltungsreaktion ist, ist es die Spaltsonde an eine von partiellem Promotoroligo freie Matrizenkopie zu hybridisieren. Das 3'-OH, das am Ende der hybridisierten Spaltsonde anwesend ist, wird dann durch eine DNA-Polymerase verlängert, um einen vollständigen und ungenickten Promotor zu bilden, der fähig zur Transkription ist.

[0786] In diesem Beispiel wurde der Promotor durch die Verwendung der Primerextension anstatt durch Cohybridisierung mit einem anderen Oligonukleotid vervollständigt. Die Reaktionsschritte sind schematisch in Fig. 87 dargestellt. Zwei invasive Spaltungsreaktionen wurden angesetzt, eine ohne (Rkt. 1) und eine mit (Rkt. 2) zugesetzter Ziel-DNA. Die Reaktionen (1 und 2) umfassten 10 mM MOPS (pH 7,5), 0,05% Tween-20, 0,05% NP-40 und 20 pmol Sondenoligo 073-067-01 (Seq.-ID Nr. 132) und 10 pmol Invader™-Oligo 073-073-02 (Seq.-ID Nr. 134) in einem Volumen von 14 µl. Reaktion 2 enthielt auch 100 fmol M13mp18-ssDNA, Die Proben wurden bei 60°C gehalten und 6 µl einer Lösung mit 20 ng Mja-FEN-1 und 40 mM $MgCl_2$ wurden zu jeder Probe zugegeben, um die Reaktion zu starten. Die Proben wurden 30 Minuten bei 60°C inkubiert und durch Zugabe von 3 µl 2,5 M NaOAc, 83 mM Na_2EDTA (pH 8,0). Jede Probe wurde in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und dann die DNAs gefällt, gewaschen und getrocknet, wie in Bsp. 42 beschrieben. Das Produkt dieser invasiven Spaltungsreaktion ist die 12 nt Oligonukleotidsequenz: 5'-CGAAATTAATAC-3' (Seq.-ID Nr. 128), als –12-Spaltsonde bezeichnet (die gleiche Sequenz wie Oligo 073-073-03, das als –12-"Spalt"-Sonde erwähnt ist, um anzudeuten, dass es nicht in einer invasiven Spaltungsreaktion erzeugt worden ist).

[0787] Um die Extension dieser Produkte unter Verwendung einer Matrizen-abhängigen DNA-Polymerase zuzulassen, wurde eine 20 µl Lösung mit 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,05% Tween-20, 0,05% NP-40, 25 µM je dNTP, 0,25 Units TaqDNA-Polymerase (Boehringer) und 2 µM Matrizenkopieoligo 150 (Seq.-ID Nr. 123) zu jeder der getrockneten Spaltungsproben gegeben. Die Proben wurden 1 Std. bei 30°C inkubiert. Die Primerextensionsreaktionen wurden durch die Zugabe von 3 µl 2,5 M NaOAc mit 83 mM Na_2EDTA (pH 8,0)/Probe gestoppt. Jede Probe wurde in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die DNAs wurden gefällt, gewaschen und getrocknet wie in Bsp. 42 beschrieben.

[0788] Die Proben 1 und 2 wurden dann in 4 µl RNAse-freiem dH_2O gelöst. Die Proben 3, 4 und 5 sind Kontrollreaktionen: Probe 3 war 4 µl RNAse-freies dH_2O ohne zugesetzte DNA, Probe 4 enthielt 1 pmol des Matrizenkopieoligos 150 (Seq.-ID Nr. 123) in 4 µl RNAse-freies dH_2O und Probe 5 enthielt 1 pmol der selben Matrizenkopie und 1 pmol des vollständigen Promotoroligos 151 (Seq.-ID Nr. 124) in RNAse-freiem dH_2O.

[0789] Die Transkriptionsreaktionen wurden unter Verwendung des MEGAshortscript™-System in Übereinstimmung mit den Herstelleranweisungen aber mit Zusatz eines Fluorescein-markierten Ribonukleotids durchgeführt. Zu jeder Probe wurden 6 µl einer Lösung mit 1 µl 10 × Transkriptionspuffer, je 7,5 mM RNTP, 0,125 Fluorescein-12-UTP (Boehringer) und 1 µl T7 MEGAshortscript™-Enzymmischung gegeben. Die Proben wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert. Ein µl RNAse-freier DNAse 1 (2 U/µl) wurden zu jeder Probe zugegeben und sie wurden weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 10 µl einer Lösung von 95% Formamid, 5 mM Na_2EDTA, mit Ladefarbstoff gestoppt. Alle Proben wurden 2 Minuten auf 95°C erhitzt und vier µl jeder Probe wurden durch Elektrophorese auf einem 20%igen denaturierenden Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3), 1,4 mM EDTA aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden abgebildet unter Verwendung des Molecular Dynamics Fluoroimager 595, mit Anregung bei 488 nm und gemessener Emission bei 530 nm.

[0790] Das entstandene Bild ist in den Spuren 1–5 der Fig. 89 gezeigt; die Spurnummern entsprechen den Probennummern. Die Figursnummern entsprechen der schematischen Darstellung des Promotors, der wie über den Spuren angegeben, in jeder Reaktion transkribiert wird. Das RNA-Produkt einer erfolgreichen Tran-

skription erscheint im oberen Drittel des Panels, als ("RNA") angegeben. Nicht aufgenommenes markiertes Nukleotid erscheint als ein dichtes Signal nahe am unteren Rand ("NTPs"). Kurze Transkriptionsprodukte, die durch abgebrochene Initiationsereignisse entstanden waren (Milligan und Uhlenbeck, Methods Enzymol., 180: 51 [1989]), erscheinen als Bande kurz über den freien Nukleotiden in den Spuren, womit aktive Transkription gezeigt wird (d. h. Spuren 2 und 5).

[0791] Es ist aus den Daten in den Spuren 1 und 2 klar ersichtlich, dass die Transkription abhängig von der Anwesenheit eines Zielmaterials in der invasiven Spaltungsreaktion ist. Es ist an anderer Stelle gezeigt (siehe Spur 3, Fig. 92), dass das Produkt der Spaltungsreaktion selbst nicht ausreichend ist, um Transkription von der Matrizenkopie zu erlauben. Folglich ist die Aktivität der DNA-Polymerase beim Verlängern der hybridisierten Spaltsonde über den Promotor ein notwendiger Schritt um die Transkription in dieser Ausführungsform zu ermöglichen. Diese Daten zeigen deutlich, dass sowohl die matrizenabhängige Extension durch DNA-Polymerase als auch die Extension gefolgt von Transkription, geeignete Verfahren der Sichtbarmachung des Produkts des invasiven SpaltungsTests sind. Wie in der Beschreibung der Erfindung diskutiert, würden die Produkte der thermischen Schädigung, die 3'-terminale Phosphate besitzen würden nicht verlängert werden und würden so an der Teilnahme an der Hintergrundtranskription ausgeschlossen.

Beispiel 45

Test der Abhängigkeit eines Enzyms auf die Anwesenheit eines Stromaufwärts-Oligonukleotids

[0792] Wenn eine strukturspezifische Nuklease für die Verwendung in einer sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion ausgewählt wird, ist es bevorzugt, dass das Enzym nur geringe Fähigkeit hat eine Sonde, 1) bei Fehlen eines Stromaufwärts-Oligonukleotids und 2) bei Fehlen einer Überlappung zwischen dem Stromaufwärts-Oligonukleodid und dem Stromabwärts-markierten Sondenoligonukleotid, zu spalten. **Fig.** 99a–e stellen einige Strukturen dar, die verwendet werden können, um die Aktivität eines Enzyms, das mit jeder dieser Strukturtypen konfrontiert ist, zu untersuchen. Die Struktur a (**Fig.** 99a) zeigt das Alignment eines Sondenoligonukleotids mit einer Zielstelle auf Bakteriophagen-M13-DNA (in Fig. 99 gezeigte M13-Sequenzen sind in Seq.-ID Nr. 163 bereitgestellt) in Abwesenheit eines Stromaufwärts-Oligonukleotids. Struktur b (**Fig.** 99b) wird mit einem Stromaufwärts-Oligonukleotid bereitgestellt, das keine überlappende Region mit der markierten Sonde (die Sonde ist durch den Stern gekennzeichnet) enthält. In den Strukturen c, d und e (**Fig.** 99c–e) haben die Stromaufwärts-Oligonukleotide Überlappungen von 1, 3 bzw. 5 Nukleotiden mit dem Stromabwärts-Sondenoligonukleotid und jede dieser Strukturen stellt eine geeignete invasive Spaltungsstruktur dar. Das Enzym Pfu-FEN-1 wurde auf Aktivität an jeder dieser Strukturen getestet und alle Reaktionen wurden doppelt durchgeführt.

[0793] Jede Reaktion umfasste 1 µM 5'-TET-markiertes Sondenoligonukleotid 89-15-1 (Seq.-ID Nr. 152), 50 nM Stromaufwärts-Oligonukleotid (entweder Oligo 81-69-2 [Seq.-ID Nr. 153], Oligo 81-69-3 [Seq.-ID Nr. 154], Oligo 81-69-4 [Seq.-ID Nr. 155), Oligo 81-69-5 [Seq.-ID Nr. 156], oder kein Stromaufwärts-Oligonukleotid), 1 fmol M13 Ziel-DNA, 10 mg/ml tRNA und 10 ng Pfu-FEN-1 in 10 µl 19 mM MOPS (pH 7,5), 7,5 mM $MgCl_2$ mit je 0,05% von Tween-20 und Nonidet P-40.

[0794] Alle Bestandteile wurden vereint, mit Ausnahme des Enzyms und des $MgCl_2$ in einem Endvolumen von 8 µl und wurden mit 10 µl Chill-Out™-Flüssigwachs überschichtet. Die Proben wurden auf die Reaktionstemperatur von 69°C erhitzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Pfu-FEN-1 und $MgCl_2$ in einem Volumen von 2 µl gestartet. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 69°C wurden die Reaktionen mit 10 µl 95%-igem Formamid, 10 mM EDTA, 0,02% Methylviolett gestoppt. Die Proben wurden 1 min auf 90°C erhitzt, kurz vor der Elektrophorese auf einem 20%igen denaturierenden Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3), 1,4 mM EDTA. Die Gele wurden dann mit einem FMBIO-100 Hitachi FMBIO-Fluoreszenzimager analysiert. Das entstandene Bild wird in Fig. 100 dargestellt.

[0795] In Fig. 100 enthalten die mit "a" markierten Spuren die Produkte, von den Reaktionen, die ohne ein Stromaufwärts-Oligonukleotid (Struktur a) ausgeführt wurden, Die mit "b" markierten Spuren enthalten ein Stromaufwärts-Oligonukleotid, das nicht in die Sonde/Zielduplex eindringt (Stuktur b). Die mit "c", "d" und "e" markierten Spuren enthalten die Produkte, die von Reaktionen erzeugt wurden, die unter Verwendung eines Stromaufwärts-Oligonukleotids durchgeführt wurden, das in die Sonde/Zielduplex durch 1, 3 beziehungsweise 5 Basen eindringt. Die Größe (in Nukleotiden) der ungespaltenen Sonde und die Spaltungsprodukte sind an der rechten Seite des Bildes in Fig. 100 angezeigt.

[0796] Wie in Fig. 100 gezeigt, war die Spaltung der Sonde nicht nachweisbar, wenn die Strukturen a und b

verwendet wurden. Dagegen wurden Spaltungsprodukte erzeugt, wenn invasive Spaltungsstrukturen verwendet wurden (Strukturen c–e). Diese Daten zeigten, dass das Pfu-FEN-1-Enzym ein überlappendes Stromaufwärts-Oligonukleotid für die spezifische Spaltung der Sonde benötigt.

[0797] Jedes Enzym kann auf seine Eignung zur Verwendung in einer sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion untersucht werden, durch Untersuchung der Fähigkeit des Testenzyms die Strukturen a–e zu spalten (es ist für den Fachmann verständlich, dass die spezifischen in **Fig.** 99a–e gezeigten Oligonukleotidsequenzen nicht in den Testreaktionen eingesetzt werden müssen; diese Strukturen sind lediglich veranschaulichend für geeignete Teststrukturen). Erwünschte Enzyme zeigen nur eine geringe oder keine Spaltung der Strukturen a und b und zeigen spezifische Spaltung der Strukturen c–e (d. h. sie erzeugen Spaltungsprodukte der erwarteten Größe entsprechend dem Grad der Überlappung zwischen den zwei Oligonukleotiden, die eingesetzt wurden, um die invasive Spaltungsstruktur zu bilden).

BEISPIEL 46

Die Verwendung der Produkte einer ersten invasiven Spaltungsreaktion, um eine zweite invasive Spaltungsreaktion mit einem Nettogewinn an Empfindlichkeit zu ermöglichen

[0798] Wie vorstehend in der Beschreibung der Erfindung diskutiert, kann die Nachweisempfindlichkeit der invasiven Spaltungsreaktion durch die Durchführung einer zweiten Runde invasiver Spaltung unter Verwendung der Produkte der ersten Reaktion, um die Spaltungsstruktur in der zweiten Reaktion zu vervollständigen (schematisch in **Fig. 96** gezeigt), gesteigert werden. In diesem Beispiel ist die Verwendung einer Sonde erläutert, die beim Spalten in einer ersten invasiven Spaltungsreaktion, ein integrated-Invader™-Oligo und ein Zielmolekül zur Verwendung in einer zweiten invasiven Spaltungsreaktion bildet (schematisch gezeigt in **Fig. 97**).

[0799] Eine erste Sonde wurde entworfen, die irgendeine interne Komplementarität enthalten soll, so dass wenn sie in einer ersten Spaltungsreaktion gespalten wird, das Produkt ("Spaltsonde 1") einen Zielstrang mit einem eingebauten Invader™-Oligo bilden könnte, wie in **Fig. 97** dargestellt. Eine zweite Sonde wurde in der Reaktion bereitgestellt, die an der beabsichtigten Stelle gespalten werden könnte, wenn sie an das neugebildete Ziel/Invader™ hybridisierte (**Fig. 97**). Um den Signalgewinn auf Grund der Leistung der sequenziellen invasiven Spaltung zu verdeutlichen, wurde ein gewöhnlicher invasiver Spaltungsassay, wie vorstehend beschrieben, parallel durchgeführt.

[0800] Alle Reaktionen wurden doppelt durchgeführt. Jede herkömmliche (d. h. nicht-sequenzielle) invasive Spaltungsreaktion umfasste 1 µM 5'-Fluorescein-markiertes Sondenoligo 073-182 (5'F1-AGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAA-3'; Seq.-ID Nr. 157), 10 nM Stromaufwärts-Oligo 81-69-4 (5'-CTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGA-3'; Seq.-ID Nr. 155), 10 bis 100 attomol M13-Ziel-DNA, 10 mg/ml tRNA und 10 ng Pfu-FEN-1 in 10 µl 10 mM MOPS (pH 7,5), 8 mM $MgCl_2$ mit je 0,05 Tween-20 und Nonidet P-40. Alle diese Bestandteile mit Ausnahme des Enzyms und des $MgCl_2$ wurden in einem Volumen von 7 µl vereint und mit 10 µl Chill-Out™-Flüssigwachs überschichtet. Die Proben wurden auf die Reaktionstemperatur von 62°C erhitzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Pfu-FEN-1 und $MgCl_2$ in einem Volumen von 2 µl gestartet. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 62°C wurden die Reaktionen mit 10 µl 95% Formamid, 10 mM EDTA, 0,02% Methylviolett gestoppt.

[0801] Jede sequenzielle invasive Spaltungsreaktion umfasste 1 µM 5'-Fluorescein-markiertes Oligonukleotid 073-191 (die erste Sonde oder "Sonde1", 5'F1-TGGAGGTCAAAACATCG ATAAGTCGAAGAAAGGAAGGGAAGAAAT-3'; Seq.-ID Nr. 158), 10 nm Stromaufwärts-Oligonukleotid 81-69-4 (5'-CTTGACGGGGAAA GCCGGCGAACGTGGCGA-3'; Seq.-ID Nr. 155), 1 µM 5'-Fluorescein markiertes Oligonukleotid 106-32 (die zweite Sonde oder "Sonde2", 5'F1-TGTTTTGACCTCCA-3'; Seq.-ID Nr. 159), 1 bis 100 amol M13 Ziel-DNA, 10 mg/ml tRNA und 10 ng Pfu-FEN-1 in 10 µl 10 mM MOPS (pH 7,5), 8 mM $MgCl_2$ mit je 0,05% Tween-20 und Nonidet P-40. Alle diese Bestandteile mit Ausnahme des Enzyms und des $MgCl_2$ wurden in einem Volumen von 8 µl vereint und mit 10 µl Chill-Out™-Flüssigwachs überschichtet. Die Proben wurden auf die Reaktionstemperatur von 62°C erhitzt (diese Temperatur ist die optimale Temperatur zum Hybridisieren der Sonde 1 an die erste Ziel-DNA). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Pfu-FEN-1 und $MgCl_2$ in einem Volumen von 2 µl gestartet. Nach Inkubation für 15 Minuten bei 62°C wurde die Temperatur auf 58°C gesenkt (diese Temperatur ist die optimale Temperatur zum Hybridisieren der Sonde 2 an die zweite Ziel-DNA) und die Proben wurden für weitere 15 min inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 10 µl 95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,02% Methylviolett gestoppt.

[0802] Die Proben sowohl der gewöhnlichen als auch der sequenziellen invasiven Spaltungsreaktionen wur-

den 1 min auf 90°C erhitzt, kurz vor der Elektrophorese auf einem 20%igen denaturierenden Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat, pH 8,3, 1,4 mM EDTA. Das Gel wurde dann mit einem Molecular Dynamics FluorImager 595 analysiert. Das entstandene Bild ist in **Fig.** 101a dargestellt. Eine Graphik, die die Messung der Fluoreszenzintensität für jede der Produktbanden zeigt, ist in **Fig.** 101b gezeigt.

[0803] In **Fig.** 101a enthalten die Spuren 1–5 die Produkte, die in gewöhnlichen invasiven Spaltungsreaktionen erzeugt wurden, die entweder keine Ziel-DNA (Spur 1), 10 amol Ziel-DNA (Spur 2 und 3) oder 100 amol Ziel-DNA (Spur 4 und 5) enthielten. Die ungespaltene Sonde wird als eine dunkle Bande in jeder Spur etwa auf halber Höhe des Panels gesehen und die Spaltungsprodukte erscheinen als eine kleine, schwarze Bande in der Nähe der Unterseite des Panels, die Position des Spaltungsprodukts ist durch einen Pfeil auf der linken Seite von **Fig.** 101a gekennzeichnet. Die graue Leiter von Banden, die in den Spuren 1–5 gesehen wird, beruht auf thermischem Abbau der Sonde wie vorstehend diskutiert, und ist nicht von der An- oder Abwesenheit der Ziel-DNA abhängig. Die verbleibenden Spuren stellen Produkte dar, die in sequenziellen invasiven Spaltungsreaktionen erzeugt wurden, die 1 amol Ziel-DNA (Spuren 6 und 7), 10 amol Ziel-DNA (Spuren 8 und 9) und 100 amol Ziel-DNA (Spuren 10 und 11) enthielten. Die ungespaltene erste Sonde (Sonde 1; "1 ungespalten" markiert) wird auf der oberen Seite des Panels gesehen, während die gespaltene erste Sonde als "1:gespalten" angegeben ist. In ähnlicher Weise sind die ungespaltene und gespaltene zweite Sonde als "2:ungespalten" beziehungsweise "2:gespalten" angegeben.

[0804] Die in **Fig.** 101b gezeigte Graphik vergleicht die durch die herkömmliche Reaktion erzeugte Produktmenge ("Serien 1") mit der Produktmenge, die durch den zweiten Schritt der sequenziellen Reaktion erzeugt wurde ("Serien 2"). Der Grad der gemessenen Hintergrundfluoreszenz einer Reaktion, der Ziel-DNA fehlte, wurde von jeder Messung abgezogen. Es kann aus dieser, unter der Graphik angeordneten Tabelle ersehen werden, dass das Signal des gewöhnlichen invasiven Spaltungsassays, der 100 attomol Ziel-DNA enthielt, nahezu identisch zu dem Signal des sequenziellen invasiven Spaltungsassays war, in dem 1 attomol Ziel-DNA anwesend war, wodurch angezeigt wird, das der Einschluss einer zweiten Spaltungsstruktur die Empfindlichkeit des Tests 100- bis 200-fach erhöht. Diese Signalverstärkung erlaubt einen leichten Nachweis der Ziel-Nukleinsäuren im Subattomol-Bereich unter Verwendung des sequenziellen invasiven Spaltungsassays, während der Standardassay bei der Verwendung dieses Enzyms für nur 30 Minuten kein nachweisbares Produkt in Anwesenheit von 10 attomol Ziel-DNA erzeugte.

[0805] Wenn die Menge der Ziel-DNA 10- oder 100-fach in dem sequenziellen invasiven Spaltungsassay erniedrigt wurde, wurde die Intensität des Signals um den gleichen Anteil erniedrigt. Dies weist daraufhin, dass die quantitative Leistungsfähigkeit des invasiven Spaltungsassays beibehalten wird, auch wenn die Reaktionen in Serie durchgeführt werden, so dass auf diese Weise ein Nukleinsäurenachweisverfahren bereitgestellt wird, das sowohl empfindlich als auch quantitativ ist.

[0806] Während in diesem Beispiel die zwei verwendeten Sonden unterschiedliche optimale Hybridisierungstemperaturen hatten (d. h., das die Temperaturen empirisch bestimmt wurden, um die größten Umsatzraten unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zu ergeben) können die Sonden auch so ausgewählt (d. h. entworfen) werden, dass sie die gleiche optimale Hybridisierungstemperatur haben, so dass eine Temperaturverschiebung während der Inkubation nicht notwendig ist.

BEISPIEL 47

Die Produkte einer vollständigen sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion können nicht nachfolgende ähnliche Reaktionen kreuzkontaminieren

[0807] Wie in der Beschreibung der Erfindung diskutiert, bedeutet die aufeinander folgende Natur der vielfachen invasiven Spaltungsereignisse, die in der sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion auftreten im Gegensatz zur hin und her ablaufenden Natur der Polymerasekettenreaktion und ähnlicher Verdopplungsassays, dass die sequenzielle invasive Spaltungsreaktion nicht Ziel für Kontaminationen durch die Produkte derartiger Reaktionen ist, weil die Produkte der ersten Spaltungsreaktion bei der Erzeugung des neuen Signals in der zweiten Spaltungsreaktion beteiligt sind. Wenn eine große Menge einer vollständigen Reaktion zu einer neu zusammengestellten Reaktion zugegeben würde, würde der Hintergrund, der erzeugt würde, von der Menge der Ziel-DNA kommen, die auch eingebracht wurde, in Kombination mit der Menge von bereits gespaltener Sonde, die auch eingebracht wurde. In diesem Beispiel wird demonstriert, dass ein sehr großer Anteil einer primären Reaktion in die sekundäre Reaktion eingeführt werden muss, um ein signifikantes Signal zu erzeugen.

[0808] Eine erste oder primäre sequenzielle invasive Spaltungsreaktion wurde wie vorstehend beschrieben unter Verwendung von 100 amol Ziel-DNA durchgeführt. Ein zweiter Satz von 5 Reaktionen wurde wie in Bsp. 46 beschrieben zusammengestellt mit der Ausnahme, dass Teile der ersten Reaktion eingeführt wurden und keine zusätzliche Ziel-DNA eingeschlossen wurde. Die sekundären Reaktionen wurden wie vorstehend beschrieben gestartet und inkubiert und umfassten 0, 0,01, 0,1, 1 oder 10% des Materials der ersten Reaktion. Eine Kontrollreaktion, die 100 amol der Ziel-DNA enthielt wurde in den zweiten Satz auch eingeschlossen. Die Reaktionen wurden gestoppt, durch Elektrophorese aufgetrennt und wie vorstehend beschrieben sichtbar gemacht und das entstandene Bild ist in **Fig. 102** wiedergegeben. Die primäre Sonde, ungespaltene sekundäre Sonde und die gespaltene sekundäre Sonde sind auf der linken Seite als "1:gespalten", "2:ungespalten" beziehungsweise "2:gespalten" angegeben.

[0809] In **Fig. 102** zeigt die Spur 1 die Ergebnisse der ersten Reaktion mit dem angesammelten Produkt auf der Unterseite des Panels und Spur 2 zeigt eine 1:10 Verdünnung der selben Reaktion, um die Signalstärke zu zeigen, die von diesem Grad an Kontamination, ohne weitere Amplifikation, erwartet werden könnte. Die Spuren 3 bis 7 zeigen die Ergebnisse der sekundären Spaltungsreaktionen, die 0, 10, 1, 0,1 oder 0,01% des Materials der ersten Reaktion als Kontamination zugegeben enthielten, beziehungsweise zeigte Spur 8 eine Kontrollreaktion, der 100 amol Ziel-DNA zugefügt wurden, um die Aktivität des Systems in der sekundären Reaktion zu überprüfen. Die Signalstärke in Spur 4 ist so wie sie erwartet würde, wenn 10% des vorgespaltenen Materials überführt wird (wie in Spur 2) und 10% des überführten Zielmaterials der Reaktion aus Spur 1 weiter amplifizieren darf. In allen weiteren Verdünnungsstufen hebt sich das Signal nicht leicht vom Hintergrund ab. Diese Daten zeigen, dass ein Transfer im großen Maßstab von einer Reaktion zur anderen nachgewiesen werden kann, Kreuzkontaminationen durch die winzigen Mengen, die aus Aerosol oder Kontamination der Geräte erwartet werden würden, würden nicht einfach als falsch positives Ergebnis aufgefasst werden. Diese Daten zeigen auch, dass falls die Produkte einer Reaktion absichtlich in eine frische Probe übertragen werden, diese Produkte nicht an der neuen Reaktion teilnehmen und folglich die Stärke des Ziel-DNA-abhängigen Signals, das in dieser Reaktion erzeugt werden könnte, beeinflussen.

BEISPIEL 48

Nachweis von viraler DNA des humanen Cytomegalovirus durch invasive Spaltung

[0810] Das vorstehende Beispiel zeigt die Fähigkeit der invasiven Spaltungsreaktion winzige Mengen viraler DNA in Anwesenheit von humaner genomischer DNA nachzuweisen. In diesem Beispiel wurden die Sonde und Invader™-Oligonukleotide entworfen, um die 3104-3061-Region des hauptsächlichen Sofortgens des humanen Cytomegalovirus (HCMV) anzustreben, wie in **Fig. 103** gezeigt. In **Fig. 103** sind das Invader™-Oligo (89-44; Seq.-ID Nr. 160) und das Fluorescein-(F1)-markierte Sondenoligo (89-76; Seq.-ID Nr. 161) hybridisiert entlang einer Region des HCMV-Genoms gezeigt, die den Nukleotiden 3057–3110 der viralen DNA (Seq.-ID Nr. 162) entspricht. Die in diesem Beispiel verwendete Sonde ist eine Polypyrimidinsonde und, wie hierin gezeigt, verringert die Verwendung einer Polypyrimidinsonde das Hintergrundsignal, das durch die thermische Spaltung der Sondenoligos erzeugt wird.

[0811] Die genomische virale DNA wurde von Advanced Biotechnologies, Incorporated (Columbia, MD) vertrieben. Die DNA wurde durch Personal Advanced Biotechnologies auf eine Konzentration von 170 amol (1×10^8 Kopien) pro Mikroliter geschätzt (aber nicht nachgewiesen). Die Reaktionen wurden vierfach durchgeführt. Jede Reaktion umfasste 1 µM 5'-Fluorescein-markierten Sondenoligonukleotids 89-76 (Seq.-ID Nr. 161), 100 nM Invader™-Oligonukleotid, 1 ng/ml humane genomische DNA und eine der fünf Konzentrationen der HCMV Ziel-DNA in den Mengen, die über jeder Spur in **Fig. 104** angegeben sind, und 10 ng Pfu-FEN-1 in 10 µl 10 mM MOPS (pH 7,5), 6 mM $MgCl_2$ mit je 0,05% Tween-20 und Nonidet P-40. Alle diese Bestandteile mit Ausnahme der markierten Sonde, des Enzyms und des $MgCl_2$ wurden in einem Endvolumen von 7 µl vereint und mit 10 µl Chill-Out™-Flüssigwachs überschichtet. Die Proben wurden 5 min auf 95°C erhitzt, dann auf 62°C abgekühlt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Pfu-FEN-1 und $MgCl_2$ in einem Volumen von 3 µl gestartet. Nach 60 Minuten Inkubation bei 62°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 10 µl 95%-igem Formamid, 20 mM EDTA, 0,02% Methylviolett gestoppt. Die Proben wurden 1 min auf 90°C erhitzt, kurz vor der Elektrophorese auf einem 20%igen denaturierenden Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat, pH 8,3, 1,4 mM EDTA. Das Gel wurde dann mit einem Molecular Dynamics FluorImager 595 analysiert.

[0812] Das entstandene Bild ist in **Fig. 104** dargestellt. Die replizierten Reaktionen wurden in Gruppen von vier Spuren, unter Angabe des Gehalts der HCMV-Ziel-DNA in den Reaktionen unter jedem Satz von Spuren (0–170 amol) laufengelassen. Die ungespaltene Sonde wird im oberen Drittel des Panels ("Ungespalten

89-76") gesehen, während die Spaltungsprodukte in den unteren zwei Dritteln des Panels ("Gespalten 89-76") ersichtlich sind. Es kann gesehen werden, dass die Intensität des angehäuften Spaltungsprodukts proportional zur Menge der Ziel-DNA in der Reaktion ist. Zudem ist klar ersichtlich, dass in Reaktionen, die keine Ziel-DNA enthalten ("ohne Ziel-DNA"), die Sonde nicht gespalten wird, auch nicht vor dem Hintergrund humaner genomischer DNA. Während 10 ng humaner genomischer DNA in jeder dieser in **Fig. 104** gezeigten Reaktionen eingeschlossen war, hatte der Einschluss bis zu 200 ng genomischer DNA einen leichten Einfluss auf die Menge des angehäuften Produkts. Diese Daten deuten an, dass 200 ng pro 10 µl Reaktionsgemisch die maximale Menge genomischer DNA darstellt, die toleriert werden kann ohne wesentliche Verringerung der Signalanhäufung. Zur Bezugnahme übersteigt diese DNA-Menge das, was in 0,2 ml Urin nachgewiesen werden könnte (allgemein nachgewiesene Menge von HCMV bei Neugeborenen) und ist gleichwertig zu der Menge, die in 5 µl Vollblut gefunden werden würde.

[0813] Diese Ergebnisse zeigen, dass die gewöhnliche (d. h. nicht-sequenzielle) invasive Spaltungsreaktion ein empfindliches, spezifisches und reproduzierbares Mittel zum Nachweis viraler DNA ist. Es kann aus diesen Daten auch ersehen werden, dass die Verwendung einer Polypyrimidinsonde den Hintergrund, auf Grund thermischen Abbaus der Sonde, reduziert, wie in Beispiel 22 diskutiert. Der Nachweis von 1,7 amol Ziel-DNA ist annähernd gleichwertig zum Nachweis von 10^6 Kopien des Virus. Dies ist gleichwertig zur Zahl der viralen Genome, die in 0,2 ml Urin eines angeboren infizierten Neugeborenen gefunden werden könnten (10^2 bis 10^6 Genomäquivalente pro 0,2 ml; Stagno et al., J. Infect. Dis., 132: 568 [1975]). Die Verwendung der sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion würde den Nachweis auch kleinerer viraler DNA-Moleküle erlauben, die den Nachweis in Blut erleichtern (10^1 bis 10^5 virale Partikel pro ml; Pector et al., J. Clin. Microbiol., 30: 2359 [1992]) das eine sehr viel größere Menge an heterologer DNA mit sich führt.

[0814] Aus dem Vorstehenden wird klar, dass die Erfindung Reagentien und Verfahren bereitstellt, um den Nachweis und die Charakterisierung von Nukleinsäuresequenzen und Veränderungen in Nukleinsäuresequenzen nachzuweisen. Die Invader™-directed-cleavage-Reaktion und die sequenzielle Invader™-directed-cleavage-Reaktion stellen ideale Nachweisverfahren bereit, welche die Vorteile des direkten Nachweisassays (z. B. leichte Quantifizierung und minimales Risiko von eingeschleppter Kontamination) mit der Spezifität einer Hybridisierung mit zwei oder drei Oligonukleotiden verbinden.

[0815] Wie in der Beschreibung der Erfindung angegeben, kann die Verwendung der sequenziellen invasiven Spaltungsreaktionen das Problem der ersten oder primären ungespaltenen restlichen Sonde aufwerfen, die mit der sekundären Ziel-DNA wechselwirkt und entweder mit der Spaltsonde um die Bindung konkurriert oder Hintergrund durch geringe Spaltungsaktivität der sich ergebenden Struktur erzeugt. Dies ist als Diagramm in **Fig. 105** und **Fig. 106** gezeigt. In **Fig. 105** macht die dargestellte Reaktion Gebrauch von dem Spaltungsprodukt der ersten Reaktion, um ein Invader™-Oligonukleotid für eine zweite Spaltungsreaktion zu bilden. Die zwischen der sekundären Ziel-DNA, der sekundären Sonde und der ungespaltenen, primären Sonde gebildete Struktur ist in **Fig. 105** dargestellt, gezeigt als die Struktur auf der rechten Seite in Schritt 2a. Diese Struktur wird durch die 5'-Nukleasen erkannt und gespalten, wenn auch sehr wirkungslos (d. h. mit weniger als etwa 1% bei den meisten Reaktionsbedingungen). Nichtsdestoweniger ist das entstandene Produkt nicht von dem spezifischen Produkt unterscheidbar und kann so folglich zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Der gleiche Effekt kann auftreten, wenn die gespaltene primäre Sonde ein integriertes Invader™/Ziel-(IT-)Molekül herstellt, wie in Beispiel 46 beschrieben; die Bildung des unerwünschten Komplexes ist schematisch in **Fig. 106** dargestellt, als die Struktur auf der rechten Seite in Schritt 2a gezeigt.

[0816] Die Verbesserungen, die durch den Einschluss der Arrestor™-Oligonukleotide verschiedener Zusammensetzungen in jede dieser Arten von sequenziellen Invader™-Tests bereitgestellt wurden, sind in den nachstehenden Beispielen veranschaulicht. Diese Arrestor™-Oligos sind so gestaltet, dass sie die verbleibende ungespaltene Sonde der ersten Spaltungsreaktion in den Serien bindet und dabei die Effektivität steigert und den nicht spezifischen Hintergrund in der nachfolgenden Reaktion bzw. den nachfolgenden Reaktionen reduziert.

BEISPIEL 49

Die Arrestor™-Oligonukleotide verbessern die Empfindlichkeit vielfacher sequenzieller invasiver Spaltungsassays

[0817] In diesem Beispiel wird der Einfluss dargestellt, ein Arrestor™-Oligonukleotid für die Erzeugung eines Signals unter Verwendung des IT-Sondensystems, dargestellt in **Fig. 97** und **Fig. 106**, einzubeziehen. Das Arrestor™-Oligonukleotid hybridisiert an die primäre Sonde hauptsächlich an dem Anteil, der die Zielnukleinsäure während der ersten Spaltungsreaktion erkennt. Zusätzlich zur Untersuchung der Einflüsse des Zugebens ei-

nes Arrestor™Oligos wurden die Einflüsse unter Verwendung der Arrestor™Oligonukleotide, die sich in komplementär unterschiedlichen Abständen in den Bereich der primären Sonde ausdehnten, der die sekundäre IT-Struktur zusammensetzte, auch untersucht.

[0818] Diese Einflüsse wurden in Reaktionen verglichen, die die Ziel-DNA über einen Konzentrationsbereich umfassten oder denen Ziel-DNA fehlte, um den Grad nicht spezifischen Hintergrunds in jedem Satz von Reaktionsbedingungen zu demonstrieren.

[0819] Die Ziel-DNA für diese Reaktionen war ein Fragment, das die volle Länge des Hepatitis B-Genoms vom Stamm des Serotyps adw umfasste. Dieses Material wurde unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion vom Plasmid pAM6 (ATCC Nr. 45020D) erzeugt. Die PCRs wurden unter Verwendung eines vektorbasierten Vorwärtsprimers, Oligo Nr. 156-022-01 (5'-ggcgaccacacccgtcctgt-3'; Seq.-ID Nr. 168) und einem Rückwärtsprimer, Oligo Nr. 156-022-02 (5'-ccacgatgcgtccggcgtag-3', Seq.-ID Nr. 169) durchgeführt, um die volle Länge der HBV-Insertionssequenz zu amplifizieren, ein Amplicon von 3,2 kb. Die Zyklusbedingungen umfassten eine Denaturierung des Plasmids bei 95°C für 5 Minuten gefolgt von 30 Zyklen von 95°C, 30 Sekunden; 60°C, 40 Sekunden; und 72°C, 4 Minuten. Diesen folgte eine Extension bei 72°C für 10 Minuten zum Schluss. Das entstandene Amplicon, als pAM6 Nr. 2 bezeichnet, wurde auf 2 M NH_4OAc eingestellt und durch Fällung durch Isopropanol gewonnen. Nach der Vakuumtrocknung, wurde die DNA in 10 mM Tris pH 0,0, 0,1 mM EDTA gelöst. Die Konzentration wurde durch OD_{200}-Messung und durch einen Invader™-Test im Vergleich zu einem Standard bekannter Konzentration bestimmt.

[0820] Die Invader™-Reaktionen wurden folgendermaßen durchgeführt. Fünf Grundmischungen als "A", "B", "C", "D" und "E" bezeichnet wurden zusammengestellt; alle Mischungen enthielten 12,5 mM MOPS, pH 7,5, 500 fmol primäres Invader™-Oligo Nr. 218-55-05 (Seq.-ID Nr. 171), 10 ng humane genomische DNA (Novagen) und 30 ng AfuFEN1-Enzym für jede 8 µl Mischung. Mischung A enthielt keine zugesetzte genomische HBV-Amplicon-DNA; Mischung B enthielt 600 Moleküle der genomischen HBV-Amplicon-DNA pAM6Nr. 2; Mischung C enthielt 6000 Moleküle pAM6Nr. 2; Mischung D enthielt 60000 Moleküle pAM6Nr. 2; und Mischung E enthielt 600000 Moleküle pAM6Nr. 2. Die Mischungen wurden auf die Reaktionsröhrchen aliquotiert, 8 µl/Röhrchen: Mischung A in die Röhrchen 1, 2, 11, 12, 21 und 22; Mischung B in die Röhrchen 3, 4, 13, 14, 23 und 24; Mischung C in die Röhrchen 5, 6, 15, 16, 25 und 26; Mischung D in die Röhrchen 7, 8, 17, 18, 27 und 28; und Mischung E in die Röhrchen 9, 10, 19, 20, 29 und 30. Die Proben wurden 4 Minuten bei 95°C inkubiert, um die genomische HBV-Amplicon-DNA zu denaturieren. Die Reaktionen wurden dann auf 67°C abgekühlt und 2 µl einer Mischung mit 37,5 mM $MgCl_2$ und 2,5 pmol 218-95-06 (Seq.-ID Nr. 183) für jede 2 µl, wurde zu jeder Probe gegeben. Die Proben wurden 60 Minuten bei 67°C inkubiert. Drei sekundäre Reaktionsgrundmischungen wurden hergestellt, alle Mischungen enthielten 10 pmol des sekundären Sondenoligonukleotids Nr. 228-48-04 (Seq.-ID Nr. 173) für jede 2 µl der Mischung. Mischung 2A enthielt kein zusätzliches Oligonukleotid, Mischung 2B enthielt 5 pmol "Arrestor™"-Oligo Nr. 218-95-03 (Seq.-ID Nr. 184) und Mischung 2C enthielt 5 pmol des Arrestor™"-Oligo Nr. 218-95-01 (Seq.-ID Nr. 174). Nach 60 Minuten Inkubation bei 67°C (die vorstehend beschriebene primäre Reaktion), wurden 2 µl der sekundären Reaktionsmischung zu jeder Probe gegeben: Mischung 2A wurde zu den Proben Nr. 1–10 gegeben; Mischung 2B wurden zu den Proben Nr. 11–20 gegeben; und Mischung 2C wurde zu den Proben Nr. 21–30 gegeben. Die Temperatur wurde auf 52°C eingestellt und die Proben wurden 30 Minuten bei 52°C inkubiert. Die Reaktionen wurden dann durch Zugabe von 10 µl einer Lösung von 95% Formamid, 5 mM EDTA und 0,02 Kristallviolett gestoppt. Alle Proben wurden 2 Minuten auf 95°C erhitzt und 4 µl jeder Probe wurden durch Elektrophorese auf einem 20%igen denaturierenden Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3) und 1,4 mM EDTA aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung des Molecular Dynamics Fluoroimager 595, Anregung 488, Emission 530 abgebildet. Die entstandenen Bilder sind in **Fig. 107** gezeigt.

[0821] In **Fig. 107** zeigt Panel A die Ergebnisse der Titration der Ziel-DNA wenn kein Arrestor™-Oligonukleotid in die sekundäre Reaktion eingeschlossen wurde; Panel B zeigt die Ergebnisse der gleichen Titration unter Verwendung eines Arrestor™-Oligos das 2 nt in den komplementären Nicht-Ziel-DNA-Bereich der primären Sonde hineinreichte; und Panel C zeigte die Ergebnisse derselben Titration unter Verwendung eines Arrestor™-Oligonukleotids, das 4 nt in den komplementären Nicht-Ziel-DNA-Bereich der primären Sonde hineinreichte. Das Produkt der sekundären Spaltungsreaktionen ist als eine Bande in der Nähe der Unterseite jedes Panels sichtbar. Den ersten zwei Spuren jedes Panels (d. h. 1 und 2, 11 und 12, 21 und 22, fehlte Ziel-DNA und das Signal, das mit der Produktbande wanderte, stellte den nichtspezifischen Hintergrund unter jedem Satz von Bedingungen dar.

[0822] Durch Sichtprüfung dieser Panels kann gesehen werden, dass das Hintergrundsignal beides Mal reduziert ist und durch den Einschluss jeder Art von Arrestor™-Oligonukleotiden vorhersagbarer geworden ist.

Zusätzlich zur Reduktion des Hintergrunds in den Kontrollspuren ohne Ziel-DNA ist die Hintergrundreduzierung in den Reaktionen, die verdünntere Mengen der Ziel-DNA umfassten, verringert, was zu einem Signal führte, das eine genauere Reflexion der in der Reaktion enthaltenen Ziel-DNA ist, und das folglich die quantitative Bandbreite der vielfachen sequenziellen invasiven Spaltungsreaktionen verbessern wird.

[0823] Um den Einfluss des Arrestor™-Oligonukleotids in die sekundäre Spaltungsreaktion unter diesen Bedingungen zu quantifizieren, wurden die durchschnittlichen Produktbandensignale der Reaktionen mit der größten Menge an Ziel-DNA (d. h. durchschnittliche Signale der Spuren 9 und 10, 19 und 20 und Spuren 29 und 30) mit dem durchschnittlichen Signal der Kontrollspuren ohne Ziel-DNA für jedes Panel bestimmt, um "vielfach über Hintergrund", den Faktor der Signalamplifikation über Hintergrund unter jedem Satz von Bedingungen zu bestimmen. Für die Reaktionen ohne Arrestor™-Oligo, Panel A war der "vielfach über Hintergrund" 5,3; für Panel B war der "vielfach über Hintergrund" 12,7; und für Panel C war der "vielfach über Hintergrund" 13,4, was angibt, dass in diesem System der Einschluss von jedem Arrestor™-Oligo die Spezifität des Signals mindestens verdoppelt gegenüber Arrestor™-Oligo-freien-Reaktionen und das Arrestor™-Oligo, das etwas weiter in den komplementären Nicht-Ziel-DNA-Bereich hineinreichte, etwas wirksamer sein kann, zumindest in dieser Ausführungsform des Systems. Dies zeigt klar die Vorteile der Verwendung eines Arrestor™-Oligos, um die Spezifität dieser Reaktionen zu steigern, ein Vorteil der insbesondere von Nutzen ist bei niedrigen Spiegeln von Zielnukleinsäure.

BEISPIEL 50

"Arrestor™-Oligonukleotide" erlauben die Verwendung höherer Konzentrationen der primären Sonde ohne ansteigendes Sintergrundsignal

[0824] Es wurde in Beispiel 36 gezeigt, dass die steigende Konzentration der Sonde in der invasiven Spaltung die Signalstärke drastisch erhöhen kann, die für eine gegebene Menge von Ziel-DNA erzeugt wurde. Da nicht beabsichtigt ist, die Erklärung auf irgendeinen Mechanismus festzulegen, wird angenommem, dass es durch die Tatsache verursacht wird, dass steigende Konzentrationen der Sonde die Geschwindigkeit der Spaltungsreaktion steigern, bei der die gespaltene Sonde durch eine ungespaltene Sonde verdrängt wird, die auf diese Weise die ersichtliche Geschwindigkeit der Spaltungsreaktion steigert. Unglücklicherweise konnte dieser Einfluss nicht bereits in der primären Reaktion eines vielfach sequenziellen Invader™-Tests angewendet werden, weil die verbleibende ungespaltene primäre Sonde an die sekundäre Ziel-DNA in Konkurrenz zu den gespaltenen Molekülen hybridisieren kann, wobei die Wirksamkeit der sekundären Reaktion reduziert wird. Erhöhte Konzentrationen der primären Sonde verschlimmern dieses Problem. Außerdem können die entstandenen Komplexe, wie vorstehend beschrieben, mit niedriger Aktivität gespalten werden, und somit zum Hintergrund beitragen. Daher kann der Anstieg der primären Sonde den doppelt negativen Einfluss haben, dass sowohl die sekundäre Reaktion verlangsamt wird und der Grad dieser Form von für die Ziel-DNA nicht spezifischem Hintergrund ansteigt. Die Anwendung eines Arrestor™-Oligos, um die verbleibende primäre Sonde abzusondern oder zu neutralisieren, erlaubt es diesen konzentrationssteigernden Einfluss auf diese sequenziellen Reaktionen anzuwenden.

[0825] Um diesen Einfluss zu veranschaulichen, wurden 2 Sätze an Reaktionen durchgeführt. Im ersten Satz der Reaktionen, wurden die Reaktionen unter Verwendung einer Konzentrationsreihe der primären Sonde durchgeführt, aber kein Arrestor™-Oligonukleotid wurde in der sekundären Reaktion bereitgestellt. Im zweiten Satz der Reaktionen, wurden die gleichen Sondenkonzentrationen verwendet, aber ein Arrestor™-Oligo wurde für die sekundären Reaktionen zugegeben.

[0826] Alle Reaktionen wurden doppelt ausgeführt. Primäre Invader™-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 10 µl ausgeführt und enthielten: 10 mM MOPS, pH 7,5, 7,5 mM $MgCl_2$, 500 fmol primäres Invader™-Oligo (218-55-05; Seq.-ID Nr. 171); 30 ng des AfuFEN1-Enzyms und 10 ng humaner genomischer DNA. 100 zeptomol HBV pAM6Nr. 2-Amplicon wurden in alle, auch nummerierte Reaktionen (durch Bezugnahme auf **Fig. 108A** und B) eingeschlossen. Die Reaktionen beinhalteten 10 pmol, 20 pmol, 50 pmol, 100 pmol oder 150 pmol der primären Sonde (218-55-02; Seq.-ID Nr. 170). MOPS, Ziel-DNA und Invader™-Oligonukleotide wurden in einem Endvolumen von 7 µl vereinigt. Die Proben wurden 5 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert, dann auf 67°C abgekühlt. Während der 5-minütigen Denaturierung, wurden $MgCl_2$, Sonde und Enzymmischung vereint. Die primären Invader™-Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 µl $MgCl_2$ Sonde und Enzymmischung bis in den vorstehend angegebenen Endkonzentrationen gestartet. Die Reaktionen wurden 30 Minuten bei 67°C inkubiert. Die Reaktionen wurden dann auf 52°C abgekühlt und jede primäre Invader™-Reaktion erhielt folgende sekundäre Reaktionskomponenten in einem Gesamtvolumen von 4 µl: 2,5 pmol sekundäre Ziel-DNA (Oligonummer 218-95-04, Seq.-ID Nr. 172); 10 pmol sekundäre Sonde (Oligonummer 228-48-04; Seq.-ID Nr.

173). Die Reaktionen, die das Arrestor™-Oligonukleotid einschlossen, hatten entweder 40 pmol, 80 pmol, 200 pmol, 400 pmol oder 600 pmol des Arrestor™-Oligos (Oligonummer 218-95-01; Seq.-ID Nr. 174), das mit 4-fachem Überschuss über die primäre Sondenmenge mit diesem Gemisch für jede Reaktion zugegeben wurde. Die Reaktionen wurden 30 Minuten bei 52°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 10 µl einer Lösung von 95%-igem Formamid, 10 mM EDTA und 0,02% Kristallviolett gestoppt. Alle Proben wurden 1 Minute auf 95°C erhitzt und je 4 µl jeder Probe wurden durch Elektrophorese auf einem 20% denaturierendem Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3) und 1,4 mM EDTA aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung eines Molecular Dynamics Fluoroimagers 595, Anregung 488, Emission 530 abgebildet. Die entstandenen Bilder für die Reaktionen, entweder ohne oder mit einem Arrestor™-Oligonukleotid sind in **Fig. 108A** beziehungsweise **Fig. 108B** gezeigt. Die Produkte der Spaltung der sekundären Sonde sind als Sonde in der Nähe der Unterseite jedes Panels zu sehen.

[0827] In **Fig. 108A** zeigen Spurensatz 1 und 2 die Ergebnisse mit 10 mmol der primären Sonde; 3 und 4 hatten 20 mmol; 5 und 6 hatten 50 pmol; 7 und 8 hatten 100 pmol; und 9 und 10 hatten 150 pmol. Es konnte bei der Sichtkontrolle gesehen werden, dass die Zunahme der Menge der primären Sonde den vereinten Einfluss besitzt den Hintergrund in den Spuren ohne Ziel-DNA (ungerade Zahlen) leicht anzuheben, während er das spezifische Signal in Anwesenheit der Ziel-DNA reduziert (auch nummerierte Spuren), und daher zeigt die Reduktion der Spezifität der Reaktion, wenn sie als Maß des "vielfach über Hintergrund" betrachtet wird, dass der Ansatz das Signal zu verstärken durch Zunahme der Sonde in diesen sequenziellen Reaktionen nicht angewendet werden kann.

[0828] In **Fig. 108B** zeigen Spurensatz 1 und 2 die Ergebnisse mit 10 pmol der primären Sonde; während 3 und 4 20 pmol hatten; 5 und 6 50 pmol hatten; 7 und 8 100 pmol hatten; und 9 und 10 150 pmol hatten. Zusätzlich schloss jede Reaktion einen 4-fachen molaren Überschuss des Arrestor™-Oligonukleotids ein, der vor der sekundären Spaltungsreaktion zugegeben wurde. Es kann bei der Sichtkontrolle gesehen werden, dass der Hintergrund in den Spuren ohne Ziel-DNA (ungerade Zahlen) in allen Fällen niedriger ist, während das spezifische Signal in Anwesenheit der Ziel-DNA (auch nummerierte Spuren) zunimmt mit zunehmender Menge der primären Sonde, was zu einer größeren "vielfach über Hintergrund"-Empfindlichkeit bei diesem Ziel-DNA-Spiegel führt.

[0829] Um diese Einflüsse quantitativ zu vergleichen, wurden die Fluoreszenzsignale der Produkte, sowohl der nicht spezifischen und spezifischen Spaltung, gemessen. Die Ergebnisse sind in **Fig. 108C** graphisch dargestellt, aufgetragen als ein Maß des Prozentsatzes der sekundären, während der Reaktion gespaltenen Sonde, im Vergleich zur Menge der primären verwendeten Sonde. Die Auswertung der Plots der Reaktionen ohne Ziel-DNA bestätigen, dass der Hintergrund in Abwesenheit des Arrestor™-Oligos im Allgemeinen ungefähr 2-fach höher ist, und dass beide mit zunehmenden Sondenmengen leicht ansteigen. Die spezifischen Signale zwischen den zwei Sätzen der Reaktion unterscheiden sich jedoch drastischer. Während das Signal in Reaktionen ohne Arrestor™-Oligo sinkt, während die primäre Sonde zunimmt, fährt das Signal in den Reaktionen mit Arrestor™-Oligo fort anzusteigen. Bei der höchsten Konzentration der primären Sonde, die getestet wurde, hatten die Reaktionen ohne Arrestor™-Oligo ein spezifisches Signal, das nur 1,7-fach über Hintergrund war, während die Reaktionen mit Arrestor™-Oligo 100 zmol (60000 Kopien) an Ziel-DNA erkannten mit einem Signal, das 6,5-fach über Hintergrund war, was folglich die Verbesserung bei der sequenziellen invasiven Spaltungsreaktion zeigt, wenn ein Arrestor™-Oligonukleotid eingeschlossen ist.

BEISPIEL 51

Modifizierte Rückgrate verbessern die Leistungsfähigkeit von Arrestor™-Oligonukleotiden vollständig natürlicher "Arrestor™"-Oligos ohne 3'Amin

[0830] Die in den vorstehenden zwei Beispielen beschriebenen Reaktionen verwendeten Arrestor™-Oligonukleotide, die unter Verwendung eines 2'-O-Methylribose-Rückgrats aufgebaut wurden und die eine positiv geladene Aminogruppe am 3'-terminalen Nukleotid enthielten. Die Modifikationen wurden besonders deshalb gemacht, um die Wechselwirkung des Enzyms mit dem primäre Sonde/Arrestor™-Komplex zu reduzieren. Während der Entwicklung der vorliegenden Erfindung, wurde festgestellt, dass die 2'-O-Methyl-modifizierten Oligonukleotide ein wenig resistent gegen die Spaltung durch die 5'-Nukleasen sind, ebenso, dass sie langsam durch Nukleasen abgebaut werden, wenn sie in antisense-Anwendungen verwendet werden (siehe z. B. Kawasaki et al., J. Med. Chan., 36: 831 [1993]).

[0831] Zudem reduziert, wie in Beispiel 35 gezeigt, die Anwesenheit einer Aminogruppe am 3'-Ende eines Oligonukleotids dessen Fähigkeit zur direkten invasiven Spaltung. Um die Möglichkeit zu verringern, dass das

Arrestor™-Oligonukleotid eine Spaltungsstruktur auf diese Weise bilden würde, wurde eine Aminogruppe beim Entwurf der Experimente in diesem und anderen Beispielen eingeschlossen.

[0832] Anfängliche Entwürfe der Arrestor™-Oligonukleotide (manchmal als "Blocker" erwähnt) umfassen nicht diese Modifikationen, und von diesen Molekülen wurde festgestellt, dass sie keinen Nutzen für die Reaktion der Hindergrundspaltung in den sequenziellen invasiven Spaltungsassays bereitstellen und in der Tat manchmal zum Hintergrund mit beitragen, indem sie Spaltung an einer unerwarteten Stelle induzieren, vermutlich durch Bereitstellen irgendeines Elements zu einer alternativen Spaltungsstruktur. Die Einflüsse von natürlichen und modifizierten Arrestor™-Oligos auf das Hindergrundrauschen in diesen Reaktionen sind in diesem Beispiel untersucht.

[0833] Die Wirksamkeit eines vollständig natürlichen "Arrestor™"-Oligos (d. h. ein Arrestor™-Oligo, das nicht irgendwelche Basenanaloga oder Modifikationen enthält) wurde durch identischen Vergleich von Reaktionen, denen Arrestor™-Oligos fehlten, überprüft. Alle Reaktionen wurden doppelt ausgeführt und folgendermaßen durchgeführt. Zwei Grundmischungen wurden zusammengestellt, von denen jede 12,5 mM MOPS, pH 7,5, 500 fmol primäres Invader™-Oligonukleotid Nr. 218-55-05 (Seq.-ID Nr. 171), 10 ng humane genomische DNA (Novagen) und 30 ng AfuFEN1-Enzym für jede Mischung von 8 µl enthielten. Mischung A enthielt keine zugesetzte genomische HBV-Amplicon-DNA, Mischung B einhielt 600000 Moleküle von genomischer HBV-Amplicon-DNA, pAM6Nr. 2. Die Mischungen wurden folgendermaßen auf Reaktionsröhrchen in Aliquots von 8 µl verteilt: Mischung A auf die Röhrchen 1, 2, 5 und 6; und Mischung B auf die Röhrchen 3, 4, 7 und 8. Die Proben wurden 4 Minuten bei 95°C inkubiert, um die genomische HBV-Amplicon-DNA zu denaturieren. Die Reaktionen wurden dann auf 67°C abgekühlt und 2 µl der Mischung mit 37,5 mM $MgCl_2$ und 10 pmol Nr. 218-55-02B (Seq.-ID Nr. 185) für jede 2 µl, wurde zu jeder Probe gegeben. Die Proben wurden dann 30 Minuten bei 67°C inkubiert. Zwei sekundäre Grundmischungen wurden hergestellt, jede enthielt 10 pmol des sekundären Sondenoligos Nr. 228-48-04N (Seq.-ID Nr. 178) und 2,5 pmol des sekundären Zieloligonukleotids Nr. 218-95-04 (Seq.-ID Nr. 172) für jede 3 µl der Mischung. Mischung 2A enthielt keine zusätzlichen Oligonukleotide, während Mischung 2B 50 pmol des natürlichen, "Arrestor™"-Oligonukleotids Nr. 241-62-02 (Seq.-ID Nr. 186) enthielt. Nach der anfänglichen 30-Minuten-Inkubation bei 67°C, wurde die Temperatur auf 52°C eingestellt und 3 µl der sekundären Reaktionsmischung wurden zu jeder Probe folgendermaßen gegeben: Mischung 2A wurde zu den Proben Nr. 1–4 gegeben; Mischung 2B wurde zu den Proben Nr. 5–8 gegeben. Die Proben wurden dann 30 Minuten bei 52°C inkubiert. Die Reaktionen wurden dann durch Zugabe von 10 µl einer Lösung von 95% Formamid, 10 mM EDTA und 0,02% Kristallviolett gestoppt.

[0834] Jede der Proben wurde 2 Minuten auf 95°C erhitzt und 4 µl jeder Probe wurden durch Elektrophorese auf einem 20% denaturierenden Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer von 45 mM Tris-Borat (pH 8,3) und 1,4 mM EDTA aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung eines Molecular Dynamics Fluoroimager 595, Anregung 488, Emission 539 abgebildet. Das entstandene Bild ist in **Fig. 109A** gezeigt.

[0835] Um die Einflüsse der verschiedenen Modifikationen, die in den Arrestor™-Oligos eingeführt wurden, zu vergleichen, wurden Reaktionen unter Verwendung von Arrestor™-Oligos mit vollständig natürlichen Basen durchgeführt, die aber ein 3'-terminales Amin enthielten; von Arrestor™-Oligos mit dem 3'-Anteil, der aus 2'-O-Methylnukleotiden aufgebaut ist, zusätzlich zum 3'-terminalen Amin; und von Arrestor™-Oligos, die insgesamt aus 2'-O-Methylnukleotiden zusammengesetzt waren, zusätzlich zum 3'-terminalen Amin. Diese wurden mit Reaktionen verglichen, die ohne Arrestor™-Oligo durchgeführt wurden. Die Reaktionen wurden folgendermaßen ausgeführt. Zwei Grundmischungen wurden zusammengestellt, alle Mischungen enthielten 14,3 mM MOPS, pH 7,5; 500 fmol primäres Invader™-Oligo Nr. 218-55-05 (Seq.-ID Nr. 171) und 10 ng humane genomische DNA (Novagen) für jede 7 µl der Mischung. Mischung A enthielt keine zugesetzte genomische HBV-Amplicon DNA, Mischung B enthielt 600000 Moleküle genomische HBV-Amplicon-DNA, pAM6Nr. 2. Die Mischungen wurden auf die Reaktionsröhrchen mit 7 µl/Röhrchen verteilt: Mischung A auf die Röhrchen 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14; und Mischung B auf die Röhrchen 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 und 16. Die Proben wurden 4 Minuten auf 95°C erwärmt um die HBV-DNA zu denaturieren. Die Reaktionen wurden dann auf 67°C abgekühlt und 3 µl einer Mischung mit 25 mM $MgCl_2$, 25 pmol 218-55-02B (Seq.-ID Nr. 185) und 30 ng AfuFEN1-Enzym pro 3 µl wurden zu jeder Probe gegeben. Die Proben wurden dann 30 Minuten bei 67°C inkubiert. Vier sekundäre Grundmischungen wurden hergestellt. Alle Mischungen enthielten 10 pmol des sekundären Sondenoligonukleotids Nr. 228-48-04B (Seq.-ID Nr. 190) und 2,5 pmol sekundäres Zieloligonukleotid Nr. 218-95-04 (Seq.-ID Nr. 172) für jede 3 µl der Mischung. Mischung 2A enhielt keine zusätzlichen Oligonukleotide, während Mischung 2B 100 pmol des natürlichen Amin-Arrestor™-Oligonukleotids Nr. 241-62-01 (Seq.-ID Nr. 187) enthielt, während Mischung 2D 100 pmol des vollständigen O-Methyl-Amin-Oligonukleotids Nr. 241-64-01 (Seq.-ID Nr. 189) enthielt. Nach der anfänglichen 30-Minuten-Inkubation bei 67°C, wurde die Temperatur auf

52°C eingestellt und 3 µl einer sekundären Reaktionsmischung wurden folgendermaßen zu jeder Probe gegeben: Mischung 2A wurde zu den Proben Nr. 1–4 gegeben; Mischung 2B wurde zu den Proben Nr. 5–8 gegeben; Mischung 2C wurde zu den Proben Nr. 9–12 gegeben; und Mischung 2D wurde zu den Proben Nr. 13–16 gegeben. Die Proben wurden 30 Minuten bei 52°C inkubiert, dann durch Zugabe von 10 µl einer Lösung von 95% Formamid, 10 mM NaEDTA und 0,2% Kristallviolett gestoppt.

[0836] Alle Proben wurden 2 Minuten auf 95°C erhitzt und 4 µl jeder Probe wurden durch Elektrophorese auf einem 20% denaturierenden Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3) und 1,4 mM EDTA aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung eines Molecular Dynamics Fluoroimager 595, Anregung 488, Emission 530 abgebildet. Das entstandene Bild ist in **Fig. 109B** gezeigt.

[0837] In **Fig. 109A** zeigt das linke Panel, die Reaktionen, denen ein Arrestor™-Oligo fehlt, während das rechte Panel die Daten von Reaktionen zeigt, die vollständig natürliche Arrestor™-Oligonukleotide einschlossen. Die ersten zwei Spuren jedes Panels sind von Kontrollen ohne Ziel-DNA, der zweite Satz an Spuren enthielt Ziel-DNA. Die Produkte der Spaltung sind im unteren ersten Viertel jedes Panels sichtbar. Die Position an der die spezifischen Reaktionsprodukte laufen sollten ist durch Pfeile rechts und links angezeigt.

[0838] Es kann durch Auswertung dieser Daten gesehen werden, dass die Reaktionen, die in Abwesenheit der Arrestor™-Oligo ablaufen, reproduzierbare Qualität zwischen den Replikaten zeigen und bemerkenswerte Spaltung nur, wenn die Ziel-DNA anwesend ist. Dagegen verursacht die Zugabe von einem anderen unmodifizierten Oligonukleotid in die Reaktionen große Abweichungen zwischen den Replikatspuren (z. B. Spuren 5 und 6 wurden mit den gezeigten Reaktanten bereitgestellt, produzierten aber bemerkenswert verschiedene Ergebnisse). Die Einführung der vollständig natürlichen Arrestor™-Oligonukleotide produzierte eher Hintergrund, als ihn in diesen Spuren ohne Ziel-DNA zu reduzieren, und förderte die Spaltung an anderen Stellen (d. h. die Banden, die andere als solche waren, die durch die Pfeile seitlich der Panels angezeigt wurden). Aus diesen Gründen wurden die vorstehend beschriebenen Modifikationen, deren Einflüsse in **Fig. 109B** gezeigt sind, eingeschlossen.

[0839] Die ersten 4 Spuren der **Fig. 109B** zeigen die Produkte der zweifachen Reaktionen ohne Arrestor™-Oligo mit oder ohne die HBV-Ziel-DNA (Spuren 1, 2, beziehungsweise 3, 4); die nächsten 4 Spuren 5, 6 und 7, 8 verwendeten ein natürliches Arrestor™-Oligonukleotid mit einem 3'-terminalem Amin, die Spuren 9, 10 und 11, 12 verwendeten Arrestor™-Oligo mit einem 3'-Anteil aufgebaut aus 2'-O-Methylnukleotiden und mit einem 3'-terminalen Amin; die Spuren 13, 14 und 15, 16 verwendeten das Arrestor™-Oligo, das vollständig aus 2'-O-Methylnukleotiden zusammengesetzt ist und ein 3'-terminales Amin hat. Die Produkte der Spaltung der sekundären Sonde sind im unteren Drittel des Panels sichtbar.

[0840] Sichtkontrolle dieser Daten zeigt, dass die Zugabe des 3'-terminalen Amins zum natürlichen Arrestor™-Oligo die abweichende Spaltung, die in **Fig. 109A** gesehen wird, unterdrückt, aber dieses Arrestor™-Oligo verbessert nicht die Leistungsfähigkeit der Reaktionen, im Vergleich zu den Kontrollen ohne Arrestor™-Oligo. Dagegen reduziert die Verwendung der 2'-O-Methylnukleotide in dem Körper des Arrestor™-Oligonukleotids, ob teilweise oder vollständig substituiert, den Hintergrund. Um die verhältnismäßigen Einflüsse dieser Modifikationen zu quantifizieren, wurde die Fluoreszenz von jeder der mitwandernden Produktbanden gemessen, die Signale der doppelten Spuren wurden gemittelt und das "vielfach über Hintergrund" wurde für jede Reaktion mit Zielnukleinsäure berechnet.

[0841] Wenn Arrestor™-Oligo weggelassen wird, war das für Ziel-DNA spezifische Signal (Spuren 3, 4) 27-fach über Hintergrund ohne Ziel-DNA; das natürliche Arrestor™-Oligo + Amin ergab ein Signal von 17-fach über Hintergrund; das teilweise 2'-O-Methyl + Amin ergab ein Signal von 47-fach über Hintergrund; und das vollständige 2'-O-Methyl + Amin ergab ein Signal von 33-fach über Hintergrund.

[0842] Diese Figuren zeigen, dass beide Modifikationen einen nützlichen Einfluss auf die Spezifikation des vielfachen sequenziellen invasiven Spaltungsassays haben können. Sie zeigen auch, dass die Verwendung des 2'-O-Methyl-Rückgrats, entweder teilweise oder ganz, die Spezifität dieser Reaktionen bemerkenswert verbessert. Es ist beabsichtigt, dass bei verschiedenen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, deren Anzahl von Modifikationen, die entweder das Arrestor™-Oligo oder den Komplex, den es mit der primären Ziel-DNA bildet, resistent gegen Nukleasen machen, ähnliche Steigerung bereitstellen werden.

BEISPIEL 52

Einfluss der Arrestor™-Oligolänge auf die Signalsteigerung in vielfachen sequenziellen invasiven Spaltungsassays

[0843] Wie in der Beschreibung der Erfindung erwähnt, hängt die optimale Länge eines Arrestor™-Oligonukleotides von der Form der anderen Nukleinsäureelemente der Invader™-Reaktionen ab, insbesondere von der Form der primären Sonde. In diesem Beispiel wurden die Einflüsse des Veränderns der Länge des Arrestor™-Oligonukleotids in einem System, das zwei verschiedene sekundäre Sonden verwendet, untersucht. Ein schematisches Diagramm, das diese Arrestor™-Oligos alignt zeigt, wie sie an das primäre Sondenoligonukleotid hybridisieren würden, ist in **Fig. 110C** bereitgestellt. In dieser Figur ist die Region der primären Sonde, welche die Zielnukleinsäure erkennt, unterstrichen gezeigt; der nicht unterstrichene Teil und die erste unterstrichene Base ist der Teil, der durch die erste Spaltung freigesetzt wird und in der zweiten oder folgenden Spaltungsstrukturen fortfährt beteiligt zu sein.

[0844] Alle Reaktionen wurden doppelt durchgeführt. Die Invader™-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 10 µl mit 10 mM MOPS, pH 7, 5, mM $MgCl_2$, 500 fmol primäres Invader™-Oligo 241-95-01, (Seq.-ID Nr. 176), 25 pmol primärer Sonde 241-95-02 (Seq.-ID Nr. 175), 30 ng AfuFEN1-Enzym und 10 ng humane genomische DNA, und falls eingeschlossen, 1 amol HBV-Amplicon pAM6Nr. 2. MOPS, Ziel-DNA und Invader™-Oligonukleotid wurden zu einem Endvolumen von 7 µl vereinigt. Die Proben wurden 5 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert, dann auf 67°C abgekühlt. Während der 5-minütigen Denaturierung wurden $MgCl_2$, Sonde und Enzym vereint. Die primären Invader™-Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 µl Mischung aus $MgCl_2$, Sonde und Enzym zu den vorstehend angegebenen Endkonzentrationen gesteuert. Die Reaktionen wurden 30 Minuten bei 67°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann auf 52°C abgekühlt und jede primäre Invader™-Reaktion erhielt die folgenden sekundären Reaktionskomponenten in einem Gesamtvolumen von 3 µl: 2,5 pmol sekundäre Ziel-DNA 241-95-07 (Seq.-ID Nr. 177), 10 pmol von entweder sekundärer Sonde 228-48-04 (Seq.-ID Nr. 173), oder 228-48-04N (Seq.-ID Nr. 178) und 100 pmol eines Arrestor™-Oligonukleotids, entweder 241-95-03 (Seq.-ID Nr. 179), 241-95-04 (Seq.-ID Nr. 180), 241-95-05 (Seq.-ID Nr. 181) oder 241-95-06 (Seq.-ID Nr. 182). Die Arrestor™-Oligos wurden in einigen Reaktionen als Kontrolle für die Einflüsse des Arrestor™-Oligos weggelassen.

[0845] Die Reaktionen wurden 34 Minuten bei 52°C inkubiert und wurden dann durch Zugabe von 10 µl von 95% Formamid, 10 mM EDTA und 0,02% Kristallviolett gestoppt. Alle Proben wurden 1 Minute auf 95°C erhitzt und 4 µl jeder Probe wurden durch Elektrophorese auf einem 20% denaturiertem Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3) und 1,4 mM EDTA aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung des Molecular Dynamics Flouroimager 595, Anregung 488, Emission 530 abgebildet. Die entstandenen Bilder für die Reaktionen mit den kürzeren und längeren sekundären Sonden sind in **Fig. 110A** beziehungsweise **Fig. 110B** gezeigt.

[0846] In jeder Figur sind die Produkte der Spaltung als Banden in der unteren Hälfte jeder Spur sichtbar. Die ersten 4 Spuren jeder Figur zeigen die Produkte der doppelten Reaktionen ohne Arrestor™-Oligo, mit oder ohne die HBV-Ziel-DNA (Spurensätze 1 beziehungsweise 2); in den nächsten 4 Spuren verwendeten die Sätze 3 und 4 das kürzeste Arrestor™-Oligo 241-95-03 (Seq.-ID Nr. 179) die Spuren 5 und 6 verwendeten 241-95-04 (Seq.-ID Nr. 180); die Spuren 7 und 8 verwendeten 241-95-05 (Seq.-ID Nr. 181); und die Spuren 9 und 10 verwendeten 241-95-06 (Seq.-ID Nr. 182).

[0847] Der Hauptgrund für Bedenken ist die Bande, die in den "ohne Ziel-DNA"-Spuren erscheint (ungerade Zahlen; diese Bande wandert mit dem für Ziel-DNA spezifischen Signal in der Nähe der Unterseite jedes Gelpanels). Sichtkontrolle zeigt, dass das kürzeste Arrestor™-Oligo am wenigsten wirksam war zur Unterdrückung des Hintergrunds, und dass die Wirksamkeit anstieg, wenn das Arrestor™-Oligo weiter in den Teil hineinragt, der an der anschließenden Spaltungsreaktionen beteiligt ist. Auch mit diesem Unterschied des Einflusses kann gesehen werden, dass es große Freiheit beim Entwurf des Arrestor™-Oligonukleotids gibt. Die Wahl der Länge wird durch die Temperatur beeinflusst, bei der die Reaktion, welche sich das Arrestor™-Oligo zu Nutze macht, durchgeführt wird, die Länge der gebildeten Duplexstrukturen zwischen der primären Sonde und der Ziel-DNA, der primären Sonde und der sekundären Ziel-DNA, und die relativen Konzentrationen der verschiedenen Nukleinsäurearten in den Reaktionen.

BEISPIEL 53

Einfluss der Arrestor™-Oligokonzentrationen auf die Signalsteigerung in vielfachen sequenziellen invasiven Spaltungsassays

[0848] Beim Untersuchen der Einflüsse auf das Einschließen der Arrestor™-Oligonukleotide in diese Spaltungsreaktionen war es von Interesse zu bestimmen, ob die Konzentration des Arrestor™-Oligos im Überschuss der Konzentration der primären Sonde einen Einfluss auf die Ausbeute des entweder nicht spezifischen oder spezifischen Signals haben würde und ob die Länge des Arrestor™-Oligos ein Faktor sein würde. Diese zwei Variablen wurden im nachstehenden Beispiel untersucht.

[0849] Alle Reaktionen wurden doppelt durchgeführt. Die primären Invader™-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 10 µl durchgeführt und enthielten 10 mM MOPS, pH 7,5; 7,5 mM $MgCl_2$, 500 fmol primäres Invader™-Oligo 241-95-01 (Seq.-ID Nr. 176), 25 pmol primärer Sonde 241-95-02 (Seq.-ID Nr. 175), 30 ng AfuFEN1-Enzym und 10 ng humaner, genomischer DNA. Wenn sie eingeschlossen war, war die Ziel-DNA 1 amol HBV-Amplicon pAM6Nr. 2, wie vorstehend beschrieben. MOPS, Ziel-DNA und Invader™-Oligo wurden zu einem Endvolumen von 7 µl vereint. Die Proben wurden 5 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert, dann auf 67°C abgekühlt. Während der 5-minütigen Denaturierung wurden $MgCl_2$, Sonde und Enzym vereint. Die primären Invader™-Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 µl der Mischung aus $MgCl_2$, Sonde und Enzym gestartet. Die Reaktionen wurden 30 Minuten bei 67°C inkubiert. Die Reaktionen wurden dann auf 52°C abgekühlt und jede primäre Invader™-Reaktion enthielt die folgenden sekundären Reaktionskomponenten: 2,5 pmol sekundäre Ziel-DNA 241-95-07 (Seq.-ID Nr. 177), 10 pmol sekundäre Sonde 228-48-04 (Seq.-ID Nr. 173) und, falls eingeschlossen, 50, 100 oder 200 pmol von entweder Arrestor™-Oligo 241-95-03 (Seq.-ID Nr. 179) oder 241-95-05 (Seq.-ID Nr. 181) in einem Gesamtvolumen von 3 µl. Die Reaktionen wurden dann 35 Minuten bei 52°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 10 µl von 95% Formamid, 10 mM EDTA und 0,02% Kristallviolett gestoppt. Alle Proben wurden 1 Minute auf 95°C erhitzt und 4 µl jeder Probe wurden durch Elektrophorese auf einem 20% denaturierenden Acrylamidgel (19:1 quervernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer mit 45 mM Tris-Borat (pH 8,3) und 1,4 mM EDTA aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung eines Molecular Dynamics Flouroimager 595, Anregung 488, Emission 530 abgebildet. Die entstandenen Bilder sind als ein zusammengesetztes Bild in **Fig. 111** gezeigt.

[0850] Jede der doppelten Reaktionen wurde auf das Gel in benachbarte Spuren geladen und mit einer einzigen Spurnummer markiert. Alle ungeraden Zahlen waren Kontrollen ohne Ziel-DNA. Die Spuren 1 und 2 hatten kein zugefügtes Arrestor™-Oligo; die Spuren 3–8 zeigten die Ergebnisse von Reaktionen mit dem kürzeren Arrestor™-Oligo 241-95-03 (Seq.-ID Nr. 179); die Spuren 9–14 zeigten die Ergebnisse von Reaktionen mit dem längerem Arrestor™-Oligo, 241-95-05 (Seq.-ID Nr. 181). Die Spaltungsprodukte der sekundären Reaktion sind im unteren ersten Drittel jeden Panels sichtbar. Sichtkontrolle dieser Daten (d. h. Vergleichen der spezifischen Produkte mit den Hintergrundbanden) zeigt, dass beide Arrestor™-Oligos einigen nützlichen Einfluss bei allen Konzentrationen haben.

[0851] Um die relativen Einflüsse der Arrestor™-Länge und -Konzentrationen zu quantifizieren, wurde die Fluoreszens von jeder der mitwandernden Produktbanden gemessen, die Signale der doppelten Spuren wurden gemittelt und der "vielfach über Hintergrund" (Signal + Ziel-DNA/Signal-Ziel-DNA) wurde für jede Reaktion mit Zielnukleinsäure berechnet. Die Reaktion, der ein Arrestor™-Oligo fehlte, ergab ein Signal annähernd 27-fach über Hintergrund. Einschluss des kürzeren Arrestor™-Oligo mit 50, 100, oder 200 pmol erzeugte Produkte von 42, 51- beziehungsweise 60-fach über Hintergrund. Dies zeigt, dass während das kürzere Arrestor™-Oligo bei der niedrigsten Konzentration weniger wirksam als das längere Arrestor™-Oligo zu sein scheint (siehe beschriebenes Beispiel), es durch Anheben der Konzentration des Arrestor™-Oligo und dabei des Verhältnisses von Arrestor™-Oligo: primäre Sonde kompensiert werden kann.

[0852] Dagegen erzeugt der Einschluss des längeren Arrestor™-Oligos mit 50, 100 oder 200 pmol Produkte 60-, 32- beziehungsweise 24-fach über Hintergrund. Bei der niedrigsten Konzentration ist die Wirksamkeit dieses längeren Arrestor™-Oligos relativ zum kürzeren Arrestor™-Oligo übereinstimmend mit dem vorstehenden Beispiel. Konzentrationsanstieg erniedrigt jedoch die Ausbeute des spezifischen Produkts, was auf einen Konzentrationseinfluss mit irgendeinem Element der sekundären Spaltungsreaktion hinweist.

[0853] Diese Daten zeigen, dass die Arrestor™-Oligonukleotide zum Vorteil in einer Anzahl spezifischer Reaktionsformen verwendet werden können. Die Wahl der Konzentration wird durch die Temperaturen beeinflusst, bei der die Reaktion, die Gebrauch von dem Arrestor™-Oligo macht, durchgeführt wird, die Länge der gebildeten Duplexstrukturen zwischen der primären Sonde und der Ziel-DNA, der primären Sonde und der se-

kundären Ziel-DNA, und zwischen der primären Sonde und dem Arrestor™-Oligo.

[0854] Die Auswahl der Oligonukleotidsonde für die Zielnukleinsäuren, anders als für die hier gezeigte HBV, (z. B. Oligonukleotidzusammensetzung und -länge) und die Optimierung der Bedingungen der Spaltungsreaktion gemäß den hier bereitgestellten Modellen folgen Routineverfahren und gewöhnlicher Praxis für den Fachmann von Verfahren der Molekularbiologie.

SEQUENZLISTE

[0791]
(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN
(i) ANMELDER: Hall, Jeff G.
Lyamichev, Victor I.
Mast, Andrea L.
Brow, Mary Ann D.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Detection Of Nucleic Acids By Multiple Sequential Invasive Cleavages (Nachweis von Nukleinsäuren durch mehrere sequenzielle invasive Spaltungen)
(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 190
(iv) KORRESPONDENZANSCHRIFT:

(A) EMPFÄNGER: Medlen & Carroll, LLP
(B) STRASSE: 220 Montgomery Street, Suite 2200
(C) STADT: San Francisco
(D) BUNDESSTAAT: Kalifornien
(E) LAND: Vereinigte Staaten von Amerika
(F) POSTLEITZAHL: 94104

(v) RECHNERLESBARE FORM:

(A) ART DES DATENTRÄGERS: Floppy-Diskette
(B) RECHNER: IBM PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: Patentln Release 1.0, Version 1.30

(vi)DATEN DER AKTUELLEN ANMELDUNG:

(A) NUMMER DER ANMELDUNG: US
(B) EINREICHUNGSDATUM:
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) DATEN ZU VORHERIGEN ANMELDUNGEN:
(A) NUMMER DER ANMELDUNG: PCT/US97/01072
(B) EINREICHUNGSDATUM: 21-JAN-1997

(vii) DATEN ZU VORHERIGEN ANMELDUNGEN:
(A) NUMMER DER ANMELDUNG: US 08/759,038
(B) EINREICHUNGSDATUM: 02-DEZ-1996

(vii) DATEN ZU VORHERIGEN ANMELDUNGEN:
(A) NUMMER DER ANMELDUNG: US 08/758,314
(B) EINREICHUNGSDATUM: 02-DEZ-1996

(vii) DATEN ZU VORHERIGEN ANMELDUNGEN:
(A) NUMMER DER ANMELDUNG: US 08/756,386
(B) EINREICHUNGSDATUM: 29-NOV-1996

(vii) DATEN ZU VORHERIGEN ANMELDUNGEN:
(A) NUMMER DER ANMELDUNG: US 08/682,853

(B) EINREICHUNGSDATUM: 12-JUL-1996

(vii) DATEN ZU VORHERIGEN ANMELDUNGEN:
(A) NUMMER DER ANMELDUNG: US 08/599,491
(B) EINREICHUNGSDATUM: 24-JAN-1996

(vii) DATEN ZU VORHERIGEN ANMELDUNGEN:
(A) NUMMER DER ANMELDUNG: US 08/823,516
(B) EINREICHUNGSDATUM: 24-MÄR-1997

(viii) INFORMATIONEN ZU RECHTSANWALT/VERTRETER:
(A) NAME: MacKnight, Kamrin T.
(B) ZULASSUNGSNUMMER: 38,230
(C) REFERENZ/DOCKET-NUMMER: FORS-03295

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATIONEN:
(A) TELEFON: +1 (415) 705-8410
(B) TELEFAX: +1 (415) 397-8338

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 1
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 2506 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 1:

```
ATGAGGGGGA TGCTGCCCCT CTTTGAGCCC AAGGGCCGGG TCCTCCTGGT GGACGGCCAC      60
CACCTGGCCT ACCGCACCTT CCACGCCCTG AAGGGCCTCA CCACCAGCCG GGGGGAGCCG     120
GTGCAGGCGG TCTACGGCTT CGCCAAGAGC CTCCTCAAGG CCCTCAAGGA GGACGGGGAC     180
GCGGTGATCG TGGTCTTTGA CGCCAAGGCC CCCTCCTTCC GCCACGAGGC CTACGGGGGG     240
TACAAGGCGG GCCGGGCCCC CACGCCGGAG GACTTTCCCC GGCAACTCGC CCTCATCAAG     300
GAGCTGGTGG ACCTCCTGGG GCTGGCGCGC CTCGAGGTCC CGGGCTACGA GGCGGACGAC     360
GTCCTGGCCA GCCTGGCCAA GAAGGCGGAA AAGGAGGGCT ACGAGGTCCG CATCCTCACC     420
GCCGACAAAG ACCTTTACCA GCTCCTTTCC GACCGCATCC ACGTCCTCCA CCCCGAGGGG     480
TACCTCATCA CCCCGGCCTG GCTTTGGGAA AAGTACGGCC TGAGGCCCGA CCAGTGGGCC     540
GACTACCGGG CCCTGACCGG GGACGAGTCC GACAACCTTC CCGGGGTCAA GGGCATCGGG     600
GAGAAGACGG CGAGGAAGCT TCTGGAGGAG TGGGGGAGCC TGGAAGCCCT CCTCAAGAAC     660
CTGGACCGGC TGAAGCCCGC CATCCGGGAG AAGATCCTGG CCCACATGGA CGATCTGAAG     720
CTCTCCTGGG ACCTGGCCAA GGTGCGCACC GACCTGCCCC TGGAGGTGGA CTTCGCCAAA     780
AGGCGGGAGC CCGACCGGGA GAGGCTTAGG GCCTTTCTGG AGAGGCTTGA GTTTGGCAGC     840
CTCCTCCACG AGTTCGGCCT TCTGGAAAGC CCCAAGGCCC TGGAGGAGGC CCCCTGGCCC     900
CCGCCGGAAG GGGCCTTCGT GGGCTTTGTG CTTTCCCGCA AGGAGCCCAT GTGGGCCGAT     960
CTTCTGGCCC TGGCCGCCGC CAGGGGGGGC CGGGTCCACC GGGCCCCCGA GCCTTATAAA    1020
GCCCTCAGGG ACCTGAAGGA GGCGCGGGGG CTTCTCGCCA AAGACCTGAG CGTTCTGGCC    1080
CTGAGGGAAG GCCTTGGCCT CCCGCCCGGC GACGACCCCA TGCTCCTCGC CTACCTCCTG    1140
GACCCTTCCA ACACCACCCC CGAGGGGGTG GCCCGGCGCT ACGGCGGGGA GTGGACGGAG    1200
GAGGCGGGGG AGCGGGCCGC CCTTTCCGAG AGGCTCTTCG CCAACCTGTG GGGGAGGCTT    1260
GAGGGGGAGG AGAGGCTCCT TTGGCTTTAC CGGGAGGTGG AGAGGCCCCT TTCCGCTGTC    1320
CTGGCCCACA TGGAGGCCAC GGGGGTGCGC CTGGACGTGG CCTATCTCAG GGCCTTGTCC    1380
```

```
CTGGAGGTGG CCGAGGAGAT CGCCCGCCTC GAGGCCGAGG TCTTCCGCCT GGCCGGCCAC   1440
CCCTTCAACC TCAACTCCCG GGACCAGCTG GAAAGGGTCC TCTTTGACGA GCTAGGGCTT   1500
CCCGCCATCG GCAAGACGGA GAAGACCGGC AAGCGCTCCA CCAGCGCCGC CGTCCTGGAG   1560
GCCCTCCGCG AGGCCCACCC CATCGTGGAG AAGATCCTGC AGTACCGGGA GCTCACCAAG   1620
CTGAAGAGCA CCTACATTGA CCCCTTGCCG GACCTCATCC ACCCCAGGAC GGGCCGCCTC   1680
CACACCCGCT TCAACCAGAC GGCCACGGCC ACGGGCAGGC TAAGTAGCTC CGATCCCAAC   1740
CTCCAGAACA TCCCCGTCCG CACCCCGCTT GGGCAGAGGA TCCGCCGGGC CTTCATCGCC   1800
GAGGAGGGGT GGCTATTGGT GGCCCTGGAC TATAGCCAGA TAGAGCTCAG GGTGCTGGCC   1860
CACCTCTCCG GCGACGAGAA CCTGATCCGG GTCTTCCAGG AGGGGCGGGA CATCCACACG   1920
GAGACCGCCA GCTGGATGTT CGGCGTCCCC CGGGAGGCCG TGGACCCCCT GATGCGCCGG   1980
GCGGCCAAGA CCATCAACTT CGGGGTCCTC TACGGCATGT CGGCCCACCG CCTCTCCCAG   2040
GAGCTAGCCA TCCCTTACGA GGAGGCCCAG GCCTTCATTG AGCGCTACTT TCAGAGCTTC   2100
CCCAAGGTGC GGGCCTGGAT TGAGAAGACC CTGGAGGAGG GCAGGAGGCG GGGGTACGTG   2160
GAGACCCTCT TCGGCCGCCG CCGCTACGTG CCAGACCTAG AGGCCCGGGT GAAGAGCGTG   2220
CGGGAGGCGG CCGAGCGCAT GGCCTTCAAC ATGCCCGTCC AGGGCACCGC CGCCGACCTC   2280
ATGAAGCTGG CTATGGTGAA GCTCTTCCCC AGGCTGGAGG AAATGGGGGC CAGGATGCTC   2340
CTTCAGGTCC ACGACGAGCT GGTCCTCGAG GCCCCAAAAG AGAGGGCGGA GGCCGTGGCC   2400
CGGCTGGCCA AGGAGGTCAT GGAGGGGGTG TATCCCCTGG CCGTGCCCCT GGAGGTGGAG   2460
GTGGGGATAG GGGAGGACTG GCTCTCCGCC AAGGAGTGAT ACCACC                  2506
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 2
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 2496 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 2:

```
ATGGCGATGC TTCCCCTCTT TGAGCCCAAA GGCCGCGTGC TCCTGGTGGA CGGCCACCAC     60
CTGGCCTACC GCACCTTCTT TGCCCTCAAG GGCCTCACCA CCAGCCGCGG CGAACCCGTT    120
CAGGCGGTCT ACGGCTTCGC CAAAAGCCTC CTCAAGGCCC TGAAGGAGGA CGGGGACGTG    180
GTGGTGGTGG TCTTTGACGC CAAGGCCCCC TCCTTCCGCC ACGAGGCCTA CGAGGCCTAC    240
AAGGCGGGCC GGGCCCCCAC CCCGGAGGAC TTTCCCCGGC AGCTGGCCCT CATCAAGGAG    300
TTGGTGGACC TCCTAGGCCT TGTGCGGCTG GAGGTTCCCG GCTTTGAGGC GGACGACGTG    360
CTGGCCACCC TGGCCAAGCG GGCGGAAAAG GAGGGGTACG AGGTGCGCAT CCTCACTGCC    420
GACCGCGACC TCTACCAGCT CCTTTCGGAG CGCATCGCCA TCCTCCACCC TGAGGGGTAC    480
CTGATCACCC CGGCGTGGCT TTACGAGAAG TACGGCCTGC GCCCGGAGCA GTGGGTGGAC    540
```

```
TACCGGGCCC TGGCGGGGGA CCCCTCGGAT AACATCCCCG GGGTGAAGGG CATCGGGGAG    600
AAGACCGCCC AGAGGCTCAT CCGCGAGTGG GGGAGCCTGG AAAACCTCTT CCAGCACCTG    660
GACCAGGTGA AGCCCTCCTT GCGGGAGAAG CTCCAGGCGG GCATGGAGGC CCTGGCCCTT    720
TCCCGGAAGC TTTCCCAGGT GCACACTGAC CTGCCCCTGG AGGTGGACTT CGGGAGGCGC    780
CGCACACCCA ACCTGGAGGG TCTGCGGGCT TTTTTGGAGC GGTTGGAGTT TGGAAGCCTC    840
CTCCACGAGT TCGGCCTCCT GGAGGGGCCG AAGGCGGCAG AGGAGGCCCC CTGGCCCCCT    900
CCGGAAGGGG CTTTTTTGGG CTTTTCCTTT TCCCGTCCCG AGCCCATGTG GGCCGAGCTT    960
CTGGCCCTGG CTGGGGCGTG GGAGGGGCGC CTCCATCGGG CACAAGACCC CCTTAGGGGC   1020
CTGAGGGACC TTAAGGGGGT GCGGGGAATC CTGGCCAAGG ACCTGGCGGT TTTGGCCCTG   1080
CGGGAGGGCC TGGACCTCTT CCCAGAGGAC GACCCCATGC TCCTGGCCTA CCTTCTGGAC   1140
CCCTCCAACA CCACCCCTGA GGGGGTGGCC CGGCGTTACG GGGGGGAGTG GACGGAGGAT   1200
GCGGGGGAGA GGGCCCTCCT GGCCGAGCGC CTCTTCCAGA CCCTAAAGGA GCGCCTTAAG   1260
GGAGAAGAAC GCCTGCTTTG GCTTTACGAG GAGGTGGAGA AGCCGCTTTC CCGGGTGTTG   1320
GCCCGGATGG AGGCCACGGG GGTCCGGCTG GACGTGGCCT ACCTCCAGGC CCTCTCCCTG   1380
GAGGTGGAGG CGGAGGTGCG CCAGCTGGAG GAGGAGGTCT TCCGCCTGGC CGGCCACCCC   1440
TTCAACCTCA ACTCCCGCGA CCAGCTGGAG CGGGTGCTCT TTGACGAGCT GGGCCTGCCT   1500
GCCATCGGCA AGACGGAGAA GACGGGGAAA CGCTCCACCA GCGCTGCCGT GCTGGAGGCC   1560
CTGCGAGAGG CCCACCCCAT CGTGGACCGC ATCCTGCAGT ACCGGGAGCT CACCAAGCTC   1620
AAGAACACCT ACATAGACCC CCTGCCCGCC CTGGTCCACC CCAAGACCGG CCGGCTCCAC   1680
ACCCGCTTCA ACCAGACGGC CACCGCCACG GGCAGGCTTT CCAGCTCCGA CCCCAACCTG   1740
CAGAACATCC CCGTGCGCAC CCCTCTGGGC CAGCGCATCC GCCGAGCCTT CGTGGCCGAG   1800
GAGGGCTGGG TGCTGGTGGT CTTGGACTAC AGCCAGATTG AGCTTCGGGT CCTGGCCCAC   1860
CTCTCCGGGG ACGAGAACCT GATCCGGGTC TTTCAGGAGG GGAGGGACAT CCACACCCAG   1920
ACCGCCAGCT GGATGTTCGG CGTTTCCCCC GAAGGGGTAG ACCCTCTGAT GCGCCGGGCG   1980
GCCAAGACCA TCAACTTCGG GGTGCTCTAC GGCATGTCCG CCCACCGCCT CTCCGGGGAG   2040
CTTTCCATCC CCTACGAGGA GGCGGTGGCC TTCATTGAGC GCTACTTCCA GAGCTACCCC   2100
AAGGTGCGGG CCTGGATTGA GGGGACCCTC GAGGAGGGCC GCCGGCGGGG GTATGTGGAG   2160
ACCCTCTTCG GCCGCCGGCG CTATGTGCCC GACCTCAACG CCCGGGTGAA GAGCGTGCGC   2220
GAGGCGGCGG AGCGCATGGC CTTCAACATG CCGGTCCAGG GCACCGCCGC CGACCTCATG   2280
AAGCTGGCCA TGGTGCGGCT TTTCCCCCGG CTTCAGGAAC TGGGGGCGAG GATGCTTTTG   2340
CAGGTGCACG ACGAGCTGGT CCTCGAGGCC CCCAAGGACC GGGCGGAGAG GGTAGCCGCT   2400
TTGGCCAAGG AGGTCATGGA GGGGGTCTGG CCCCTGCAGG TGCCCCTGGA GGTGGAGGTG   2460
GGCCTGGGGG AGGACTGGCT CTCCGCCAAG GAGTAG                              2496
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 3
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 2504 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 3:

```
ATGGAGGCGA TGCTTCCGCT CTTTGAACCC AAAGGCCGGG TCCTCCTGGT GGACGGCCAC    60
CACCTGGCCT ACCGCACCTT CTTCGCCCTG AAGGGCCTCA CCACGAGCCG GGGCGAACCG   120
GTGCAGGCGG TCTACGGCTT CGCCAAGAGC CTCCTCAAGG CCCTGAAGGA GGACGGGTAC   180
AAGGCCGTCT TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGAG   240
GCCTACAAGG CGGGGAGGGC CCCGACCCCC GAGGACTTCC CCCGGCAGCT CGCCCTCATC   300
AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGTTTACC CGCCTCGAGG TCCCCGGCTA CGAGGCGGAC   360
GACGTTCTCG CCACCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GGTACGAGGT GCGCATCCTC   420
ACCGCCGACC GCGACCTCTA CCAACTCGTC TCCGACCGCG TCGCCGTCCT CCACCCCGAG   480
GGCCACCTCA TCACCCCGGA GTGGCTTTGG GAGAAGTACG GCCTCAGGCC GGAGCAGTGG   540
GTGGACTTCC GCGCCCTCGT GGGGGACCCC TCCGACAACC TCCCCGGGGT CAAGGGCATC   600
GGGGAGAAGA CCGCCCTCAA GCTCCTCAAG GAGTGGGGAA GCCTGGAAAA CCTCCTCAAG   660
AACCTGGACC GGGTAAAGCC AGAAAACGTC CGGGAGAAGA TCAAGGCCCA CCTGGAAGAC   720
CTCAGGCTCT CCTTGGAGCT CTCCCGGGTG CGCACCGACC TCCCCCTGGA GGTGGACCTC   780
GCCCAGGGGC GGGAGCCCGA CCGGGAGGGG CTTAGGGCCT TCCTGGAGAG GCTGGAGTTC   840
GGCAGCCTCC TCCACGAGTT CGGCCTCCTG GAGGCCCCCG CCCCCCTGGA GGAGGCCCCC   900
TGGCCCCCGC CGGAAGGGGC CTTCGTGGGC TTCGTCCTCT CCCGCCCCGA GCCCATGTGG   960
GCGGAGCTTA AAGCCCTGGC CGCCTGCAGG GACGGCCGGG TGCACCGGGC AGCAGACCCC  1020
TTGGCGGGGC TAAAGGACCT CAAGGAGGTC CGGGGCCTCC TCGCCAAGGA CCTCGCCGTC  1080
TTGGCCTCGA GGGAGGGGCT AGACCTCGTG CCCGGGGACG ACCCCATGCT CCTCGCCTAC  1140
CTCCTGGACC CCTCCAACAC CACCCCCGAG GGGGTGGCGC GGCGCTACGG GGGGGAGTGG  1200
ACGGAGGACG CCGCCCACCG GGCCCTCCTC TCGGAGAGGC TCCATCGGAA CCTCCTTAAG  1260
CGCCTCGAGG GGGAGGAGAA GCTCCTTTGG CTCTACCACG AGGTGGAAAA GCCCCTCTCC  1320
CGGGTCCTGG CCCACATGGA GGCCACCGGG GTACGGCTGG ACGTGGCCTA CCTTCAGGCC  1380
CTTTCCCTGG AGCTTGCGGA GGAGATCCGC CGCCTCGAGG AGGAGGTCTT CCGCTTGGCG  1440
GGCCACCCCT TCAACCTCAA CTCCCGGGAC CAGCTGGAAA GGGTGCTCTT TGACGAGCTT  1500
AGGCTTCCCG CCTTGGGGAA GACGCAAAAG ACAGGCAAGC GCTCCACCAG CGCCGCGGTG  1560
CTGGAGGCCC TACGGGAGGC CCACCCCATC GTGGAGAAGA TCCTCCAGCA CCGGGAGCTC  1620
ACCAAGCTCA AGAACACCTA CGTGGACCCC CTCCCAAGCC TCGTCCACCC GAGGACGGGC  1680
CGCCTCCACA CCCGCTTCAA CCAGACGGCC ACGGCCACGG GGAGGCTTAG TAGCTCCGAC  1740
```

```
CCCAACCTGC AGAACATCCC CGTCCGCACC CCCTTGGGCC AGAGGATCCG CCGGGCCTTC    1800
GTGGCCGAGG CGGGTTGGGC GTTGGTGGCC CTGGACTATA GCCAGATAGA GCTCCGCGTC    1860
CTCGCCCACC TCTCCGGGGA CGAAAACCTG ATCAGGGTCT TCCAGGAGGG GAAGGACATC    1920
CACACCCAGA CCGCAAGCTG GATGTTCGGC GTCCCCCCGG AGGCCGTGGA CCCCCTGATG    1980
CGCCGGGCGG CCAAGACGGT GAACTTCGGC GTCCTCTACG GCATGTCCGC CCATAGGCTC    2040
TCCCAGGAGC TTGCCATCCC CTACGAGGAG GCGGTGGCCT TTATAGAGGC TACTTCCAAA    2100
GCTTCCCCAA GGTGCGGGCC TGGATAGAAA AGACCCTGGA GGAGGGGAGG AAGCGGGGCT    2160
ACGTGGAAAC CCTCTTCGGA AGAAGGCGCT ACGTGCCCGA CCTCAACGCC CGGGTGAAGA    2220
GCGTCAGGGA GGCCGCGGAG CGCATGGCCT TCAACATGCC CGTCCAGGGC ACCGCCGCCG    2280
ACCTCATGAA GCTCGCCATG GTGAAGCTCT TCCCCCGCCT CCGGGAGATG GGGGCCCGCA    2340
TGCTCCTCCA GGTCCACGAC GAGCTCCTCC TGGAGGCCCC CCAAGCGCGG GCCGAGGAGG    2400
TGGCGGCTTT GGCCAAGGAG GCCATGGAGA AGGCCTATCC CCTCGCCGTG CCCCTGGAGG    2460
TGGAGGTGGG GATGGGGGAG GACTGGCTTT CCGCCAAGGG TTAG                      2504
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 4
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 832 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 4:

```
Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1               5                  10                  15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
            20                  25                  30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
        35                  40                  45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
    50                  55                  60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65                  70                  75                  80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
                85                  90                  95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
            100                 105                 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
        115                 120                 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
    130                 135                 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145                 150                 155                 160
```

```
Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
                165                 170                 175

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
            180                 185                 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
        195                 200                 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
    210                 215                 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
225                 230                 235                 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
                245                 250                 255

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
            260                 265                 270

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
        275                 280                 285

Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
    290                 295                 300

Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
305                 310                 315                 320

Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
                325                 330                 335

Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
            340                 345                 350

Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
        355                 360                 365

Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
    370                 375                 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
385                 390                 395                 400

Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
                405                 410                 415

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
            420                 425                 430

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
        435                 440                 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
    450                 455                 460

Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
465                 470                 475                 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
                485                 490                 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
            500                 505                 510
```

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
595 600 605

Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
610 615 620

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
625 630 635 640

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
660 665 670

Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
675 680 685

Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
690 695 700

Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val
705 710 715 720

Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg
725 730 735

Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
740 745 750

Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
755 760 765

Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His
770 775 780

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
805 810 815

Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
820 825 830

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 5
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 831 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 5:

```
Met Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val
1               5                  10                  15

Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu
            20                  25                  30

Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys
        35                  40                  45

Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Val Val Val Val Val
    50                  55                  60

Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala
                85                  90                  95

Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val
            100                 105                 110

Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Arg Ala
        115                 120                 125

Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg Asp Leu
    130                 135                 140

Tyr Gln Leu Leu Ser Glu Arg Ile Ala Ile Leu His Pro Glu Gly Tyr
145                 150                 155                 160

Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Tyr Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro Glu
                165                 170                 175

Gln Trp Val Asp Tyr Arg Ala Leu Ala Gly Asp Pro Ser Asp Asn Ile
            180                 185                 190

Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Gln Arg Leu Ile Arg
        195                 200                 205

Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Phe Gln His Leu Asp Gln Val Lys
    210                 215                 220

Pro Ser Leu Arg Glu Lys Leu Gln Ala Gly Met Glu Ala Leu Ala Leu
225                 230                 235                 240

Ser Arg Lys Leu Ser Gln Val His Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp
                245                 250                 255

Phe Gly Arg Arg Arg Thr Pro Asn Leu Glu Gly Leu Arg Ala Phe Leu
            260                 265                 270

Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu
        275                 280                 285

Gly Pro Lys Ala Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly Ala
    290                 295                 300

Phe Leu Gly Phe Ser Phe Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu
305                 310                 315                 320

Leu Ala Leu Ala Gly Ala Trp Glu Gly Arg Leu His Arg Ala Gln Asp
                325                 330                 335
```

```
Pro Leu Arg Gly Leu Arg Asp Leu Lys Gly Val Arg Gly Ile Leu Ala
            340                 345                 350

Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp Leu Phe Pro
        355                 360                 365

Glu Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn Thr
    370                 375                 380

Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu Asp
385                 390                 395                 400

Ala Gly Glu Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Phe Gln Thr Leu Lys
                405                 410                 415

Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Glu Glu Val
            420                 425                 430

Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala Arg Met Glu Ala Thr Gly Val
        435                 440                 445

Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu Val Glu Ala
    450                 455                 460

Glu Val Arg Gln Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro
465                 470                 475                 480

Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu
                485                 490                 495

Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser
            500                 505                 510

Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val
        515                 520                 525

Asp Arg Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr Tyr
    530                 535                 540

Ile Asp Pro Leu Pro Ala Leu Val His Pro Lys Thr Gly Arg Leu His
545                 550                 555                 560

Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser
                565                 570                 575

Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg
            580                 585                 590

Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Glu Gly Trp Val Leu Val Val Leu
        595                 600                 605

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp
    610                 615                 620

Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr Gln
625                 630                 635                 640

Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Gly Val Asp Pro Leu
                645                 650                 655

Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met
            660                 665                 670

Ser Ala His Arg Leu Ser Gly Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala
        675                 680                 685
```

```
Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Tyr Pro Lys Val Arg Ala
    690                 695                 700

Trp Ile Glu Gly Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val Glu
705                 710                 715                 720

Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val
                725                 730                 735

Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val
            740                 745                 750

Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Arg Leu Phe
        755                 760                 765

Pro Arg Leu Gln Glu Leu Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp
    770                 775                 780

Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Asp Arg Ala Glu Arg Val Ala Ala
785                 790                 795                 800

Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Trp Pro Leu Gln Val Pro Leu
                805                 810                 815

Glu Val Glu Val Gly Leu Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
            820                 825                 830
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 6
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 834 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 6:

```
Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1                   5                  10                  15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly
            20                  25                  30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
        35                  40                  45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe
    50                  55                  60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu
65                  70                  75                  80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
                85                  90                  95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu
            100                 105                 110

Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys
        115                 120                 125

Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg
    130                 135                 140
```

```
Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu
145                 150                 155                 160

Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg
                165                 170                 175

Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp
            180                 185                 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu
        195                 200                 205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg
    210                 215                 220

Val Lys Pro Glu Asn Val Arg Glu Lys Ile Lys Ala His Leu Glu Asp
225                 230                 235                 240

Leu Arg Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu
                245                 250                 255

Glu Val Asp Leu Ala Gln Gly Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg
            260                 265                 270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly
        275                 280                 285

Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro
    290                 295                 300

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp
305                 310                 315                 320

Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Arg Asp Gly Arg Val His Arg
                325                 330                 335

Ala Ala Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly
            340                 345                 350

Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Ser Arg Glu Gly Leu Asp
        355                 360                 365

Leu Val Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro
    370                 375                 380

Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp
385                 390                 395                 400

Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu His Arg
                405                 410                 415

Asn Leu Leu Lys Arg Leu Glu Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr
            420                 425                 430

His Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala
        435                 440                 445

Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu
    450                 455                 460

Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala
465                 470                 475                 480

Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu
                485                 490                 495
```

```
Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly
            500                 505                 510

Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His
        515                 520                 525

Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys
    530                 535                 540

Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Ser Leu Val His Pro Arg Thr Gly
545                 550                 555                 560

Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu
                565                 570                 575

Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu
            580                 585                 590

Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu
        595                 600                 605

Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu
    610                 615                 620

Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile
625                 630                 635                 640

His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val
                645                 650                 655

Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu
            660                 665                 670

Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr
        675                 680                 685

Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys
    690                 695                 700

Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly
705                 710                 715                 720

Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn
                725                 730                 735

Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn
            740                 745                 750

Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val
        755                 760                 765

Lys Leu Phe Pro Arg Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln
    770                 775                 780

Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu
785                 790                 795                 800

Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala
                805                 810                 815

Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala
            820                 825                 830

Lys Gly
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 7

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 2502 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 7:

ATGNNGGCGA TGCTTCCCCT CTTTGAGCCC AAAGGCCGGG TCCTCCTGGT GGACGGCCAC 60
CACCTGGCCT ACCGCACCTT CTTCGCCCTG AAGGGCCTCA CCACCAGCCG GGGCGAACCG 120
GTGCAGGCGG TCTACGGCTT CGCCAAGAGC CTCCTCAAGG CCCTGAAGGA GGACGGGGAC 180
NNGGCGGTGN TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGAG 240
GCCTACAAGG CGGGCCGGGC CCCCACCCCG GAGGACTTTC CCCGGCAGCT CGCCCTCATC 300
AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGCTTGCG CGCCTCGAGG TCCCCGGCTA CGAGGCGGAC 360
GACGTNCTGG CCACCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GGTACGAGGT GCGCATCCTC 420
ACCGCCGACC GCGACCTCTA CCAGCTCCTT TCCGACCGCA TCGCCGTCCT CCACCCCGAG 480
GGGTACCTCA TCACCCCGGC GTGGCTTTGG GAGAAGTACG GCCTGAGGCC GGAGCAGTGG 540
GTGGACTACC GGGCCCTGGC GGGGGACCCC TCCGACAACC TCCCCGGGGT CAAGGGCATC 600
GGGGAGAAGA CCGCCCNGAA GCTCCTCNAG GAGTGGGGGA GCCTGGAAAA CCTCCTCAAG 660
AACCTGGACC GGGTGAAGCC CGCCNTCCGG GAGAAGATCC AGGCCCACAT GGANGACCTG 720
ANGCTCTCCT GGGAGCTNTC CCAGGTGCGC ACCGACCTGC CCCTGGAGGT GGACTTCGCC 780
AAGNGGCGGG AGCCCGACCG GGAGGGGCTT AGGGCCTTTC TGGAGAGGCT GGAGTTTGGC 840
AGCCTCCTCC ACGAGTTCGG CCTCCTGGAG GGCCCCAAGG CCCTGGAGGA GGCCCCCTGG 900
CCCCCGCCGG AAGGGGCCTT CGTGGGCTTT GTCCTTTCCC GCCCCGAGCC CATGTGGGCC 960
GAGCTTCTGG CCCTGGCCGC CGCCAGGGAG GGCCGGGTCC ACCGGGCACC AGACCCCTTT 1020
ANGGGCCTNA GGGACCTNAA GGAGGTGCGG GGNCTCCTCG CCAAGGACCT GGCCGTTTTG 1080
GCCCTGAGGG AGGGCCTNGA CCTCNTGCCC GGGGACGACC CCATGCTCCT CGCCTACCTC 1140
CTGGACCCCT CCAACACCAC CCCCGAGGGG GTGGCCCGGC GCTACGGGGG GGAGTGGACG 1200
GAGGANGCGG GGGAGCGGGC CCTCCTNTCC GAGAGGCTCT TCCNGAACCT NNNGCAGCGC 1260
CTTGAGGGGG AGGAGAGGCT CCTTTGGCTT TACCAGGAGG TGGAGAAGCC CCTTTCCCGG 1320
GTCCTGGCCC ACATGGAGGC CACGGGGGTN CGGCTGGACG TGGCCTACCT CCAGGCCCTN 1380
TCCCTGGAGG TGGCGGAGGA GATCCGCCGC CTCGAGGAGG AGGTCTTCCG CCTGGCCGGC 1440
CACCCCTTCA ACCTCAACTC CCGGGACCAG CTGGAAAGGG TGCTCTTTGA CGAGCTNGGG 1500
CTTCCCGCCA TCGGCAAGAC GGAGAAGACN GGCAAGCGCT CCACCAGCGC CGCCGTGCTG 1560
GAGGCCCTNC GNGAGGCCCA CCCCATCGTG GAGAAGATCC TGCAGTACCG GGAGCTCACC 1620
AAGCTCAAGA ACACCTACAT NGACCCCCTG CCNGNCCTCG TCCACCCCAG GACGGGCCGC 1680

```
CTCCACACCC GCTTCAACCA GACGGCCACG GCCACGGGCA GGCTTAGTAG CTCCGACCCC   1740

AACCTGCAGA ACATCCCCGT CCGCACCCCN CTGGGCCAGA GGATCCGCCG GGCCTTCGTG   1800

GCCGAGGAGG GNTGGGTGTT GGTGGCCCTG GACTATAGCC AGATAGAGCT CCGGGTCCTG   1860

GCCCACCTCT CCGGGGACGA GAACCTGATC CGGGTCTTCC AGGAGGGGAG GGACATCCAC   1920

ACCCAGACCG CCAGCTGGAT GTTCGGCGTC CCCCCGGAGG CCGTGGACCC CCTGATGCGC   1980

CGGGCGGCCA AGACCATCAA CTTCGGGGTC CTCTACGGCA TGTCCGCCCA CCGCCTCTCC   2040

CAGGAGCTTG CCATCCCCTA CGAGGAGGCG GTGGCCTTCA TTGAGCGCTA CTTCCAGAGC   2100

TTCCCCAAGG TGCGGGCCTG GATTGAGAAG ACCCTGGAGG AGGGCAGGAG GCGGGGGTAC   2160

GTGGAGACCC TCTTCGGCCG CCGGCGCTAC GTGCCCGACC TCAACGCCCG GGTGAAGAGC   2220

GTGCGGGAGG CGGCGGAGCG CATGGCCTTC AACATGCCCG TCCAGGGCAC CGCCGCCGAC   2280

CTCATGAAGC TGGCCATGGT GAAGCTCTTC CCCCGGCTNC AGGAAATGGG GGCCAGGATG   2340

CTCCTNCAGG TCCACGACGA GCTGGTCCTC GAGGCCCCCA AAGAGCGGGC GGAGGNGGTG   2400

GCCGCTTTGG CCAAGGAGGT CATGGAGGGG GTCTATCCCC TGGCCGTGCC CCTGGAGGTG   2460

GAGGTGGGGA TGGGGGAGGA CTGGCTCTCC GCCAAGGAGT AG                      2502
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 8
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 833 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 8:

```
Met Xaa Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1               5                  10                  15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly
            20                  25                  30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
        35                  40                  45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Xaa Val
    50                  55                  60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala
65                  70                  75                  80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
                85                  90                  95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Xaa Arg Leu Glu
            100                 105                 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Lys
        115                 120                 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg Asp
    130                 135                 140
```

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile Ala Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
165 170 175

Glu Gln Trp Val Asp Tyr Arg Ala Leu Xaa Gly Asp Pro Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Xaa Lys Leu Leu
195 200 205

Xaa Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Val
210 215 220

Lys Pro Xaa Xaa Arg Glu Lys Ile Xaa Ala His Met Glu Asp Leu Xaa
225 230 235 240

Leu Ser Xaa Xaa Leu Ser Xaa Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
245 250 255

Asp Phe Ala Xaa Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg Ala Phe
260 265 270

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
275 280 285

Glu Xaa Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
290 295 300

Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu
305 310 315 320

Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Xaa Gly Arg Val His Arg Ala Xaa
325 330 335

Asp Pro Leu Xaa Gly Leu Arg Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly Leu Leu
340 345 350

Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp Leu Xaa
355 360 365

Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
370 375 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
385 390 395 400

Asp Ala Gly Glu Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu Phe Xaa Asn Leu
405 410 415

Xaa Xaa Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Xaa Glu
420 425 430

Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
435 440 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
450 455 460

Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
465 470 475 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
485 490 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
500 505 510

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr
530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Xaa Leu Val His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Glu Gly Trp Xaa Leu Val Ala
595 600 605

Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
610 615 620

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
625 630 635 640

Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val Asp Pro
645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
660 665 670

Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
675 680 685

Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
690 695 700

Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val
705 710 715 720

Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg
725 730 735

Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
740 745 750

Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
755 760 765

Phe Pro Arg Leu Xaa Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His
770 775 780

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Xaa Arg Ala Glu Xaa Val Ala
785 790 795 800

Ala Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
805 810 815

Leu Glu Val Glu Val Gly Xaa Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
820 825 830

Xaa

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 9
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 1647 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 9:

```
ATGAATTCGG GGATGCTGCC CCTCTTTGAG CCCAAGGGCC GGGTCCTCCT GGTGGACGGC      60
CACCACCTGG CCTACCGCAC CTTCCACGCC CTGAAGGGCC TCACCACCAG CCGGGGGGAG     120
CCGGTGCAGG CGGTCTACGG CTTCGCCAAG AGCCTCCTCA AGGCCCTCAA GGAGGACGGG     180
GACGCGGTGA TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGGG     240
GGGTACAAGG CGGGCCGGGC CCCCACGCCG GAGGACTTTC CCCGGCAACT CGCCCTCATC     300
AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGCTGGCG CGCCTCGAGG TCCCGGGCTA CGAGGCGGAC     360
GACGTCCTGG CCAGCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GCTACGAGGT CCGCATCCTC     420
ACCGCCGACA AAGACCTTTA CCAGCTCCTT TCCGACCGCA TCCACGTCCT CCACCCCGAG     480
GGGTACCTCA TCACCCCGGC CTGGCTTTGG GAAAAGTACG GCCTGAGGCC CGACCAGTGG     540
GCCGACTACC GGGCCCTGAC CGGGGACGAG TCCGACAACC TTCCCGGGGT CAAGGGCATC     600
GGGGAGAAGA CGGCGAGGAA GCTTCTGGAG GAGTGGGGGA GCCTGGAAGC CCTCCTCAAG     660
AACCTGGACC GGCTGAAGCC CGCCATCCGG GAGAAGATCC TGGCCCACAT GGACGATCTG     720
AAGCTCTCCT GGGACCTGGC CAAGGTGCGC ACCGACCTGC CCCTGGAGGT GGACTTCGCC     780
AAAAGGCGGG AGCCCGACCG GGAGAGGCTT AGGGCCTTTC TGGAGAGGCT TGAGTTTGGC     840
AGCCTCCTCC ACGAGTTCGG CCTTCTGGAA AGCCCCAAGG CCCTGGAGGA GGCCCCCTGG     900
CCCCCGCCGG AAGGGGCCTT CGTGGGCTTT GTGCTTTCCC GCAAGGAGCC CATGTGGGCC     960
GATCTTCTGG CCCTGGCCGC CGCCAGGGGG GGCCGGGTCC ACCGGGCCCC CGAGCCTTAT    1020
AAAGCCCTCA GGGACCTGAA GGAGGCGCGG GGGCTTCTCG CCAAAGACCT GAGCGTTCTG    1080
GCCCTGAGGG AAGGCCTTGG CCTCCCGCCC GGCGACGACC CCATGCTCCT CGCCTACCTC    1140
CTGGACCCTT CCAACACCAC CCCCGAGGGG GTGGCCCGGC GCTACGGCGG GGAGTGGACG    1200
GAGGAGGCGG GGGAGCGGGC CGCCCTTTCC GAGAGGCTCT TCGCCAACCT GTGGGGGAGG    1260
CTTGAGGGGG AGGAGAGGCT CCTTTGGCTT TACCGGGAGG TGGAGAGGCC CCTTTCCGCT    1320
GTCCTGGCCC ACATGGAGGC CACGGGGGTG CGCCTGGACG TGGCCTATCT CAGGGCCTTG    1380
TCCCTGGAGG TGGCCGGGGA GATCGCCCGC CTCGAGGCCG AGGTCTTCCG CCTGGCCGGC    1440
CACCCCTTCA ACCTCAACTC CCGGGACCAG CTGGAAAGGG TCCTCTTTGA CGAGCTAGGG    1500
CTTCCCGCCA TCGGCAAGAC GGAGAAGACC GGCAAGCGCT CCACCAGCGC CGCCGTCCTG    1560
GAGGCCCTCC GCGAGGCCCA CCCCATCGTG GAGAAGATCC TGCAGGCATG CAAGCTTGGC    1620
ACTGGCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGA                                        1647
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 10
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 2088 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 10:

```
ATGAATTCGG GGATGCTGCC CCTCTTTGAG CCCAAGGGCC GGGTCCTCCT GGTGGACGGC      60
CACCACCTGG CCTACCGCAC CTTCCACGCC CTGAAGGGCC TCACCACCAG CCGGGGGGAG     120
CCGGTGCAGG CGGTCTACGG CTTCGCCAAG AGCCTCCTCA AGGCCCTCAA GGAGGACGGG     180
GACGCGGTGA TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGGG     240
GGGTACAAGG CGGGCCGGGC CCCCACGCCG GAGGACTTTC CCCGGCAACT CGCCCTCATC     300
AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGCTGGCG CGCCTCGAGG TCCCGGGCTA CGAGGCGGAC     360
GACGTCCTGG CCAGCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GCTACGAGGT CCGCATCCTC     420
ACCGCCGACA AAGACCTTTA CCAGCTCCTT TCCGACCGCA TCCACGTCCT CCACCCCGAG     480
GGGTACCTCA TCACCCCGGC CTGGCTTTGG GAAAAGTACG GCCTGAGGCC CGACCAGTGG     540
GCCGACTACC GGGCCCTGAC CGGGGACGAG TCCGACAACC TTCCCGGGGT CAAGGGCATC     600
GGGGAGAAGA CGGCGAGGAA GCTTCTGGAG GAGTGGGGGA GCCTGGAAGC CCTCCTCAAG     660
AACCTGGACC GGCTGAAGCC CGCCATCCGG GAGAAGATCC TGGCCCACAT GGACGATCTG     720
AAGCTCTCCT GGGACCTGGC CAAGGTGCGC ACCGACCTGC CCCTGGAGGT GGACTTCGCC     780
AAAAGGCGGG AGCCCGACCG GGAGAGGCTT AGGGCCTTTC TGGAGAGGCT TGAGTTTGGC     840
AGCCTCCTCC ACGAGTTCGG CCTTCTGGAA AGCCCCAAGG CCCTGGAGGA GGCCCCCTGG     900
CCCCCGCCGG AAGGGGCCTT CGTGGGCTTT GTGCTTTCCC GCAAGGAGCC CATGTGGGCC     960
GATCTTCTGG CCCTGGCCGC CGCCAGGGGG GGCCGGGTCC ACCGGGCCCC CGAGCCTTAT    1020
AAAGCCCTCA GGGACCTGAA GGAGGCGCGG GGGCTTCTCG CCAAAGACCT GAGCGTTCTG    1080
GCCCTGAGGG AAGGCCTTGG CCTCCCGCCC GGCGACGACC CCATGCTCCT CGCCTACCTC    1140
CTGGACCCTT CCAACACCAC CCCCGAGGGG GTGGCCCGGC GCTACGGCGG GGAGTGGACG    1200
GAGGAGGCGG GGGAGCGGGC CGCCCTTTCC GAGAGGCTCT TCGCCAACCT GTGGGGGAGG    1260
CTTGAGGGGG AGGAGAGGCT CCTTTGGCTT TACCGGGAGG TGGAGAGGCC CCTTTCCGCT    1320
GTCCTGGCCC ACATGGAGGC CACGGGGGTG CGCCTGGACG TGGCCTATCT CAGGGCCTTG    1380
TCCCTGGAGG TGGCCGGGGA GATCGCCCGC CTCGAGGCCG AGGTCTTCCG CCTGGCCGGC    1440
CACCCCTTCA ACCTCAACTC CCGGGACCAG CTGGAAAGGG TCCTCTTTGA CGAGCTAGGG    1500
CTTCCCGCCA TCGGCAAGAC GGAGAAGACC GGCAAGCGCT CCACCAGCGC CGCCGTCCTG    1560
GAGGCCCTCC GCGAGGCCCA CCCCATCGTG GAGAAGATCC TGCAGTACCG GGAGCTCACC    1620
AAGCTGAAGA GCACCTACAT TGACCCCTTG CCGGACCTCA TCCACCCCAG GACGGGCCGC    1680
CTCCACACCC GCTTCAACCA GACGGCCACG GCCACGGGCA GGCTAAGTAG CTCCGATCCC    1740
```

```
AACCTCCAGA ACATCCCCGT CCGCACCCCG CTTGGGCAGA GGATCCGCCG GGCCTTCATC   1800
GCCGAGGAGG GGTGGCTATT GGTGGCCCTG GACTATAGCC AGATAGAGCT CAGGGTGCTG   1860
GCCCACCTCT CCGGCGACGA GAACCTGATC CGGGTCTTCC AGGAGGGGCG GGACATCCAC   1920
ACGGAGACCG CCAGCTGGAT GTTCGGCGTC CCCCGGGAGG CCGTGGACCC CCTGATGCGC   1980
CGGGCGGCCA AGACCATCAA CTTCGGGGTC CTCTACGGCA TGTCGGCCCA CCGCCTCTCC   2040
CAGGAGCTAG CTAGCCATCC CTTACGAGGA GGCCCAGGCC TTCATTGA                2088
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 11
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 962 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 11:

```
ATGAATTCGG GGATGCTGCC CCTCTTTGAG CCCAAGGGCC GGGTCCTCCT GGTGGACGGC    60
CACCACCTGG CCTACCGCAC CTTCCACGCC CTGAAGGGCC TCACCACCAG CCGGGGGGAG   120
CCGGTGCAGG CGGTCTACGG CTTCGCCAAG AGCCTCCTCA AGGCCCTCAA GGAGGACGGG   180
GACGCGGTGA TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGGG   240
GGGTACAAGG CGGGCCGGGC CCCCACGCCG GAGGACTTTC CCCGGCAACT CGCCCTCATC   300
AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGCTGGCG CGCCTCGAGG TCCCGGGCTA CGAGGCGGAC   360
GACGTCCTGG CCAGCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GCTACGAGGT CCGCATCCTC   420
ACCGCCGACA AAGACCTTTA CCAGCTTCTT TCCGACCGCA TCCACGTCCT CCACCCCGAG   480
GGGTACCTCA TCACCCCGGC CTGGCTTTGG GAAAAGTACG GCCTGAGGCC CGACCAGTGG   540
GCCGACTACC GGGCCCTGAC CGGGGACGAG TCCGACAACC TTCCCGGGGT CAAGGGCATC   600
GGGGAGAAGA CGGCGAGGAA GCTTCTGGAG GAGTGGGGGA GCCTGGAAGC CCTCCTCAAG   660
AACCTGGACC GGCTGAAGCC CGCCATCCGG GAGAAGATCC TGGCCCACAT GGACGATCTG   720
AAGCTCTCCT GGGACCTGGC CAAGGTGCGC ACCGACCTGC CCCTGGAGGT GGACTTCGCC   780
AAAAGGCGGG AGCCCGACCG GGAGAGGCTT AGGGCCTTTC TGGAGAGGCT TGAGTTTGGC   840
AGCCTCCTCC ACGAGTTCGG CCTTCTGGAA AGCCCCAAGT CATGGAGGGG GTGTATCCCC   900
TGGCCGTGCC CCTGGAGGTG GAGGTGGGGA TAGGGGAGGA CTGGCTCTCC GCCAAGGAGT   960
GA                                                                  962
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 12
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 1600 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 12:

```
ATGGAATTCG GGGATGCTGC CCCTCTTTGA GCCCAAGGGC CGGGTCCTCC TGGTGGACGG      60
CCACCACCTG GCCTACCGCA CCTTCCACGC CCTGAAGGGC CTCACCACCA GCCGGGGGGA     120
GCCGGTGCAG GCGGTCTACG GCTTCGCCAA GAGCCTCCTC AAGGCCCTCA AGGAGGACGG     180
GGACGCGGTG ATCGTGGTCT TTGACGCCAA GGCCCCCTCC TTCCGCCACG AGGCCTACGG     240
GGGGTACAAG GCGGGCCGGG CCCCCACGCC GGAGGACTTT CCCCGGCAAC TCGCCCTCAT     300
CAAGGAGCTG GTGGACCTCC TGGGGCTGGC GCGCCTCGAG GTCCCGGGCT ACGAGGCGGA     360
CGACGTCCTG GCCAGCCTGG CCAAGAAGGC GGAAAAGGAG GGCTACGAGG TCCGCATCCT     420
CACCGCCGAC AAAGACCTTT ACCAGCTCCT TTCCGACCGC ATCCACGTCC TCCACCCCGA     480
GGGGTACCTC ATCACCCCGG CCTGGCTTTG GGAAAAGTAC GGCCTGAGGC CCGACCAGTG     540
GGCCGACTAC CGGGCCCTGA CCGGGGACGA GTCCGACAAC CTTCCCGGGG TCAAGGGCAT     600
CGGGGAGAAG ACGGCGAGGA AGCTTCTGGA GGAGTGGGGG AGCCTGGAAG CCCTCCTCAA     660
GAACCTGGAC CGGCTGAAGC CCGCCATCCG GGAGAAGATC CTGGCCCACA TGGACGATCT     720
GAAGCTCTCC TGGGACCTGG CCAAGGTGCG CACCGACCTG CCCCTGGAGG TGGACTTCGC     780
CAAAAGGCGG GAGCCCGACC GGGAGAGGCT TAGGGCCTTT CTGGAGAGGC TTGAGTTTGG     840
CAGCCTCCTC CACGAGTTCG GCCTTCTGGA AAGCCCCAAG ATCCGCCGGG CCTTCATCGC     900
CGAGGAGGGG TGGCTATTGG TGGCCCTGGA CTATAGCCAG ATAGAGCTCA GGGTGCTGGC     960
CCACCTCTCC GGCGACGAGA ACCTGATCCG GGTCTTCCAG GAGGGGCGGG ACATCCACAC    1020
GGAGACCGCC AGCTGGATGT TCGGCGTCCC CCGGGAGGCC GTGGACCCCC TGATGCGCCG    1080
GGCGGCCAAG ACCATCAACT TCGGGGTCCT CTACGGCATG TCGGCCCACC GCCTCTCCCA    1140
GGAGCTAGCC ATCCCTTACG AGGAGGCCCA GGCCTTCATT GAGCGCTACT TTCAGAGCTT    1200
CCCCAAGGTG CGGGCCTGGA TTGAGAAGAC CCTGGAGGAG GGCAGGAGGC GGGGGTACGT    1260
GGAGACCCTC TTCGGCCGCC GCCGCTACGT GCCAGACCTA GAGGCCCGGG TGAAGAGCGT    1320
GCGGGAGGCG GCCGAGCGCA TGGCCTTCAA CATGCCCGTC CGGGGCACCG CCGCCGACCT    1380
CATGAAGCTG GCTATGGTGA AGCTCTTCCC CAGGCTGGAG GAAATGGGGG CCAGGATGCT    1440
CCTTCAGGTC CACGACGAGC TGGTCCTCGA GGCCCCAAAA GAGAGGGCGG AGGCCGTGGC    1500
CCGGCTGGCC AAGGAGGTCA TGGAGGGGGT GTATCCCCTG GCCGTGCCCC TGGAGGTGGA    1560
GGTGGGGATA GGGGAGGACT GGCTCTCCGC CAAGGAGTGA                           1600
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 13
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 36 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 13:
CACGAATTCG GGGATGCTGC CCCTCTTTGA GCCCAA 36

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 14
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 14:
GTGAGATCTA TCACTCCTTG GCGGAGAGCC AGTC 34

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 15
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 91 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 15:

TAATACGACT CACTATAGGG AGACCGGAAT TCGAGCTCGC CCGGGCGAGC TCGAATTCCG 60

TGTATTCTAT AGTGTCACCT AAATCGAATT C 91

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 16
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 16:
TAATACGACT CACTATAGGG 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 17
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 17:
GAATTCGATT TAGGTGACAC TATAGAA 27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 18
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 18:
GTAATCATGG TCATAGCTGG TAGCTTGCTA C 31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 19
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 42 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 19:
GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGCATGC CTACCTTGGT AG 42

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 20
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 20:
GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGCATGC 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 21
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 2502 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 21:

```
ATGAATTCGG GGATGCTGCC CCTCTTTGAG CCCAAGGGCC GGGTCCTCCT GGTGGACGGC    60
CACCACCTGG CCTACCGCAC CTTCCACGCC CTGAAGGGCC TCACCACCAG CCGGGGGGAG   120
CCGGTGCAGG CGGTCTACGG CTTCGCCAAG AGCCTCCTCA AGGCCCTCAA GGAGGACGGG   180
GACGCGGTGA TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGGG   240
GGGTACAAGG CGGGCCGGGC CCCCACGCCG GAGGACTTTC CCCGGCAACT CGCCCTCATC   300
AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGCTGGCG CGCCTCGAGG TCCCGGGCTA CGAGGCGGAC   360
GACGTCCTGG CCAGCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GCTACGAGGT CCGCATCCTC   420
```

ACCGCCGACA AAGACCTTTA CCAGCTCCTT TCCGACCGCA TCCACGTCCT CCACCCCGAG 480

GGGTACCTCA TCACCCCGGC CTGGCTTTGG GAAAAGTACG GCCTGAGGCC CGACCAGTGG 540

GCCGACTACC GGGCCCTGAC CGGGGACGAG TCCGACAACC TTCCCGGGGT CAAGGGCATC 600

GGGGAGAAGA CGGCGAGGAA GCTTCTGGAG GAGTGGGGGA GCCTGGAAGC CCTCCTCAAG 660

AACCTGGACC GGCTGAAGCC CGCCATCCGG GAGAAGATCC TGGCCCACAT GGACGATCTG 720

AAGCTCTCCT GGGACCTGGC CAAGGTGCGC ACCGACCTGC CCCTGGAGGT GGACTTCGCC 780

AAAAGGCGGG AGCCCGACCG GGAGAGGCTT AGGGCCTTTC TGGAGAGGCT TGAGTTTGGC 840

AGCCTCCTCC ACGAGTTCGG CCTTCTGGAA AGCCCCAAGG CCCTGGAGGA GGCCCCCTGG 900

CCCCCGCCGG AAGGGGCCTT CGTGGGCTTT GTGCTTTCCC GCAAGGAGCC CATGTGGGCC 960

GATCTTCTGG CCCTGGCCGC CGCCAGGGGG GGCCGGGTCC ACCGGGCCCC CGAGCCTTAT 1020

AAAGCCCTCA GGGACCTGAA GGAGGCGCGG GGGCTTCTCG CCAAAGACCT GAGCGTTCTG 1080

GCCCTGAGGG AAGGCCTTGG CCTCCCGCCC GGCGACGACC CCATGCTCCT CGCCTACCTC 1140

CTGGACCCTT CCAACACCAC CCCCGAGGGG GTGGCCCGGC GCTACGGCGG GGAGTGGACG 1200

GAGGAGGCGG GGGAGCGGGC CGCCCTTTCC GAGAGGCTCT TCGCCAACCT GTGGGGGAGG 1260

CTTGAGGGGG AGGAGAGGCT CCTTTGGCTT TACCGGGAGG TGGAGAGGCC CCTTTCCGCT 1320

GTCCTGGCCC ACATGGAGGC CACGGGGGTG CGCCTGGACG TGGCCTATCT CAGGGCCTTG 1380

TCCCTGGAGG TGGCCGGGGA GATCGCCCGC CTCGAGGCCG AGGTCTTCCG CCTGGCCGGC 1440

CACCCCTTCA ACCTCAACTC CCGGGACCAG CTGGAAAGGG TCCTCTTTGA CGAGCTAGGG 1500

CTTCCCGCCA TCGGCAAGAC GGAGAAGACC GGCAAGCGCT CCACCAGCGC CGCCGTCCTG 1560

GAGGCCCTCC GCGAGGCCCA CCCCATCGTG GAGAAGATCC TGCAGTACCG GGAGCTCACC 1620

AAGCTGAAGA GCACCTACAT TGACCCCTTG CCGGACCTCA TCCACCCCAG GACGGGCCGC 1680

CTCCACACCC GCTTCAACCA GACGGCCACG GCCACGGGCA GGCTAAGTAG CTCCGATCCC 1740

AACCTCCAGA ACATCCCCGT CCGCACCCCG CTTGGGCAGA GGATCCGCCG GGCCTTCATC 1800

GCCGAGGAGG GGTGGCTATT GGTGGCCCTG GACTATAGCC AGATAGAGCT CAGGGTGCTG 1860

GCCCACCTCT CCGGCGACGA GAACCTGATC CGGGTCTTCC AGGAGGGGCG GGACATCCAC 1920

ACGGAGACCG CCAGCTGGAT GTTCGGCGTC CCCCGGGAGG CCGTGGACCC CCTGATGCGC 1980

CGGGCGGCCA AGACCATCAA CTTCGGGGTC CTCTACGGCA TGTCGGCCCA CCGCCTCTCC 2040

CAGGAGCTAG CCATCCCTTA CGAGGAGGCC CAGGCCTTCA TTGAGCGCTA CTTTCAGAGC 2100

TTCCCCAAGG TGCGGGCCTG GATTGAGAAG ACCCTGGAGG AGGGCAGGAG GCGGGGGTAC 2160

GTGGAGACCC TCTTCGGCCG CCGCCGCTAC GTGCCAGACC TAGAGGCCCG GGTGAAGAGC 2220

GTGCGGGAGG CGGCCGAGCG CATGGCCTTC AACATGCCCG TCCGGGGCAC CGCCGCCGAC 2280

CTCATGAAGC TGGCTATGGT GAAGCTCTTC CCCAGGCTGG AGGAAATGGG GGCCAGGATG 2340

CTCCTTCAGG TCCACGACGA GCTGGTCCTC GAGGCCCCAA AAGAGAGGGC GGAGGCCGTG 2400

GCCCGGCTGG CCAAGGAGGT CATGGAGGGG GTGTATCCCC TGGCCGTGCC CCTGGAGGTG 2460

GAGGTGGGGA TAGGGGAGGA CTGGCTCTCC GCCAAGGAGT GA 2502

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 22
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 22:
GATTTAGGTG ACACTATAG 19

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 23
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 50 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 23:
ACACAGGTAC CACATGGTAC AAGAGGCAAG AGAGACGACA CAGCAGAAAC 50

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 24
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 24:

```
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Ile Asn Ser
1               5                  10                  15
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 25
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 969 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 25:

```
ATGGCTAGCA TGACTGGTGG ACAGCAAATG GGTCGGATCA ATTCGGGGAT GCTGCCCCTC      60
TTTGAGCCCA AGGGCCGGGT CCTCCTGGTG GACGGCCACC ACCTGGCCTA CCGCACCTTC     120
CACGCCCTGA AGGGCCTCAC CACCAGCCGG GGGGAGCCGG TGCAGGCGGT CTACGGCTTC     180
GCCAAGAGCC TCCTCAAGGC CCTCAAGGAG GACGGGGACG CGGTGATCGT GGTCTTTGAC     240
```

```
GCCAAGGCCC CCTCCTTCCG CCACGAGGCC TACGGGGGGT ACAAGGCGGG CCGGGCCCCC   300
ACGCCGGAGG ACTTTCCCCG GCAACTCGCC CTCATCAAGG AGCTGGTGGA CCTCCTGGGG   360
CTGGCGCGCC TCGAGGTCCC GGGCTACGAG GCGGACGACG TCCTGGCCAG CCTGGCCAAG   420
AAGGCGGAAA AGGAGGGCTA CGAGGTCCGC ATCCTCACCG CCGACAAAGA CCTTTACCAG   480
CTTCTTTCCG ACCGCATCCA CGTCCTCCAC CCCGAGGGGT ACCTCATCAC CCCGGCCTGG   540
CTTTGGGAAA AGTACGGCCT GAGGCCCGAC CAGTGGGCCG ACTACCGGGC CCTGACCGGG   600
GACGAGTCCG ACAACCTTCC CGGGGTCAAG GGCATCGGGG AGAAGACGGC GAGGAAGCTT   660
CTGGAGGAGT GGGGGAGCCT GGAAGCCCTC CTCAAGAACC TGGACCGGCT GAAGCCCGCC   720
ATCCGGGAGA AGATCCTGGC CCACATGGAC GATCTGAAGC TCTCCTGGGA CCTGGCCAAG   780
GTGCGCACCG ACCTGCCCCT GGAGGTGGAC TTCGCCAAAA GGCGGGAGCC CGACCGGGAG   840
AGGCTTAGGG CCTTTCTGGA GAGGCTTGAG TTTGGCAGCC TCCTCCACGA GTTCGGCCTT   900
CTGGAAAGCC CCAAGTCATG GAGGGGGTGT ATCCCCTGGC CGTGCCCCTG GAGGTGGAGG   960
TGGGGATAG                                                           969
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 26
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 948 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 26:

```
ATGGCTAGCA TGACTGGTGG ACAGCAAATG GGTCGGATCA ATTCGGGGAT GCTGCCCCTC    60
TTTGAGCCCA AGGGCCGGGT CCTCCTGGTG GACGGCCACC ACCTGGCCTA CCGCACCTTC   120
CACGCCCTGA AGGGCCTCAC CACCAGCCGG GGGGAGCCGG TGCAGGCGGT CTACGGCTTC   180
GCCAAGAGCC TCCTCAAGGC CCTCAAGGAG GACGGGGACG CGGTGATCGT GGTCTTTGAC   240
GCCAAGGCCC CCTCCTTCCG CCACGAGGCC TACGGGGGGT ACAAGGCGGG CCGGGCCCCC   300
ACGCCGGAGG ACTTTCCCCG GCAACTCGCC CTCATCAAGG AGCTGGTGGA CCTCCTGGGG   360
CTGGCGCGCC TCGAGGTCCC GGGCTACGAG GCGGACGACG TCCTGGCCAG CCTGGCCAAG   420
AAGGCGGAAA AGGAGGGCTA CGAGGTCCGC ATCCTCACCG CCGACAAAGA CCTTTACCAG   480
CTTCTTTCCG ACCGCATCCA CGTCCTCCAC CCCGAGGGGT ACCTCATCAC CCCGGCCTGG   540
CTTTGGGAAA AGTACGGCCT GAGGCCCGAC CAGTGGGCCG ACTACCGGGC CCTGACCGGG   600
GACGAGTCCG ACAACCTTCC CGGGGTCAAG GGCATCGGGG AGAAGACGGC GAGGAAGCTT   660
CTGGAGGAGT GGGGGAGCCT GGAAGCCCTC CTCAAGAACC TGGACCGGCT GAAGCCCGCC   720
ATCCGGGAGA AGATCCTGGC CCACATGGAC GATCTGAAGC TCTCCTGGGA CCTGGCCAAG   780
GTGCGCACCG ACCTGCCCCT GGAGGTGGAC TTCGCCAAAA GGCGGGAGCC CGACCGGGAG   840

AGGCTTAGGG CCTTTCTGGA GAGGCTTGAG TTTGGCAGCC TCCTCCACGA GTTCGGCCTT   900
CTGGAAAGCC CCAAGGCCGC ACTCGAGCAC CACCACCACC ACCACTGA                948
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 27
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 206 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 27:

```
CGCCAGGGTT TTCCCAGTCA CGACGTTGTA AAACGACGGC CAGTGAATTG TAATACGACT      60

CACTATAGGG CGAATTCGAG CTCGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGTCGAC CTGCAGGCAT     120

GCAAGCTTGA GTATTCTATA GTGTCACCTA AATAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG     180

TTTCCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCT                                          206
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 28
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 28:

```
AACAGCTATG ACCATGATTA C        21
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 29
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 60 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 29:

```
GTTCTCTGCT CTCTGGTCGC TGTCTCGCTT GTGAAACAAG CGAGACAGCG TGGTCTCTCG      60
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 30
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 15 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 30:

```
CGAGAGACCA CGCTG        15
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 31

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 52 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 31:
CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TC 52

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 32
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 32:
AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGG 26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 33
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 33:
GACGGGGAAA GCCGGCGAAC G 21

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 34
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 34:
GAAAGCCGGC GAACGTGGCG 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 35
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 35:
GGCGAACGTG GCGAGAAAGG A 21

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 36
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 42 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 36:
CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GC 42

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 37
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 42 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 37:
CCTTTCGCTC TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GC 42

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 38
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 8
(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: experimentell
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Evidenz = EXPERIMENTELL / mod. Base = ANDERE / Bemerkung = „Der A-Rest an dieser Position ist 2'-O-Methyladenosin."
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 38:
AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGT 27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 39
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 39:
GCCGGCGAAC GTGGCGAGAA AGGA 24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 40
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 40:
GGTTTTTCTT TGAGGTTTAG 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.:41
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 41:
GCGACACTCC ACCATAGAT 19

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 42
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 42:
CTGTCTTCAC GCAGAAAGC 19

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 43
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 43:
GCACGGTCTA CGAGACCTC 19

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 44
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 44:
TAATACGACT CACTATAGGG 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 45
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 337 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 45:

GGGAAAGCUU GCAUGCCUGC AGGUCGACUC UAGAGGAUCU ACUAGUCAUA UGGAUUCUGU 60

CUUCACGCAG AAAGCGUCUG GCCAUGGCGU UAGUAUGAGU GUCGUGCAGC CUCCAGGACC 120

CCCCCUCCCG GGAGAGGCAU AGUGGUCUGC GGAACCGGUG AGUACACCGG AAUUGCCAGG 180

ACGACCGGGU CCUUUCUUGG AUAAACCCGC UCAAUGCCUG GAGAUUUGGG CGUGCCCCCG 240

CAAGACUGCU AGCCGAGUAG UGUUGGGUCG CGAAAGGCCU UGUGGUACUG CCUGAUAGGG 300

UGCCUGCGAG UGCCCCGGGA GGUCUCGUAG ACCGUGC 337

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 46
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Merkmale
(B) POSITION: 18
(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: experimentell
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Evidenz = EXPERIMENTELL / Bemerkung = „Das N an dieser Position zeigt das Vorhandensein eines Fluoreszeinfarbstoffes an einem abasischen Linker an.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 46:

CCGGTCGTCC TGGCAATNCC 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 47
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 47:
GTTTATCCAA GAAAGGACCC GGTC 24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 48
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 48:
CAGGGTGAAG GGAAGAAGAA AGCGAAAGGT 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 49
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 49:
CAGGGGGAAG GGAAGAAGAA AGCGAAAGGT 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 50
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1..2
(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: experimentell

(D) SONSTIGE HINWEISE: /Evidenz = EXPERIMENTELL / mod Base = ANDERE / Bemerkung = „Die T-Reste an Position 1 und 2 sind aminomodifizierte T-Reste."

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 50:

TTCTTTTCAC CAGCGAGACG GG 22

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 51
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 51:

ATTGGGCGCC AGGGTGGTTT TT 22

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 52
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 53 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 52:

CCCGTCTCGC TGGTGAAAAG AAAAACCACC CTGGCGCCCA ATACGCAAAC CGC 53

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 53
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 53:

GAATTCGATT TAGGTGACAC TATAGAATAC A 31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 54
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 42 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 54:

CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GC 42

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 55
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 55:
GCCGGCGAAC GTGGCGAGAA AGGA 24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 56
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 56:
CAGAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGG 26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 57
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 57:
CAGGGGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGG 26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 58
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 58:
CAGGGTACAG GGAAGAAAGC GAAAGG 26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 59
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 42 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 59:

GGGAAAGTCC TCGGAGCCGC GCGGGACGAG CGTGGGGGCC CG 42

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 60
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 963 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) POSITION: 1..960
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 60:

```
ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG ATC AAT TCG GGG      48
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Ile Asn Ser Gly
 1               5                  10                  15
```

```
ATG CTG CCC CTC TTT GAG CCC AAG GGC CGG GTC CTC CTG GTG GAC GGC          96
Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly
            20                  25                  30

CAC CAC CTG GCC TAC CGC ACC TTC CAC GCC CTG AAG GGC CTC ACC ACC         144
His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr
        35                  40                  45

AGC CGG GGG GAG CCG GTG CAG GCG GTC TAC GGC TTC GCC AAG AGC CTC         192
Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu
    50                  55                  60

CTC AAG GCC CTC AAG GAG GAC GGG GAC GCG GTG ATC GTG GTC TTT GAC         240
Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val Val Phe Asp
65                  70                  75                  80

GCC AAG GCC CCC TCC TTC CGC CAC GAG GCC TAC GGG GGG TAC AAG GCG         288
Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly Tyr Lys Ala
                85                  90                  95

GGC CGG GCC CCC ACG CTC GTC CCG CGC GGC TCC GAG GAC TTT CCC CGG         336
Gly Arg Ala Pro Thr Leu Val Pro Arg Gly Ser Glu Asp Phe Pro Arg
            100                 105                 110

CAA CTC GCC CTC ATC AAG GAG CTG GTG GAC CTC CTG GGG CTG GCG CGC         384
Gln Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg
        115                 120                 125

CTC GAG GTC CCG GGC TAC GAG GCG GAC GAC GTC CTG GCC AGC CTG GCC         432
Leu Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala
    130                 135                 140

AAG AAG GCG GAA AAG GAG GGC TAC GAG GTC CGC ATC CTC ACC GCC GAC         480
Lys Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp
145                 150                 155                 160

AAA GAC CTT TAC CAG CTC CTT TCC GAC CGC ATC CAC GTC CTC CAC CCC         528
Lys Asp Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro
                165                 170                 175

GAG GGG TAC CTC ATC ACC CCG GCC TGG CTT TGG GAA AAG TAC GGC CTG         576
Glu Gly Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu
            180                 185                 190

AGG CCC GAC CAG TGG GCC GAC TAC CGG GCC CTG ACC GGG GAC GAG TCC         624
Arg Pro Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser
        195                 200                 205

GAC AAC CTT CCC GGG GTC AAG GGC ATC GGG GAG AAG ACG GCG AGG AAG         672
Asp Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys
    210                 215                 220

CTT CTG GAG GAG TGG GGG AGC CTG GAA GCC CTC CTC AAG AAC CTG GAC         720
Leu Leu Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp
225                 230                 235                 240

CGG CTG AAG CCC GCC ATC CGG GAG AAG ATC CTG GCC CAC ATG GAC GAT         768
Arg Leu Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp
                245                 250                 255

CTG AAG CTC TCC TGG GAC CTG GCC AAG GTG CGC ACC GAC CTG CCC CTG         816
Leu Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu
            260                 265                 270

GAG GTG GAC TTC GCC AAA AGG CGG GAG CCC GAC CGG GAG AGG CTT AGG         864
Glu Val Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg
        275                 280                 285
```

```
GCC TTT CTG GAG AGG CTT GAG TTT GGC AGC CTC CTC CAC GAG TTC GGC        912
Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly
    290                 295                 300

CTT CTG GAA AGC CCC AAG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC        960
Leu Leu Glu Ser Pro Lys Ala Ala Leu Glu His His His His His His
305                 310                 315                 320

TGA                                                                    963
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 61
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 320 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 61:

```
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Ile Asn Ser Gly
 1               5                  10                  15

Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly
            20                  25                  30

His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr
        35                  40                  45

Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu
    50                  55                  60

Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val Val Phe Asp
65                  70                  75                  80

Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly Tyr Lys Ala
                85                  90                  95

Gly Arg Ala Pro Thr Leu Val Pro Arg Gly Ser Glu Asp Phe Pro Arg
            100                 105                 110

Gln Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg
        115                 120                 125

Leu Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala
    130                 135                 140

Lys Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp
145                 150                 155                 160

Lys Asp Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro
                165                 170                 175

Glu Gly Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu
            180                 185                 190

Arg Pro Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser
        195                 200                 205

Asp Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys
    210                 215                 220

Leu Leu Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp
225                 230                 235                 240

Arg Leu Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp
                245                 250                 255

Leu Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu
            260                 265                 270

Glu Val Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg
        275                 280                 285

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly
    290                 295                 300

Leu Leu Glu Ser Pro Lys Ala Ala Leu Glu His His His His His His
305                 310                 315                 320
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 62

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 62:
CGATCTCCTC GGCCACCTCC 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 63
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 63:
GGCGGTGCCC TGGACGGGCA 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 64
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 64:
CCAGCTCGTT GTGGACCTGA 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 65
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 2505 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) POSITION: 1..2499
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 65:

```
ATG AAT TCG GGG ATG CTG CCC CTC TTT GAG CCC AAG GGC CGG GTC CTC          48
Met Asn Ser Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu
 1               5                  10                  15

CTG GTG GAC GGC CAC CAC CTG GCC TAC CGC ACC TTC CAC GCC CTG AAG          96
Leu Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys
            20                  25                  30

GGC CTC ACC ACC AGC CGG GGG GAG CCG GTG CAG GCG GTC TAC GGC TTC         144
Gly Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe
        35                  40                  45

GCC AAG AGC CTC CTC AAG GCC CTC AAG GAG GAC GGG GAC GCG GTG ATC         192
Ala Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile
    50                  55                  60

GTG GTC TTT GAC GCC AAG GCC CCC TCC TTC CGC CAC GAG GCC TAC GGG         240
Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly
65                  70                  75                  80

GGG TAC AAG GCG GGC CGG GCC CCC ACG CCG GAG GAC TTT CCC CGG CAA         288
Gly Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
                85                  90                  95

CTC GCC CTC ATC AAG GAG CTG GTG GAC CTC CTG GGG CTG GCG CGC CTC         336
Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu
            100                 105                 110

GAG GTC CCG GGC TAC GAG GCG GAC GAC GTC CTG GCC AGC CTG GCC AAG         384
Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys
        115                 120                 125

AAG GCG GAA AAG GAG GGC TAC GAG GTC CGC ATC CTC ACC GCC GAC AAA         432
Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys
    130                 135                 140

GAC CTT TAC CAG CTC CTT TCC GAC CGC ATC CAC GTC CTC CAC CCC GAG         480
Asp Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu
145                 150                 155                 160

GGG TAC CTC ATC ACC CCG GCC TGG CTT TGG GAA AAG TAC GGC CTG AGG         528
Gly Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg
                165                 170                 175

CCC GAC CAG TGG GCC GAC TAC CGG GCC CTG ACC GGG GAC GAG TCC GAC         576
Pro Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp
            180                 185                 190

AAC CTT CCC GGG GTC AAG GGC ATC GGG GAG AAG ACG GCG AGG AAG CTT         624
Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu
        195                 200                 205

CTG GAG GAG TGG GGG AGC CTG GAA GCC CTC CTC AAG AAC CTG GAC CGG         672
Leu Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg
    210                 215                 220

CTG AAG CCC GCC ATC CGG GAG AAG ATC CTG GCC CAC ATG GAC GAT CTG         720
Leu Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu
225                 230                 235                 240
```

```
AAG CTC TCC TGG GAC CTG GCC AAG GTG CGC ACC GAC CTG CCC CTG GAG      768
Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu
                245                 250                 255

GTG GAC TTC GCC AAA AGG CGG GAG CCC GAC CGG GAG AGG CTT AGG GCC      816
Val Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala
            260                 265                 270

TTT CTG GAG AGG CTT GAG TTT GGC AGC CTC CTC CAC GAG TTC GGC CTT      864
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu
        275                 280                 285

CTG GAA AGC CCC AAG GCC CTG GAG GAG GCC CCC TGG CCC CCG CCG GAA      912
Leu Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu
    290                 295                 300

GGG GCC TTC GTG GGC TTT GTG CTT TCC CGC AAG GAG CCC ATG TGG GCC      960
Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala
305                 310                 315                 320

GAT CTT CTG GCC CTG GCC GCC GCC AGG GGG GGC CGG GTC CAC CGG GCC     1008
Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala
                325                 330                 335

CCC GAG CCT TAT AAA GCC CTC AGG GAC CTG AAG GAG GCG CGG GGG CTT     1056
Pro Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu
            340                 345                 350

CTC GCC AAA GAC CTG AGC GTT CTG GCC CTG AGG GAA GGC CTT GGC CTC     1104
Leu Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu
        355                 360                 365

CCG CCC GGC GAC GAC CCC ATG CTC CTC GCC TAC CTC CTG GAC CCT TCC     1152
Pro Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser
    370                 375                 380

AAC ACC ACC CCC GAG GGG GTG GCC CGG CGC TAC GGC GGG GAG TGG ACG     1200
Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr
385                 390                 395                 400

GAG GAG GCG GGG GAG CGG GCC GCC CTT TCC GAG AGG CTC TTC GCC AAC     1248
Glu Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn
                405                 410                 415

CTG TGG GGG AGG CTT GAG GGG GAG GAG AGG CTC CTT TGG CTT TAC CGG     1296
Leu Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg
            420                 425                 430

GAG GTG GAG AGG CCC CTT TCC GCT GTC CTG GCC CAC ATG GAG GCC ACG     1344
Glu Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr
        435                 440                 445

GGG GTG CGC CTG GAC GTG GCC TAT CTC AGG GCC TTG TCC CTG GAG GTG     1392
Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val
    450                 455                 460

GCC GAG GAG ATC GCC CGC CTC GAG GCC GAG GTC TTC CGC CTG GCC GGC     1440
Ala Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly
465                 470                 475                 480

CAC CCC TTC AAC CTC AAC TCC CGG GAC CAG CTG GAA AGG GTC CTC TTT     1488
His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe
                485                 490                 495

GAC GAG CTA GGG CTT CCC GCC ATC GGC AAG ACG GAG AAG ACC GGC AAG     1536
Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys
            500                 505                 510
```

```
CGC TCC ACC AGC GCC GCC GTC CTG GAG GCC CTC CGC GAG GCC CAC CCC      1584
Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro
        515                 520                 525

ATC GTG GAG AAG ATC CTG CAG TAC CGG GAG CTC ACC AAG CTG AAG AGC      1632
Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser
    530                 535                 540

ACC TAC ATT GAC CCC TTG CCG GAC CTC ATC CAC CCC AGG ACG GGC CGC      1680
Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg
545                 550                 555                 560

CTC CAC ACC CGC TTC AAC CAG ACG GCC ACG GCC ACG GGC AGG CTA AGT      1728
Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser
                565                 570                 575

AGC TCC GAT CCC AAC CTC CAG AAC ATC CCC GTC CGC ACC CCG CTT GGG      1776
Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly
            580                 585                 590

CAG AGG ATC CGC CGG GCC TTC ATC GCC GAG GAG GGG TGG CTA TTG GTG      1824
Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val
        595                 600                 605

GCC CTG GAC TAT AGC CAG ATA GAG CTC AGG GTG CTG GCC CAC CTC TCC      1872
Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser
    610                 615                 620

GGC GAC GAG AAC CTG ATC CGG GTC TTC CAG GAG GGG CGG GAC ATC CAC      1920
Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His
625                 630                 635                 640

ACG GAG ACC GCC AGC TGG ATG TTC GGC GTC CCC CGG GAG GCC GTG GAC      1968
Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp
                645                 650                 655

CCC CTG ATG CGC CGG GCG GCC AAG ACC ATC AAC TTC GGG GTC CTC TAC      2016
Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr
            660                 665                 670

GGC ATG TCG GCC CAC CGC CTC TCC CAG GAG CTA GCC ATC CCT TAC GAG      2064
Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu
        675                 680                 685

GAG GCC CAG GCC TTC ATT GAG CGC TAC TTT CAG AGC TTC CCC AAG GTG      2112
Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val
    690                 695                 700

CGG GCC TGG ATT GAG AAG ACC CTG GAG GAG GGC AGG AGG CGG GGG TAC      2160
Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr
705                 710                 715                 720

GTG GAG ACC CTC TTC GGC CGC CGC CGC TAC GTG CCA GAC CTA GAG GCC      2208
Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala
                725                 730                 735

CGG GTG AAG AGC GTG CGG GAG GCG GCC GAG CGC ATG GCC TTC AAC ATG      2256
Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met
            740                 745                 750

CCC GTC CAG GGC ACC GCC GCC GAC CTC ATG AAG CTG GCT ATG GTG AAG      2304
Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys
        755                 760                 765

CTC TTC CCC AGG CTG GAG GAA ATG GGG GCC AGG ATG CTC CTT CAG GTC      2352
Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val
    770                 775                 780
```

```
CAC AAC GAG CTG GTC CTC GAG GCC CCA AAA GAG AGG GCG GAG GCC GTG      2400
His Asn Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val
785                 790                 795                 800

GCC CGG CTG GCC AAG GAG GTC ATG GAG GGG GTG TAT CCC CTG GCC GTG      2448
Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val
                805                 810                 815

CCC CTG GAG GTG GAG GTG GGG ATA GGG GAG GAC TGG CTC TCC GCC AAG      2496
Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys
            820                 825                 830

GAG TGATAG                                                          2505
Glu
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 66
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 833 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 66:

```
Met Asn Ser Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu
 1               5                  10                  15

Leu Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys
            20                  25                  30

Gly Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe
        35                  40                  45

Ala Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile
    50                  55                  60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly
65                  70                  75                  80

Gly Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
                85                  90                  95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu
            100                 105                 110

Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys
        115                 120                 125

Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys
    130                 135                 140

Asp Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu
145                 150                 155                 160

Gly Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg
                165                 170                 175

Pro Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp
            180                 185                 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu
        195                 200                 205

Leu Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg
    210                 215                 220
```

Leu Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu
225 230 235 240

Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu
245 250 255

Val Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala
260 265 270

Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu
275 280 285

Leu Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu
290 295 300

Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala
305 310 315 320

Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala
325 330 335

Pro Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu
340 345 350

Leu Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu
355 360 365

Pro Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser
370 375 380

Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr
385 390 395 400

Glu Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn
405 410 415

Leu Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg
420 425 430

Glu Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr
435 440 445

Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val
450 455 460

Ala Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly
465 470 475 480

His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe
485 490 495

Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys
500 505 510

Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro
515 520 525

Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser
530 535 540

Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg
545 550 555 560

Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser
565 570 575

```
Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly
            580                 585                 590

Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val
        595                 600                 605

Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser
    610                 615                 620

Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His
625                 630                 635                 640

Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp
                645                 650                 655

Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr
            660                 665                 670

Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu
        675                 680                 685

Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val
    690                 695                 700

Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr
705                 710                 715                 720

Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala
                725                 730                 735

Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met
            740                 745                 750

Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys
        755                 760                 765

Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val
    770                 775                 780

His Asn Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val
785                 790                 795                 800

Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val
                805                 810                 815

Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys
            820                 825                 830

Glu
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 67
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 67:

TGGCTATAGR CCAGGGCCAC 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 68
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 2505 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) POSITIONE: 1..2499
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 68:

```
ATG AAT TCG GGG ATG CTG CCC CTC TTT GAG CCC AAG GGC CGG GTC CTC        48
Met Asn Ser Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu
  1               5                  10                  15

CTG GTG GAC GGC CAC CAC CTG GCC TAC CGC ACC TTC CAC GCC CTG AAG        96
Leu Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys
            20                  25                  30

GGC CTC ACC ACC AGC CGG GGG GAG CCG GTG CAG GCG GTC TAC GGC TTC       144
Gly Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe
        35                  40                  45

GCC AAG AGC CTC CTC AAG GCC CTC AAG GAG GAC GGG GAC GCG GTG ATC       192
Ala Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile
    50                  55                  60

GTG GTC TTT GAC GCC AAG GCC CCC TCC TTC CGC CAC GAG GCC TAC GGG       240
Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly
65                  70                  75                  80

GGG TAC AAG GCG GGC CGG GCC CCC ACG CCG GAG GAC TTT CCC CGG CAA       288
Gly Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
                85                  90                  95

CTC GCC CTC ATC AAG GAG CTG GTG GAC CTC CTG GGG CTG GCG CGC CTC       336
Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu
            100                 105                 110

GAG GTC CCG GGC TAC GAG GCG GAC GAC GTC CTG GCC AGC CTG GCC AAG       384
Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys
        115                 120                 125

AAG GCG GAA AAG GAG GGC TAC GAG GTC CGC ATC CTC ACC GCC GAC AAA       432
Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys
    130                 135                 140

GAC CTT TAC CAG CTC CTT TCC GAC CGC ATC CAC GTC CTC CAC CCC GAG       480
Asp Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu
145                 150                 155                 160

GGG TAC CTC ATC ACC CCG GCC TGG CTT TGG GAA AAG TAC GGC CTG AGG       528
Gly Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg
                165                 170                 175

CCC GAC CAG TGG GCC GAC TAC CGG GCC CTG ACC GGG GAC GAG TCC GAC       576
Pro Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp
            180                 185                 190

AAC CTT CCC GGG GTC AAG GGC ATC GGG GAG AAG ACG GCG AGG AAG CTT       624
Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu
        195                 200                 205
```

```
CTG GAG GAG TGG GGG AGC CTG GAA GCC CTC CTC AAG AAC CTG GAC CGG        672
Leu Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg
    210                 215                 220

CTG AAG CCC GCC ATC CGG GAG AAG ATC CTG GCC CAC ATG GAC GAT CTG        720
Leu Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu
225                 230                 235                 240

AAG CTC TCC TGG GAC CTG GCC AAG GTG CGC ACC GAC CTG CCC CTG GAG        768
Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu
                245                 250                 255

GTG GAC TTC GCC AAA AGG CGG GAG CCC GAC CGG GAG AGG CTT AGG GCC        816
Val Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala
            260                 265                 270

TTT CTG GAG AGG CTT GAG TTT GGC AGC CTC CTC CAC GAG TTC GGC CTT        864
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu
        275                 280                 285

CTG GAA AGC CCC AAG GCC CTG GAG GAG GCC CCC TGG CCC CCG CCG GAA        912
Leu Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu
    290                 295                 300

GGG GCC TTC GTG GGC TTT GTG CTT TCC CGC AAG GAG CCC ATG TGG GCC        960
Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala
305                 310                 315                 320

GAT CTT CTG GCC CTG GCC GCC GCC AGG GGG GGC CGG GTC CAC CGG GCC       1008
Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala
                325                 330                 335

CCC GAG CCT TAT AAA GCC CTC AGG GAC CTG AAG GAG GCG CGG GGG CTT       1056
Pro Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu
            340                 345                 350

CTC GCC AAA GAC CTG AGC GTT CTG GCC CTG AGG GAA GGC CTT GGC CTC       1104
Leu Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu
        355                 360                 365

CCG CCC GGC GAC GAC CCC ATG CTC CTC GCC TAC CTC CTG GAC CCT TCC       1152
Pro Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser
    370                 375                 380

AAC ACC ACC CCC GAG GGG GTG GCC CGG CGC TAC GGC GGG GAG TGG ACG       1200
Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr
385                 390                 395                 400

GAG GAG GCG GGG GAG CGG GCC GCC CTT TCC GAG AGG CTC TTC GCC AAC       1248
Glu Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn
                405                 410                 415

CTG TGG GGG AGG CTT GAG GGG GAG GAG AGG CTC CTT TGG CTT TAC CGG       1296
Leu Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg
            420                 425                 430

GAG GTG GAG AGG CCC CTT TCC GCT GTC CTG GCC CAC ATG GAG GCC ACG       1344
Glu Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr
        435                 440                 445

GGG GTG CGC CTG GAC GTG GCC TAT CTC AGG GCC TTG TCC CTG GAG GTG       1392
Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val
    450                 455                 460

GCC GGG GAG ATC GCC CGC CTC GAG GCC GAG GTC TTC CGC CTG GCC GGC       1440
Ala Gly Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly
465                 470                 475                 480
```

```
CAC CCC TTC AAC CTC AAC TCC CGG GAC CAG CTG GAA AGG GTC CTC TTT      1488
His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe
                485                 490                 495

GAC GAG CTA GGG CTT CCC GCC ATC GGC AAG ACG GAG AAG ACC GGC AAG      1536
Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys
            500                 505                 510

CGC TCC ACC AGC GCC GCC GTC CTG GAG GCC CTC CGC GAG GCC CAC CCC      1584
Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro
        515                 520                 525

ATC GTG GAG AAG ATC CTG CAG TAC CGG GAG CTC ACC AAG CTG AAG AGC      1632
Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser
    530                 535                 540

ACC TAC ATT GAC CCC TTG CCG GAC CTC ATC CAC CCC AGG ACG GGC CGC      1680
Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg
545                 550                 555                 560

CTC CAC ACC CGC TTC AAC CAG ACG GCC ACG GCC ACG GGC AGG CTA AGT      1728
Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser
                565                 570                 575

AGC TCC GAT CCC AAC CTC CAG AAC ATC CCC GTC CGC ACC CCG CTT GGG      1776
Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly
            580                 585                 590

CAG AGG ATC CGC CGG GCC TTC ATC GCC GAG GAG GGG TGG CTA TTG GTG      1824
Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val
        595                 600                 605

GCC CTG GCC TAT AGC CAG ATA GAG CTC AGG GTG CTG GCC CAC CTC TCC      1872
Ala Leu Ala Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser
    610                 615                 620

GGC GAC GAG AAC CTG ATC CGG GTC TTC CAG GAG GGG CGG GAC ATC CAC      1920
Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His
625                 630                 635                 640

ACG GAG ACC GCC AGC TGG ATG TTC GGC GTC CCC CGG GAG GCC GTG GAC      1968
Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp
                645                 650                 655

CCC CTG ATG CGC CGG GCG GCC AAG ACC ATC AAC TTC GGG GTC CTC TAC      2016
Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr
            660                 665                 670

GGC ATG TCG GCC CAC CGC CTC TCC CAG GAG CTA GCC ATC CCT TAC GAG      2064
Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu
        675                 680                 685

GAG GCC CAG GCC TTC ATT GAG CGC TAC TTT CAG AGC TTC CCC AAG GTG      2112
Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val
    690                 695                 700

CGG GCC TGG ATT GAG AAG ACC CTG GAG GAG GGC AGG AGG CGG GGG TAC      2160
Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr
705                 710                 715                 720

GTG GAG ACC CTC TTC GGC CGC CGC CGC TAC GTG CCA GAC CTA GAG GCC      2208
Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala
                725                 730                 735

CGG GTG AAG AGC GTG CGG GAG GCG GCC GAG CGC ATG GCC TTC AAC ATG      2256
Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met
            740                 745                 750
```

```
CCC GTC CAG GGC ACC GCC GCC GAC CTC ATG AAG CTG GCT ATG GTG AAG      2304
Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys
        755                 760                 765

CTC TTC CCC AGG CTG GAG GAA ATG GGG GCC AGG ATG CTC CTT CAG GTC      2352
Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val
    770                 775                 780

CAC GAC GAG CTG GTC CTC GAG GCC CCA AAA GAG AGG GCG GAG GCC GTG      2400
His Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val
785                 790                 795                 800

GCC CGG CTG GCC AAG GAG GTC ATG GAG GGG GTG TAT CCC CTG GCC GTG      2448
Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val
                805                 810                 815

CCC CTG GAG GTG GAG GTG GGG ATA GGG GAG GAC TGG CTC TCC GCC AAG      2496
Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys
            820                 825                 830

GAG TGATAG                                                          2505
Glu
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 69
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 833 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 69:

```
Met Asn Ser Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu
 1               5                  10                  15

Leu Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys
            20                  25                  30

Gly Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe
        35                  40                  45

Ala Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile
    50                  55                  60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly
65                  70                  75                  80

Gly Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
                85                  90                  95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu
            100                 105                 110

Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys
        115                 120                 125

Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys
    130                 135                 140

Asp Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu
145                 150                 155                 160

Gly Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg
                165                 170                 175
```

Pro Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp
180 185 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu
195 200 205

Leu Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg
210 215 220

Leu Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu
225 230 235 240

Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu
245 250 255

Val Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala
260 265 270

Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu
275 280 285

Leu Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu
290 295 300

Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala
305 310 315 320

Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala
325 330 335

Pro Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu
340 345 350

Leu Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu
355 360 365

Pro Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser
370 375 380

Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr
385 390 395 400

Glu Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn
405 410 415

Leu Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg
420 425 430

Glu Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr
435 440 445

Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val
450 455 460

Ala Gly Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly
465 470 475 480

His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe
485 490 495

Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys
500 505 510

Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro
515 520 525

```
Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser
    530                 535                 540

Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg
545                 550                 555                 560

Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser
                565                 570                 575

Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly
            580                 585                 590

Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val
        595                 600                 605

Ala Leu Ala Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser
    610                 615                 620

Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His
625                 630                 635                 640

Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp
                645                 650                 655

Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr
            660                 665                 670

Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu
        675                 680                 685

Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val
    690                 695                 700

Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr
705                 710                 715                 720

Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala
                725                 730                 735

Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met
            740                 745                 750

Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys
        755                 760                 765

Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val
    770                 775                 780

His Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val
785                 790                 795                 800

Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val
                805                 810                 815

Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys
            820                 825                 830

Glu
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 70
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 2505 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) POSITION: 1..2499
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 70:

```
ATG AAT TCG GGG ATG CTG CCC CTC TTT GAG CCC AAG GGC CGG GTC CTC        48
Met Asn Ser Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu
 1               5                  10                  15

CTG GTG GAC GGC CAC CAC CTG GCC TAC CGC ACC TTC CAC GCC CTG AAG        96
Leu Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys
            20                  25                  30

GGC CTC ACC ACC AGC CGG GGG GAG CCG GTG CAG GCG GTC TAC GGC TTC       144
Gly Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe
        35                  40                  45

GCC AAG AGC CTC CTC AAG GCC CTC AAG GAG GAC GGG GAC GCG GTG ATC       192
Ala Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile
    50                  55                  60

GTG GTC TTT GAC GCC AAG GCC CCC TCC TTC CGC CAC GAG GCC TAC GGG       240
Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly
65                  70                  75                  80

GGG TAC AAG GCG GGC CGG GCC CCC ACG CCG GAG GAC TTT CCC CGG CAA       288
Gly Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
                85                  90                  95

CTC GCC CTC ATC AAG GAG CTG GTG GAC CTC CTG GGG CTG GCG CGC CTC       336
Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu
            100                 105                 110

GAG GTC CCG GGC TAC GAG GCG GAC GAC GTC CTG GCC AGC CTG GCC AAG       384
Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys
        115                 120                 125

AAG GCG GAA AAG GAG GGC TAC GAG GTC CGC ATC CTC ACC GCC GAC AAA       432
Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys
    130                 135                 140

GAC CTT TAC CAG CTC CTT TCC GAC CGC ATC CAC GTC CTC CAC CCC GAG       480
Asp Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu
145                 150                 155                 160

GGG TAC CTC ATC ACC CCG GCC TGG CTT TGG GAA AAG TAC GGC CTG AGG       528
Gly Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg
                165                 170                 175

CCC GAC CAG TGG GCC GAC TAC CGG GCC CTG ACC GGG GAC GAG TCC GAC       576
Pro Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp
            180                 185                 190

AAC CTT CCC GGG GTC AAG GGC ATC GGG GAG AAG ACG GCG AGG AAG CTT       624
Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu
        195                 200                 205

CTG GAG GAG TGG GGG AGC CTG GAA GCC CTC CTC AAG AAC CTG GAC CGG       672
Leu Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg
    210                 215                 220
```

```
CTG AAG CCC GCC ATC CGG GAG AAG ATC CTG GCC CAC ATG GAC GAT CTG        720
Leu Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu
225                 230                 235                 240

AAG CTC TCC TGG GAC CTG GCC AAG GTG CGC ACC GAC CTG CCC CTG GAG        768
Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu
                245                 250                 255

GTG GAC TTC GCC AAA AGG CGG GAG CCC GAC CGG GAG AGG CTT AGG GCC        816
Val Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala
            260                 265                 270

TTT CTG GAG AGG CTT GAG TTT GGC AGC CTC CTC CAC GAG TTC GGC CTT        864
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu
        275                 280                 285

CTG GAA AGC CCC AAG GCC CTG GAG GAG GCC CCC TGG CCC CCG CCG GAA        912
Leu Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu
    290                 295                 300

GGG GCC TTC GTG GGC TTT GTG CTT TCC CGC AAG GAG CCC ATG TGG GCC        960
Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala
305                 310                 315                 320

GAT CTT CTG GCC CTG GCC GCC GCC AGG GGG GGC CGG GTC CAC CGG GCC       1008
Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala
                325                 330                 335

CCC GAG CCT TAT AAA GCC CTC AGG GAC CTG AAG GAG GCG CGG GGG CTT       1056
Pro Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu
            340                 345                 350

CTC GCC AAA GAC CTG AGC GTT CTG GCC CTG AGG GAA GGC CTT GGC CTC       1104
Leu Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu
        355                 360                 365

CCG CCC GGC GAC GAC CCC ATG CTC CTC GCC TAC CTC CTG GAC CCT TCC       1152
Pro Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser
    370                 375                 380

AAC ACC ACC CCC GAG GGG GTG GCC CGG CGC TAC GGC GGG GAG TGG ACG       1200
Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr
385                 390                 395                 400

GAG GAG GCG GGG GAG CGG GCC GCC CTT TCC GAG AGG CTC TTC GCC AAC       1248
Glu Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn
                405                 410                 415

CTG TGG GGG AGG CTT GAG GGG GAG GAG AGG CTC CTT TGG CTT TAC CGG       1296
Leu Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg
            420                 425                 430

GAG GTG GAG AGG CCC CTT TCC GCT GTC CTG GCC CAC ATG GAG GCC ACG       1344
Glu Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr
        435                 440                 445

GGG GTG CGC CTG GAC GTG GCC TAT CTC AGG GCC TTG TCC CTG GAG GTG       1392
Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val
    450                 455                 460

GCC GGG GAG ATC GCC CGC CTC GAG GCC GAG GTC TTC CGC CTG GCC GGC       1440
Ala Gly Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly
465                 470                 475                 480

CAC CCC TTC AAC CTC AAC TCC CGG GAC CAG CTG GAA AGG GTC CTC TTT       1488
His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe
                485                 490                 495
```

```
GAC GAG CTA GGG CTT CCC GCC ATC GGC AAG ACG GAG AAG ACC GGC AAG      1536
Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys
            500                 505                 510

CGC TCC ACC AGC GCC GCC GTC CTG GAG GCC CTC CGC GAG GCC CAC CCC      1584
Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro
        515                 520                 525

ATC GTG GAG AAG ATC CTG CAG TAC CGG GAG CTC ACC AAG CTG AAG AGC      1632
Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser
    530                 535                 540

ACC TAC ATT GAC CCC TTG CCG GAC CTC ATC CAC CCC AGG ACG GGC CGC      1680
Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg
545                 550                 555                 560

CTC CAC ACC CGC TTC AAC CAG ACG GCC ACG GCC ACG GGC AGG CTA AGT      1728
Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser
                565                 570                 575

AGC TCC GAT CCC AAC CTC CAG AAC ATC CCC GTC CGC ACC CCG CTT GGG      1776
Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly
            580                 585                 590

CAG AGG ATC CGC CGG GCC TTC ATC GCC GAG GAG GGG TGG CTA TTG GTG      1824
Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val
        595                 600                 605

GCC CTG GTC TAT AGC CAG ATA GAG CTC AGG GTG CTG GCC CAC CTC TCC      1872
Ala Leu Val Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser
    610                 615                 620

GGC GAC GAG AAC CTG ATC CGG GTC TTC CAG GAG GGG CGG GAC ATC CAC      1920
Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His
625                 630                 635                 640

ACG GAG ACC GCC AGC TGG ATG TTC GGC GTC CCC CGG GAG GCC GTG GAC      1968
Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp
                645                 650                 655

CCC CTG ATG CGC CGG GCG GCC AAG ACC ATC AAC TTC GGG GTC CTC TAC      2016
Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr
            660                 665                 670

GGC ATG TCG GCC CAC CGC CTC TCC CAG GAG CTA GCC ATC CCT TAC GAG      2064
Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu
        675                 680                 685

GAG GCC CAG GCC TTC ATT GAG CGC TAC TTT CAG AGC TTC CCC AAG GTG      2112
Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val
    690                 695                 700

CGG GCC TGG ATT GAG AAG ACC CTG GAG GAG GGC AGG AGG CGG GGG TAC      2160
Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr
705                 710                 715                 720

GTG GAG ACC CTC TTC GGC CGC CGC CGC TAC GTG CCA GAC CTA GAG GCC      2208
Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala
                725                 730                 735

CGG GTG AAG AGC GTG CGG GAG GCG GCC GAG CGC ATG GCC TTC AAC ATG      2256
Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met
            740                 745                 750

CCC GTC CAG GGC ACC GCC GCC GAC CTC ATG AAG CTG GCT ATG GTG AAG      2304
Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys
        755                 760                 765
```

```
CTC TTC CCC AGG CTG GAG GAA ATG GGG GCC AGG ATG CTC CTT CAG GTC      2352
Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val
    770                 775                 780

CAC GAC GAG CTG GTC CTC GAG GCC CCA AAA GAG AGG GCG GAG GCC GTG      2400
His Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val
785                 790                 795                 800

GCC CGG CTG GCC AAG GAG GTC ATG GAG GGG GTG TAT CCC CTG GCC GTG      2448
Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val
                805                 810                 815

CCC CTG GAG GTG GAG GTG GGG ATA GGG GAG GAC TGG CTC TCC GCC AAG      2496
Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys
            820                 825                 830

GAG TGATAG                                                          2505
Glu
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 71
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 833 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 71:

```
Met Asn Ser Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu
  1               5                  10                  15

Leu Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys
            20                  25                  30

Gly Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe
        35                  40                  45

Ala Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile
    50                  55                  60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly
65                  70                  75                  80

Gly Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
                85                  90                  95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu
            100                 105                 110

Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys
        115                 120                 125

Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys
    130                 135                 140

Asp Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu
145                 150                 155                 160

Gly Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg
                165                 170                 175

Pro Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp
            180                 185                 190
```

```
Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu
        195                 200                 205

Leu Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg
    210                 215                 220

Leu Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu
225                 230                 235                 240

Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu
                245                 250                 255

Val Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala
            260                 265                 270

Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu
        275                 280                 285

Leu Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu
    290                 295                 300

Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala
305                 310                 315                 320

Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala
                325                 330                 335

Pro Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu
            340                 345                 350

Leu Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu
        355                 360                 365

Pro Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser
    370                 375                 380

Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr
385                 390                 395                 400

Glu Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn
                405                 410                 415

Leu Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg
            420                 425                 430

Glu Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr
        435                 440                 445

Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val
    450                 455                 460

Ala Gly Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly
465                 470                 475                 480

His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe
                485                 490                 495

Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys
            500                 505                 510

Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro
        515                 520                 525

Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser
    530                 535                 540
```

```
Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg
545                 550                 555                 560

Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser
                565                 570                 575

Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly
            580                 585                 590

Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val
        595                 600                 605

Ala Leu Val Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser
    610                 615                 620

Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His
625                 630                 635                 640

Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp
                645                 650                 655

Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr
            660                 665                 670

Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu
        675                 680                 685

Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val
    690                 695                 700

Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr
705                 710                 715                 720

Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala
                725                 730                 735

Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met
            740                 745                 750

Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys
        755                 760                 765

Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val
    770                 775                 780

His Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val
785                 790                 795                 800

Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val
                805                 810                 815

Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys
            820                 825                 830

Glu
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 72
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 72:
GGGATACCAT GGGAGTGCAG TTTGG 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 73
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 73:
GGTAAATTTT TCTCGTCGAC ATCCCAC 27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 74
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 981 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) POSITION: 1..978
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 74:

```
ATG GGA GTG CAG TTT GGT GAT TTT ATT CCA AAA AAT ATT ATC TCC TTT      48
Met Gly Val Gln Phe Gly Asp Phe Ile Pro Lys Asn Ile Ile Ser Phe
 1               5                  10                  15

GAA GAT TTA AAA GGG AAA AAA GTA GCT ATT GAT GGA ATG AAT GCA TTA      96
Glu Asp Leu Lys Gly Lys Lys Val Ala Ile Asp Gly Met Asn Ala Leu
            20                  25                  30

TAT CAG TTT TTA ACA TCT ATA CGT TTG AGA GAT GGT TCT CCA TTG AGA     144
Tyr Gln Phe Leu Thr Ser Ile Arg Leu Arg Asp Gly Ser Pro Leu Arg
        35                  40                  45

AAT AGA AAA GGA GAG ATA ACC TCA GCA TAT AAC GGA GTT TTT TAT AAA     192
Asn Arg Lys Gly Glu Ile Thr Ser Ala Tyr Asn Gly Val Phe Tyr Lys
    50                  55                  60

ACC ATA CAT TTG TTA GAG AAT GAT ATA ACT CCA ATC TGG GTT TTT GAT     240
Thr Ile His Leu Leu Glu Asn Asp Ile Thr Pro Ile Trp Val Phe Asp
65                  70                  75                  80

GGT GAG CCA CCA AAG TTA AAG GAG AAA ACA AGG AAA GTT AGG AGA GAG     288
Gly Glu Pro Pro Lys Leu Lys Glu Lys Thr Arg Lys Val Arg Arg Glu
                85                  90                  95

ATG AAA GAG AAA GCT GAA CTT AAG ATG AAA GAG GCA ATT AAA AAG GAG     336
Met Lys Glu Lys Ala Glu Leu Lys Met Lys Glu Ala Ile Lys Lys Glu
            100                 105                 110

GAT TTT GAA GAA GCT GCT AAG TAT GCA AAG AGG GTT AGC TAT CTA ACT     384
Asp Phe Glu Glu Ala Ala Lys Tyr Ala Lys Arg Val Ser Tyr Leu Thr
        115                 120                 125
```

```
CCG AAA ATG GTT GAA AAC TGC AAA TAT TTG TTA AGT TTG ATG GGC ATT        432
Pro Lys Met Val Glu Asn Cys Lys Tyr Leu Leu Ser Leu Met Gly Ile
    130                 135                 140

CCG TAT GTT GAA GCT CCC TCT GAG GGA GAG GCA CAA GCA AGC TAT ATG        480
Pro Tyr Val Glu Ala Pro Ser Glu Gly Glu Ala Gln Ala Ser Tyr Met
145                 150                 155                 160

GCA AAG AAG GGA GAT GTT TGG GCA GTT GTA AGT CAA GAT TAT GAT GCC        528
Ala Lys Lys Gly Asp Val Trp Ala Val Val Ser Gln Asp Tyr Asp Ala
                165                 170                 175

TTG TTA TAT GGA GCT CCG AGA GTT GTT AGA AAT TTA ACA ACT ACA AAG        576
Leu Leu Tyr Gly Ala Pro Arg Val Val Arg Asn Leu Thr Thr Thr Lys
            180                 185                 190

GAG ATG CCA GAA CTT ATT GAA TTA AAT GAG GTT TTA GAG GAT TTA AGA        624
Glu Met Pro Glu Leu Ile Glu Leu Asn Glu Val Leu Glu Asp Leu Arg
        195                 200                 205

ATT TCT TTG GAT GAT TTG ATA GAT ATA GCC ATA TTT ATG GGA ACT GAC        672
Ile Ser Leu Asp Asp Leu Ile Asp Ile Ala Ile Phe Met Gly Thr Asp
    210                 215                 220

TAT AAT CCA GGA GGA GTT AAA GGA ATA GGA TTT AAA AGG GCT TAT GAA        720
Tyr Asn Pro Gly Gly Val Lys Gly Ile Gly Phe Lys Arg Ala Tyr Glu
225                 230                 235                 240

TTG GTT AGA AGT GGT GTA GCT AAG GAT GTT TTG AAA AAA GAG GTT GAA        768
Leu Val Arg Ser Gly Val Ala Lys Asp Val Leu Lys Lys Glu Val Glu
                245                 250                 255

TAC TAC GAT GAG ATT AAG AGG ATA TTT AAA GAG CCA AAG GTT ACC GAT        816
Tyr Tyr Asp Glu Ile Lys Arg Ile Phe Lys Glu Pro Lys Val Thr Asp
            260                 265                 270

AAC TAT TCA TTA AGC CTA AAA TTG CCA GAT AAA GAG GGA ATT ATA AAA        864
Asn Tyr Ser Leu Ser Leu Lys Leu Pro Asp Lys Glu Gly Ile Ile Lys
        275                 280                 285

TTC TTA GTT GAT GAA AAT GAC TTT AAT TAT GAT AGG GTT AAA AAG CAT        912
Phe Leu Val Asp Glu Asn Asp Phe Asn Tyr Asp Arg Val Lys Lys His
    290                 295                 300

GTT GAT AAA CTC TAT AAC TTA ATT GCA AAC AAA ACT AAG CAA AAA ACA        960
Val Asp Lys Leu Tyr Asn Leu Ile Ala Asn Lys Thr Lys Gln Lys Thr
305                 310                 315                 320

TTA GAT GCA TGG TTT AAA TAA                                            981
Leu Asp Ala Trp Phe Lys
                325
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 75
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 326 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 75:

```
Met Gly Val Gln Phe Gly Asp Phe Ile Pro Lys Asn Ile Ile Ser Phe
 1               5                  10                  15

Glu Asp Leu Lys Gly Lys Lys Val Ala Ile Asp Gly Met Asn Ala Leu
            20                  25                  30

Tyr Gln Phe Leu Thr Ser Ile Arg Leu Arg Asp Gly Ser Pro Leu Arg
        35                  40                  45

Asn Arg Lys Gly Glu Ile Thr Ser Ala Tyr Asn Gly Val Phe Tyr Lys
    50                  55                  60

Thr Ile His Leu Leu Glu Asn Asp Ile Thr Pro Ile Trp Val Phe Asp
65                  70                  75                  80

Gly Glu Pro Pro Lys Leu Lys Glu Lys Thr Arg Lys Val Arg Arg Glu
                85                  90                  95

Met Lys Glu Lys Ala Glu Leu Lys Met Lys Glu Ala Ile Lys Lys Glu
            100                 105                 110

Asp Phe Glu Glu Ala Ala Lys Tyr Ala Lys Arg Val Ser Tyr Leu Thr
        115                 120                 125

Pro Lys Met Val Glu Asn Cys Lys Tyr Leu Leu Ser Leu Met Gly Ile
    130                 135                 140

Pro Tyr Val Glu Ala Pro Ser Glu Gly Glu Ala Gln Ala Ser Tyr Met
145                 150                 155                 160

Ala Lys Lys Gly Asp Val Trp Ala Val Val Ser Gln Asp Tyr Asp Ala
                165                 170                 175

Leu Leu Tyr Gly Ala Pro Arg Val Val Arg Asn Leu Thr Thr Thr Lys
            180                 185                 190

Glu Met Pro Glu Leu Ile Glu Leu Asn Glu Val Leu Glu Asp Leu Arg
        195                 200                 205

Ile Ser Leu Asp Asp Leu Ile Asp Ile Ala Ile Phe Met Gly Thr Asp
    210                 215                 220

Tyr Asn Pro Gly Gly Val Lys Gly Ile Gly Phe Lys Arg Ala Tyr Glu
225                 230                 235                 240

Leu Val Arg Ser Gly Val Ala Lys Asp Val Leu Lys Lys Glu Val Glu
                245                 250                 255

Tyr Tyr Asp Glu Ile Lys Arg Ile Phe Lys Glu Pro Lys Val Thr Asp
            260                 265                 270

Asn Tyr Ser Leu Ser Leu Lys Leu Pro Asp Lys Glu Gly Ile Ile Lys
        275                 280                 285

Phe Leu Val Asp Glu Asn Asp Phe Asn Tyr Asp Arg Val Lys Lys His
    290                 295                 300

Val Asp Lys Leu Tyr Asn Leu Ile Ala Asn Lys Thr Lys Gln Lys Thr
305                 310                 315                 320

Leu Asp Ala Trp Phe Lys
                325
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 76

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 76:
GAGGTGATAC CATGGGTGTC C 21

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 77
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 77:
GAAACTCTGC AGCGCGTCAG 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 78
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 1023 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) POSITION: 1..1020
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 78:

```
ATG GGT GTC CCA ATT GGT GAG ATT ATA CCA AGA AAA GAA ATT GAG TTA        48
Met Gly Val Pro Ile Gly Glu Ile Ile Pro Arg Lys Glu Ile Glu Leu
  1               5                  10                  15

GAA AAC CTA TAC GGG AAA AAA ATC GCA ATC GAC GCT CTT AAT GCA ATC        96
Glu Asn Leu Tyr Gly Lys Lys Ile Ala Ile Asp Ala Leu Asn Ala Ile
            20                  25                  30

TAC CAA TTT TTG TCC ACA ATA AGA CAG AAA GAT GGA ACT CCA CTT ATG       144
Tyr Gln Phe Leu Ser Thr Ile Arg Gln Lys Asp Gly Thr Pro Leu Met
        35                  40                  45

GAT TCA AAG GGT AGA ATA ACC TCC CAC CTA AGC GGG CTC TTT TAC AGG       192
Asp Ser Lys Gly Arg Ile Thr Ser His Leu Ser Gly Leu Phe Tyr Arg
    50                  55                  60

ACA ATA AAC CTA ATG GAG GCT GGA ATA AAA CCT GTG TAT GTT TTT GAT       240
Thr Ile Asn Leu Met Glu Ala Gly Ile Lys Pro Val Tyr Val Phe Asp
65                  70                  75                  80

GGA GAA CCT CCA GAA TTC AAA AAG AAA GAG CTC GAA AAA AGA AGA GAA       288
Gly Glu Pro Pro Glu Phe Lys Lys Lys Glu Leu Glu Lys Arg Arg Glu
                85                  90                  95

GCG AGA GAG GAA GCT GAA GAA AAG TGG AGA GAA GCA CTT GAA AAA GGA       336
Ala Arg Glu Glu Ala Glu Glu Lys Trp Arg Glu Ala Leu Glu Lys Gly
            100                 105                 110

GAG ATA GAG GAA GCA AGA AAA TAT GCC CAA AGA GCA ACC AGG GTA AAT       384
Glu Ile Glu Glu Ala Arg Lys Tyr Ala Gln Arg Ala Thr Arg Val Asn
        115                 120                 125
```

```
GAA ATG CTC ATC GAG GAT GCA AAA AAA CTC TTA GAG CTT ATG GGA ATT        432
Glu Met Leu Ile Glu Asp Ala Lys Lys Leu Leu Glu Leu Met Gly Ile
    130                 135                 140

CCT ATA GTT CAA GCA CCT AGC GAG GGA GAG GCC CAA GCT GCA TAT ATG        480
Pro Ile Val Gln Ala Pro Ser Glu Gly Glu Ala Gln Ala Ala Tyr Met
145                 150                 155                 160

GCC GCA AAG GGG AGC GTG TAT GCA TCG GCT AGT CAA GAT TAC GAT TCC        528
Ala Ala Lys Gly Ser Val Tyr Ala Ser Ala Ser Gln Asp Tyr Asp Ser
                165                 170                 175

CTA CTT TTT GGA GCT CCA AGA CTT GTT AGA AAC TTA ACA ATA ACA GGA        576
Leu Leu Phe Gly Ala Pro Arg Leu Val Arg Asn Leu Thr Ile Thr Gly
            180                 185                 190

AAA AGA AAG TTG CCT GGG AAA AAT GTC TAC GTC GAG ATA AAG CCC GAG        624
Lys Arg Lys Leu Pro Gly Lys Asn Val Tyr Val Glu Ile Lys Pro Glu
        195                 200                 205

TTG ATA ATT TTG GAG GAA GTA CTC AAG GAA TTA AAG CTA ACA AGA GAA        672
Leu Ile Ile Leu Glu Glu Val Leu Lys Glu Leu Lys Leu Thr Arg Glu
    210                 215                 220

AAG CTC ATT GAA CTA GCA ATC CTC GTT GGA ACA GAC TAC AAC CCA GGA        720
Lys Leu Ile Glu Leu Ala Ile Leu Val Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Gly
225                 230                 235                 240

GGA ATA AAG GGC ATA GGC CTT AAA AAA GCT TTA GAG ATT GTT AGA CAC        768
Gly Ile Lys Gly Ile Gly Leu Lys Lys Ala Leu Glu Ile Val Arg His
                245                 250                 255

TCA AAA GAT CCG CTA GCA AAG TTC CAA AAG CAA AGC GAT GTG GAT TTA        816
Ser Lys Asp Pro Leu Ala Lys Phe Gln Lys Gln Ser Asp Val Asp Leu
            260                 265                 270

TAT GCA ATA AAA GAG TTC TTC CTA AAC CCA CCA GTC ACA GAT AAC TAC        864
Tyr Ala Ile Lys Glu Phe Phe Leu Asn Pro Pro Val Thr Asp Asn Tyr
        275                 280                 285

AAT TTA GTG TGG AGA GAT CCC GAC GAA GAG GGA ATA CTA AAG TTC TTA        912
Asn Leu Val Trp Arg Asp Pro Asp Glu Glu Gly Ile Leu Lys Phe Leu
    290                 295                 300

TGT GAC GAG CAT GAC TTT AGT GAG GAA AGA GTA AAG AAT GGA TTA GAG        960
Cys Asp Glu His Asp Phe Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Gly Leu Glu
305                 310                 315                 320

AGG CTT AAG AAG GCA ATC AAA AGT GGA AAA CAA TCA ACC CTT GAA AGT       1008
Arg Leu Lys Lys Ala Ile Lys Ser Gly Lys Gln Ser Thr Leu Glu Ser
                325                 330                 335

TGG TTC AAG AGA TAA                                                   1023
Trp Phe Lys Arg
            340
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 79
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 340 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 79:

```
Met Gly Val Pro Ile Gly Glu Ile Ile Pro Arg Lys Glu Ile Glu Leu
 1               5                  10                  15

Glu Asn Leu Tyr Gly Lys Lys Ile Ala Ile Asp Ala Leu Asn Ala Ile
            20                  25                  30

Tyr Gln Phe Leu Ser Thr Ile Arg Gln Lys Asp Gly Thr Pro Leu Met
        35                  40                  45

Asp Ser Lys Gly Arg Ile Thr Ser His Leu Ser Gly Leu Phe Tyr Arg
    50                  55                  60

Thr Ile Asn Leu Met Glu Ala Gly Ile Lys Pro Val Tyr Val Phe Asp
65                  70                  75                  80

Gly Glu Pro Pro Glu Phe Lys Lys Lys Glu Leu Glu Lys Arg Arg Glu
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Glu Ala Glu Glu Lys Trp Arg Glu Ala Leu Glu Lys Gly
            100                 105                 110

Glu Ile Glu Glu Ala Arg Lys Tyr Ala Gln Arg Ala Thr Arg Val Asn
        115                 120                 125

Glu Met Leu Ile Glu Asp Ala Lys Lys Leu Leu Glu Leu Met Gly Ile
    130                 135                 140

Pro Ile Val Gln Ala Pro Ser Glu Gly Glu Ala Gln Ala Ala Tyr Met
145                 150                 155                 160

Ala Ala Lys Gly Ser Val Tyr Ala Ser Ala Ser Gln Asp Tyr Asp Ser
                165                 170                 175

Leu Leu Phe Gly Ala Pro Arg Leu Val Arg Asn Leu Thr Ile Thr Gly
            180                 185                 190

Lys Arg Lys Leu Pro Gly Lys Asn Val Tyr Val Glu Ile Lys Pro Glu
        195                 200                 205

Leu Ile Ile Leu Glu Glu Val Leu Lys Glu Leu Lys Leu Thr Arg Glu
    210                 215                 220

Lys Leu Ile Glu Leu Ala Ile Leu Val Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Gly
225                 230                 235                 240

Gly Ile Lys Gly Ile Gly Leu Lys Lys Ala Leu Glu Ile Val Arg His
                245                 250                 255

Ser Lys Asp Pro Leu Ala Lys Phe Gln Lys Gln Ser Asp Val Asp Leu
            260                 265                 270

Tyr Ala Ile Lys Glu Phe Phe Leu Asn Pro Pro Val Thr Asp Asn Tyr
        275                 280                 285

Asn Leu Val Trp Arg Asp Pro Asp Glu Glu Gly Ile Leu Lys Phe Leu
    290                 295                 300

Cys Asp Glu His Asp Phe Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Gly Leu Glu
305                 310                 315                 320

Arg Leu Lys Lys Ala Ile Lys Ser Gly Lys Gln Ser Thr Leu Glu Ser
                325                 330                 335

Trp Phe Lys Arg
            340
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 80
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 80:
GATACCATGG GTGTCCCAAT TGGTG 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 81
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 37 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 81:
TCGACGTCGA CTTATCTCTT GAACCAACTT TCAAGGG 37

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 82
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 82:
AGCGAGGGAG AGGCCCAAGC 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 83
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 83:

GCCTATGCCC TTTATTCCTC C 21

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 84
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 33 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 84:
TGGTCGCTGT CTCGCTGAAA GCGAGACAGC GTG 33

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 85
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 85:
TGCTCTCTGG TCGCTGTCTG AAAGACAGCG 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 86
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Fluoreszenzmarker enthält.“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 86:
NAGAAAGGAA GGGAAGAAAG CGAAAGG 27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 87
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 28 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (27, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Cy3-Farbstoff enthält.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 28
(D) SONSTIGE HINWEISE: /mod Base = ANDERE /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Didesoxycytidin.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 87:
AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGNC 28

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 88
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 24
(D) SONSTIGE HINWEISE: /mod Base = ANDERE /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Didesoxycytidin.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 88:
GCCGGCGAAC GTGGCGAGAA AGGC 24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 89
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzt, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Fluoreszenzmarker enthält.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (28, “”)

(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Cy3-Farbstoff trägt."

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 29
(D) SONSTIGE HINWEISE: /mod Base = ANDERE /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Didesoxycytidin."

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 89:
NAGAAAGGAA GGGAAGAAAG CGAAAGGNC 29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 90
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 90:
AAAATTCCTT TCTCTTTGCC CTTTGCTTCC 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 91
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 91:
GGAAAGCCGG CGAACGTGGC GAGAAA 26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 92
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 92:
GGAAAGCCGG CGAACGTGGC GAGA 24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 93
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Cy3-Farbstoff trägt.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (28, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der eine Biotingruppe trägt.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 93:
NAGAAAGGAA GGGAAGAAAG CGAAAGGNT 29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 94
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Cy3-Farbstoff trägt.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 2..3
(D) SONSTIGE HINWEISE: /mod Base = ANDERE /Bemerkung = „Den Resten an diesen Positionen wurde eine Aminogruppe hinzugefügt.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (24, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Fluoreszenzmarker enthält.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 94:
NTTCCAGAGC CTAATTTGCC AGTNA 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 95
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1
(D) SONSTIGE HINWEISE: /mod Base = ANDERE /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position hat einen 5’-TET-Marker.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (23, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Fluoreszenzmarker enthält.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 95:

TTCCAGAGCC TAATTTGCCA GTNA 24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 96
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 96:

CTTACCAACG CTAACGAGCG TCTTG 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 97
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 43 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 97:

CCCGTCTCGC TGGTGAAAAG AAAAACCACC CTGGCGCCCA ATA 43

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 98
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 98:
TATTGGGCGC CATGGTGGTT TTT 23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 99
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (10, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 5-Nitroindol.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (16, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 5-Nitroindol.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 99:
TATTGGGCGN CAGGGNGGTT TTT 23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 100
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (10, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 5-Nitroindol.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (16, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 5-Nitroindol.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 100:
TATTGGGCGN CATGGNGGTT TTT 23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 101
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (16, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 5-Nitropyrrol.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 101:
TATTGGGCGC CAGGGNGGTT TTT 23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 102
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (16, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist eine 5-Nitropyrrolgruppe.“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 102:
TATTGGGCGC CATGGNGGTT TTT 23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 103
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 56 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2’-Desoxycytosin-5’-O-(1-Thiomonophosphat).“
(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (2, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (3, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyguanosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (4..5, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (6, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (7, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (8, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (9..10, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 103:

```
CTGAATATAA ACTTGTGGTA GTTGGAGCTG GTGCCGTAGG CAAGAGTGCC TTGACG          56
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 104
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 56 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen, (1 "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxycytosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (2, " ")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (3, " ")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyguanosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (4..5, " ")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (6, " ")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (7, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (8, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (9..10, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 104:
CTGAATATAA ACTTGTGGTA GTTGGAGCTG GTGCCGTAGG CAAGAGTGCC TTGACG 56

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 105
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1, "")

(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyguanosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (2, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxycytosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (3, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (4, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxycytosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (5..6, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (7..8, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyguanosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (9, " ")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxycytosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 105:
GCTCAAGGCA CTCTTGCCTA CGA 23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 106
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 9 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Cy3-Amidit-Marker trägt."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base

(B) POSITION: 2..3
(D) SONSTIGE HINWEISE: /mod Base = ANDERE / Bemerkung = „Den Resten an diesen Positionen wurde eine Aminogruppe hinzugefügt."
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 106:
NTTCACCAG 9

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 107
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxycytosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (2, " ")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (3..4, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxycytosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (5..6, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (7, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxycytosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (8, " ")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (9, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 107:

CTCCAACTAC CACAAGTTTA TATTCAG 27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 108
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 14 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 108:
CGAGAGACCA CGCT 14

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 109
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 14 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (14, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position enthält eine abasische Ribose.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 109:
CGAGAGACCA CGCT 14

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 110
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 14 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (14, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position enthält eine abasische Ribose mit einer 3’-Phosphatgruppe.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 110:
CGAGAGACCA CGCT 14

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 111

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 15 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (15, “ “)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position enthält eine 3’-Phosphatgruppe.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 111:

CGAGAGACCA CGCTG 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 112
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzt, “ “)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2’-Desoxyguanosin-5’-O-(1-Thiomonophosphat).“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (2, ““)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2’-Desoxythymidin-5’-O-(1-Thiomonophosphat).“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (3..4, “ “)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2’-Desoxyadenosin-5’-O-(1-Thiomonophosphat).“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (5, “ “)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2’-Desoxythymidin-5’-O-(1-Thiomonophosphat).“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (6, ““)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2’-Desoxycytosin-5’-O-(1-Thiomonophosphat).“

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (7..8, " ")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (9, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (10, " ")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxycytosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 112:

GTAATCTTAC CAACGCTAAC GAGCGTCTTG 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 113
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1..2, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxycytosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (3, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (4..5, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (6..8, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxythymidin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (9, "")

(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxyguanosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz

(B) POSITION: Ersetzen (10, "")

(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 2'-Desoxycytosin-5'-O-(1-Thiomonophosphat)."

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 113:

CCTAATTTGC CAGTTACAAA ATAAACAGCC C 31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 114

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 9 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz

(B) POSITION: Ersetzen (1, "")

(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Cy3-Farbstoff trägt."

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base

(B) POSITION: 2..3

(D) SONSTIGE HINWEISE: /mod Base = ANDERE / Bemerkung = „Den Resten an diesen Positionen wurde eine Aminogruppe hinzugefügt."

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 114:

NTTCCAGAG 9

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 115

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 44 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 115:

TTTTCCAGAG CCTAATGAAA TTAGGCTCTG GAAAGACGCT CGTG 44

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 116

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 14 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 116:
AACGAGCGTC TTTG 14

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 117
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 14 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 117:
AACGAGCGTC ATTG 14

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 118
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 50 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 118:
TTTTTTTTTA ATTAGGCTCT GGAAAGACGC TCGTGAAACG AGCGTCTTTG 50

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 119
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 119:
TTTTCCAGAG CCTAATG 17

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 120
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 13 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position weist einen TET-Marker auf.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 120:

CCGGTCGTCC TGG 13

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 121
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 121:

CAATTCCGGT GTACTCACCG GTTCC 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 122
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 16 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzt, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position weist einen TET-Marker auf.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 122:

CCGGTCGTCC TGGCAA 16

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 123
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 47 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 123:
TGTTTTGACC TCCATAGAAG ACCCTATAGT GAGTCGTATT AATTTCG 47

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 124
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 124:
CGAAATTAAT ACGACTCACT ATA 23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 125
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 125:
CGAAATTAAT ACGACTCACT ATACCCAGAA 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 126
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 16 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 126:
CGAAATTAAT ACGACT 16

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 127
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 13 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 127:
CGAAATTAAT ACG 13

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 128
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 128:
CGAAATTAAT AC 12

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 129
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 129:
CACTATAGGG TCTTCTATGG AGGTC 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 130
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 28 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 130:
ACTCACTATA GGGTCTTCTA TGGAGGTC 28

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 131
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 131:

GACTCACTAT AGGGTCTTCT ATGGAGGTC 29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 132
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 132:
CGAAATTAAT ACGCAGTATG TTAGCAAACG 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 133
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 133:
GAACTGGCAT GATTAAGACT CCTTATTACC 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 134
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 134:
GAACTGGCAT GATTAAGACT CCTTATTAA 29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 135
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 326 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 135:

```
Met Gly Val Gln Phe Gly Asp Phe Ile Pro Lys Asn Ile Ile Ser Phe
1               5                  10                  15

Glu Asp Leu Lys Gly Lys Lys Val Ala Ile Asp Gly Met Asn Ala Leu
            20                  25                  30

Tyr Gln Phe Leu Thr Ser Ile Arg Leu Arg Asp Gly Ser Pro Leu Arg
        35                  40                  45

Asn Arg Lys Gly Glu Ile Thr Ser Ala Tyr Asn Gly Val Phe Tyr Lys
    50                  55                  60

Thr Ile His Leu Leu Glu Asn Asp Ile Thr Pro Ile Trp Val Phe Asp
65                  70                  75                  80

Gly Glu Pro Pro Lys Leu Lys Glu Lys Thr Arg Lys Val Arg Arg Glu
                85                  90                  95

Met Lys Glu Lys Ala Glu Leu Lys Met Lys Glu Ala Ile Lys Lys Glu
            100                 105                 110

Asp Phe Glu Glu Ala Ala Lys Tyr Ala Lys Arg Val Ser Tyr Leu Thr
        115                 120                 125

Pro Lys Met Val Glu Asn Cys Lys Tyr Leu Leu Ser Leu Met Gly Ile
    130                 135                 140

Pro Tyr Val Glu Ala Pro Ser Glu Gly Glu Ala Gln Ala Ser Tyr Met
145                 150                 155                 160

Ala Lys Lys Gly Asp Val Trp Ala Val Val Ser Gln Asp Tyr Asp Ala
                165                 170                 175

Leu Leu Tyr Gly Ala Pro Arg Val Val Arg Asn Leu Thr Thr Thr Lys
            180                 185                 190

Glu Met Pro Glu Leu Ile Glu Leu Asn Glu Val Leu Glu Asp Leu Arg
        195                 200                 205

Ile Ser Leu Asp Asp Leu Ile Asp Ile Ala Ile Phe Met Gly Thr Asp
    210                 215                 220

Tyr Asn Pro Gly Gly Val Lys Gly Ile Gly Phe Lys Arg Ala Tyr Glu
225                 230                 235                 240

Leu Val Arg Ser Gly Val Ala Lys Asp Val Leu Lys Lys Glu Val Glu
                245                 250                 255

Tyr Tyr Asp Glu Ile Lys Arg Ile Phe Lys Glu Pro Lys Val Thr Asp
            260                 265                 270

Asn Tyr Ser Leu Ser Leu Lys Leu Pro Asp Lys Glu Gly Ile Ile Lys
        275                 280                 285

Phe Leu Val Asp Glu Asn Asp Phe Asn Tyr Asp Arg Val Lys Lys His
    290                 295                 300

Val Asp Lys Leu Tyr Asn Leu Ile Ala Asn Lys Thr Lys Gln Lys Thr
305                 310                 315                 320

Leu Asp Ala Trp Phe Lys
                325
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 136
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 340 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 136:

```
Met Gly Val Pro Ile Gly Glu Ile Ile Pro Arg Lys Glu Ile Glu Leu
1               5                  10                  15

Glu Asn Leu Tyr Gly Lys Lys Ile Ala Ile Asp Ala Leu Asn Ala Ile
            20                  25                  30

Tyr Gln Phe Leu Ser Thr Ile Arg Gln Lys Asp Gly Thr Pro Leu Met
        35                  40                  45

Asp Ser Lys Gly Arg Ile Thr Ser His Leu Ser Gly Leu Phe Tyr Arg
    50                  55                  60

Thr Ile Asn Leu Met Glu Ala Gly Ile Lys Pro Val Tyr Val Phe Asp
65                  70                  75                  80

Gly Glu Pro Pro Glu Phe Lys Lys Lys Glu Leu Glu Lys Arg Arg Glu
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Glu Ala Glu Glu Lys Trp Arg Glu Ala Leu Glu Lys Gly
            100                 105                 110

Glu Ile Glu Glu Ala Arg Lys Tyr Ala Gln Arg Ala Thr Arg Val Asn
        115                 120                 125

Glu Met Leu Ile Glu Asp Ala Lys Lys Leu Leu Glu Leu Met Gly Ile
    130                 135                 140

Pro Ile Val Gln Ala Pro Ser Glu Gly Glu Ala Gln Ala Ala Tyr Met
145                 150                 155                 160

Ala Ala Lys Gly Ser Val Tyr Ala Ser Ala Ser Gln Asp Tyr Asp Ser
                165                 170                 175

Leu Leu Phe Gly Ala Pro Arg Leu Val Arg Asn Leu Thr Ile Thr Gly
            180                 185                 190

Lys Arg Lys Leu Pro Gly Lys Asn Val Tyr Val Glu Ile Lys Pro Glu
        195                 200                 205
```

```
Leu Ile Ile Leu Glu Glu Val Leu Lys Glu Leu Lys Leu Thr Arg Glu
    210                 215                 220

Lys Leu Ile Glu Leu Ala Ile Leu Val Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Gly
225                 230                 235                 240

Gly Ile Lys Gly Ile Gly Leu Lys Lys Ala Leu Glu Ile Val Arg His
                245                 250                 255

Ser Lys Asp Pro Leu Ala Lys Phe Gln Lys Gln Ser Asp Val Asp Leu
            260                 265                 270

Tyr Ala Ile Lys Glu Phe Phe Leu Asn Pro Pro Val Thr Asp Asn Tyr
        275                 280                 285

Asn Leu Val Trp Arg Asp Pro Asp Glu Glu Gly Ile Leu Lys Phe Leu
    290                 295                 300

Cys Asp Glu His Asp Phe Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Gly Leu Glu
305                 310                 315                 320

Arg Leu Lys Lys Ala Ile Lys Ser Gly Lys Gln Ser Thr Leu Glu Ser
                325                 330                 335

Trp Phe Lys Arg
            340
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 137
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 380 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 137:

```
Met Gly Ile Gln Gly Leu Ala Lys Leu Ile Ala Asp Val Ala Pro Ser
1               5                   10                  15

Ala Ile Arg Glu Asn Asp Ile Lys Ser Tyr Phe Gly Arg Lys Val Ala
            20                  25                  30

Ile Asp Ala Ser Met Ser Ile Tyr Gln Phe Leu Ile Ala Val Arg Gln
        35                  40                  45

Gly Gly Asp Val Leu Gln Asn Glu Glu Gly Glu Thr Thr Ser His Leu
    50                  55                  60

Met Gly Met Phe Tyr Arg Thr Ile Arg Met Met Glu Asn Gly Ile Lys
65                  70                  75                  80

Pro Val Tyr Val Phe Asp Gly Lys Pro Pro Gln Leu Lys Ser Gly Glu
                85                  90                  95

Leu Ala Lys Arg Ser Glu Arg Arg Ala Glu Ala Glu Lys Gln Leu Gln
            100                 105                 110

Gln Ala Gln Ala Ala Gly Ala Glu Gln Glu Val Glu Lys Phe Thr Lys
        115                 120                 125

Arg Leu Val Lys Val Thr Lys Gln His Asn Asp Glu Cys Lys His Leu
    130                 135                 140
```

```
Leu Ser Leu Met Gly Ile Pro Tyr Leu Asp Ala Pro Ser Glu Ala Glu
145                 150                 155                 160

Ala Ser Cys Ala Ala Leu Val Lys Ala Gly Lys Val Tyr Ala Ala Ala
                165                 170                 175

Thr Glu Asp Met Asp Cys Leu Thr Phe Gly Ser Pro Val Leu Met Arg
            180                 185                 190

His Leu Thr Ala Ser Glu Ala Lys Lys Leu Pro Ile Gln Glu Phe His
        195                 200                 205

Leu Ser Arg Ile Leu Gln Glu Leu Gly Leu Asn Gln Glu Gln Phe Val
    210                 215                 220

Asp Leu Cys Ile Leu Leu Gly Ser Asp Tyr Cys Glu Ser Ile Arg Gly
225                 230                 235                 240

Ile Gly Pro Lys Arg Ala Val Asp Leu Ile Gln Lys His Lys Ser Ile
                245                 250                 255

Glu Glu Ile Val Arg Arg Leu Asp Pro Asn Lys Tyr Pro Val Pro Glu
            260                 265                 270

Asn Trp Leu His Lys Glu Ala His Gln Leu Phe Leu Glu Pro Glu Val
        275                 280                 285

Leu Asp Pro Glu Ser Val Glu Leu Lys Trp Ser Glu Pro Asn Glu Glu
    290                 295                 300

Glu Leu Ile Lys Phe Met Cys Gly Glu Lys Gln Phe Ser Glu Glu Arg
305                 310                 315                 320

Ile Arg Ser Gly Val Lys Arg Leu Ser Lys Ser Arg Gln Gly Ser Thr
                325                 330                 335

Gln Gly Arg Leu Asp Asp Phe Phe Lys Val Thr Gly Ser Leu Ser Ser
            340                 345                 350

Ala Lys Arg Lys Glu Pro Glu Pro Lys Gly Ser Thr Lys Lys Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Thr Gly Ala Ala Gly Lys Phe Lys Arg Gly Lys
    370                 375                 380
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 138
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 378 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 138:

```
Met Gly Ile His Gly Leu Ala Lys Leu Ile Ala Asp Val Ala Pro Ser
1               5                   10                  15

Ala Ile Arg Glu Asn Asp Ile Lys Ser Tyr Phe Gly Arg Lys Val Ala
            20                  25                  30

Ile Asp Ala Ser Met Ser Ile Tyr Gln Phe Leu Ile Ala Val Arg Gln
        35                  40                  45
```

```
Gly Gly Asp Val Leu Gln Asn Glu Glu Gly Glu Thr Thr Ser Leu Met
    50                  55                  60

Gly Met Phe Tyr Arg Thr Ile Arg Met Glu Asn Gly Ile Lys Pro Val
65                  70                  75                  80

Tyr Val Phe Asp Gly Lys Pro Pro Gln Leu Lys Ser Gly Glu Leu Ala
                85                  90                  95

Lys Arg Ser Glu Arg Arg Ala Glu Ala Glu Lys Gln Leu Gln Gln Ala
            100                 105                 110

Gln Glu Ala Gly Met Glu Glu Glu Val Glu Lys Phe Thr Lys Arg Leu
        115                 120                 125

Val Lys Val Thr Lys Gln His Asn Asp Glu Cys Lys His Leu Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Met Gly Ile Pro Tyr Leu Asp Ala Pro Ser Glu Ala Glu Ala Ser
145                 150                 155                 160

Cys Ala Ala Leu Ala Lys Ala Gly Lys Val Tyr Ala Ala Ala Thr Glu
                165                 170                 175

Asp Met Asp Cys Leu Thr Phe Gly Ser Pro Val Leu Met Arg His Leu
            180                 185                 190

Thr Ala Ser Glu Ala Lys Lys Leu Pro Ile Gln Glu Phe His Leu Ser
        195                 200                 205

Arg Val Leu Gln Glu Leu Gly Leu Asn Gln Glu Gln Phe Val Asp Leu
    210                 215                 220

Cys Ile Leu Leu Gly Ser Asp Tyr Cys Glu Ser Ile Arg Gly Ile Gly
225                 230                 235                 240

Ala Lys Arg Ala Val Asp Leu Ile Gln Lys His Lys Ser Ile Glu Glu
                245                 250                 255

Ile Val Arg Arg Leu Asp Pro Ser Lys Tyr Pro Val Pro Glu Asn Trp
            260                 265                 270

Leu His Lys Glu Ala Gln Gln Leu Phe Leu Glu Pro Glu Val Val Asp
        275                 280                 285

Pro Glu Ser Val Glu Leu Lys Trp Ser Glu Pro Asn Glu Glu Glu Leu
    290                 295                 300

Val Lys Phe Met Cys Gly Glu Lys Gln Phe Ser Glu Glu Arg Ile Arg
305                 310                 315                 320

Ser Gly Val Lys Arg Leu Ser Lys Ser Arg Gln Gly Ser Thr Gln Gly
                325                 330                 335

Arg Leu Asp Asp Phe Phe Lys Val Thr Gly Ser Leu Ser Ser Ala Lys
            340                 345                 350

Arg Lys Glu Pro Glu Pro Lys Gly Pro Ala Lys Lys Lys Ala Lys Thr
        355                 360                 365

Gly Gly Ala Gly Lys Phe Arg Arg Gly Lys
    370                 375
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 139
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 382 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 139:

```
Met Gly Ile Lys Gly Leu Asn Ala Ile Ile Ser Glu His Val Pro Ser
1               5                  10                  15

Ala Ile Arg Lys Ser Asp Ile Lys Ser Phe Phe Gly Arg Lys Val Ala
            20                  25                  30

Ile Asp Ala Ser Met Ser Leu Tyr Gln Phe Leu Ile Ala Val Arg Gln
        35                  40                  45

Gln Asp Gly Gly Gln Leu Thr Asn Glu Ala Gly Glu Thr Thr Ser His
    50                  55                  60

Leu Met Gly Met Phe Tyr Arg Thr Leu Arg Met Ile Asp Asn Gly Ile
65                  70                  75                  80

Lys Pro Cys Tyr Val Phe Asp Gly Lys Pro Pro Asp Leu Lys Ser His
                85                  90                  95

Glu Leu Thr Lys Arg Ser Ser Arg Arg Val Glu Thr Glu Lys Lys Leu
            100                 105                 110

Ala Glu Ala Thr Thr Glu Leu Glu Lys Met Lys Gln Glu Arg Arg Leu
        115                 120                 125

Val Lys Val Ser Lys Glu His Asn Glu Glu Ala Gln Lys Leu Leu Gly
    130                 135                 140

Leu Met Gly Ile Pro Tyr Ile Ile Ala Pro Thr Glu Ala Glu Ala Gln
145                 150                 155                 160

Cys Ala Glu Leu Ala Lys Lys Gly Lys Val Tyr Ala Ala Ala Ser Glu
                165                 170                 175

Asp Met Asp Thr Leu Cys Tyr Arg Thr Pro Phe Leu Leu Arg His Leu
            180                 185                 190

Thr Phe Ser Glu Ala Lys Lys Glu Pro Ile His Glu Ile Asp Thr Glu
        195                 200                 205

Leu Val Leu Arg Gly Leu Asp Leu Thr Ile Glu Gln Phe Val Asp Leu
    210                 215                 220

Cys Ile Met Leu Gly Cys Asp Tyr Cys Glu Ser Ile Arg Gly Val Gly
225                 230                 235                 240

Pro Val Thr Ala Leu Lys Leu Ile Lys Thr His Gly Ser Ile Glu Lys
                245                 250                 255

Ile Val Glu Phe Ile Glu Ser Gly Glu Ser Asn Asn Thr Lys Trp Lys
            260                 265                 270

Ile Pro Glu Asp Trp Pro Tyr Lys Gln Ala Arg Met Leu Phe Leu Asp
        275                 280                 285

Pro Glu Val Ile Asp Gly Asn Glu Ile Asn Leu Lys Trp Ser Pro Pro
    290                 295                 300
```

```
Lys Glu Lys Glu Leu Ile Glu Tyr Leu Cys Asp Asp Lys Lys Phe Ser
305                 310                 315                 320

Glu Glu Arg Val Lys Ser Gly Ile Ser Arg Leu Lys Lys Gly Leu Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Ile Gln Gly Arg Leu Asp Gly Phe Phe Gln Val Val Pro Lys
            340                 345                 350

Thr Lys Glu Gln Leu Ala Ala Ala Ala Lys Arg Ala Gln Glu Asn Lys
        355                 360                 365

Lys Leu Asn Lys Asn Lys Asn Lys Val Thr Lys Gly Arg Arg
    370                 375                 380
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 140

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 387 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 140:

```
Met Gly Val His Ser Phe Trp Asp Ile Ala Gly Pro Thr Ala Arg Pro
1               5                   10                  15

Val Arg Leu Glu Ser Leu Glu Asp Lys Arg Met Ala Val Asp Ala Ser
            20                  25                  30

Ile Trp Ile Tyr Gln Phe Leu Lys Ala Val Arg Asp Gln Glu Gly Asn
        35                  40                  45

Ala Val Lys Asn Ser His Ile Thr Gly Phe Phe Arg Arg Ile Cys Lys
    50                  55                  60

Leu Leu Tyr Phe Gly Ile Arg Pro Val Phe Val Phe Asp Gly Gly Val
65                  70                  75                  80

Pro Val Leu Lys Arg Glu Thr Ile Arg Gln Arg Lys Glu Arg Arg Gln
                85                  90                  95

Gly Lys Arg Glu Ser Ala Lys Ser Thr Ala Arg Lys Leu Leu Ala Leu
            100                 105                 110

Gln Leu Gln Asn Gly Ser Asn Asp Asn Glu Val Thr Met Asp Met Ile
        115                 120                 125

Lys Glu Val Gln Glu Leu Leu Ser Arg Phe Gly Ile Pro Tyr Ile Thr
    130                 135                 140

Ala Pro Met Glu Ala Glu Ala Gln Cys Ala Glu Leu Leu Gln Leu Asn
145                 150                 155                 160

Leu Val Asp Gly Ile Ile Thr Asp Asp Ser Asp Val Phe Leu Phe Gly
                165                 170                 175

Gly Thr Lys Ile Tyr Lys Asn Met Phe His Glu Lys Asn Tyr Val Glu
            180                 185                 190

Phe Tyr Asp Ala Glu Ser Ile Leu Lys Leu Leu Gly Leu Asp Arg Lys
        195                 200                 205
```

```
Asn Met Ile Glu Leu Ala Gln Leu Leu Gly Ser Asp Tyr Thr Asn Gly
    210                 215                 220

Leu Lys Gly Met Gly Pro Val Ser Ser Ile Glu Val Ile Ala Glu Phe
225                 230                 235                 240

Gly Asn Leu Lys Asn Phe Lys Asp Trp Tyr Asn Asn Gly Gln Phe Asp
                245                 250                 255

Lys Arg Lys Gln Glu Thr Glu Asn Lys Phe Glu Lys Asp Leu Arg Lys
            260                 265                 270

Lys Leu Val Asn Asn Glu Ile Ile Leu Asp Asp Asp Phe Pro Ser Val
        275                 280                 285

Met Val Tyr Asp Ala Tyr Met Arg Pro Glu Val Asp His Asp Thr Thr
    290                 295                 300

Pro Phe Val Trp Gly Val Pro Asp Leu Asp Met Leu Arg Ser Phe Met
305                 310                 315                 320

Lys Thr Gln Leu Gly Trp Pro His Glu Lys Ser Asp Glu Ile Leu Ile
                325                 330                 335

Pro Leu Ile Arg Asp Val Asn Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Gln Lys
            340                 345                 350

Arg Ile Asn Glu Phe Phe Pro Arg Glu Tyr Ile Ser Gly Asp Lys Lys
        355                 360                 365

Leu Asn Thr Ser Lys Arg Ile Ser Thr Ala Thr Gly Lys Leu Lys Lys
    370                 375                 380

Arg Lys Met
385
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 141
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 488 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 141:

```
Met Gly Val Ser Gly Leu Trp Asn Ile Leu Glu Pro Val Lys Arg Pro
1               5                   10                  15

Val Lys Leu Glu Thr Leu Val Asn Lys Arg Leu Ala Ile Asp Ala Ser
            20                  25                  30

Ile Trp Ile Tyr Gln Phe Leu Lys Ala Val Arg Asp Lys Glu Gly Asn
        35                  40                  45

Gln Leu Lys Ser Ser His Val Val Gly Phe Phe Arg Arg Ile Cys Lys
    50                  55                  60

Leu Leu Phe Phe Gly Ile Lys Pro Val Phe Val Phe Asp Gly Gly Ala
65                  70                  75                  80

Pro Ser Leu Lys Arg Gln Thr Ile Gln Lys Arg Gln Ala Arg Arg Leu
                85                  90                  95
```

```
Asp Arg Glu Glu Asn Ala Thr Val Thr Ala Asn Lys Leu Leu Ala Leu
          100                 105                 110

Gln Met Arg His Gln Ala Met Leu Leu Lys Arg Asp Ala Asp Glu Val
      115                 120                 125

Thr Gln Val Met Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu Leu Arg Leu Phe Gly
  130                 135                 140

Leu Pro Tyr Ile Val Ala Pro Gln Glu Ala Glu Ala Gln Cys Ser Lys
145                 150                 155                 160

Leu Leu Glu Leu Lys Leu Val Asp Gly Ile Val Thr Asp Asp Ser Asp
                165                 170                 175

Val Phe Leu Phe Gly Gly Thr Arg Val Tyr Arg Asn Met Phe Asn Gln
            180                 185                 190

Asn Lys Phe Val Glu Leu Tyr Leu Met Asp Asp Met Lys Arg Glu Phe
      195                 200                 205

Asn Val Asn Gln Met Asp Leu Ile Lys Leu Ala His Leu Leu Gly Ser
  210                 215                 220

Asp Tyr Thr Met Gly Leu Ser Arg Val Gly Pro Val Leu Ala Leu Glu
225                 230                 235                 240

Ile Leu His Glu Phe Pro Gly Asp Thr Gly Leu Phe Glu Phe Lys Lys
                245                 250                 255

Trp Phe Gln Arg Leu Ser Thr Gly His Ala Ser Lys Asn Asp Val Asn
            260                 265                 270

Thr Pro Val Lys Lys Arg Ile Asn Lys Leu Val Gly Lys Ile Ile Leu
      275                 280                 285

Pro Ser Glu Phe Pro Asn Pro Leu Val Asp Glu Ala Tyr Leu His Pro
  290                 295                 300

Ala Val Asp Asp Ser Lys Gln Ser Phe Gln Trp Gly Ile Pro Asp Leu
305                 310                 315                 320

Asp Glu Leu Arg Gln Phe Leu Met Ala Thr Val Gly Trp Ser Lys Gln
                325                 330                 335

Arg Thr Asn Glu Val Leu Leu Pro Val Ile Gln Asp Met His Lys Lys
            340                 345                 350

Gln Phe Val Gly Thr Gln Ser Asn Leu Thr Gln Phe Phe Glu Gly Gly
      355                 360                 365

Asn Thr Asn Val Tyr Ala Pro Arg Val Ala Tyr His Phe Lys Ser Lys
  370                 375                 380

Arg Leu Glu Asn Ala Leu Ser Ser Phe Lys Asn Gln Ile Ser Asn Gln
385                 390                 395                 400

Ser Pro Met Ser Glu Glu Ile Gln Ala Asp Ala Asp Ala Phe Gly Glu
                405                 410                 415

Ser Lys Gly Ser Asp Glu Leu Gln Ser Arg Ile Leu Arg Arg Lys Lys
            420                 425                 430

Met Met Ala Ser Lys Asn Ser Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Asp
      435                 440                 445
```

```
Asn Phe Leu Ala Ser Leu Thr Pro Lys Thr Asn Ser Ser Ser Ile Ser
    450                 455                 460

Ile Glu Asn Leu Pro Arg Lys Thr Lys Leu Ser Thr Ser Leu Leu Lys
465                 470                 475                 480

Lys Pro Ser Lys Arg Arg Arg Lys
                485
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 142
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 550 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 142:

```
Met Gly Val Gln Gly Leu Trp Lys Leu Leu Glu Cys Ser Gly Arg Gln
1               5                   10                  15

Val Ser Pro Glu Ala Leu Glu Gly Lys Ile Leu Ala Val Asp Ile Ser
            20                  25                  30

Ile Trp Leu Asn Gln Ala Leu Lys Gly Val Arg Asp Arg His Gly Asn
        35                  40                  45

Ser Ile Glu Asn Pro His Leu Leu Thr Leu Phe His Arg Leu Cys Lys
    50                  55                  60

Leu Leu Phe Phe Arg Ile Arg Pro Ile Phe Val Phe Asp Gly Asp Ala
65                  70                  75                  80

Pro Leu Leu Lys Lys Gln Thr Leu Val Lys Arg Arg Gln Arg Lys Asp
                85                  90                  95

Leu Ala Ser Ser Asp Ser Arg Lys Thr Thr Glu Lys Leu Leu Lys Thr
            100                 105                 110

Phe Leu Lys Arg Gln Ala Ile Lys Thr Glu Arg Ile Ala Ala Thr Val
        115                 120                 125

Thr Gly Gln Met Phe Leu Glu Ser Gln Glu Leu Leu Arg Leu Phe Gly
    130                 135                 140

Ile Pro Tyr Ile Gln Ala Pro Met Glu Ala Glu Ala Gln Cys Ala Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Leu Thr Asp Gln Thr Ser Gly Thr Ile Thr Asp Asp Ser Asp
                165                 170                 175

Ile Trp Leu Phe Gly Ala Arg His Val Tyr Arg Asn Phe Phe Asn Lys
            180                 185                 190

Asn Lys Phe Val Glu Tyr Tyr Gln Tyr Val Asp Phe His Asn Gln Leu
        195                 200                 205

Gly Leu Asp Arg Asn Lys Leu Ile Asn Leu Ala Tyr Leu Leu Gly Ser
    210                 215                 220

Asp Tyr Thr Glu Gly Ile Pro Thr Val Gly Cys Val Thr Ala Met Glu
225                 230                 235                 240
```

```
Ile Leu Asn Glu Phe Pro Gly His Gly Leu Glu Pro Leu Leu Lys Phe
                245                 250                 255

Ser Glu Trp Trp His Glu Ala Gln Lys Asn Pro Lys Ile Arg Pro Asn
            260                 265                 270

Pro His Asp Thr Lys Val Lys Lys Lys Leu Arg Thr Leu Gln Leu Thr
        275                 280                 285

Pro Gly Phe Pro Asn Pro Ala Val Ala Glu Ala Tyr Leu Lys Pro Val
    290                 295                 300

Val Asp Asp Ser Lys Gly Ser Phe Leu Trp Gly Lys Pro Asp Leu Asp
305                 310                 315                 320

Lys Ile Arg Glu Phe Cys Gln Arg Tyr Phe Gly Trp Asn Arg Thr Lys
                325                 330                 335

Thr Asp Glu Ser Leu Phe Pro Val Leu Lys Gln Leu Asp Ala Gln Gln
            340                 345                 350

Thr Gln Leu Arg Ile Asp Ser Phe Phe Arg Leu Ala Gln Gln Glu Lys
        355                 360                 365

Glu Asp Ala Lys Arg Ile Lys Ser Gln Arg Leu Asn Arg Ala Val Thr
    370                 375                 380

Cys Met Leu Arg Lys Glu Lys Glu Ala Ala Ala Ser Glu Ile Glu Ala
385                 390                 395                 400

Val Ser Val Ala Met Glu Lys Glu Phe Glu Leu Leu Asp Lys Ala Lys
                405                 410                 415

Arg Lys Thr Gln Lys Arg Gly Ile Thr Asn Thr Leu Glu Glu Ser Ser
            420                 425                 430

Ser Leu Lys Arg Lys Arg Leu Ser Asp Ser Lys Arg Lys Asn Thr Cys
        435                 440                 445

Gly Gly Phe Leu Gly Glu Thr Cys Leu Ser Glu Ser Ser Asp Gly Ser
    450                 455                 460

Ser Ser Glu His Ala Glu Ser Ser Ser Leu Met Asn Val Gln Arg Arg
465                 470                 475                 480

Thr Ala Ala Lys Glu Pro Lys Thr Ser Ala Ser Asp Ser Gln Asn Ser
                485                 490                 495

Val Lys Glu Ala Pro Val Lys Asn Gly Gly Ala Thr Thr Ser Ser Ser
            500                 505                 510

Ser Asp Ser Asp Asp Asp Gly Gly Lys Glu Lys Met Val Leu Val Thr
        515                 520                 525

Ala Arg Ser Val Phe Gly Lys Lys Arg Arg Lys Leu Arg Arg Ala Arg
    530                 535                 540

Gly Arg Lys Arg Lys Thr
545                 550
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 143
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 543 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 143:

```
Met Gly Val Gln Gly Leu Trp Lys Leu Leu Glu Cys Ser Gly His Arg
1               5                  10                  15

Val Ser Pro Glu Ala Leu Glu Gly Lys Val Leu Ala Val Asp Ile Ser
            20                  25                  30

Ile Trp Leu Asn Gln Ala Leu Lys Gly Val Arg Asp Ser His Gly Asn
        35                  40                  45

Val Ile Glu Asn Ala His Leu Leu Thr Leu Phe His Arg Leu Cys Lys
    50                  55                  60

Leu Leu Phe Phe Arg Ile Arg Pro Ile Phe Val Phe Asp Gly Asp Ala
65                  70                  75                  80

Pro Leu Leu Lys Lys Gln Thr Leu Ala Lys Arg Arg Gln Arg Lys Asp
                85                  90                  95

Ser Ala Ser Ile Asp Ser Arg Lys Thr Thr Glu Lys Leu Leu Lys Thr
            100                 105                 110

Phe Leu Lys Arg Gln Ala Leu Lys Thr Asp Arg Ile Ala Ala Ser Val
        115                 120                 125

Thr Gly Gln Met Phe Leu Glu Ser Gln Glu Leu Leu Arg Leu Phe Gly
    130                 135                 140

Val Pro Tyr Ile Gln Ala Pro Met Glu Ala Glu Ala Gln Cys Ala Val
145                 150                 155                 160

Leu Asp Leu Ser Asp Gln Thr Ser Gly Thr Ile Thr Asp Asp Ser Asp
                165                 170                 175

Ile Trp Leu Phe Gly Ala Arg His Val Tyr Lys Asn Phe Phe Asn Lys
            180                 185                 190

Asn Lys Phe Val Glu Tyr Tyr Gln Tyr Val Asp Phe Tyr Ser Gln Leu
        195                 200                 205

Gly Leu Asp Arg Asn Lys Leu Ile Asn Leu Ala Tyr Leu Leu Gly Ser
    210                 215                 220

Asp Tyr Thr Glu Gly Ile Pro Thr Val Gly Cys Val Thr Ala Met Glu
225                 230                 235                 240

Ile Leu Asn Glu Phe Pro Gly Arg Gly Leu Asp Pro Leu Leu Lys Phe
                245                 250                 255

Ser Glu Trp Trp His Glu Ala Gln Asn Asn Lys Lys Val Ala Glu Asn
            260                 265                 270

Pro Tyr Asp Thr Lys Val Lys Lys Lys Leu Arg Lys Leu Gln Leu Thr
        275                 280                 285

Pro Gly Phe Pro Asn Pro Ala Val Ala Asp Ala Tyr Leu Arg Pro Val
    290                 295                 300

Val Asp Asp Ser Arg Gly Ser Phe Leu Trp Gly Lys Pro Asp Val Asp
305                 310                 315                 320

Lys Ile Arg Glu Phe Cys Gln Arg Tyr Phe Gly Trp Asn Arg Met Lys
                325                 330                 335
```

```
Thr Asp Glu Ser Leu Tyr Pro Val Leu Lys His Leu Asn Ala His Gln
            340                 345                 350

Thr Gln Leu Arg Ile Asp Ser Phe Phe Arg Leu Ala Gln Gln Glu Lys
        355                 360                 365

Gln Asp Ala Lys Leu Ile Lys Ser His Arg Leu Ser Arg Ala Val Thr
    370                 375                 380

Cys Met Leu Arg Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ala Pro Glu Leu Thr Lys
385                 390                 395                 400

Val Thr Glu Ala Met Glu Lys Glu Phe Glu Leu Leu Asp Asp Ala Lys
                405                 410                 415

Gly Lys Thr Gln Lys Arg Glu Leu Pro Tyr Lys Lys Glu Thr Ser Val
            420                 425                 430

Pro Lys Arg Arg Arg Pro Ser Gly Asn Gly Gly Phe Leu Gly Asp Pro
        435                 440                 445

Tyr Cys Ser Glu Ser Pro Gln Glu Ser Ser Cys Glu Asp Gly Glu Gly
    450                 455                 460

Ser Ser Val Met Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ala Ala Glu Ser Ser Lys
465                 470                 475                 480

Ile Gly Cys Ser Asp Val Pro Asp Leu Val Arg Asp Ser Pro His Gly
                485                 490                 495

Arg Gln Gly Cys Val Ser Thr Ser Ser Ser Asp Ser Glu Asp Gly Glu
            500                 505                 510

Asp Lys Ala Lys Thr Val Leu Val Thr Ala Arg Pro Val Phe Gly Lys
        515                 520                 525

Lys Arg Arg Lys Leu Lys Ser Met Lys Arg Arg Lys Lys Lys Thr
    530                 535                 540
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 144
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 527 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 144:

```
Met Gly Val Gln Gly Leu Trp Lys Leu Leu Glu Cys Ser Gly Arg Pro
1               5                   10                  15

Ile Asn Pro Gly Thr Leu Glu Gly Lys Ile Leu Ala Val Asp Ile Ser
            20                  25                  30

Ile Trp Leu Asn Gln Ala Val Lys Gly Ala Arg Asp Arg Gln Gly Asn
        35                  40                  45

Ala Ile Gln Asn Ala His Leu Leu Thr Leu Phe His Arg Leu Cys Lys
    50                  55                  60

Leu Leu Phe Phe Arg Ile Arg Pro Ile Phe Val Phe Asp Gly Glu Ala
65                  70                  75                  80
```

```
Pro Leu Leu Lys Arg Gln Thr Leu Ala Lys Arg Arg Gln Arg Thr Asp
                85                  90                  95

Lys Ala Ser Asn Asp Ala Arg Lys Thr Asn Glu Lys Leu Leu Arg Thr
            100                 105                 110

Phe Leu Lys Arg Gln Ala Ile Lys Ala Glu Arg Ile Ala Ala Thr Val
        115                 120                 125

Thr Gly Gln Met Cys Leu Glu Ser Gln Glu Leu Leu Gln Leu Phe Gly
    130                 135                 140

Ile Pro Tyr Ile Val Ala Pro Met Glu Ala Glu Ala Gln Cys Ala Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Leu Thr Asp Gln Thr Ser Gly Thr Ile Thr Asp Asp Ser Asp
                165                 170                 175

Ile Trp Leu Phe Gly Ala Arg His Val Tyr Lys Asn Phe Phe Ser Gln
            180                 185                 190

Asn Lys His Val Glu Tyr Tyr Gln Tyr Ala Asp Ile His Asn Gln Leu
        195                 200                 205

Gly Leu Asp Arg Ser Lys Leu Ile Asn Leu Ala Tyr Leu Leu Gly Ser
    210                 215                 220

Asp Tyr Thr Glu Gly Ile Pro Thr Val Gly Tyr Val Ser Ala Met Glu
225                 230                 235                 240

Ile Leu Asn Glu Phe Pro Gly Gln Gly Leu Glu Pro Leu Val Lys Phe
                245                 250                 255

Lys Glu Trp Trp Ser Glu Ala Gln Lys Asp Lys Lys Met Arg Pro Asn
            260                 265                 270

Pro Asn Asp Thr Lys Val Lys Lys Lys Leu Arg Leu Leu Asp Leu Gln
        275                 280                 285

Gln Ser Phe Pro Asn Pro Ala Val Ala Ser Ala Tyr Leu Lys Pro Val
    290                 295                 300

Val Asp Glu Ser Lys Ser Ala Phe Ser Trp Gly Arg Pro Asp Leu Glu
305                 310                 315                 320

Gln Ile Arg Glu Phe Cys Glu Ser Arg Phe Gly Trp Tyr Arg Leu Lys
                325                 330                 335

Thr Asp Glu Val Leu Leu Pro Val Leu Lys Gln Leu Asn Ala Gln Gln
            340                 345                 350

Thr Gln Leu Arg Ile Asp Ser Phe Phe Arg Leu Glu Gln His Glu Ala
        355                 360                 365

Ala Gly Leu Lys Ser Gln Arg Leu Arg Arg Ala Val Thr Cys Met Lys
    370                 375                 380

Arg Lys Glu Arg Asp Val Glu Ala Glu Glu Val Glu Ala Ala Val Ala
385                 390                 395                 400

Val Met Glu Arg Glu Cys Thr Asn Gln Arg Lys Gly Gln Lys Thr Asn
                405                 410                 415

Thr Lys Ser Gln Gly Thr Lys Arg Arg Lys Pro Thr Glu Cys Ser Gln
            420                 425                 430
```

```
Glu Asp Gln Asp Pro Gly Gly Gly Phe Ile Gly Ile Glu Leu Lys Thr
        435                 440                 445

Leu Ser Ser Lys Ala Tyr Ser Ser Asp Gly Ser Ser Ser Asp Ala Glu
    450                 455                 460

Asp Leu Pro Ser Gly Leu Ile Asp Lys Gln Ser Gln Ser Gly Ile Val
465                 470                 475                 480

Gly Arg Gln Lys Ala Ser Asn Lys Val Glu Ser Ser Ser Ser Ser Asp
                485                 490                 495

Asp Glu Asp Arg Thr Val Met Val Thr Ala Lys Pro Val Phe Gln Gly
            500                 505                 510

Lys Lys Thr Lys Ser Lys Thr Met Lys Glu Thr Val Lys Arg Lys
        515                 520                 525
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 145
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 434 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 145:

```
Met Thr Ile Asn Gly Ile Trp Glu Trp Ala Asn His Val Val Arg Lys
1               5                  10                  15

Val Pro Asn Glu Thr Met Arg Asp Lys Thr Leu Ser Ile Asp Gly His
            20                  25                  30

Ile Trp Leu Tyr Glu Ser Leu Lys Gly Cys Glu Ala His His Gln Gln
        35                  40                  45

Thr Pro Asn Ser Tyr Leu Val Thr Phe Phe Thr Arg Ile Gln Arg Leu
    50                  55                  60

Leu Glu Leu Lys Ile Ile Pro Ile Val Val Phe Asp Asn Ile Asn Ala
65                  70                  75                  80

Ser Ser Ser Ala His Glu Ser Lys Asp Gln Asn Glu Phe Val Pro Arg
                85                  90                  95

Lys Arg Arg Ser Phe Gly Asp Ser Pro Phe Thr Asn Leu Val Asp His
            100                 105                 110

Val Tyr Lys Thr Asn Ala Leu Leu Thr Glu Leu Gly Ile Lys Val Ile
        115                 120                 125

Ile Ala Pro Gly Asp Gly Glu Ala Gln Cys Ala Arg Leu Glu Asp Leu
    130                 135                 140

Gly Val Thr Ser Gly Cys Ile Thr Thr Asp Phe Asp Tyr Phe Leu Phe
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Asn Leu Tyr Arg Phe Asp Phe Thr Ala Gly Thr Ser Ser
                165                 170                 175

Thr Ala Cys Leu His Asp Ile Met His Leu Ser Leu Gly Arg Met Phe
            180                 185                 190
```

```
Met Glu Lys Lys Val Ser Arg Pro His Leu Ile Ser Thr Ala Ile Leu
        195                 200                 205

Leu Gly Cys Asp Tyr Phe Gln Arg Gly Val Gln Asn Ile Gly Ile Val
    210                 215                 220

Ser Val Phe Asp Ile Leu Gly Glu Phe Gly Asp Asp Gly Asn Glu Glu
225                 230                 235                 240

Ile Asp Pro His Val Ile Leu Asp Arg Phe Ala Ser Tyr Val Arg Glu
                245                 250                 255

Glu Ile Pro Ala Arg Ser Glu Asp Thr Gln Arg Lys Leu Arg Leu Arg
            260                 265                 270

Arg Lys Lys Tyr Asn Phe Pro Val Gly Phe Pro Asn Cys Asp Ala Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Ile Thr Met Tyr Leu Arg Pro Pro Val Ser Ser Glu Ile
    290                 295                 300

Pro Lys Ile Ile Pro Arg Ala Ala Asn Phe Gln Gln Val Ala Glu Ile
305                 310                 315                 320

Met Met Lys Glu Cys Gly Trp Pro Ala Thr Arg Thr Gln Lys Glu Leu
                325                 330                 335

Ala Leu Ser Ile Arg Arg Lys Val His Leu Thr Thr Thr Val Ala Gln
            340                 345                 350

Thr Arg Ile Pro Asp Phe Phe Ala Ala Thr Lys Ser Lys Asn Phe Thr
        355                 360                 365

Pro Ile Val Glu Pro Cys Glu Ser Leu Glu Asp Tyr Ile Ser Ala Asn
    370                 375                 380

Asn Thr Trp Met Arg Lys Arg Lys Arg Ser Glu Ser Pro Gln Ile Leu
385                 390                 395                 400

Gln His His Ala Lys Arg Gln Val Pro Asp Arg Lys Arg Ser Val Lys
                405                 410                 415

Ile Arg Ala Phe Lys Pro Tyr Pro Thr Asp Val Ile Glu Leu Gly Asp
            420                 425                 430

Ser Asp
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 146
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 33 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 146:
TACTGACTCA CTATAGGGTC TTCTATGGAG GTC 33

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 147
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 42 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 147:
TTTTTTTTTA ATTAGGCTCT GGAAGACGCT GAAAGCGTCT TG 42

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 148
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 38 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 148:
TTTTTTTTTA ATTAGGCTCT GGAAGACGGA ACGTCTTG 38

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 149
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 149:
TTTTTTTTTA ATTAGGCTCT GGAAGAGAAT CTTG 34

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 150
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 32 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 150:
TTTTTTTTTA ATTAGGCTCT GGAAGGAACT TG 32

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 151
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 151:
TTTTTTTTTA ATTAGGCTCT GGAAG 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 152
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position enthält einen TET-Marker.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 152:
ATTAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAA 26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 153
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 153:
ACGGGGAAAG CCGGCGAACG TGGCGAGAAA 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 154
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 154:
TGACGGGGAA AGCCGGCGAA CGTGGCGAGA 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 155
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 155:
CTTGACGGGG AAAGCCGGCG AACGTGGCGA 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 156
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 156:
GCTTGACGGG GAAAGCCGGC GAACGTGGCG 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 157
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position enthält einen Fluoreszein-Marker.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 157:
AGAAAGGAAG GGAAGAAA 18

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 158
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 45 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position enthält einen Fluoreszein-Marker.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 158:

TGGAGGTCAA AACATCGATA AGTCGAAGAA AGGAAGGGAA GAAAT 45

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 159
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 14 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position enthält einen Fluoreszein-Marker.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 159:

TGTTTTGACC TCCA 14

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 160
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 160:

ACACAGTGTC CTCCCGCTCC TCCTGAGCAA 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 161
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position enthält einen Fluoreszein-Marker.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 161:
TTTCCCTCCT CCTCTTCC 18

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 162
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 54 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 162:
ATGAGGAAGA GGAGGAGGGT GCTCAGGAGG AGCGGGAGGA CACTGTGTCT GTCA 54

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 163
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 53 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 163:
TTCGCTTTCT TCCCTTCCTT TCTCGCCACG TTCGCCGGCT TTCCCCGTCA AGC 53

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 164
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 1011 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 164:

```
ATGGGTGCGG ATATTGGTGA CCTCTTTGAG AGGGAAGAGG TCGAGCTTGA GTACTTCTCA      60
GGAAAGAAAA TTGCCGTTGA TGCTTTCAAC ACGCTATACC AGTTCATCTC GATAATAAGG     120
CAGCCTGACG GTACGCCGTT AAAGGACTCA CAGGGCAGAA TCACCTCTCA CCTTTCCGGA     180
ATCCTATACA GAGTCTCCAA CATGGTCGAG GTGGGAATCA GGCCGGTGTT TGTATTCGAC     240
GGAGAGCCAC CGGAGTTCAA GAAGGCTGAA ATTGAGGAGA GGAAAAAGAG AAGGGCTGAG     300
GCAGAGGAGA TGTGGATTGC GGCTTTGCAG GCAGGAGATA AGGACGCGAA AAAGTATGCT     360
CAGGCTGCAG GGAGGGTTGA CGAGTACATT GTTGACTCCG CAAAGACGCT TTTAAGTTAC     420
ATGGGGATTC CCTTTGTCGA TGCCCCGTCT GAAGGAGAGG CGCAGGCTGC TTACATGGCA     480
GCAAAAGGCG ATGTGGAGTA CACAGGAAGC CAGGATTACG ATTCTCTGCT CTTCGGAAGC     540
CCGAGACTCG CCAGAAATCT CGCAATAACG GGAAAAAGGA AGCTTCCCGG CAAAAATGTC     600
TATGTGGATG TAAAGCCGGA GATAATAATT CTGGAAAGCA ACCTCAAAAG GCTGGGTTTG     660
ACGAGGGAGC AGCTCATCGA CATAGCGATT CTGGTCGGGA CGGACTACAA TGAGGGTGTG     720
AAGGGTGTCG GCGTCAAGAA GGCTTTGAAC TACATCAAGA CCTACGGAGA TATTTTCAGG     780
GCACTCAAGG CTCTGAAAGT AAATATTGAC CACGTAGAGG AGATAAGGAA TTTCTTCCTG     840
AATCCTCCTG TGACTGACGA CTACAGAATA GAGTTCAGGG AGCCTGACTT TGAGAAGGCC     900

ATCGAGTTCC TGTGCGAGGA GCACGACTTC AGCAGGGAGA GGGTCGAGAA GGCCTTGGAG     960
AAGCTCAAAG CTCTGAAGTC AACCCAGGCC ACGCTTGAGA GGTGGTTCTG A              1011
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 165
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 336 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant
(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 165:

```
Met Gly Ala Asp Ile Gly Asp Leu Phe Glu Arg Glu Glu Val Glu Leu
1               5                  10                  15

Glu Tyr Phe Ser Gly Lys Lys Ile Ala Val Asp Ala Phe Asn Thr Leu
            20                  25                  30

Tyr Gln Phe Ile Ser Ile Ile Arg Gln Pro Asp Gly Thr Pro Leu Lys
        35                  40                  45

Asp Ser Gln Gly Arg Ile Thr Ser His Leu Ser Gly Ile Leu Tyr Arg
    50                  55                  60

Val Ser Asn Met Val Glu Val Gly Ile Arg Pro Val Phe Val Phe Asp
65                  70                  75                  80

Gly Glu Pro Pro Glu Phe Lys Lys Ala Glu Ile Glu Glu Arg Lys Lys
                85                  90                  95

Arg Arg Ala Glu Ala Glu Glu Met Trp Ile Ala Ala Leu Gln Ala Gly
            100                 105                 110

Asp Lys Asp Ala Lys Lys Tyr Ala Gln Ala Ala Gly Arg Val Asp Glu
        115                 120                 125

Tyr Ile Val Asp Ser Ala Lys Thr Leu Leu Ser Tyr Met Gly Ile Pro
    130                 135                 140

Phe Val Asp Ala Pro Ser Glu Gly Glu Ala Gln Ala Ala Tyr Met Ala
145                 150                 155                 160

Ala Lys Gly Asp Val Glu Tyr Thr Gly Ser Gln Asp Tyr Asp Ser Leu
                165                 170                 175

Leu Phe Gly Ser Pro Arg Leu Ala Arg Asn Leu Ala Ile Thr Gly Lys
            180                 185                 190

Arg Lys Leu Pro Gly Lys Asn Val Tyr Val Asp Val Lys Pro Glu Ile
        195                 200                 205

Ile Ile Leu Glu Ser Asn Leu Lys Arg Leu Gly Leu Thr Arg Glu Gln
    210                 215                 220

Leu Ile Asp Ile Ala Ile Leu Val Gly Thr Asp Tyr Asn Glu Gly Val
225                 230                 235                 240

Lys Gly Val Gly Val Lys Lys Ala Leu Asn Tyr Ile Lys Thr Tyr Gly
                245                 250                 255

Asp Ile Phe Arg Ala Leu Lys Ala Leu Lys Val Asn Ile Asp His Val
            260                 265                 270

Glu Glu Ile Arg Asn Phe Phe Leu Asn Pro Pro Val Thr Asp Asp Tyr
        275                 280                 285

Arg Ile Glu Phe Arg Glu Pro Asp Phe Glu Lys Ala Ile Glu Phe Leu
    290                 295                 300

Cys Glu Glu His Asp Phe Ser Arg Glu Arg Val Glu Lys Ala Leu Glu
305                 310                 315                 320

Lys Leu Lys Ala Leu Lys Ser Thr Gln Ala Thr Leu Glu Arg Trp Phe
                325                 330                 335
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 166
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 166:
CCGTCAACAT TTACCATGGG TGCGGA 26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 167
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 167:
CCGCCACCTC GTAGTCGACA TCCTTTTCGT G 31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 168
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 168:

GGCGACCACA CCCGTCCTGT 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 169
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 169:
CCACGATGCG TCCGGCGTAG 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 170
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (29,““)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3’-Amin“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 170:
AACGAGGCGC ACCCACCCAA GGCACAGCN 29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 171
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 171:
ACGGGTCAAT GTCCATGCCC CAAAGA 26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 172
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 28 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 23..27
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Die Reste an diesen Positionen sind 2’-O-Methyle“.
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (28, ““)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Reste an dieser Position ist ein 3’-Amin“.
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 172:

GTCTGAGATG AAAGTGCGCC TCGTTAAN 28

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 173
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzt, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Fluoreszenzmarker enthält“.
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 173:

NTCTTCGCAC ATTTCATCTC AGACGGA 27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 174
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1..21
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Die Reste an diesen Positionen sind 2’-O-Methyle“.
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (22, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3’-Amin“.
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 174:

GCTGTGCCTT GGGTGGGTGC GN 22

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 175
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (29, “ “)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3’-Amin.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 175:

AACGAGGCGC ACCCACCCAA GGCACAGCN 29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 176
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 176:

ACGGGTCAAT GTCCATGCCC CAAAGA 26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 177
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 28 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 23..27
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Die Reste an diesen Positionen sind 2’-O-Methyle.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (28, ““)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3’-Amin“.
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 177:

GTCTGAGATG AAAGTGCGCC TCGTTAAN 28

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 178
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäur
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen, (1, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Fluoreszein-Marker enthält.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 178:

NTCTTCGCAC ATTTCATCTC AGAC 24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 179
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1..17
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Die Reste an diesen Positionen sind 2’-O-Methyle.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen(18, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3’-Amin“.
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 179:

GCTGTGCCTT GGGTGGGN 18

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 180
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1..19
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Die Reste an diesen Positionen sind 2’-O-Methyle.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (20, “”)

(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3'-Amin."

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 180:

GCTGTGCCTT GGGTGGGTGN 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 181
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1..21
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Die Reste an diesen Positionen sind 2'-O-Methyle".
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (22, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3'-Amin".
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 181:

GCTGTGCCTT GGGTGGGTGC GN 22

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 182
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA"
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1..22
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Die Reste an diesen Positionen sind 2'-O-Methyle".
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (23, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3'-Amin".
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 182:

GCTGTGCCTT GGGTGGGTGC GCN 23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 183
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 43 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Fluoreszein-Marker enthält“.
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 23
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position zeigt 2’-O-Methylzucker an“.
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (43, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3’-Amin“.
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 183:

NGTCTGAGAT GAAAGTGCTC CCGCACCCAC CCAAGGCACA GCN 43

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 184
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1..17
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Die Reste an diesen Positionen sind 2’-O-Methylzucker“.
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (18, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3’-Amin“.
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 184:

GCTGTGCCTT GGGTGGGN 18

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 185

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (29, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3’-Primer.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 185:
AACGAGGCGC ACCCACCCAA GGCACAGCN 29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 186
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 186:
GCTGTGCCTT GGGTGGGTGC G 21

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 187
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (21, “”)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3’-Amin“.
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 187:
GCTGTGCCTT GGGTGGGTGC N 21

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 188
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 15..20
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Die Reste an diesen Positionen sind 2'-O-Methylzucker“.
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (21, “ “)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3'-Amin.“
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 188:
GCTGTGCCTT GGGTGGGTGC N 21

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 189
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base
(B) POSITION: 1..20
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Die Reste an diesen Positionen sind 2'-O-Methylzucker.“
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (21, “ “)
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein 3'-Amin“.
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 189:
GCTGTGCCTT GGGTGGGTGC N 21

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 190
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /Beschr = „DNA“
(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: div_Differenz
(B) POSITION: Ersetzen (1, "")
(D) SONSTIGE HINWEISE: /Bemerkung = „Der Rest an dieser Position ist ein Abstandshalter, der einen Fluoreszein-Marker enthält."

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 190:

NTCTTCGCAC ATTTCATCTC AGACGGA 27

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis der Spaltung von Nukleinsäurespaltungsstrukturen, umfassend:
a) das Bereitstellen:
i) eines Spaltungsagens mit 5'-Nuklease-Funktion;
ii) einer ersten Zielnukleinsäure, die einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich und einen dritten Bereich umfaßt, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt und der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt;
iii) eines ersten Oligonukleotids, umfassend einen 3'-Anteil und einen 5'-Anteil, wobei der 3'-Anteil des ersten Oligonukleotids eine Sequenz enthält, die zum dritten Bereich der ersten Zielnukleinsäure vollständig komplementär ist, und wobei der 5'-Anteil des ersten Oligonukleotids eine Sequenz enthält, die unmittelbar auf den 3'-Anteil des ersten Oligonukleotids folgt und zum zweiten Bereich der ersten Zielnukleinsäure vollständig komplementär ist;
iv) eines zweiten Oligonukleotids, umfassend einen 3'-Anteil und einen 5'-Anteil, wobei der 5'-Anteil zum ersten Bereich der ersten Zielnukleinsäure vollständig komplementär ist und wobei der 3'-Anteil entweder zum zweiten Bereich der ersten Zielnukleinsäure komplementär oder mit dem zweiten Bereich der ersten Zielnukleinsäure fehlgepaart ist;
v) einer zweiten Zielnukleinsäure, die einen ersten Bereich, einen zweiten Bereich und einen dritten Bereich umfaßt, wobei der erste Bereich stromabwärts unmittelbar auf den zweiten Bereich folgt und der zweite Bereich stromabwärts unmittelbar auf den dritten Bereich folgt, wobei der erste Bereich zu einer im 5'-Anteil des ersten Oligonukleotids enthaltenen Sequenz komplementär ist;
vi) eines dritten Oligonukleotids, umfassend einen 5'- und einen 3'-Anteil, wobei der 5'-Anteil des dritten Oligonukleotids eine zum zweiten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure komplementäre Sequenz enthält und wobei der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids eine zum dritten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure komplementäre Sequenz enthält;
vii) eines zur Hemmung der Wechselwirkung zwischen dem ersten Oligonukleotid und der zweiten Zielnukleinsäure ausgewählten Arrestoragens;
b) das Erzeugen einer ersten Spaltungsstruktur, wobei wenigstens ein Anteil der Sequenz des 3'-Anteils des ersten Oligonukleotids in einer Annealing-Reaktion an den dritten Bereich der ersten Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei die Sequenz des 5'-Anteils des ersten Oligonukleotids in einer Annealing-Reaktion an den zweiten Bereich der ersten Zielnukleinsäure gebunden wird, so daß ein Doppelstrangbereich gebildet wird, und wobei wenigstens der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids in einer Annealing-Reaktion an den ersten Bereich der ersten Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei die Spaltung der ersten Spaltungsstruktur innerhalb des Doppelstrangbereichs über das Spaltungsagens mit einer 5'-Nuklease-Aktivität erfolgt, wodurch das erste Oligonukleotid unter Erzeugung eines den 5'-Anteil des ersten Oligonukleotids enthaltenden vierten Oligonukleotids gespalten wird, wobei das vierte Oligonukleotid ferner einen 3'-Anteil und einen 5'-Anteil umfaßt, wobei der 5'-Anteil des vierten Oligonukleotids zum ersten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure komplementär ist und wobei der 3'-Anteil entweder zum zweiten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure komplementär oder mit dem zweiten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure fehlgepaart ist;
c) das Erzeugen einer zweiten Spaltungsstruktur unter Bedingungen, bei denen das Arrestoragens die Wechselwirkung zwischen dem ersten Oligonukleotid und der zweiten Zielnukleinsäure hemmt, und wobei wenigstens ein Anteil des dritten Oligonukleotids in einer Annealing-Reaktion an den dritten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei wenigstens der 5'-Anteil des vierten Oligonukleotids in einer Annealing-Reaktion an den ersten Bereich der zweiten Zielnukleinsäure gebunden wird und wobei die Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur unter Erzeugung eines Spaltfragments erfolgt; und
d) das Nachweisen der Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Nachweisen der Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur das Nachweisen des Spaltfragments umfaßt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids ein zur ersten Zielnukleinsäure nicht komplementäres 3'-terminales Nukleotid umfaßt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der 3'-Anteil des vierten Oligonukleotids ein zur zweiten Zielnukleinsäure nicht komplementäres 3'-terminales Nukleotid umfaßt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids ein zur ersten Zielnukleinsäure nicht komplementäres 3'-terminales Nukleotid umfaßt und das vierte Oligonukleotid ein zur zweiten Zielnukleinsäure nicht komplementäres 3'-terminales Nukleotid umfaßt.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids aus einem zur ersten Zielnukleinsäure nicht komplementären einzelnen Nukleotid besteht.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der 3'-Anteil des vierten Oligonukleotids aus einem zur zweiten Zielnukleinsäure nicht komplementären einzelnen Nukleotid besteht.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids aus einem zur ersten Zielnukleinsäure nicht komplementären einzelnen Nukleotid besteht und der 3'-Anteil des vierten Oligonukleotids aus einem zur zweiten Zielnukleinsäure nicht komplementären einzelnen Nukleotid besteht.

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Arrestoragens um ein Oligonukleotid handelt.

10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids mit der zweiten Zielnukleinsäure kovalent verknüpft ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids mit der zweiten Zielnukleinsäure über eine Stem-Loop-Struktur unter Ausbildung einer Haarnadelstruktur kovalent verknüpft ist.

12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Nachweisen der Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur den Nachweis von Fluoreszenz umfaßt.

13. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Nachweisen der Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur den Nachweis von Masse umfaßt.

14. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Nachweisen der Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur den Nachweis von Fluoreszenzenergietransfer umfaßt.

15. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Nachweisen der Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur den Nachweis von Hybridisierung auf einem Chip umfaßt.

16. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Nachweisen der Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur einen Nachweis, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem Nachweis von Radioaktivität, Lumineszenz, Phosphoreszenz, Fluoreszenzpolarisation und Ladung, umfaßt.

17. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem eine 5'-Nuklease umfassenden Spaltungsagens um ein temperaturstabiles Spaltungsagens handelt.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei ein Anteil der Aminosäuresequenz der temperaturstabilen Spaltungsstruktur zu einem Anteil der Aminosäuresequenz einer aus einem thermophilen Organismus stammenden temperaturstabilen DNA-Polymerase homolog ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei der thermophile Organismus ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Thermus aquaticus, Thermus flavus und Thermus thermophilus.

20. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das eine 5'-Nuklease umfassende Spaltungsagens eine FEN-1-Endonuklease umfaßt.

21. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die erste Zielnukleinsäure eine synthetische Zielnukleinsäure umfaßt.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die synthetische Zielnukleinsäure eine amplifizierte Nukleinsäure umfaßt. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die amplifizierte Nukleinsäure eine mit einer Polymerasekettenre-

aktion erzeugte Nukleinsäure umfaßt.

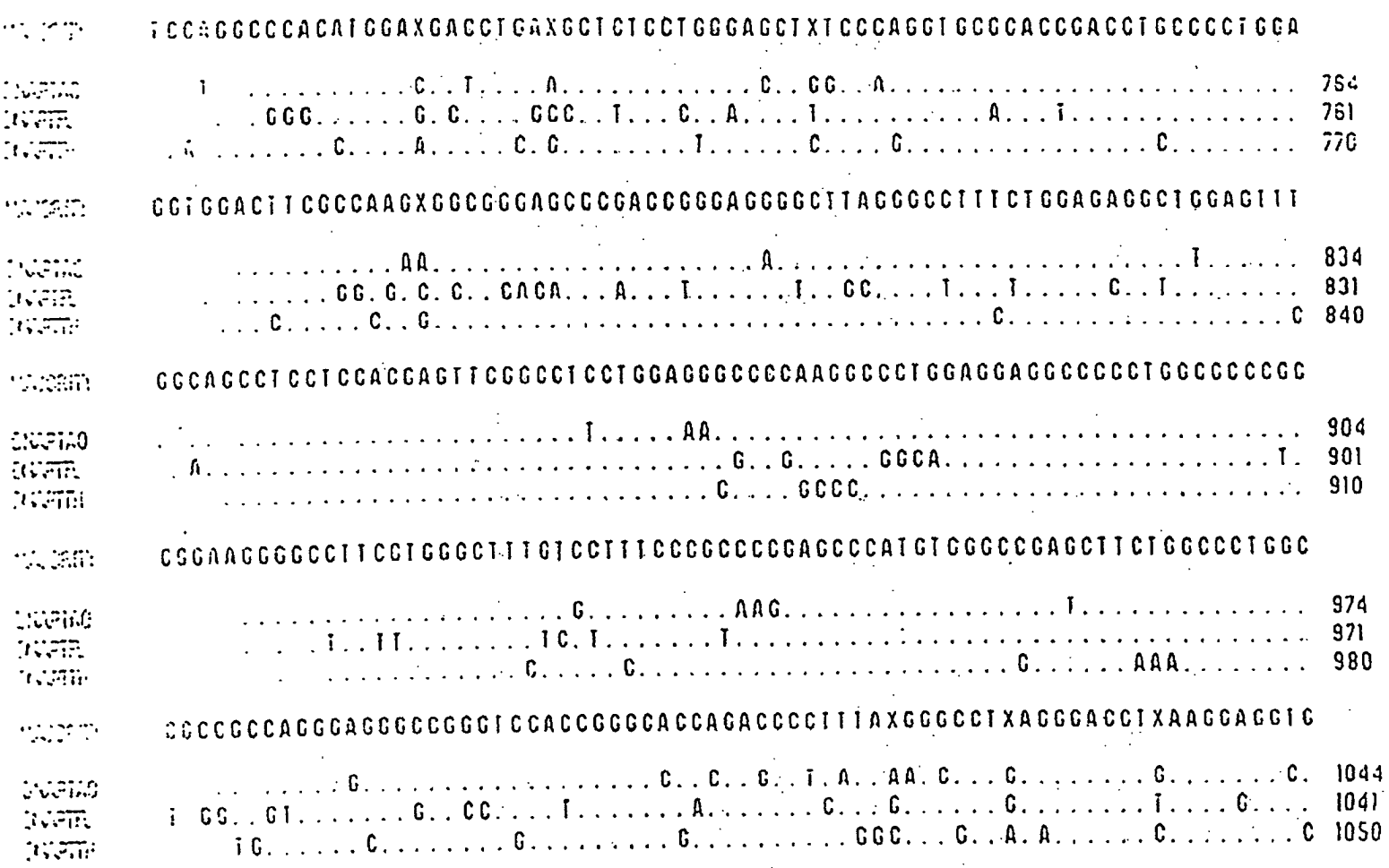
Es folgen 133 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

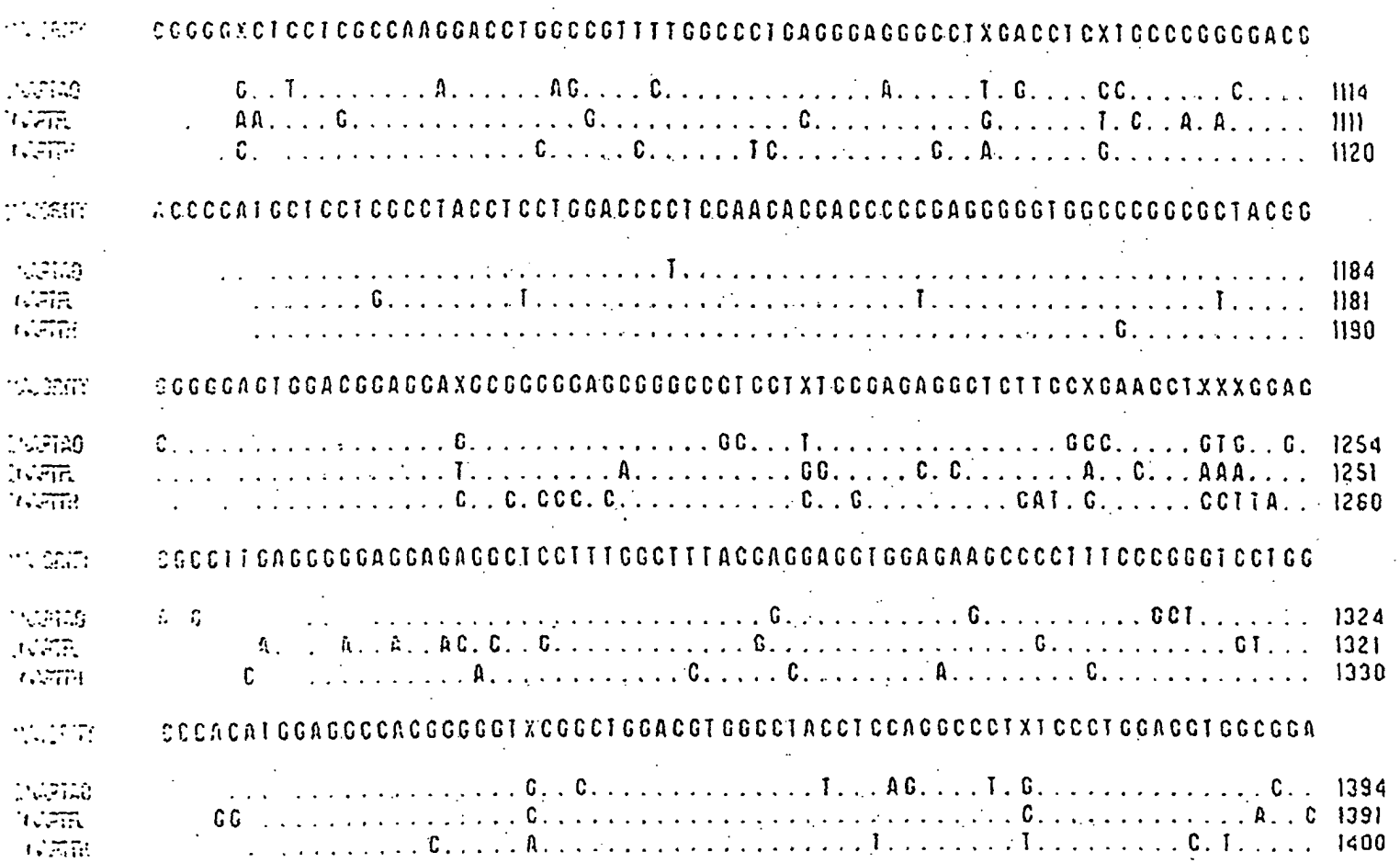
FIGUR 1A

FIGUR 1B

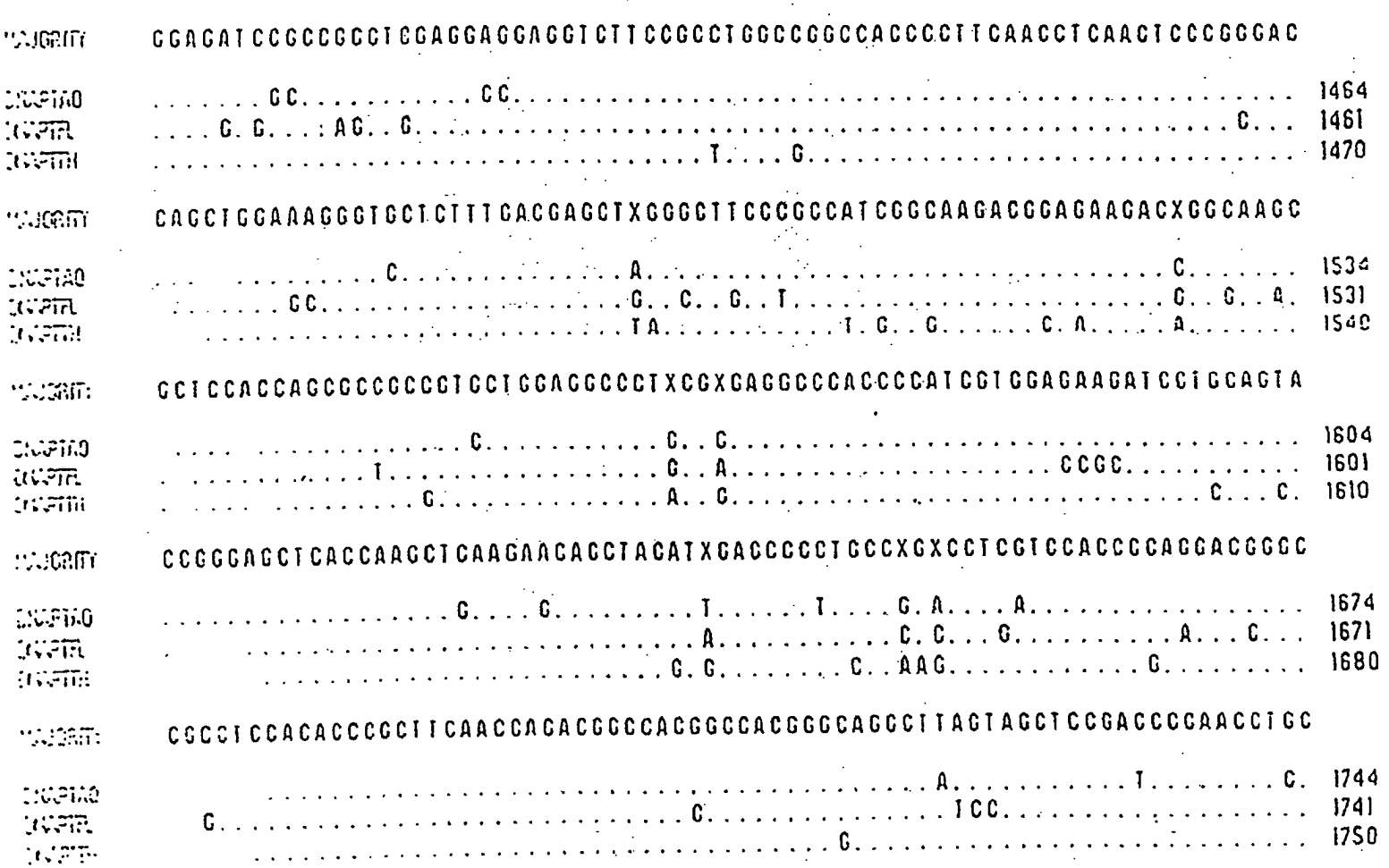
FIGUR 1C



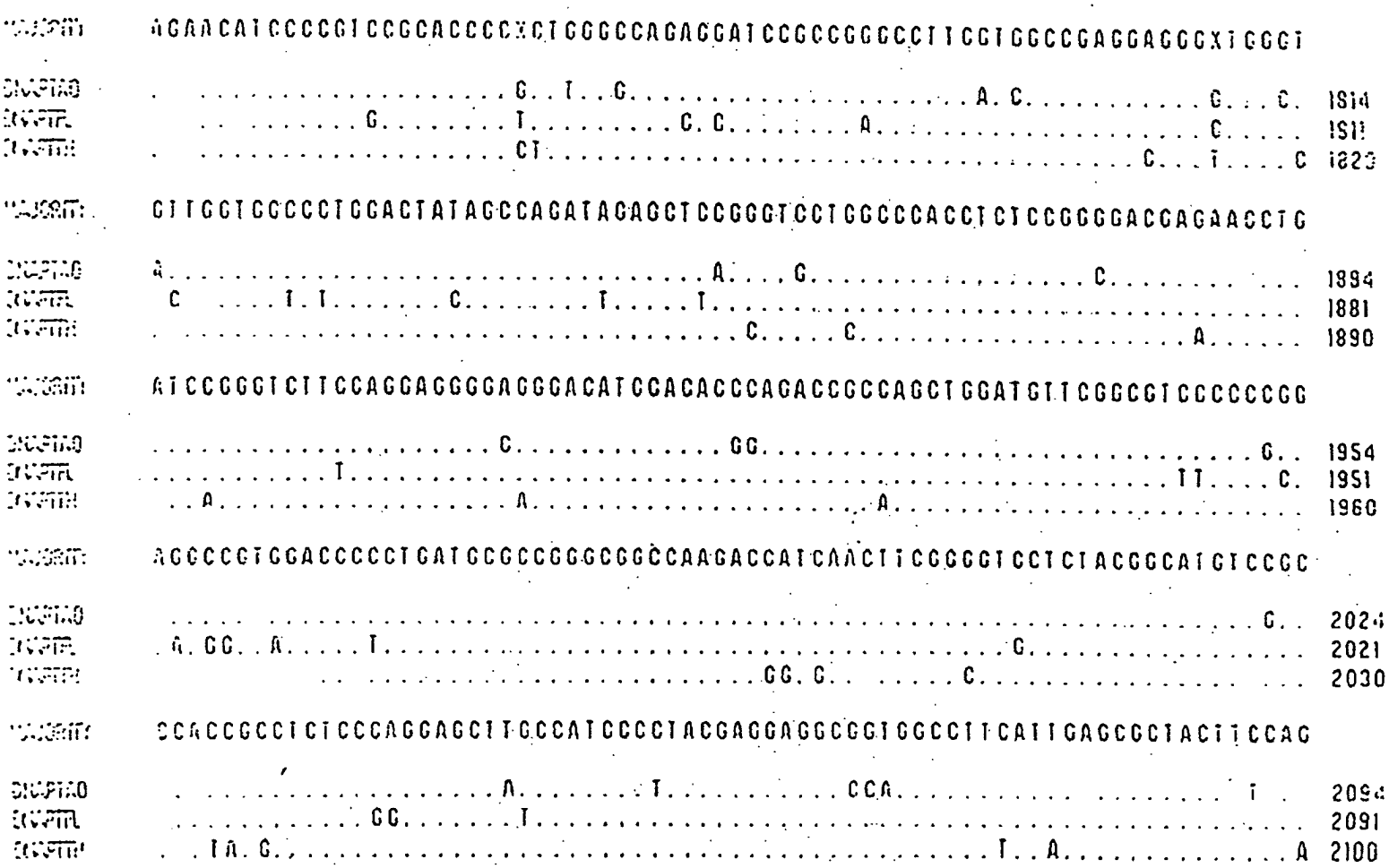
FIGUR 1D



FIGUR 1E



FIGUR 1F



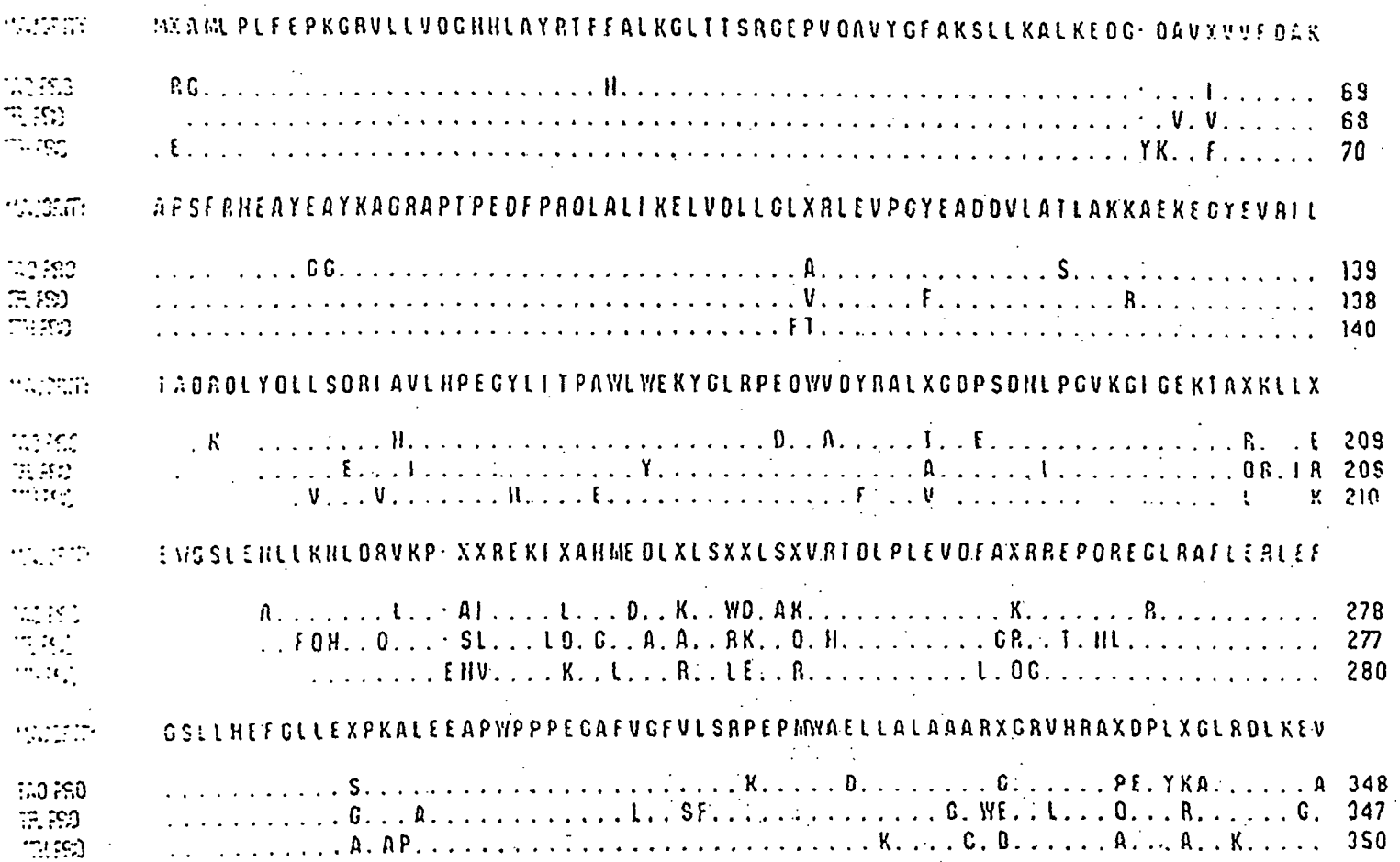
FIGUR 1G



FIGUR 1H

GCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGGGGACGACTCGCTCTCCCCCAACGCAGTAC
A
CC
T
2499
2496
2503

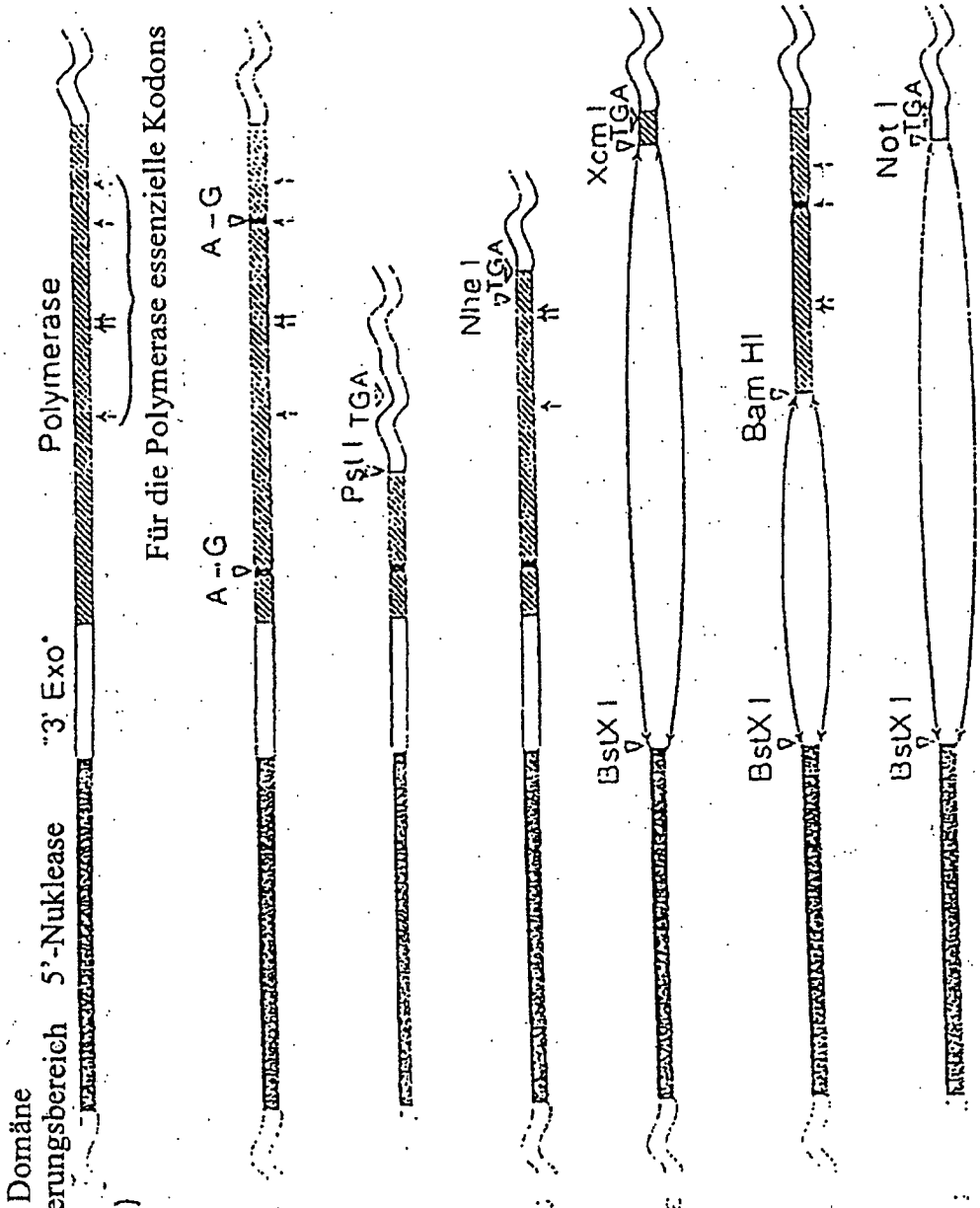
FIGUR 2A



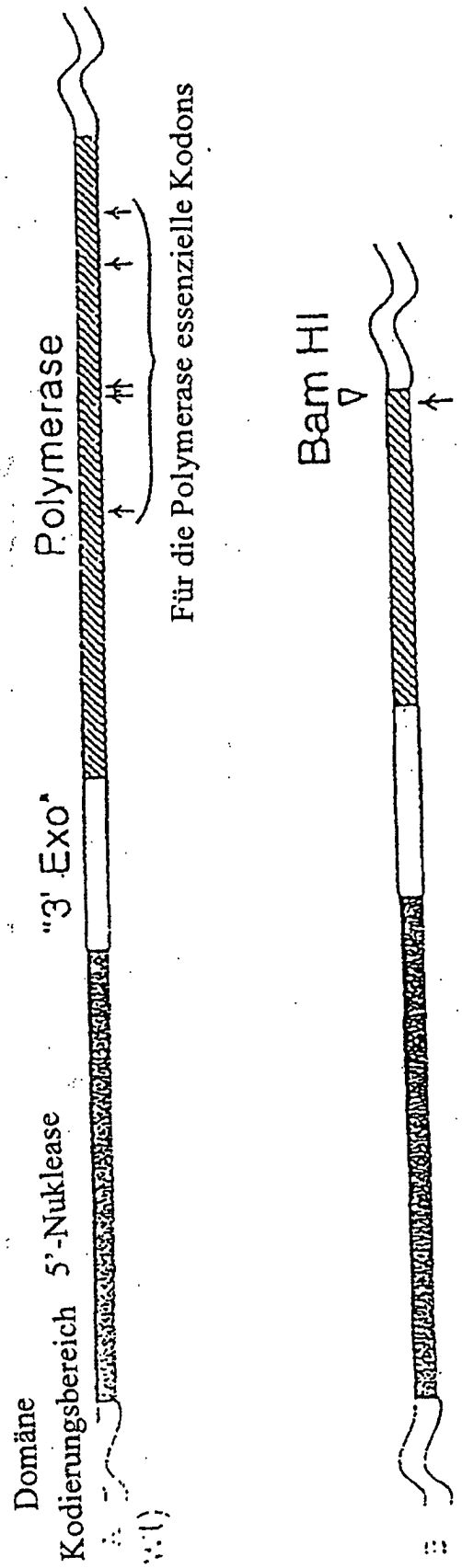
FIGUR 2B

FIGUR 2C

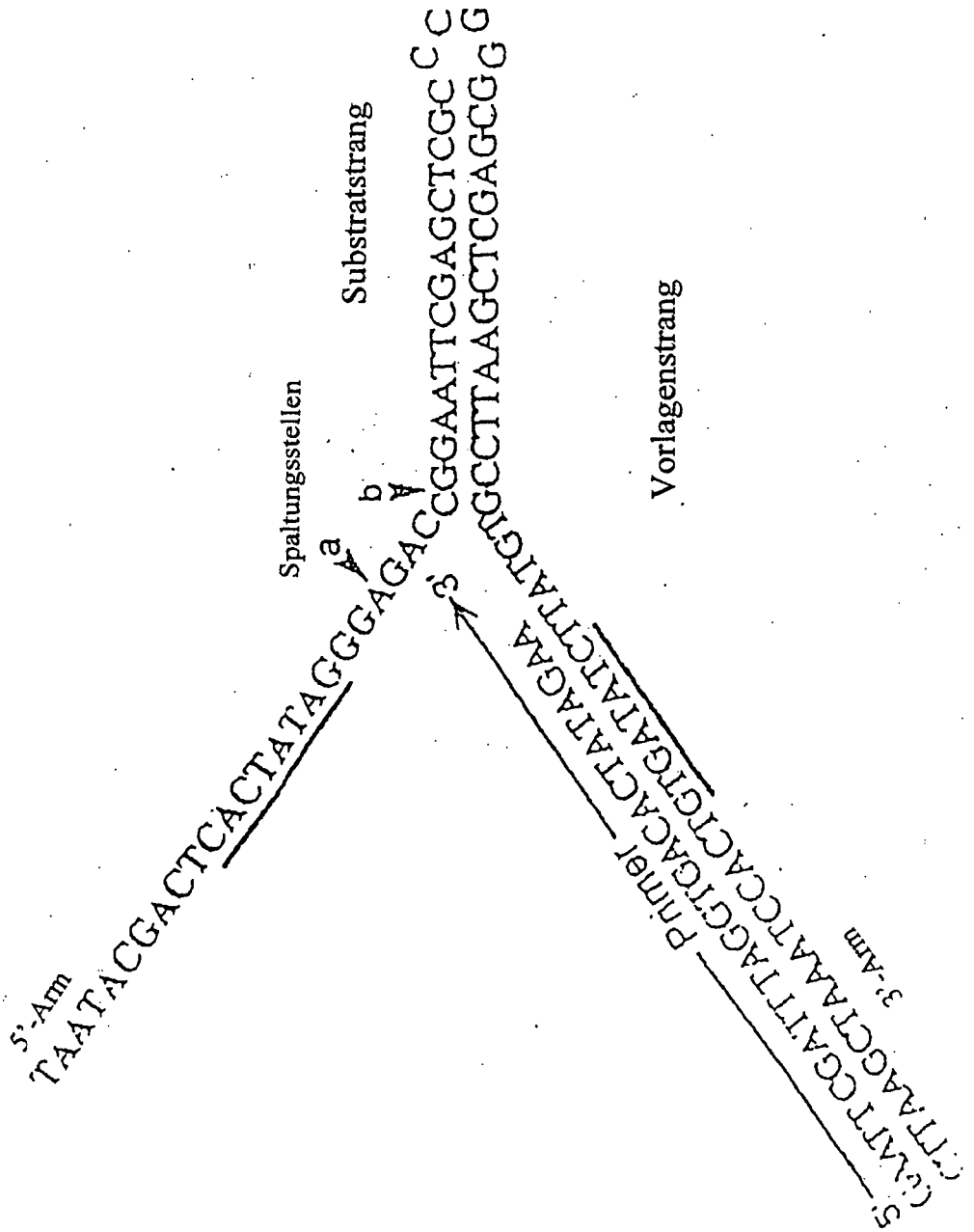
FIGUR 3

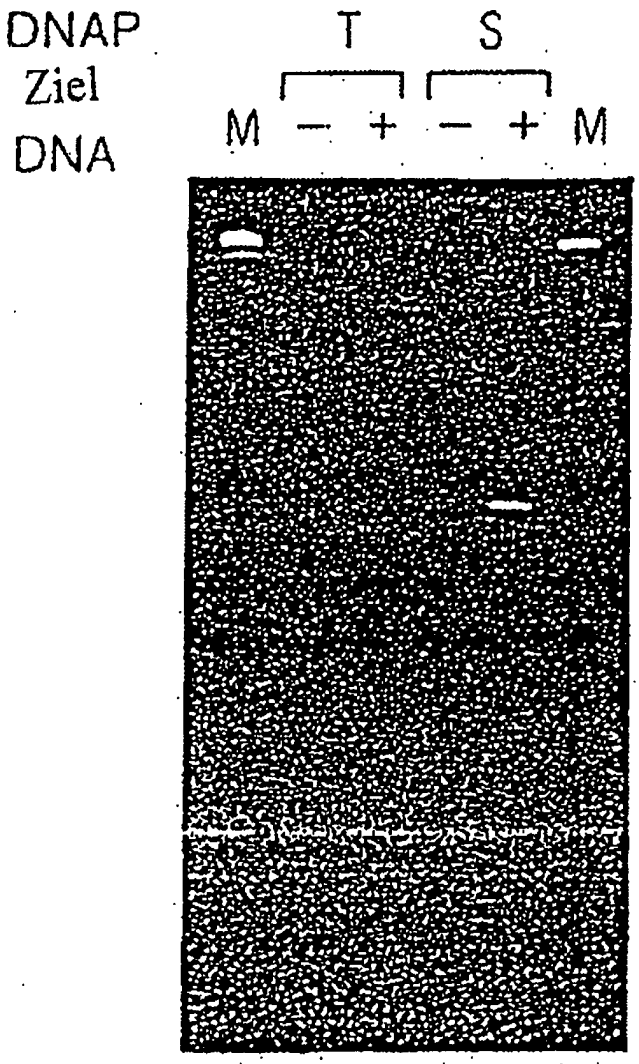

Domäne
Kodierungsbereich
5'-Nuklease
"3' Exo"
Polymerase
Für die Polymerase essenzielle Kodons
A→G
A→G
Psi I TGA
Nhe I
TGA
Xcm I
TGA
BstX I
Bam HI
BstX I
Not I
TGA
BstX I

FIGUR 4

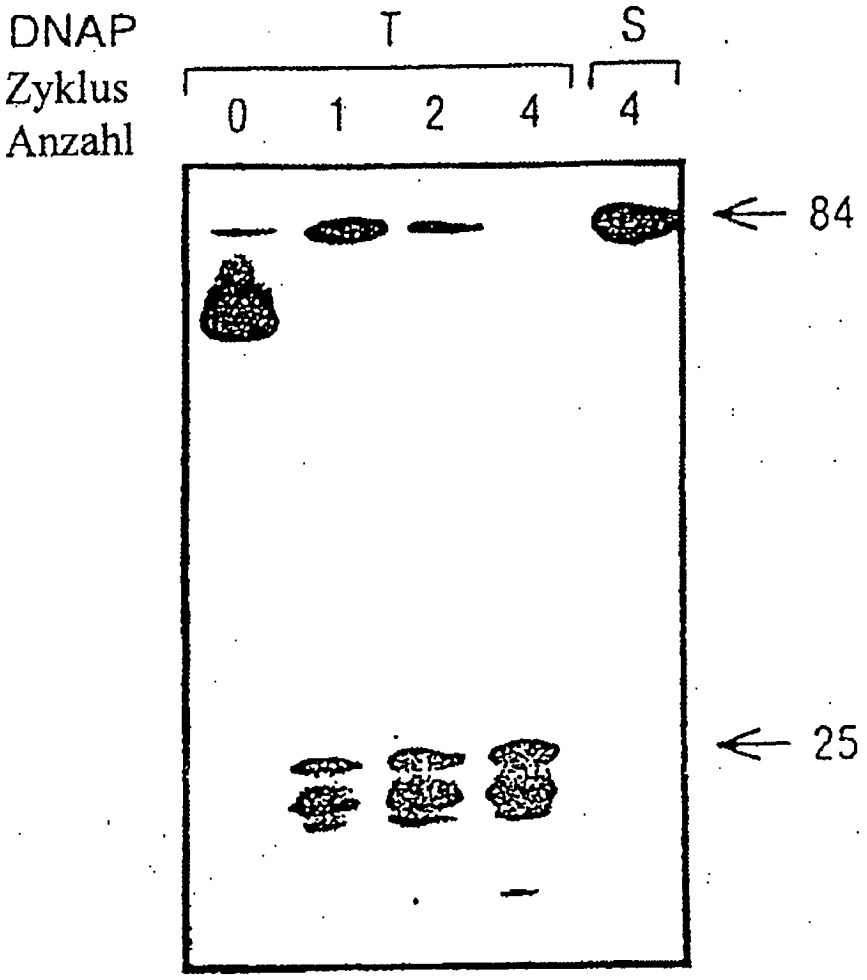

Gene für Wild-Typ- und Poly(-)-DNAPTfl
Domäne
Kodierungsbereich
5'-Nuklease
"3' Exo"
Polymerase
Für die Polymerase essenzielle Kodons
Bam HI

FIGUR 5

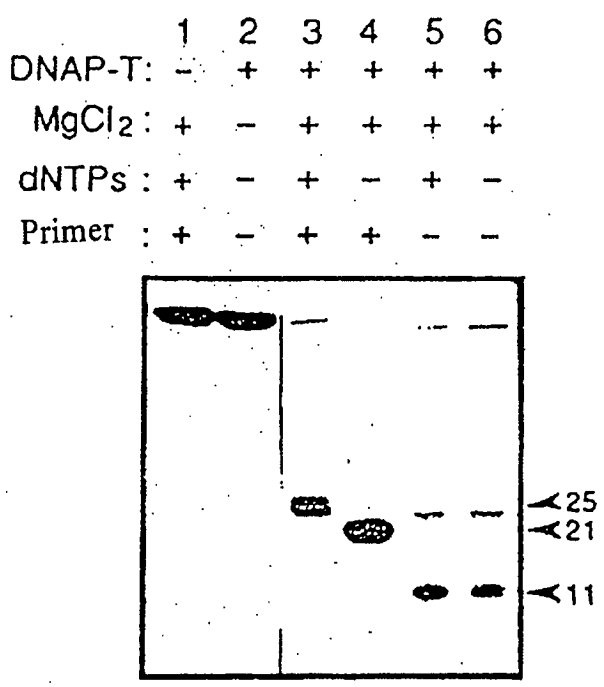

5'-Am
TAATACGACTCACTATAGGAGACCGGAATTCGGCTCGAGGCTTAAGCCTTATGTTGAA
Spaltungsstellen
a
b
Substratstrang
3'
GCCTTAAGCTCGAGCCGGTG
Vorlagenstrang
Primer
5'
CGATTCGATTAGCTGACACTATAGAA
GCTTAAGCTAATCCACTGTGATATCTTA
3'-Am



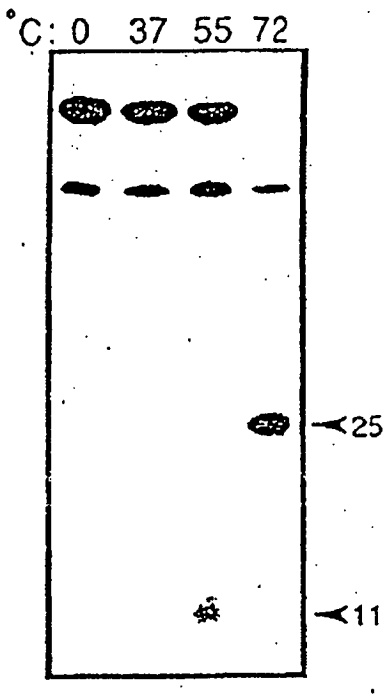
FIGUR 6



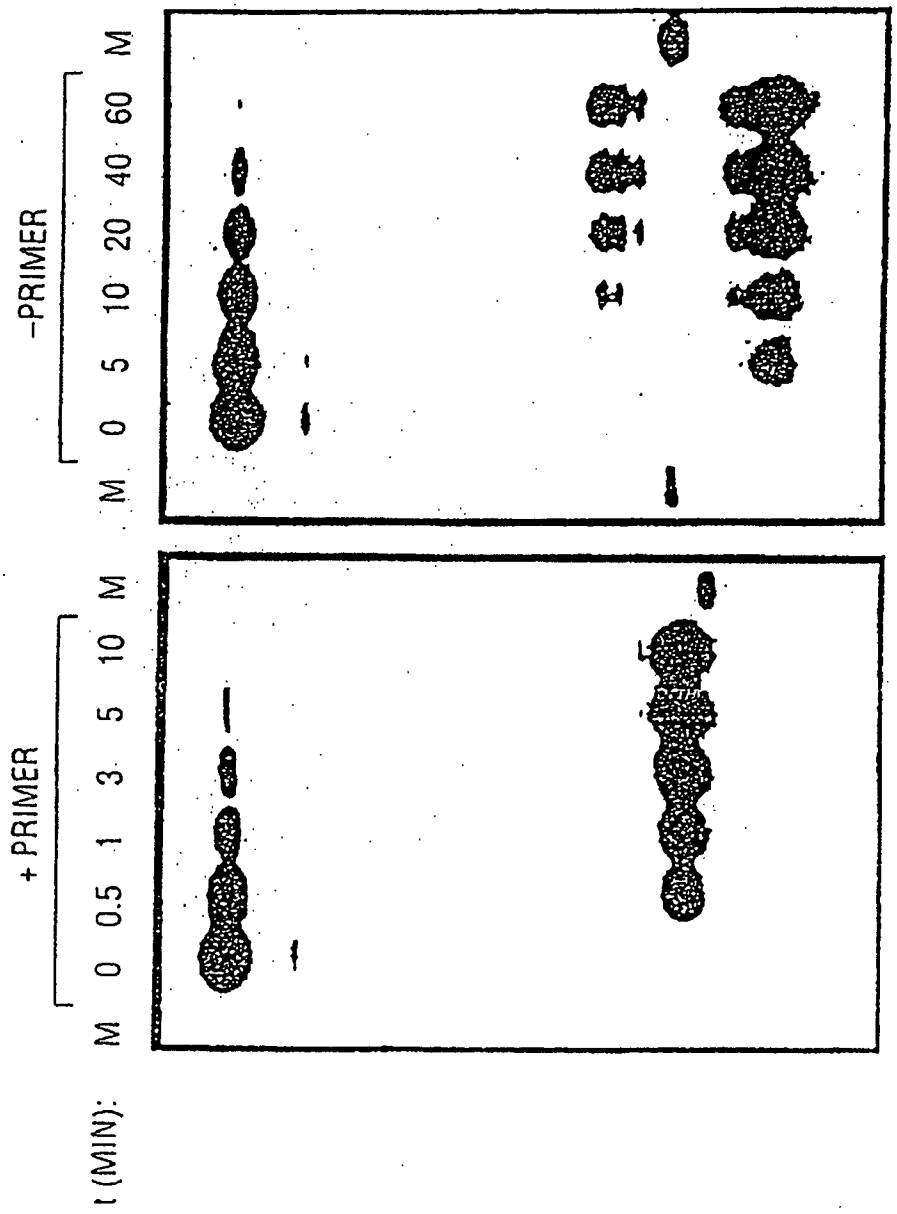
FIGUR 7



FIGUR 8A

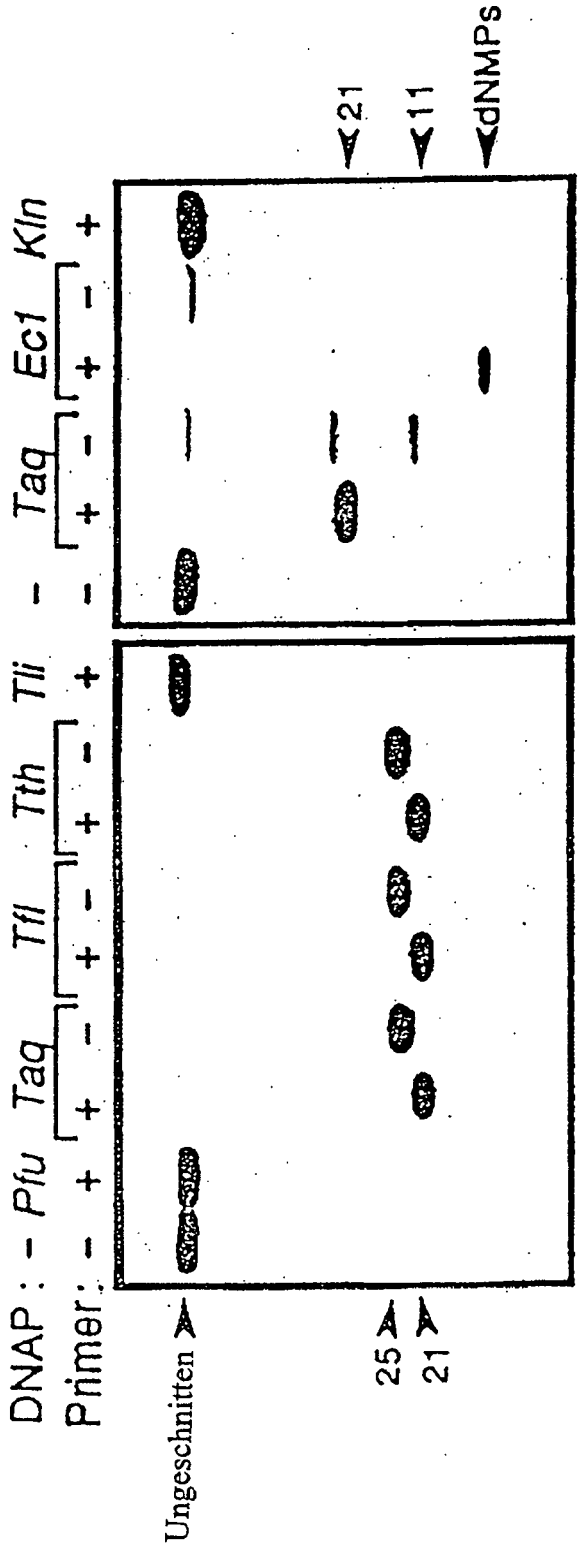


FIGUR 8B



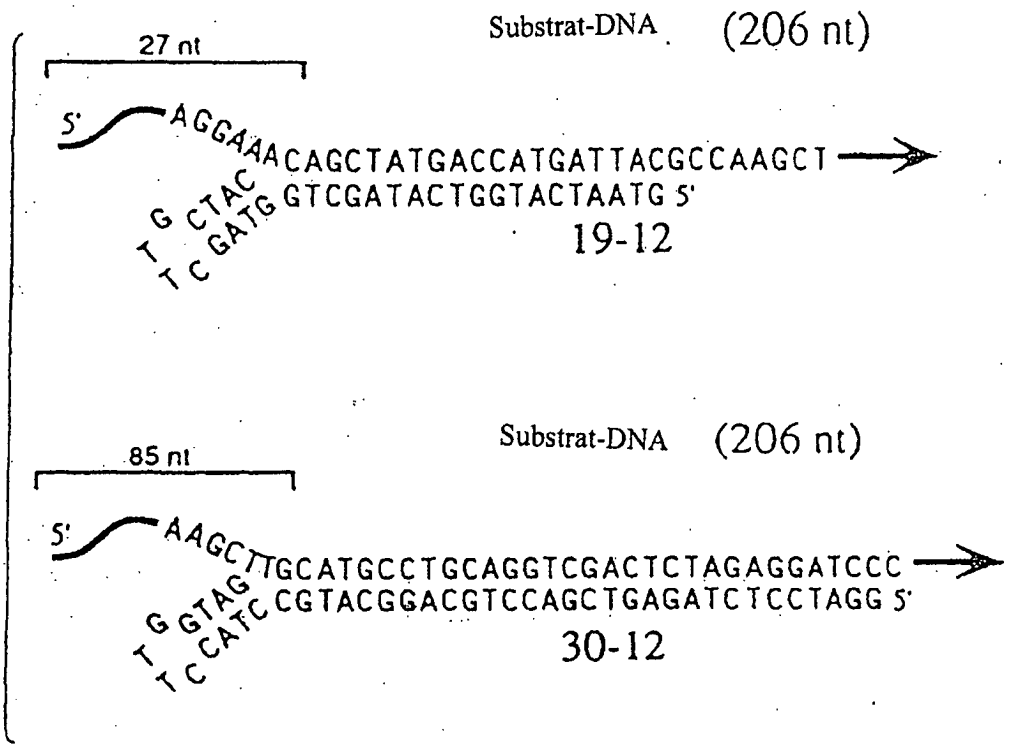
FIGUR 9A

FIGUR 9B

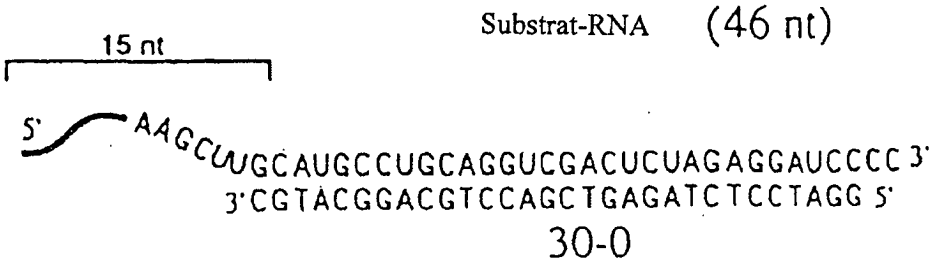


FIGUR 10A

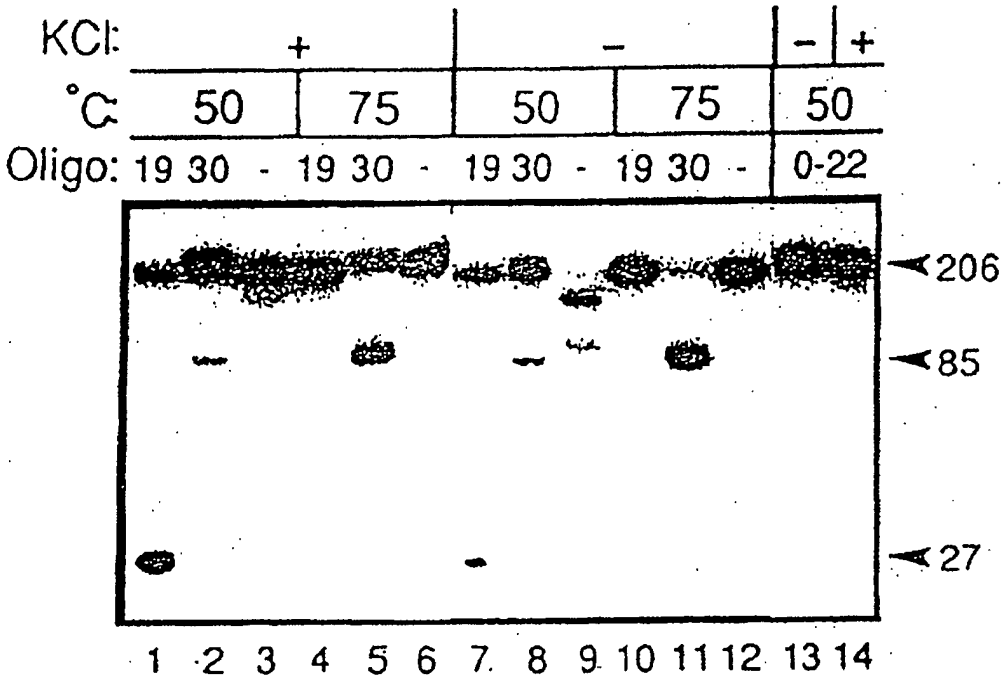
FIGUR 10B



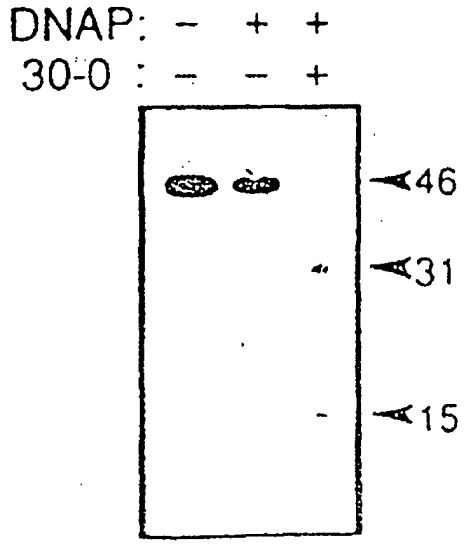
FIGUR 11A



FIGUR 12A

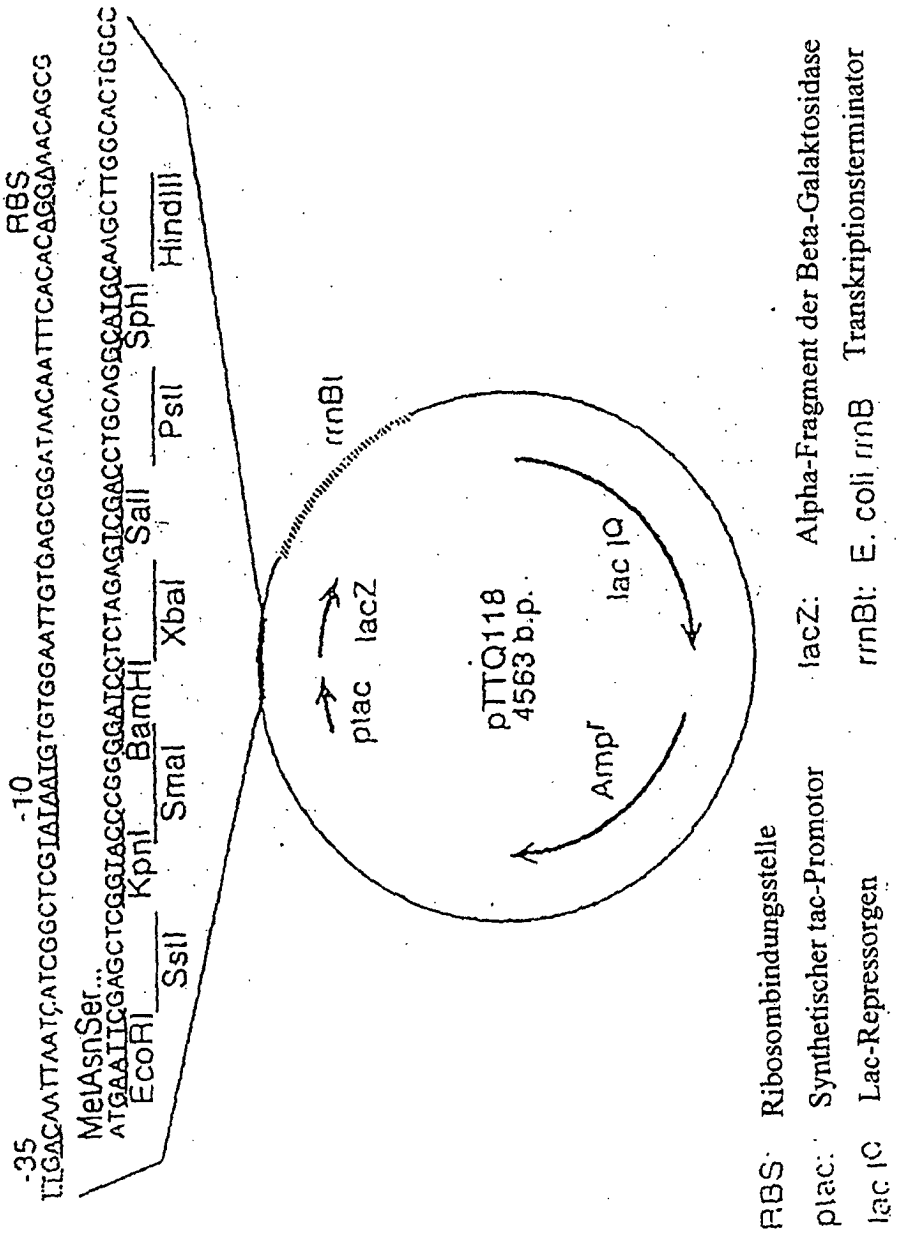


FIGUR 11B

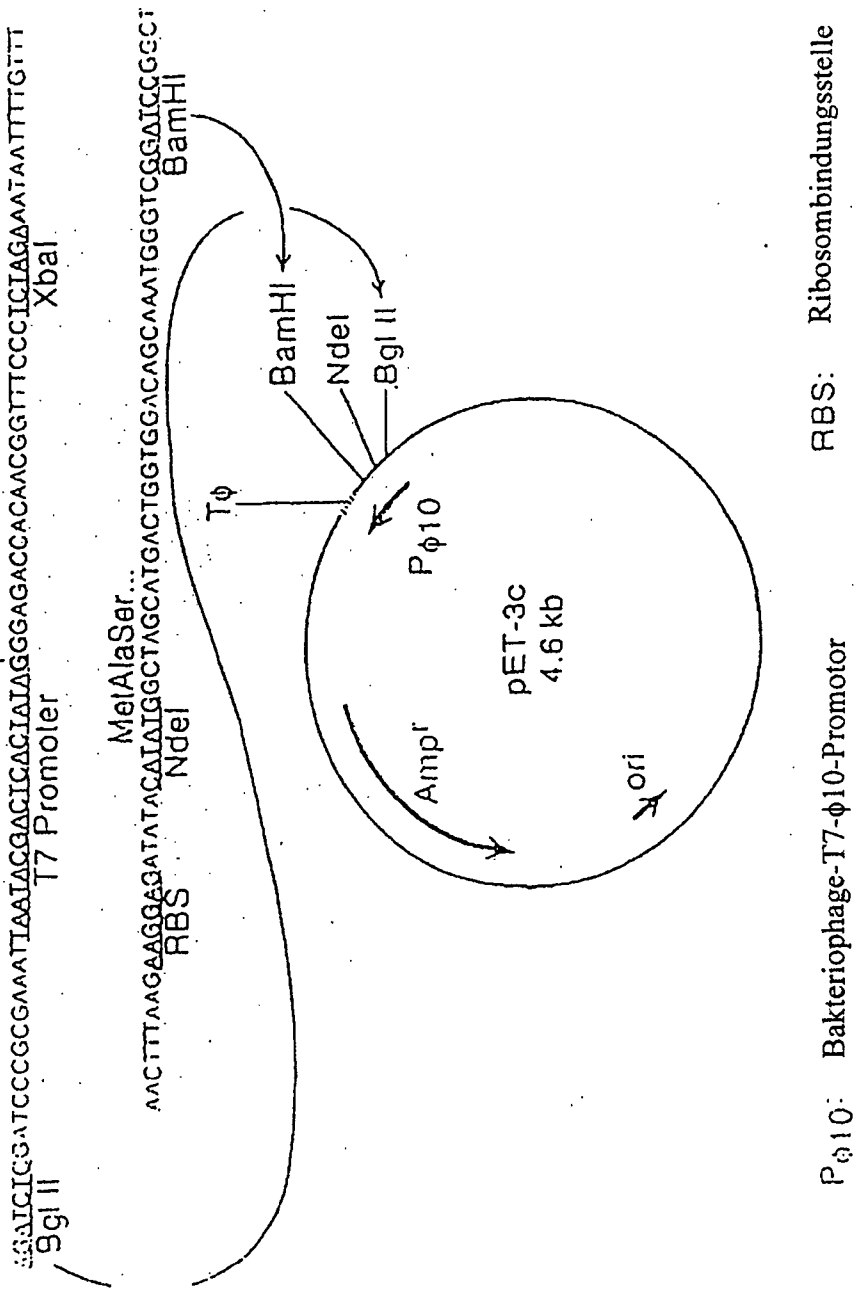


FIGUR 12B

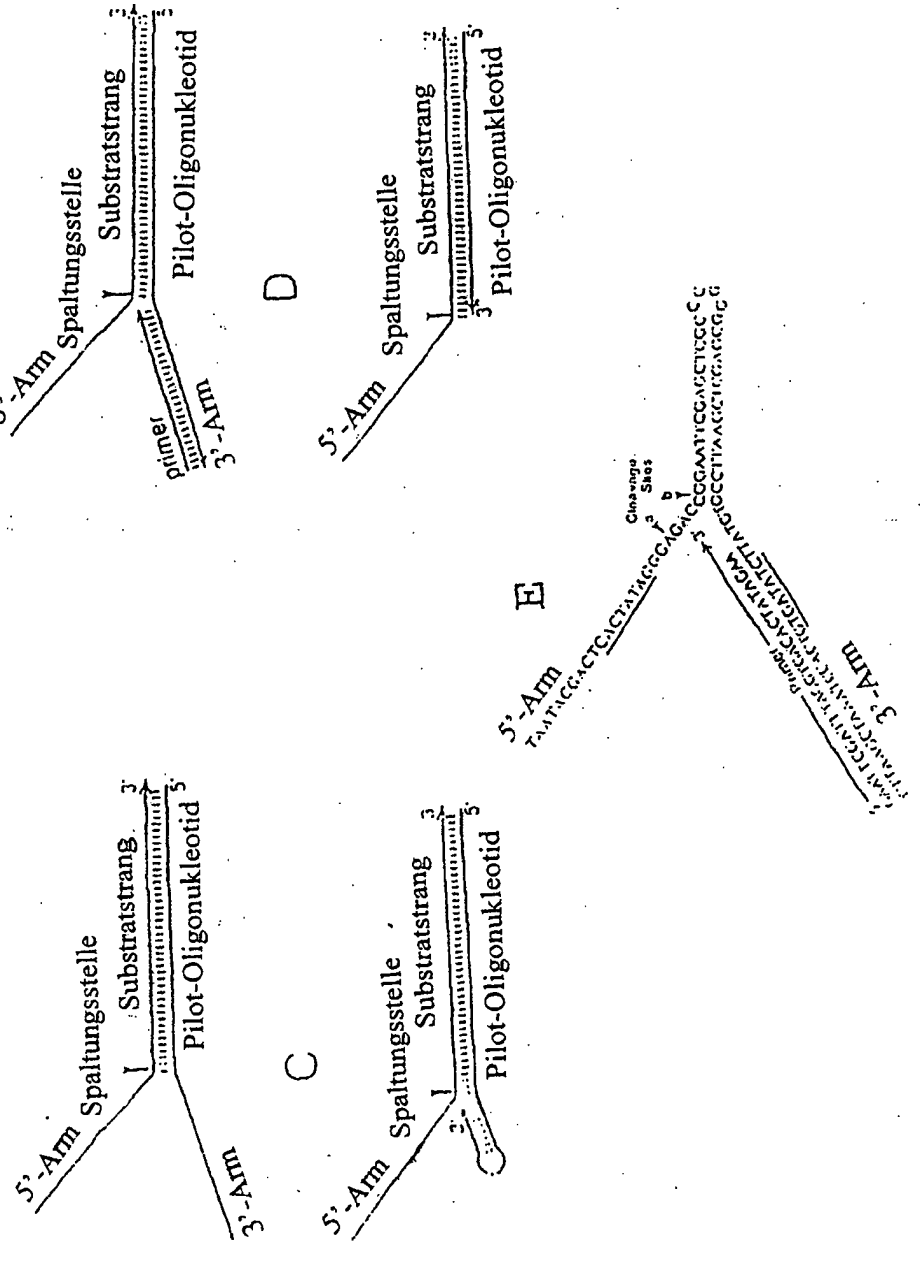
FIGUR 13

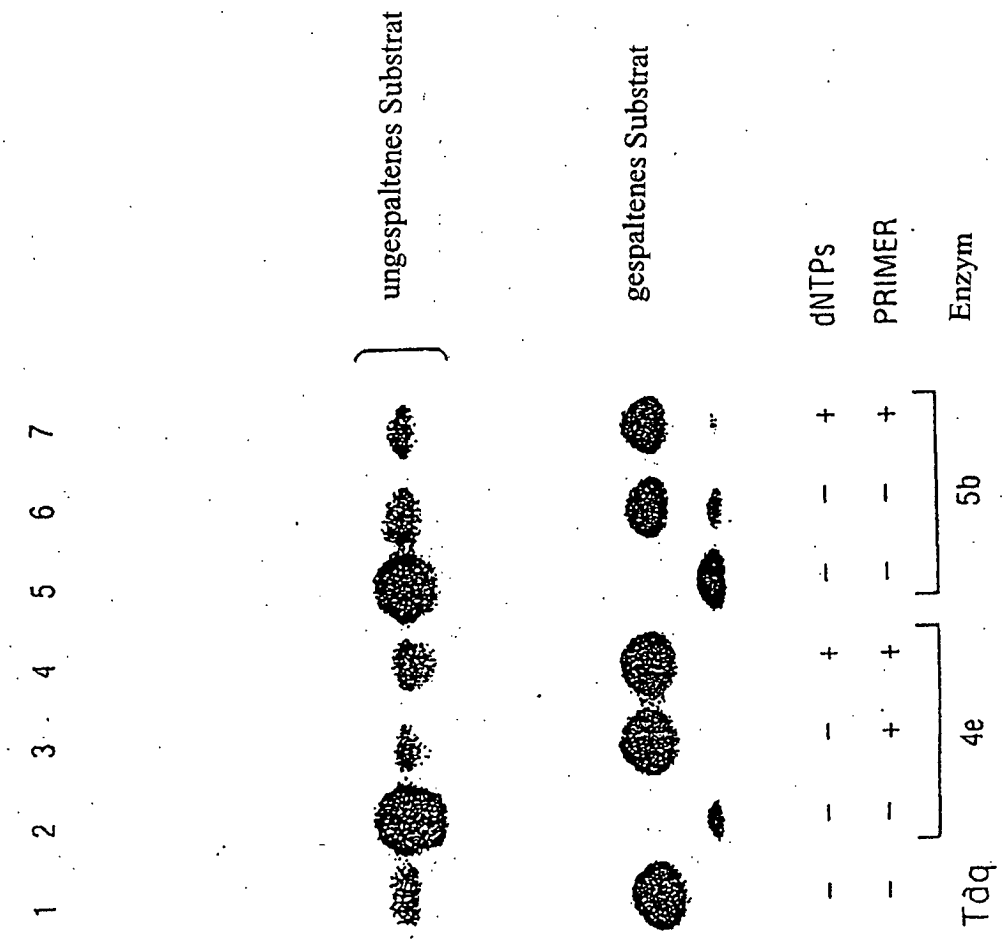

-35
-10
RBS
MetAsnSer...
EcoRI
KpnI
BamHI
SalI
PstI
SphI
HindIII
SstI
SmaI
XbaI
rrnBI
ptac
lacZ
pTTQ118
4563 b.p.
Ampr
lac IQ
RBS: Ribosombindungsstelle
ptac: Synthetischer tac-Promotor
lacZ: Alpha-Fragment der Beta-Galaktosidase
lac IQ: Lac-Repressorgen
rrnBt: E. coli rrnB Transkriptionsterminator

FIGUR 14

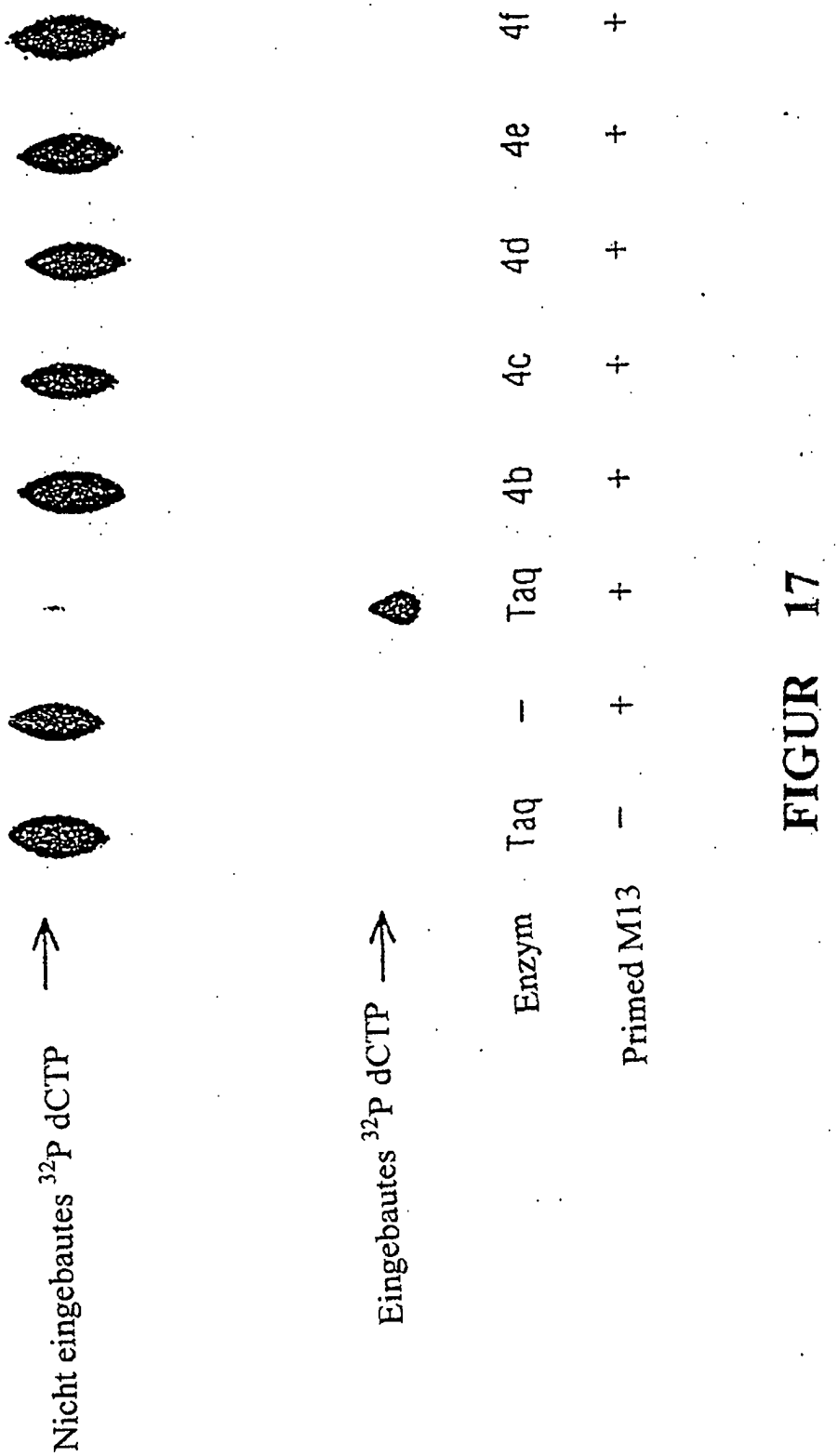

Bgl II
T7 Promoter
XbaI
MetAlaSer...
RBS
NdeI
BamHI
BamHI
NdeI
Bgl II
Tφ
Pφ10
pET-3c
4.6 kb
Ampr
ori
Pφ10: Bakteriophage-T7-φ10-Promotor
Tφ T7 φ Terminator
RBS: Ribosombindungsstelle

FIGUR 15

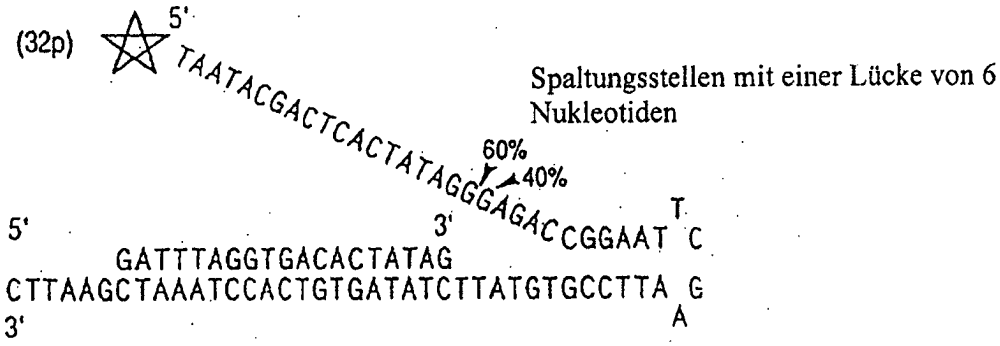

A
5'-Arm
Spaltungsstelle
Substratstrang
Pilot-Oligonukleotid
3'-Arm
B
5'-Arm
Spaltungsstelle
Substratstrang
Pilot-Oligonukleotid
primer
3'-Arm
C
5'-Arm
Spaltungsstelle
Substratstrang
Pilot-Oligonukleotid
D
5'-Arm
Spaltungsstelle
Substratstrang
Pilot-Oligonukleotid
E
5'-Arm
Cleavage Site
3'-Arm


1 2 3 4 5 6 7
ungespaltenes Substrat
gespaltenes Substrat
dNTPs
PRIMER
Enzym
Taq
4e
5b

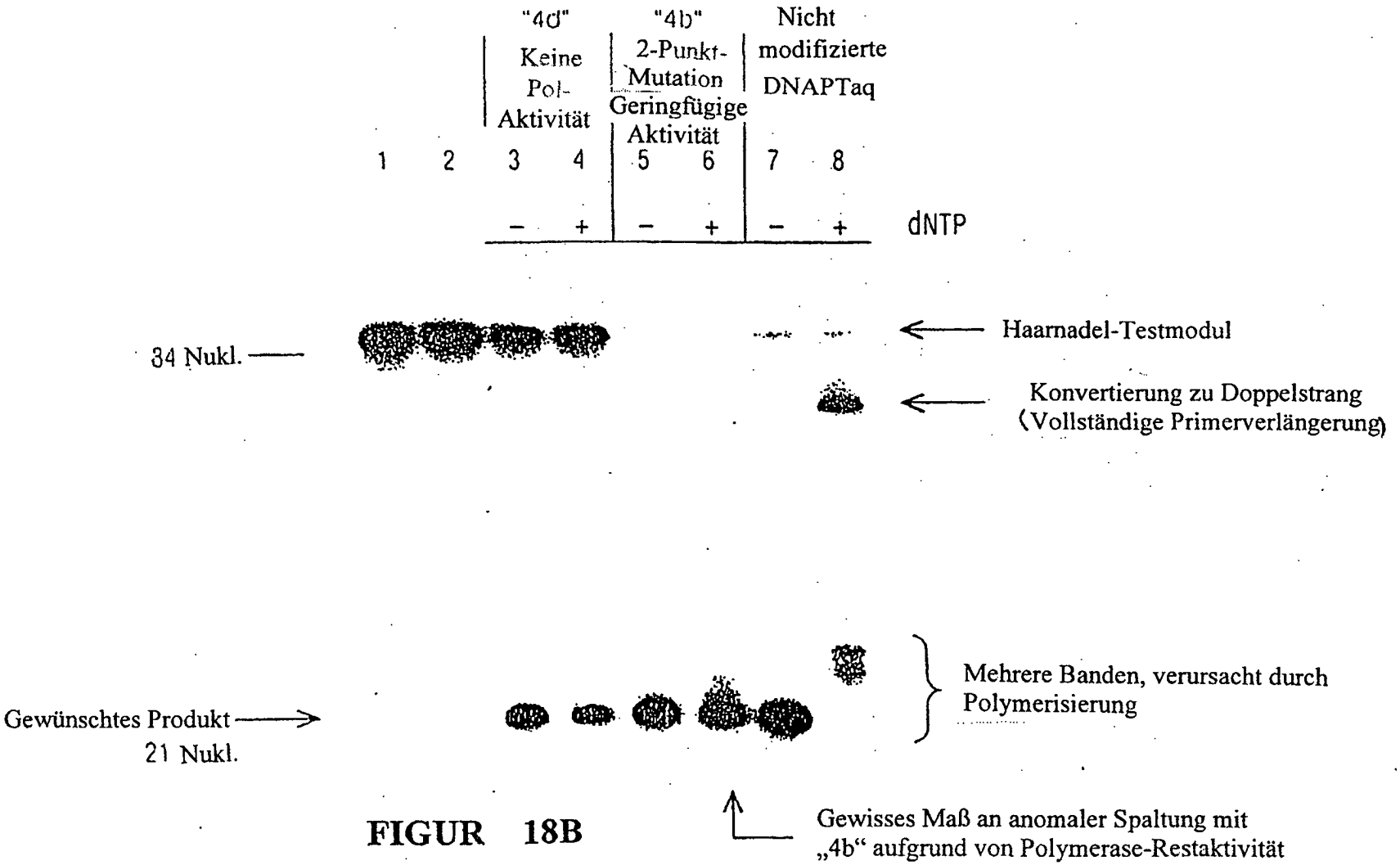
FIGUR 16


Nicht eingebautes ^{32}P dCTP
Eingebautes ^{32}P dCTP
Enzym Taq – Taq 4b 4c 4d 4e 4f
Primed M13 – + + + + + +

FIGUR 17

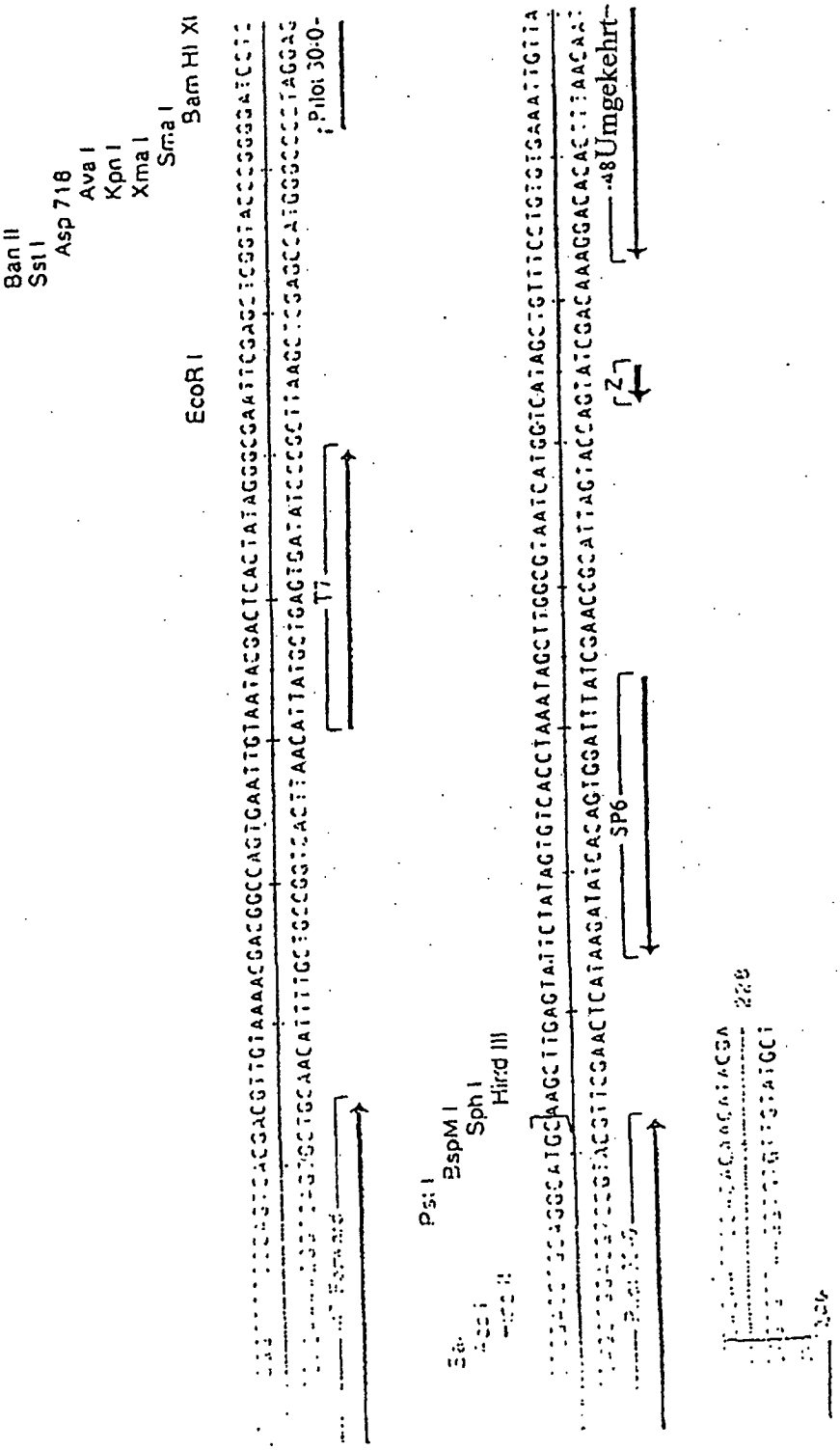

(32p)
5'
TAATACGACTCACTATAGGGAGAC
Spaltungsstellen mit einer Lücke von 6 Nukleotiden
60%
40%
5'
3'
CGGAAT C
T
GATTTAGGTGACACTATAG
CTTAAGCTAAATCCACTGTGATATCTTATGTGCCTTA G
A
3'

FIGUR 18A

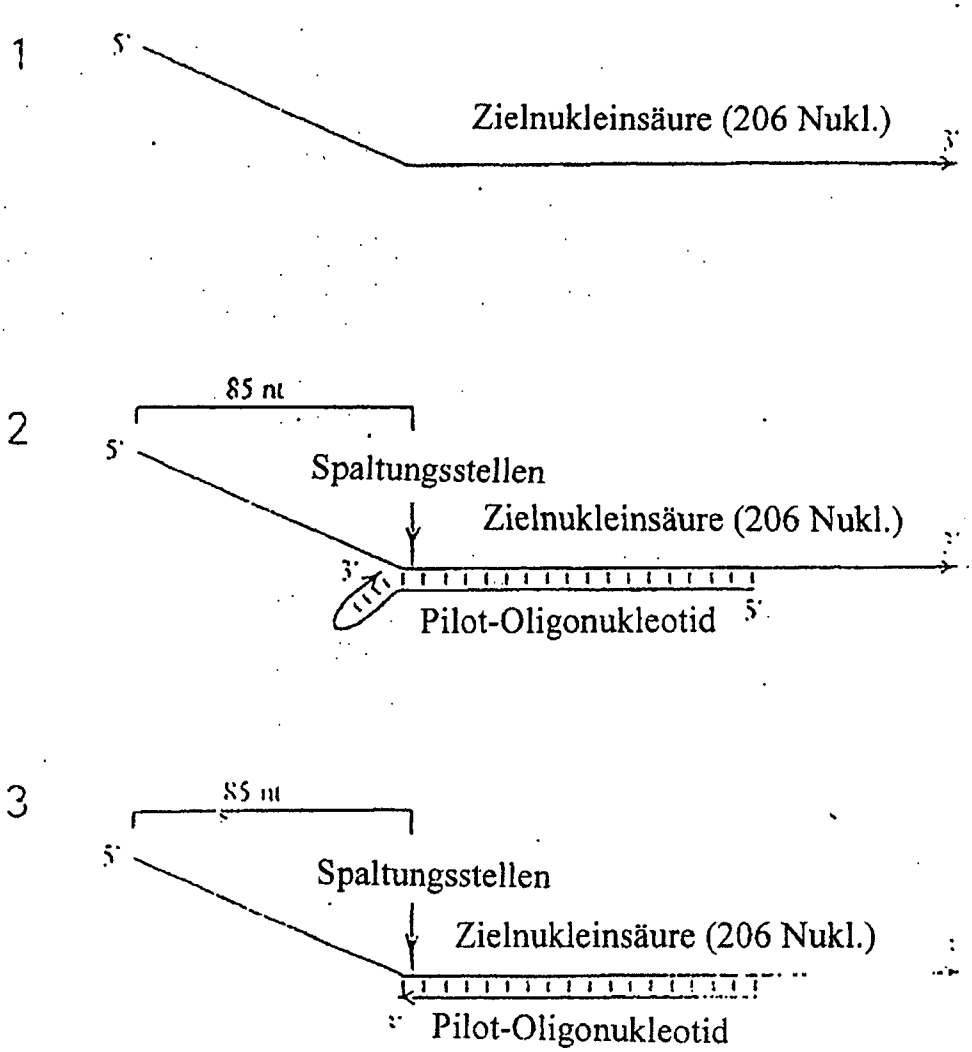

"4d"
Keine Pol-Aktivität
"4b"
2-Punkt-Mutation Geringfügige Aktivität
Nicht modifizierte DNAPTaq
1 2 3 4 5 6 7 8
– + – + – +
dNTP
34 Nukl.
Haarnadel-Testmodul
Konvertierung zu Doppelstrang (Vollständige Primerverlängerung)
Gewünschtes Produkt
21 Nukl.
Mehrere Banden, verursacht durch Polymerisierung
Gewisses Maß an anomaler Spaltung mit „4b“ aufgrund von Polymerase-Restaktivität

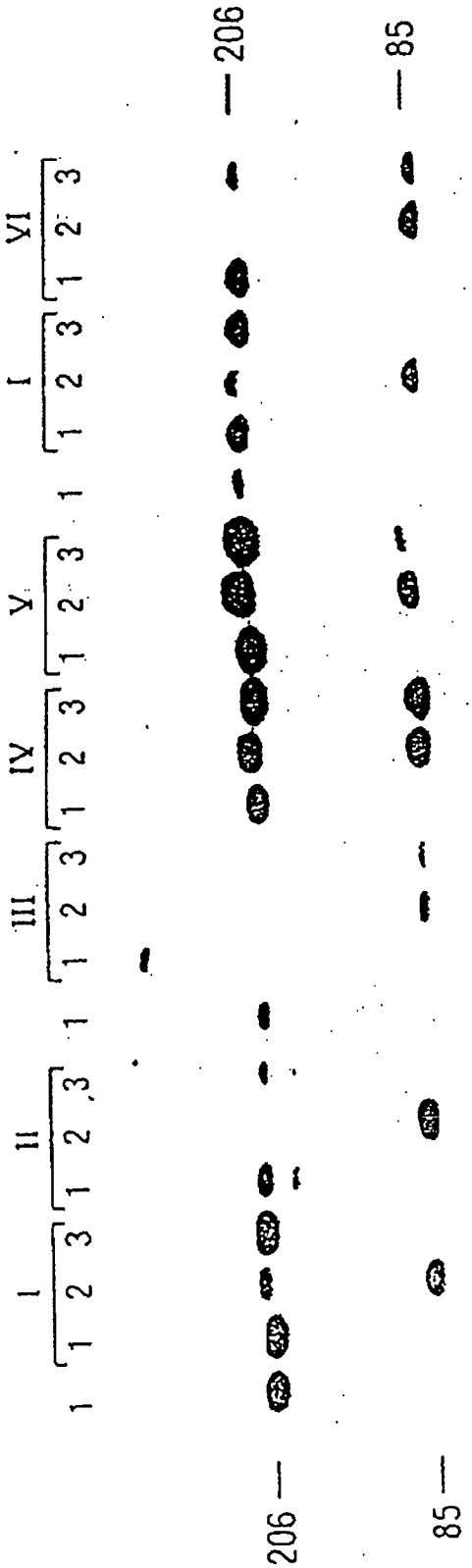
FIGUR 18B

FIGUR 19

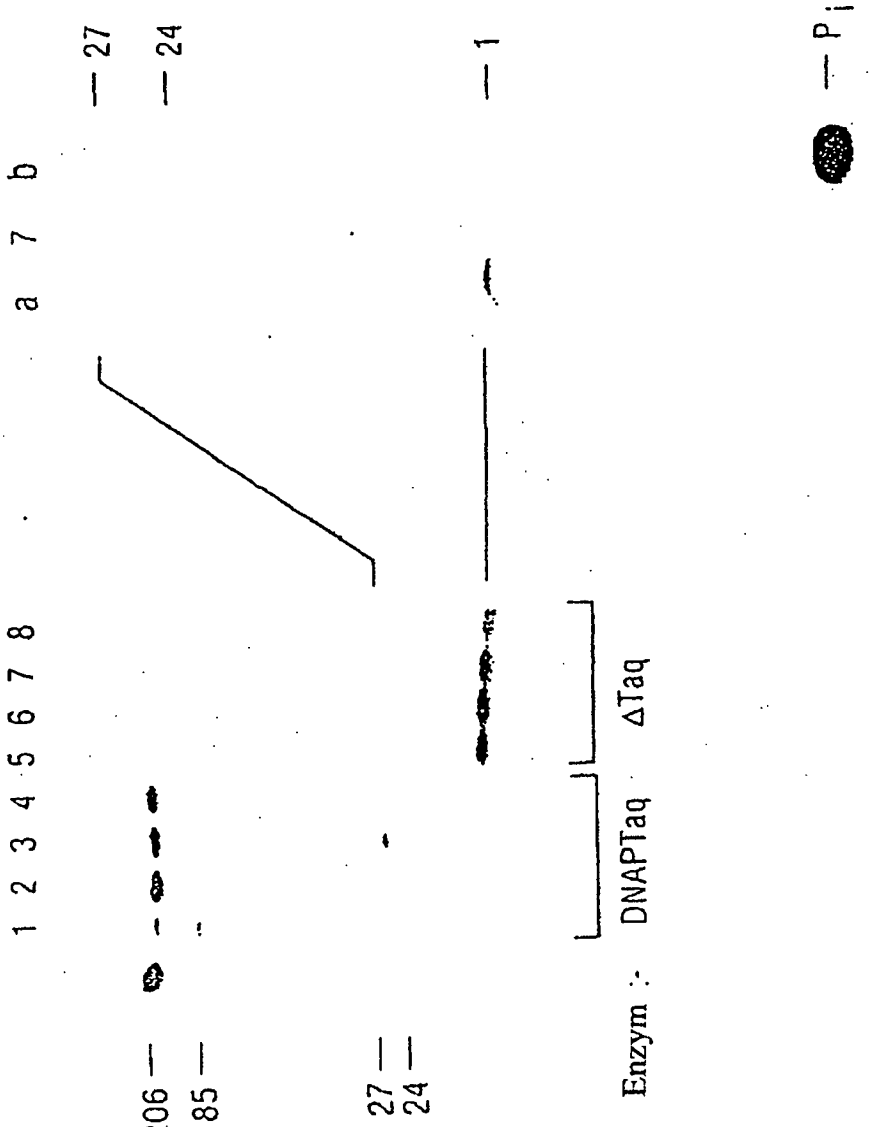

Ban II
Ssi I
Asp 718
Ava I
Kpn I
Xma I
Sma I
Bam HI XI
EcoR I
T7
Pst I
BspM I
Sph I
Hind III
SP6
Umgekehrt

FIGUR 20A


1
5'
Zielnukleinsäure (206 Nukl.)
3'
2
85 nt
5'
Spaltungsstellen
Zielnukleinsäure (206 Nukl.)
3'
3'
Pilot-Oligonukleotid
5'
3
85 nt
5'
Spaltungsstellen
Zielnukleinsäure (206 Nukl.)
3'
Pilot-Oligonukleotid

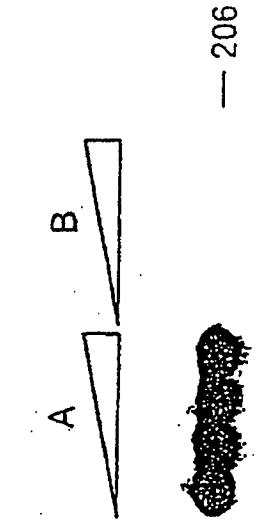


FIGUR 20B



FIGUR 21A

FIGUR 21B



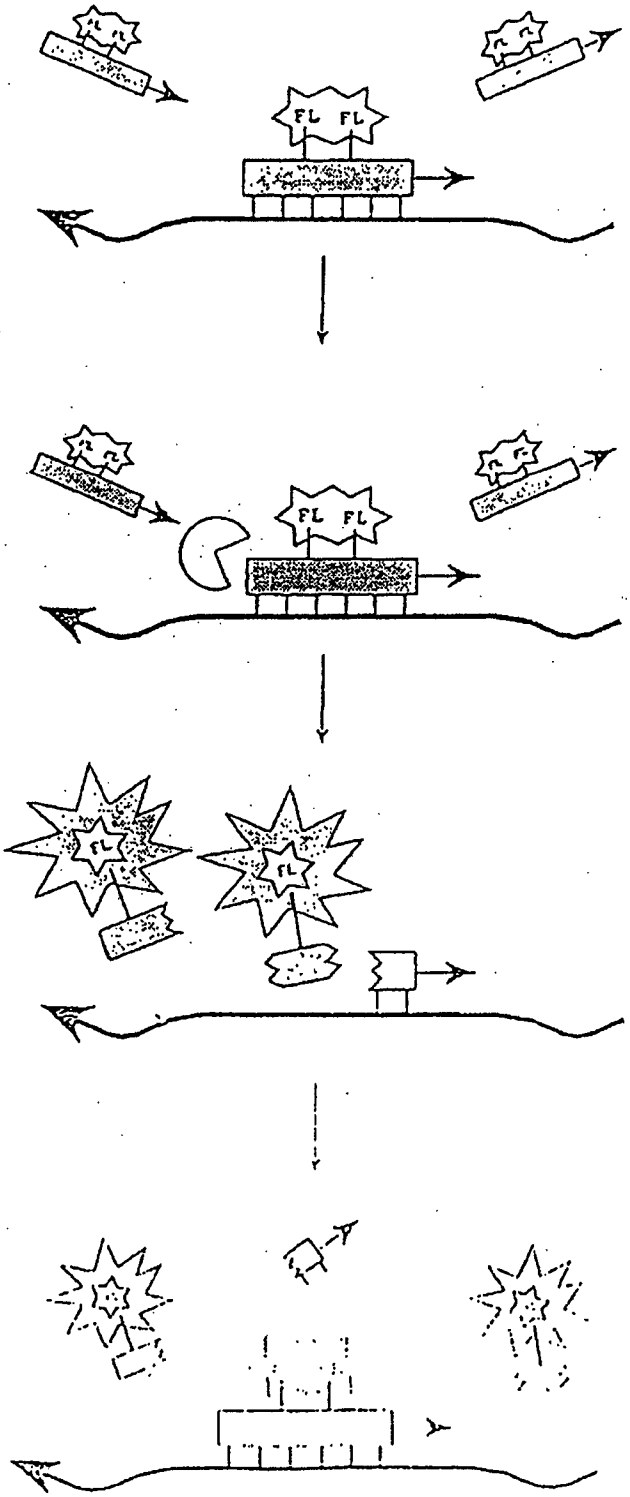
FIGUR 22A

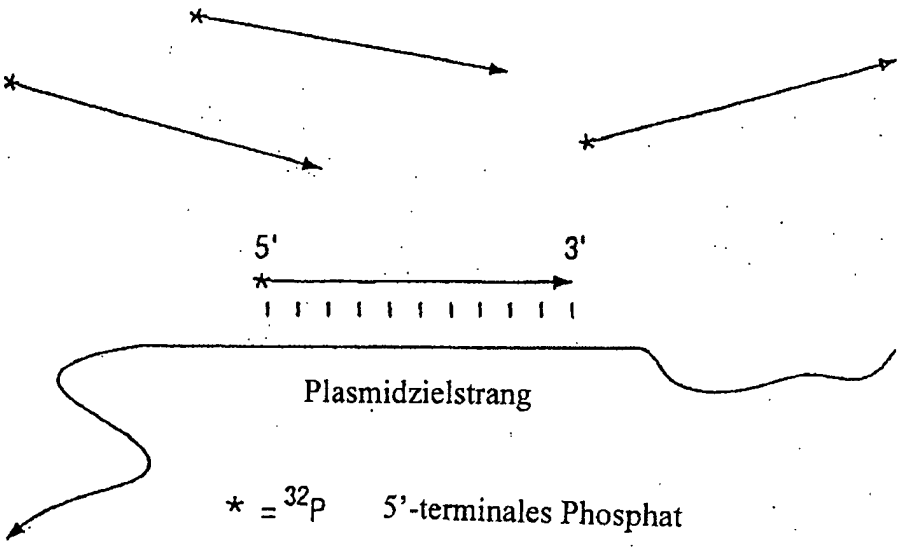


* = ^{32}P

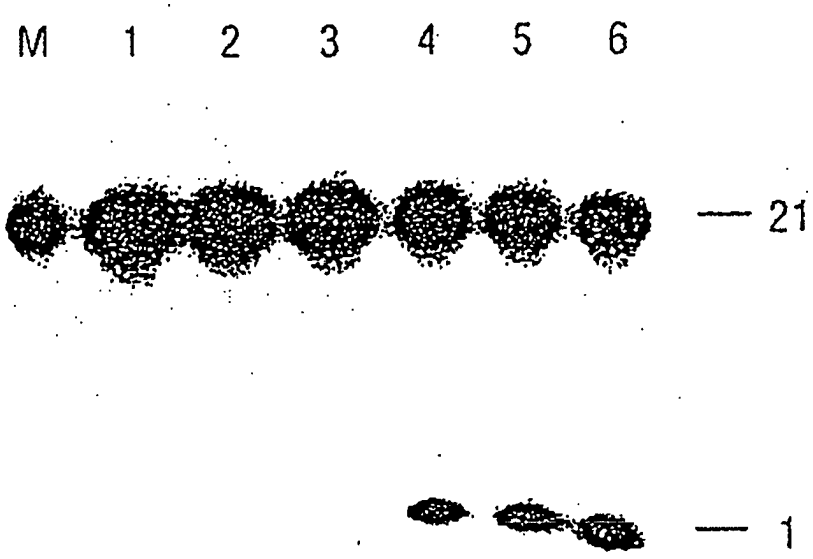
FIGUR 22B

FIGUR 23



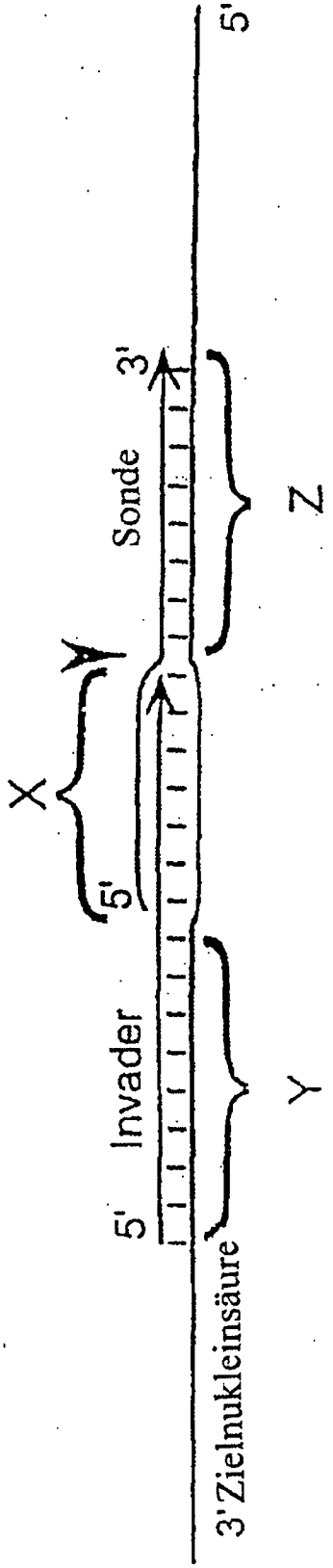


FIGUR 24A

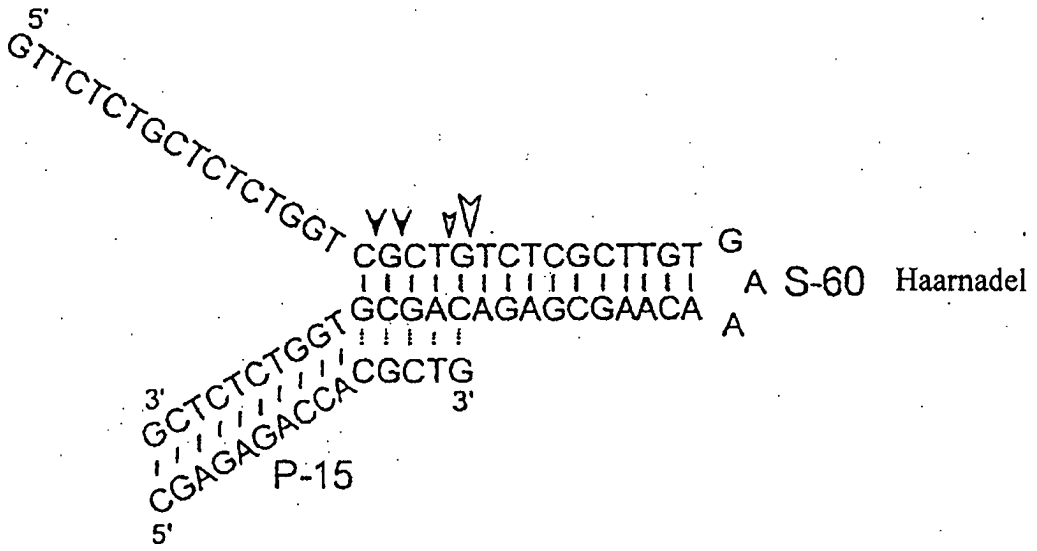


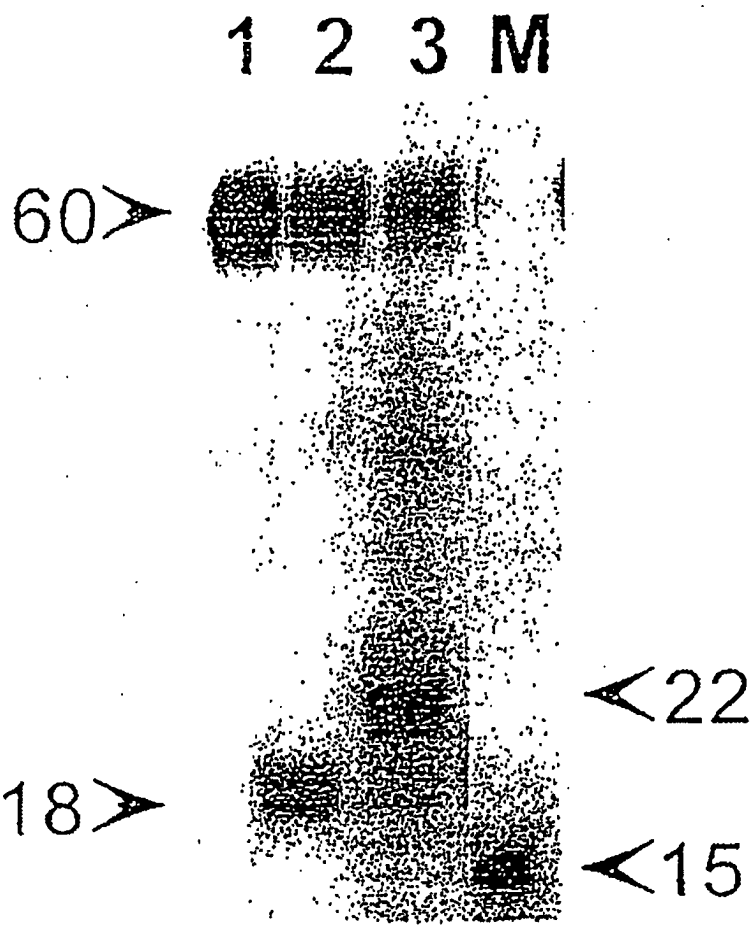
FIGUR 24B

FIGUR 25



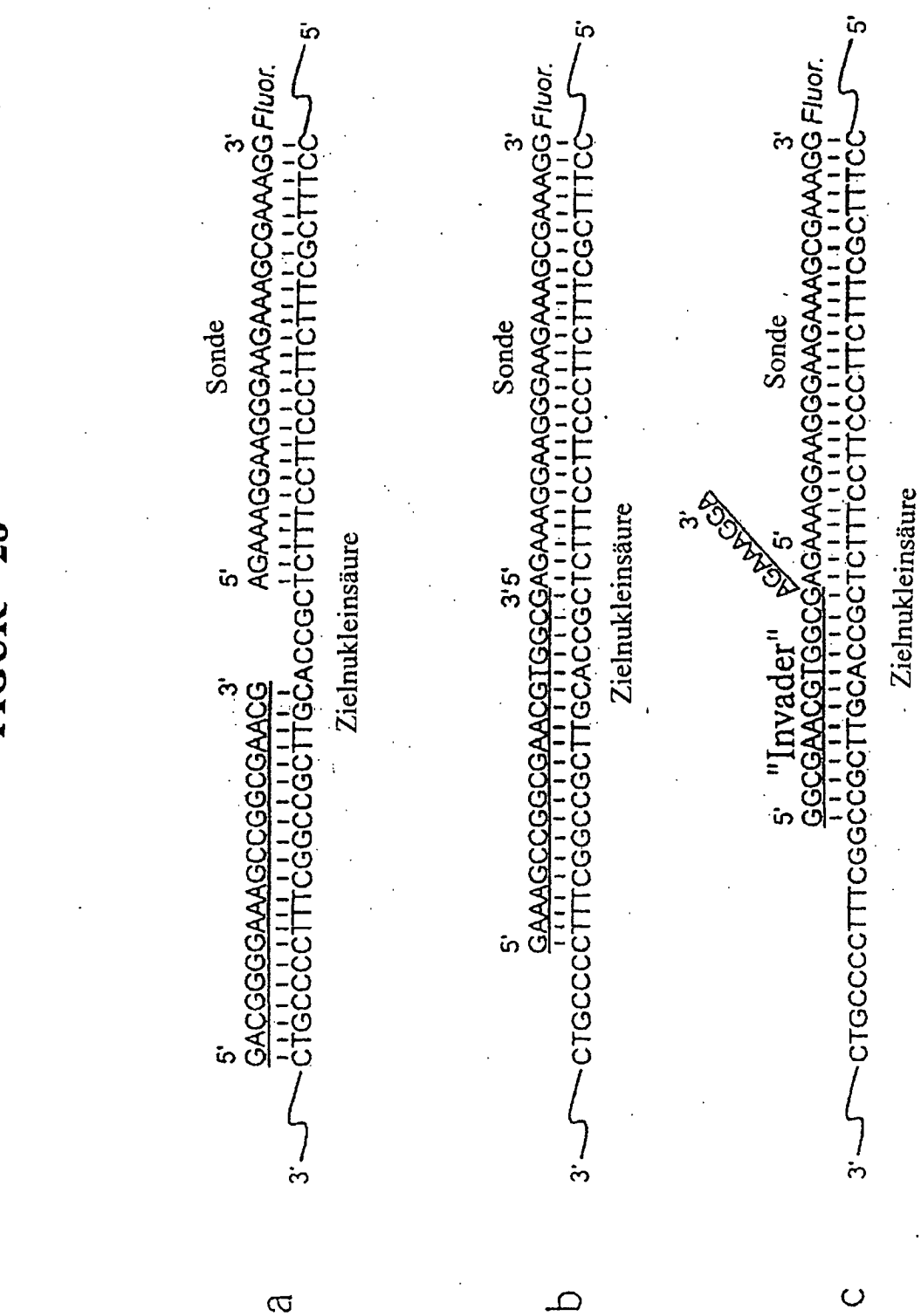
FIGUR 26


5'
GTTCTCTGCTCTCTGGT
CGCTGTCTCGCTTGT G
A S-60 Haarnadel
GCGACAGAGCGAACA
A
GCTCTCTGGT
CGCTG
3'
3'
CGAGAGACCA
P-15
5'

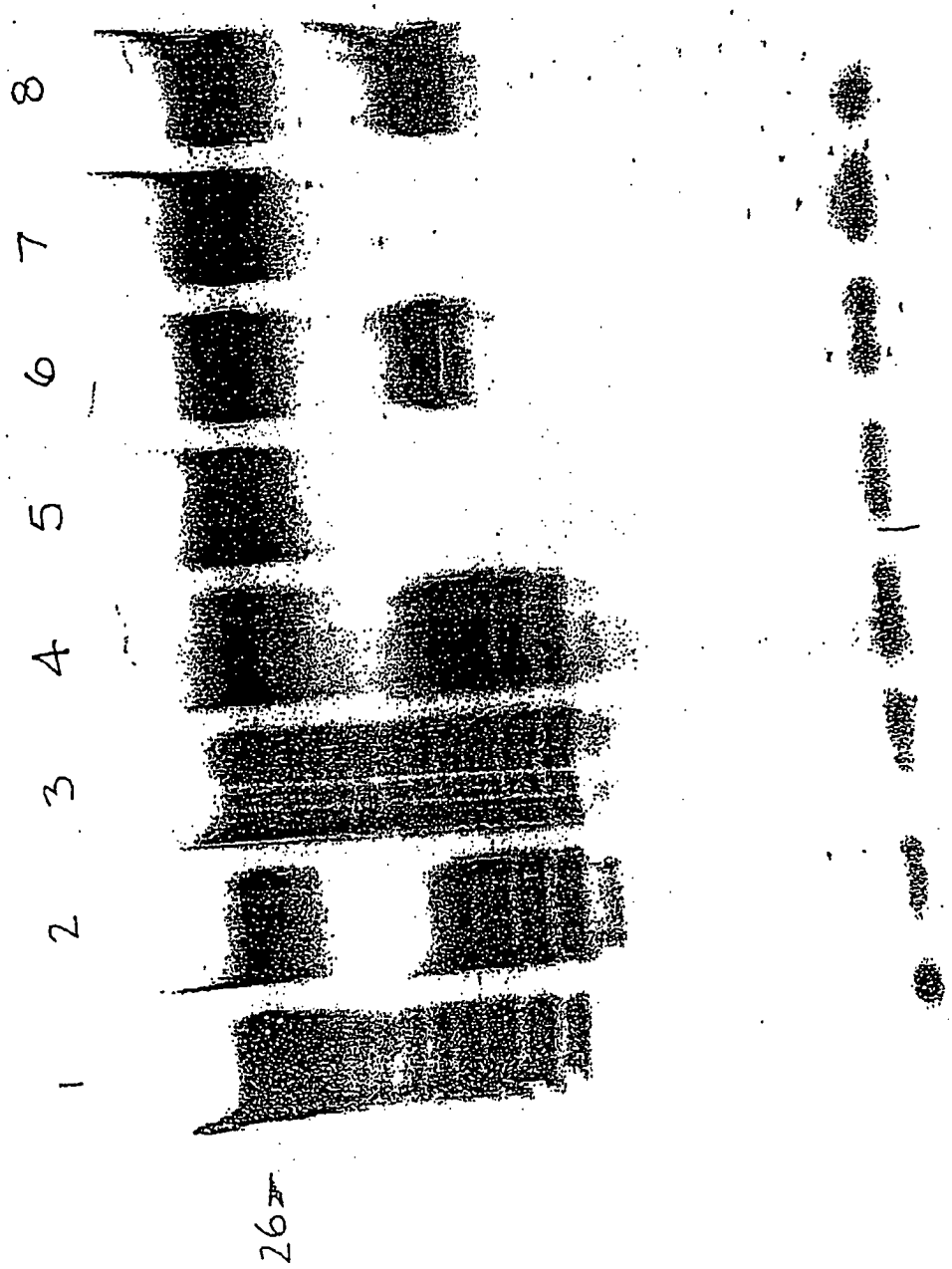


FIGUR 27

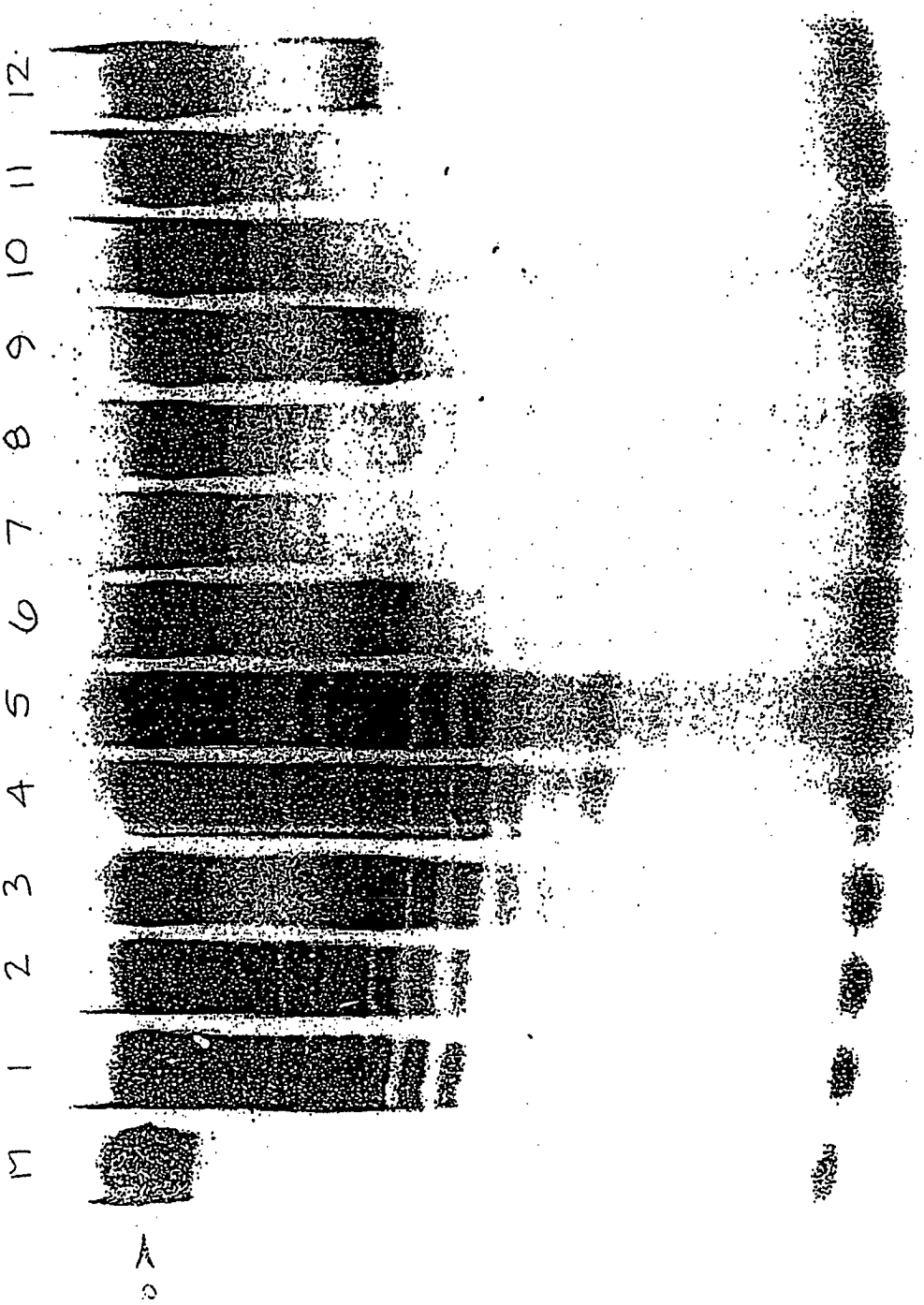
FIGUR 28


a
Sonde
5'
3'
GACGGGGAAAGCCGGCGAACG
AGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG Fluor.
3'
CTGCCCCTTTCGGCCGCTTGCACCGCTCTTTCCTTCTTTCGCTTTCC
5'
Zielnukleinsäure
b
Sonde
5'
3'5'
GAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG Fluor.
3'
CTGCCCCTTTCGGCCGCTTGCACCGCTCTTTCCTTCCTTCTTTCGCTTTCC
5'
Zielnukleinsäure
c
"Invader"
Sonde
3'
AGAAAGG
5'
5'
GGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG Fluor.
3'
CTGCCCCTTTCGGCCGCTTGCACCGCTCTTTCCTTCCTTCTTTCGCTTTCC
5'
Zielnukleinsäure

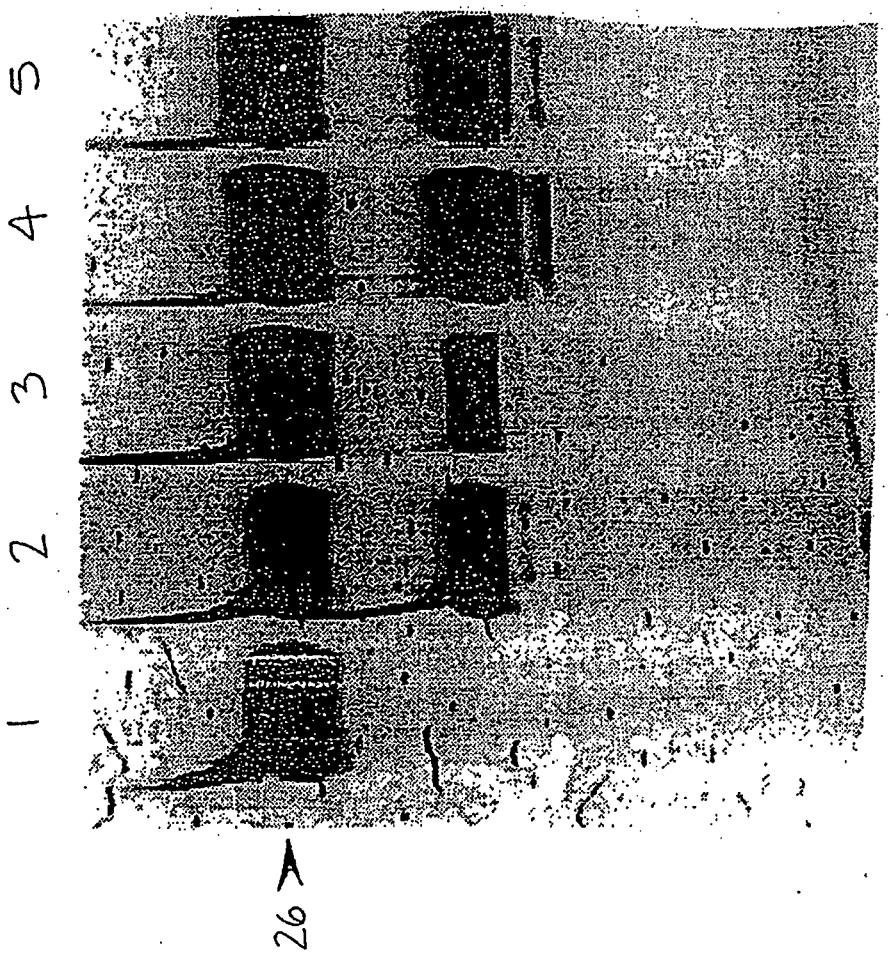
FIGUR 29



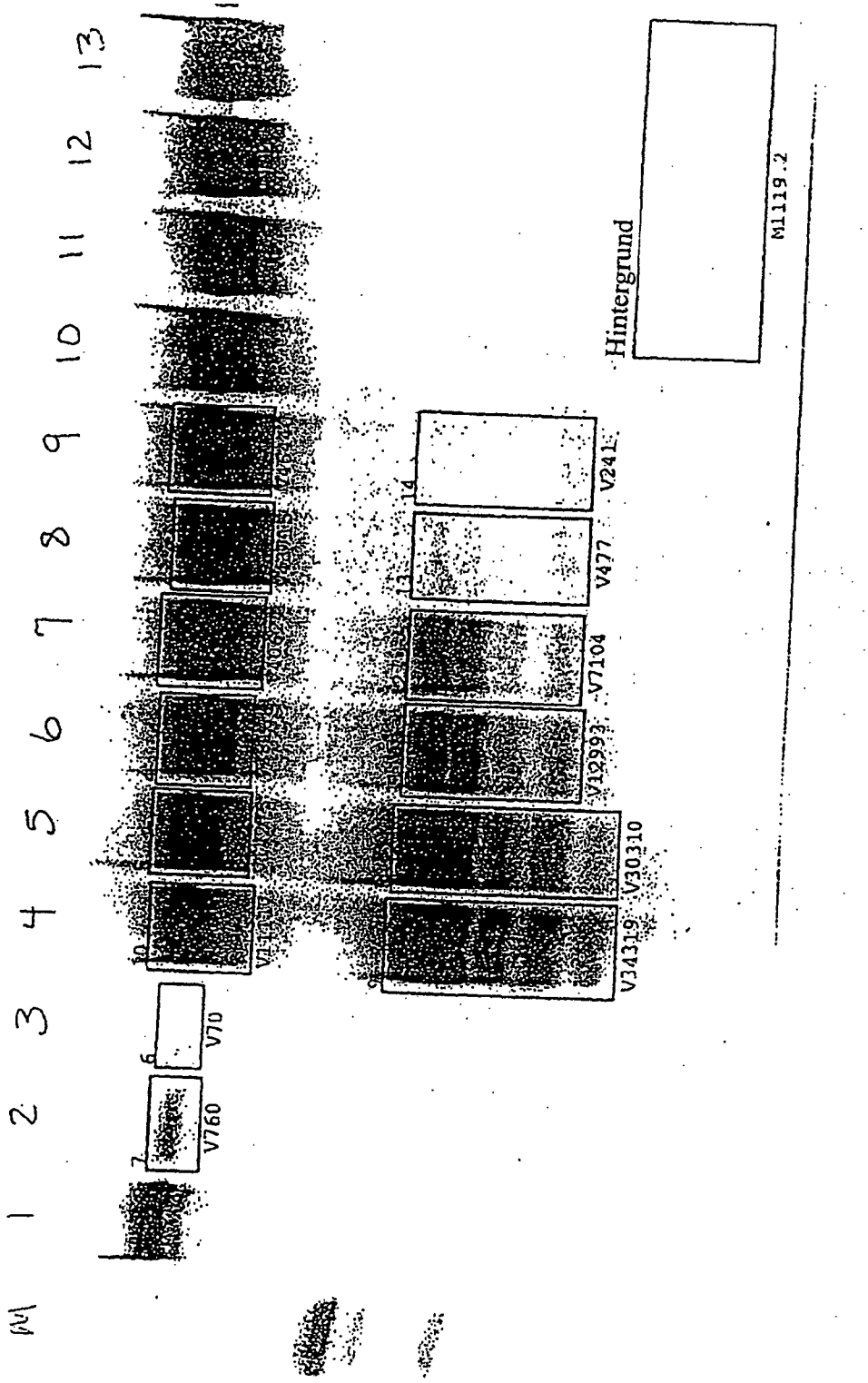
FIGUR 30



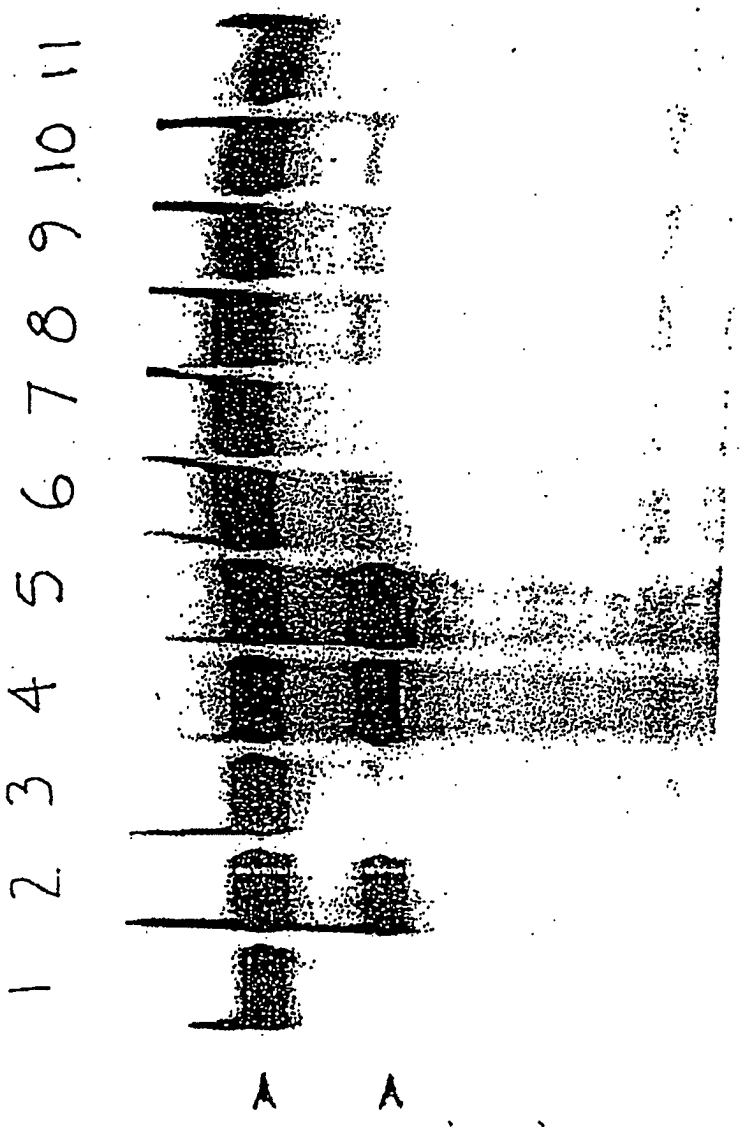
FIGUR 31



FIGUR 32


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
V760
V70
V7104
V12993
V30310
V3431-9
V241
V477
Hintergrund
M1119.2

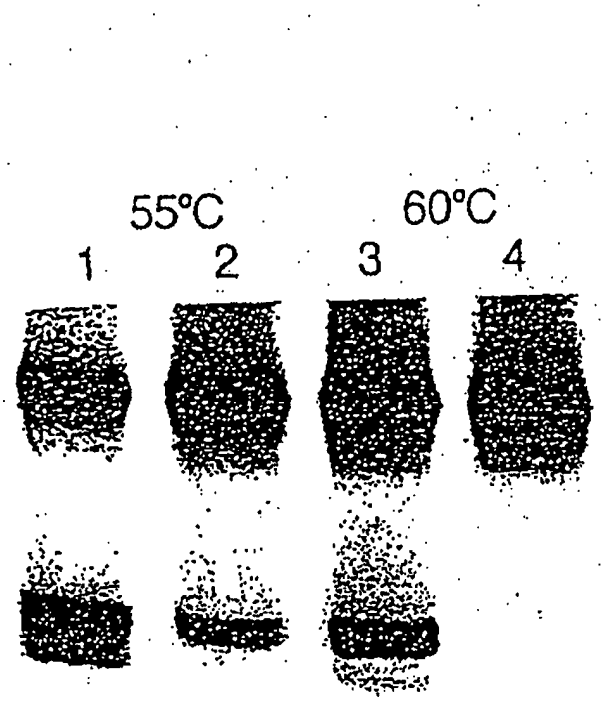
FIGUR 33



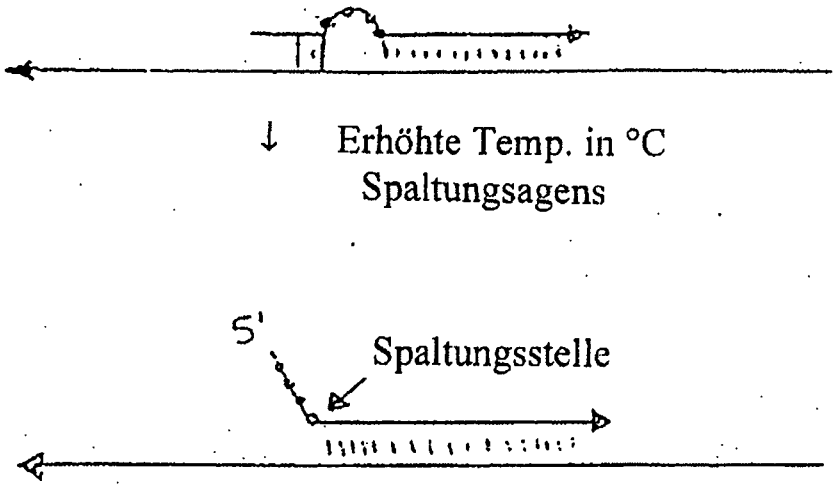
FIGUR 34



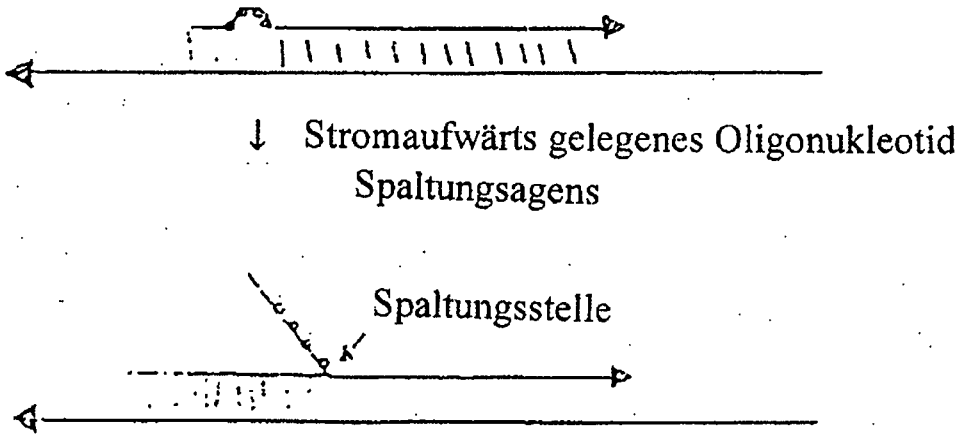
FIGUR 35



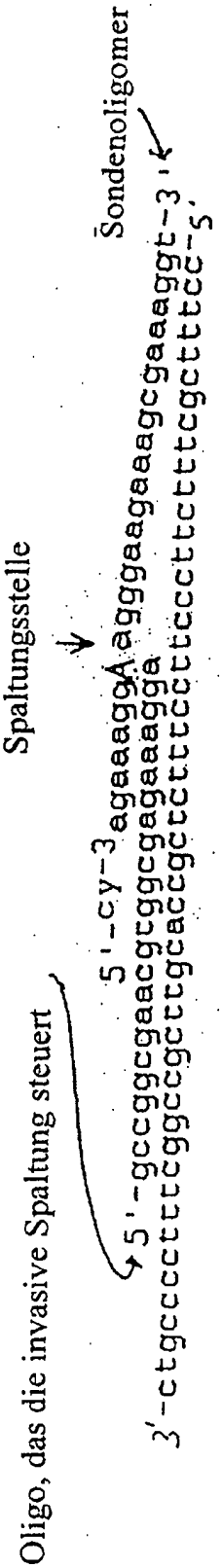
a.


↓ Erhöhte Temp. in °C
Spaltungsagens
5'
Spaltungsstelle

b.

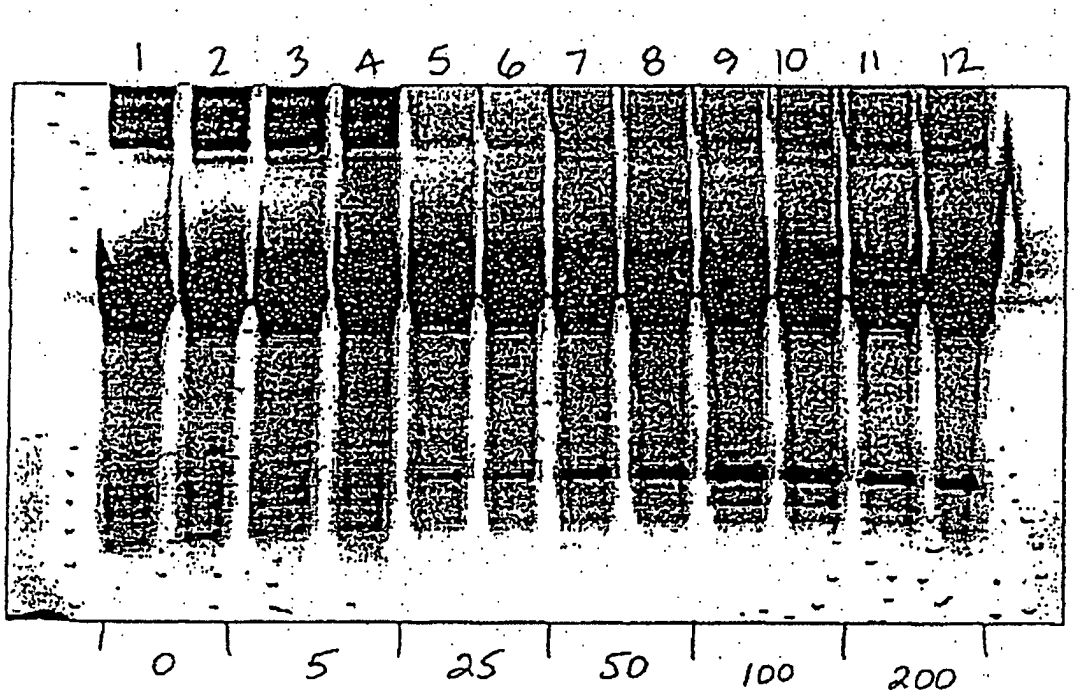

↓ Stromaufwärts gelegenes Oligonukleotid
Spaltungsagens
Spaltungsstelle

FIGUR 36

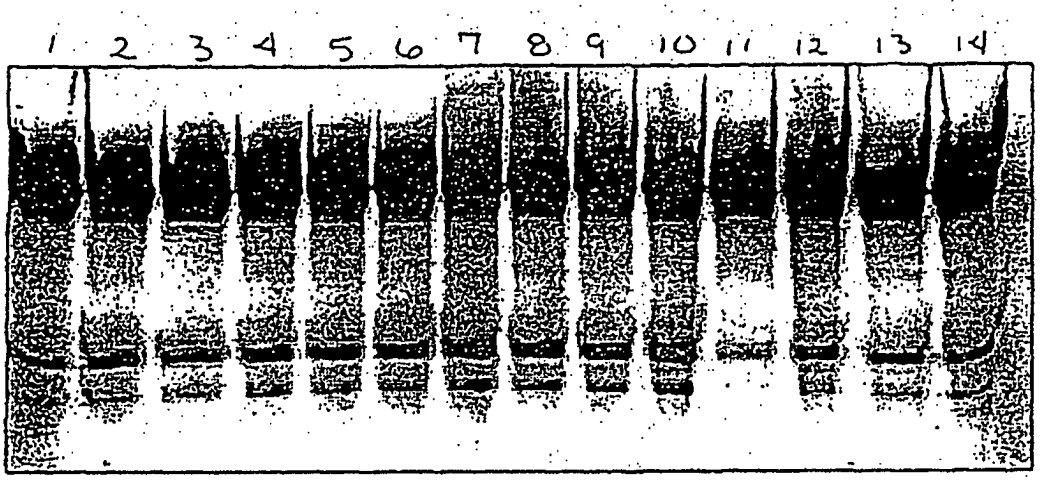

Spaltungsstelle
Sondenoligomer
Oligo, das die invasive Spaltung steuert
5'-cy-3 agaaaaggga agggaagaaagcgaaaggt-3'
5'-gccggcgcgaacgcggcgagaaaggga
3'-ctgccccttttcggccgcttgcaccgcttttccctttcgctttcc-5'

FIGUR 37

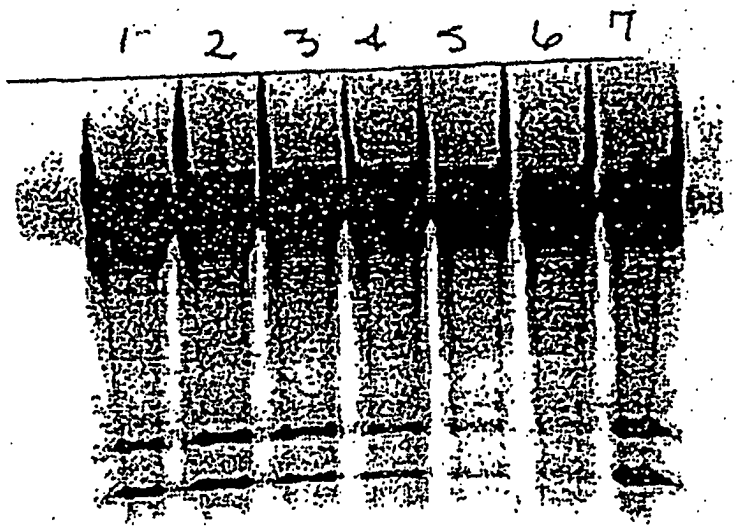
FIGUR 38



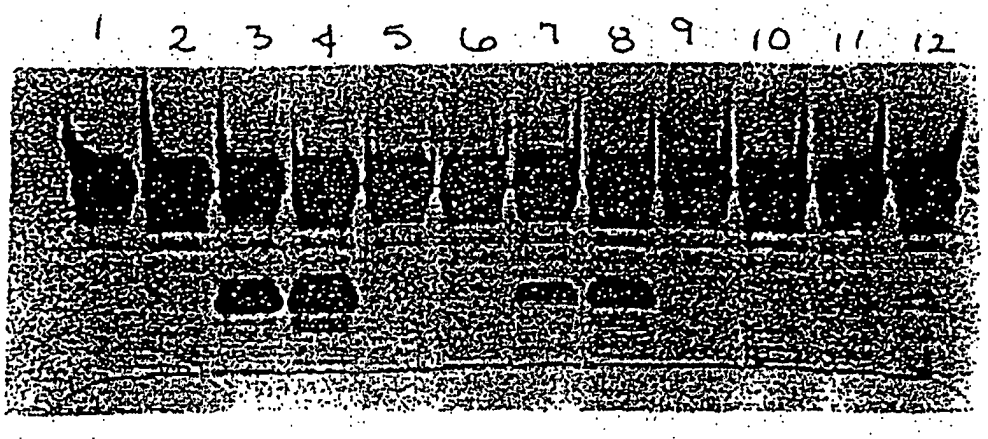
FIGUR 39



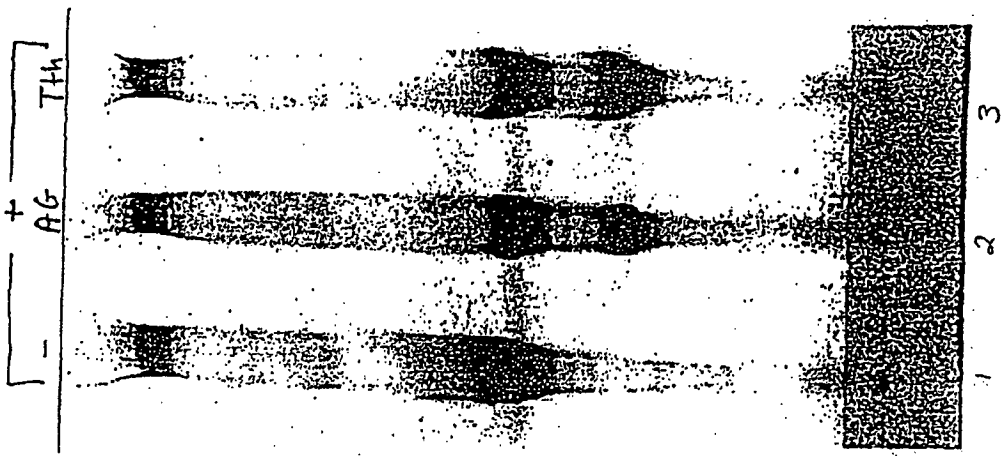
FIGUR 40



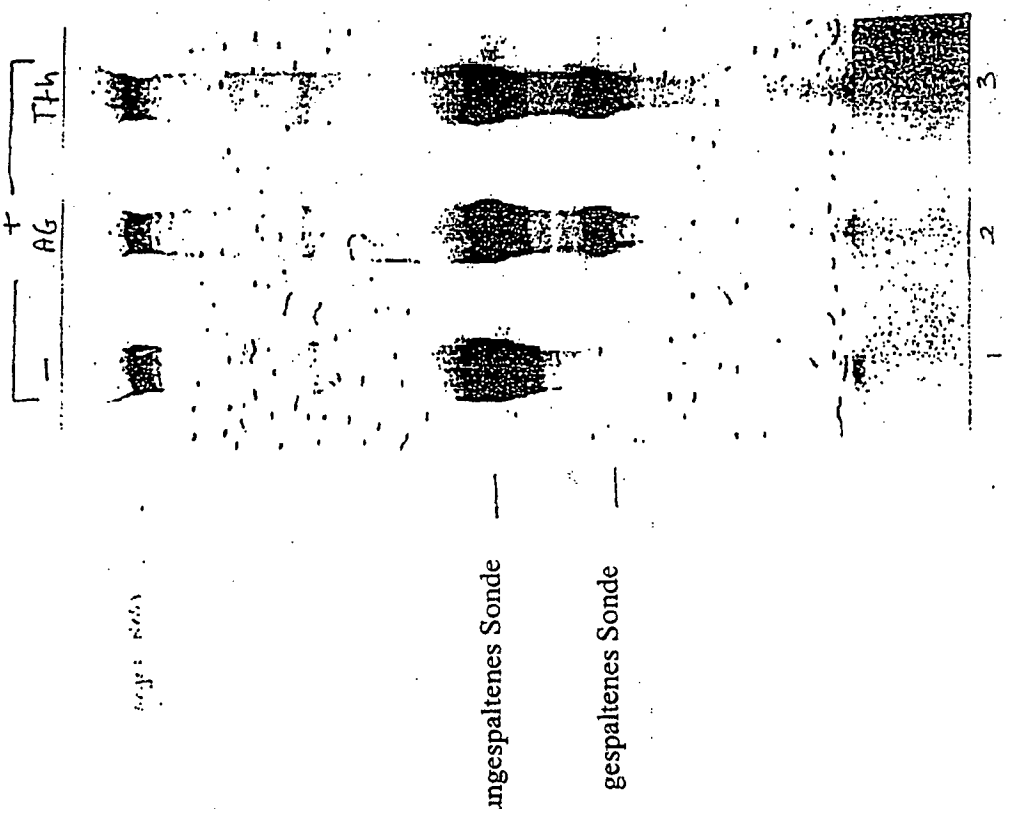
FIGUR 41

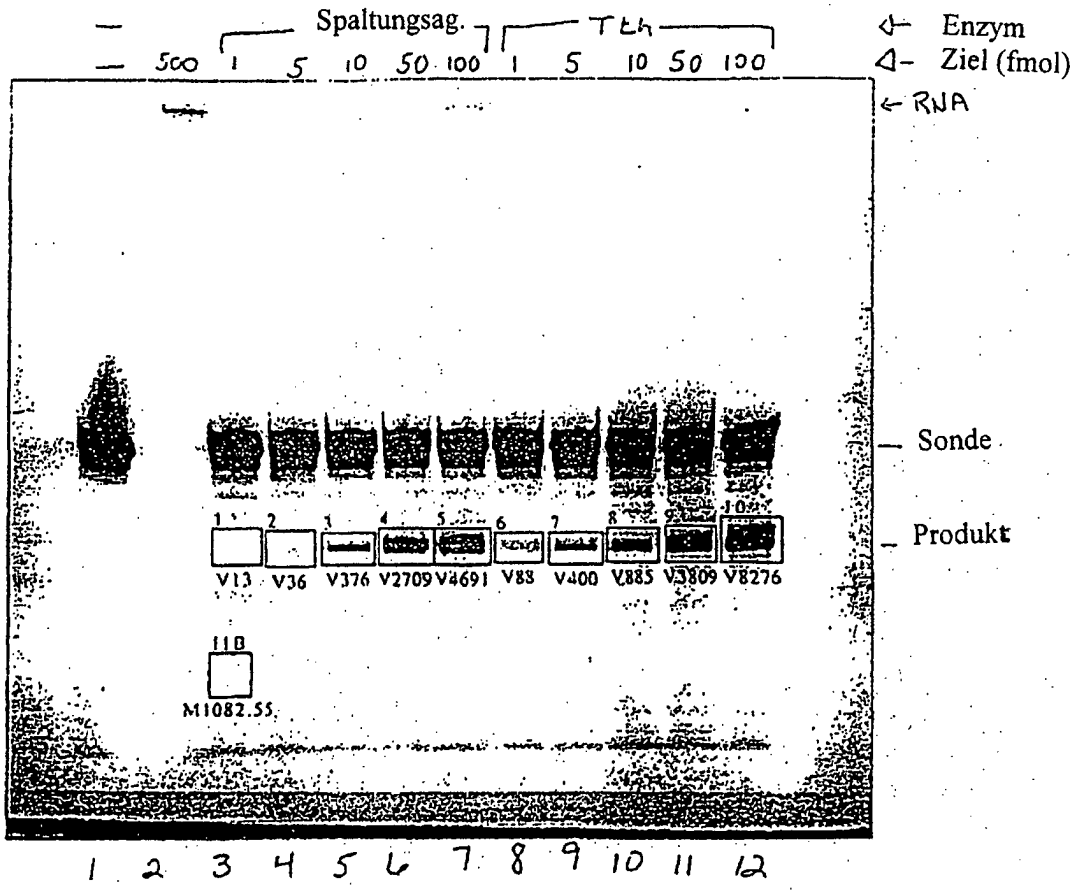


FIGUR 42B

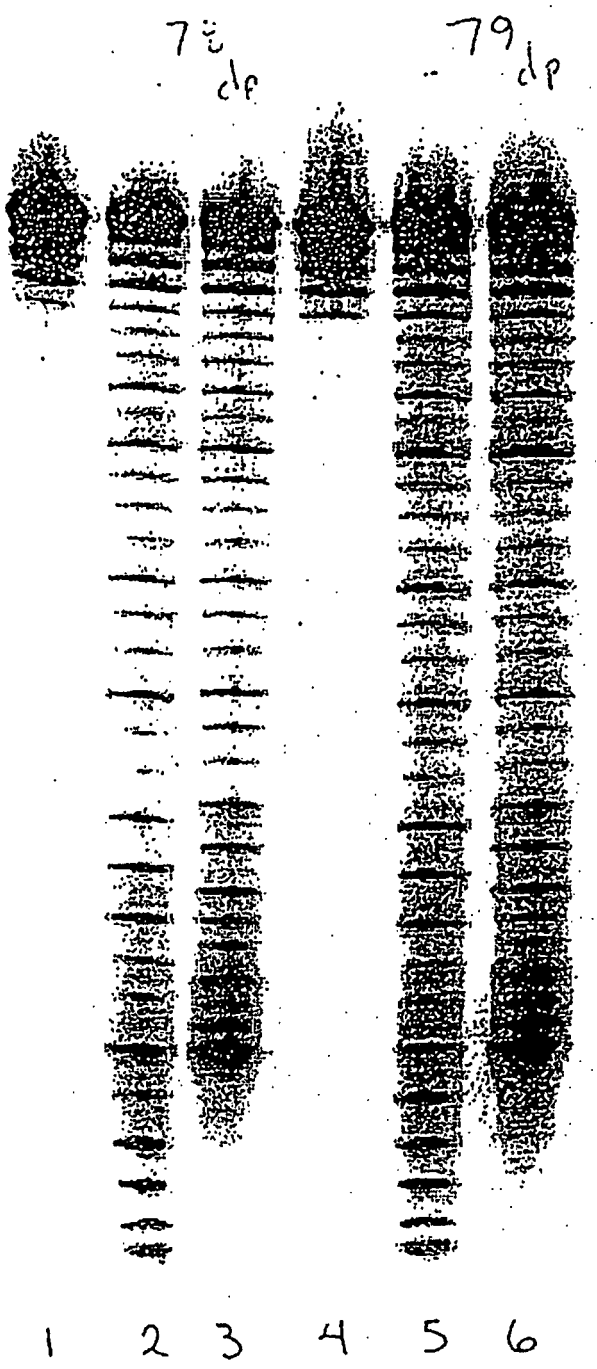


FIGUR 42A



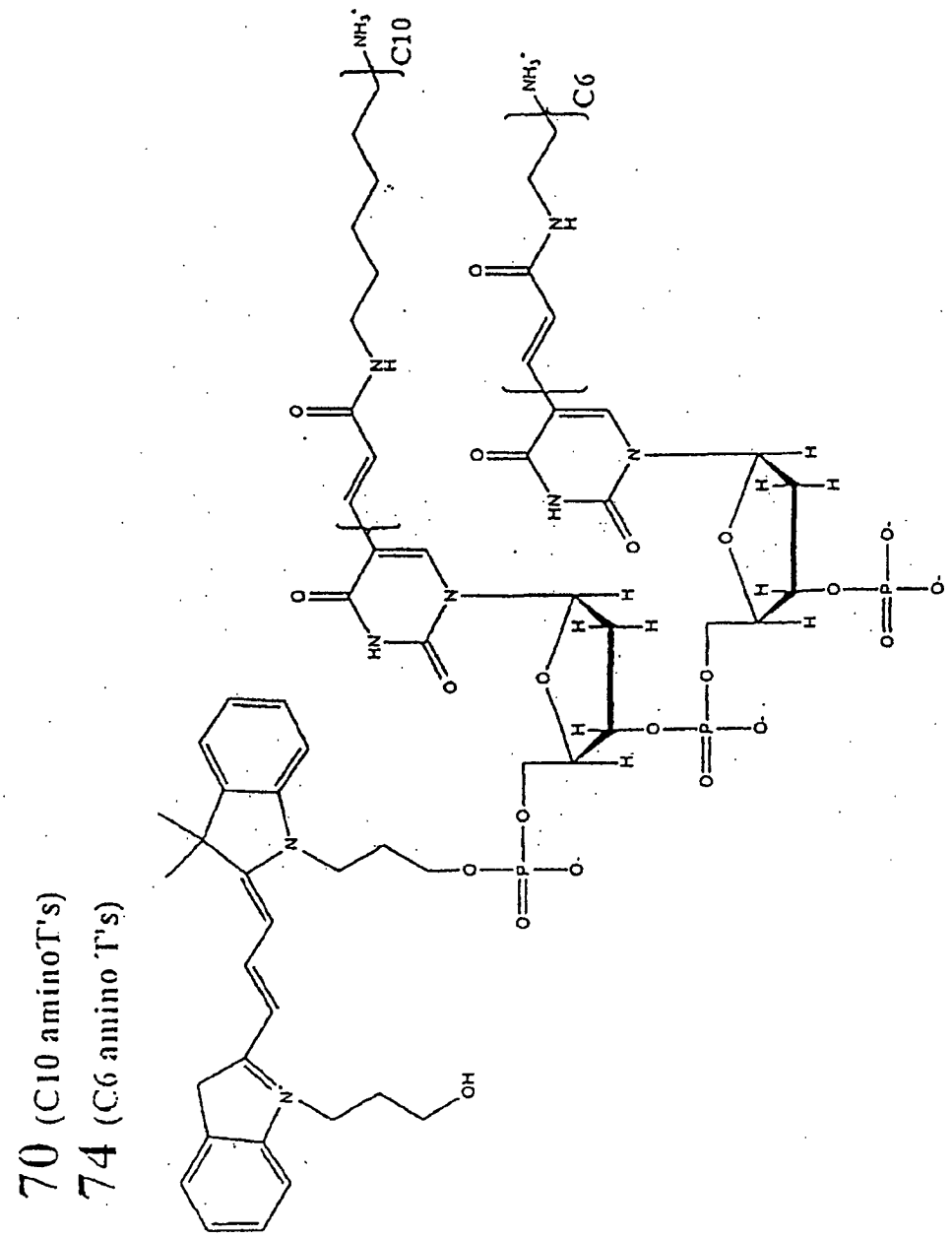

Spaltungsag.
TTh
Enzym
Ziel (fmol)
500 1 5 10 50 100 1 5 10 50 100
RNA
Sonde
Produkt
V13 V36 V376 V2709 V4691 V88 V400 V885 V3809 V8276
M1082.55
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

FIGUR 43

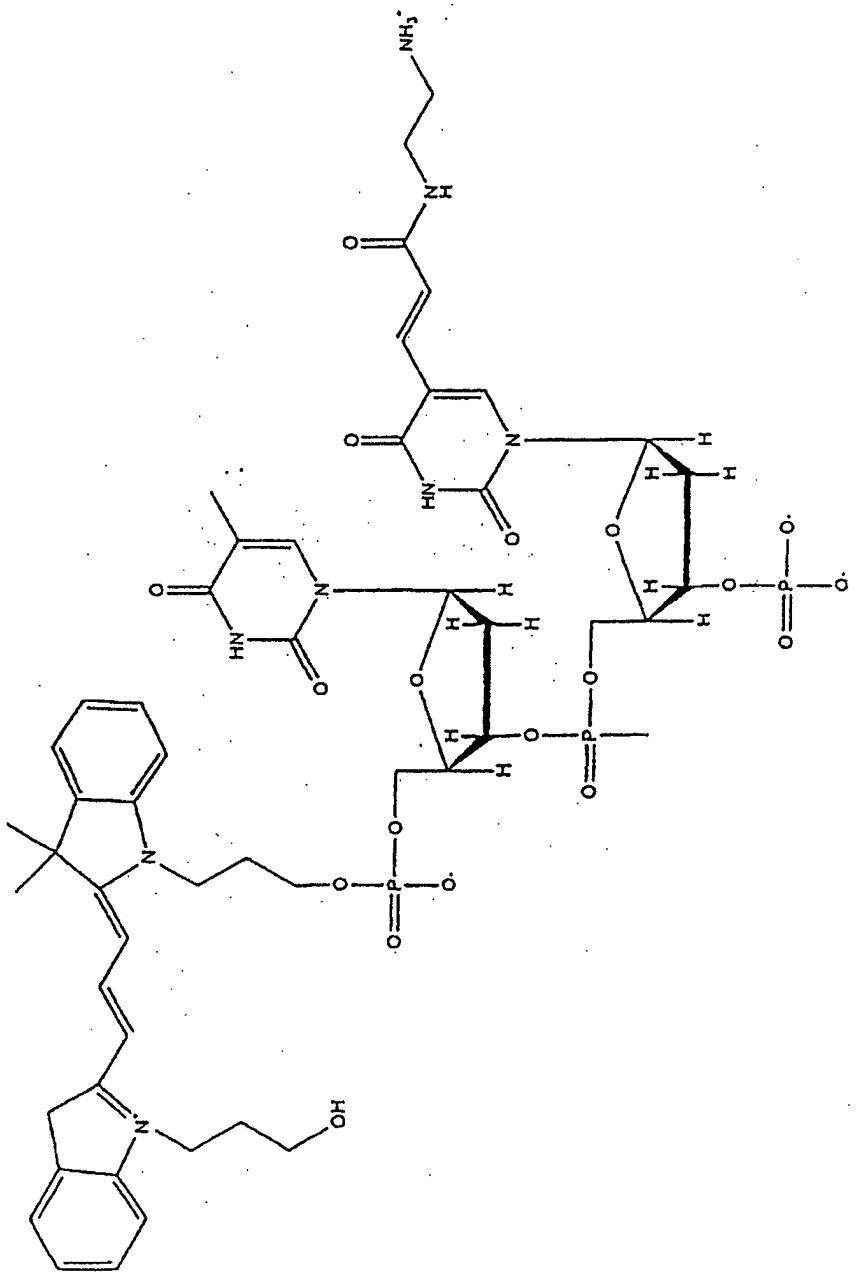


FIGUR 44

FIGUR 45

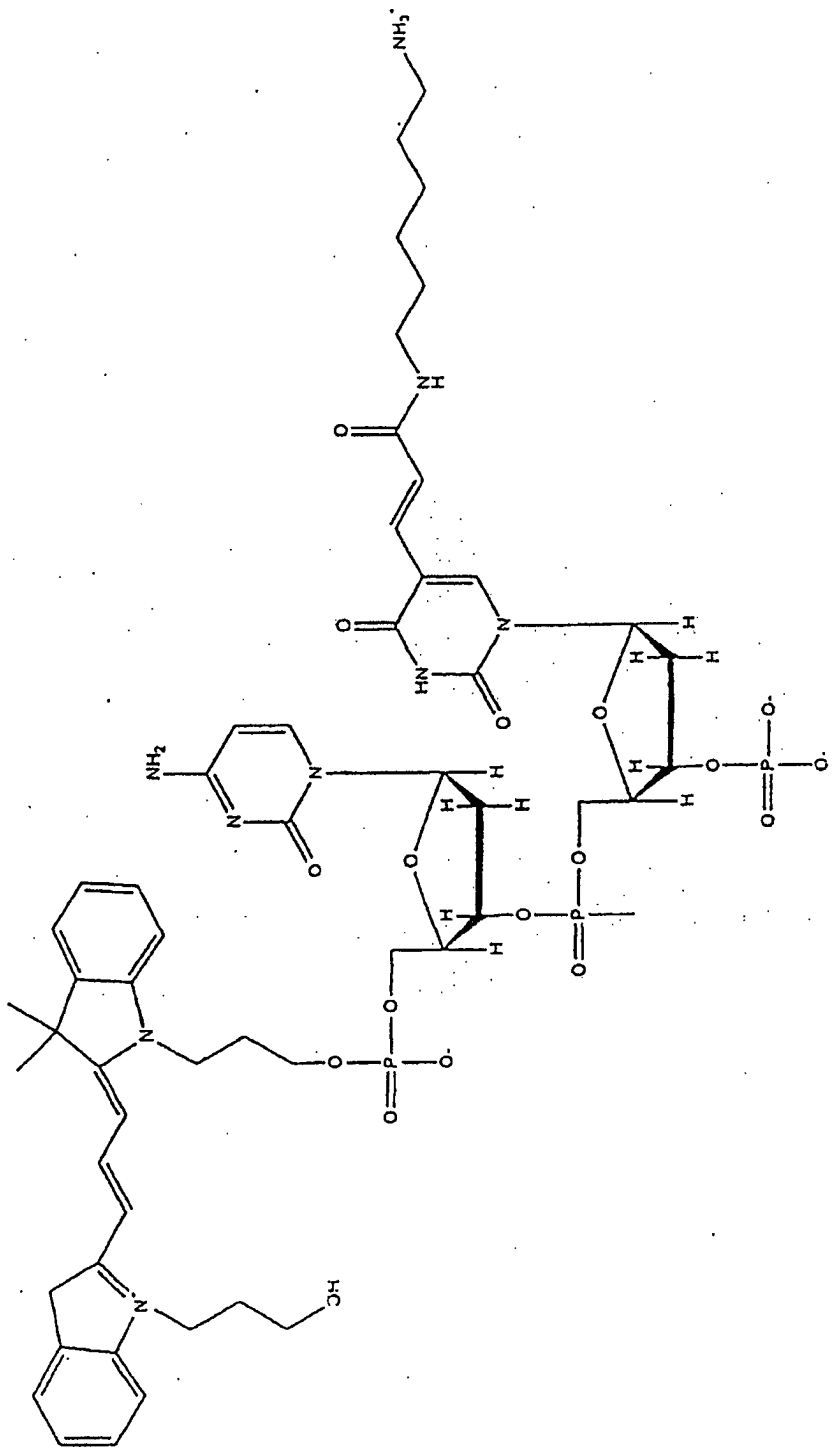


FIGUR 46



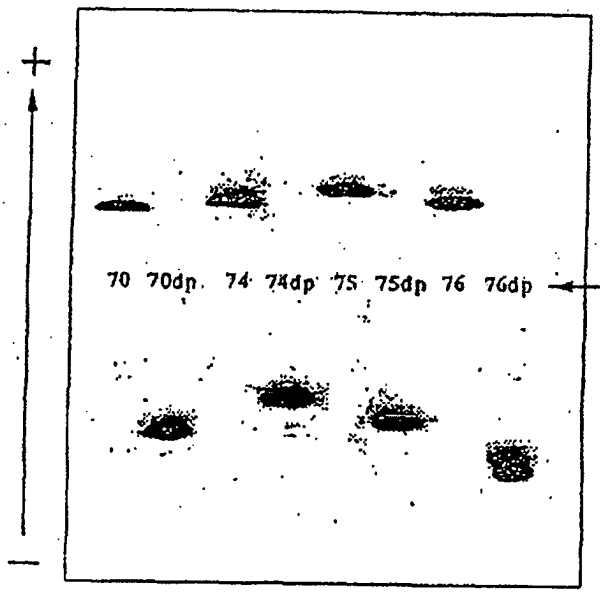
75

FIGUR 47



76

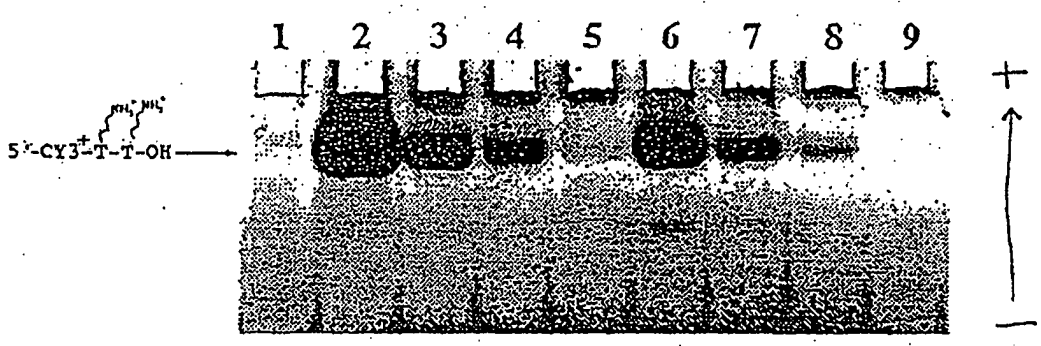
FIGUR 48



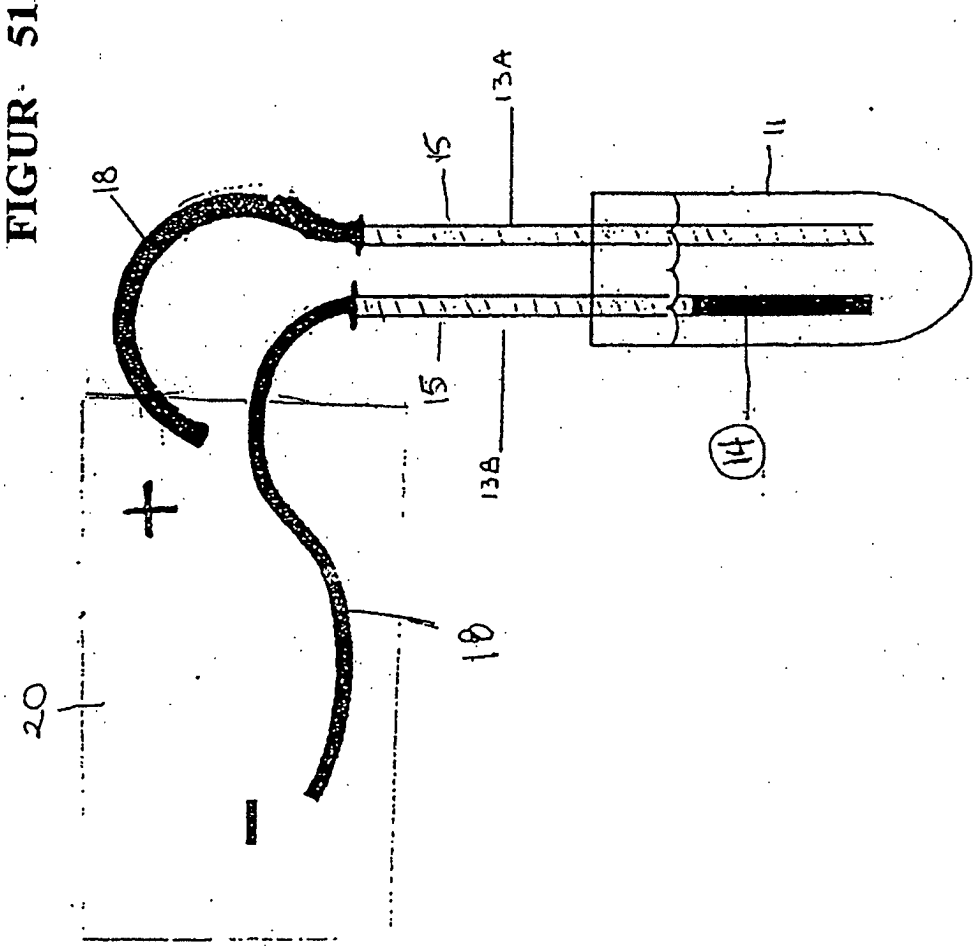

A.
Spaltungsstelle
5'-CY3-T-T-
INVADER
CTTTTCACCAGCGAGACGGG-3' --61
M13 - 3-CGCCAAACGCATAACCCGCGGTCCCACCAAAAAGAAAAGTGGTCGCTCTGCCC-5'
09876543210987654321 123456789
67 — ATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTT
B.
50 55 60 65 —
5'-CY3-T-T-
+
—
1 2 3 4 5

FIGUR 49

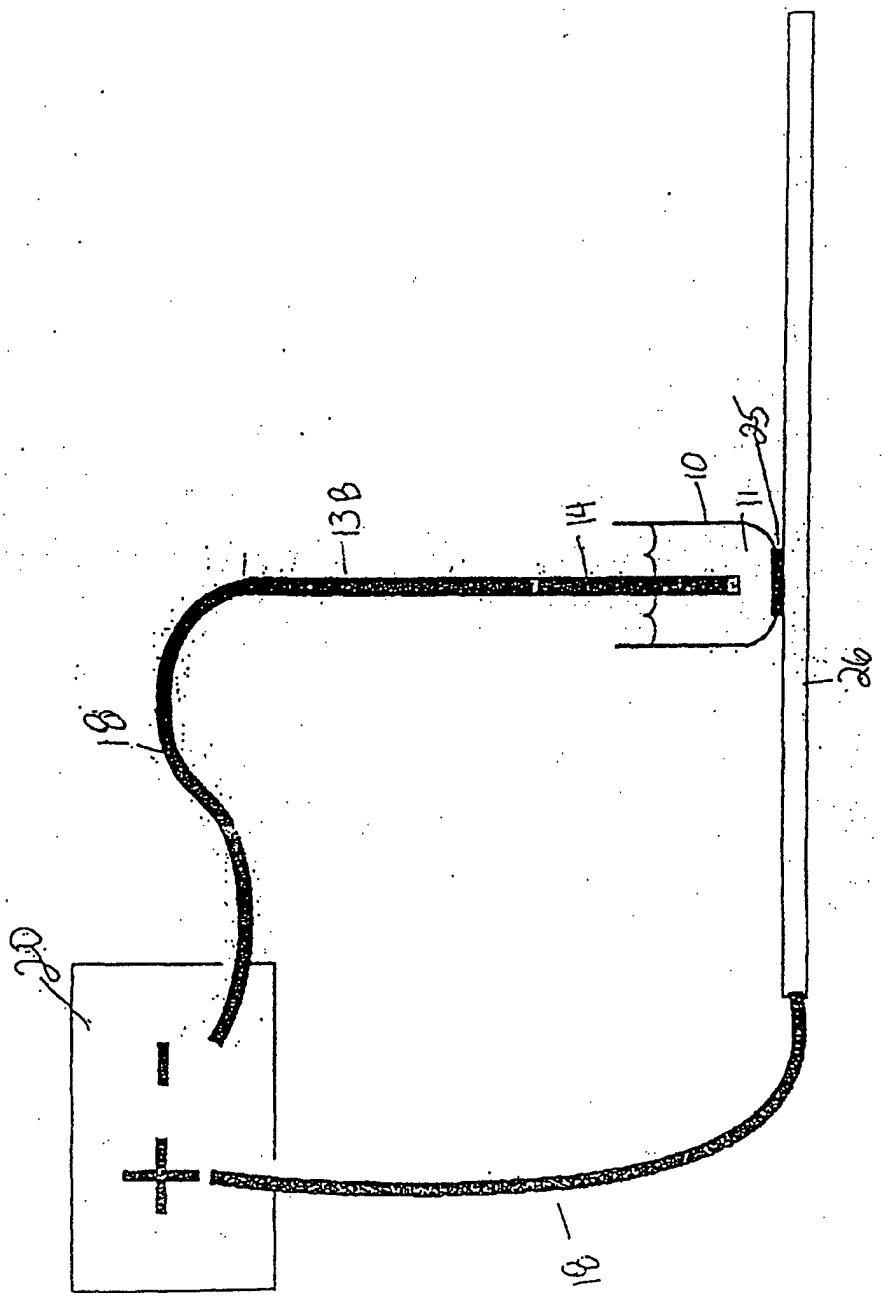
FIGUR 50



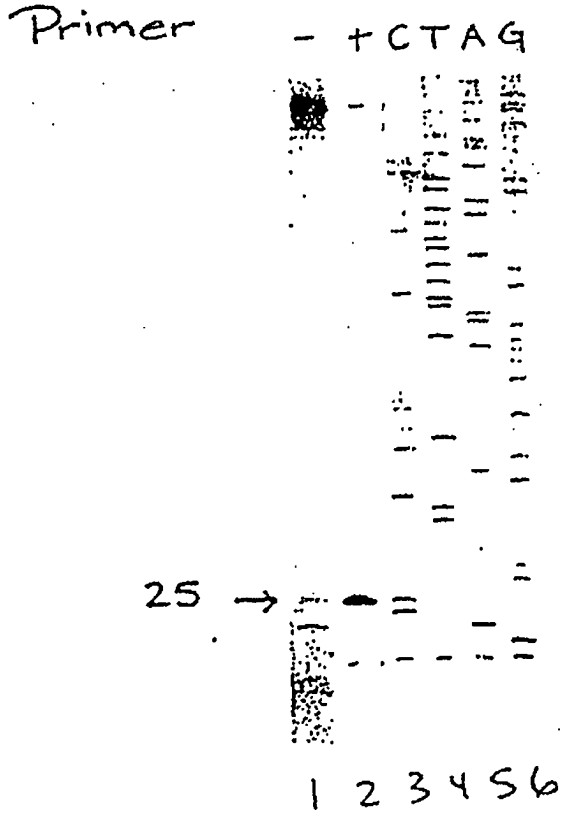
FIGUR 51

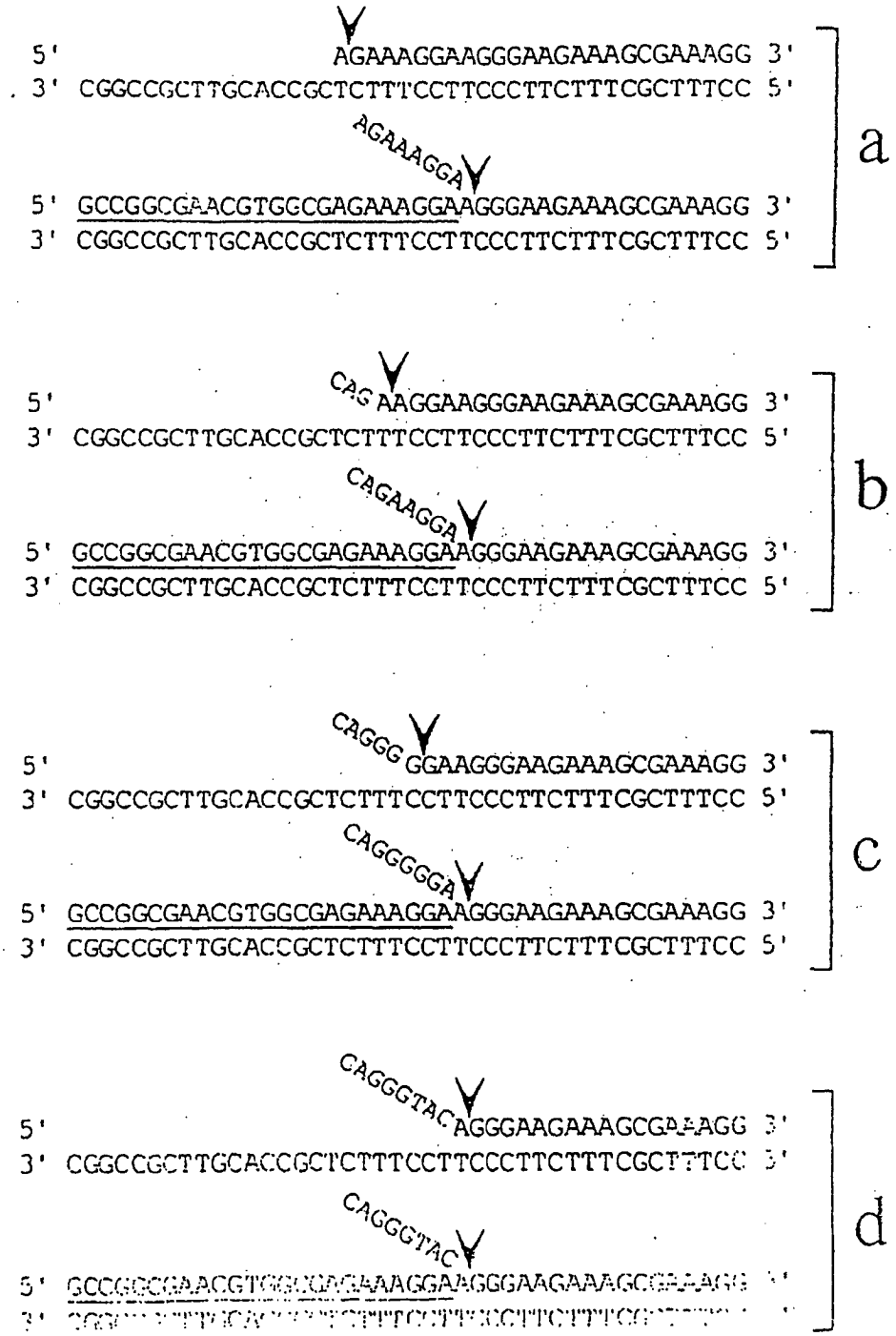


FIGUR 52



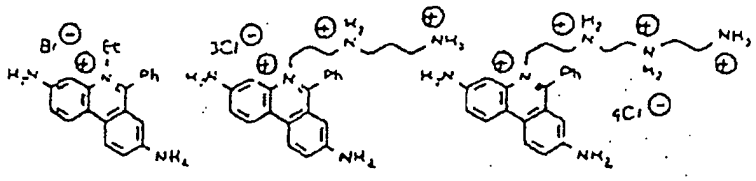
FIGUR 53




5' AGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG 3'
3' CGGCCGCTTGCACCGCTCTTTCCTTCCCTTCTTTCGCTTTCC 5'
AGAAAGGA
5' GCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG 3'
3' CGGCCGCTTGCACCGCTCTTTCCTTCCCTTCTTTCGCTTTCC 5'
a
CAG
5' AAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG 3'
3' CGGCCGCTTGCACCGCTCTTTCCTTCCCTTCTTTCGCTTTCC 5'
CAGAAGGA
5' GCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG 3'
3' CGGCCGCTTGCACCGCTCTTTCCTTCCCTTCTTTCGCTTTCC 5'
b
CAGGG
GGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG
CAGGGGGA
GCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG
CGGCCGCTTGCACCGCTCTTTCCTTCCCTTCTTTCGCTTTCC
c
CAGGGTAC
AGGGAAGAAAGCGAAAGG
CAGGGTAC
d

FIGUR 54

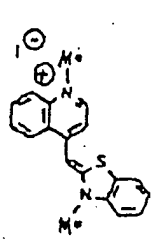
FIGUR 55



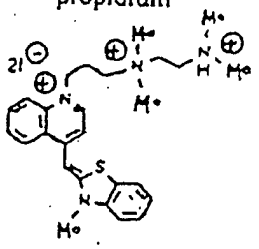
Ethidiumbromid

(1,3-Propandiamino)-propidium

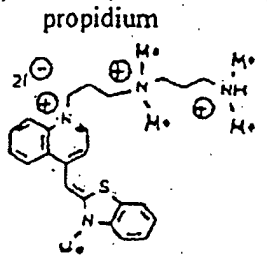
(Diethylentriamino)-propidium



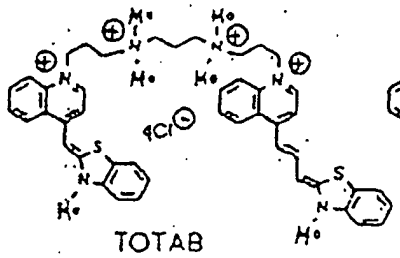
Thiazol-Orange



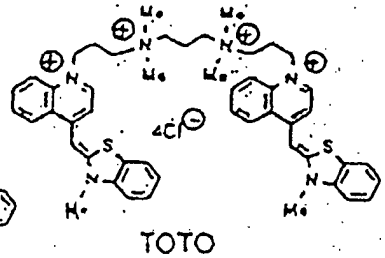
(N,N''-Tetramethyl 1,2-ethandiamino)-propylthiazolorange



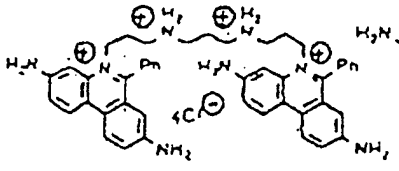
(N,N'-Tetramethyl-1,3-propandiamino)-propylthiazolorange



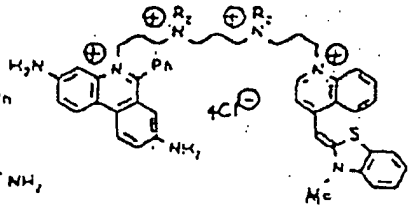
TOTAB



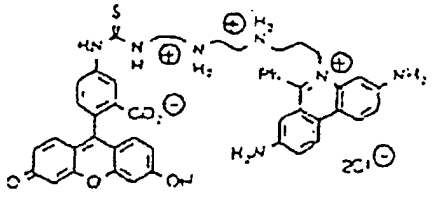
TOTO



EthD

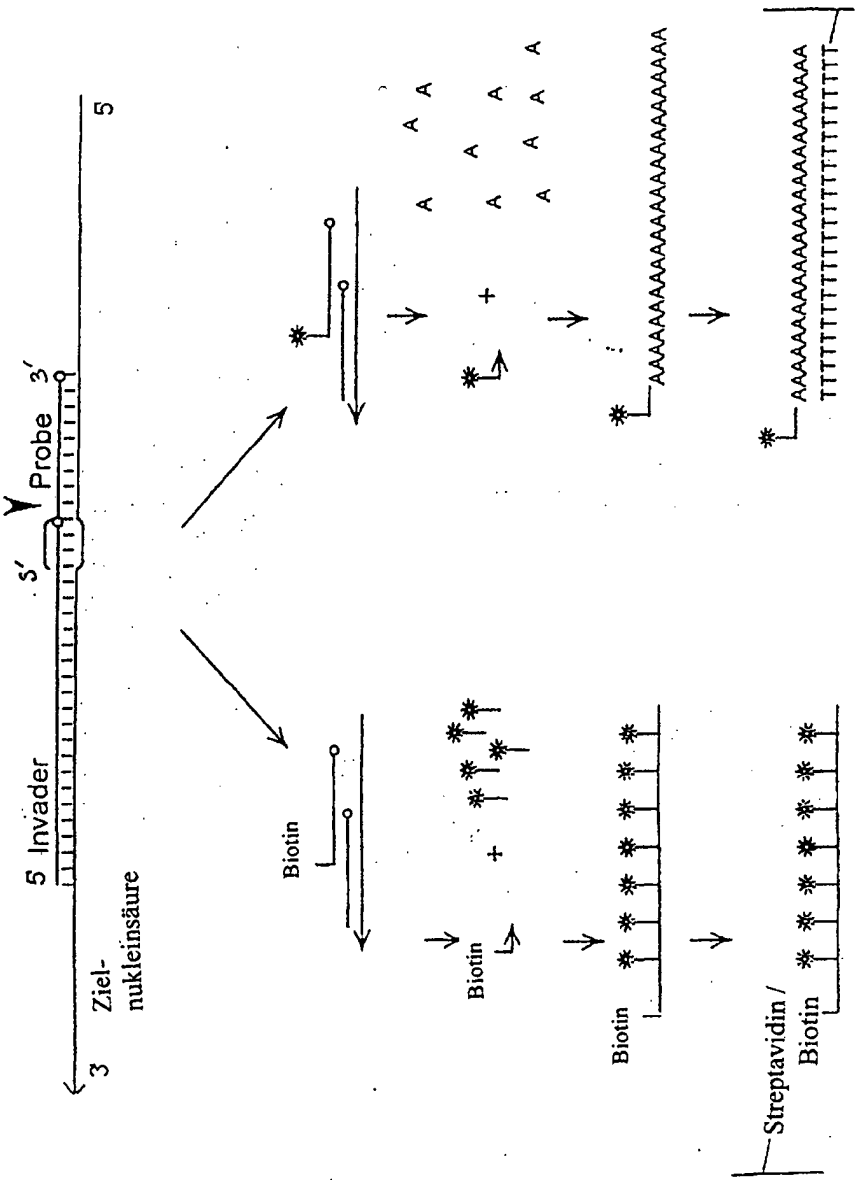


TOED1 (R = H)
TOED2 (R = CH_3)

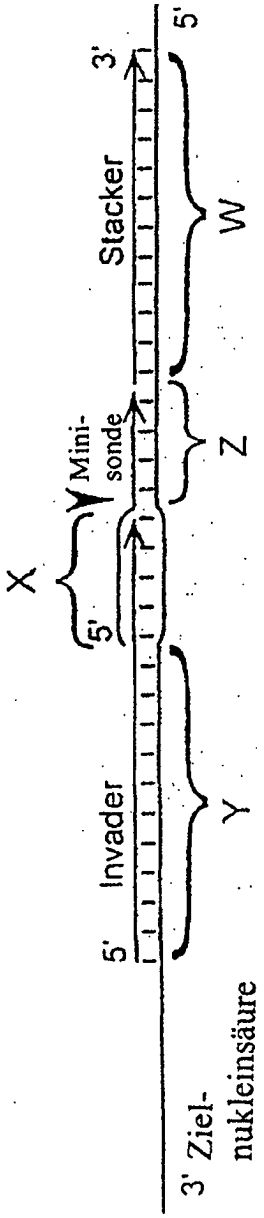


FED

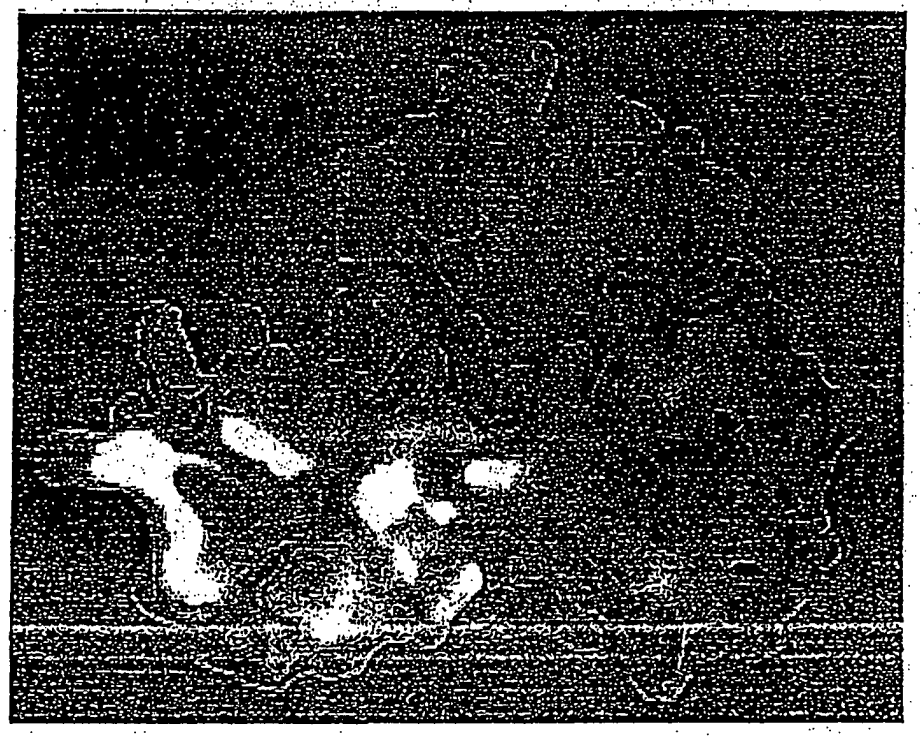
FIGUR 56


5 Invader
5´
Probe
3´
5
3
Ziel-
nukleinsäure
Biotin
Biotin
Biotin
Streptavidin /
Biotin
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

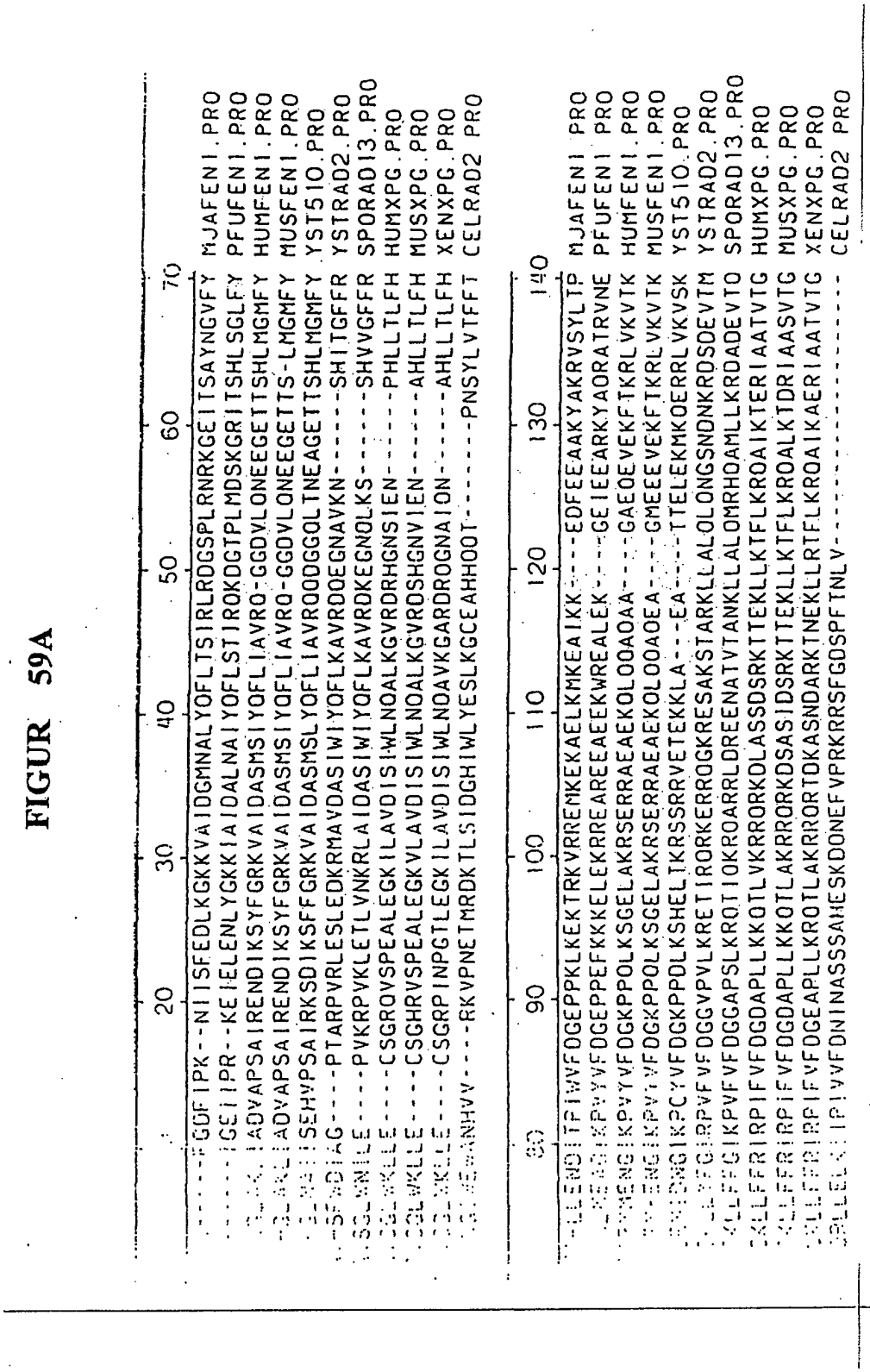
FIGUR 57



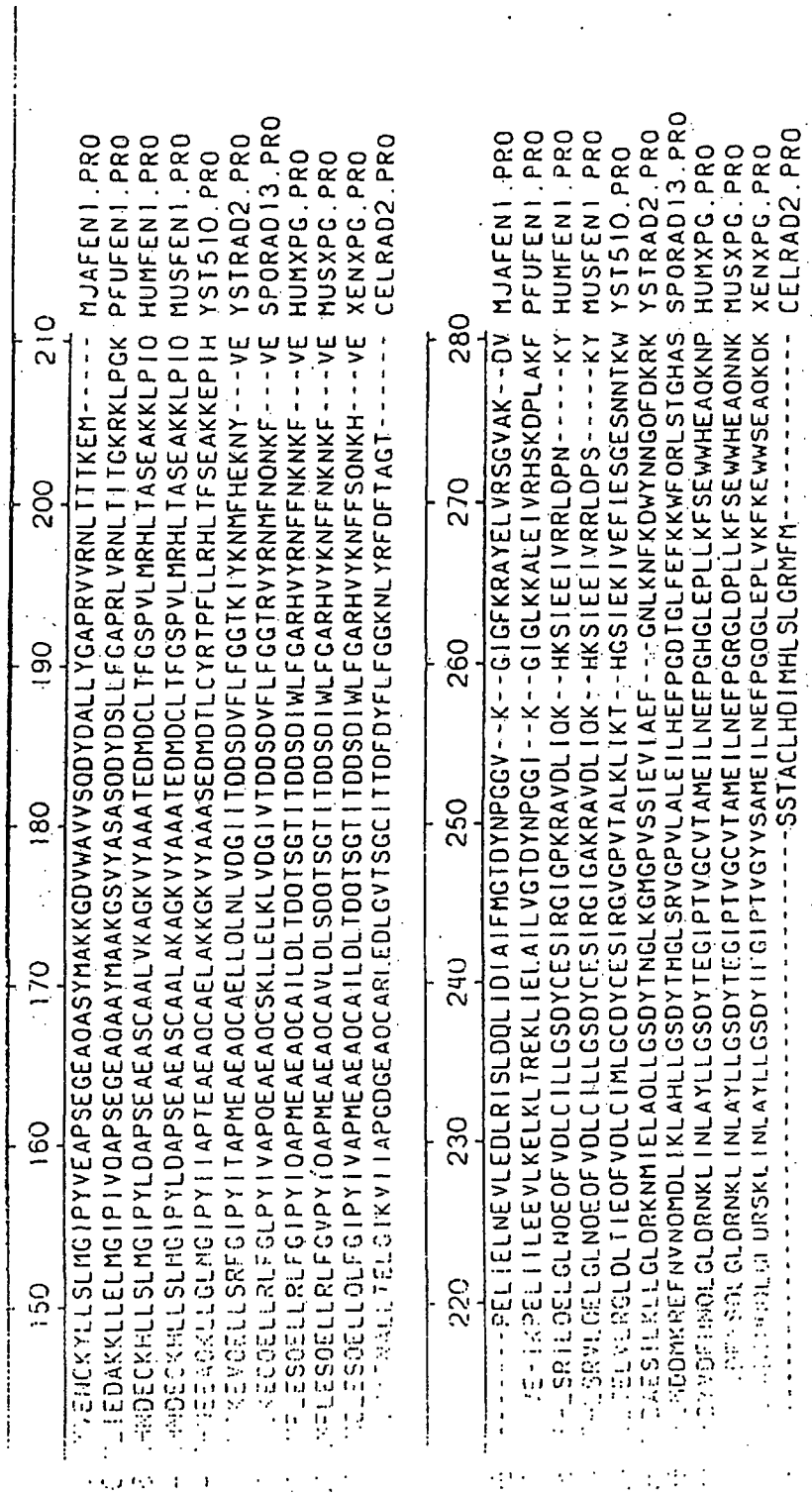
FIGUR 58



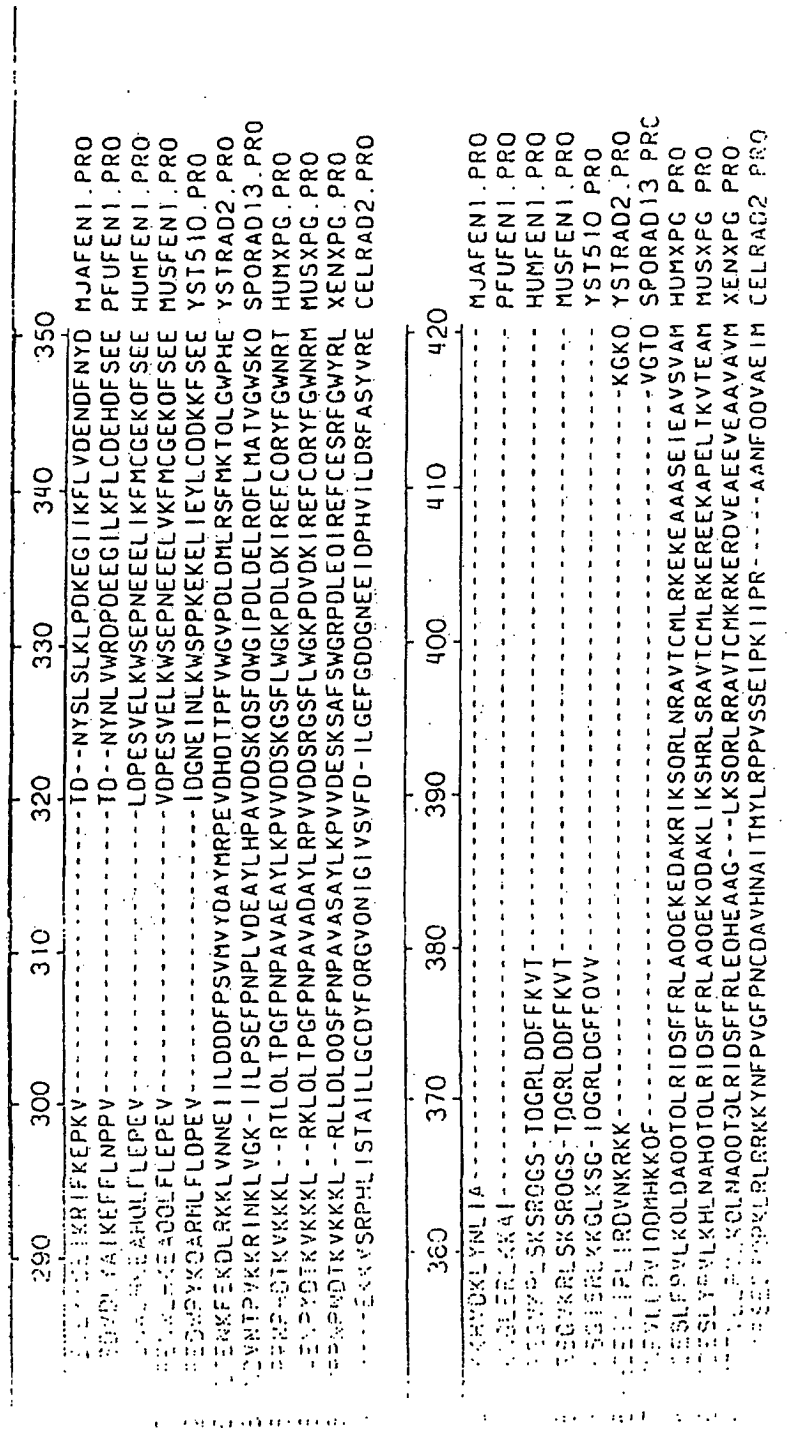
FIGUR 59A



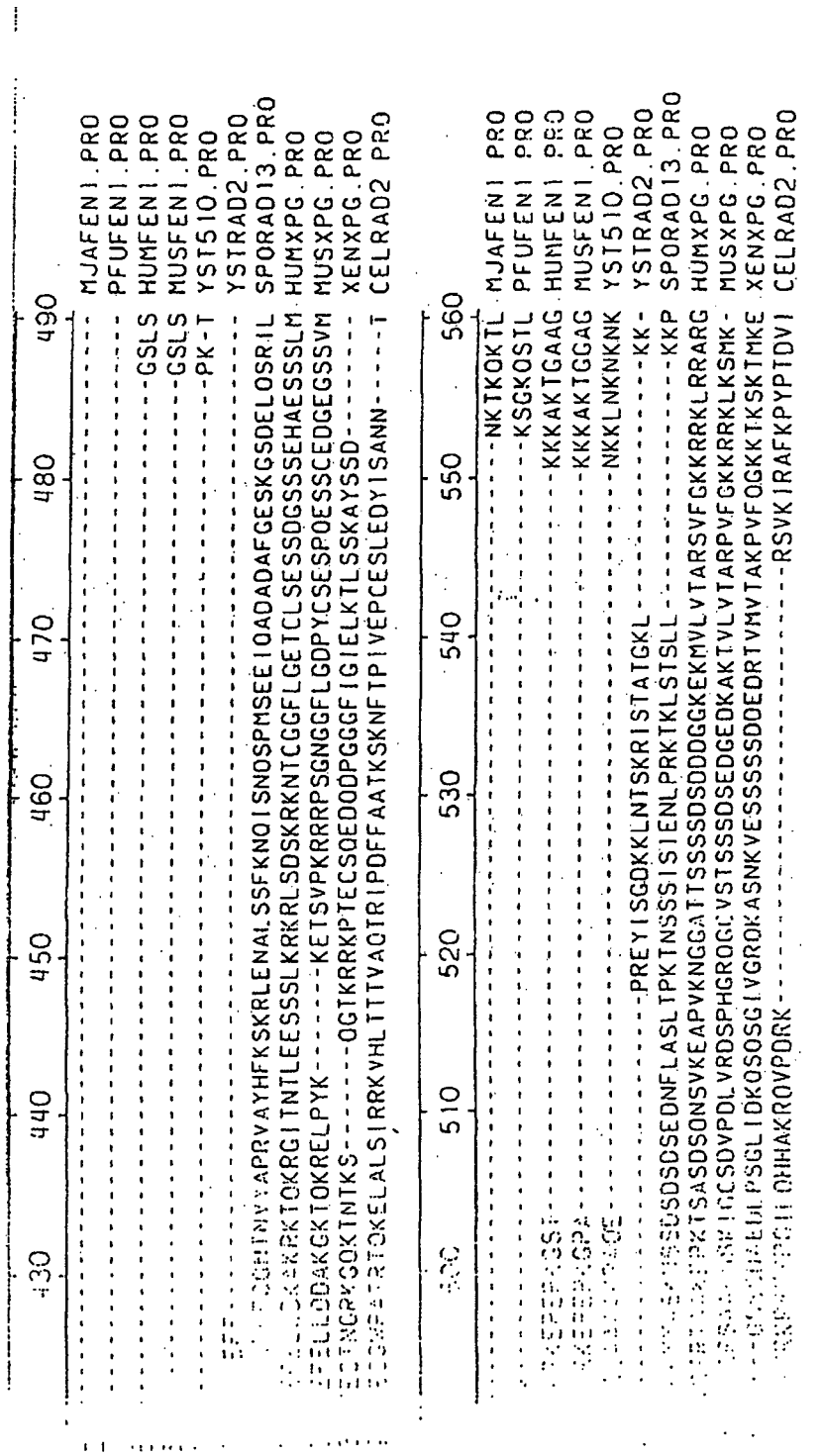
FIGUR 59B



FIGUR 59C



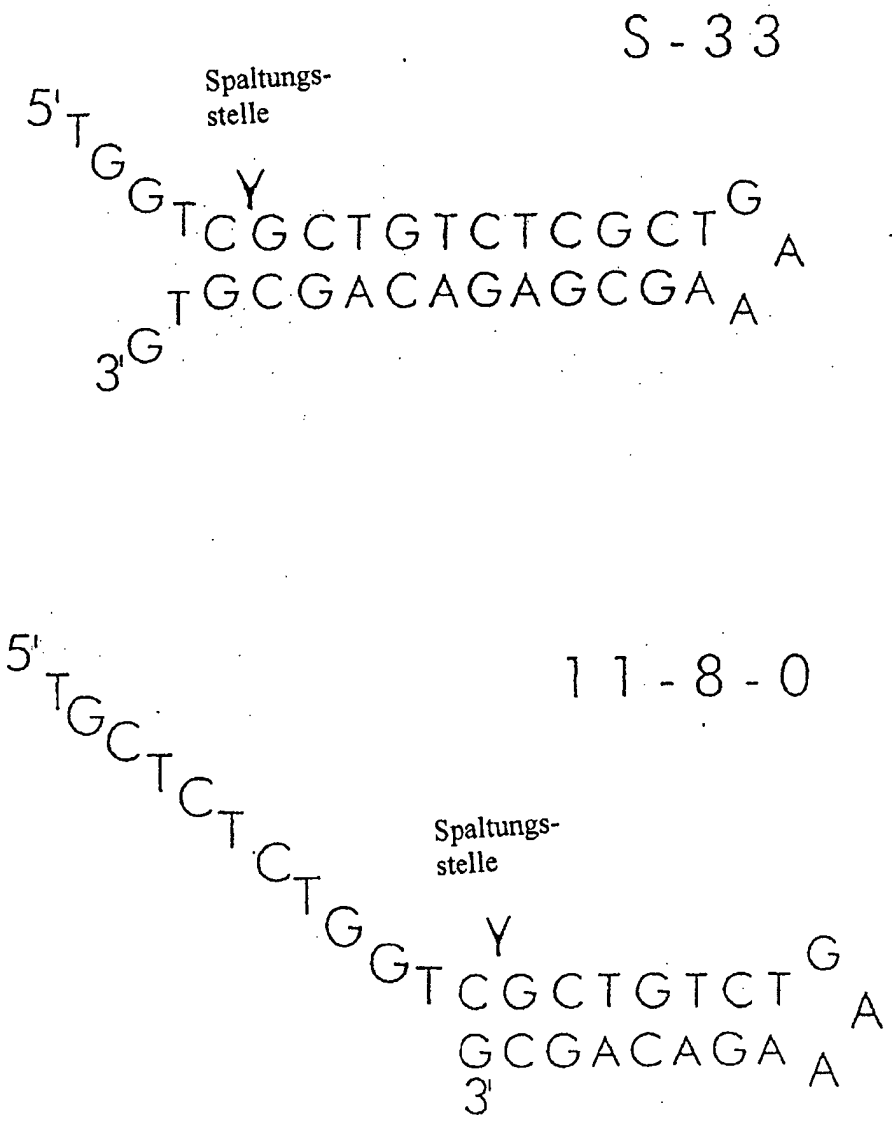
FIGUR 59D


430
440
450
460
470
480
490
MJAFEN1.PRO
PFUFEN1.PRO
HUMFEN1.PRO
MUSFEN1.PRO
YST510.PRO
YSTRAD2.PRO
SPORAD13.PRO
HUMXPG.PRO
MUSXPG.PRO
XENXPG.PRO
CELRAD2.PRO
510
520
530
540
550
560
MJAFEN1.PRO
PFUFEN1.PRO
HUMFEN1.PRO
MUSFEN1.PRO
YST510.PRO
YSTRAD2.PRO
SPORAD13.PRO
HUMXPG.PRO
MUSXPG.PRO
XENXPG.PRO
CELRAD2.PRO

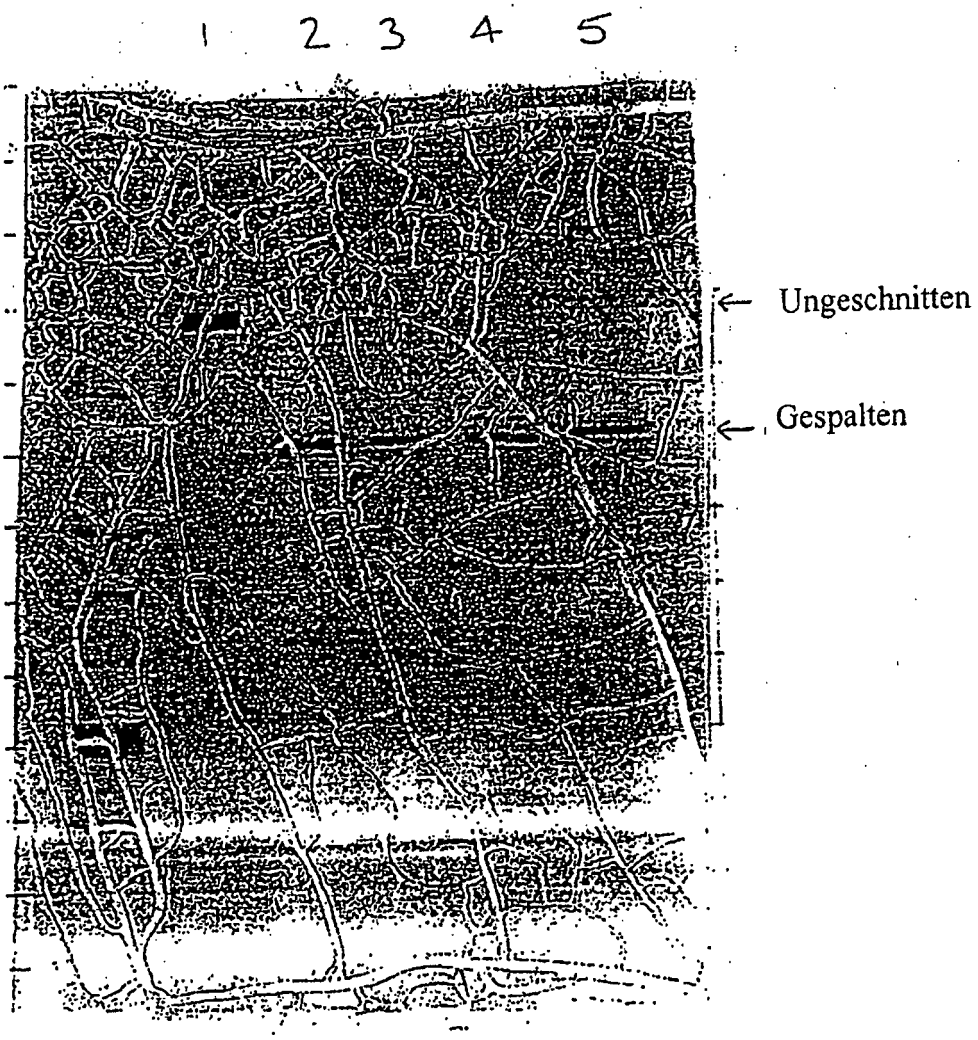
FIGUR 59E

MJAFEN1.PRO
PFUFEN1.PRO
HUMFEN1.PRO
MUSFEN1.PRO
YST510.PRO
YSTRAD2.PRO
SPORAD13.PRO
HUMXPG.PRO
MUSXPG.PRO
XENXPG.PRO
CELRAD2.PRO

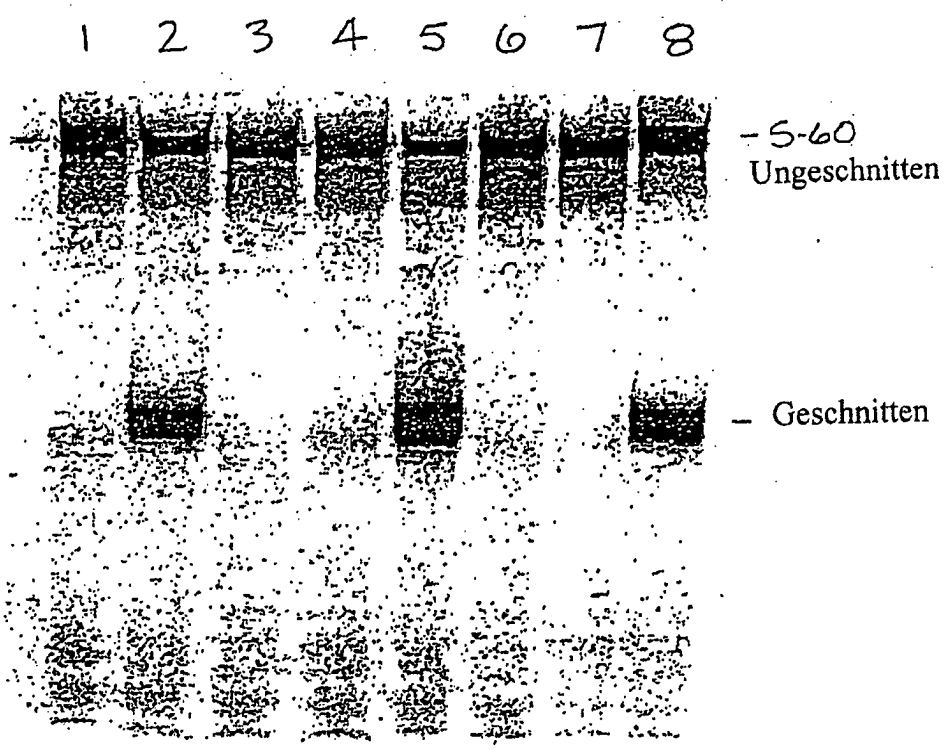
FIGUR 60


S-33
Spaltungs-
stelle
5'
TGGTCGCTGTCTCGCTG
Y
A
TGCGACAGAGCGA
A
3'G
T
11-8-0
5'
TGCTCTCTGGTCGCTGTCTG
Y
A
GCGACAGA
A
3'
Spaltungs-
stelle

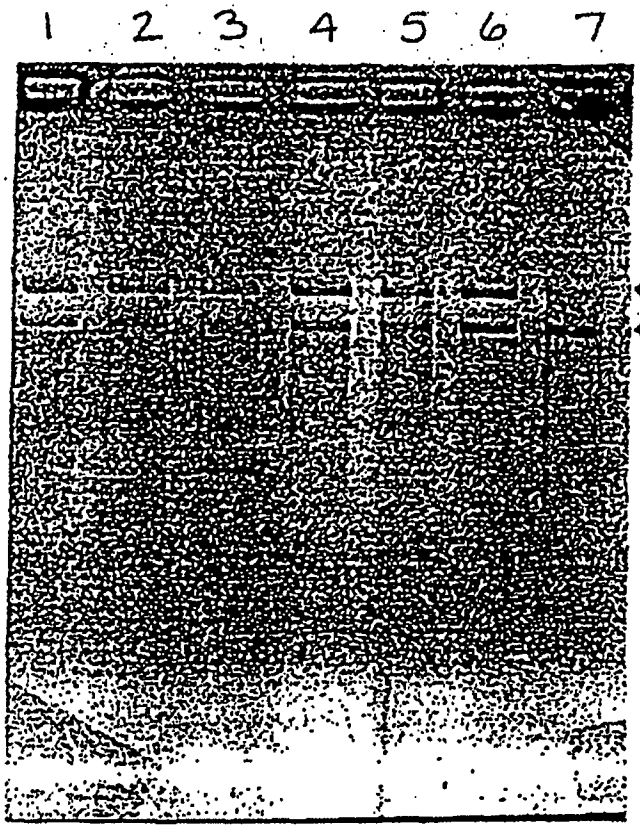
FIGUR 61

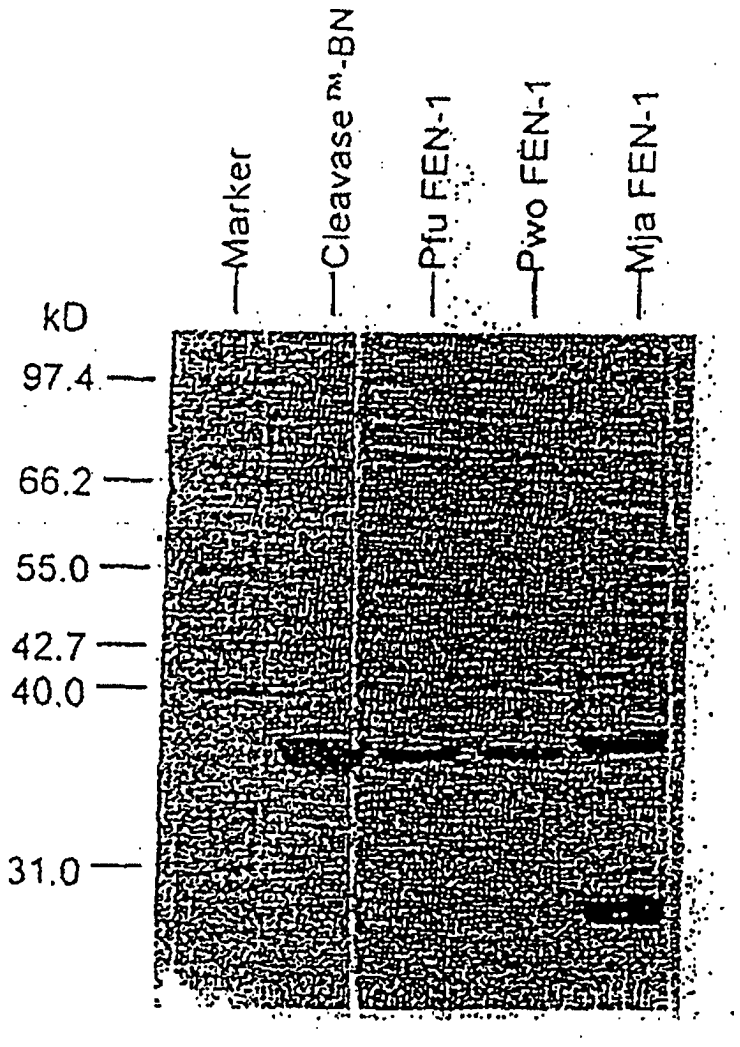


FIGUR 62

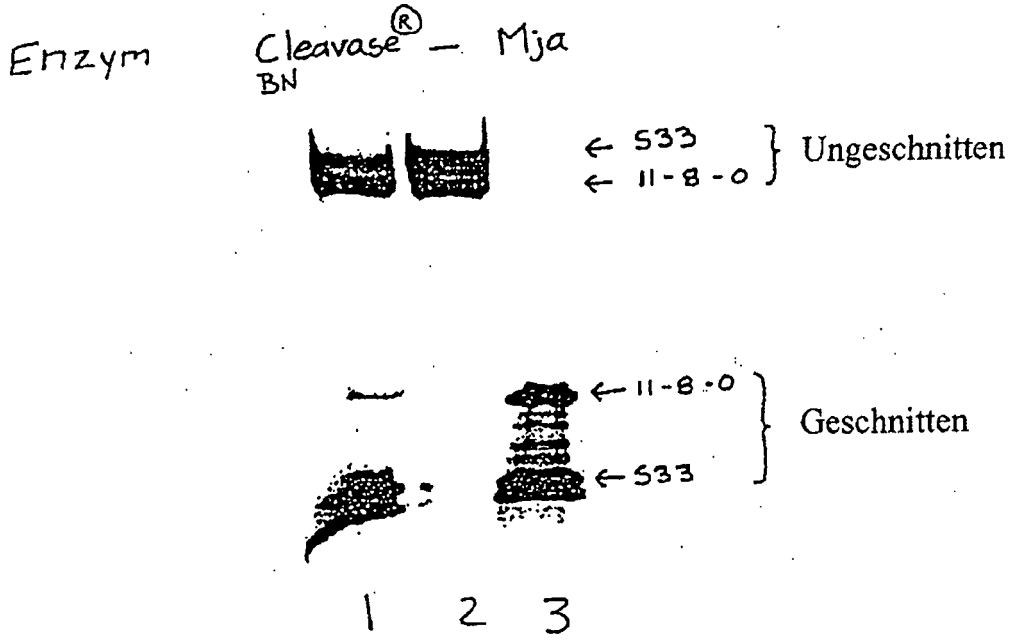


FIGUR 63

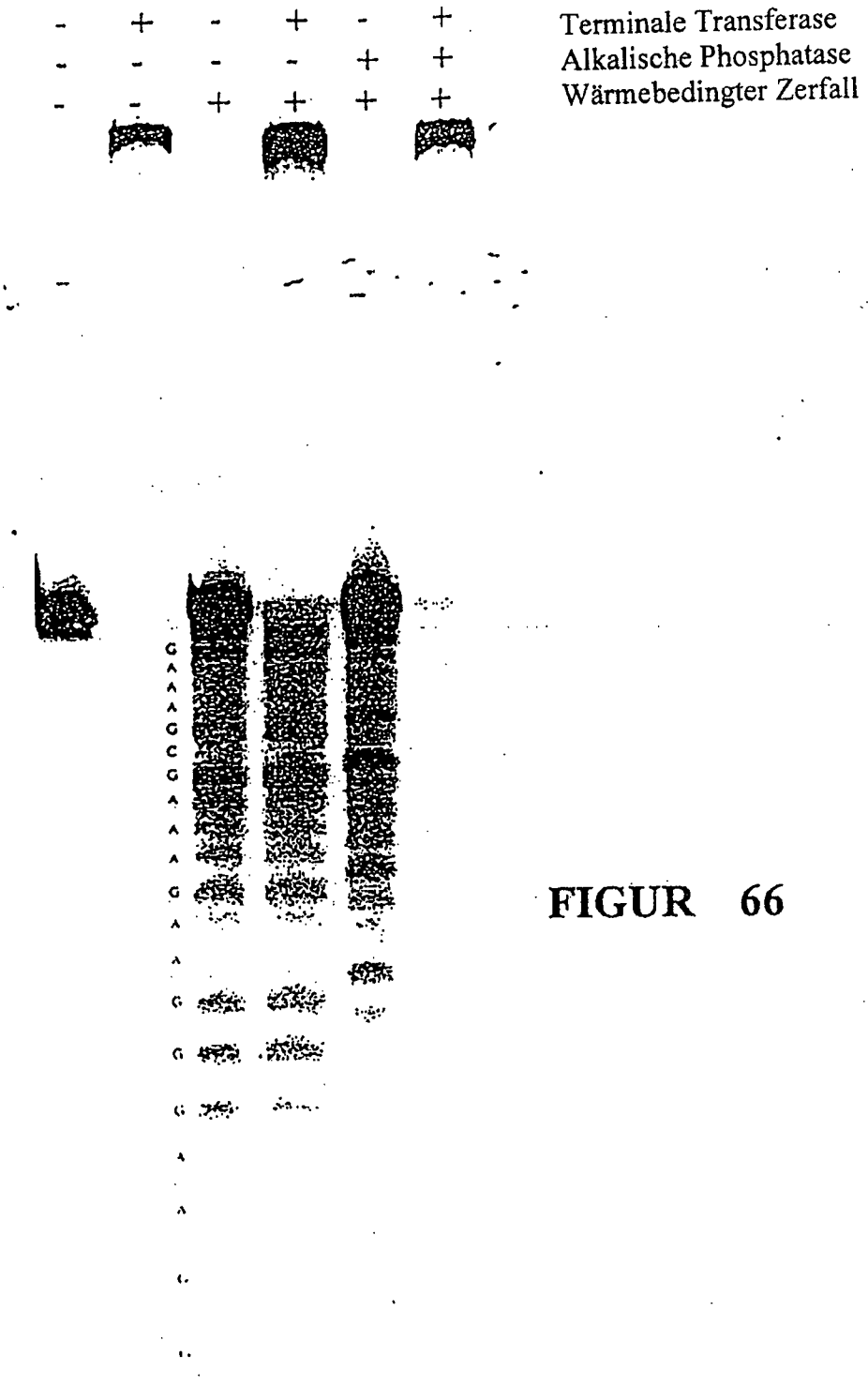



Marker
Cleavase™-BN
Pfu FEN-1
Pwo FEN-1
Mja FEN-1
kD
97.4
66.2
55.0
42.7
40.0
31.0

FIGUR 64

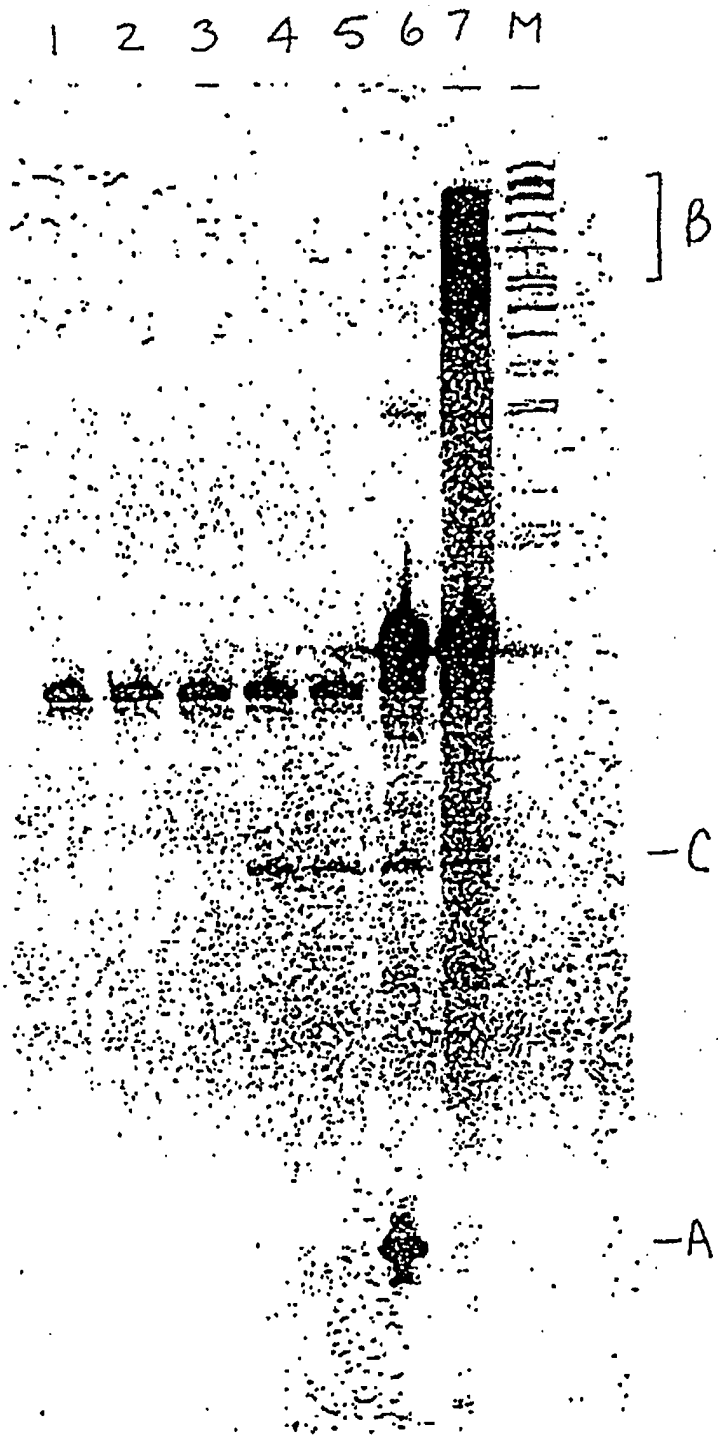

Enzym
Cleavase® BN — Mja
← 533
← 11-8-0
Ungeschnitten
← 11-8-0
← 533
Geschnitten
1 2 3

FIGUR 65



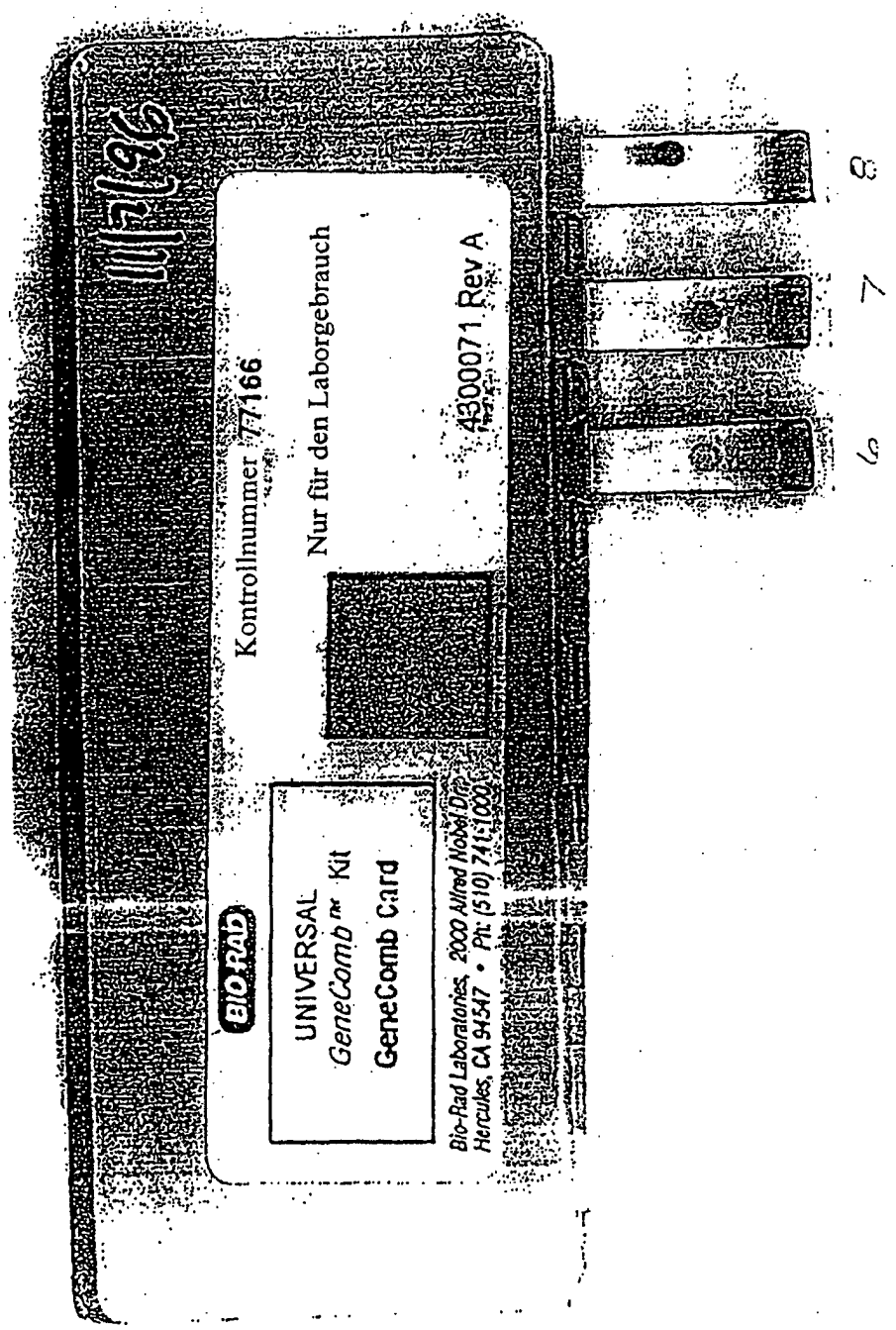
FIGUR 66

5'-nAGAAAggaaggga agaaagcgaaagG-3'

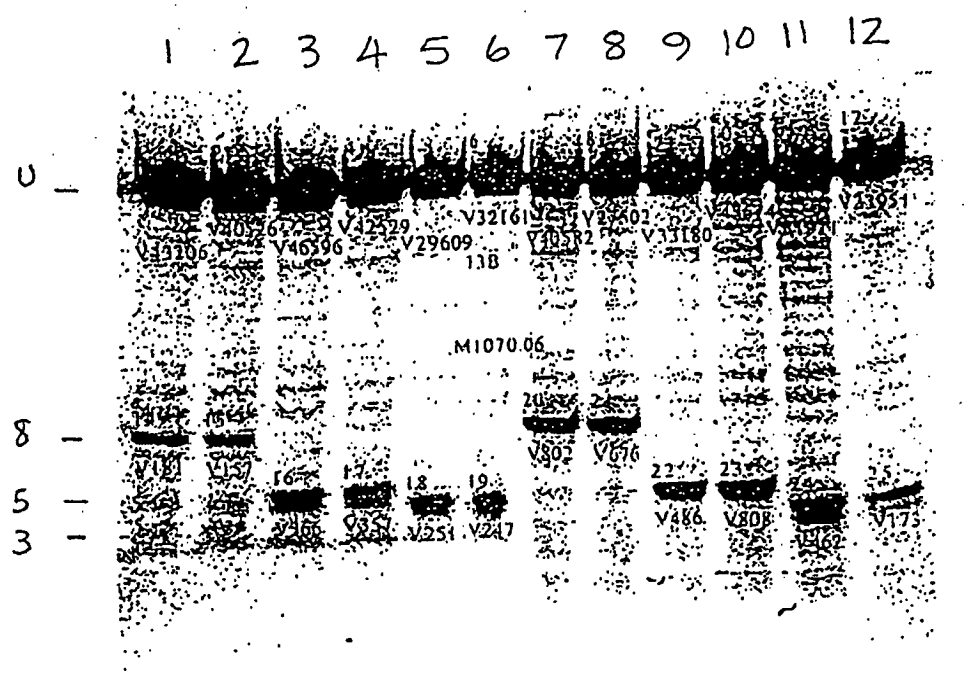


FIGUR 67

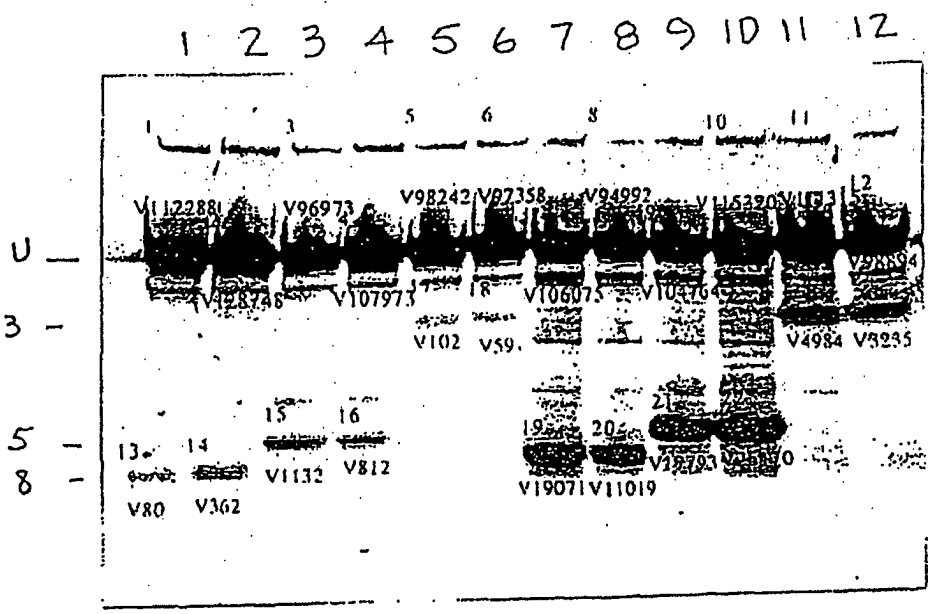
FIGUR 68


Kontrollnummer 77166
Nur für den Laborgebrauch
43000071 Rev A
BIO-RAD
UNIVERSAL
GeneComb™ Kit
GeneComb Card
Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr.
Hercules, CA 94547 • Ph: (510) 741-1000

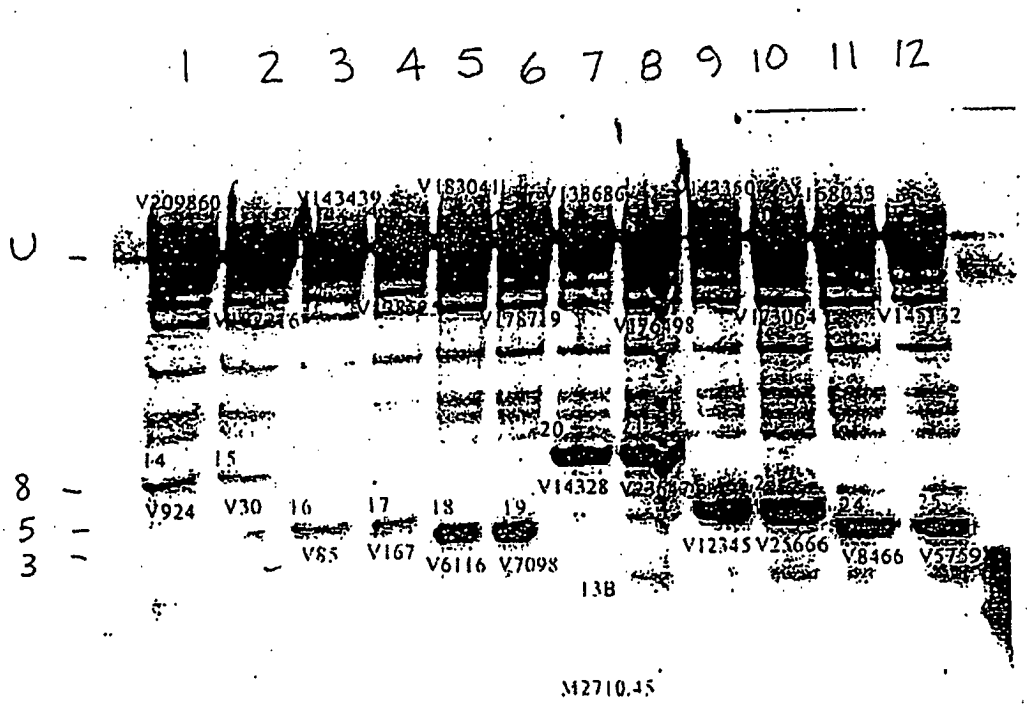
FIGUR 69

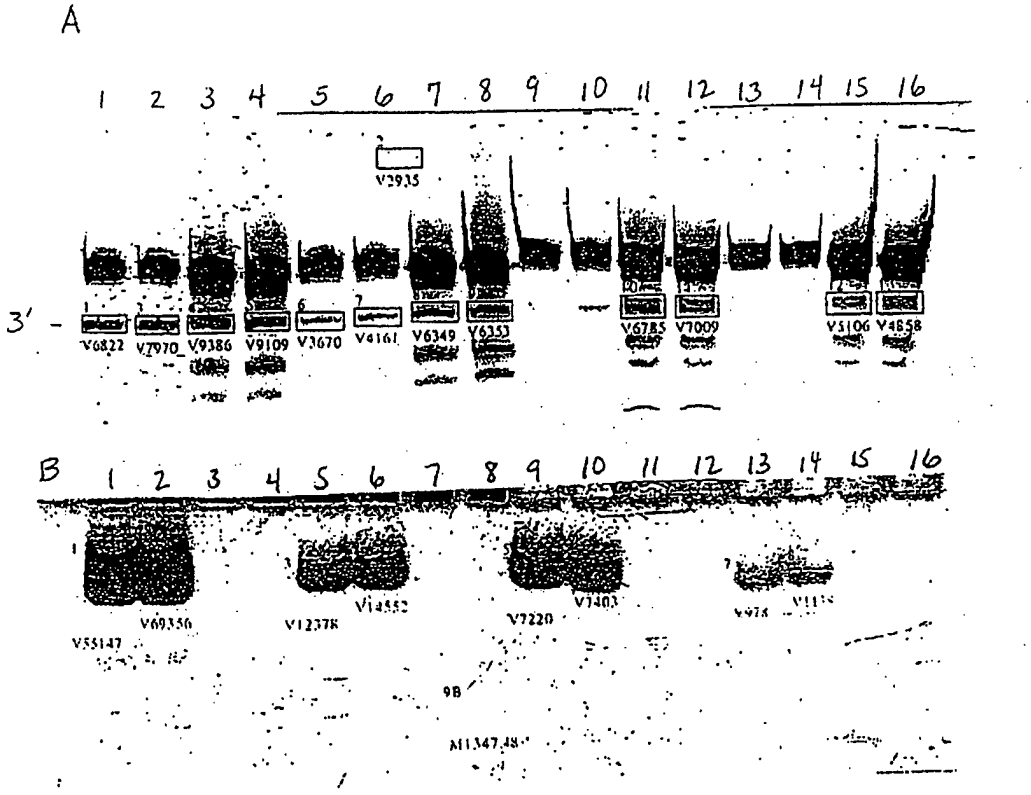


FIGUR 70


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
U
3
5
8
V112288
V96973
V98242
V87358
V94992
V128746
V107973
V102
V59
V106075
V4984
V3235
V80
V362
V1132
V812
V19071
V11019

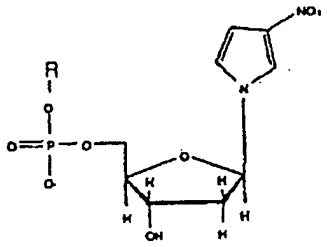
FIGUR 71


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
U
8
5
3
V209860
V143439
V18304
V13868
V78719
V176198
V14328
V924
V30
16
17
18
19
V85
V167
V6116
V7098
V12345
V25666
V8466
V57592
20
24
25
13B
M2710.45

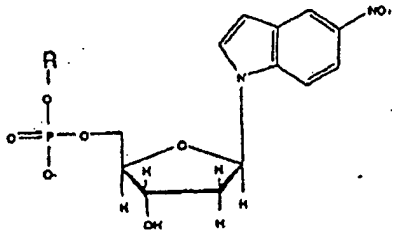

A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
V2935
3'
V6822
V7970
V9386
V9109
V3670
V4161
V6349
V6353
V6785
V7009
V5106
V4858
B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
V69356
V55147
V12378
V14552
V7220
V7403
9B

FIGUR 72

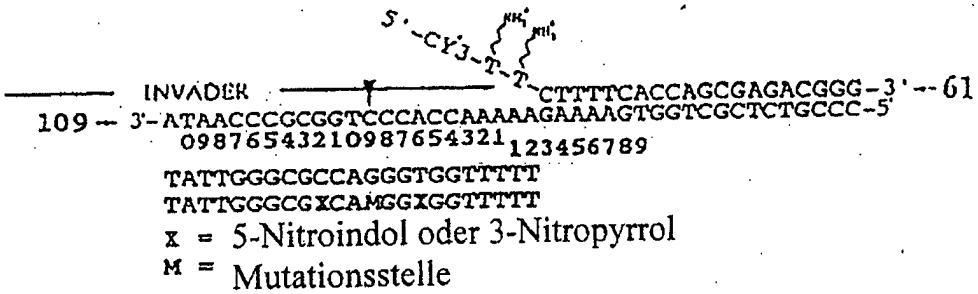
FIGUR 73



3-Nitropyrrol



5-Nitroindol

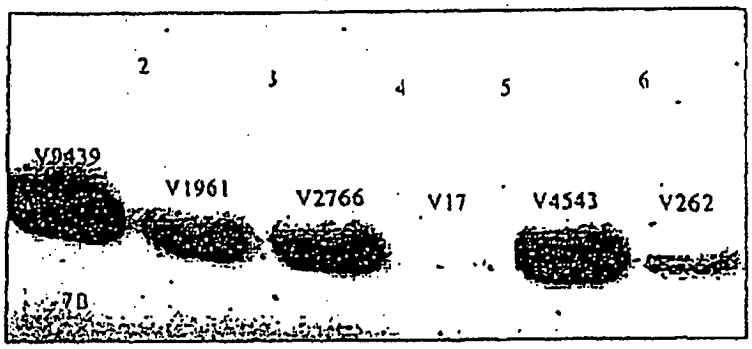

5'-CYJ-T-T-
INVADER
CTTTTCACCAGCGAGACGGG-3'--61
109-- 3'-ATAACCCGCGGTCCCACCAAAAAGAAAAGTGGTCGCTCTGCCC-5'
09876543210987654321 123456789
TATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTT
TATTGGGCGXCAMGGXGGTTTTT
X = 5-Nitroindol oder 3-Nitropyrrol
M = Mutationsstelle

FIGUR 74

	AllComp	Basen fehlpaarung	Allcomp 2 NI	1Base Mismatch 2NI	Allcomp 1NP	1Base Mismatch 1NP
Invader #	67	114	115	116	112	113

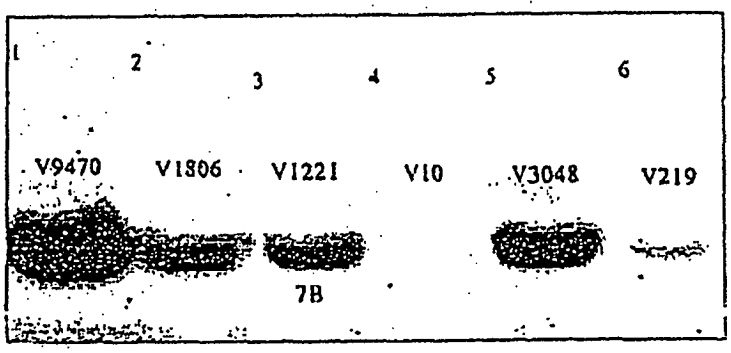
A

52°C



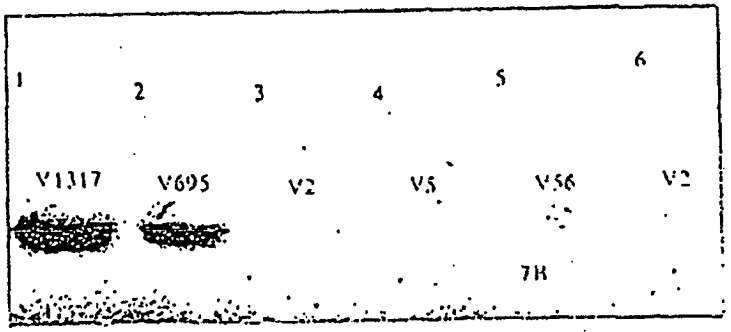
B

55°C



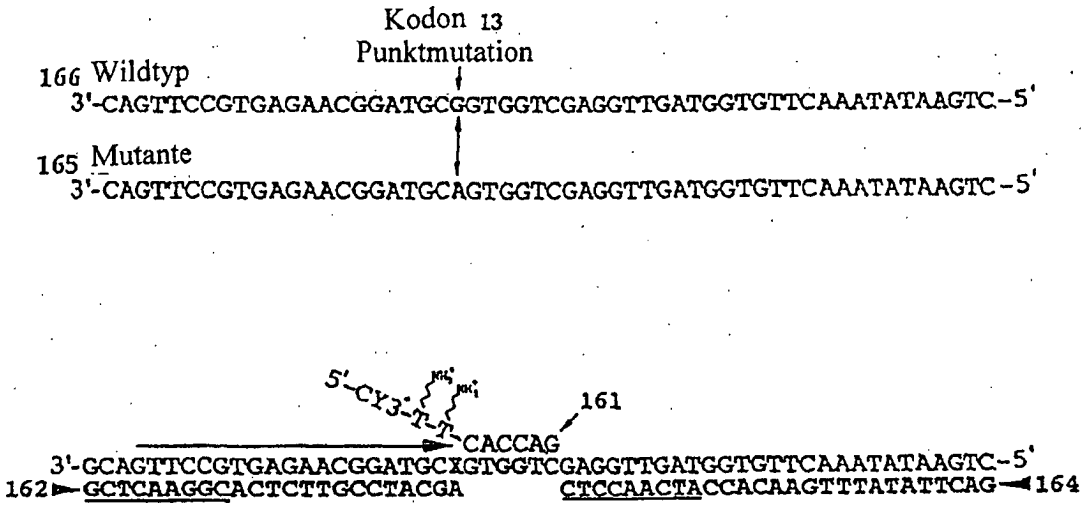
C

58°C

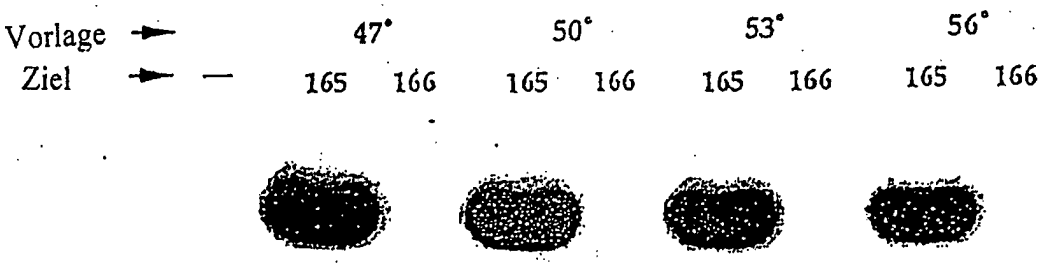


FIGUR 75

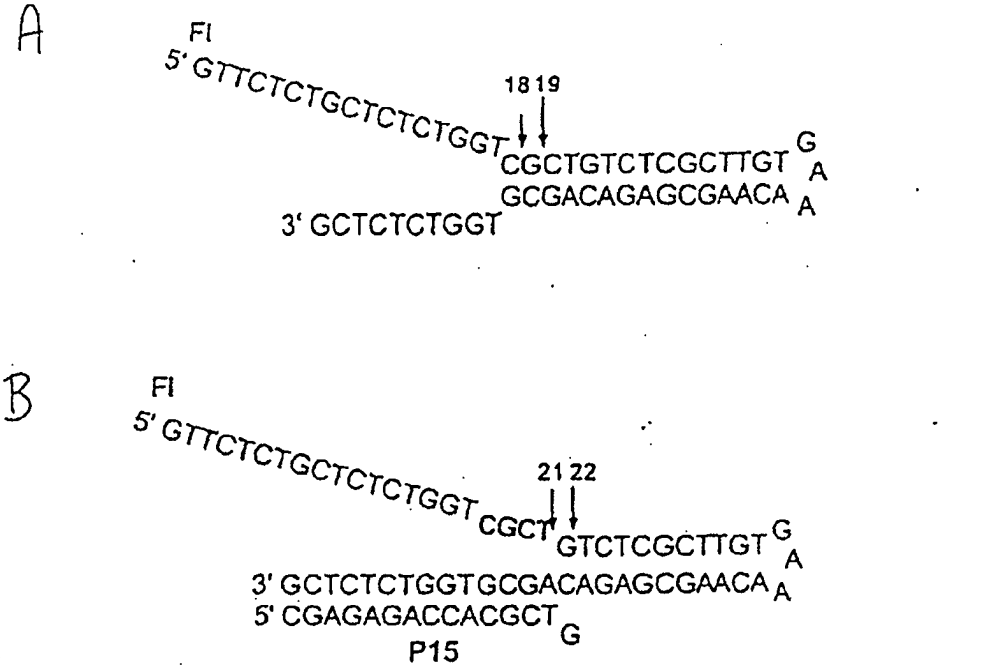
FIGUR 76


Kodon 13
Punktmutation
166 Wildtyp
3'-CAGTTCCGTGAGAACGGATGCGGTGGTCGAGGTTGATGGTGTTCAAATATAAGTC-5'
165 Mutante
3'-CAGTTCCGTGAGAACGGATGCAGTGGTCGAGGTTGATGGTGTTCAAATATAAGTC-5'
5'-CY3-
161
CACCAG
3'-GCAGTTCCGTGAGAACGGATGCXGTGGTCGAGGTTGATGGTGTTCAAATATAAGTC-5'
162
GCTCAAGGCACTCTTGCCTACGA
CTCCAACTACCACAAGTTTATATTCAG
164

FIGUR 77

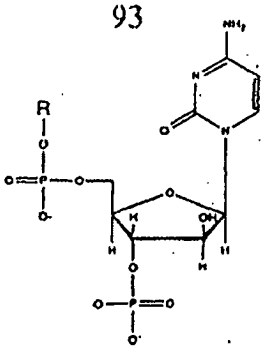


FIGUR 78


A
Fl
5' GTTCTCTGCTCTCTGGT
18 19
CGCTGTCTCGCTTGT G
A
GCGACAGAGCGAACA A
3' GCTCTCTGGT
B
Fl
5' GTTCTCTGCTCTCTGGT
21 22
CGCT GTCTCGCTTGT G
A
3' GCTCTCTGGT GCGACAGAGCGAACA A
5' CGAGAGACCACGCT G
P15
C
—
P14d
P14dp
P15
P15p
invader
22
21
19
18
1
2

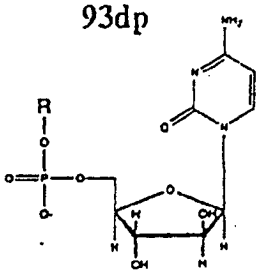
Invader-3'-End-Substituenten

93



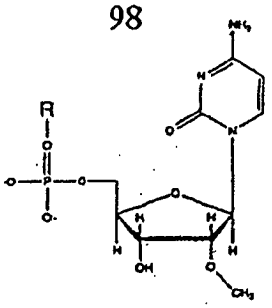
3'-Phosphat-C-Arabinose

93dp



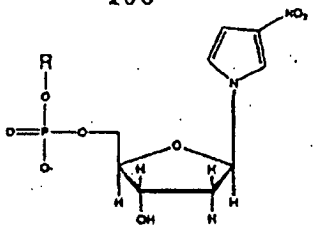
:3'-Cytosinarabinose

98



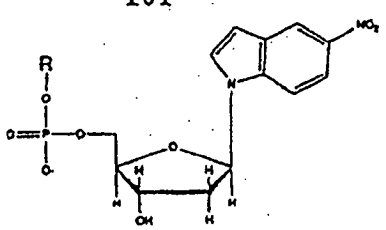
2'-O-Methylcytosin

100



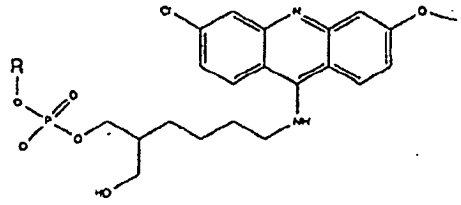
3-Nitropyrrol

101



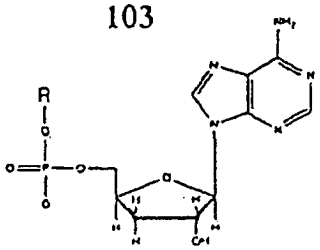
5-Nitroindol

102



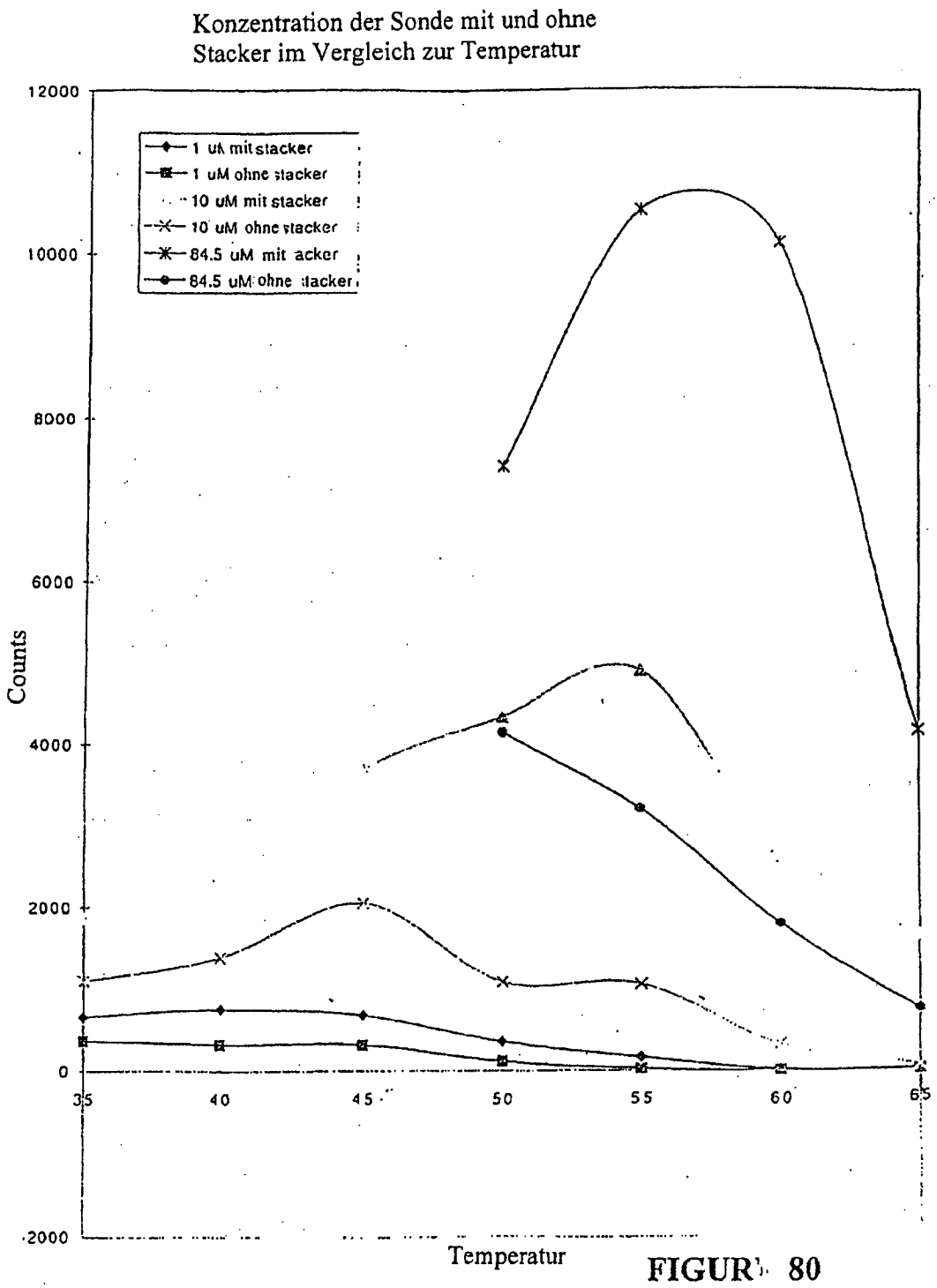
Acridin

103



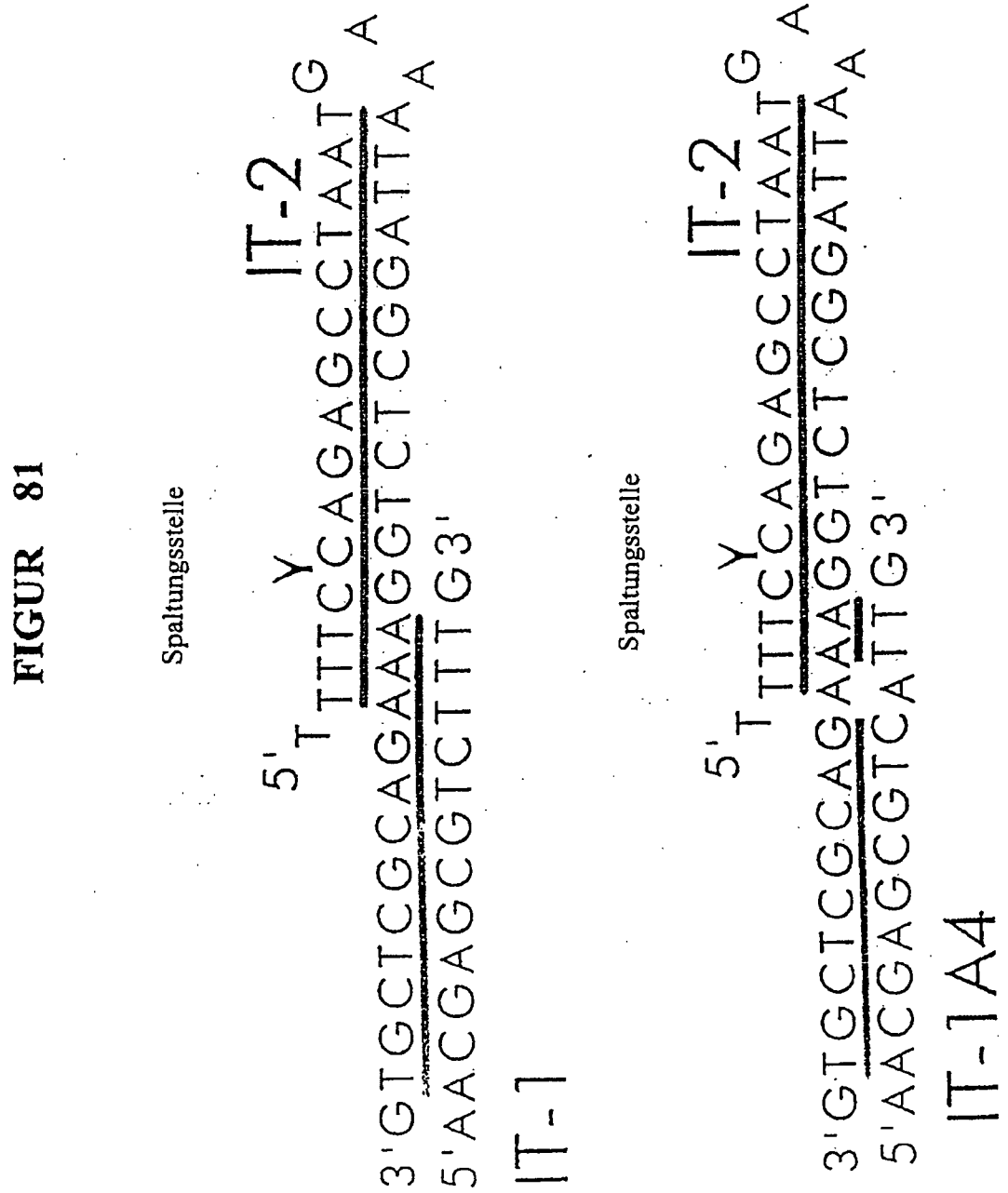
3'-Desoxyadenine

FIGUR 79

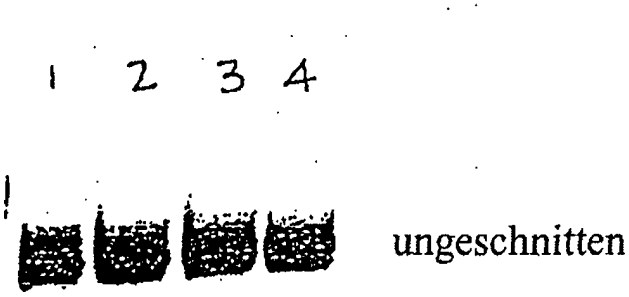

Konzentration der Sonde mit und ohne Stacker im Vergleich zur Temperatur
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
Counts
1 uM mit stacker
1 uM ohne stacker
10 uM mit stacker
10 uM ohne stacker
84.5 uM mit acker
84.5 uM ohne stacker
35
40
45
50
55
60
65
Temperatur

FIGUR 80

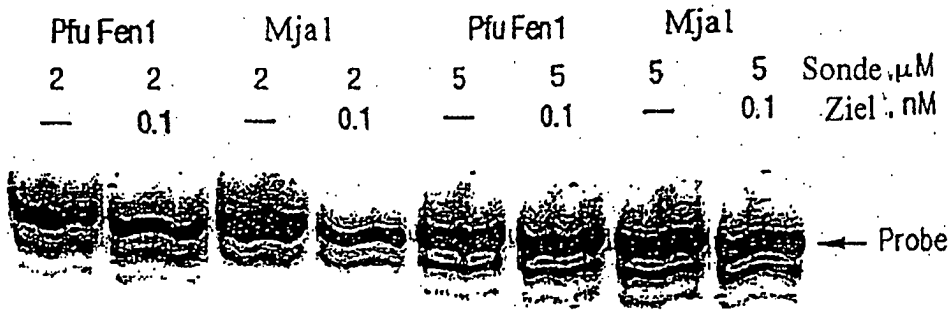
FIGUR 81

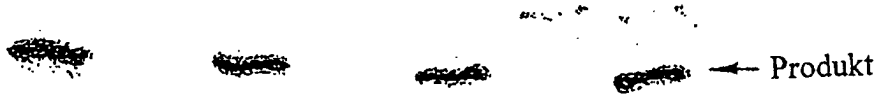

Spaltungsstelle
5'
Y
IT-2
3'GTGCTCGGCAGAAAGGTCTCGGATTA
5'AACGAGCCGTCTTTTG3'
IT-1
Spaltungsstelle
5'
Y
IT-2
3'GTGCTCGGCAGAAAGGTCTCGGATTA
5'AACGAGCCGTCATTG3'
IT-1A4

FIGUR 82



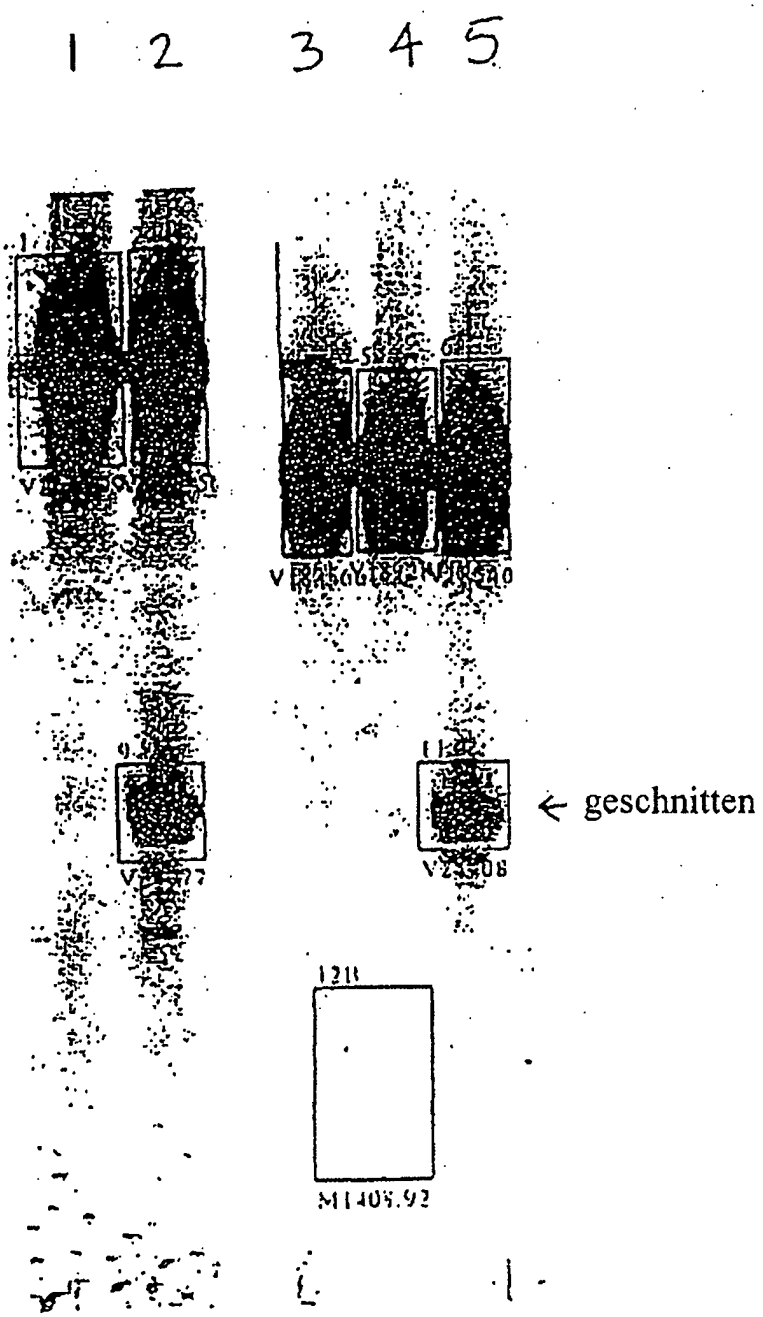
FIGUR 83



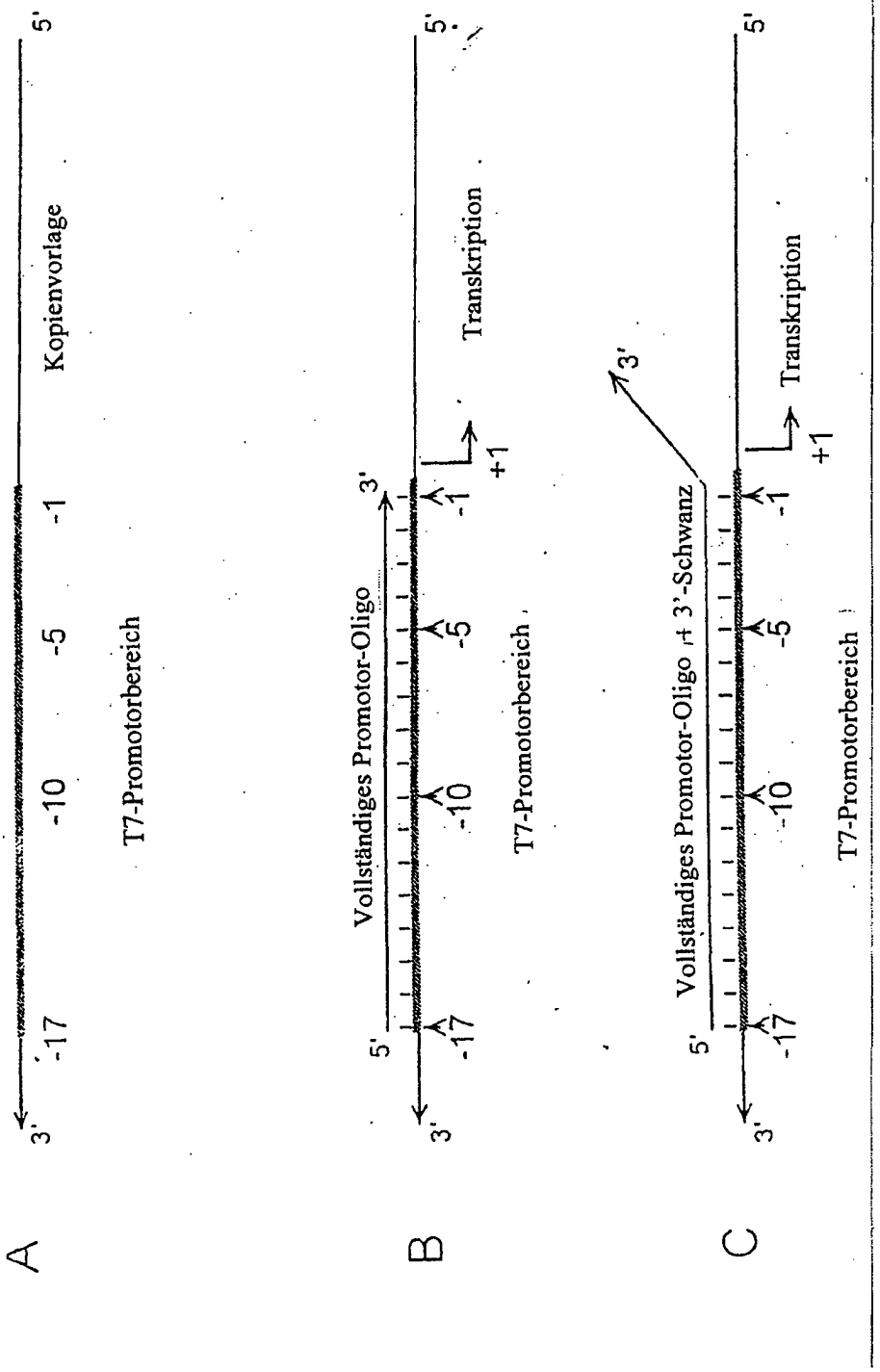


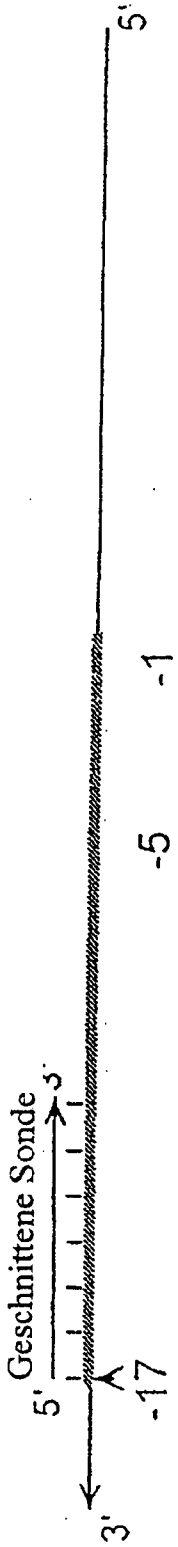
35 58 49 67 Umsetzungsrate je Zielstrang, 1/Min.

FIGUR 84

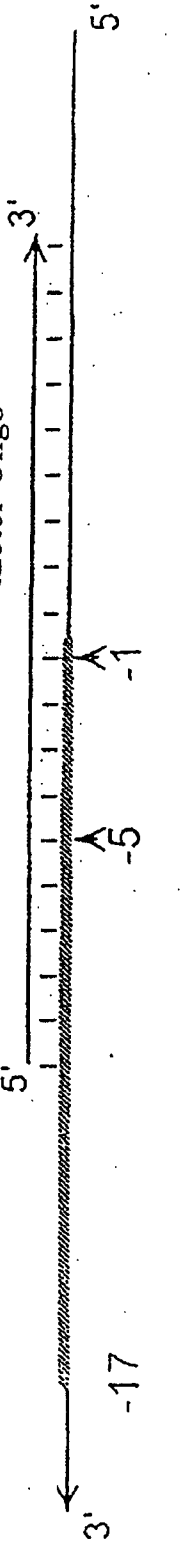


FIGUR 85


A
5'
3'
-17
-10
-5
-1
Kopienvorlage
T7-Promotorbereich
B
Vollständiges Promotor-Oligo
5'
3'
-17
-10
-5
-1
+1
Transkription
T7-Promotorbereich
C
3'
Vollständiges Promotor-Oligo + 3'-Schwanz
5'
3'
-17
-10
-5
-1
+1
Transkription
T7-Promotorbereich

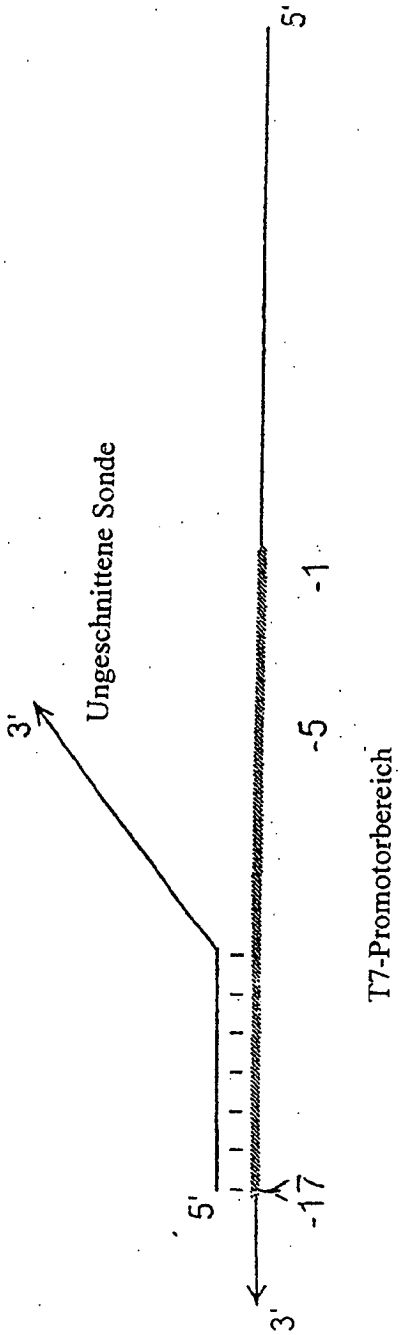


FIGUR 86A

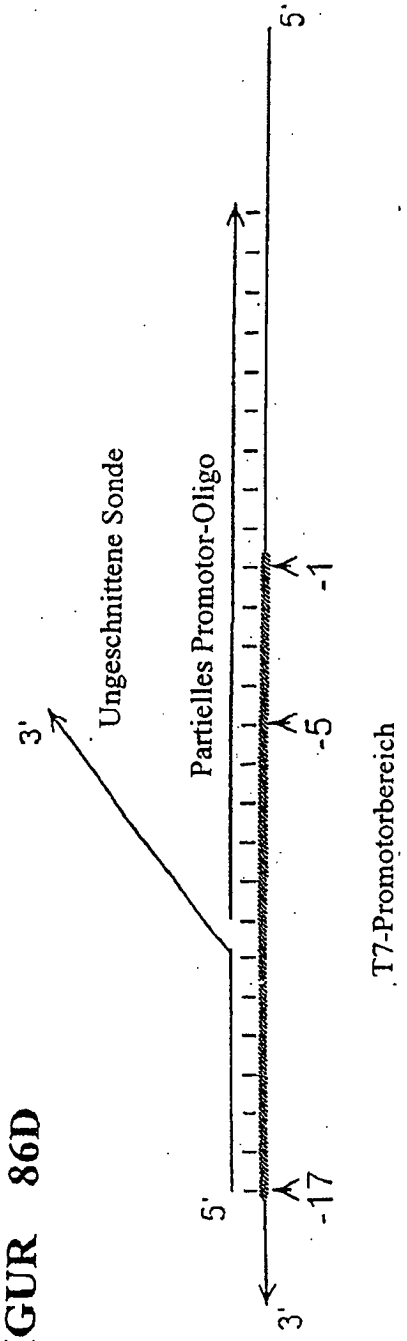


FIGUR 86B

FIGUR 86C



FIGUR 86D



FIGUR 87

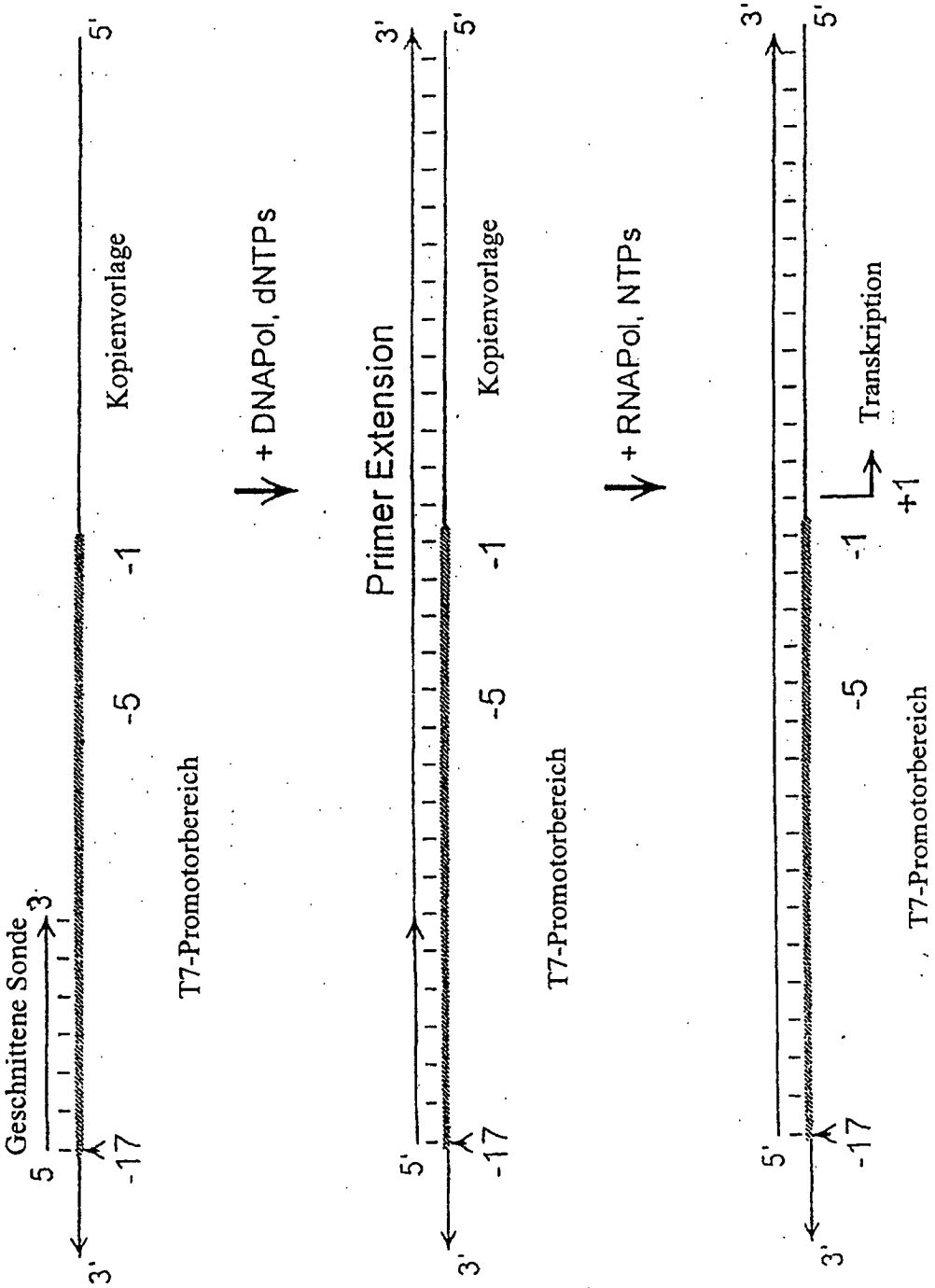

Geschnittene Sonde
5
3'
3
-17
5'
Kopienvorlage
-5
-1
T7-Promotorbereich
+ DNAPol, dNTPs
Primer Extension
3'
5'
5'
-17
3'
Kopienvorlage
-5
-1
T7-Promotorbereich
+ RNAPol, NTPs
3'
5'
5'
-17
3'
-5
-1
+1
Transkription
T7-Promotorbereich

FIGURE 88A

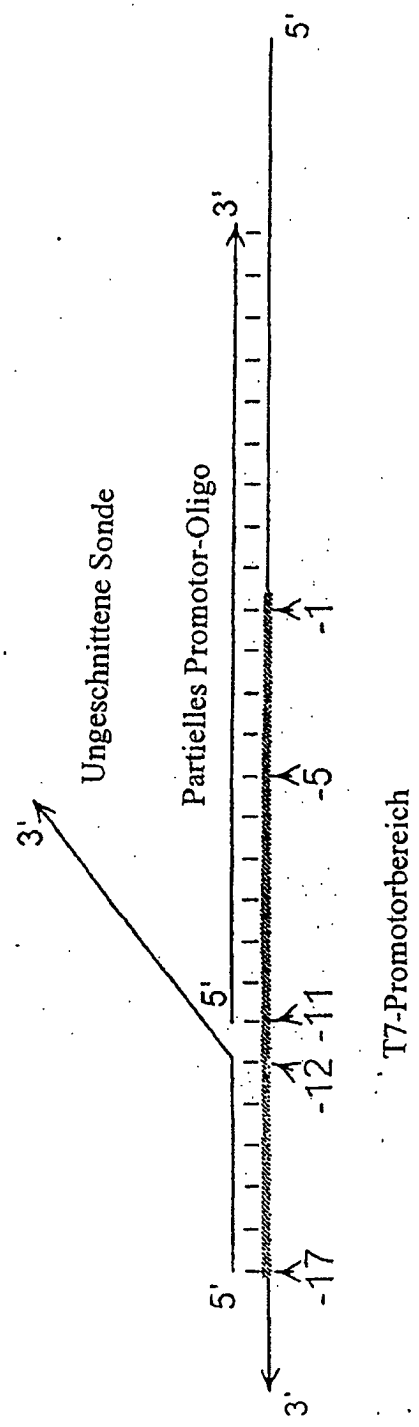
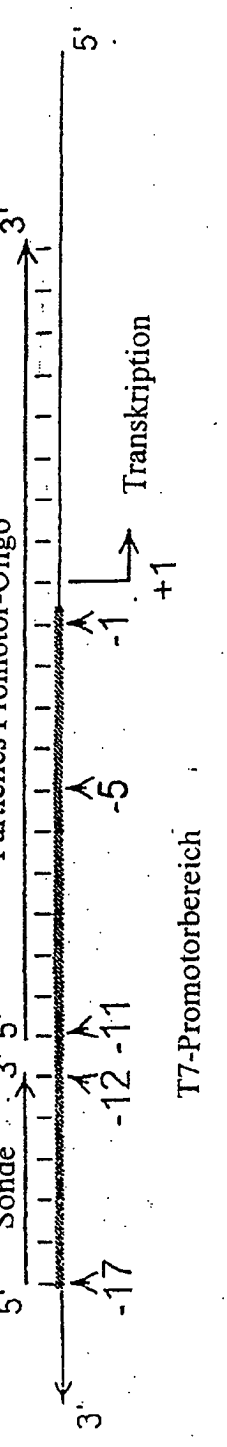
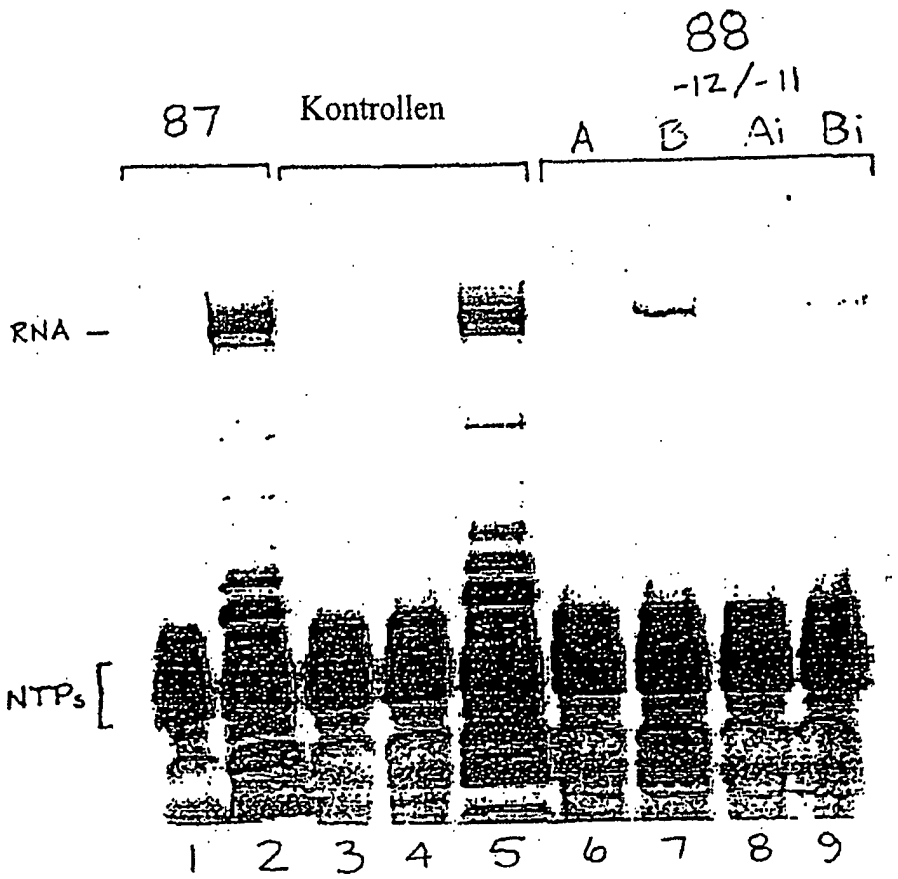


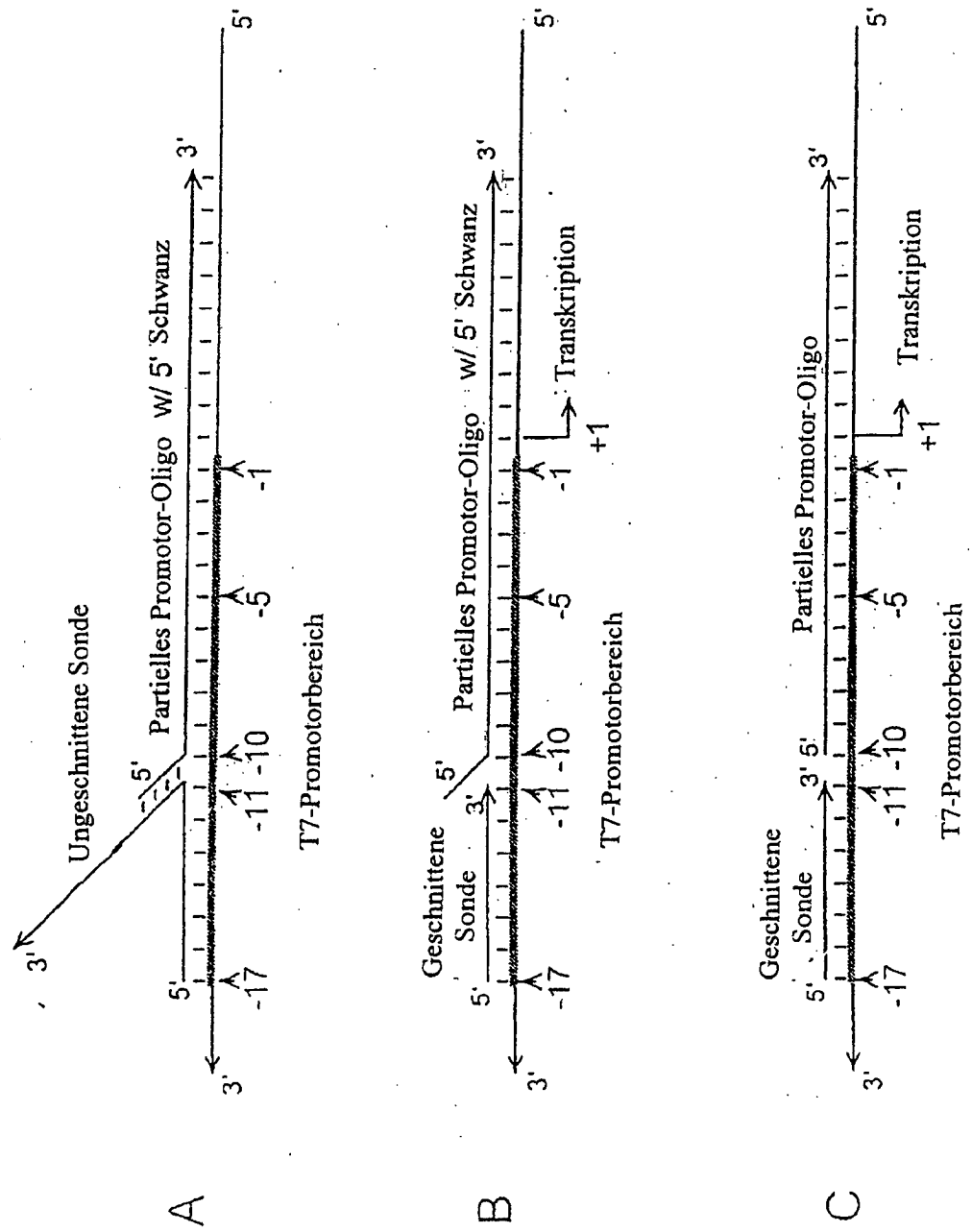
FIGURE 88B

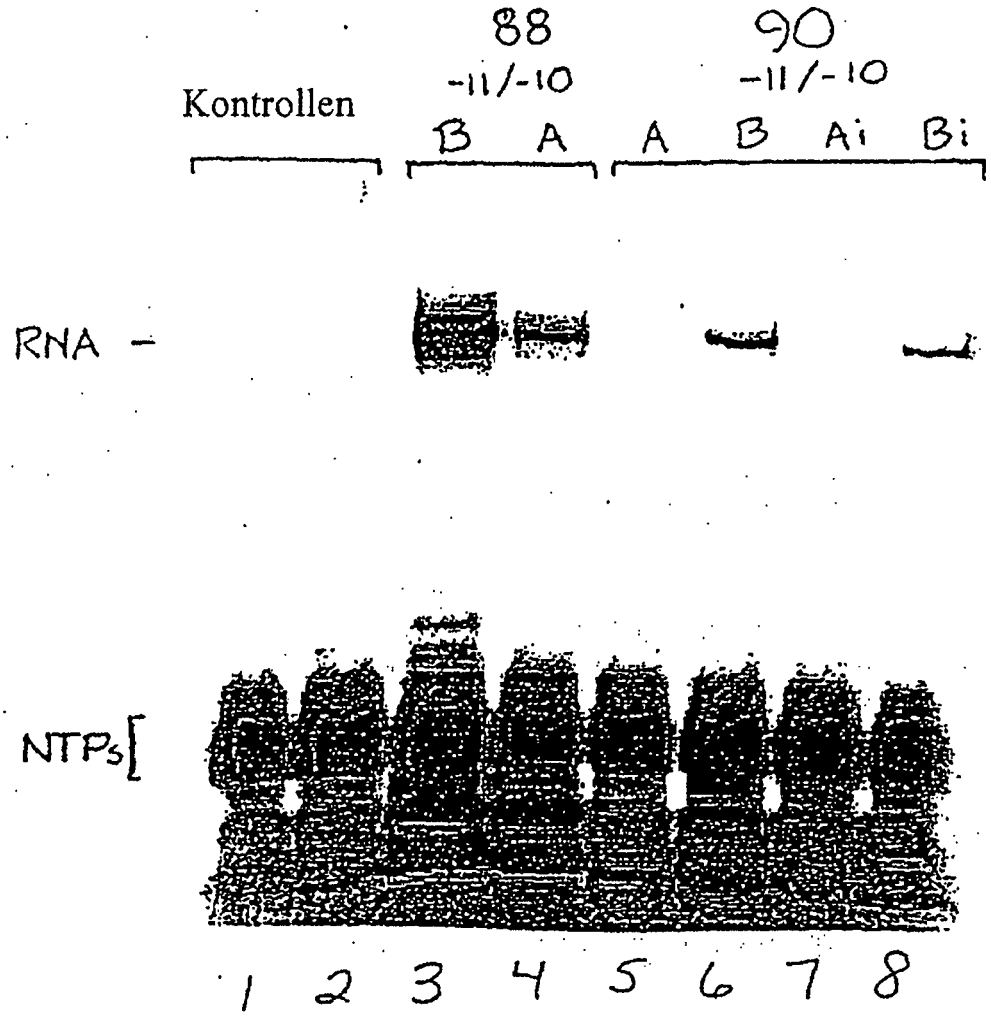


FIGUR 89



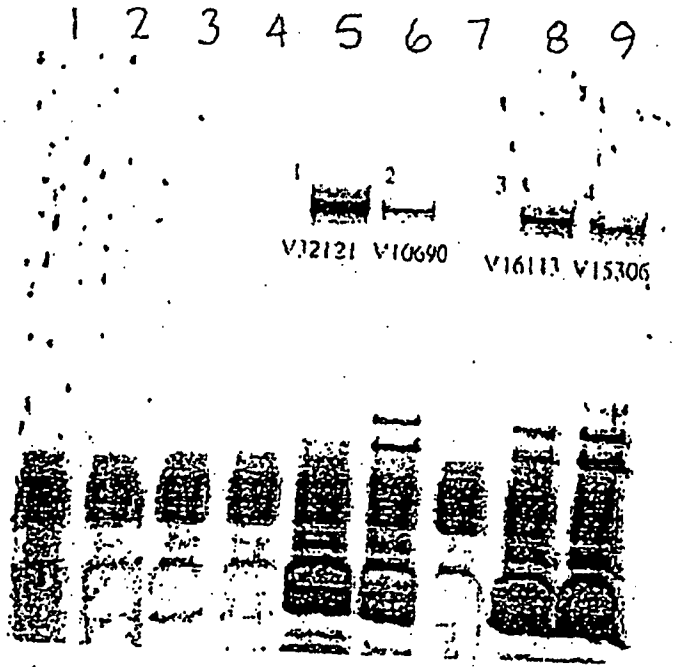
FIGUR 90


A
Ungeschnittene Sonde
3'
5'
Partielles Promotor-Oligo w/ 5' Schwanz
5'
3'
-17
-11 -10
-5
-1
T7-Promotorbereich
B
Geschnittene Sonde
5'
3'
5'
Partielles Promotor-Oligo w/ 5' Schwanz
3'
5'
3'
-17
-11 -10
-5
-1
+1
Transkription
T7-Promotorbereich
C
Geschnittene Sonde
5'
3' 5'
Partielles Promotor-Oligo
3'
5'
3'
-17
-11 -10
-5
-1
+1
Transkription
T7-Promotorbereich



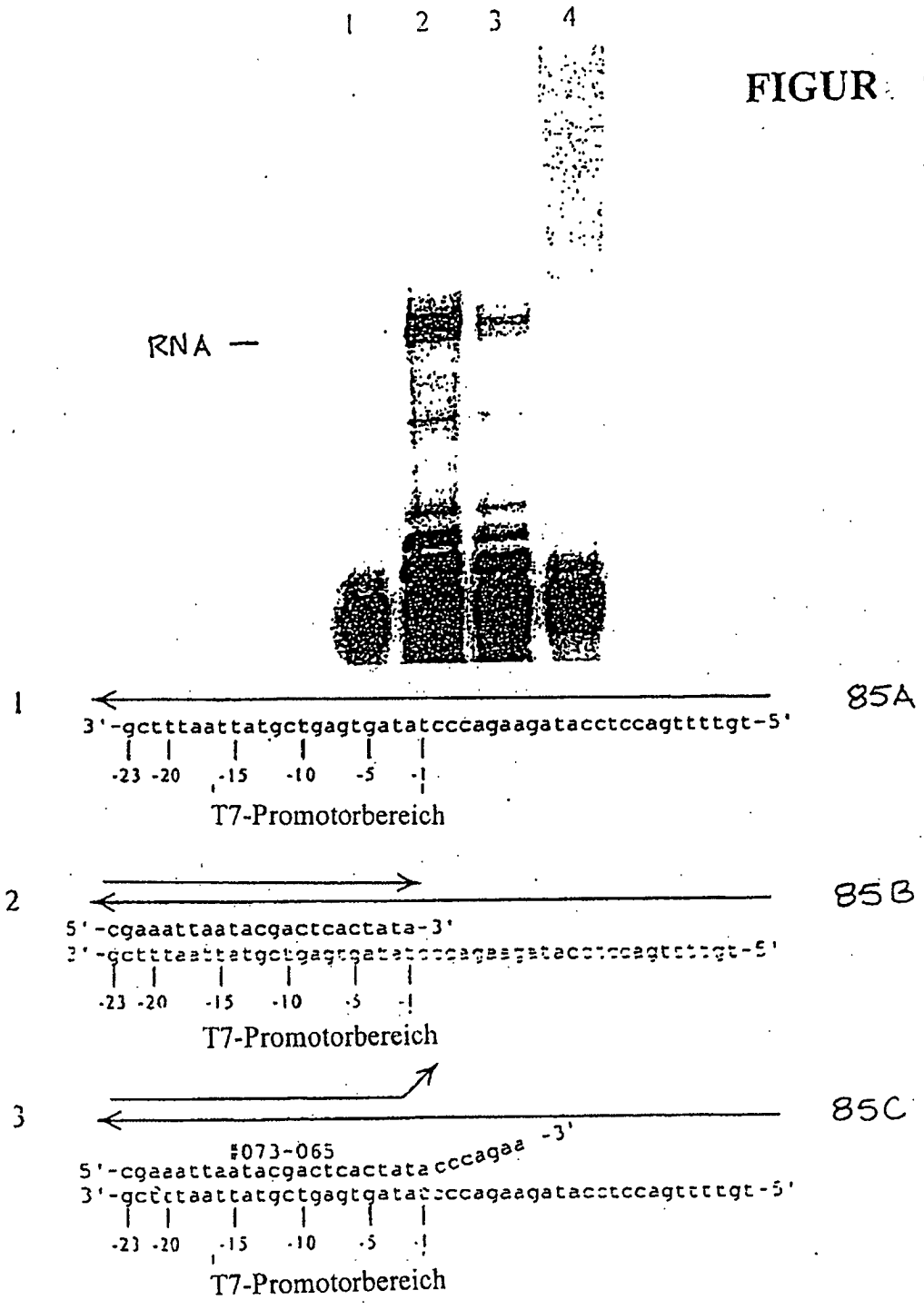
FIGUR 91

FIGUR 92

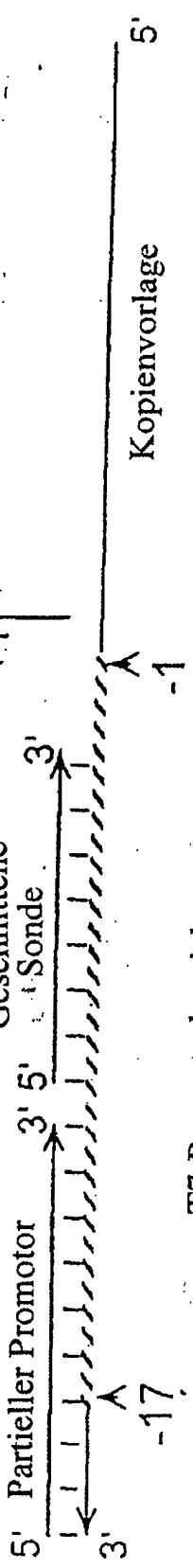


	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Struktur :		35A	86A	36B	83B	86A	86B	88B	85B
Einzelstrangbruchstelle :			-11/-10	-11/-10	-11/-10	-8/-7	-8/-7	-8/-7	

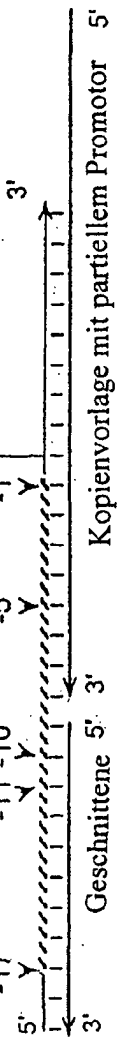
FIGUR 93


1 2 3 4
RNA
1
85A
3'-gctttaattatgctgagtgatatcccagaagatacctccagttttgt-5'
-23 -20 -15 -10 -5 -1
T7-Promotorbereich
2
85B
5'-cgaaattaatacgactcactata-3'
3'-gctttaattatgctgagtgatatcccagaagatacctccagttttgt-5'
-23 -20 -15 -10 -5 -1
T7-Promotorbereich
3
85C
#073-065
5'-cgaaattaatacgactcactata cccagaa -3'
3'-gctttaattatgctgagtgatatcccagaagatacctccagttttgt-5'
-23 -20 -15 -10 -5 -1
T7-Promotorbereich
4 Keine DNA

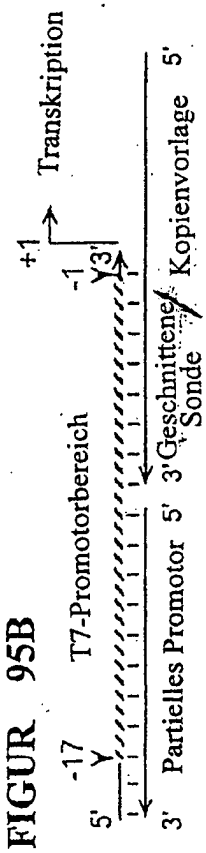
FIGUR 94


5'
Kopienvorlage
-1
+1
Transkription
3'
5'
Geschnittene Sonde
3'
5'
Partieller Promotor
-17
T7-Promotorbereich
3'

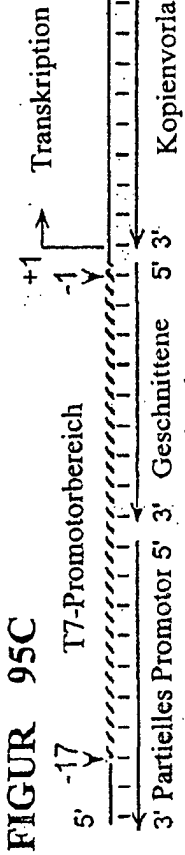
FIGUR 95A



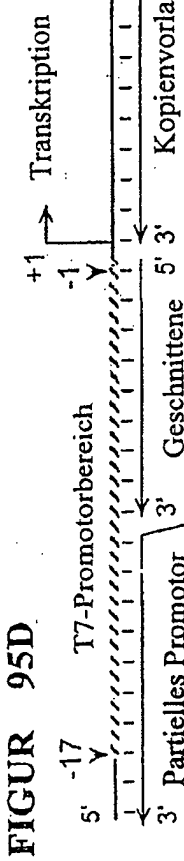
FIGUR 95B



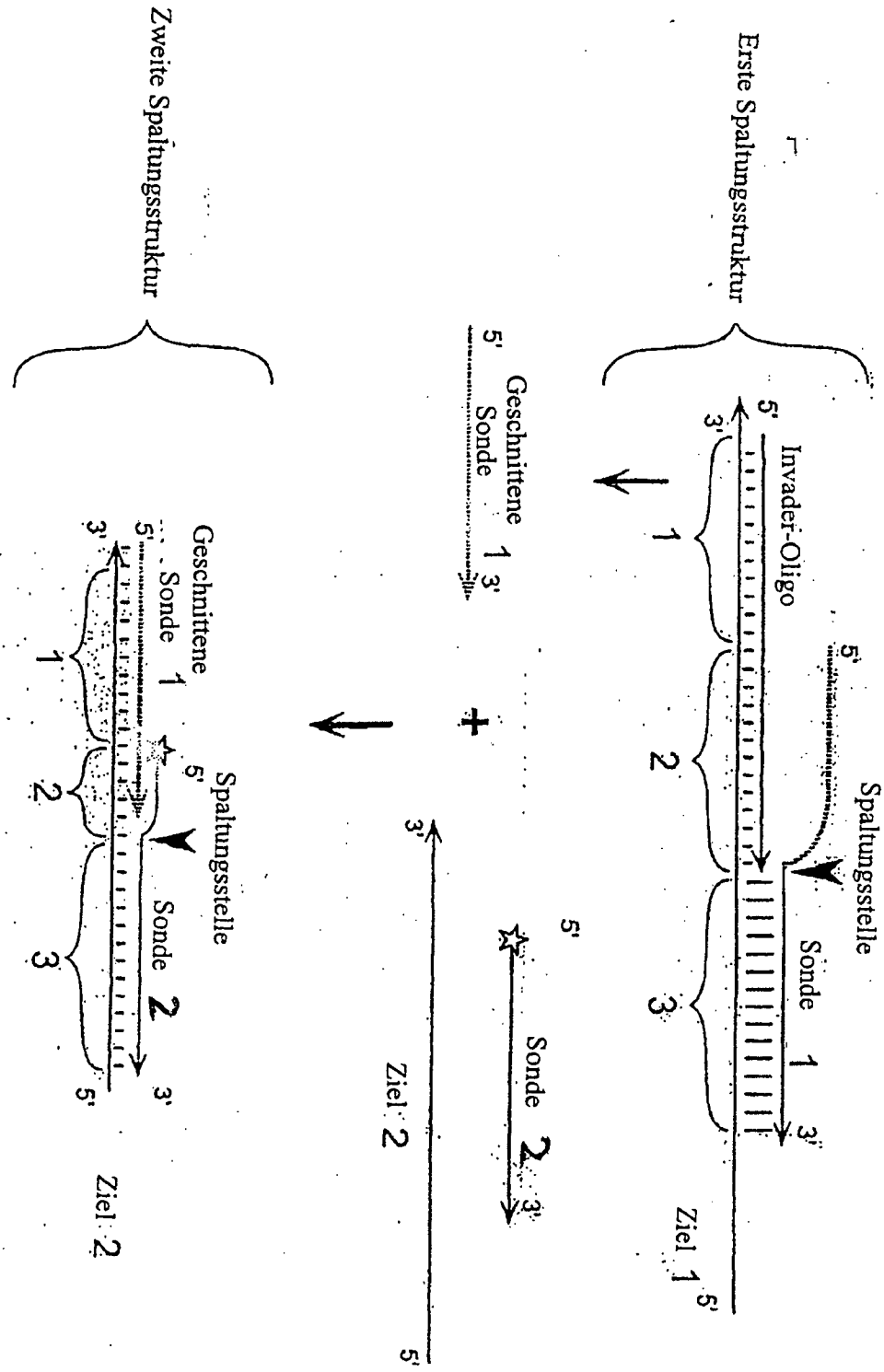
FIGUR 95C



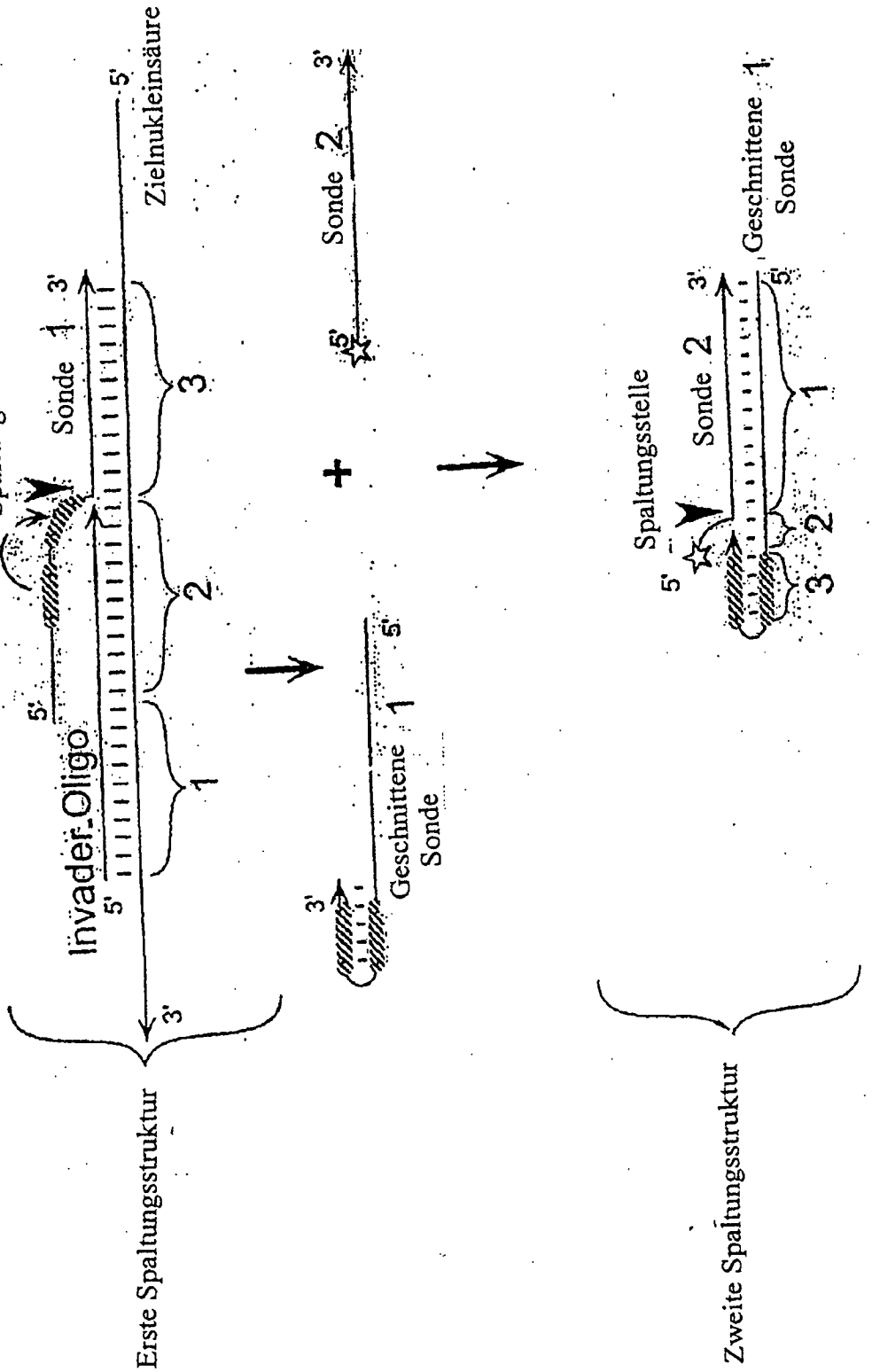
FIGUR 95D



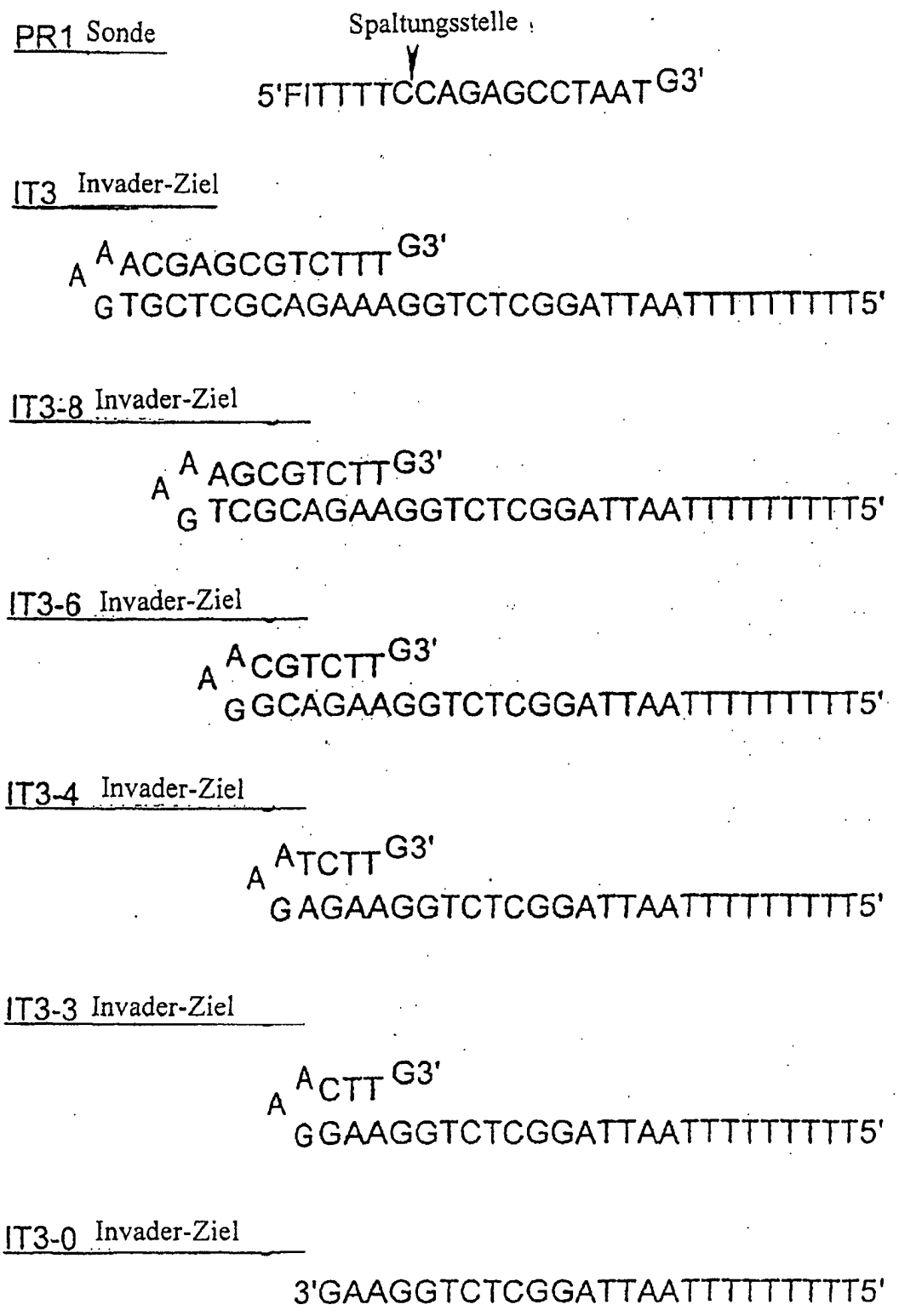
FIGUR 96


Erste Spaltungsstruktur
Invader-Oligo
Spaltungsstelle
Sonde 1
Ziel 1
Geschnittene Sonde 1
Sonde 2
Ziel 2
Zweite Spaltungsstruktur
Geschnittene Sonde 1
Spaltungsstelle
Sonde 2
Ziel 2

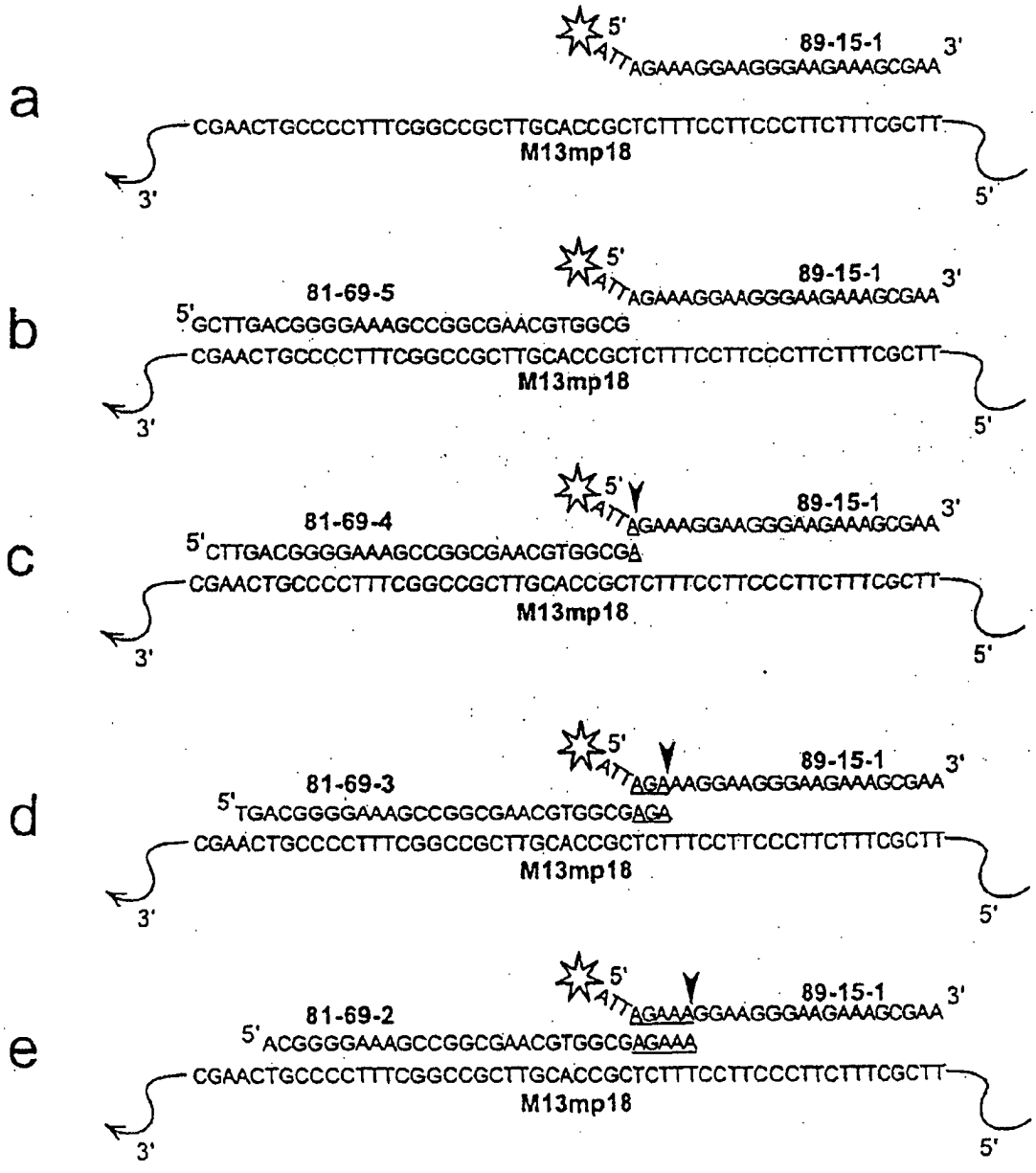
FIGUR 97


Spaltungsstelle
Sonde 1
Zielnukleinsäure
Invader-Oligo
Erste Spaltungsstruktur
Geschnittene Sonde
Sonde 2
Spaltungsstelle
Sonde 2
Geschnittene Sonde
Zweite Spaltungsstruktur

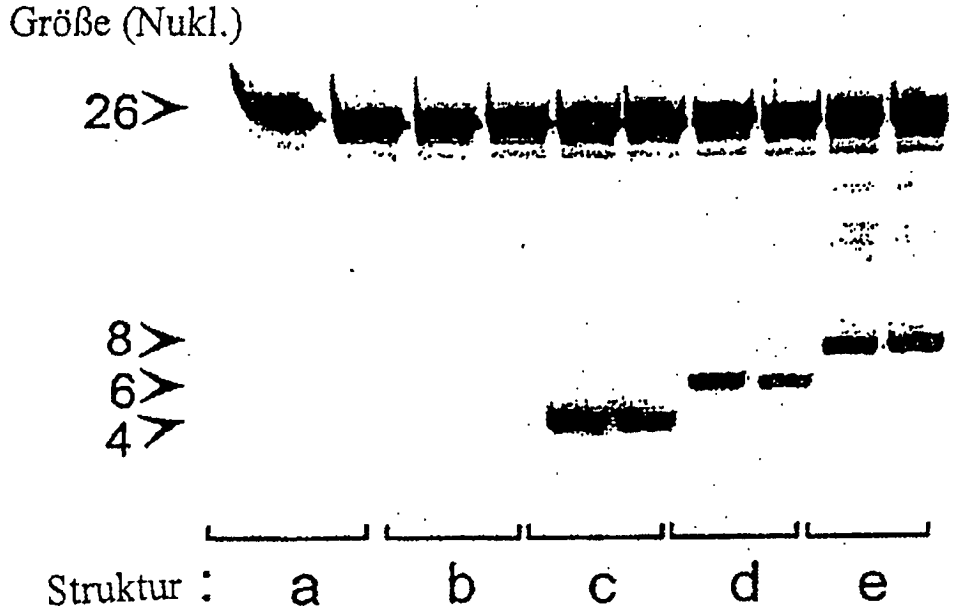
FIGUR 98


PR1 Sonde
Spaltungsstelle
5'FITTTTCCAGAGCCTAATG3'
IT3 Invader-Ziel
AAACGAGCGTCTTTG3'
GTGCTCGCAGAAAGGTCTCGGATTAATTTTTTTTT5'
IT3-8 Invader-Ziel
AAAGCGTCTTG3'
GTCGCAGAAGGTCTCGGATTAATTTTTTTTT5'
IT3-6 Invader-Ziel
AACGTCTTG3'
GGCAGAAGGTCTCGGATTAATTTTTTTTT5'
IT3-4 Invader-Ziel
AATCTTG3'
GAGAAGGTCTCGGATTAATTTTTTTTT5'
IT3-3 Invader-Ziel
AACTTG3'
GGAAGGTCTCGGATTAATTTTTTTTT5'
IT3-0 Invader-Ziel
3'GAAGGTCTCGGATTAATTTTTTTTT5'

FIGUR 99

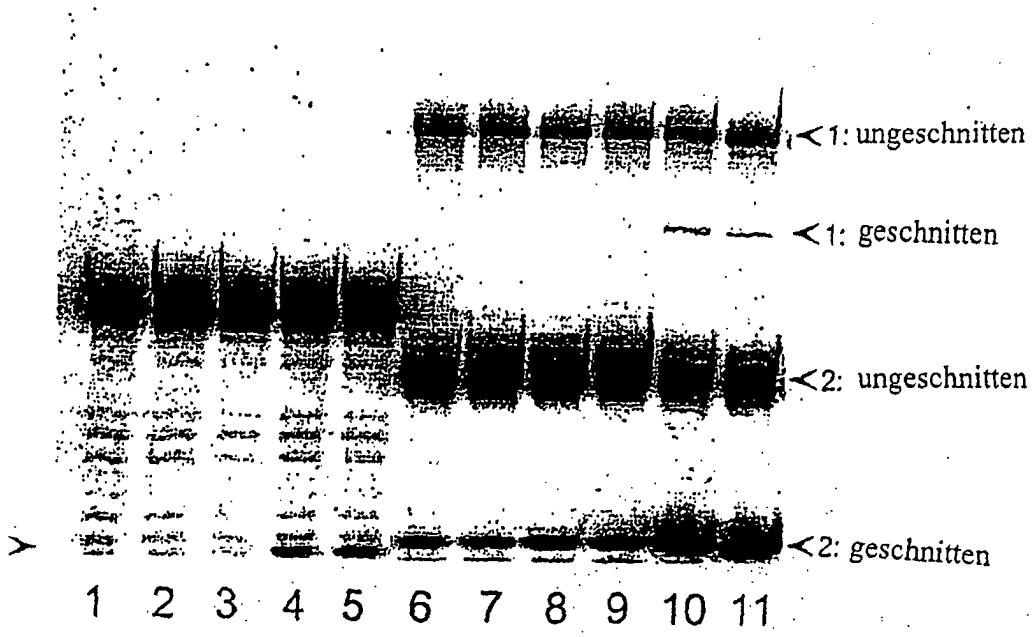

a
5'
ATTAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAA
89-15-1
3'
CGAACTGCCCCTTTCGGCCGCTTGCACCGCTCTTTCCTTCCCTTCTTTCGCTT
M13mp18
3'
5'
b
81-69-5
5'GCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCG
c
81-69-4
5'CTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGA
d
81-69-3
5'TGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGA
e
81-69-2
5'ACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAA

FIGUR 100

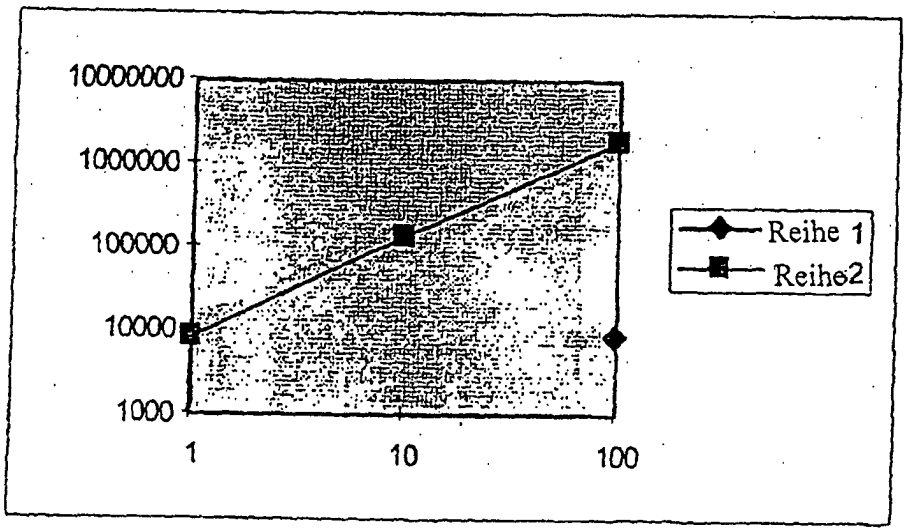


FIGUR 101

a

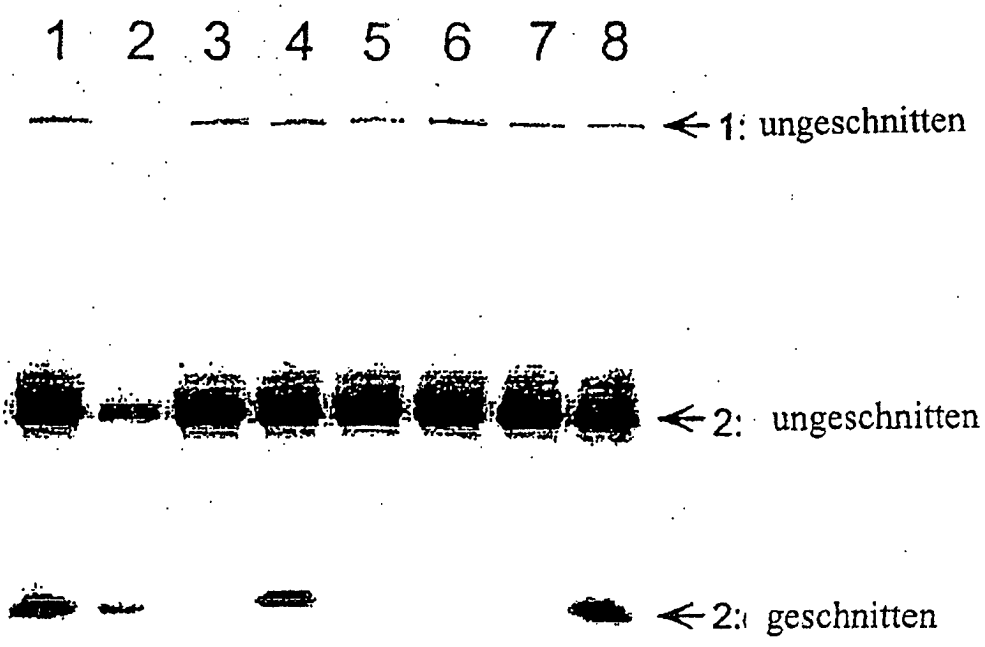


b

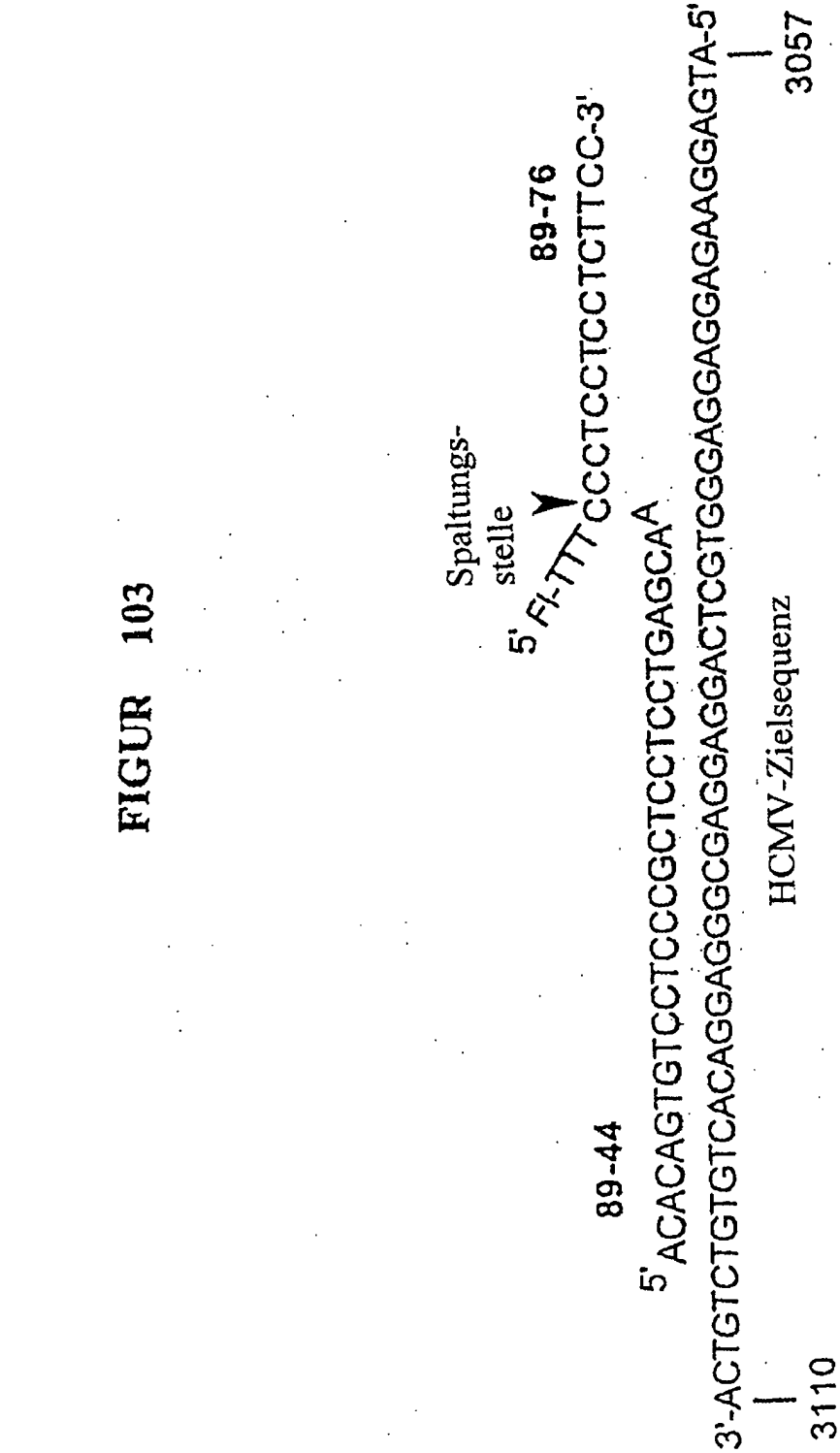


Attamol/Ziel	Basisinvader	Invader im Quadrat
1		8386
10		133185
100	8512	1862211

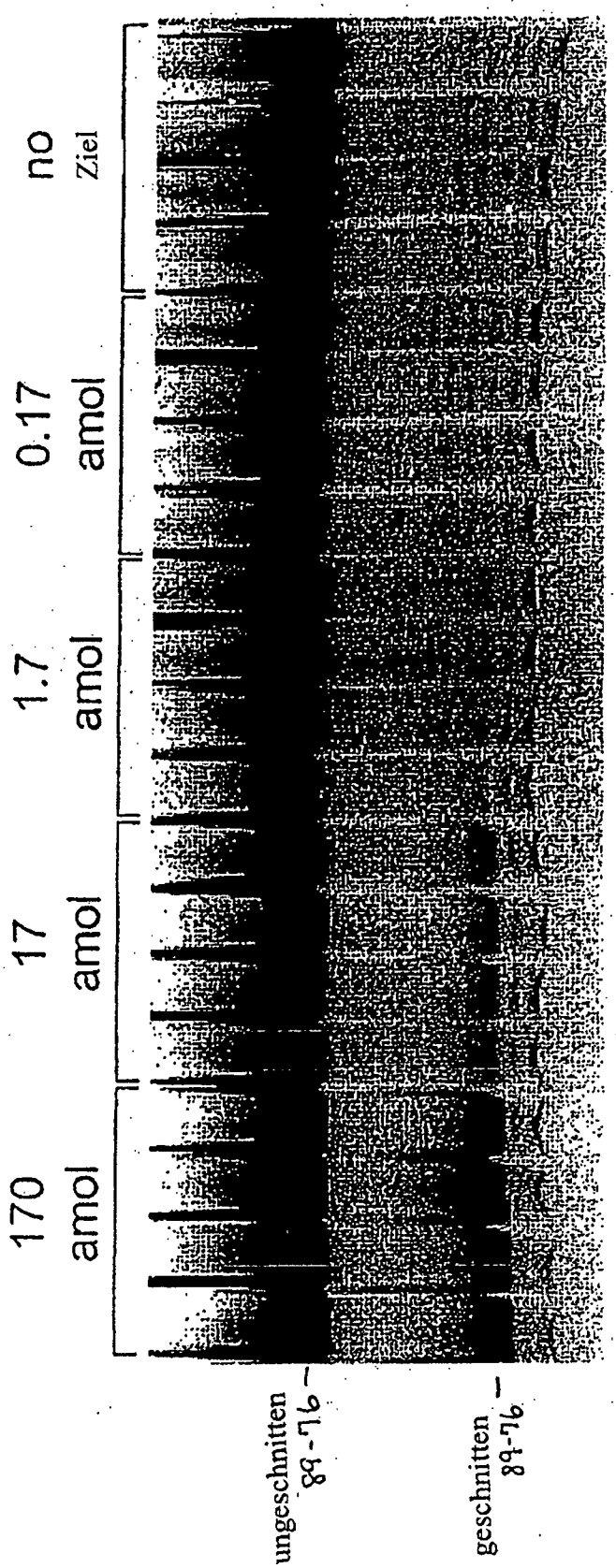
FIGUR 102



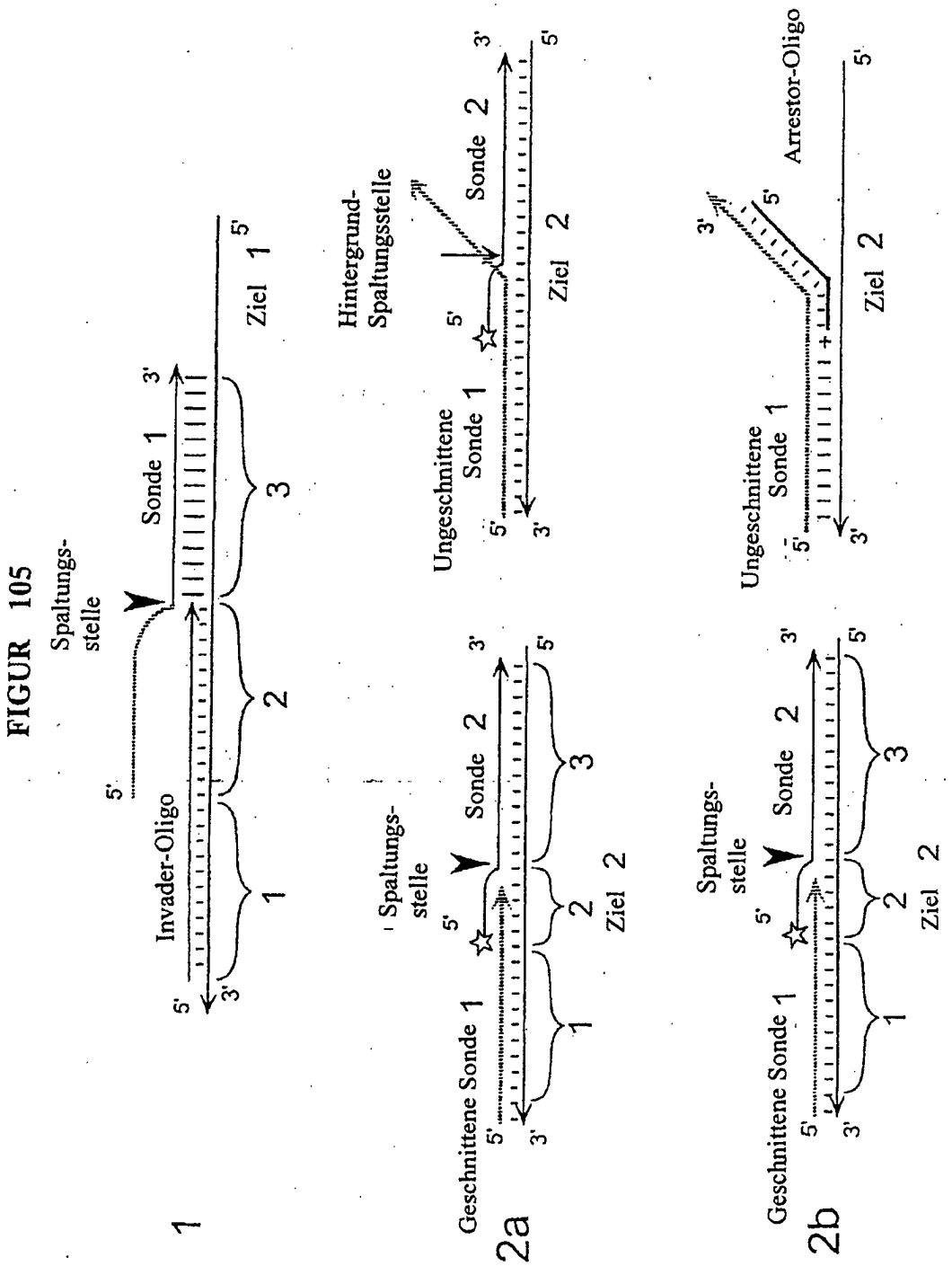
FIGUR 103


Spaltungs-
stelle
5'
89-76
CCCTCCTCCTCTTCC-3'
89-44
5'ACACAGTGTCCTCCCGCTCCTCCTGAGCA
3'-ACTGTCTGTGTCACAGGAGGGCGAGGAGGACTCGTGGGAGGAGGAAGGAGTA-5'
3110
HCMV-Zielsequenz
3057

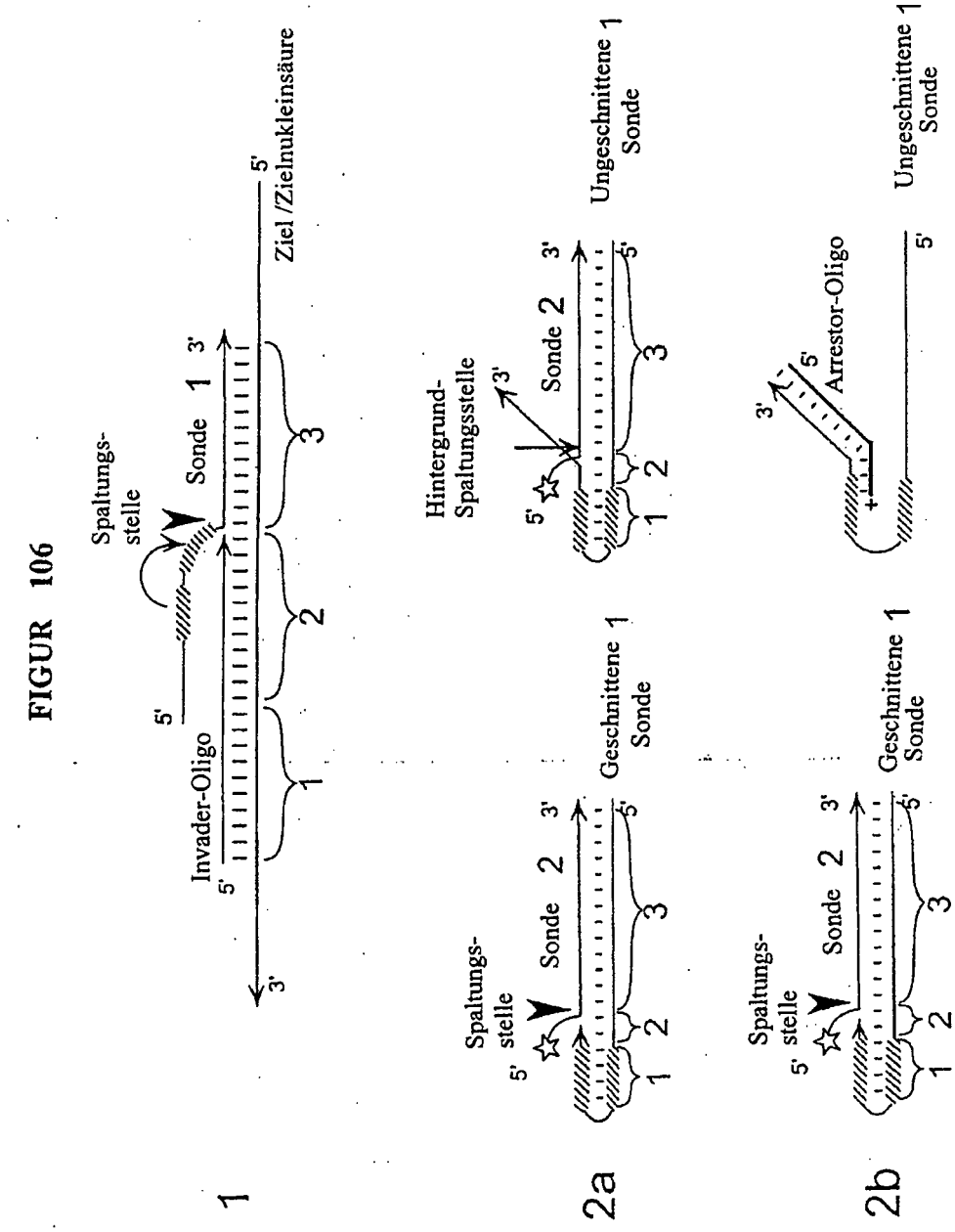
FIGUR 104


170 amol
17 amol
1.7 amol
0.17 amol
no Ziel
ungeschnitten 89-76
geschnitten 89-76

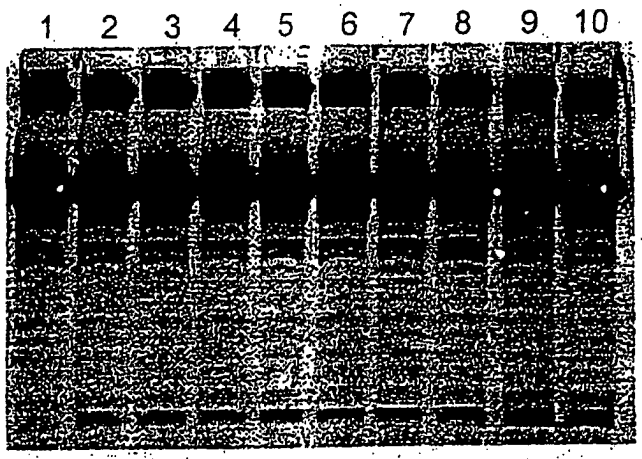
FIGUR 105


1
Spaltungs-stelle
Sonde 1
Invader-Oligo
Ziel 1
2a
Hintergrund-Spaltungsstelle
Ungeschnittene Sonde 1
Sonde 2
Ziel 2
Spaltungs-stelle
Geschnittene Sonde 1
Sonde 2
Ziel 2
2b
Arrestor-Oligo
Ungeschnittene Sonde 1
Sonde 2
Ziel 2
Spaltungs-stelle
Geschnittene Sonde 1
Sonde 2
Ziel 2

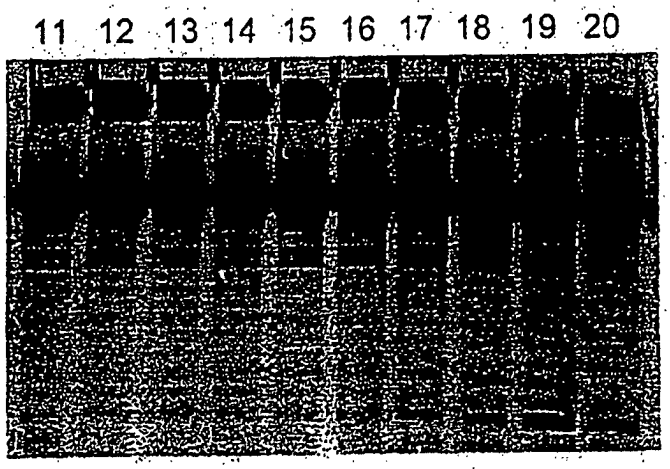
FIGUR 106


1
Spaltungs-
stelle
Sonde 1
Invader-Oligo
Ziel /Zielnukleinsäure
5'
3'
2a
Hintergrund-
Spaltungsstelle
Sonde 2
Geschnittene 1
Sonde
Ungeschnittene 1
Sonde
2b
Arrestor-Oligo

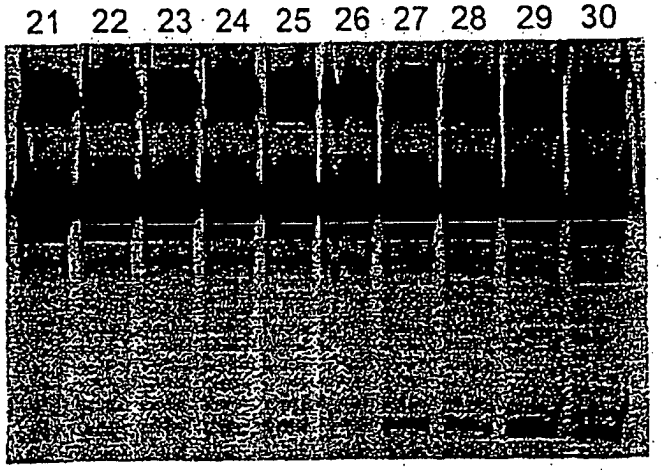
A

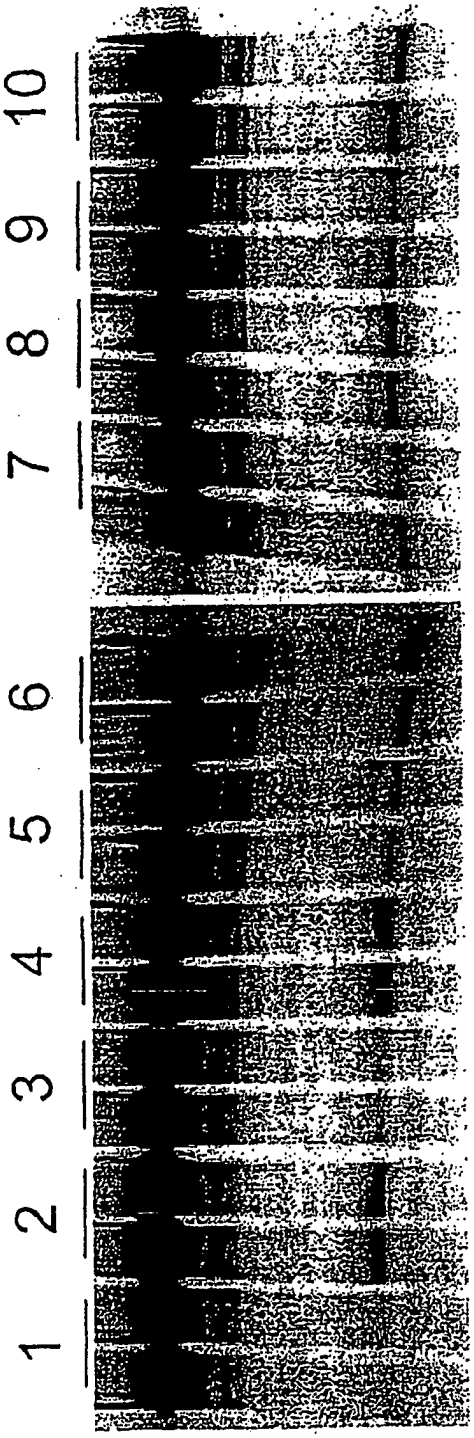

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

B


11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

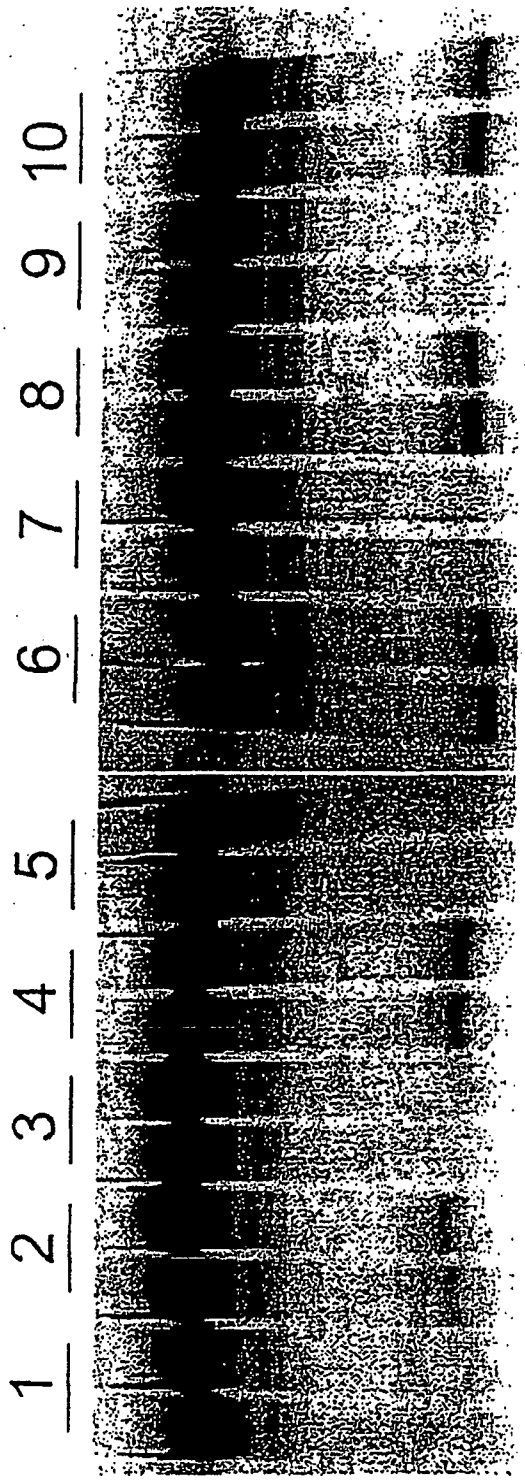
C


21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

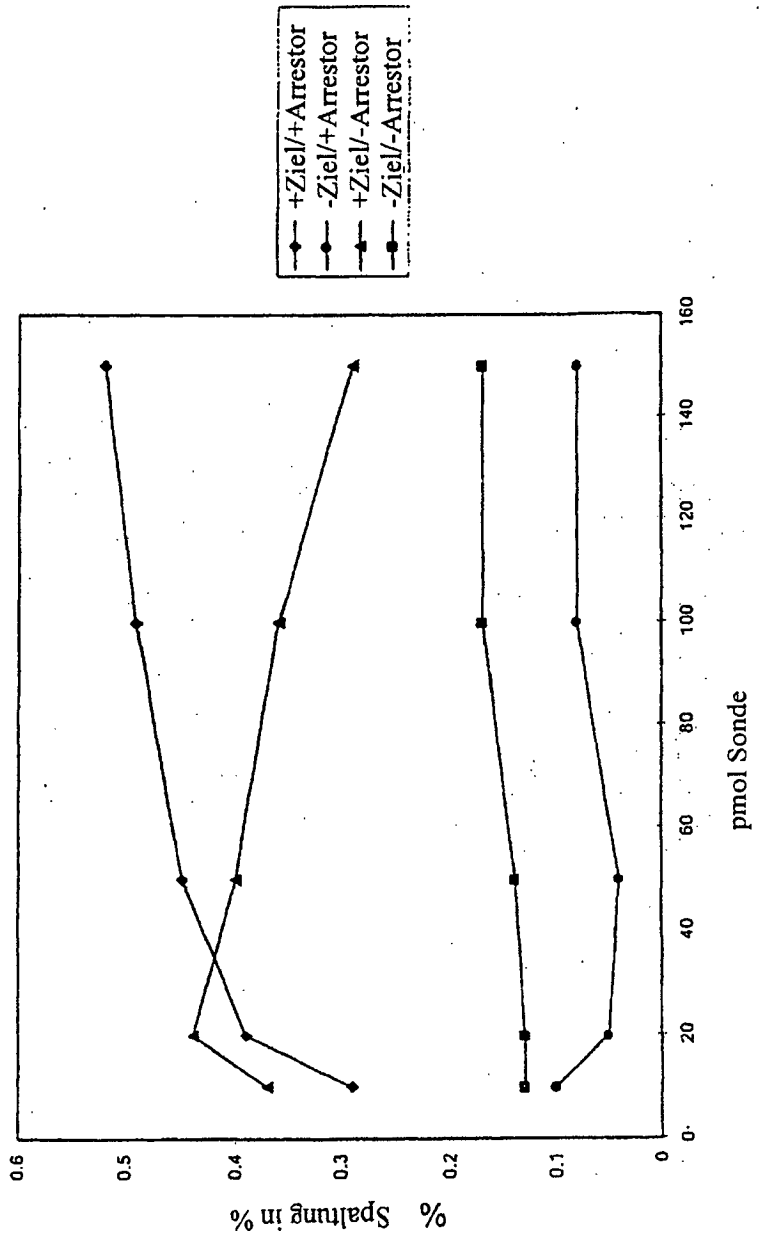


FIGUR 108A

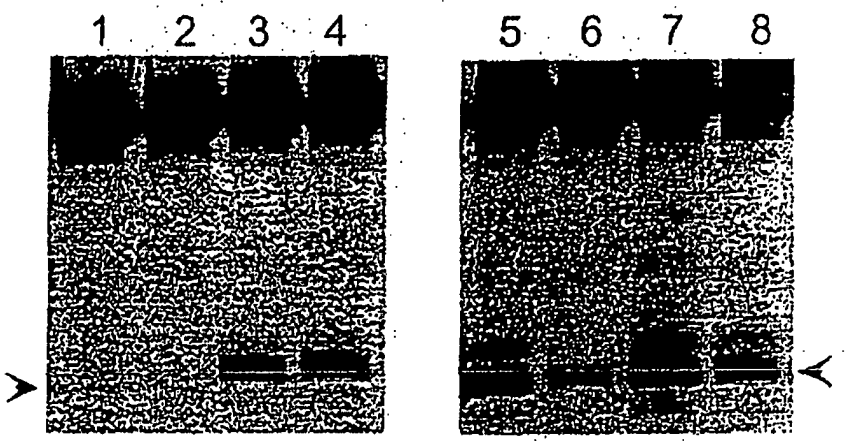
FIGUR 108B



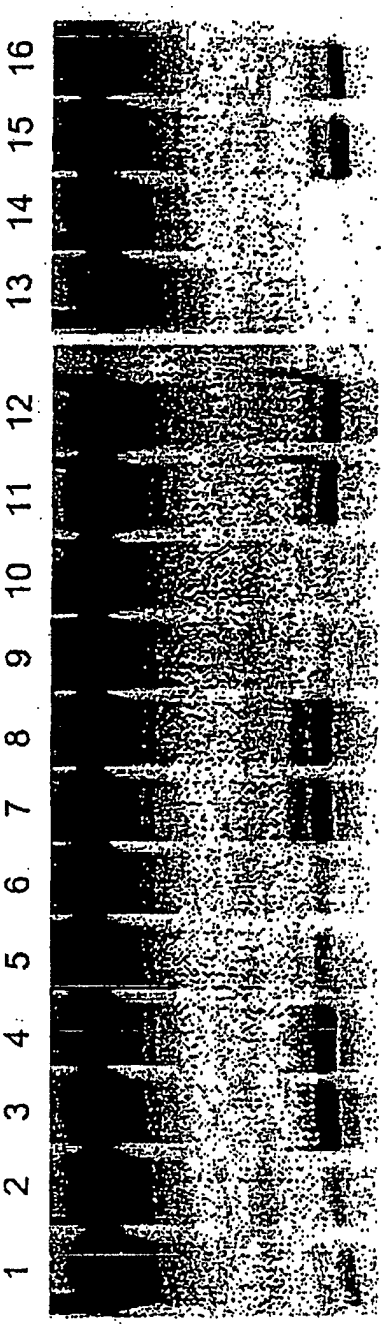
FIGUR 108C


+Ziel/+Arrestor
-Ziel/+Arrestor
+Ziel/-Arrestor
-Ziel/-Arrestor
% Spaltung in %
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
pmol Sonde

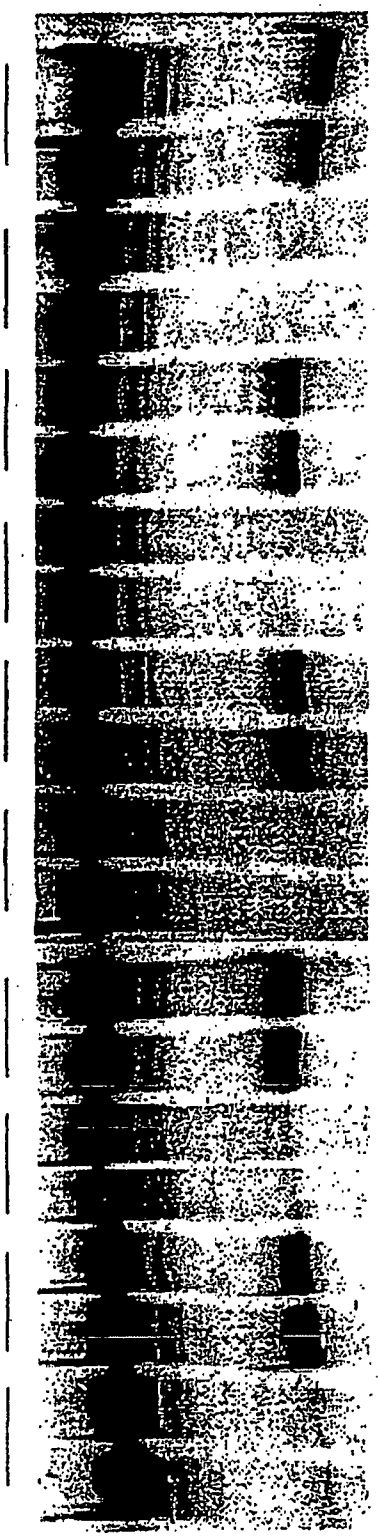
FIGUR 109A



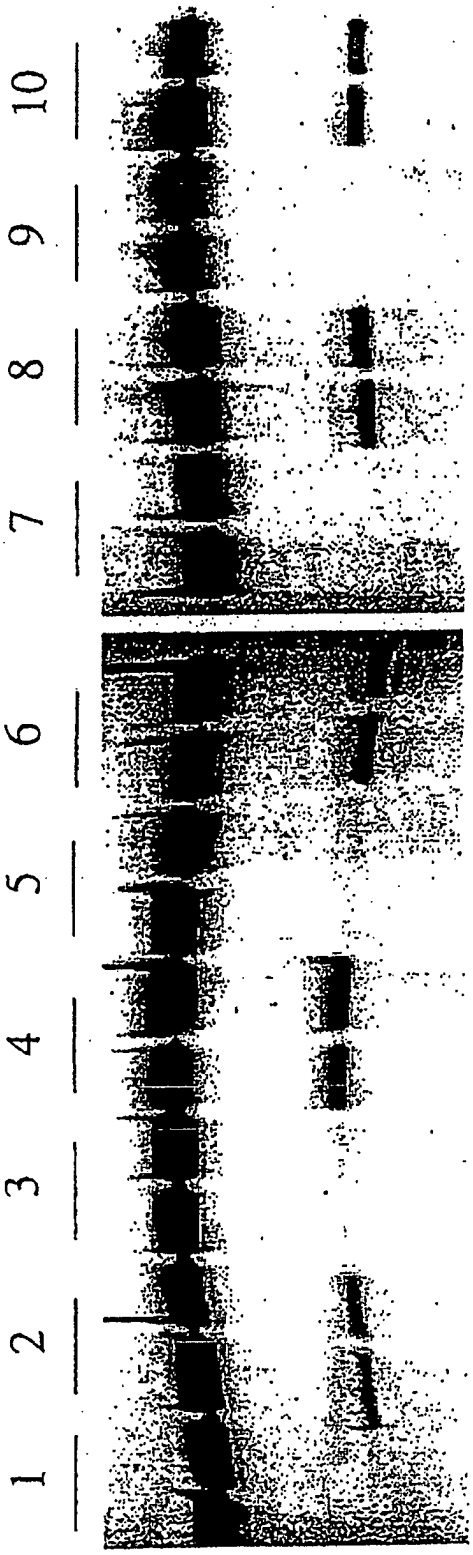
FIGUR 109B



FIGUR 110A



FIGUR 110B



FIGUR 110C

Primäre Sonde 241-95-02
5' AACGAGGCGCACCCACCCAAGGCACAGC-NH3+ 3'
Arrestors
3' NH3+GGGTGGGTTCCGTGTCG 5' 241-95-03
3'NH3+TGGGGTGGGTTCCGTGTCG 5' 241-95-04
3'NH3+TGCGGGGTGGGTTCCGTGTCG 5' 241-95-05
3'NH3+TGCGCGGGTGGGTTCCGTGTCG 5' 241-95-06

FIGUR 111

