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

(10) **DE 694 33 644 T2** 2005.03.24

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 702 729 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 644.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/06690**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 921 292.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/029485**
(86) PCT-Anmeldetag: **15.06.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **22.12.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.03.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **24.03.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.03.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12Q 1/68**

(30) Unionspriorität:
77251 **15.06.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, IE, IT, LI, NL

(73) Patentinhaber:
Imclone Systems, Inc., New York, N.Y., US

(72) Erfinder:
SEGEV, David, 76804 Mazkeret Batya, IL

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **CHEMISCHES VERFAHREN ZUR VERVIELFÄLTIGUNG UND DETEKTION VON NUKLEINSÄURE-SEQUENZEN**

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 betrifft ein Verfahren zum Amplifizieren und Detektieren existierender Nukleinsäuresequenzen in einer Testprobe.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Das Standardverfahren zum Amplifizieren und Detektieren von Nukleinsäure- Target-Sequenzen ist die Polymerase- Kettenreaktion (PCR). (Siehe Saiki et al. in Science 239, 487 (1988) and Mullis et al in U.S. Patent 4,683,195). Ein Problem mit PCR ist die nichtspezifische Polymerisation, die zu falschen Hintergrundsignalen führt.

[0003] In WO 93/06240 wird die Gegenwart einer Nukleinsäure- Target- Sequenz detektiert durch in Kontakt bringen der Probe mit einer ersten und einer zweiten Sonde, Teilen von besagten Sonden, die in der Lage sind, in der Target- Sequenz zu hybridisieren, so dass die Sonden benachbart oder substanziell benachbart zueinander sind, so dass sie andere komplementäre Teile der ersten und zweiten Sonde befähigen, miteinander zu annealen bzw. die Probe so zu behandeln, dass eine Kettenverlängerung einer der Sonden unter Verwendung eines Teiles einer Sonde als ein Templat verursacht wird.

[0004] In EP 0324616 wird eine Nukleinsäure- Target- Sequenz detektiert durch in Kontakt bringen der Probe mit einer ersten und einer zweiten Sonde, welche photoreaktiv funktionelle Gruppen aufweisen, die in der Lage sind, die erste Sonde und die zweite Sonde aneinander zu binden und zwar nach Photoaktivierung, wenn die erste und zweite Sonde durch Binden der Nukleinsäure- Target- Sequenz in eine reaktive Position gebracht sind.

[0005] Backman et al. (EP 320 308) offenbart ein alternatives Verfahren bekannt als Ligase-Kettenreaktion (LCR) zum Amplifizierung einer Nukleinsäure- Target- Sequenz. In der LCR werden vier verschiedene Nukleinsäuresonden in Überschuss eingesetzt. Die erste und dritte Sonde bilden ein komplementäres Oligonukleotid. Die zweite und vierte Sonde bilden ein weiteres komplementäres Oligonukleotid. Die erste und zweite Sonde hybridisieren an Sequenzen, welche benachbart in dem ersten Strang des Targetmoleküls sind. Wenn hybridisiert, grenzen erste und zweite Sonde aneinander in einer 5'-Phosphat-3'-hydroxylbeziehung an, so dass eine Ligase beide Sonden zu einem fusionierten Produkt verbinden kann. Auch die dritte und vierte Sonde hybridisieren an Sequenzen, welche benachbart in dem zweiten Strang des Targetmoleküls sind. Wenn hybridisiert, grenzen die dritte und vierte Sonde aneinander in einer 5'-Phosphat-3'-hydroxylbeziehung an, so dass eine Ligase die beiden Sonden zu einem zweiten Fusionsprodukt verbinden kann.

[0006] Das erste und das zweite Fusionsprodukt werden von den Targetsträngen abgetrennt, was zur eigentlichen Verdopplung der Targetpopulation in der Probe führt. Die fusionierten Produkte dienen dann durch Hybridisieren an ihre komplementären Sonden als Template für weitere LCR- Reaktionen. Wenn der Zyklus der Hybridisierung, Ligation und Denaturierung wiederholt wird, steigt die Population von fusionierten Sonden in einer geometrischen Geschwindigkeit. Die fusionierten Sonden werden mit Standardverfahren detektiert.

[0007] Diese Amplifikationsreaktionen erlauben schnelle Analyse oder Charakterisierung von Sequenzen von Interesse, selbst wo Startmengen von Material extrem klein sind. Jedoch ist es wichtig, dass das Amplifikationsverfahren hochspezifisch ist, da die Amplifikation von nicht- Target- Sequenzen zusammen mit Target- Signalen die Verlässlichkeit des Amplifikationsverfahrens beeinträchtigt.

[0008] Wie auch für PCR ist ein Problem assoziiert mit LCR, das ungewünschte Hintergrundsignal verursacht durch Target- unabhängige Ligation der komplementären Oligonukleotidpaare. Der ungewünschte Hintergrund wird durch die Fähigkeit dieser komplementären Paare erzeugt, welche in Überschuss zugegeben sind, untereinander kreuzweise zu hybridisieren. Solche Kreuzhybridisierung kann zu unabhängiger Ligation der Sonden führen und verknüpfte Produkte in der Abwesenheit der Target- Sequenz ausbilden. Diese Target unabhängigen Produkte sind ununterschreitbar von der gewünschten amplifizierten Target- Sequenz.

[0009] Sowohl PCR als auch LCR haben weitere Nachteile aufgrund der Benötigung von Polymerasen oder Ligasen, um die Amplifizierung zu ermöglichen. Darüber hinaus, dass sie teuer sind, zeigen solche Enzyme von Stück zu Stück Variierung hinsichtlich der Aktivität und in der Konzentration von unerwünschten Nukleasekontaminierungen. Solche Variationen beeinträchtigen des Weiteren die Verlässlichkeit der Verfahren.

[0010] Das Problem, das es durch die vorliegende Erfindung zu lösen gilt, ist die Bereitstellung des Verfahrens der Amplifikation und Detektion von Target- Sequenzen, die weder Polymerase noch Ligase nutzen und die falsche Hintergrundsignale verringern und die Verlässlichkeit verbessern.

Zusammenfassung der Erfindung

[0011] Diese und weitere Aufgaben, die für den Fachmann offensichtlich werden, wurden erfüllt durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Amplifizierung und Detektion eines einzelsträngigen Nukleinsäure- Target-Moleküls umfassend eine Target- Sequenz oder eines doppelsträngigen Nukleinsäure- Target- Moleküls umfassend eine Target-Sequenz und eine Target komplementäre Sequenz, beide in einer Probe, wobei der Prozess folgende Schritte umfasst:

(a) Bereitstellen eines ersten komplementären Oligonukleotidpaares und eines zweiten komplementären Oligonukleotidpaares, worin:

(i) das erste komplementäre Oligonukleotidpaar aus einer Sonde 1 und einer Sonde 1' besteht und das zweite komplementäre Oligonukleotidpaar aus einer Sonde 2 und einer Sonde 2' besteht;

(ii) Sonde 1 eine lange Sequenz H und eine kurze Sequenz I umfasst; Sonde 1' eine lange Sequenz H' und eine kurze Sequenz I' umfasst;

(iii) Sonde 2 eine lange Sequenz J und eine kurze Sequenz K umfasst; Sonde 2' eine lange Sequenz J' und eine kurze Sequenz K' umfasst;

(iv) die lange Sequenz H von Sonde 1 und die lange Sequenz H' von Sonde 1' komplementär zueinander sind;

(v) die lange Sequenz J von Sonde 2 und die lange Sequenz J' von Sonde 2 komplementär zueinander sind;

(vi) die lange Sequenz H von Sonde 1 und die lange Sequenz J von Sonde 2 komplementär zu benachbarten Portionen der Target- Sequenz sind;

(vii) die lange Sequenz H' von Sonde 1' und die lange Sequenz J' von Sonde 2' komplementär zu benachbarten Portionen der Target komplementären Sequenz sind;

(viii) die kurze Sequenz I und die kurze Sequenz K nicht an die Target- Sequenz hybridisieren, wenn die lange Sequenz H und die lange Sequenz J an die Target-Sequenz hybridisieren;

(ix) die kurze Sequenz I' und die kurze Sequenz K' nicht an die Target komplementäre Sequenz hybridisieren, wenn die lange Sequenz H' und die lange Sequenz J' an die Target komplementäre Sequenz hybridisieren;

(x) die kurze Sequenz I von Sonde 1 komplementär zur kurzen Sequenz K von Sonde 2 ist, und die kurze Sequenz I' von Sonde 1' komplementär zur kurzen Sequenz K' von Sonde 2' ist;

(xi) die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz I von Sonde 1 mit einer chemisch funktionalen Gruppe X_1 modifiziert ist; die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz K von Sonde 2 mit einer chemisch funktionalen Gruppe Y_1 modifiziert ist; die chemisch funktionelle Gruppe X_1 reaktiv mit der chemischen funktionellen Gruppe Y_1 ist;

(xii) die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz I' von Sonde 1' mit einer chemisch funktionalen Gruppe X_2 modifiziert ist; die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz K' von Sonde 2' mit einer chemisch funktionalen Gruppe Y_2 modifiziert ist; die chemisch funktionelle Gruppe X_2 reaktiv mit der chemischen funktionellen Gruppe Y_2 ist;

(xiii) die kurze Sequenz I an die kurze Sequenz K hybridisiert, wenn die lange Sequenz H von Sonde 1 und die lange Sequenz J von Sonde 2 an benachbarte Portionen der Target- Sequenz hybridisieren;

(xiv) wenn die kurze Sequenz I an die kurze Sequenz K hybridisiert, die chemisch funktionelle Gruppe X_1 mit der chemisch funktionellen Gruppe Y_1 reagiert, um eine chemische Bindung auszubilden;

(xv) die kurze Sequenz I' an die kurze Sequenz K' hybridisiert, wenn die lange Sequenz H' von Sonde 1' und die lange Sequenz J' von Sonde 2' an benachbarte Portionen der Target komplementären Sequenz hybridisieren;

(xvi) wenn die kurze Sequenz I' an die kurze Sequenz K' hybridisiert, die chemisch funktionelle Gruppe X_2 mit der chemisch funktionellen Gruppe Y_2 reagiert, um eine chemische Bindung auszubilden;

(b) Hybridisieren in dem Fall, dass die Target- Sequenz und die Target komplementäre Sequenz einen Doppelstrang ausbilden, der langen Sequenz H von Sonde 1 und der langen Sequenz J von Sonde 2 an benachbarte Portionen der Target-Sequenz, so dass I und K in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren und Hybridisieren der langen Sequenz H' von Sonde 1' und der langen Sequenz J' von Sonde 2' an benachbarte Portionen der Target komplementären Sequenz, so dass I' und K' in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren; oder

Hybridisieren in dem Fall, dass die Target- Sequenz oder die Target komplementäre Sequenz einzelsträngig ist, der langen Sequenz H von Sonde 1 und der langen Sequenz J von Sonde 2 an benachbarte Portionen der Target- Sequenz, so dass I und K in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren oder Hybridisieren der langen Sequenz H' von Sonde 1' und der langen Sequenz J' von Sonde 2' an benachbarte Portionen der

Target komplementären Sequenz, so dass I' und K' in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren,
(c) Verbinden von Sonde 1 und von Sonde 2, welche nach Schritt (b) an benachbarte Portionen der Target-Sequenz hybridisiert sind, aneinander durch Ausbilden einer chemischen Bindung zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1, wodurch ein zweites verbundenes Oligonukleotid- Produkt ausgebildet wird, welches eine Target komplementäre Sequenz aufweist;
(d) Verbinden von Sonde 1' und von Sonde 2', welche nach Schritt (b) an benachbarte Portionen der Target komplementäre Sequenz hybridisiert sind, aneinander durch Ausbilden einer chemischen Bindung zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_2 und Y_2, wodurch ein erstes verbundenes Oligonukleotid-Produkt ausgebildet wird, welches eine Target- Sequenz aufweist;
(e) Behandlung der Probe unter denaturierenden Bedingungen;
(f) Wiederholung der Schritte (b) bis (e) über eine gewünschte Anzahl von Perioden; und
(g) Detektieren der verbundenen Oligonukleotid- Produkte, wobei zumindest eine der funktionellen Gruppen X_1, X_2, Y_1 oder Y_2 die Hydroxylgruppe oder den Wasserstoff lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings eines Nukleotids in der kurzen Sequenz I, I', K bzw. K' ersetzt.

Beschreibung der Zeichnungen

[0012] **Fig.** 1 zeigt eine verallgemeinerte Illustrierung der Oligonukleotidsonden 1, 1', 2 und 2'. Die vertikalen Linien in der Illustration stellen hauptsächlich die Abgrenzung zwischen in ihrer Funktionalität unterschiedlichen Segmenten jeder Sonde heraus.

[0013] **Fig.** 2 zeigt Adeninderivate A_1, A_2, A_3 und A_4 modifiziert mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z.

[0014] **Fig.** 3 zeigt Cytidinderivate C_1, C_2 und C_3 modifiziert mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z.

[0015] **Fig.** 4 zeigt Guaninderivate G_1, G_2 unds G_3 modifiziert mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z.

[0016] **Fig.** 5 zeigt Thymidinderivate T_1, T_2 und T_3 modifiziert mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z.

[0017] **Fig.** 6 zeigt Uridinderivate U_1 und U_2 modifiziert mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z.

[0018] **Fig.** 7 zeigt ein Segment von zwei Nukleotiden von kurzen Sequenzen I und K von Sonden 1 bzw. 2 mit chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1 angeheftet an Guaninreste.

[0019] **Fig.** 7.1 zeigt ein Segment von zwei Nukleotiden von kurzen Sequenzen I' und K' von Sonden 1' bzw. 2: mit chemisch funktionellen Gruppen X_2 und Y_2 angeheftet an Guaninreste.

[0020] **Fig.** 8 zeigt eine verallgemeinerte Illustration einer geschützten chemisch funktionellen Gruppe X, angebracht an die Zuckergruppe der Nukleotidbase B in der kurzen Sequenz einer Sonde. In der Figur repräsentiert X eine chemisch funktionelle Gruppe, A repräsentiert Adenin, G repräsentiert Guanin, C repräsentiert Cytidin, B repräsentiert irgendeine Nukleotidbase und die Folge von Symbolen mit S oder P darin repräsentiert das Zucker- Phosphat- Rückgrat der Nukleinsäuresequenz.

[0021] **Fig.** 9 zeigt eine verallgemeinerte Illustrierung von zwei hybridisierten kurzen Sequenzen mit chemisch funktionellen Gruppen X und Y, angebracht an die C-2' Position des Riboserings von beiden Nukleotidbasen B. in der Figur repräsentierten X und Y jeweils eine chemisch funktionelle Gruppe, G repräsentiert Guanin, C repräsentiert Cytosin, B repräsentiert irgendeine Nukleotidbase und die Abfolge der Symbole mit S und P darin repräsentiert das Zucker-Phosphat- Rückgrat der Nukleinsäuresequenz. Die Nukleotidbasen, welchen die chemisch funktionellen Gruppen angebracht sind, sind nicht aneinander hybridisiert. Stattdessen ist die chemisch funktionelle Gruppe X an das Nukleotid angebracht, das an das Nukleotid hybridisiert, das benachbart zu dem Nukleotid ist, an welchem die chemisch funktionelle Gruppe Y angebracht ist. Chemisch funktionelle Gruppen X und Y sollen so verstanden werden, dass sie über eine kovalente Bindung miteinander verknüpft sind.

[0022] **Fig.** 10 zeigt eine verallgemeinerte Illustration von zwei hybridisierten kurzen Sequenzen mit einer chemisch funktionellen Gruppen X, angebracht an die C-2' Position des Riboserings einer Nukleotidbase B und einer chemisch funktionellen Gruppe Y angebracht entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Positionen einer Nukleotidbase B. In der Figur repräsentierten X und Y jeweils eine chemisch funktionelle Gruppe, G repräsentiert Guanin, C repräsentiert Cytosin, B repräsentiert irgendeine Nukleotidbase und die Abfolge von Symbolen mit S und P darin repräsentiert das Zucker- Phosphat-Rückgrat der Nukleinsäuresequenz. Die Nukleotidbasen, an

welchen die chemisch funktionellen Gruppen angebunden sind, sind nicht hybridisiert aneinander. Die chemisch funktionellen Gruppen X und Y verstehen sich so, dass sie über eine kovalente Bindung miteinander verknüpft sind.

[0023] **Fig.** 11 zeigt eine verallgemeinerte Illustration von zwei hybridisierten kurzen Sequenzen mit einer chemisch funktionellen Gruppen X, angebracht die C-2' Position des Riboserings einer Nukleotidbase B und einer chemisch funktionellen Gruppe Y angebracht an entweder die C-5, C-6 oder C-8 Positionen einer Nukleotidbase B. In der Figur repräsentierten X und Y jeweils eine chemisch funktionelle Gruppe, G repräsentiert Guanin, C repräsentiert Cytosin, B repräsentiert irgendeine Nukleotidbase und die Abfolge von Symbolen mit S und P darin repräsentiert das Zucker- Phosphat- Rückgrat der Nukleinsäuresequenz. Die Nukleotidbasen, an welchen die chemisch funktionellen Gruppen angebunden sind, sind nicht hybridisiert aneinander. Die chemisch funktionellen Gruppen X und Y verstehen sich so, dass sie über eine kovalente Bindung miteinander verknüpft sind.

[0024] **Fig.** 12 zeigt eine verallgemeinerte Illustration von zwei hybridisierten kurzen Sequenzen mit einer chemisch funktionellen Gruppe X, angebracht entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Position einer Nukleotidbase B und der chemisch funktionellen Gruppe Y angebracht entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Position der Nukleotidbase B. In der Figur repräsentierten X und Y jeweils eine chemisch funktionelle Gruppe, G repräsentiert Guanin, C repräsentiert Cytosin, B repräsentiert irgendeine Nukleotidbase und die Abfolge von Symbolen mit S und P darin repräsentiert das Zucker- Phosphat- Rückgrat der Nukleinsäuresequenz. Die Nukleotidbasen, an welchen die chemisch funktionellen Gruppen angebunden sind, sind nicht hybridisiert aneinander. Die chemisch funktionellen Gruppen X und Y verstehen sich so, dass sie über eine kovalente Bindung miteinander verknüpft sind.

[0025] **Fig.** 13 zeigt eine verallgemeinerte Illustration von zwei hybridisierten kurzen Sequenzen mit einer chemisch funktionellen Gruppe X, angebracht entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Position einer Nukleotidbase B und der chemisch funktionellen Gruppe Y angebracht entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Position einer Nukleotidbase B. In der Figur repräsentierten X und Y jeweils eine chemisch funktionelle Gruppe, G repräsentiert Guanin, C repräsentiert Cytosin, B repräsentiert irgendeine Nukleotidbase und die Abfolge von Symbolen mit S und P darin repräsentiert das Zucker- Phosphat- Rückgrat der Nukleinsäuresequenz. Die Nukleotidbasen, an welchen die chemisch funktionellen Gruppen angebunden sind, sind nicht hybridisiert aneinander. Die chemisch funktionellen Gruppen X und Y verstehen sich so, dass sie über eine kovalente Bindung miteinander verknüpft sind.

[0026] **Fig.** 14 zeigt eine verallgemeinerte Illustration einer chemisch funktionellen Gruppe X geschützt mit Oligonukleotid 1.1.

[0027] **Fig.** 15 zeigt die Schritte der Synthese von geschütztem 2'-Amino-2'-desoxyguanosinphosphoramidid von 2'-Amino-2'-desoxyguanin. Reagenzien: I), S-ethyl-trifluorothioacetat in Methanol; II), Dimethylformamid Dimethylacetal in Methanol; III), Dimethoxytitylchlorid, Triethylamin in Pyridin; IV), β-cyanoethyl (N,N-diisopropylamino) Chlorophosphoramidit und N,N-diisopropyl-ethylamin in Dichlormethan.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0028] Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zum Amplifizieren und Detektieren eines Nukleinsäure- Target- Moleküls in einer Testprobe.

Nukleinsäure- Target- Molekül

[0029] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann die geometrische Amplifikationen eines Nukleinsäure-Target- Moleküls bereitstellen unter der Voraussetzung, dass zumindest ein Teil der Nukleotidsequenz im hinreichenden Detail bekannt ist, so dass komplementäre Oligonukleotidpaare synthetisiert werden können. Das Targetmolekül kann in reiner oder nicht reiner Form vorliegen und kann eine einzelsträngige oder doppelsträngige DNA, RNA oder ein DNA-RNA-Hybrid sein.

[0030] Das Nukleinsäure- Target- Molekül enthält die spezifische Nukleinsäuresequenz, die an die Oligonukleotidsonden hybridisiert. Diese Sequenz wird als Target- Sequenz bezeichnet. Falls ein Nukleinsäure- Target-Molekül doppelsträngig ist, wird es eine Target- Sequenz enthalten und sein Komplement, das als Target komplementäre Sequenz bezeichnet wird. Die Target- Sequenz kann so kurz als zwölf Nukleotide sein, enthält jedoch vorzugsweise zumindest sechzehn Nukleotide und mehr bevorzugt zumindest zwanzig Nukleotide. Es

besteht kein Maximum hinsichtlich der Zahl der Nukleotide in der Target- Sequenz oder der Target komplementären Sequenz, welche entweder ein Teil des Targetmoleküls oder des ganzen Targetmoleküls konstruieren können.

[0031] Jegliche Quelle einer Nukleinsäure kann als Quelle des Nukleinsäure- Target-Moleküls verwendet werden. Beispielsweise können DNA oder RNA isoliert aus Bakterien, Viren, Algen, Protozoen, Hefen, Pilze, Plasmiden, Zellen in Zellkultur und höheren Organismen, wie z.B. Pflanzen oder Tieren mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung amplifiziert werden.

[0032] DNA oder RNA aus diesen Quellen können beispielsweise in Proben einer Körperflüssigkeit eines Tieres, einschließlich eines Menschen gefunden werden, wie z.B., jedoch nicht limitiert auf, Blut, Urin, lymphatische Flüssigkeiten, synoviale Flüssigkeiten, Galle, Schleim, Speichel, Hammerwasser, Tränenflüssigkeit, Menstruationsflüssigkeit und Samenflüssigkeit. Darüber hinaus können Proben enthaltend DNA oder RNA beispielsweise in Flüssigkeiten einer Pflanze gefunden werden, wie z.B., jedoch nicht limitiert auf Holzflüssigkeiten, Phloemflüssigkeiten und Pflanzenexudate. Proben enthaltend DNA oder RNA können beispielsweise auch in nicht lebenden Quellen gefunden werden wie z.B., jedoch nicht limitiert auf Nahrung, Abwasser, gerichtsmedizinischen Proben, Seen, Reservoirs, Flüssen und Meeren.

Sonden

[0033] Die Bezeichnung "komplementäres Oligonukleotid- Paar", wie hier verwendet, bezeichnet zwei verschiedene Oligonukleotidsonden, genannt beispielsweise Sonde 1 und Sonde 1' und Sonde 2 und Sonde 2'. Sonde 1 weist eine Basensequenz komplementär zu Sonde 1' auf und Sonde 2 weist eine Basensequenz komplementär zu Sonde 2' auf. Jedes Paar von Sonden kann gleich oder nicht gleich in der Länge sein. Es sollte sich verstehen, dass mehr als 2 komplementäre Oligonukleotid- Paare pro Target- Sequenz oder Target komplementärer Sequenz im Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet könnten.

[0034] Die Bezeichnung "Oligonukleotidpaar", wie hier verwendet, bezieht sich auf eine Gruppe von Sonden 1 und 2 als ein Paar und die Gruppe der Sonden 1' und 2' als ein Paar.

[0035] Jede Sonde weist zwei verschiedene Sequenzen auf. Eine Sequenz ist allgemein länger als die andere. Die beiden Sequenzen werden als die lange Sequenz und die kurze Sequenz bezeichnet. Die Oligonukleotidproben sind vorzugsweise konstruiert aus Desoxyribonukleotiden, obwohl Ribonukleotide akzeptabler Ersatz sind.

[0036] In Bezug auf das erste komplementäre Oligonukleotid- Paar in **Fig.** 1 weist die Sonde 1 ein langes Sequenz H und eine kurze Sequenz I auf. Die Probe 1' weist eine lange Sequenz H' und eine kurze Sequenz I' auf.

[0037] In Bezug auf das zweite komplementäre Oligonukleotid- Paar in **Fig.** 1 weist die Sonde 2 eine lange Sequenz J und eine kurze Sequenz K auf. Die Sonde 2' weist eine lange Sequenz J' und eine kurze Sequenz K' auf.

[0038] Die lange Sequenz H von Sonde 1 und die lange Sequenz H' von Sonde 1' sind komplementär zueinander. Die lange Sequenz J von Sonde 2 und die lange Sequenz J' von Sonde 2' sind zueinander komplementär. Die lange Sequenz H ist nicht komplementär zur langen Sequenz J. In ähnlicher Weise ist die lange Sequenz H' nicht komplementär zur langen Sequenz J'.

[0039] Falls die Nukleinsäure Target- Sequenz in einer Testprobe vorliegt, werden die langen Sequenzen H und J entweder vollständig komplementär oder hinreichend komplementär mit benachbarten Regionen der Target- Sequenz, um ein stabiles Hybrid unter der ausgewählten Hybridisierungsbedingungen auszubilden.

[0040] Falls ein Strang komplementär zu einer Nukleinsäure- Target- Sequenz in einer Testprobe vorliegt, sind die langen Sequenzen H' und J' entweder vollständig komplementär zu der Target komplementären Sequenz oder hinreichend komplementär zu benachbarten Regionen der Target komplementären Sequenz, um ein stabiles Hybrid unter ausgewählten Hybridisierungsbedingungen auszubilden.

[0041] Die Bezeichnung "benachbarte Regionen an einer Target- Sequenz" oder "benachbarte Regionen an einer Target komplementären Sequenz" wie hier verwendet bezieht sich auf Sequenzen in diesen Nukleinsäuremolekülen, die entweder direkt aneinander angrenzen oder angrenzend zueinander sind oder durch eine oder zwei Nukleotidbasen getrennt sind.

[0042] Die minimale Anzahl von Nukleotiden in der langen Sequenz ist die kleinste Zahl, die hinreichend Selektivität in der Amplifikation und in einem Detektionsverfahren der vorliegenden Erfindung gibt. Beispielsweise ist eine lange Sequenz umfassend zumindest sechs, vorzugsweise zumindest zwölf und mehr bevorzugt zumindest zwanzig Desoxyribonukleotide oder Ribonukleotide geeignet.

[0043] Die maximale Länge der langen Sequenz einer Sonde ist limitiert durch die Länge der Nukleinsäure-Target- Sequenz in der Testprobe. Die lange Sequenz sollte hinreichend lang sein, um ein stabiles Hybrid mit einer Target- Sequenz auszubilden, jedoch vorzugsweise nicht zu lang, um exzessive Hybridisierungszeiten zu benötigen. Solche geeigneten Maximallängen der langen Sequenz sind 200 Nukleotide, vorzugsweise 150 Nukleotide und am meisten bevorzugt 100 Nukleotide.

[0044] Einige geeigneten Längen der langen Sequenz sind 6–100 Nukleotide, vorzugsweise 10–70 Nukleotide, mehr bevorzugt 16–50 Nukleotide und am meisten bevorzugt 18–30 Nukleotide.

[0045] Die kurzen Sequenzen I und K der Sonden 1 bzw. 2 sind zueinander komplementär. Die kurzen Sequenzen I' und K' der Sonden 1' bzw. 2' sind zueinander komplementär. Die kurzen Sequenzen I und I' der Sonden 1 bzw. 2' können oder können nicht komplementär zueinander sein. Ähnlich können die kurzen Sequenzen K und K' der Sonden 2 bzw. 2' komplementär zueinander sein oder nicht.

[0046] Die kurze Sequenz einer jeden Sonde ist so konzipiert, dass sie nicht an die Target-Sequenz hybridisiert, wenn die langen Sequenzen der Sonden an die Target- Sequenz hybridisiert haben oder an die Target komplementäre Sequenz. Deswegen hybridisiert die kurze Sequenz I an die kurze Sequenz K, wenn die lange Sequenz H und die lange Sequenz J an benachbarte Teile der Target- Sequenz hybridisiert. Dergleichen hybridisieren die kurze Sequenz I' und die kurze Sequenz K', wenn die lange Sequenz H' und die lange Sequenz J' an die benachbarten Teile der Target komplementären Sequenz hybridisieren.

[0047] Die Länge der kurzen Sequenz ist so kurz wie möglich, um die Hybridisierung zwischen den kurzen Sequenzen I und K zu vermeiden, wenn die langen Sequenzen H und J nicht an die Target- Sequenz hybridisiert sind oder zwischen kurzen Sequenzen I' und K', wenn die langen Sequenzen H' und J' nicht an die Target komplementäre Sequenz hybridisiert sind.

[0048] Die Maximallänge der kurzen Sequenz hängt vom Verhältnis der langen Sequenz zur kurzen Sequenz ab. Das Verhältnis der langen Sequenz zur kurzen Sequenz sollte so groß als möglich sein, vorzugsweise in einer Größenordnung von 2:1 bis zu 50:1. Beispielsweise sollte das Verhältnis zumindest 2:1, vorzugsweise zumindest 5:1, mehr bevorzugt zumindest 10:1 und am meisten bevorzugt zumindest 20:1 sein. Beispielsweise sollte, falls die lange Sequenz dreißig Nukleotide enthält, die kurze Sequenz maximal zehn Nukleotide, vorzugsweise maximal sechs Nukleotide, mehr bevorzugt maximal drei Nukleotide und am meisten bevorzugt 2 Nukleotide aufweisen.

[0049] Jede kurze Sequenz weist eine chemisch funktionelle Gruppe auf, bezeichnend entweder das X oder Y, die kovalent an die Zucker- und/ oder Basengruppen von einem oder mehreren der Nukleotide in der Sequenz gebunden sind. Wenn die kurzen Sequenzen der Sonden 1 und 2 oder der Sonden 1' und 2' miteinander hybridisiert haben, reagieren die chemisch funktionellen Gruppen auf jeder Sequenz chemisch, um eine kovalente Bindung auszubilden, die die Sonden aneinander knüpft, um ein verknüpftes Oligonukleotid- Produkt auszubilden. Wenn die kurzen Sequenzen der Sonden 1 und 2 oder der Sonden 1' und 2' nicht hybridisiert zueinander sind, schützen das Nukleotid, an welches die funktionelle Gruppe angebunden ist und das benachbarte Nukleotid oder die benachbarten Nukleotide in der Sonde die chemisch funktionelle Gruppe auf der Sonde gegen das Reagieren mit der chemisch funktionellen Gruppe auf der anderen Sonde.

[0050] Unter den Hybridisierungsbedingungen verwendet in dem Verfahren muss die lange Sequenz ein hinreichend hohe Schmelztemperatur aufweisen, um ein stabiles Hybrid mit einer Target- Sequenz und einer Target komplementären Sequenz auszubilden. Die kurze Sequenz muss eine hinreichend niedrige Schmelztemperatur aufweisen, dass sie nicht unter den gleichen Hybridisierungsbedingungen an die kurze komplementäre Sequenz der anderen Sonde bindet, bis die langen Sonden an die Target- Sequenz oder die Target komplementäre Sequenz hybridisiert haben.

[0051] Die Bezeichnung "Schmelztemperatur", wie hier verwendet, betrifft die Temperatur, an welcher ein Oligonukleotid an eine komplementäre Nukleinsäuresequenz hybridisiert, um ein stabilen Komplex auszubilden. Die Bezeichnung wird abgekürzt mit "Tm". Der Tm eines gegebenen Oligonukleotids ist eine Funktion der Größe in der Zusammensetzung des Oligonukleotids, der Konzentration des Oligonukleotids und der Zusammen-

setzung des Reaktionslösungsmittels.

[0052] Die Hybridisierungscharakteristika der Sonden der vorliegenden Erfindung werden hier diskutiert hinsichtlich der langen und kurzen Längen der Segmente der Sonden. Da die Hybridisierungscharakterstika einer Sonde weithin bestimmt sind sowohl durch Länge als auch durch Zusammensetzung der Sonde, versteht es sich, dass es akkurater ist, die langen und kurzen Segmente der Sonde im Hinblick auf ihre jeweiligen Schmelztemperaturen zu charakterisieren. Demzufolge versteht es sich, dass die lange Sequenz einer Sonde das Segment der Sonde ist, das eine höhere Schmelztemperatur im Hinblick auf ihre komplementäre Sequenz aufweist als die kurze Sequenz der Sonde im Hinblick auf ihre komplementäre Sequenz. In ähnlicher Weise versteht es sich, dass die kurze Sequenz der Sonde das Segment der Sonde ist, das eine niedere Schmelztemperatur aufweist in Bezug auf ihre komplementäre Sequenz als die lange Sequenz der Sonde im Hinblick auf ihre komplementäre Sequenz. Daher ist die korrektere Charakterisierung der beiden verschiedenen Segmente einer Sonde diejenige, im Hinblick auf ihre jeweiligen Schmelztemperaturen. Jedoch das allgemeine Verhältnis zwischen der Länge einer Nukleotidsequenz und der Schmelztemperatur der Sequenz erlaubt, dass die unterschiedlichen Segmente der Sonden im Hinblick auf ihre Längen wie auch auf ihre Schmelztemperaturen diskutiert werden.

[0053] Die Oligonukleotid- Sondenpaare können chemisch synthetisiert werden aus den vier Nukleotiden und zwar als Ganze oder in Teilen durch Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind. Solche Verfahren schließen diejenigen ein, die von Caruthers in Science 230, 281–285 (1985) und von Beaucage; et al. in Tetrahedron Letters 22, 1859-1862 (1981) beschrieben werden.

Chemisch funktionelle Gruppen

[0054] Chemisch funktionelle Gruppen X und Y (X = X_1 oder X_2 und Y = Y_1 oder Y_2) sind Paare von Atomen und/ oder Gruppen, die miteinander reaktiv sind, um kovalente Bindungen auszubilden, wenn sie in enge Nähe miteinander durch Hybridisieren der kurzen Sequenzen der Sonde 1 bzw. 2 gebracht werden. Es versteht sich, dass der Abstand der chemisch funktionellen Gruppen ungefähr 4A oder weniger sein soll, damit die Reaktion zwischen den Gruppen auftreten kann.

[0055] Eine chemisch funktionelle Gruppe wird an die Basen- oder Zuckergruppe von zumindest einem Nukleotid in jeder kurzen Sequenz angebunden. Wie aus **Fig.** 1 ersichtlich ist, ist die chemisch funktionelle Gruppe X_1 an das Nukleotid in der kurzen Sequenz I angebunden. Wie auch aus **Fig.** 1 ersichtlich ist, ist die chemisch funktionelle Gruppe X_2 an ein Nukleotid in der kurzen Sequenz I' angebunden. In ähnlicher Art und Weise ist die chemisch funktionelle Gruppe Y_1 an ein Nukleotid in der kurzen Sequenz K und die chemisch funktionelle Gruppe Y_2 an ein Nukleotid in der kurzen Sequenz K' angebunden.

[0056] Chemisch funktionelle Gruppen X_1 und X_2 können identisch oder unterschiedlich sein und die chemisch funktionellen Gruppen Y_1 oder Y_2 können identisch oder unterschiedlich sein, so lange als X_1 eine kovalente Bindung mit Y_1 und X_2 eine kovalente Bindung mit Y_2 ausbilden kann, wenn die kurzen Sequenzen I und K und I' bzw. K' aneinander hybridisiert sind.

[0057] Eine chemisch funktionelle Gruppe ist kovalent an ein Nukleotid in der kurzen Sequenz an einer sterisch tolerablen Stelle angebunden. Eine sterisch tolerable Stelle ist definiert als eine Position auf einer Nukleotidbase oder einer Zuckergruppe, an welcher die chemisch funktionelle Gruppe angebunden werden kann, ohne signifikante Beeinträchtigung der Hybridisierung der kurzen Sequenzen aneinander oder der Hybridisierung der langen Sequenz an die Target- Sequenz oder an die Target komplementäre Sequenz zu verursachen. Sterisch tolerable Stellen schließen Positionen auf den Purin- und Pyrimidinbasen und den polyvalenten Heteroatomen der Basen oder der Ribosestelle des Nukleotids oder modifizierten Nukleotids ein.

[0058] Beispiele von sterisch tolerablen Stellen schließen die Methylgruppe angebracht an der C-5 Position von Thymidin, der Aminogruppe angebracht an der C-6 Position von Adenin oder Cytidin, die C-8 Position von Adenin oder Guanin, die C-2' Position des Riboserings in jedem Typ eines Nukleotids und die Hydroxylgruppe angebunden an die C-2' Position des Riboserings eines Ribonukleotids ein.

[0059] Die Modifizierung der Purin- und Pyrimidinbasen kann beispielsweise durchgeführt werden gemäß den Verfahren, wie sie im Stand der Technik bekannt sind, beispielsweise denjenigen beschrieben von Ruth in EP 135 587. Die Modifizierung eines Ribonukleotids an der C-2' Position des Riboserings des Ribonukleotids kann beispielsweise durchgeführt werden gemäß dem Verfahren beschreiben von Yamana, K. et al. in Bioconjugate Chemistry 1, 319–324 (1990).

[0060] Ein Beispiel von Nukleotiden modifiziert mit einer chemisch funktionellen Gruppe an jeder der oben genannten sterisch tolerablen Stellen sind in **Fig.** 2–6 gezeigt. Wo modifizierte Desoxyribonukleotide in **Fig.** 2–6 gezeigt sind, versteht es sich, dass Ribonukleotide akzeptable Substitute darstellen. Eine Liste von Bezeichnungen der modifizierten Nukleotide wird unten gegeben.
A_1 repräsentiert Adenin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend ein Wasserstoff der Aminogruppe lokalisiert an der C-6 Position.
A_2 repräsentiert Adenin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z angebunden an die Hydroxylgruppe lokalisiert an die C-2'- Position des Riboserings.
A_3 repräsentiert Adenin mit der chemisch funktioneller Gruppe Z ersetzend das Wasserstoff lokalisiert an der C-8 Position.
A_4 repräsentiert Adenin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
C_1 repräsentiert Cytidin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend ein Wasserstoffatom der Aminogruppe lokalisiert an der C-6 Position.
C_2 repräsentiert Cytidin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z angebunden an die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
C_3 repräsentiert Cytidin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
G_1 repräsentiert Guanin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend das Wasserstoff lokalisiert an der C-8 Position.
G_2 repräsentiert Guanin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z angebunden an die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
G_3 repräsentiert Guanin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
T_1 repräsentiert Thymidin in der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend ein Wasserstoff aus der Methylgruppe lokalisiert an der C-5 Position.
T_2 repräsentiert Thymidin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z angebunden an die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position.
T_3 repräsentiert Thymidin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
U_1 repräsentiert Uridin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
U_2 repräsentiert Uridin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z angebunden an die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
Z repräsentiert die chemisch funktionellen Gruppen X_1, X_2, Y_1 oder Y_2.

[0061] Es ist offensichtlich, dass eine relativ große Zahl an Bezeichnungen oben definiert wurde, um die verschiedenen Sequenzen, modifizierten Nukleotide und chemisch funktionellen Gruppen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, zu beschreiben. Einige weitere Bezeichnungen werden unten definiert. Zur Erleichterung des Lesers wird ein Glossar am Ende des Beispielsabschnittes unten gegeben, wo alle diese Bezeichnungen an einer Stelle gesammelt werden.

[0062] Es ist wichtig festzuhalten, dass chemisch funktionelle Gruppen X und Y nicht an den gleichen Positionen auf den jeweiligen Nukleotiden angebunden sein müssen. Beispielsweise und ohne Einschränkung kann die Gruppe X an die Position C-2' eines Nukleotids der kurzen Sequenz von Sonde 1 angebunden sein, und die Gruppe Y könnte an die Position C-6 eines geeigneten Nukleotids der kurzen Sequenz von Sonde 2 angebunden sein.

[0063] Die Position, an welcher die chemisch funktionellen Gruppen an ein Nukleotid in der kurzen Sequenz an einer Sonde angebunden sind, kann die Minimallänge der kurzen Sequenz determinieren. Beispielsweise können, wenn chemisch funktionelle Gruppen an die C-2' Position eines Nukleotids in der kurzen Sequenz von beiden Teilen eines Oligonukleotidpaares gebunden sind, die kurzen Sequenzen gerade einmal zwei bis drei Nukleotidsäuren kurz sein. Jedoch, wenn ein Teil eines Oligonukleotidpaares eine chemisch funktionelle Gruppe, angebunden an die C-2' Position eines Nukleotids, in einer kurzen Sequenz aufweist und der andere Teil des Paares eine chemisch funktionellen Gruppe, angebunden an einer Position verschieden an der C-2' Position, eines Nukleotids in der kurzen Sequenz aufweist, können die kurzen Sequenzen gerade einmal 1–3 Nukleotide kurz sein. In ähnlicher Weise kann, wenn kein Teil eines Oligonukleotidpaares die chemisch funktionelle Gruppe, angebunden an die C-2' Position eines Nukleotids, in seiner kurzen Sequenz aufweist, die kurze Sequenz gerade einmal 1–3 Nukleotide kurz sein.

[0064] Die bevorzugte Position zum Anbinden chemisch funktioneller Gruppen einer Nukleotide ist die C-2' Position des Riboserings des Nukleotids. Beispielsweise ist es günstig, die Hydroxylgruppe an der C-2' Position des Riboserings mit einer Aminogruppe zu ersetzen, beispielsweise durch das Protokoll beschrieben in Moffatt et al., J. Org. Chem. 36, 250 (1971) und Ruth in EP 135 587. Die Aminogruppe kann entweder als chemisch funktionelle Gruppe dienen oder als Überbrückungsgruppe, zum Anknüpfen der chemisch funktionellen Gruppen an dem Ribosering.

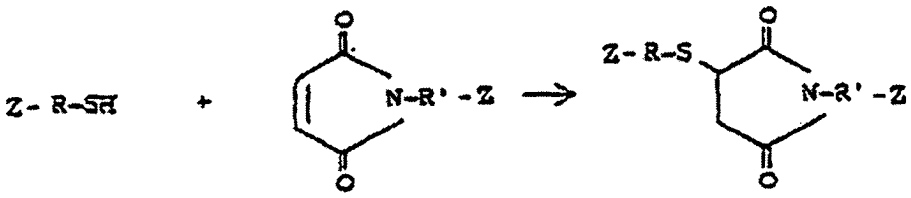
[0065] Chemisch funktionelle Gruppen können optional eine Überbrückungsgruppe enthalten, welche an das Nukleotid angebunden nist. Beispiele von Überbrückungsgruppen schließen ein, sind jedoch nicht limitiert auf Amino, Amido, Thio, Carbonyl, Carboxyl, Alkylgruppen, Arylgruppen, Alkylarylgruppen, Arylalkylgruppen, die optional substituiert an irgendeiner Position sind mit Gruppen z.B. Amido, Carbonyl, Carboxyl, Amino und Thio. Alkylgruppen können zyklisch sein und zwar als Ganze oder teilweise. Beispiele von Alkylgruppen schließen, sind jedoch nicht limitiert auf Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Pentyl, Cyclopentyl, Hexyl, Cyclohexyl, etc. Beispiele von Arylgruppen schließen ein, sind jedoch nicht limitiert auf Phenyl, Naphthyl, Imidazolyl, Indyl, etc. Darüber hinaus bezieht sich die Bezeichnung "Ph" wie hier verwendet auf eine Phenylgruppe. Eine Phenylgruppe substituiert beispielsweise an Position 1 und 3, wird als 1,3Ph bezeichnet.

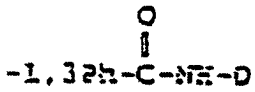
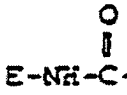
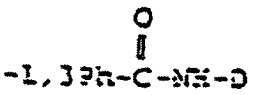
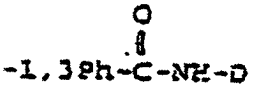
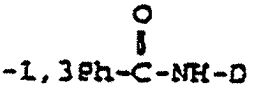
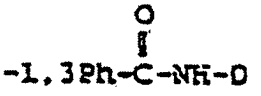
[0066] Einige spezielle Beispiele der chemischen Reaktionen geeignet für das vorliegende Verfahren werden unten dargestellt. In diesen Beispielen repräsentiert D modifizierte Nukleotide A_4, C_3, G_3, T_3 oder U_1; E repräsentiert modifizierte Nukleotide A_1 oder C_1; F repräsentiert modifizierte Nukleotide A_3 oder G_1; und L repräsentiert modifizierte Ribonukleotide A_2, C_2, G_2, T_2 und U_2, abgebildet in den **Fig.** 2–6. (Siehe auch "Glossar" unten am Ende des Beispielsabschnitts).

[0067] In einem gegebenen Paar von komplementären kurzen Sequenzen weist beispielsweise ein Teil des Paares eine nukleophile chemisch funktionelle Gruppe auf und der andere Teil des Paares eine elektrophile chemisch funktionelle Gruppe. (D.h., falls X in **Fig.** 1 nukleophil ist, dann ist Y elektrophil und umgekehrt).

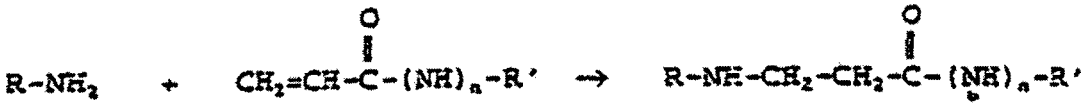
[0068] Einige Beispiele der Nukleophile schließen ein – SH, – NH_2, – NHA (wobei A eine Alkylgruppe ist, wie z.B. Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, etc. oder eine Arylgruppe, z.B. Phenyl, Naphthyl, Imidazolyl, Indyl, etc.). Elektrophile sind in der Lage, Einfach- oder Doppelbindung via Elektronentransfer von einem Nukleophil auszubilden. Die Reaktion zwischen dem Nukleophil und dem Elektrophil kann die Addition des Nukleophils über eine Doppelbindung angebunden an eine elektronenziehende Gruppe oder die Substitution eines Nukleophils als Ersatz für eine elektrophile Abgangsgruppe involvieren.

[0069] Beispiele für die Addition eines Nukleophils über eine Doppelbindung, die die Addition einer Thiolgruppe an eine Doppelbindung einer Maleimidgruppe involvieren, sind unten gezeigt. Das allgemeine Schema der Reaktion ist wie folgt, wobei R-Z und R'-Z irgendeines der modifizierten Nukleotide, dargestellt in den **Fig.** 2–6, repräsentieren:



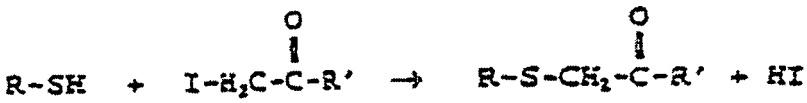
R	R'
D-NH-1,4Ph-	
	
F-NH-1,4Ph-	
L-NH-1,4Ph-	
T_1-NH-1,4Ph-	

[0070] Das allgemeine Schema der Michael Reaktion ist wie folgt:



R	R'	n
D-	-D	0
D-	-D	1
E-CH_2-CH_2-	-D	0
E-CH_2-CH_2-	-D	1
F-	-D	0
F-	D	0
F-	-D	1
L-	-D	0
L-	-D	1
T_1-	-D	0
T_1-	-D	1

[0071] Das allgemeine Schema der Reaktion involvierend die Substitution eines Nukleophils anstelle einer elektrophilen Abgangsgruppe ist wie folgt:



R	R'
D-NH-C(=O)-CH_2-	-D
E-NH-C(=O)-CH_2-	-D
F-NH-C(=O)-CH_2-	-D







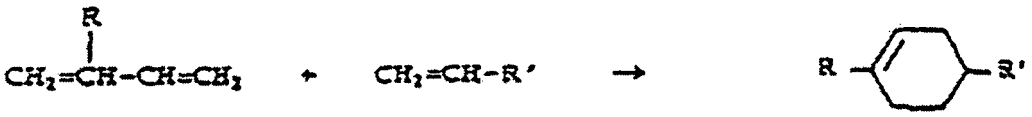






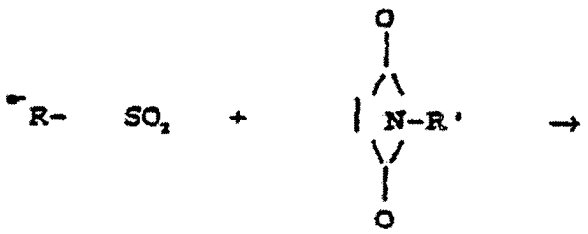


[0072] Andere Typen der Reaktionen zwischen chemisch funktionellen Gruppen sind beispielsweise die Diels- Alder Reaktion oder irgendeine perizyklische Reaktion, die eine oder mehrere kovalente Bindungen erzeugt. Das allgemeine Schema der Diels- Alder Reaktion ist wie folgt:



R	R'
D-NH-C(=O)-CH$_2$-	-1,3Ph-C(=O)-NH-D
E-NH-C(=O)-CH$_2$-	-1,3Ph-C(=O)-NH-D
F-NH-C(=O)-CH$_2$-	-1,3Ph-C(=O)-NH-D
L-NH-C(=O)-CH$_2$-	-1,3Ph-C(=O)-NH-D
T$_1$-NH-C(=O)-CH$_2$-	-1,3Ph-C(=O)-NH-D

[0073] Weitere Beispiele der Diels- Alder Reaktionen zwischen chemisch funktionellen Gruppen sind wie folgt:



R

R'

D-NH-C(=O)-CH$_2$-

-1,3Ph-C(=O)-NH-D

E-NH-C(=O)-CH$_2$-

-1,3Ph-C(=O)-NH-D

F-NH-C(=O)-CH$_2$-

-1,3Ph-C(=O)-NH-D

L-O-CH$_2$-

-CH$_2$-O-D

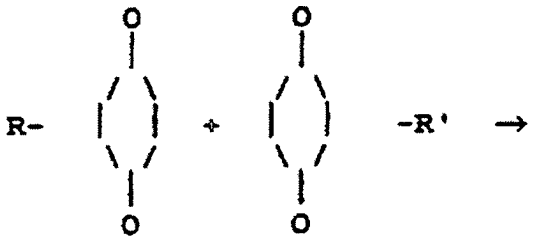
T$_1$-NH-C(=O)-CH$_2$-

-1,3Ph-C(=O)-NH-D

[0074] Chemisch funktionelle Gruppen, die kovalente Bindungen über Photochemische Reaktionen wie z.B. [2+2] Photo- Cyclodimerisierung oder andere Arten von Photocyclisierungen ausbilden, können auch aus ausgewählt werden. Ein Beispiel einer [2+2] Photo-Cyclodimerisierungsreaktion ist unten gezeigt.

R	R'
D-	-D
E-	-D
F-	-D
L-	-D
T_1-	-D

[0075] Weitere Beispiele einer [2+2] Photo- Cyclodimerisierungsreaktion zwischen chemisch funktionellen Gruppen sind unten gezeigt. Das allgemeine Schema der Reaktion ist wie folgt:



R	R'
D-O-CH_2-	-CH_2-O-D
E-O-CH_2-	-CH_2-O-D
F-O-CH_2-	-CH_2-O-D
L-O-CH_2-	-CH_2-O-D
T_1-O-CH_2-	-CH_2-O-D

[0076] Ein weiteres Beispiel einer photocyclischen Reaktion zwischen chemisch funktionellen Gruppen wird unten gezeigt, wobei eine Phenylgruppe an der 2 Position mit einer NO_2-Gruppe substituiert ist und an der 4 Position mit einer OCH_3- Gruppe. Die substituierte Phenylgruppe wird bezeichnet als (2, NO_2, 4, OCH_3- Ph). R und R' repräsentieren irgendwelche natürlich vorkommenden Desoxyribonukleotide oder Ribonukleotide.

R-NH_2 + CH_3O-(2, NO_2 , 4. OCH_3-Ph)-NH-R' → R-NH-(2. NO_2, 4, OCH_3-Ph)-NH-R' + CH_3OH

Beschreibung der chemischen Amplifizierung und des Detektionsprozesses

[0077] Die Amplifizierung einer Nukleinsäure- Target- Sequenz wird in der vorliegenden Erfindung realisiert durch Verbinden von zwei oder mehreren chemisch modifizierten Oligonukleotidsonden für jeden Strang eines Nukleinsäure- Target- Moleküls, um ein verknüpftes Oligonukleotid- Produkt auszubilden. Einmal ausgebildet dient das verknüpfte Oligonukleotid- Produkt als Templat für die weitere Produktion von verknüpften Oligonukleotid- Produkten. Die Schritte des Verfahrens werden wiederholt in einer hinreichenden Anzahl von Wiederholungen, um nachweisbare Mengen von verknüpften Oligonukleotid- Produkten auszubilden. Jede Wiederholung der Schritte des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird als ein Zyklus bezeichnet. Die Anzahl der Zyklen, die notwendig ist, um nachweisbare Mengen von verknüpften Oligonukleotid- Produkten herzustellen, hängt größtenteils von der Anzahl der Targetmoleküle ab, die zu Beginn in einer Probe vorliegen. Je größer die Anzahl der Zahlmoleküle in einer Probe ist, um so weniger groß ist die Zykluszahl notwendig, um nachweisbare Mengen des verknüpften Olignonukleotidproduktes zu erzeugen. Wenn eine gewünschte Anzahl von verknüpften Oligonukleotid- Produkten ausgebildet wird, wird sie detektiert. Ein neuer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Art und Weise, in welcher die Oligonukleotidsonden die verknüpften Oligonukleotid- Produkte ausbilden. Weder DNA- Polymersase noch DNA-Ligase werden in der vorliegenden Erfindung verwendet, um die verknüpften Oligonukleotid- Produkte auszubilden.

[0078] Sonden 1, 1' und 2 und 2' werden in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung wie folgt verwendet, um Target- Sequenzen in einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäuremolekülen zu amplifizieren.

[0079] Wie oben beschrieben hybridisieren, wenn eine Target- Sequenz in einer Testprobe vorliegt, unter sorgsam kontrollierten Hybridisierungsbedingungen, nur lange Sequenzen H und J von Oligonukleotidsonden

1 bzw. 2 an benachbarte Regionen der Target-Sequenz. Dies lässt die kurzen Sequenzen I und K der Sonden 1 bzw. 2 unhybridisiert an die Target- Sequenz. Wenn die langen Sequenzen H und J stabile Hybridkomplexe mit der Target- Sequenz ausgebildet haben, werden die kurzen Sequenzen in Nähe zueinander gezwungen und, da sie komplementär sind, hybridisieren aneinander. Wenn die Sequenzen I und K aneinander hybridisieren, werden die chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1 in hinreichend nahe Entfernung zueinander gebracht, um eine kovalente Bindung auszubilden. Die Bindung zwischen chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1 verknüpft Sonde 1 mit Sonde 2, wobei ein erstes verknüpftes Oligonukleotid-Produkt ausgebildet wird. Einmal ausgebildet konstituieren diese beiden Sequenzen des ersten verknüpften Oligonukleotid- Produktes eine "Target komplementäre Sequenz" und sind komplementär zu benachbarten Sequenzen der Target- Sequenz.

[0080] In ähnlicher Art und Weise hybridisieren, wenn lange Sequenzen H' und J' zu Sonden 1' bzw. 2' an die benachbarten Regionen der Target komplementären Sequenzen hybridisieren, die kurzen Sequenzen I' und K' zu Sonden 1' und 2' aneinander. Die Hybridisierung der kurzen Sequenzen I' und K' bringt die chemisch funktionellen Gruppen X_2 der Sequenz I' in die chemisch funktionelle Gruppe Y_2 der Sequenz K' in hinreichende Nähe, um eine kovalente Bindung auszubilden, welche die Sonden 1' und 2' aneinanderknüpft, um ein zweites verknüpftes Oligonukleotid- Produkt zu erzeugen. Einmal ausgebildet, konstituieren die beiden Sequenzen des zweiten verbundenen Oligonukleotidsproduktes eine "Target- Sequenz" und sind komplementär zu den benachbarten Sequenzen der Target komplementären Sequenz.

[0081] Die chemisch funktionellen Gruppen auf jeder Sonde werden geschützt und abgeschirmt durch Nukleotide der kurzen Sequenzen, an welchen die Gruppen angebunden sind und ihre benachbarten Nukleotide gegen die chemisch funktionellen Gruppen auf anderen Sonden, wenn die kurze Sequenz der Sonde nicht hybridisiert an die kurze Sequenz einer anderen Sonde ist. Eine allgemeine Illustrierung einer geschützten chemisch funktionellen Gruppe, angebunden an der kurzen Sequenz, wird in **Fig.** 8 wiedergegeben.

[0082] Als ein Ergebnis des Schutzes der chemisch funktionellen Gruppe durch die Nukleotide der kurzen Sequenz wird jede chemische funktionelle Gruppe daran gehindert, mit den chemisch funktionellen Gruppen auf anderen Sonden zu reagieren, so lange bis die chemisch funktionellen Gruppen in hinreichende kleine Nähe durch Hybridisierung der kurzen Sequenzen miteinander gebracht werden.

[0083] Verallgemeinerte Illustrierungen der beiden hybridisierten kurzen Sequenzen mit chemisch funktionellen Gruppen angebunden an die Nukleotidbasen, dargestellt in **Fig.** 2–6, sind in **Fig.** 9–13 gezeigt. Es versteht sich, dass in **Fig.** 9–13 chemisch funktionelle Gruppen X und Y aneinander über kovalente Bindungen verknüpft sind.

[0084] Wie aus **Fig.** 9 ersichtlich ist, können die chemisch funktionellen Gruppen X und Y an die C-2' Position des Riboserings eines jeden Nukleotids B angebunden werden. Die Nukleotidbasen, an welche die chemisch funktionellen Gruppen angebunden sind, sind nicht aneinander hybridisiert. Stattdessen ist die chemisch funktionelle Gruppe an das Nukleotid angebunden, das an das Nukleotid hybridisiert benachbart zu dem Nukleotid, an welchem die chemisch funktionelle Gruppe Y angebunden ist.

[0085] Wie aus **Fig.** 10 ersichtlich ist, kann die chemisch funktionelle Gruppe X an die C-2' Position des Riboserings angebunden werden. Eine Nukleotidbase B an der chemisch funktionelle Gruppe Y kann entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Position einer Nukleotidbase angebunden werden. In der Ausführungsform, gezeigt in **Fig.** 10, sind die Nukleotidbasen, an welche die chemisch funktionellen Gruppen angebunden sind, nicht miteinander hybridisiert.

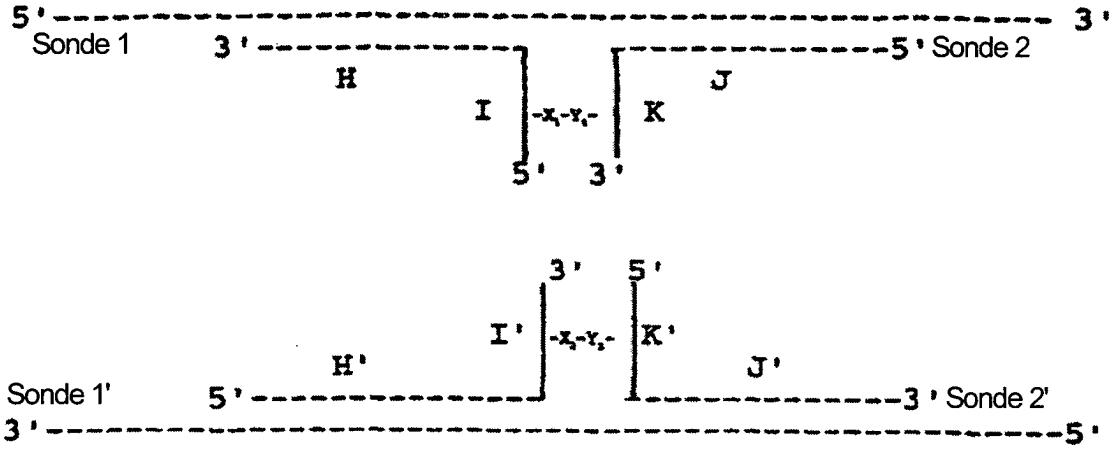
[0086] Wie aus **Fig.** 11 ersichtlich ist, kann die chemisch funktionelle Gruppe an die C-2' Position des Riboserings an einer Nukleotidbase B angebunden sein und die chemisch funktionelle Gruppe Y kann entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Position einer Nukleotidbase B angebunden sind. In der Ausführungsform, wie in **Fig.** 11 gezeigt, sind die Nukleotidbasen, an welche die chemisch funktionellen Gruppen angebunden sind, miteinander hybridisiert.

[0087] Wie aus **Fig.** 12 ersichtlich ist, kann die chemisch funktionelle Gruppe X entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Position einer Nukleotidbase B angebunden sein und die chemisch funktionelle Gruppe Y kann entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Position einer Nukleotidbase B angeknüpft sein. In der Ausführungsform, wie in **Fig.** 12 gezeigt, sind die Nukleotidbasen, an welche die chemisch funktionellen Gruppen angebunden sind, aneinander hybridisiert.

[0088] Wie aus **Fig.** 13 ersichtlich ist, kann die chemisch funktionelle Gruppe X entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Position einer Nukleotidbase B angebunden sein und die chemisch funktionelle Gruppe Y kann entweder an die C-5, C-6 oder C-8 Position einer Nukleotidbase B angeknüpft sein. In der Ausführungsform, wie in **Fig.** 13 gezeigt, sind die Nukleotidbasen, an welche die chemisch funktionellen Gruppen angebunden sind, nicht miteinander hybridisiert.

[0089] Eine verallgemeinerte Illustrierung von beiden Paaren von Oligonukleotidsonden hybridisiert an ein doppelsträngiges Targetmolekül und verbunden durch chemisch funktionelle Gruppen, um ein erstes und ein zweites verknüpftes Oligonukleotid- Produkt auszubilden, wird unten gezeigt. Es versteht sich, dass in den bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kein Abstand zwischen den Sonden liegt, obwohl ein Abstand von ein oder zwei Nukleotiden zulässig ist.

Target- Sequenz



Target komplementäre Sequenz

[0090] In einer Probe enthaltend ein einzelsträngiges Targetmolekül wird das zweite verknüpfte Oligonukleotid- Produkt ausgebildet nach dem ersten Zyklus. Um ein zweites verknüpftes Oligonukleotid- Produkt in der Abwesenheit eines Target komplementären Moleküls auszubilden, muss ein erstes verknüpfte Oligonukleotid- Produkt in dem ersten Zyklus des Verfahrens ausgebildet werden. Das erste verknüpfte Oligonukleotid- Produkt weist eine Target komplementäre Sequenz auf und fungiert als Templat, an welches die Sonden 1' und 2' hybridisieren. Die Sonden 1' und 2' bilden ein zweites verknüpftes Oligonukleotid- Produkt aus, das die Target-Sequenz für den zweiten Zyklus und die nachfolgenden Zyklen des Verfahrens aufweist.

[0091] Sobald das erste verknüpfte Oligonukleotid- Produkt in dem ersten Zyklus des Verfahrens ausgebildet ist, wird das Produkt von der Target- Sequenz durch Denaturierung abgetrennt. Die Bezeichnung "denaturieren" oder "Denaturierung", wie hier verwendet, bedeutet den reversiblen Verlust von höher geordneter Struktur und die Trennung von hybridisierten Nukleinsäuren in Einzelstränge, erzeugt durch physiologische oder nicht physiologische Bedingungen wie z.B. Enzyme, pH, Temperatur, Salz oder organische Lösungsmittel.

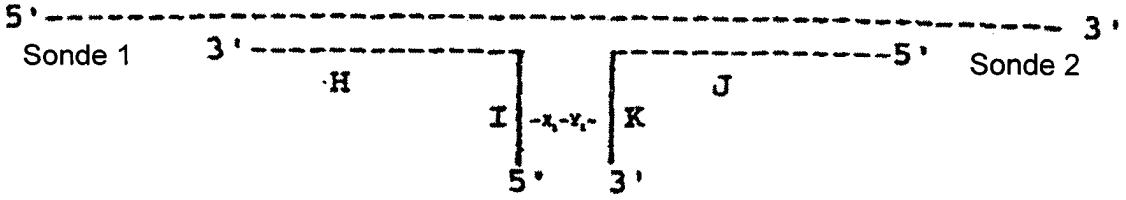
[0092] Das zweite verknüpfte Oligonukleotid- Produkt wird auch ein abgetrennt von der Target komplementären Sequenz oder dem ersten verknüpften Oligonukleotid- Produkt und zwar durch Denaturierung, sobald es ausgebildet ist. Das Targetmolekül und das erste und zweite verknüpfte Oligonukleotid- Produkt dienen als Template für wiederholte Zyklen des Verfahrens.

[0093] Eine allgemeine Illustrierung des ersten Zyklus des Amplifikationsprozesses der vorliegenden Erfindung für eine einzelsträngige Sequenz wird unten dargestellt.

Schritt 1

[0094] Hybridisierung der Sonde an die Target- Sequenz und Verknüpfung der Sonde über die chemisch funktionellen Gruppen, um ein erstes verknüpftes Oligonukleotid- Produkt auszubilden.

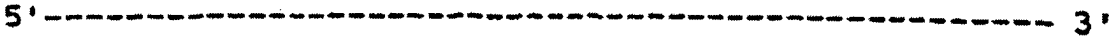
Target- Sequenz



[0095] Denaturierung des ersten verknüpften Oligonukleotid- Produktes von der Target-Sequenz.

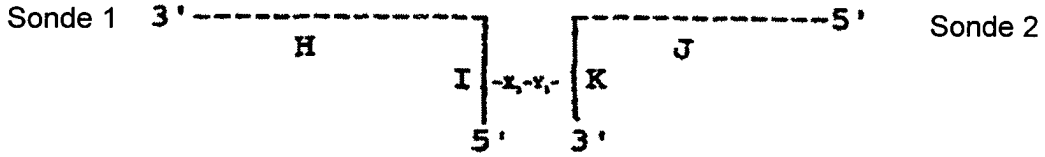
↓

Target- Sequenz



+

Erstes verknüpftes Oligonukleotid- Produkt

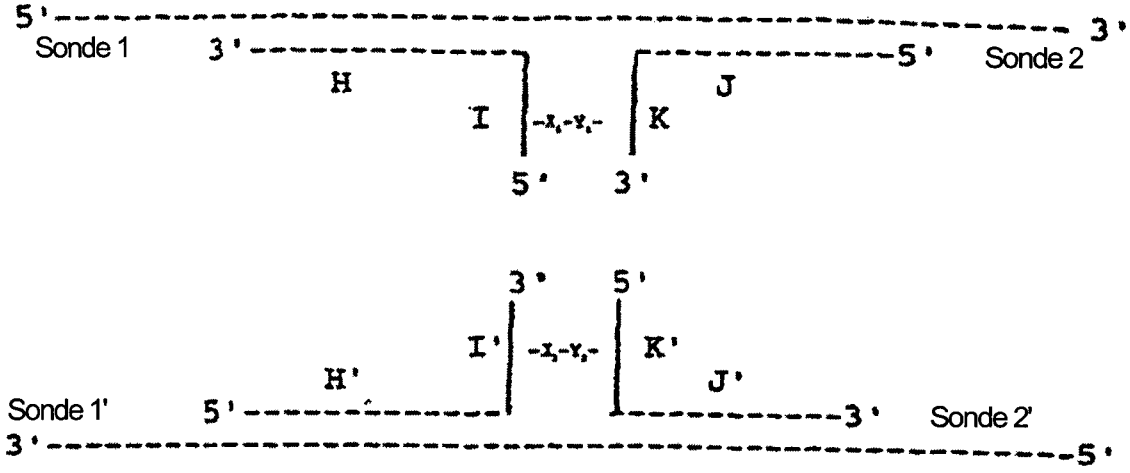


[0096] Eine verallgemeinerte Illustrierung des ersten Zyklus des Amplifikationsprozesses für eine doppelsträngige Sequenz ist unten gezeigt.

Schritt 1

[0097] Hybridisierung der Sonde an die Target- Sequenz und die Target komplementäre Sequenz und Verknüpfen der Sonde über die chemisch funktionellen Gruppen, um verknüpfte Oligonukleotid- Produkte auszubilden.

Target- Sequenz

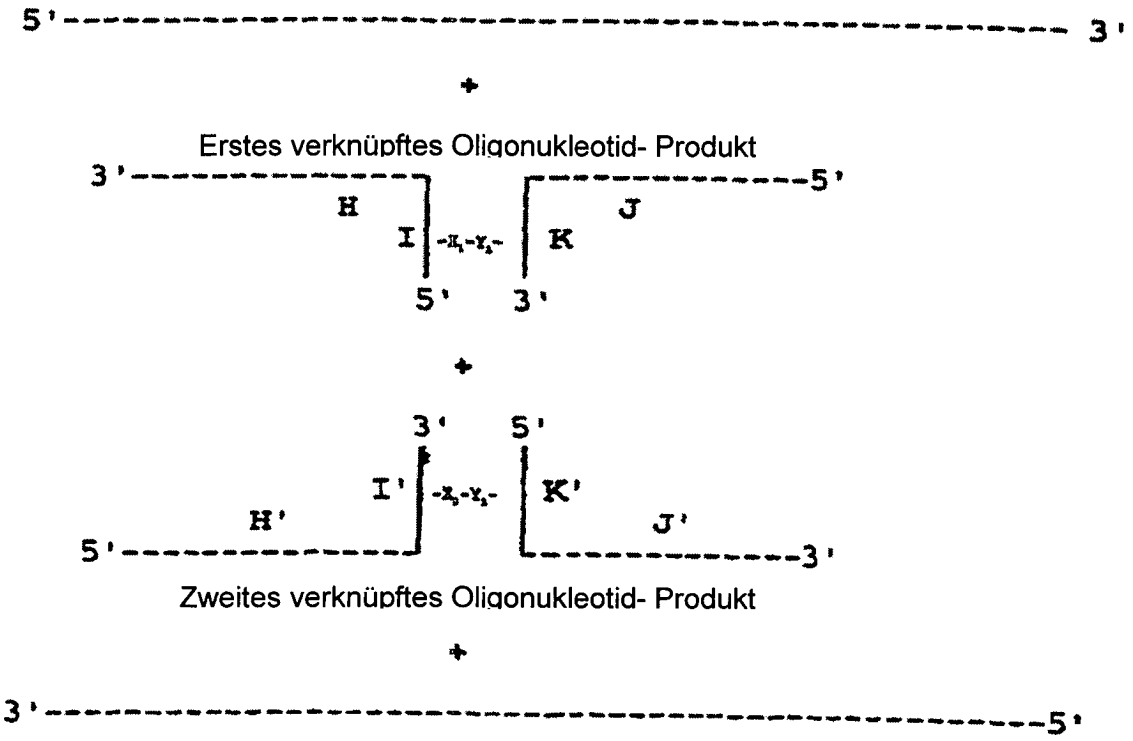


Target komplementäre Sequenz

[0098] Denaturierung des ersten und zweiten verknüpften Oligonukleotid- Produkts von der Target- Sequenz

bzw. der Target komplementären Sequenz

Target- Sequenz



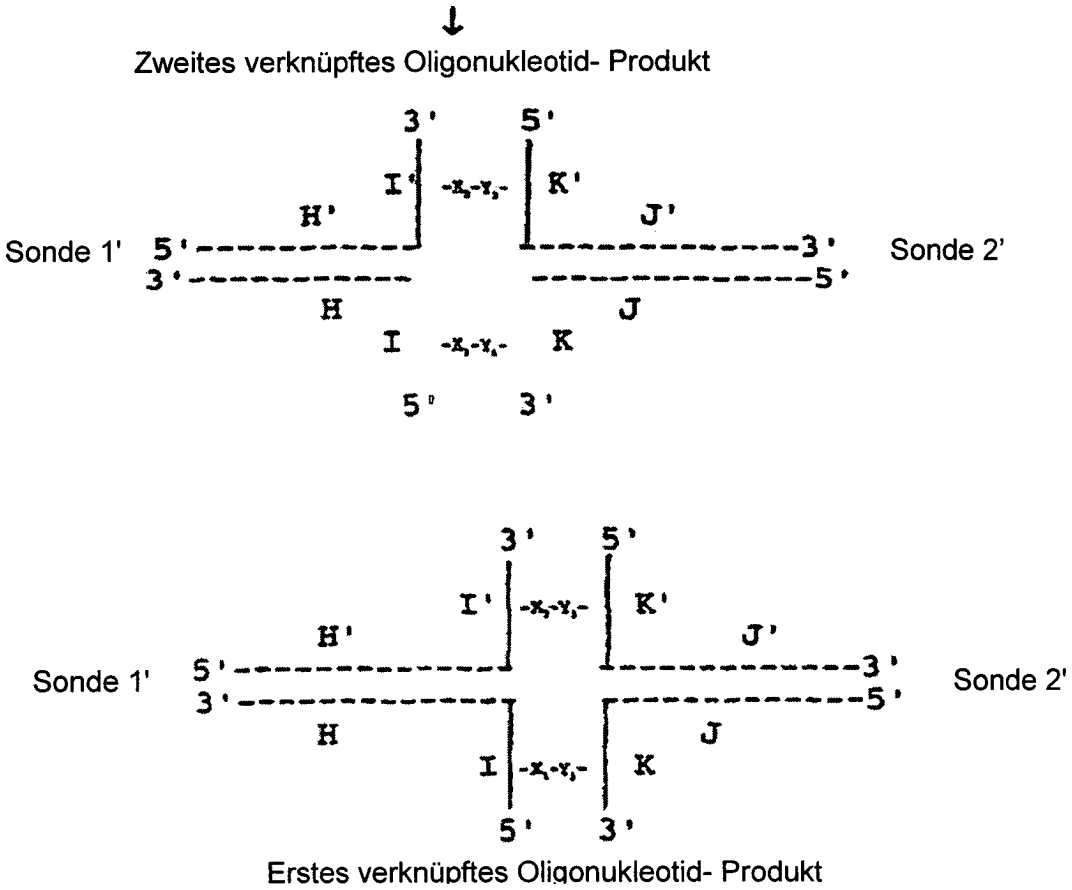
Target komplementäre Sequenz

[0099] Sobald der erste Zyklus des Prozesses fertig ist, wird weitere Amplifizierung der Target-Sequenz durch wiederholte Zyklen der Denaturierung der verknüpften Oligonukleotid-Produkte erreicht, durch Annealen der Sondenpaare an die verknüpften Oligonukleotid-Produkte und Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen den chemisch funktionellen Gruppen auf den kurzen Sequenzen, um mehr verknüpfte Oligonukleotid-Produkte zu erzeugen. Alle Zyklen nach dem ersten Zyklus weisen notwendigerweise sowohl Target- Sequenz (einzel- und doppelsträngige Targetmoleküle und zweite verknüpfte Oligonukleotid- Produkte) und Target komplementäre Sequenz (doppelsträngiges Targetmolekül und erste Oligonukleotid- Produkte) auf.

[0100] Eine allgemeine Illustrierung der Fähigkeit des ersten und zweiten verknüpften Oligonukleotid- Produktes, als ein Templat für die Ausbildung von zusätzlichen ersten und zweiten verknüpften Oligonukleotid-Produkten zu fungieren und zwar während des zweiten und allen nachfolgenden Zyklen des Amplifikationsprozesses für eine einzelsträngige und doppelsträngige Target- Sequenz, wird unten gezeigt.

Schritt 2

[0101] Hybridisierung der Sonde an die Target- Sequenz und die Target komplementäre Sequenz aus den ersten und zweiten verknüpften Oligonukleotid- Produkten im vorangegangenen Schritt und Verknüpften der Sonden, um mehr verknüpfte Oligonukleotid-Produkte auszubilden.



[0102] Targetunabhängige Hybridisierung der kurzen Sequenzen wird vermieden durch Aufrechterhalten einer Reaktionstemperatur hinreichend unterhalb der Schmelztemperatur T_m der langen Sequenzen (H, H', J und J'), um stabile Hybridisierung der langen Sequenzen an die Target- Sequenz oder die Target komplementäre Sequenz zu erlauben, jedoch oberhalb des Tm der kurzen Sequenzen (I, I', K und K'), um zu verhindern, dass die kurzen Sequenzen stabil aneinander hybridisieren, wenn die Sonden nicht vollständig an die Target- Sequenz oder die Target komplementäre Sequenz hybridisieren. Unter solch stringenten Bedingungen hybridisieren die komplementären kurzen Sequenzen (I und K; I' und K') aneinander nur wenn die langen Sequenzen der Sonden an benachbarte Teile der Target- Sequenz oder der Target komplementären Sequenz hybridisiert sind. Die kurzen Sequenzen können dann hinreichend stabile Hybride ausbilden, was den chemisch funktionellen Gruppen erlaubt, zu reagieren, und das verknüpfte Oligonukleotid- Produkt auszubilden. Dementsprechend muss die Länge der kurzen Sequenzen so gewählt werden, dass unter den Reaktionsbedingungen, die verwendet werden, ihre Tm hinreichend niedrig sind, um Target unabhängige Hybridisierung der kurzen Sequenzen zu vermeiden, wohingegen die Länge der langen Sequenzen so gewählt werden muss, dass sie effizient stabile Hybride mit der Target- Sequenz oder der Target komplementären Sequenz ausbilden.

[0103] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die lineare Amplifikation einer Target- Sequenz oder einer Target komplementären Sequenz, falls vorhanden, realisiert werden durch Verwendung von nur den Sonden 1 und 2 oder den Sonden 1' und 2' in dem oben genannten Verfahren.

[0104] Einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Standardhybridisierungspuffer, wie z.B. 30% deionisiertes Formamid in Wasser (vol/ vol), 0,54 M NaCl, 0,03 M Natriumphosphat (pH 7,4), 0,003 M EDTA, 5% Dextransulfat 500K m.w. (Sigma) (w/ vol) und 0,1% Triton X- 100, mit Oligonukleotiden einer beliebigen Länge von sechs bis einhundert Nukleotiden verwendet. Nur die Temperatur der Denaturierung und die Temperatur der Hybridisierung verändern sich, wenn sich die Länge (genauer gesagt der Tm) der Oligonukleotidsonden ändert. Die Hybridisierungstemperatur und die Denaturierungstemperatur sind beide Funktionen der Länge der Oligonukleotidsonden. Die folgende Tabelle zeigt eine bevorzugte durchschnittliche Beziehung der Länge der Oligonukleotidsonden zu den Hybridisierungs- und Denaturierungstemperaturen.

Länge der Sonden	Hybridisierungstemperatur	Denaturierungstemperatur
6 Nukleotide	20°C	40°C
12 Nukleotide	30°C	60°C
16 Nukleotide	45°C	64°C
24 Nukleotide	55°C	85°C
32 Nukleotide	65°C	90°C

[0105] Im Allgemeinen werden Oligonukleotidpaare in einem molaren Überschuss von ungefähr 10^5-10^{15}, vorzugsweise 10^9-10^{15}, Paaren pro Nukleinsäure Target- Sequenz oder Target komplementäre Sequenz vorliegen. Die exakte Anzahl der zu verwendenden Paare für diagnostische Zwecke kann nicht bekannt sein aufgrund der Unsicherheit betreffend die Menge der Targetnukleinsäure in einer Probe. Jedoch die Verwendung einer durchschnittlichen Menge von 10^5 Oligonukleotidpaaren ist in einem typischen Diagnose- Assay- Format anwendbar. Ein großer molarer Überschuss ist in jedem Fall bevorzugt, um die Effizient des Verfahrens der Erfindung zu verbessern.

[0106] Da die chemisch funktionellen Gruppen gegen Reaktion und Verknüpfung der Sonden aneinander geschützt sind, falls die langen Sequenzen von beiden Sonden nicht an die Target- Sequenz hybridisiert haben und die kurzen Sequenzen der Sonden nicht aneinander hybridisiert haben, wird die Ausbildung eines Targetunabhängigen verknüpften Oligonukleotid- Produktes vermieden. Sobald eine hinreichende Menge des verknüpften Oligonukleotid- Produktes hergestellt worden ist, werden diese durch Routineverfahren im Stand der Technik detektiert, wie z.B. das Immobilisieren eines Teils eines verknüpften Oligonukleotid- Produktes (d.h. 1 oder 1') und durch Labeln des anderen Teils (d.h. 2 oder 2'), beispielsweise mit einem oder mehreren radioaktiven, chromogenen, chemilumineszenten oder fluoreszenten Signalen oder durch Größenauftrennung des verknüpften Oligonukleotid- Produktes auf einem Gel.

[0107] Verfahren zum Labeln von Oligonukleotidsonden wurden beispielsweise von Leary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80:4045; Renz and Kurz, Nucl. Acids Res. (1984) 12:3435; Richardson and Gumport, Nucl. Acids Res. (1983) 11:6167; Smith et al., Nucl. Acids Res. (1985) 13:2339; und Meinkoth and Wahl, Anal. Biochem. (1984) 138:267 beschrieben.

[0108] Der Label kann radioaktiv sein. Einige Beispiele von verwendbaren radioaktiven Labeln schließen ^{32}P, ^{25}I, ^{131}I und ^{3}H ein. Die Verwendung radioaktiver Label wurde beschrieben in U.K. 2,034,323, US 4,358,535 und US 4,302,204.

[0109] Einige Beispiele von nichtradioaktiven Labeln schließen Enzyme, Chromophore, Atome und Moleküle ein, die detektierbar durch Elektronenmikroskopie sind und Metallionen detektierbar durch ihre magnetischen Eigenschaften.

[0110] Einige verwendbare enzymatische Label schließen Enzyme ein, die eine detektierbare Veränderung in einem Substrat erzeugen. Einige verwendbare Enzyme und ihre Substrate schließen beispielsweise ein, Meerrettich Peroxidase (Pyrogallol und o-Phenylendiamin), beta-Galactosidase(Fluorescin beta-D-galactopyranosid) und Alkalinphosphatase (5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat/Nitroblautetrazolium). Die Verwendung von enzymatischen Labeln wurde in U.K. 2,019,404, EP 64,879 und von Rotman, Proc. Natl. Acad. Sci., 47, 1981–1991 (1961) beschrieben.

[0111] Verwendbare Chromophore schließen beispielsweise ein fluoreszente, chemilumineszente und bioluminezente Moleküle, wie auch Farbstoffe. Einige spezielle Chromophore für die vorliegende Erfindung schließen beispielsweise Fluorescin, Rhodamin, Texas Red, Phycoerythrin, Umbelliferon und Luminol ein.

[0112] Die Detektion von verknüpften Oligonukleotid- Produkten wird durch Verfahren durchgeführt, die im Stand der Technik bekannt sind, wie z.B. mit einem radioaktiven Label oder mit einem nichtradioaktiven Einfang- Assay (capture assay). Beispielsweise werden verknüpfte Oligonukleotid- Produkte mit einem radioaktiven Label durch Audioradiografie nach Größenauftrennung der verknüpften Oligonukleotid- Produkte auf einem Gel detektiert. Alternativ werden verknüpfte Oligonukleotid- Produkte in einem nichtradioaktiven Einfang-Assay durch Anbinden eines Rezeptors, wie z.B. Biotin, an Sonde 1 und Anknüpfen eines enzymatischen Labels, wie z.B. alkalische Phosphatase an Sonde 2 detektiert. Eine Mikrotiterplatte gecoated mit einem Ligan-

den für den Rezeptor, wie z.B. Avidin, wird verwendet, um die Sonde 1 über das an die Sonde angebundene Biotin einzufangen. Der angebundene enzymatische Label und Sonde 2 wird einem chromogenen Substrat ausgesetzt, wie z.B. 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat/Nitroblautetrazolium, und eine colorimetrische Veränderung in dem Substrat wird detektiert durch Messung der optischen Dichte (O.D.) der Lösung.

[0113] Die Labels können konjugiert an ein Antikörper oder eine Nukleotidsonde sein durch Verfahren, die im Stand der Technik wohl bekannt sind. Die Label können direkt über eine funktionelle Gruppe auf der Sonde gebunden sein. Die Sonde enthält entweder solch eine funktionelle Gruppe oder kann dazu gebracht werden, eine solche zu enthalten. Einige Beispiele für geeignete funktionelle Gruppen schließen ein z.B. Amino, Carboxyl, Sulfhydryl, Maleimid, Isocyanat, Isothiocyanat.

[0114] Alternativ können Label, wie z.B. Enzyme und Chromophormoleküle an Antikörper gebunden werden oder an Nukleotide mit Hilfe von Koppelagenzien, wie z.B. Dialdehyde, Carbodiimide, Dimaleimide oder dergleichen.

[0115] Die Label können auch an die Sonde mit Hilfe eines Liganden gebunden werden, der an die Sonde gebunden wird durch ein Verfahren wie oben beschrieben und einen Rezeptor, für diesen Liganden angebunden an das Label. Jede der bekannten Ligand-Rezeptorkombinationen ist geeignet. Einige geeignete Ligand-Rezeptorpaare schließen beispielsweise Biotin- Avidin oder Biotin- Streptavidin und Antikörper- Antigen ein. Die Biotin- Avidin- Kombination ist bevorzugt.

[0116] Falls ein Label verwendet wird, um das verknüpfte Oligonukleotid- Produkt zu detektieren, können die Label entweder an die lange Sequenz oder die kurze Sequenz einer oder beider Sonden gebunden werden.

[0117] Mehr als zwei Oligonukleotidsonden pro Nukleinsäure- Target- Molekül können in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, um verschiedene Target-Sequenzen in dem gleichen Nukleinsäure- Target- Molekül zu detektieren. Verknüpfte Oligonukleotid- Produkte von verschiedenen Sequenzen des gleichen Nukleinsäure-Target- Moleküls können voneinander unterschieden werden beispielsweise durch verschiedene Label oder durch Verwenden von Sonden von unterscheidbar verschiedenen Längen.

[0118] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die kurze Sequenz der Oligonukleotidsonde ein Palindrom. Dies befähigt die komplementären Sequenzen des Panlindroms miteinander zu hybridisieren und darüber hinaus die chemische Gruppe mit anderen chemisch funktionellen Gruppen zu reagieren, wenn die lange und die kurze Sequenz der Sonden nicht richtig wie oben beschrieben hybridisiert sind. Zwei Beispiele dieser Ausführungsform sind unten illustriert für Sonde 1. (Die Doppelvertikallinien in der Abbildung unten stellen in erster Linie die Abgrenzung zwischen der langen und der kurzen Sequenz einer jeden Sonde dar).

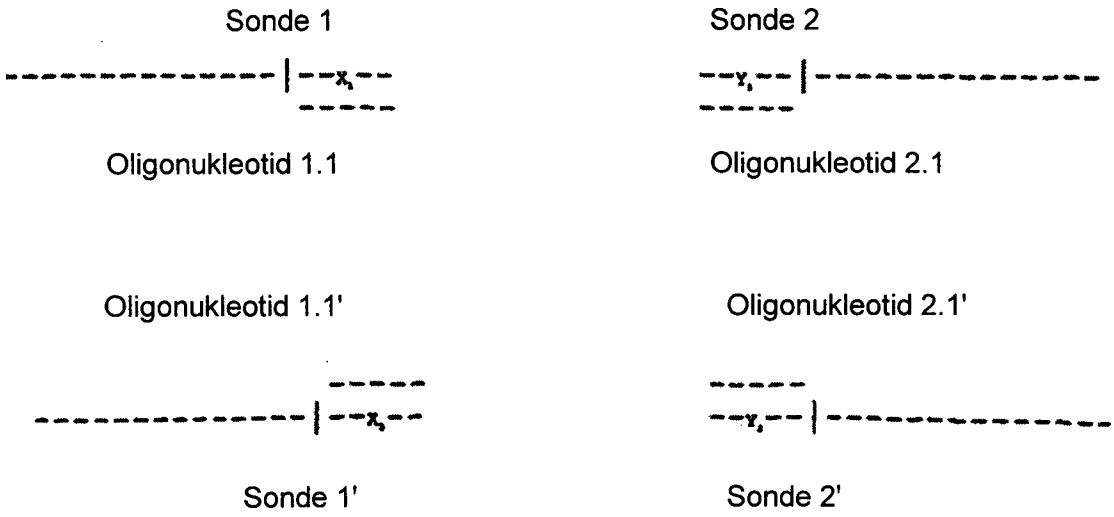




[0119] In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Oligonukleotide 1.1, 1.1', 2.1 und 2.1' bereitgestellt, die komplementär nur zu den kurzen Sequenzen der Sonden 1, 1', 2 bzw. 2' sind. Oligonukleotide 1.1, 1.1', 2.1 und 2.1' weisen keine chemisch funktionellen Gruppen, angebunden an die Sequenzen, auf. Wenn nichtchemisch modifizierte Oligonukleotide 1.1, 1.1', 2.1 und 2.1' an die kurzen Sequenzen der Sonden 1, 1', 2 bzw. 2' hybridisiert sind, schützen die nichtchemisch modifizierten Sonden die chemisch funktionellen Gruppen auf den Sonden gegen die Reaktion miteinander.

[0120] Während des Denaturierungsschritts der vorliegenden Erfindung werden die Sonden 1, 1', 2 und 2' von den Oligonukleotiden 1.1, 1.1', 2.1 bzw. 2.1' denaturiert und die chemisch funktionellen Gruppen angebunden an die kurzen Sequenzen der Sonden 1, 1', 2 und 2' sind nicht länger von den Oligonukleotiden geschützt. Wenn die Sonden 1 und 2 an die Target- Sequenz und die Sonden 1 und 1' an die Target komplementäre Sequenz hybridisieren, reagieren die chemisch funktionellen Gruppen so, dass sie verknüpfte Oligonukleotid-Produkte, wie oben beschrieben, ausbilden. Ein Beispiel dieser Ausführungsform wird unten dargestellt. (Die

vertikalen Linien in dieser Darstellung unten stellen in erster Linie die Abgrenzung zwischen der langen und der kurzen Sequenz jeder Sonde dar).



[0121] Eine andere verallgemeinerte Darstellung der Ausführungsform, die eine chemisch funktionelle Gruppe, geschützt mit einer unmodifizierten kurzen Sequenz, zeigt, ist in **Fig.** 14 dargestellt.

BEISPIELE

Beispiel 1

[0122] Dieses Beispiel illustriert das Amplifikations- und Detektionsverfahren der vorliegenden Erfindung, um eine 48 Basenpaar lange DNA- Sequenz zu amplifizieren und zu detektieren, die in dem menschlichen Papilloma Virus Typ 16 (HPV- 16) Genom enthalten ist. Die Region, die es zu amplifizieren gilt, umfasst die Nukleotidbasenzahlen 6634 bis 6681 mit der folgenden Sequenz:

5'-TTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATAT-3'

3'-AACAACTATGATGTGCGTCATGTTTATACAGTAATACACGACGGTATA-5'

(Siehe Seedorf, K., et al., Virology 145, 181–185 (1985) und SEQ. ID. NOS. 1–2) Vier Oligonukleotidsonden, bezeichnet als 1, 1', 2 und 2' werden verwendet, um die oben genannten Target- Sequenzen zu amplifizieren. Die Sonden haben die folgenden Sequenzen. (Siehe SEQ. ID. NOS. 3- 6). Die doppeltvertikalen Linien stellen in erster Linie die Abgrenzung zwischen der langen und der kurzen Sequenz einer jeden Probe dar. Die einzelvertikalen Linien zeigen eine chemische Bindung, welche eine chemisch funktionelle Gruppe an eine nachfolgende Gruppe auf einen der Nukleotide in der kurzen Sequenz einer jeden Sonde anbindet.

Sonde 1

3'-AACAACTATGATGTGCGTCATGTT‖ACGATAA-5'

X_1

Sonde 2

3'-TTATCGT‖TATACAGTAATACACGACGGTATA-5'

Y_1

Sonde 1'

5'-TTGTTGATACTACACGCAGTACAA‖TGCTATT-3'

X_2

Sonde 2'



[0123] Die Oligonukleotidsonden dieses Beispiels werden wie folgt synthetisiert. Zuerst wird ein Guaninrest modifiziert, so dass eine gewünschte chemisch funktionelle Gruppe später kovalent angebunden werden kann. Konventionelle Verfahren werden dann verwendet, um die Oligonukleotidsonden zu synthetisieren. Während der Synthese des Oligonukleotids wird der modifizierte Guaninrest an der Stelle der kurzen Sequenz platziert, wo die chemisch funktionelle Gruppe lokalisiert sein soll. Sobald die Oligonukleotidsonde synthetisiert ist, wird die geeignete chemisch funktionelle Gruppe an den modifizierten Guaninrest in der kurzen Sequenz des Oligonukleotids angebunden. In diesem Beispiel sind die funktionellen Gruppen X_1 und X_2 der Sonden 1 bzw. 1' 2,4,5-Trichloro-3-thiphen-1,1-dioxidacetyl. Die funktionellen Gruppen Y_1 und Y_2 der Sonden 2 bzw. 2' sind M-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfo-succinimylester. Beide dieser chemisch funktionellen Gruppen werden am 2'- Amino- 2'- desoxyguanin in der kurzen Sequenz einer jeden Oligonukleotidsonde über ihre entsprechenden N-Hydroxysuccinimdoderivate angebunden.

[0124] Der modifizierte Guaninrest wird erhalten durch Herstellen eines modifizierten Phosphoramidits von 2'-Amino-2'-desox-guanin gemäß dem Verfahren, beschrieben von Benseler, F., et al., in Nucleosides and Nucleotides 11, 1333–1351 (1992). Diese Schritte in der Synthese des modifizierten Phosphoramidits von 2'-Amino-2'-desoxyguanin sind in Fig. 16 Id auf S. 1348 gezeigt.

[0125] Alle der Oligonukleotide, beschrieben in Beispiel 1, werden synthetisiert und aufgereinigt durch das folgende Verfahren.

1. Automatisierte Syntheseverfahren

[0126] Die 2-Cyanoethylphosphoramidite werden, kommerziell von Applied Biosystems Inc. erworben. Das Verfahren schließt die Kondensation von Nucleosidphosphoramiditen an 30 mg einer Nucleosid- derivisierten Glasbead- Unterlage aus kontrolliertem Porenglas (controlled pore glass – CPG) (500 Angström Porendurchmesser), unter Verwendung eines DNA- Syntheseapparates von Applied Biosystems Inc., Typ 380B-02, ein. Die Zyklen schließen Detritylation mit 2%iger Trichloressigsäure in Dichlormethan; Kondensation unter Verwendung von Tetrazol als einen aktivierenden Protonendonor; Kappen mit Säureanhydrid und Dimethylaminopyridin; Detritylation unter Verwendung von 2%iger Trichloressigsäure in Dichlormethan; und Oxidation des Phosphits zum Phosphat mit 0,1 M I_2/H_2O/Lutidin/ Tetrahydrofuran ein. Die Zykluszeit ist ungefähr 30 Minuten. Die Ausbeuten sind in jedem Schritt essentiell quantitativ und werden durch Sammeln spektroskopischer Untersuchung des Dimethoxytritylalkohols, der während der Detritylation freigesetzt wird, bestimmt.

II. Oligodesoxyribonukleosid- Schutzgruppen- Entfernung und Aufreinigungsverfahren

[0127] Die feste Unterlage wird von der Säule entfernt und 1 ml an konzentrierten Ammoniumhydroxid bei 60°C für 16 Stunden in einer geschlossenen Röhre ausgesetzt. Ammoniak wird entfernt und der Rest wird auf ein präparatives 12% Polyacrylamidgel aufgetragen unter Verwendung eines Tris- Borat- Puffer (pH 8) enthaltend 7M Harnstoff. Die Elektrophorese wird bei 20 Volt/ cm für 5 Stunden durchgeführt, wonach das Band, das das Produkt enthält, durch UF- Abschattung einer fluoreszierenden Platte identifiziert wird. Das Band wird entfernt und mit 1 ml doppeltdestilliertem Wasser über Nacht bei Raumtemperatur eluiert. Diese Lösung wird filtriert und der Überstand wir extrahiert (3× 300 Mikroliter) mit n- Butanol. Die wässrige Phase wird auf einer Sephadex G50 Säule platziert (Pharmacia) (1×10 cm). Die Eluierung wird durch UV-Absorption bei 260 nm überwacht und die geeignete Fraktion wird gesammelt, quantitativ bestimmt durch UV-Absorption in einem fixen Volumen und zur Trockene bei Raumtemperatur in einer Vakuumzentrifuge eingedampft.

[0128] Die chemisch Gruppe verwendet, um chemisch funktionelle Gruppen X_1 und X_2, 2,4,5-Trichloro-3-thiphen 1,1-dioxidessigsäure auszubilden, wird gemäß Brown et al., EP 340,010 hergestellt.

[0129] Um 2,4,5-Trichloro-3-thiophen1,1 Dioxidessigsäure an die 2'-NH_2-substituierenden Gruppe von 2'-Amino-2'-desoxyguanin, kovalent anzubinden, muss 2,4,5-Trichloro-3-thiophen-1,2 Dioxidessigsäure mit N-Hydroxysuccinimid modifiziert werden, um 2,4,5-Trichloro-3-thiphen 1,1-Dioxidessigsäure N-Hydroxysuccinimid zu erzeugen.

[0130] 2,4,5-Trichlor-3-thiophen 1,1-Dioxidessignsäure N-Hydroxysuccinimid wird wie folgt hergestellt. 2,45 g (0,01 Mol) von 2,4,5-Trichloro-3-thiophen 1,1-Dioxidessigsäure werden in 100 ml an Tetrahydrofuran (THF) aufgelöst. Zu dieser Lösung werden 1,3 g (0,015 Mol) von N-Hydroxysuccinimid (Aldrich) und 2,26 g (0,011 Mol) von 1,3-Dicyclohexylcarbodiimid (Sigma) hinzugegeben. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Filtration der Lösung wird das Lösungsmittel entfernt unter vermindertem Druck und das weiße feste Produkt wird mit THF gewaschen und zur Trockene eingedampft.

[0131] Die chemische Gruppe verwendet, um die chemisch funktionellen Gruppen Y_1 und Y_2 auszubilden, m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfo-succinimidester, ist kommerziell verfügbar (Pierce).

[0132] Chemische Modifikationen des 2'-Amino-2-desoxyguaninrests von jeder der Oligonukleotidsonden, um funktionelle Gruppen X_1, X_2, Y_1 und Y_2 anzubinden, wird wie folgt durchgeführt.

[0133] Aliquots der vier Oligonukleotidsonden enthaltend 2'-Amino-2'-desoxyguanin mit einer optischen Dichte von 5,0 (5,0 O.D.) werden zur Trocknung lyophilisiert in separaten 2 ml wegwerfbaren Violen. Jede Sondenpräparation wird in 0,75 ml eines 0,2 M Sodiumboratpuffers bei pH 9,3 rekonstituiert.

[0134] Um die chemisch funktionellen Gruppen X_1 und X_2 anzubinden, werden 0,25 ml von 2,4,5-Trichloro-3-thiophen 1,1-Dioxidessigsäure N-Hydroxysuccinimid (siehe obige Synthese) aufgelöst in N,N-Dimethylformamid (DMF) und zu 20 mg/ ml zu jeder der Violen enthaltend die modifizierten Sonden 1 und 1' gegeben.

[0135] Um die chemisch funktionellen Gruppen Y_1 und Y_2 anzubinden, werden 0,25 ml von m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfo-succinimidester zu 20 mg/ ml zu jeder der Violen enthaltend modifizierten Sonden 2 und 2' gegeben.

[0136] Die Reaktionsmischungen in jeder der Violen wird energisch bei Raumtemperatur (RT) für ungefähr 12 Stunden gerührt. Die Mischungen werden dann zentrifugiert und jeweils durch separate Pharmacia Sephadex NAP-10 Säulen passiert, um die Lösungen zu erhalten und den Überschuss des chemisch funktionellen Gruppenreagenzes zu entfernen. Jede der resultierenden Lösungen wird mit einer FPLC Säule (Pharmacia) gereinigt. Das FPLC-System ist mit einer Pro RPC HR 10/ 10 Säule (100 mm × 10 mm Durchmesser, gepackt mit Silica- basierter 13 µm C2/C8 Matrix von 300 Å Porengröße) bestückt. Die Lösungen werden gereinigt unter Verwendung eines linearen Gradienten von Acetonitril/ 10 mM Triethylammoniumacetat 1:1 (v/ v) gegen 10 mM Triethylammoniumacetat über einen Bereich von 0 bis 35% über 45 Minuten bei einer Rate von 2 ml/ min.

[0137] Die Fraktionen werden gesammelt und gepoolt für jede gereinigte Oligonukleotidsonde. Jede der Sonden, 1, 1', 2 und 2' wird zur Trockene lyophilisiert und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

[0138] Eine Illustration der modifizierten Guaninreste und der benachbarten Cytosinreste in der kurzen Sequenz der Sonden 1, 1', 2 und 2' ist in **Fig.** 7 gezeigt.

[0139] Die Amplifikation der HPV- 16 Sequenz, wie oben gezeigt, (SEQ. ID. NOS. 1–2) wird wie folgt durchgeführt.

[0140] Die HPV- 16 Sequenz ist in einem Plasmid enthalten. Das Plasmid wird durch Klonen der HPV- 16 Sequenz veröffentlicht durch Seedorf et al., in Virology 145, 181–185 (1985) in einem Bluescriptvektor (Stratagene) hergestellt. Sobald die HPV- 16 Sequenz in das Plasmid geklont ist, wird das Plasmid in doppelt destilliertem Wasser in einer Konzentration von 20 ng/ ml aufgelöst.

[0141] 10^{11} Moleküle jeder Oligonukleotidsonde werden in Hybridisationspuffer bei einem letztendlichen Volumen von 200 µl rekonstituiert. Der Hybridisierungspuffer enthält 30% deionisierten Formamid in Wasser (vol/ vol), 0,54 M NaCl, 0,03 M Natriumphosphat (pH 7,4), 0,003 M EDTA, 5% Dextransulfat 500K m.w. (Sigma) (w/ vol) und 0,1% Triton X-100.

[0142] Deionisiertes Formamid wird hergestellt durch Zugabe von 1 gm von Bio- Rad AG 501-X8(D) 20–50 mesh mixed bed Harz zu 50 ml Formamid (Sigma Chemical Co.) und Mischen für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das Formamid wird zweimal durch Whatman No. 1 Filterpapier filtriert.

[0143] Zwei Eppendorftubes, 1 und 2 (Perkin Elmer), werden für die Amplifikationsreaktion verwendet. Tube 1 wird als Kontrolle verwendet und Tube 2 wird für die Testreaktion verwendet. Tube 1 enthält keine Target-Sequenz. Tube 2 enthält eine Probe von HPV-16 Target- Sequenz.

[0144] 100 µl des Hybridisierungspuffers enthaltend die vier Oligonukleotidsonden 1, 1', 2 und 2', wird jedem Tube zugegeben. 2 µl der Lösung enthaltend das Plasmid mit der HPV-16 Sequenz, wie oben beschrieben, wird dem Tube 2 zugegeben. 1 µl an dreifach destilliertem Wasser wird zu Tube 2 als Kontrolle zugegeben. Die Lösungen in jedem Tube werden kurz vermischt durch kurzes Vortexen der Tubes. 100 µl an Mineralöl wird langsam jedem Tube zugegeben, um eine Schicht oberhalb der Reaktionsmischung auszubilden, um das Verdampfen der Lösung während dem wiederholten Erhitzungszyklen der Amplifikationsreaktion zu verhindern.

[0145] Beide Tubes werden in einem DNA- thermalen Cycler (Perkin Elmer, Cetus) platziert und 40 Erhitzungs- und Abkühlungszyklen unterzogen. Jeder Zyklus besteht aus 65 Sekunden Inkubation bei 90°C und 240 Sekunden Inkubation bei 40°C.

[0146] Nach dem Cycling werden 20 µl jeder Lösung zu einer Mischung von 2 µl Bromphenolblau und 40%igem Glycerin in 1M TBE (Trisborat EDTA) hinzugefügt. Jeder Tube wird milde durch Vortexen- Mischen vermischt.

[0147] Die amplifizierte HPV- 16 Target- Sequenz wird durch Anfärben mit Ethidiumbrmoid des verknüpften Oligonukleotid- Produkts auf einem Gel angefärbt. 20 µl jeder Lösung werden auf ein 12%iger Polyacrylamidgel beladen unter Verwendung von Tris- Boratpuffer (pH 8,0).

[0148] Elektrophorese wird bei 20 Volt/ cm für drei Stunden durchgeführt, wonach das Gel in ein 100 ml Lösung von Ethidiumbromid untergetaucht wird, 0,5 µg/ ml H_2O, für 45 Minuten bei Raumtemperatur.

[0149] Das Gel wird einem polaroidfotografischen Film vom Typ 57 oder 667 (ASA 3000) mit effizienter Ultraviolett (UV) – Lichtquelle (72.500 µW/ cm^2) ausgesetzt. Der fotografische Film wird für 0,5 Sekunden bei f8 belichtet, um die Banden des verknüpften Oligonukleotid- Produktes in Mengen bis zu 10 ng zu detektieren.

GLOSSAR

A_1 repräsentiert Adenin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend ein Wasserstoff der Aminogruppe lokalisiert an der C-6 Position
A_2 repräsentiert Adenin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z angebunden an die Hydroxylgruppe lokalisiert an die C-2'- Position des Riboserings
A_3 repräsentiert Adenin mit der chemisch funktioneller Gruppe Z ersetzend das Wasserstoff lokalisiert an der C-8 Position
A_4 repräsentiert Adenin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings
B repräsentiert irgendeine Oligonukleotidbase
C_1 repräsentiert Cytidin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend ein Wasserstoffatom der Aminogruppe lokalisiert an der C-6 Position
C_2 repräsentiert Cytidin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z angebunden an die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings
C_3 repräsentiert Cytidin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings
D repräsentiert die modifizierten Nukieotide A_4, C_3, G_3, T_3 oder U_1
E repräsentiert die modifizierten Nukleotide A_1 oder C_1
F repräsentiert die modifizierten Nukleotide A_3 oder G_1
G_1 repräsentiert Guanin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend das Wasserstoff lokalisiert an der C-8 Position.
G_2 repräsentiert Guanin mit einer chemisch funktionellen Gruppe Z angebunden an die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
G_3 repräsentiert Guanin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
H und H' repräsentieren die langen Sequenzen der Sonden 1 bzw. 1'
I und I' repräsentieren die kurzen Sequenzen der Sonden 1 bzw. 1'
J und J' repräsentieren die langen Sequenzen der Sonden 2 bzw. 2'
K bzw. K' repräsentieren die kurzen Sequenzen der Sonden 2 bzw. 2'
L repräsentiert modifizierte Oligonukleotide A_2, C_2, G_2, T_2 und U_2
R und R' repräsentieren irgendwelche der modifizierten Nukleotide, wie sie in **Fig.** 2–6 gezeigt sind
T_1 repräsentiert Thymidin in der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend ein Wasserstoff aus der Methylgruppe lokalisiert an der C-5 Position.

T_2 repräsentiert Thymidin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z angebunden an die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position.
T_3 repräsentiert Thymidin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
U_1 repräsentiert Uridin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z ersetzend die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
U_2 repräsentiert Uridin mit der chemisch funktionellen Gruppe Z angebunden an die Hydroxylgruppe lokalisiert an der C-2' Position des Riboserings.
X repräsentiert die chemisch funktionellen Gruppen X_1 oder X_2
X_1 repräsentiert eine chemisch funktionelle Gruppe angebunden an die kurze Sequenz der Sonde 1
X_2 repräsentiert eine chemisch funktionelle Gruppe angebunden an die kurze Sequenz der Sonde 1'
Y repräsentiert die chemisch funktionellen Gruppen Y_1 oder Y_2
Y_1 repräsentiert eine chemisch funktionelle Gruppe angebunden an die kurze Sequenz von Sonde 2
Y_2 repräsentiert eine chemisch funktionelle Gruppe angebunden an die kurze Sequenz von Sonde 2'
Z repräsentiert die chemisch funktionellen Gruppen X_1, X_2, Y_1 oder Y_2.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: Segev. David

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Chemisches Verfahren zum Amplifizieren und Detektieren von Nukleinsäuresequenzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) KORRESPONDEZADRESSE.
- (A) ADRESSAT: ImClone Systems Incorporated
- (B) STRASSE: 180 Varick Street
- (C) STADT: New York
- (D) STAAT: New York
- (E) LAND: USA
- (F) ZIP: 10014

(v) COMPUTERLESBARE FORM:
- (A) MEDIUMTYP: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC- DOS/ MS- DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) DERZEITIGE ANMELDUNGSDATEN:
- (A) ANMELDENUMMER: US
- (B) ANMELDEDATUM:
- (C) KLASSIFIKATION:

(vii) ANWALT/ VERTRETERINFORMATION:
- (A) NAME: Feit, Irving N.
- (B) REGISTARTIONSNUMMER: 28,601

(C) REFERENZ/ DOKCET- NUMMER: SEG- 3

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: 2122- 645- 1405

(B) TELEFAX: 212- 645- 2054

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 48 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: doppelt

(D) TOPOLOGIE: zirkular

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI- SENSE: nein

(vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: menschlicher Papillomavirus

(B) STRANG: Typ 16

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 1:

TTGTTGATAC TACACGCAGT ACAAATATGT CATTATGTGC TGCCATAT

48

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 48 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: doppelt

(D) TOPOLOGIE: zirkular

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI- SENSE: nein

(vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: menschlicher Papillomavirus

(B) STRANG: Typ 16

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 2:

ATATGGCAGC ACATAATGAC ATATTTGTAC TGCGTGTAGT ATCAACAA
48

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI- SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.3:

AATAGCATTG TACTGCGTGT AGTATCAACA A
31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI- SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.4:

ATATGGCAGC ACATAATGAC ATATTGCTAT T
31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI- SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.5:

TTGTTGATAC TACACGCAGT ACAATGCTAT T
31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI- SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.6:

AATAGCAATA TGTCATTATG TGCTGCCATA T
31

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zum Amplifizieren und Detektieren eines einzelsträngigen Targetnukleinsäuremoleküls umfassend eine Targetsequenz oder eines doppelsträngigen Nukleinsäure-Targetmoleküls umfassend eine Targetsequenz und eine Target komplementäre Sequenz, in einer Probe, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
(a) Bereitstellen eines ersten komplementären Oligonukleotidpaares und eines zweiten komplementären Oligonukleotidpaares, worin:
(i) das erste komplementäre Oligonukleotidpaar aus einer Sonde 1 und einer Sonde 1' besteht und das zweite komplementäre Oligonukleotidpaar aus einer Sonde 2 und einer Sonde 2' besteht;
(ii) Sonde 1 eine lange Sequenz H und eine kurze Sequenz I umfasst; Sonde 1' eine lange Sequenz H' und eine kurze Sequenz I' umfasst;

(iii) Sonde 2 eine lange Sequenz J und eine kurze Sequenz K umfasst; Sonde 2' eine lange Sequenz J' und eine kurze Sequenz K' umfasst;
(iv) die lange Sequenz H von Sonde 1 und die lange Sequenz H' von Sonde 1' komplementär zueinander sind;
(v) die lange Sequenz J von Sonde 2 und die lange Sequenz J' von Sonde 2 komplementär zueinander sind;
(vi) die lange Sequenz H von Sonde 1 und die lange Sequenz J von Sonde 2 komplementär zu benachbarten Portionen der Targetsequenz sind;
(vii) die lange Sequenz H' von Sonde 1' und die lange Sequenz J' von Sonde 2' komplementär zu benachbarten Portionen der Target komplementären Sequenz sind;
(viii) die kurze Sequenz I und die kurze Sequenz K nicht an die Targetsequenz hybridisieren, wenn die lange Sequenz H und die lange Sequenz J an die Targetsequenz hybridisieren;
(ix) die kurze Sequenz I' und die kurze Sequenz K' nicht an die Target komplementäre Sequenz hybridisieren, wenn die lange Sequenz H' und die lange Sequenz J' an die Target komplementäre Sequenz hybridisieren;
(x) die kurze Sequenz 1 von Sonde 1 komplementär zur kurzen Sequenz von Sonde 2 ist, und die kurze Sequenz I' von Sonde 1' komplementär zur kurzen Sequenz K' von Sonde 2' ist;
(xi) die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz I von Sonde 1 mit einer chemisch funktionalen Gruppe X_1 modifiziert ist; die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz K von Sonde 2 mit einer chemisch funktionalen Gruppe Y_1 modifiziert ist; die chemisch funktionelle Gruppe X_1 reaktiv mit der chemischen funktionellen Gruppe Y_1 ist;
(xii) die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz I' von Sonde 1' mit einer chemisch funktionalen Gruppe X_2 modifiziert ist; die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz K' von Sonde 2' mit einer chemisch funktionalen Gruppe Y_2 modifiziert ist; die chemisch funktionelle Gruppe X_2 reaktiv mit der chemischen funktionellen Gruppe Y_2 ist;
(xiii) die kurze Sequenz I an die kurze Sequenz K hybridisiert, wenn die lange Sequenz H von Sonde 1 und die lange Sequenz J von Sonde 2. an benachbarte Portionen der Targetsequenz hybridisieren;
(xiv) wenn die kurze Sequenz I an die kurze Sequenz K hybridisiert, die chemisch funktionelle Gruppe X_1 mit der chemisch funktionellen Gruppe Y_1 reagiert, um eine chemische Bindung auszubilden;
(xv) die kurze Sequenz I' an die kurze Sequenz K' hybridisiert, wenn die lange Sequenz H' von Sonde 1' und die lange Sequenz J' von Sonde 2' an benachbarte Portionen der Target komplementären Sequenz hybridisieren;
(xvi) wenn die kurze Sequenz I' an die kurze Sequenz K' hybridisiert, die chemisch funktionelle Gruppe X_2 mit der chemisch funktionellen Gruppe Y_2 reagiert, um eine chemische Bindung auszubilden;
(b) Hybridisieren in dem Fall, dass die Targetsequenz und die Target komplementäre Sequenz einen Doppelstrang ausbilden, der langen Sequenz H von Sonde 1 und der langen Sequenz J von Sonde 2 an benachbarte Portionen der Targetsequenz, so dass I und K in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren und Hybridisieren der langen Sequenz H' von Sonde 1' und der langen Sequenz J' von Sonde 2' an benachbarte Portionen der Target komplementären Sequenz, so dass I' und K' in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren; oder Hybridisieren in dem Fall, dass die Targetsequenz oder die Target komplementäre Sequenz einzelsträngig ist, der langen Sequenz H von Sonde 1 und der langen Sequenz J von Sonde 2 an benachbarte Portionen der Targetsequenz, so dass I und K in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren oder Hybridisieren der langen Sequenz H' von Sonde 1' und der langen Sequenz J' von Sonde 2' an benachbarte Portionen der Target komplementären Sequenz, so dass I' und K' in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren,
(c) Verbinden von Sonde 1 und von Sonde 2, welche nach Schritt (b) an benachbarte Portionen der Targetsequenz hybridisiert sind, aneinander durch Ausbilden einer chemischen Bindung zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1, wodurch ein zweites verbundenes Oligonukleotidprodukt ausgebildet wird, welches eine Target komplementäre Sequenz aufweist;
(d) Verbinden von Sonde 1' und von Sonde 2', welche nach Schritt (b) an benachbarte Portionen der Target komplementäre Sequenz hybridisiert sind, aneinander durch Ausbilden einer chemischen Bindung zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_2 und Y_2, wodurch ein erstes verbundenes Oligonukleotidprodukt ausgebildet wird, welches eine Targetsequenz aufweist;
(e) Behandlung der Probe unter denaturierenden Bedingungen;
(f) Wiederholung der Schritte (b) bis (e) über eine gewünschte Anzahl von Perioden; und
(g) Detektieren der verbundenen Oligonukleotidprodukte, wobei zumindest eine der funktionellen Gruppen X_1, X_2, Y_1 oder Y_2 die Hydroxylgruppe oder den Wasserstoff lokalisiert an der C-2'-Position des Riboserings eines Nukleotids in der kurzen Sequenz I, I', K bzw. K' ersetzt.

2. Ein Verfahren zur lineare Amplifikation und Detektion eines einsträngigen Targetnukleinsäuremoleküls, welches eine Targetsequenz umfasst oder eines doppelsträngigen Targetnukleinsäuremoleküls, welches eine Targetsequenz und eine Target komplementäre Sequenz umfasst, in einer Probe, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
(a) Bereitstellen eines Oligonukleotidpaares, worin:

(i) das Oligonukleotidpaar aus einer Sonde 1 und einer Sonde 2 oder einer Sonde 1' und einer Sonde 2' besteht;
(ii) Sonde 1 eine lange Sequenz H und eine kurze Sequenz I umfasst; Sonde 2 eine lange Sequenz J und eine kurze Sequenz K umfasst;
(iii) Sonde 1' eine lange Sequenz H' und eine kurze Sequenz I' umfasst; Sonde 2' eine lange Sequenz J' und eine kurze Sequenz K' umfasst;
(iv) die lange Sequenz H von Sonde 1 und die lange Sequenz J von Sonde 2 komplementär an benachbarte Portionen der Targetsequenz sind;
(v) die lange Sequenz H' von Sonde 1' und die lange Sequenz J' von Sonde 2' komplementär an benachbarte Portionen der Target komplementären Sequenz sind;
(vi) die kurze Sequenz I und die kurze Sequenz K nicht an die Targetsequenz hybridisieren, wenn die lange Sequenz H und die lange Sequenz J an die Targetsequenz hybridisieren;
(vii) die kurze Sequenz I' und die kurze Sequenz K' nicht an die Target komplementäre Sequenz hybridisieren, wenn die lange Sequenz H' und die lange Sequenz J' an die Target komplementäre Sequenz hybridisieren;
(viii) die kurze Sequenz I von Sonde 1 komplementär zur kurzen Sequenz K von Sonde 2 ist und die kurze Sequenz I' von Sonde 1' komplementär zur kurzen Sequenz K' von Sonde 2' ist;
(ix) die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz I von Sonde 1 mit einer chemisch funktionellen Gruppe X_1 modifiziert ist; die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz K von Sonde 2 mit einer chemisch funktionellen Gruppe Y_1 modifiziert ist; die chemische funktionelle Gruppe X_1 mit der chemischen Gruppe Y_1 reaktiv ist;
(x) die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz I' von Sonde 1' mit einer chemisch funktionellen Gruppe X_2 modifiziert ist; die Zucker- oder Basengruppe von einem oder mehreren der Nukleotide von Sequenz K' von Sonde 2' mit einer chemisch funktionellen Gruppe Y_2 modifiziert ist; die chemische funktionelle Gruppe X_2 mit der chemischen Gruppe Y_2 reaktiv ist;
(xi) die kurze Sequenz I an die kurze Sequenz K hybridisiert, wenn die lange Sequenz H von Sonde 1 und die lange Sequenz J von Sonde 2 an benachbarte Portionen der Targetsequenz hybridisieren;
(xii) wenn die kurze Sequenz I an die kurze Sequenz K hybridisiert, die chemisch funktionelle Gruppe X_1 mit der chemisch funktionellen Gruppe Y_1 reagiert, um eine chemische Bindung auszubilden;
(xiii) die kurze Sequenz I' an die kurze Sequenz K' hybridisiert, wenn die lange Sequenz H' von Sonde 1' und die lange Sequenz J' von Sonde 2' an benachbarte Portionen der Target komplementären Sequenz hybridisieren;
(xiv) wenn die kurze Sequenz I' an die kurze Sequenz K' hybridisiert, die chemisch funktionelle Gruppe X_2 mit der chemisch funktionellen Gruppe Y_2 reagiert, um eine chemische Bindung auszubilden;
(b) Hybridisieren in dem Fall, dass die Targetsequenz und die Target komplementäre Sequenz einen Doppelstrang ausbilden, der langen Sequenz H von Sonde 1 und der langen Sequenz J von Sonde 2 an benachbarte Portionen der Targetsequenz, so dass I und K in der Lage sind aneinander zu hybridisieren und Hybridisieren der langen Sequenz H' von Sonde 1' und der langen Sequenz J' von Sonde 2' an benachbarte Portionen der Target komplementären Sequenz, so dass I' und K' in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren; oder Hybridisieren in dem Fall, dass die Targetsequenz oder die Target komplementäre Sequenz einzelsträngig ist, der langen Sequenz H von Sonde 1 und der langen Sequenz J von Sonde 2 an benachbarte Portionen der Targetsequenz, so dass I und K in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren oder Hybridisieren der langen Sequenz H' von Sonde 1' und der langen Sequenz J' von Sonde 2' an benachbarte Portionen der Target komplementären Sequenz, so dass I' und K' in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren,
(c) Verbinden von Sonde 1 und von Sonde 2, welche nach Schritt (b) an benachbarte Portionen der Targetsequenz hybridisiert sind, aneinander durch Ausbilden einer chemischen Bindung zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1, wodurch ein verbundenes Oligonukleotidprodukt ausgebildet wird, welches eine Target komplementäre Sequenz aufweist;
(d) Verbinden von Sonde 1' und von Sonde 2', welche nach Schritt (b) an benachbarte Portionen der Target komplementäre Sequenz hybridisiert sind, aneinander durch Ausbilden einer chemischen Bindung zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_2 und Y_2, wodurch ein verbundenes Oligonukleotidprodukt ausgebildet wird, welches eine Targetsequenz aufweist;
(e) Behandlung der Probe unter denaturierenden Bedingungen;
(f) Wiederholung der Schritte (b) bis (e) über eine gewünschte Anzahl von Perioden; und
(g) Detektieren der verbundenen Oligonukleotidprodukte, wobei zumindest eine der funktionellen Gruppen X_1, X_2, Y_1 oder Y_2 die Hydroxylgruppe oder den Wasserstoff lokalisiert an der C-2'-Position des Riboserings eines Nukleotids in der kurzen Sequenz I, I', K bzw. K' ersetzt.

3. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die chemisch funktionelle Gruppe X_1 ein Elektrophil und die chemisch funktionelle Gruppe Y_1 ein Nukleophil ist.

4. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die chemisch funktionelle Gruppe X_1 ein Nukleophil und die chemisch funktionelle Gruppe Y_1 ein Elektrophil ist.

5. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die chemisch funktionelle Gruppe X_2 ein Elektrophil und die chemisch funktionelle Gruppe Y_2 ein Nukleophil ist.

6. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die chemisch funktionelle Gruppe X_2 ein Nukleophil und die chemisch funktionelle Gruppe Y_2 ein Elektrophil ist.

7. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die chemisch funktionelle Gruppe X_1, X_2, Y_1 oder Y_2 einen Wasserstoff in der Aminogruppe, welche an der C-6-Position eines Adenin- oder Cytidinrests in der kurzen Sequenz I, I', K bzw. K' ersetzt.

8. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die chemisch funktionelle Gruppe X_1, X_2, Y_1 oder Y_2 einen Wasserstoff in der Aminogruppe, welche an der C-8-Position eines Adenin- oder Guaninrests in der kurzen Sequenz I, I', K bzw. K' ersetzt.

9. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die chemisch funktionelle Gruppe X_1, X_2, Y_1 oder Y_2 einen Wasserstoff in der Aminogruppe, welche an der C-5-Position eines Thymidinrests in der kurzen Sequenz I, I', K bzw. K' ersetzt.

10. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die Nukleinsäuresequenz der kurzen Sequenz I, I', K oder K' ein Palindrom darstellt.

11. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die chemisch funktionelle Gruppe X_1, X_2, Y_1 oder Y_2 in der kurzen Sequenz I, I', K bzw. K' der Sonden 1, 2, 1' bzw. 2' des Weiteren geschützt ist gegen das Reagieren untereinander durch nichtchemisch modifizierte Oligonukleotidsonden, welchen an besagte kurze Sequenzen der Sonden 1, 2, 1' bzw. 2' hybridisieren.

12. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin das Verhältnis der Länge der langen Sequenz zur der Länge der kurzen Sequenz der Sonden 1, 2, 1' oder 2' zwischen 2:1 bis 50:1 reicht.

13. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin das Verhältnis der Länge der langen Sequenz zu der Länge der kurzen Sequenz 2:1 ist.

14. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin das Verhältnis der Länge der langen Sequenz zu der Länge der kurzen Sequenz 3:1 ist.

15. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin das Verhältnis der Länge der langen Sequenz zu der Länge der kurzen Sequenz 5:1 ist.

16. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin das Verhältnis der Länge der langen Sequenz zu der Länge der kurzen Sequenz 10:1 ist.

17. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin das Verhältnis der Länge der langen Sequenz zu der Länge der kurzen Sequenz 20:1 ist.

18. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die Reaktion zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1 oder X_2 und Y_2 die Substitution eines Nukleophils als Ersatz für eine elektrophile Abgangsgruppe ist.

19. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die Reaktion zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1 oder X_2 und Y_2 eine Michael-Additionsreaktion ist.

20. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die Reaktion zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1 oder X_2 und Y_2 eine Diels-Alder-Additionsreaktion ist.

21. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die Reaktion zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1 oder X_2 und Y_2 die Addition einer Thiolgruppe an die Doppelbindung der Maleimidogruppe ist.

22. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die Reaktion zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1 oder X_2 und Y2 eine photochemische Reaktion ist.

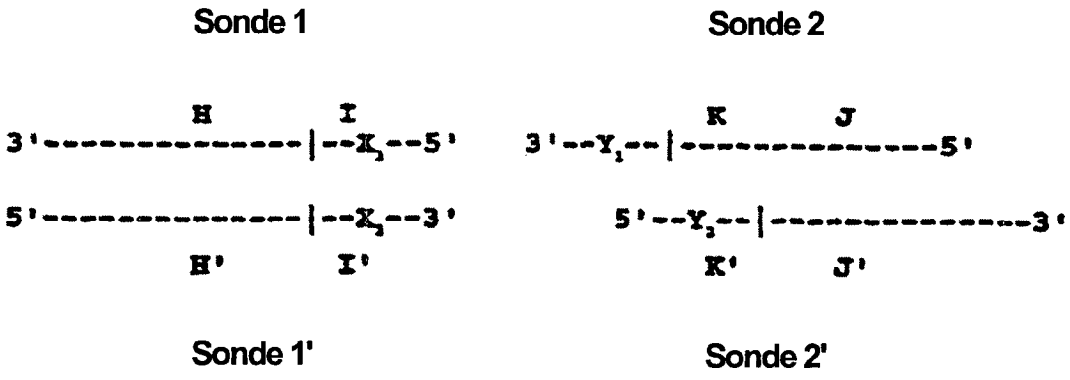
23. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die Reaktion zwischen den chemisch funktionellen Gruppen X_1 und Y_1 oder X_2 und Y_2 eine [2+2]-Photozyklodimerisationsreaktion ist.

24. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin die Oligonukleotidpaare als molarer Überschuss in der Größenordnung von 10^5 bis 10^{15} Paaren pro Targetnukleinsäuresequenz oder Target komplementärer Sequenz vorliegen.

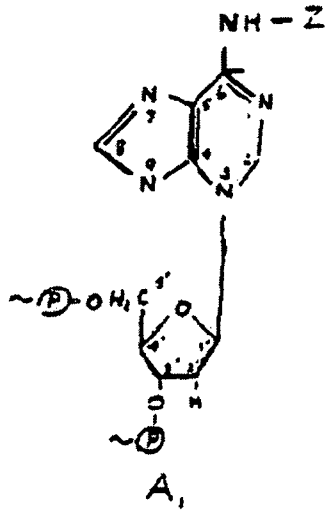
Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

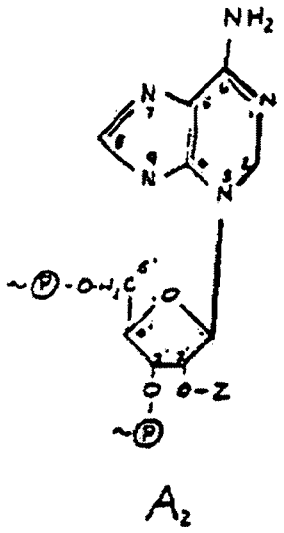
Anhängende Zeichnungen

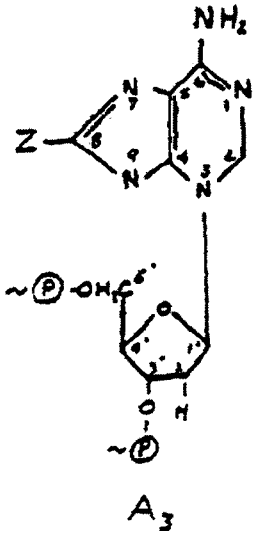
Figur 1

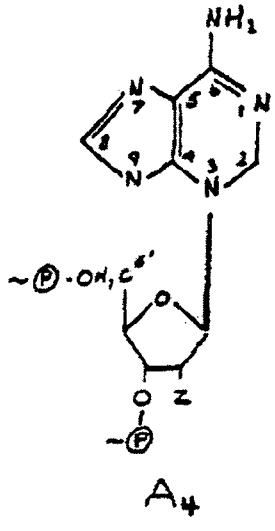


Figur 2

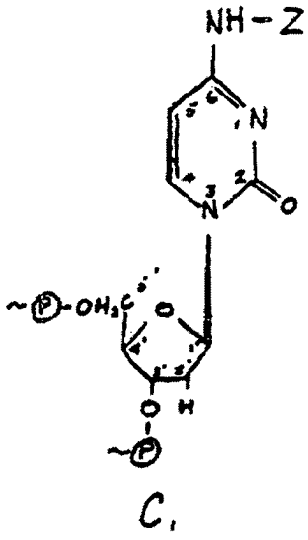




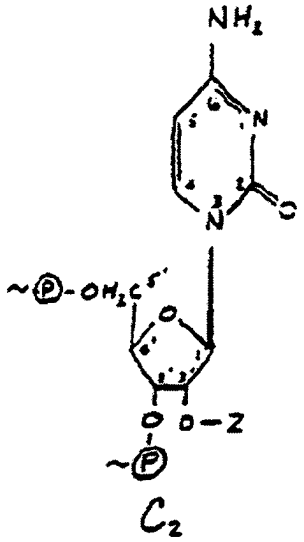




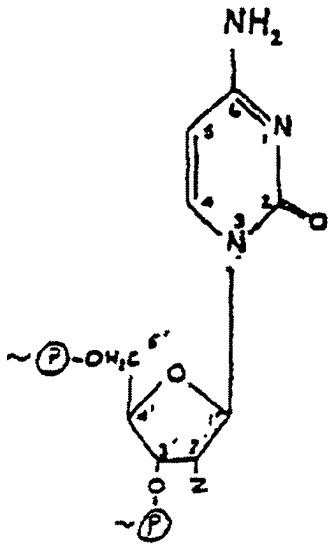
Figur 3



C1

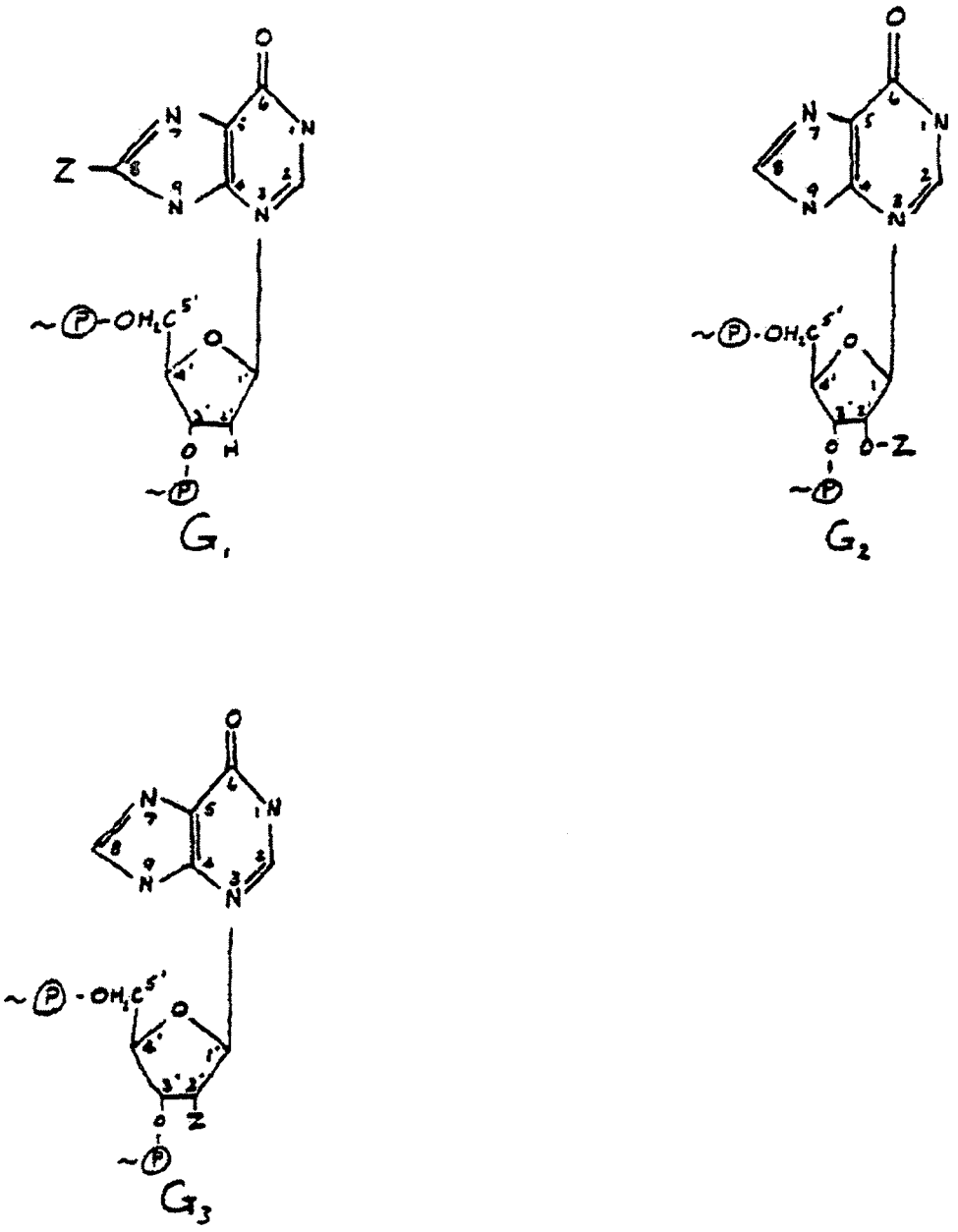


C2

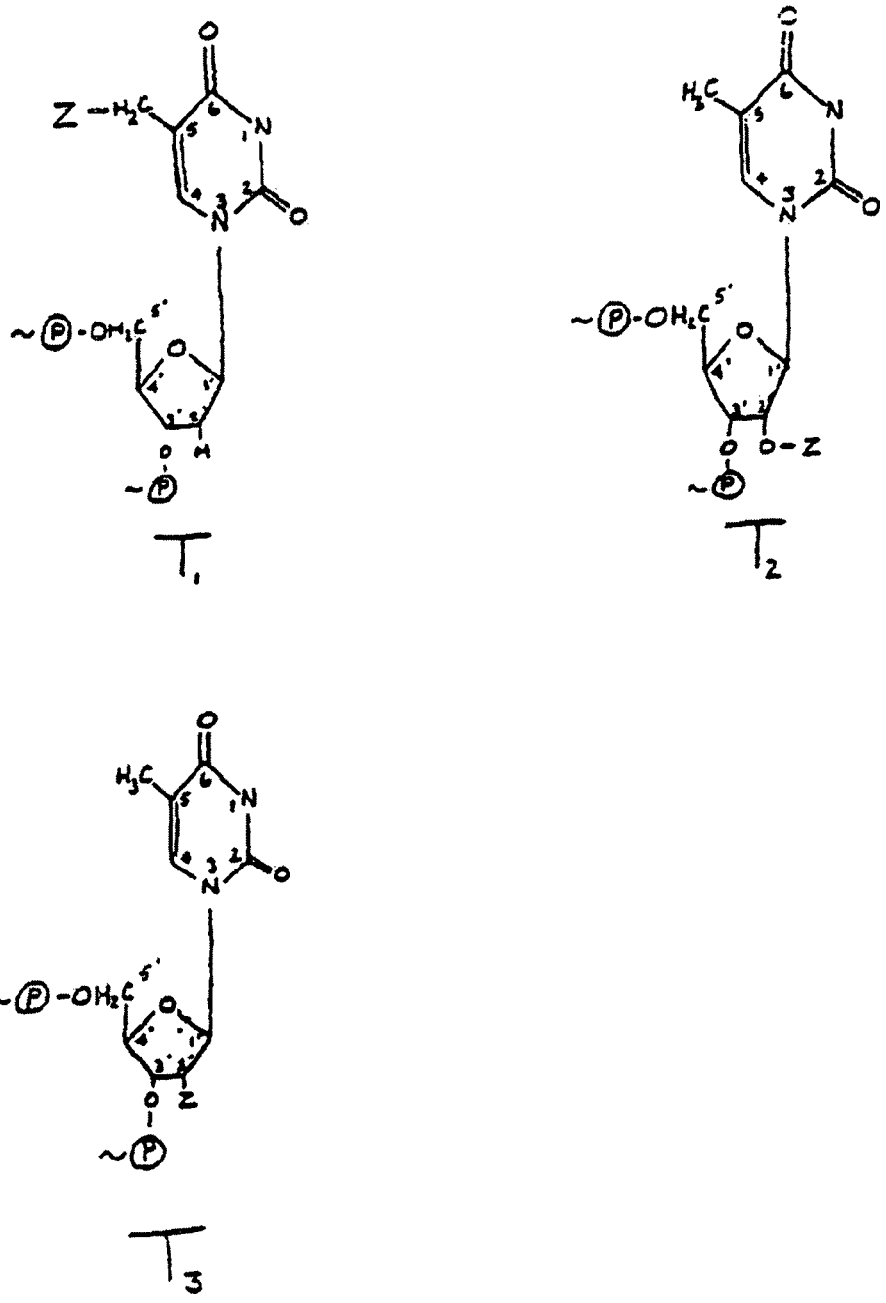


C3

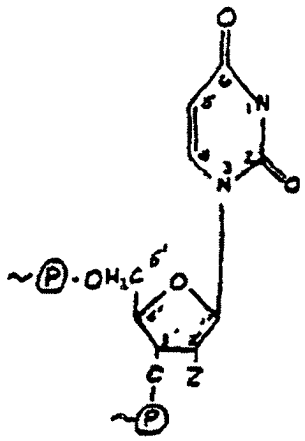
Figur 4



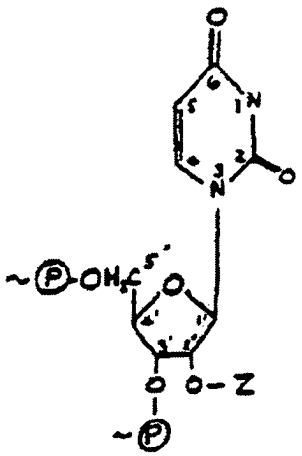
Figur 5



Figur 6

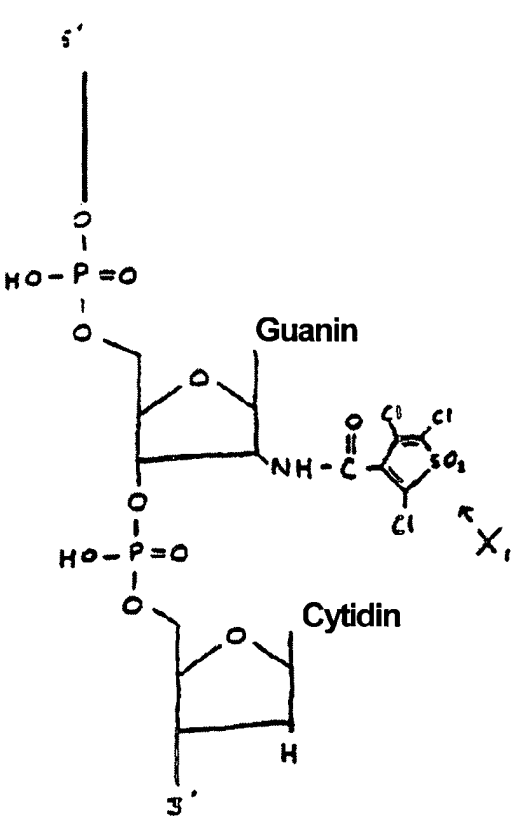


U_1

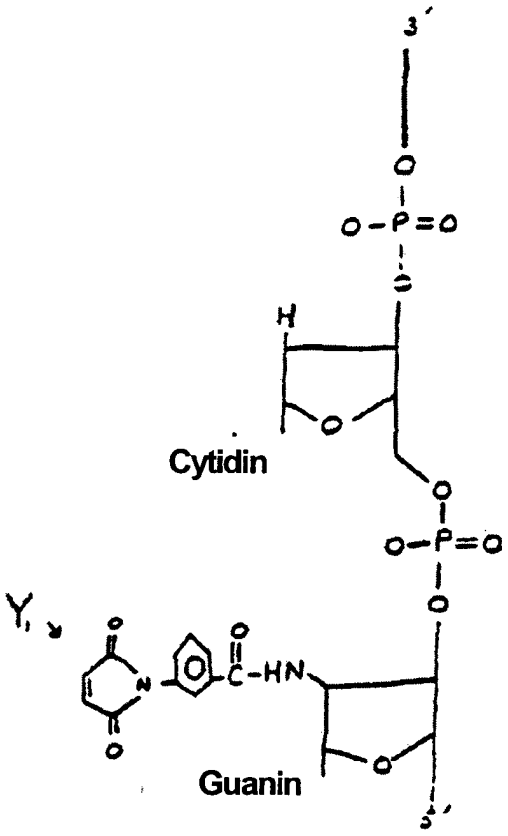


U_2

Figur 7

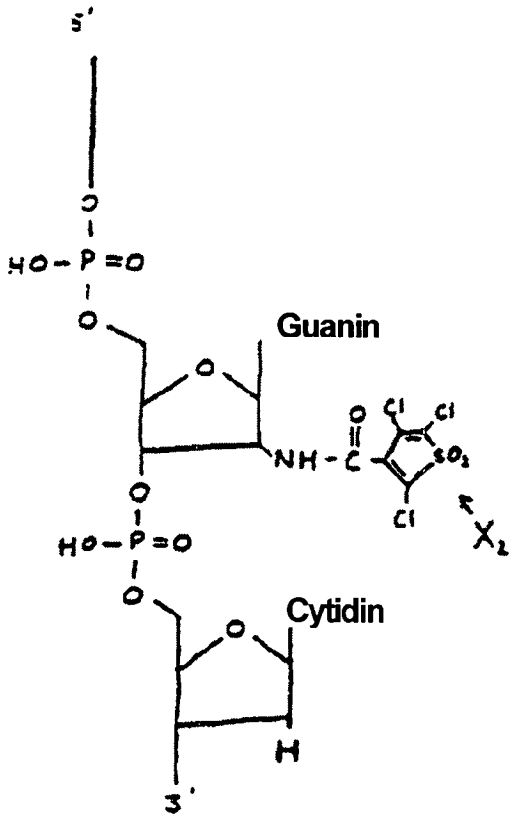


Sonde 1

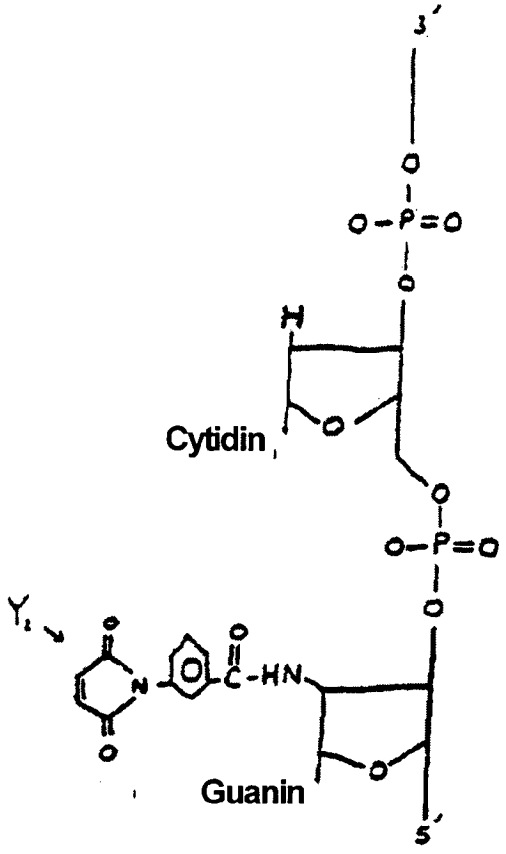


Sonde 2

Figur 7.1

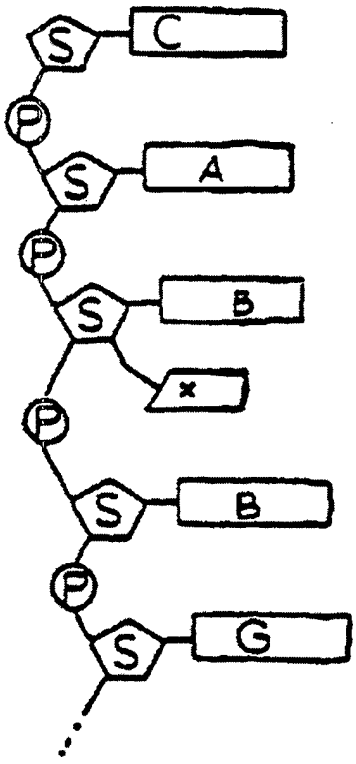


Sonde 1'

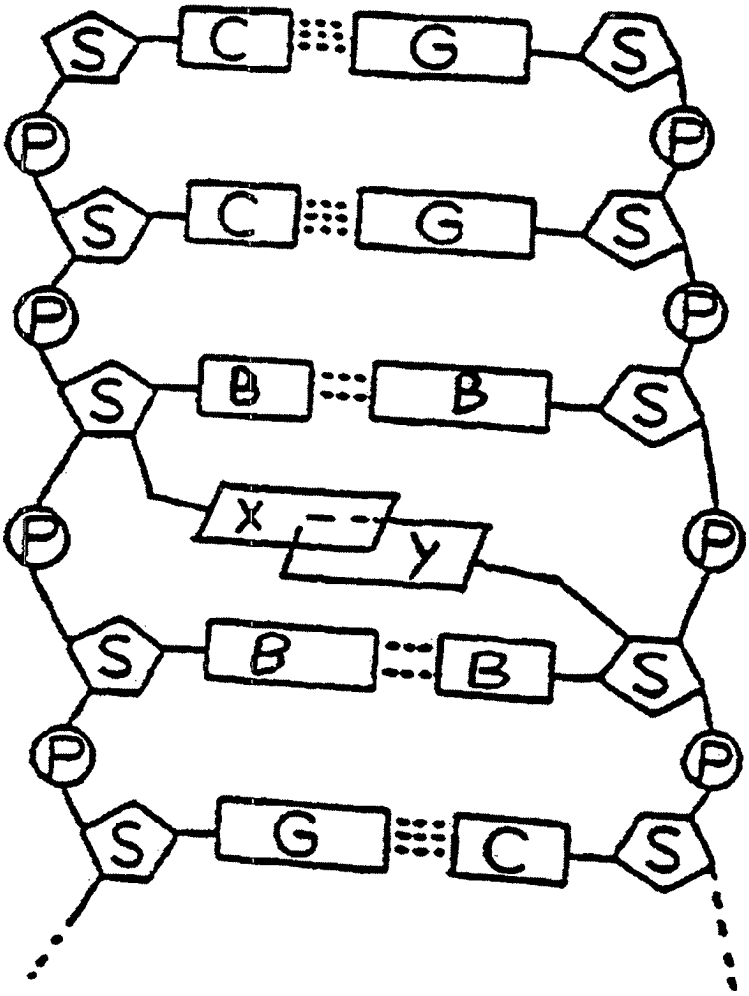


Sonde 2'

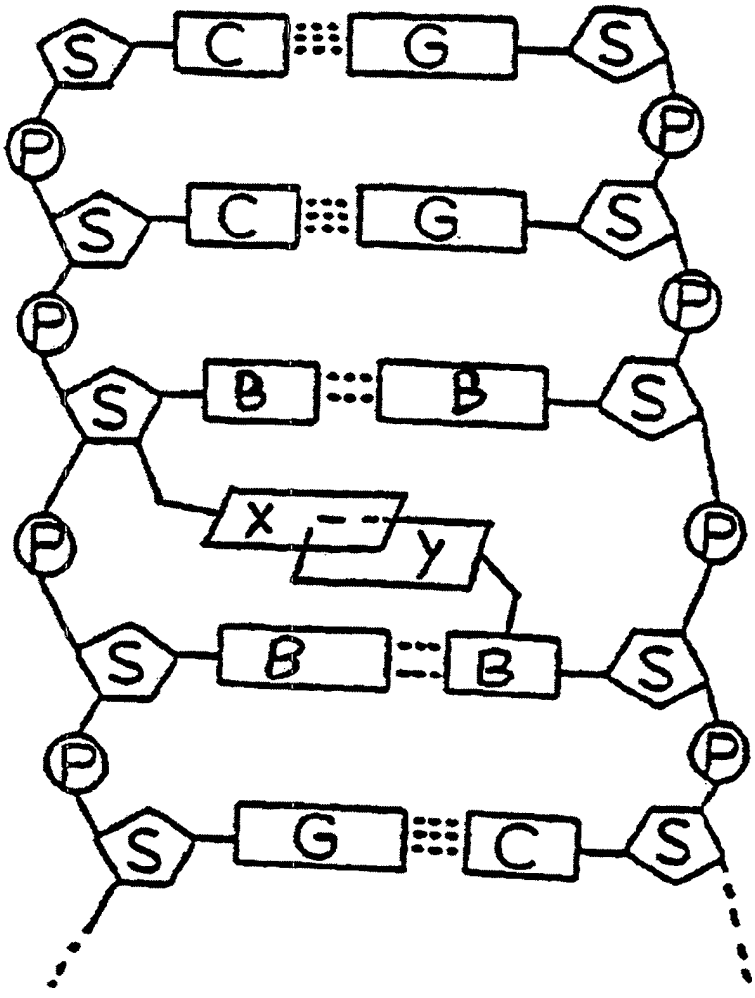
Figur 8



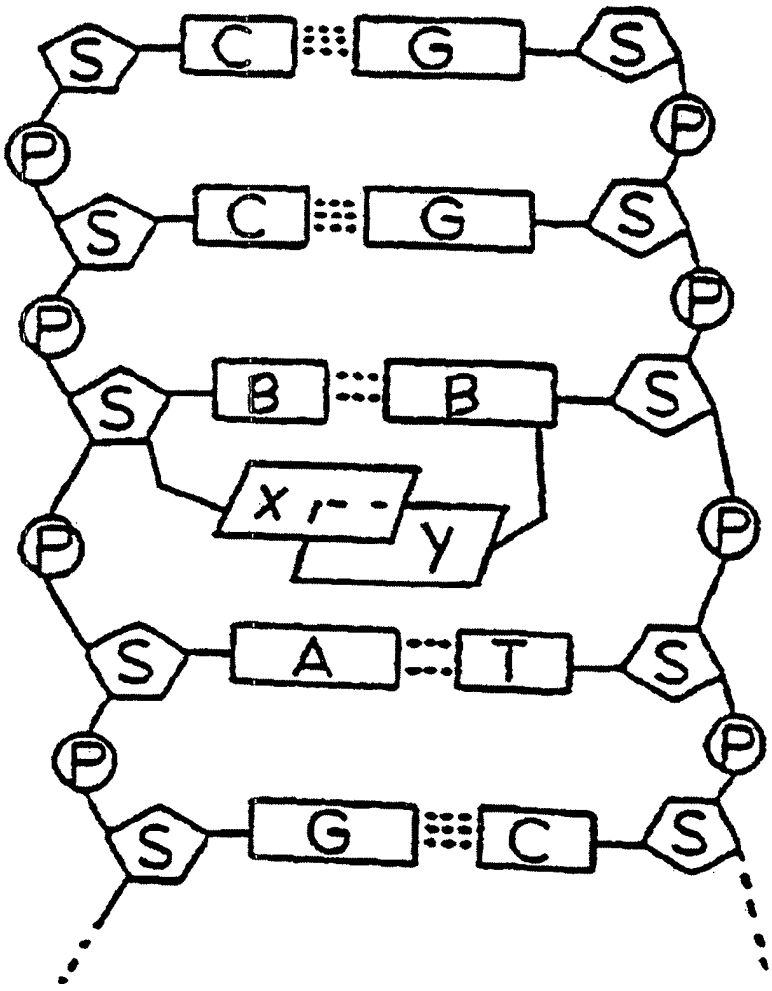
Figur 9



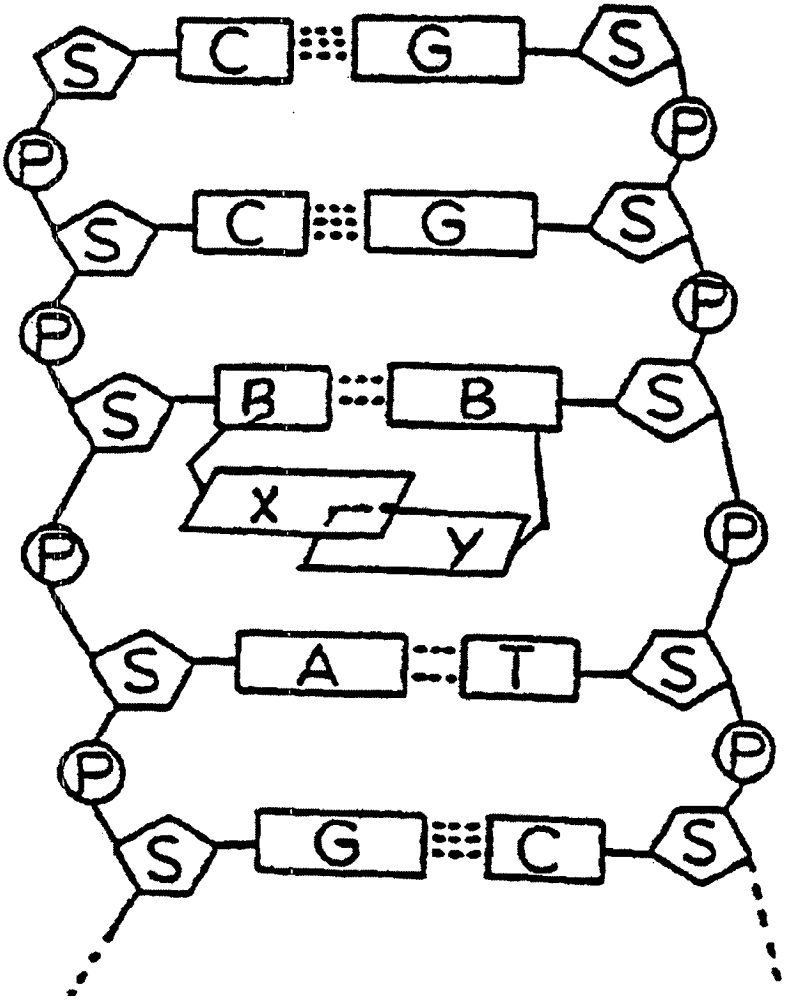
Figur 10



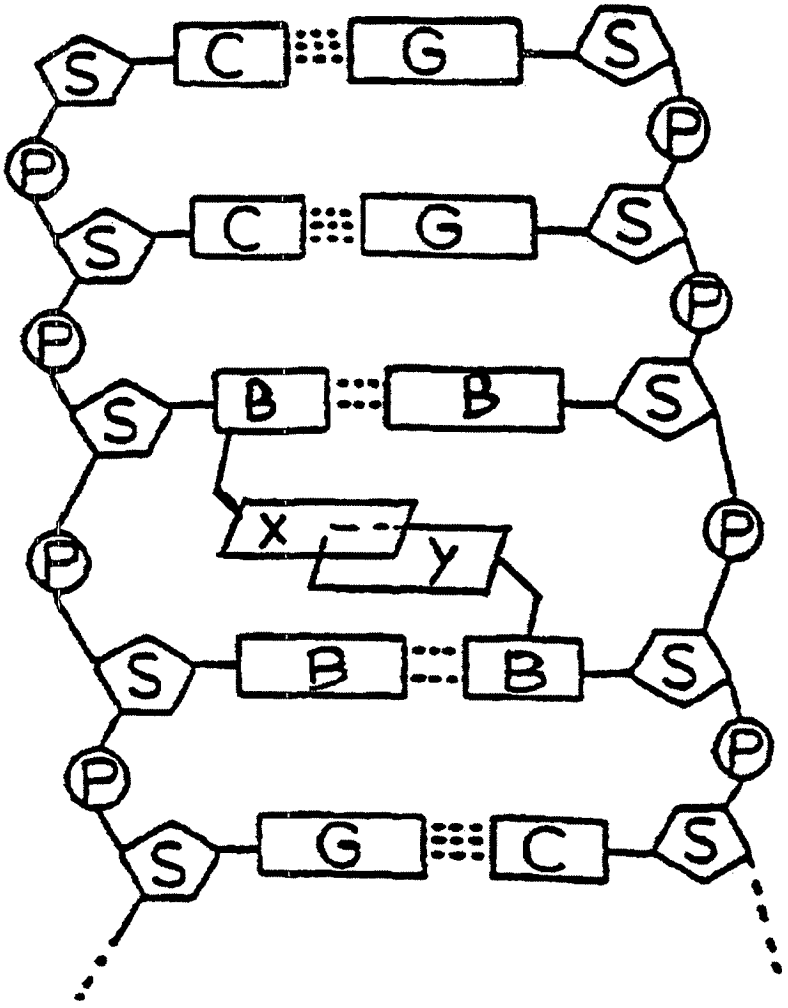
Figur 11



Figur 12

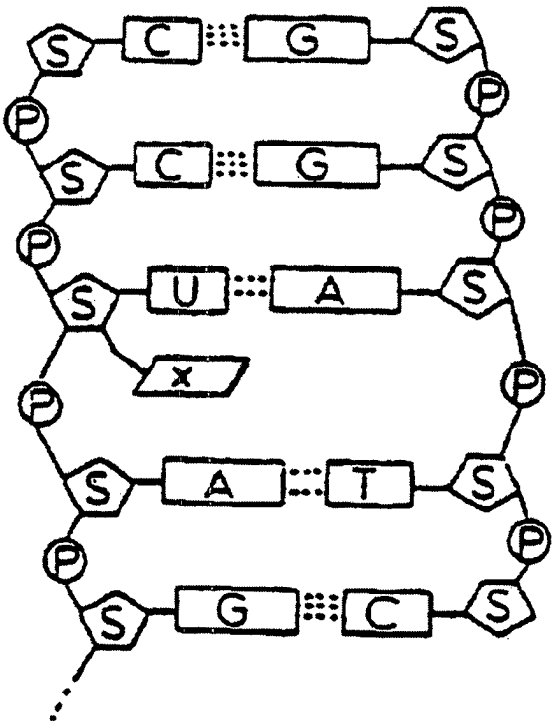


Figur 13



Figur 14

Sonde 1



Oligonukleotid 1.1

Figur 15

