



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 677 285 A5

(51) Int. Cl.⁵: G 01 N 33/50

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) **PATENTSCHRIFT** A5

(21) Gesuchsnummer: 902/88

(22) Anmeldungsdatum: 10.03.1988

(30) Priorität(en): 11.03.1987 US 024604

(24) Patent erteilt: 30.04.1991

(45) Patentschrift
veröffentlicht: 30.04.1991

(73) Inhaber:
Orion-Yhtymä Oy, Espoo (FI)

(72) Erfinder:
Söderlund, Hans, Espoo (FI)
Weckman, Arja, Helsinki (FI)

(74) Vertreter:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel

(54) **Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren und Reagenzienkombination und Besteck zu seiner Durchführung.**

(57) Es wird ein Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren durch Hybridisierung beschrieben, bei dem man als Einfangsonden modifizierte Primer verwendet, die in Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure eingebaut werden, und sodann die Kopien durch mindestens eine selektive Detektorsonde nachweist.

Ferner wird ein Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren durch Hybridisierung beschrieben, bei dem man als Detektorsonden modifizierte Primer verwendet, die in Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäuren eingebaut werden. In diesem Verfahren werden die Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure, in die die modifizierten Primer eingebaut sind, zuerst mit mindestens einer selektiven Einfangsonde hybridisiert, sodann wird das gebildete Hybrid mit Hilfe der Einfangsonde abgetrennt und schliesslich das vorliegende Hybrid nachgewiesen.

Ausserdem betrifft die Erfindung Reagenzienkombinationen und Bestecke zur Durchführung der beschriebenen Verfahren.

Durch die Verwendung der Detektor- oder Einfangsonden als Primer in einer Polymerisationsreaktion ist es möglich, die Empfindlichkeit der Hybridisierungsreaktion um mehrere Grössenordnungen gegenüber Nachweisverfahren zu steigern, bei denen die nachzuweisende Nucleinsäure direkt gemessen wird.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein schnelles und empfindliches Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren mit Hilfe von Hybridisierungstechniken, bei dem die Detektorsonden als modifizierte Primer in Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure eingebaut werden, bevor die Hybridisierungsreaktion durchgeführt wird. Ausserdem betrifft die Erfindung eine Reagenzienkombination und ein Besteck zur Durchführung dieses Verfahrens.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren mit Hilfe von Hybridisierungstechniken, bei dem die Einfangsonden als modifizierte Primer in Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäuren eingebaut werden, bevor die Hybridisierungsreaktion durchgeführt wird. Die Erfindung betrifft ferner eine Reagenzienkombination und ein Besteck zur Durchführung dieses Verfahrens.

Bei Hybridisierungsreaktionen wird ein markiertes Oligo- oder Polynucleotid, d.h. das Sondenmolekül, über Basenpaarungen an eine nachzuweisende Nucleinsäure angelagert. Verschiedene Hybridisierungsverfahren wurden zum Nachweis von Nucleinsäuren verwendet. Bei direkten Hybridisierungsverfahren befindet sich die Probe entweder in Lösung oder sie ist an einen festen Träger gebunden. Die nachzuweisende Nucleinsäure wird mit einem markierten Sondenmolekül nachgewiesen.

Die US-PS 4 486 539 beschreibt ein Sandwich-Hybridisierungs-Verfahren. Bei diesem Verfahren werden zwei getrennte Sondenmoleküle verwendet. Eines davon ist eine Detektorsonde. Sie ist markiert und wird zum Nachweis verwendet. Die andere ist eine Einfangsonde. Sie ist an einem festen Träger immobilisiert und dient der Abtrennung der nachzuweisenden Nucleinsäure vom Reaktionsgemisch.

Das Hybridisierungsverfahren in Lösung wird in der GB-OS 2 169 403 beschrieben. Bei diesem Verfahren werden zwei verschiedene Sondenmoleküle verwendet, die sich in derselben Lösung befinden. Die Detektorsonde wird mit einer nachweisbaren Markierung markiert. Die Einfangsonde wird mit einer Gruppe versehen, die eine Affinität für einen anderen Bestandteil aufweist. Nach der Hybridisierung wird das zwischen der Einfangsonde, der nachzuweisenden Nucleinsäure und der Detektorsonde gebildete Hybrid aus der Hybridisierungslösung mit Hilfe des anderen Teils des Affinitätsaares abgetrennt.

Die enzymatisch katalysierte DNA-Polymerisation, bei der die Nucleotidsequenz eines vorgegebenen Nucleinsäurestranges, d.h. einer Matrize, exakt kopiert wird und dabei der komplementäre Strang synthetisiert wird, ist aus dem Stand der Technik gut bekannt; vgl. z.B. Kornberg, «DNA replication», W.H. Freeman & Co., San Francisco, S. 221–225 und 670–679, 1980, und Maniatis et al., «Molecular Cloning, A Laboratory Manual», Cold Spring Harbor Laboratory, S. 122, 1982. Diese biologische Vermehrung wird bei Hybridisierungs-Nachweisverfahren verwendet, also in Nachweisverfahren, bei denen der nachzuweisende Mikroorganismus gezüchtet und dadurch seine DNA vor der Durchführung des Tests angereichert wird; vgl. z.B. Woo, Methods Enzymol. 68 (1979), S. 389, und US-PS 4 358 535. Spezifische DNA-Sequenzen lassen sich auch in lebenden Zellen amplifizieren, z.B. durch Verwendung geeigneter Arzneistoffe, vgl. z.B. Clewell und Helinski, J. Bacteriol. 110 (1972), S. 1135, und EP-A 55 742. Eine noch spezifischere DNA-Anreicherung wird in der EP-A 175 689 beschrieben. Dabei wird die nachzuweisende Nucleinsäure mit einem Plasmid-Replikon verbunden und in eine geeignete Zelle eingeführt. Eine weitere Methode wird in der EP-A 201 184 beschrieben. Dabei wird die Primer-abhängige DNA-Synthese in einer in vitro-Reaktion zur Amplifikation der nachzuweisenden DNA benützt. In der EP-A 200 362 wird ein Verfahren zum Nachweis amplifizierter Nucleinsäure-Sequenzen vorgeschlagen, das jedoch insbesondere zur Durchführung von Reihenuntersuchungen nicht schnell, empfindlich und einfach genug ist.

Dementsprechend liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein schnell und einfach durchführbares Verfahren zum Nachweis von geringen Nucleinsäure-Konzentrationen bereitzustellen.

Erfindungsgemäss wird diese Aufgabe durch die Bereitstellung eines Hybridisierungsverfahrens gelöst, bei dem entweder die Detektorsonden oder die Einfangsonden als modifizierte Primer wirken, die in die Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure während einer matrizenabhängigen Polymerisationsreaktion vor der Durchführung der Hybridisierung eingebaut werden, bei dem also die nachzuweisende Nucleinsäure amplifiziert wird.

In einem jeden der erfindungsgemässen Verfahren wird mindestens ein Primer benötigt, der immer modifiziert ist. Wenn die Detektorsonden als Primer bei der Polymerisationsreaktion dienen, weisen die Primer mindestens eine geeignete, nachweisbare Markierung oder mindestens eine spezifische Stelle auf, an die mindestens eine geeignete, nachweisbare Markierung gebunden werden kann.

In einem anderen erfindungsgemässen Verfahren werden die Einfangsonden als Primer bei der Polymerisationsreaktion verwendet. Dabei weisen die Primer mindestens ein geeignetes Teil eines Affinitätsaares oder mindestens eine geeignete Stelle auf, an die mindestens ein geeignetes Teil eines Affinitätsaares gebunden werden kann.

Die Erfindung betrifft auch eine Reagenzienkombination und ein Besteck zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens. In einer bevorzugten Ausführungsform befindet sich die Reagenzienkombination in einem unterteilten Behälter.

Durch die Verwendung der Detektor- oder Einfangsonden als Primer in einer Polymerisationsreaktion ist es möglich, die Empfindlichkeit der Hybridisierungsreaktion um mehrere Grössenordnungen gegenüber Nachweisverfahren zu steigern, bei denen die nachzuweisende Nucleinsäure direkt gemessen wird. Ausserdem wird erfindungsgemäss ein bequemes Verfahren zur Durchführung der Hybridisie-

rungsreaktion in Lösung bereitgestellt, so dass die Hybridmoleküle einfach und schnell aus der Hybridisierungslösung nach der Hybridisierungsreaktion abgetrennt werden können.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist besonders brauchbar zur Diagnose bestimmter Krankheiten, die mit üblichen Verfahren nur sehr schwer zu diagnostizieren sind. Daher ist das erfindungsgemässe

5 Verfahren besonders geeignet zur Identifizierung von Cytomegalie-Viren und HIV- bzw. AIDS-Viren.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 zeigt die Nucleotidsequenz der modifizierten Primer P_a und P_b und der selektiven Sondenmoleküle S_1 und S_2 , die in den Beispielen 1 bis 3 verwendet werden. Ferner zeigt sie die relativen Stellen der modifizierten Primer P_a und P_b und der selektiven Sondenmoleküle S_1 und S_2 in der in diesem Fall nachzuweisenden Nucleinsäure. Die durchgehenden Linien A und B bezeichnen die beiden nachzuweisenden Stränge, die in beiden Richtungen weitergehen. Die Pfeilspitzen an den Primern P_a und P_b bezeichnen die Richtung, in der sie während der Polymerisation verlängert werden.

Fig. 2 zeigt die Nucleotidsequenz der modifizierten Primer P_a und P_b und des selektiven Sondenmoleküls S , die in Beispiel 4 verwendet werden. Ferner zeigt sie die relativen Stellen der modifizierten Primer P_a und P_b und des selektiven Sondenmoleküls S in der in diesem Falle nachzuweisenden Nucleinsäure. Die Linie A bezeichnet die RNA und ihre identischen DNA-Kopien, und die Linie B zeigt die komplementären DNA-Kopien. Die Pfeilspitzen an den Primern P_a und P_b bezeichnen die Richtung, in der sie bei der Polymerisation verlängert werden.

Präparation von Sondenmolekülen

Die erfindungsgemäss verwendeten Sondenmoleküle sind Oligo- oder Polynucleotide. Sie können synthetisch oder halbsynthetisch hergestellt werden, je nachdem, welche Herstellungsweise für die als Primer zu verwendenden Sondenmoleküle bevorzugt wird. Ausserdem lassen sich die Sondenmoleküle durch DNA-Rekombinationsverfahren oder aus unmittelbar aus der Natur isolierten Nucleinsäuren herstellen. Ein Sondenmolekül kann an einen geeigneten Vektor gebunden werden. Es kann gegebenenfalls Vektorteile enthalten. Eine Reihe erfindungsgemäss verwendbarer Primer und Sondenmoleküle ist im Handel erhältlich.

Die Detektorsonden als modifizierte Primer

In einem der erfindungsgemässen Verfahren sind die Detektorsonden Oligo- oder Polynucleotide, die an die nachzuweisende Nucleinsäure über Basenpaarungen gebunden werden und als Primer für eine matrizenabhängige, enzymatische Nucleinsäuresynthese dienen. Wesentlich ist, dass die als Detektorsonde wirkenden Primer mindestens eine geeignete, nachweisbare Markierung oder mindestens eine spezifische Stelle aufweisen, an die mindestens eine geeignete, nachweisbare Markierung gebunden werden kann.

Als Markierung lassen sich verschiedene radioaktive Isotope oder radioaktiv markierte Verbindungen verwenden. Die Markierungssubstanz kann auch fluoreszieren, lumineszieren, lichtemittieren oder enzymatisch oder immunologisch nachweisbar sein. Es lassen sich auch Markierungen verwenden, die auf der Affinität von Biotin zu Avidin oder Streptavidin beruhen, Lanthanid-Chelate, Ferritin- und Häm-Verbindungen. Weitere Beispiele sind immunologisch nachweisbare Haptene, wie AAF und AIF (Acetoxyacetylfluorendervivate). Die Identifizierung kann auch mit Hilfe von vermittelnden Molekülen, z.B. Proteinen, durchgeführt werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren hängt nicht von der verwendeten Markierung ab. Alle gegenwärtig bekannten Markierungssubstanzen, die für die Hybridisierung von Nucleinsäuren geeignet sind, lassen sich verwenden. Es ist jedoch wesentlich, dass die Markierung aus einer Gruppe von Markierungen ausgewählt wird, die nicht die Funktion des Primers stören, sofern die Detektorsonden als Primer verwendet werden. Der als Detektorsonde verwendete Primer muss so mit der Markierung versehen werden, dass die Nucleinsäure-Polymerase den Primer immer noch als solchen erkennt.

Die Einfangsonden als modifizierte Primer

In einem anderen erfindungsgemässen Verfahren sind die Einfangsonden Oligo- oder Polynucleotide, die an die nachzuweisende Nucleinsäure über Basenpaarungen gebunden werden und als Primer bei einer matrizenabhängigen, enzymatischen Nucleinsäuresynthese wirken. Wesentlich ist, dass die als Einfangsonde wirkenden Primer mindestens ein geeignetes Teil eines Affinitätspaares oder mindestens eine spezifische Stelle aufweisen, an die mindestens ein geeignetes Teil eines Affinitätspaares gebunden werden kann. Das Teil oder die Teile des Affinitätspaares lassen sich auch über ein vermittelndes Molekül an den als Einfangsonde wirkenden Primer binden. Die einzigen Bedingungen sind, dass sich das Hybrid aus der Hybridisierungslösung mit Hilfe des Affinitätspaares abtrennen lässt und dass die Funktion des Primers nicht beeinträchtigt wird.

Das Teil des Affinitätspaares ist ein Bestandteil mit einer Affinität für einen anderen Bestandteil. Bei-

spiele solcher Affinitätspaare sind Biotin – Avidin oder Streptavidin, ein Schwermetallderivat – eine Thiogruppe, verschiedene Homopolynucleotide, wie Poly dG – Poly dC, Poly dA – Poly dT und Poly dA – Poly U. Es lassen sich aber auch andere Paare von Verbindungen verwenden, vorausgesetzt, dass sie eine ausreichende Affinität für die spezifische Bindung des modifizierten, als Einfangs-
 5 Primers, der in die Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure eingebaut ist, an den festen Träger aufweisen. Geeignete Affinitätspaare sind auch in immunologischen Verfahren verwendete Liganden und Konjugate.

10 Die selektive Einfangs-sonde

In einem der erfindungsgemässen Verfahren, bei dem die Detektorsonde als Primer verwendet wird, wird eine selektive Einfangs-sonde benötigt, um die selektive Abtrennung der Kopien der nachzuweisen-
 15 den Nucleinsäure zu ermöglichen, in die die modifizierten Primer eingebaut sind. Wesentlich ist, dass die Einfangs-sonden ausreichend homolog zur nachzuweisenden Nucleinsäure sind, um ihre spezifische Hybridisierung mit den Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure zu gestatten und dadurch die selekti-
 ve Abtrennung und den Nachweis der als Detektorsonde wirkenden Primer zu ermöglichen, die in die Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure eingebaut sind.

20 Die selektive Detektor-sonde

In einem anderen erfindungsgemässen Verfahren, bei dem die Einfangs-sonden als modifizierte Primer verwendet werden, wird eine selektive Detektor-sonde benötigt, um den Nachweis der Kopien der nach-
 25 zuweisenden Nucleinsäuren zu ermöglichen, in die die modifizierten Primer eingebaut sind. Wesentlich ist, dass die Detektor-sonde ausreichend homolog zur nachzuweisenden Nucleinsäure ist, um spezifisch mit dieser zu hybridisieren und dadurch die nachzuweisende Nucleinsäure selektiv zu identifizieren. Die Detektor-sonden können geeignete, nachweisbare Markierungen aufweisen, beispielsweise die vorste-
 hend genannten.

30 Reagenzienkombinationen

Die Detektor-sonde als modifizierter Primer

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Reagenzienkombination, enthaltend mindestens einen mo-
 35 difizierten Primer, der mindestens eine geeignete, nachweisbare Markierung oder mindestens eine spe- zifische Stelle aufweist, an die mindestens eine geeignete, nachweisbare Markierung gebunden werden kann, und mindestens eine selektive Einfangs-sonde, die mindestens ein Teil eines Affinitäts-
 paares oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die mindestens ein Teil eines Affinitäts-
 paares gebunden werden kann.

40 Die Einfangs-sonde als modifizierter Primer

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Reagenzienkombination enthaltend mindestens einen mo-
 difizierten Primer, der mindestens ein geeignetes Teil eines Affinitäts-
 45 paares oder mindestens eine spezi- fische Stelle aufweist, an die mindestens ein geeignetes Teil eines Affinitäts-
 paares gebunden werden kann, und mindestens eine selektive Detektor-sonde, die mindestens eine geeig-
 nete, nachweisbare Mar- kierung oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die mindestens eine geeignete, nachweisba-
 re Markierung gebunden werden kann.

Die Erfindung beschreibt auch ein für den Nachweis von Nucleinsäure geeignetes Besteck. Das Be-
 50 steck enthält, gegebenenfalls verpackt in einen unterteilten Behälter, eine der vorstehend genannten Reagenzienkombinationen in Verbindung mit mindestens einem der folgenden Reaktanten oder der fol-
 genden Einrichtungen, die beim Testverfahren benötigt werden, d.h. gegebenenfalls ein Gefäss enthal-
 tend mindestens ein Reagens zur matrizenabhängigen Polymerisation, gegebenenfalls ein Gefäss mit
 den vier Desoxynucleosidtriphosphaten, gegebenenfalls eine für die Durchführung der Polymerisation
 und der Hybridisierung geeignete Einrichtung, gegebenenfalls eine zum Abtrennen der Kopien der nach-
 55 zuweisenden Nucleinsäure geeignete Einrichtung, und gegebenenfalls eine zum Nachweis der Markie-
 rung geeignete Einrichtung. Die bevorzugten Einrichtungen und Reaktanten werden nachstehend näher
 erläutert.

Beim erfindungsgemässen Verfahren werden zunächst mindestens zwei modifizierte Primer zu einer
 denaturierten Probenlösung zugegeben. Beide Primer sind entweder als Detektor-sonde oder als Ein-
 60 fangs-sonde wirkende Primer. Dabei lagern sich die modifizierten Primer jeweils an den komplementären
 Strang der nachzuweisenden Nucleinsäure, d.h. die Matrize, an. Nach der Zugabe eines Enzyms, das
 matrizenabhängig Nucleinsäure synthetisiert, werden die Primer verlängert. Dieses Verfahren schrei-
 tet in vitro mit hoher Ausbeute fort. Dabei werden neue Nucleinsäurestränge geschaffen, die mehrere
 tausend Nucleotide lang sein können, sofern die gewählten Bedingungen dafür geeignet sind.

65 Durch Verwendung eines Überschusses der modifizierten Primer kann der Vorgang wiederholt wer-

den, um komplementäre Kopien der neu synthetisierten Stränge herzustellen, die somit identische Kopien der zunächst verwendeten Matrizen darstellen. Durch Wiederholung dieses Vorgangs wird eine Reaktionskaskade eingeleitet, durch die die nachzuweisende Nucleinsäure vervielfältigt wird. Dieser Vorgang lässt sich so oft wie gewünscht wiederholen, um die gewünschte Nachweisempfindlichkeit zu erhalten. In Fällen, in denen die Konzentration der nachzuweisenden Nucleinsäure nicht extrem niedrig ist, reicht eine Vervielfältigung aus, um die Nucleinsäure nachweisbar zu machen.

Es ist auch möglich, lediglich einen modifizierten Primer beim erfindungsgemässen Verfahren zu verwenden. In diesem Fall wird die Vervielfältigung jedoch nicht so wirksam sein, wie bei der Verwendung von mindestens zwei Primern, da keine Reaktionskaskade eingeleitet wird.

Mit dem erfindungsgemässen Verfahren kann sowohl DNA als auch RNA bestimmt werden. Falls jedoch die zu bestimmende Nucleinsäure eine RNA ist, ist es bequemer, zunächst eine entsprechende cDNA-Kopie der RNA mit einer reversen Transkriptase anzufertigen und sodann das erfindungsgemässe Verfahren durchzuführen.

Nachdem die modifizierten Primer in die Kopien der zu bestimmenden Nucleinsäuren eingebaut sind, wird das Reaktionsgemisch mit einem geeigneten selektiven Sondenmolekül versetzt, das die zu bestimmende Sequenz und ihre Kopien erkennt, und die Hybridisierung wird unter Bedingungen durchgeführt, die für den gewünschten Hybridisierungsvorgang geeignet sind.

Bei der Hybridisierungsreaktion wird je nach Wahl der modifizierten Primer entweder eine selektive Einfangs- oder eine selektive Detektorsonde mit den Kopien der zu bestimmenden Nucleinsäure hybridisiert, die nunmehr in vielfachen Mengen gegenüber der Ausgangssituation vorliegt.

Falls die ursprüngliche Probe die nachzuweisende Sequenz enthält, hybridisiert das selektive Sondenmolekül mit den neu synthetisierten Kopien der zu bestimmenden Nucleinsäure. Es wird ein Hybrid zwischen dem kopierten Molekül, in das der modifizierte Primer eingebaut ist, und dem selektiven Sondenmolekül gebildet. Die gebildeten Hybride lassen sich erfindungsgemäss aus der Hybridisierungslösung in einfacher Weise mit Hilfe des Teils des Affinitäts-paares abtrennen, die entweder an dem als Einfangs- oder an der selektiven Einfangs- sonde befestigt ist. Während der Fraktionierung bleiben die Hybride, die einen solchen Fangteil aufweisen, an einem festen Träger mit Hilfe des anderen Teils des Affinitäts-paares haften. Die Menge der selektiven Detektorsonde oder des als Detektorsonde wirkenden Primers, die am Träger haften bleibt, kann in an sich bekannter Weise direkt am Trägermaterial oder nach der Elution im Eluat bestimmt werden. Die ermittelte Menge der Markierung ist ein Mass für die Menge der zu bestimmenden Nucleinsäure.

Vor der Fraktionierung wird die Lösung gegebenenfalls verdünnt, um die Bedingungen vorteilhaft für das Affinitäts-paar zu beeinflussen. Sodann wird die Lösung mit dem festen Träger in Berührung gebracht. Der zu verwendende Träger kann beispielsweise eine Affinitätschromatographiesäule, ein Filter, eine Plastikoberfläche oder eine Glasoberfläche sein. Günstige Einrichtungen zur Durchführung der Abtrennung sind unterschiedliche Typen von Mikrotiterplatten, Eintauchsystemen oder magnetischen Teilchen. Es ist aber auch möglich, die Abtrennung in Teströhrchen oder mit Körnchen durchzuführen.

Als Trägermaterial kann für die Affinitätschromatographiesäule beispielsweise ein natürliches oder synthetisches Polymer, wie die Cellulose, Polyacrylamid, Polystyrol, Dextran oder Agarose, verwendet werden. Diese Materialien können auch als Suspensionen in einem Teströhrchen eingesetzt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Teströhrchen verwendet, an deren innerer Oberfläche das andere Teil des Affinitäts-paares gebunden ist. Eine Voraussetzung für das ausgewählte Material ist, dass es die Bindung eines Bestandteils mit Affinität zu dem Teil des Affinitäts-paares gestattet, an den als Einfangs- oder an der selektiven Einfangs- sonde gebunden ist.

Es ist nicht erforderlich, das Teil oder die Teile des Affinitäts-paares an den als Einfangs- oder an der selektiven Einfangs- sonde wirkenden Primer zu Beginn der Polymerisation zu binden. Auch ist es nicht notwendig, die nachweisbare Markierung an den als Einfangs- oder an der selektiven Einfangs- sonde wirkenden Primer vor der Polymerisation zu binden. Sie können auch nach der Polymerisation an den modifizierten Primer angelagert oder gebunden werden, der in die Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure eingebaut ist. Wenn beispielsweise die nachweisbare Markierung bei den Hybridisierungsbedingungen nicht beständig ist, kann sie auch nach der Hybridisierung der selektiven Einfangs- sonde mit den Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure zugegeben werden.

Wenn die Detektorsonden als modifizierte Primer wirken, die in die Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure eingebaut sind, lässt sich das Hybrid aus dem Reaktionsgemisch mit Hilfe selektiver Einfangs- sonden abtrennen, die an festen Trägern immobilisiert sind. Bei einem derartigen Verfahren wird die Reaktionsgeschwindigkeit dadurch begrenzt, dass die nachzuweisende Nucleinsäure und ihre Kopien, in die die als Detektorsonde wirkenden Primer eingebaut sind, mit der selektiven Einfangs- sonde hybridisiert werden müssen, die an einem festen Träger immobilisiert ist. Deshalb wird bei der vorliegenden Erfindung die Hybridisierung in Lösung bevorzugt. Falls das Verfahren jedoch mit einer immobilisierten Einfangs- sonde durchgeführt wird, wird das am festen Träger gebildete Hybrid gewaschen, und die Menge der Markierung am Trägermaterial wird in an sich bekannter Weise gemessen.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Nachweis von Cytomegalievirus-DNA mit als modifizierte Primer wirkenden Detektorsonden

5 In diesem erfindungsgemässen Beispiel wird als nachzuweisende Nucleinsäure das rekombinante Plasmid pBR322/CMV HindIII L verwendet. Dieses enthält ein 12,3 kb Fragment des Cytomegalievirus-Genoms (CMV, AD 169, ATCC VR-538). Die beiden als Detektorsonde verwendeten Primer P_a und P_b (vgl. Fig. 1) haben eine Länge von 20 Nucleotiden und wurden in an sich bekannter Weise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät synthetisiert. Sie entsprechen zwei Regionen der CMV-spezifischen Insertion, die 111 Nucleotide voneinander entfernt sind. Die beiden selektiven Einfangsonden S₁ und S₂ (vgl. Fig. 1) erkennen Bereiche in jedem der beiden DNA-Stränge, die zwischen den beiden als Detektorsonde wirkenden Primern liegen. Die als Detektorsonde wirkenden Primer P_a und P_b werden mit ³²P an ihren 5'-Enden so markiert, dass ihre spezifische Aktivität 4 × 10⁹ CPM/μg beträgt. Die Markierung wird in an sich bekannter Weise mit Polynucleotidkinase und Gamma-³²P-ATP durchgeführt; vgl. Maniatis et al., «Molecular Cloning, A Laboratory Manual», Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

15 Die 3'-Enden der Einfangsonden werden mit biotinylierten Nucleotiden versehen. Dabei wird Bio 11-dUTP (BRL) und eine terminale Transferase (Promega Biotech.) verwendet; vgl. Riley et al., DNA 5 (4) (1986), S. 333–337. Das nachzuweisende Plasmid wird durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym EcoRI linearisiert. DNA-Polymerase, Klenow-Fragment, wurde bei Boehringer-Mannheim und Streptavidin-Agarose bei BRL gekauft.

Mit diesen Reagenzien wird das folgende Experiment durchgeführt:

Es werden vier unterschiedliche Reaktionen durchgeführt, die 0, 10⁴, 10⁶ und 10⁸ Moleküle des nachzuweisenden Plasmids enthalten. Dies entspricht 0,2 × 10⁻²⁰, 2 × 10⁻¹⁸ bzw. 2 × 10⁻¹⁶ Mol. Weitere Bestandteile des Gesamtreaktionsvolumens von 50 μl sind 2 pMol der beiden Primer, 0,5 mM von jedem der vier Desoxynucleosidtriphosphate (d.h. dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl und 10 mM Dithiothreitol. Das Reaktionsgemisch wird 2 Minuten auf 100°C erhitzt und dann 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend wird 1 μl (1 Einheit) DNA-Polymerase zugegeben. Das Gemisch wird nochmals 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Aufkochen und das anschliessende Anlagern der als Detektorsonde wirkenden Primer sowie die Inkubation mit der DNA-Polymerase bei 37°C ist ein DNA-Synthesekyklus. Bei diesem Experiment wird der Reaktionszyklus entweder nur einmal durchgeführt oder 5- oder 15mal wiederholt. Nach dem letzten Reaktionszyklus wird die Probe nochmals auf 100°C erhitzt. Sodann werden 100 pMol der selektiven Einfangsonde und 0,9M NaCl, 20 mM EDTA, 20 mM Natriumphosphat (pH 7,5) und 0,1% Natriumdodecylsulfat zugegeben. Das Gesamtvolumen beträgt 100 μl. Die angegebenen Konzentrationen sind die Endkonzentrationen. Das Gemisch wird sodann 1 Stunde bei 50°C inkubiert. Nach dieser Hybridisierungsreaktion werden 200 μl einer 25%igen Suspension von Streptavidin-Agarose in 1M NaCl, 20 mM Natriumphosphat (pH 7,5) und 1 mM EDTA zugegeben. Es wird 15 Minuten bei 37°C in einem Rotationsmischer inkubiert, damit die biotinylierten Moleküle an die Streptavidin-Agarose binden können. Die Agarose wird kurz abzentrifugiert und der Überstand wird abgebaut. Sodann wird die Agarose einmal mit gepufferter 1M NaCl-Lösung und zweimal mit einer Lösung enthaltend 150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat und 0,2% Natriumdodecylsulphat (pH 8) bei 37°C gewaschen. Sodann wird die durch die gebildeten Hybride an die Agarose gebundene Radioaktivität mit einem Zählgerät bestimmt. Das Isolierungs- und Waschverfahren der die biotinylierten Markierungen enthaltenden DNA-Hybride erfolgt wie in der GB-A 2 169 403.

Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle I zusammengefasst. Aus Tabelle I ergibt sich, dass bei einem einzigen DNA-Synthesekyklus nur dann genügend Radioaktivität für den Nachweis eingebaut wird, wenn hohe Ausgangskonzentrationen der nachzuweisenden Nucleinsäure vorliegen. Werden jedoch 15 DNA-Synthesekyklen durchgeführt, lassen sich selbst sehr geringe Mengen dieser nachzuweisenden Nucleinsäure nachweisen. Bei einer grossen Menge der nachzuweisenden Nucleinsäure und 15 DNA-Synthesekyklen wird die Reaktion durch die Menge des als Detektorsonde wirkenden Primers begrenzt.

Tabelle I

Menge der nachzuweisenden Nucleinsäure (Mol)	³² P-Aktivität in den gesammelten Hybriden ^a (CPM über Hintergrund) ^b			Anzahl der DNA-Synthesezyklen
	1	5	15	
0	0	0	0	
2×10^{-20}	ND	ND	650	
2×10^{-18}	ND	300	11 000	
2×10^{-16}	700	13 000	36 000	

^a Mittelwert aus zwei Messungen
^b ND: nicht nachweisbar (weniger als zweimal soviel Radioaktivität wie die mittlere Hintergrundaktivität)

Beispiel 2

Bestimmung von Cytomegalievirus-DNA mit Einfangsonden als modifizierte Primer

Bei diesem erfindungsgemässen Beispiel werden die Einfangsonden als Primer verwendet. Bis auf die nachfolgend genannten Abweichungen werden die gleichen Reagenzien wie in Beispiel 1 verwendet. Die als Einfangsonde wirkenden Primer P_a und P_b (vgl. Fig. 1) werden nicht mit ³²P markiert. Statt dessen werden ihre 5'-Enden mit einem Biotinrest versehen. Diese chemische Modifizierung wird in an sich bekannter Weise durchgeführt, vgl. Chollet und Kawashima, Nucleic Acids Research, 13 (1985), S. 1529 – 1541. Die beiden selektiven Sondenmoleküle S₁ und S₂ (vgl. Fig. 1) werden in diesem Experiment an ihren 5'-Enden markiert. Sie werden als Detektorsonden verwendet. Ihre spezifischen Aktivitäten sind 2×10^9 bzw. $2,5 \times 10^9$ cpm/μg.

Die Reaktionsgemische haben die in Beispiel 1 beschriebene Zusammensetzung. Die biotinylierten, als Einfangsonde wirkenden Primer, werden jedoch in 10facher Menge zugefügt, d.h. 20 pM pro Reaktion. Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden 1,5 oder 15 DNA-Synthesezyklen durchgeführt. Sodann werden die Proben auf 100°C erhitzt und 0,5 pM von jedem der ³²P-markierten Sondenmoleküle S₁ und S₂ werden zugegeben. Die Hybridisierung wird unter den in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Die Hybride werden sodann an Streptavidin-Agarose gesammelt, gewaschen und die ³²P-Aktivität wird wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst.

Tabelle II

Menge der nachzuweisenden Nucleinsäure (Mol)	³² P-Aktivität in den gesammelten Hybriden ^a (CPM über Hintergrund) ^b			Anzahl der DNA-Synthesezyklen
	1	5	15	
0	0	0	0	
2×10^{-20}	ND	ND	800	
2×10^{-18}	ND	400	13 000	
2×10^{-16}	300	11 000	54 000	

^a Mittelwert aus zwei Messungen
^b ND: nicht nachweisbar (vgl. Beispiel 1)

Beispiel 3

Nachweis von Cytomegalievirus-DNA aus klinischen Proben mit Einfangsonden als modifizierte Primer

In diesem Beispiel wird gezeigt, dass das erfindungsgemässe Verfahren zur Untersuchung klinischer Proben geeignet ist. Dies erfolgt durch den Nachweis von CMV aus dem Urin eines Kindes, das bekanntermassen an einer Cytomegalievirus-Infektion leidet. Der Urin eines gesunden Kindes wird dabei als Kontrolle verwendet. Aus zwei Proben mit jeweils 10 ml Urin wird die Gesamt-DNA isoliert nach der Vor-

schrift von Virtanen et al., J. Clin. Microbiol. 20 (6) (1984), S. 1083–1088. Die in 20 µl H₂O gelösten DNA's werden als nachzuweisende Nucleinsäure in gemäss Beispiel 2 ausgeführten Reaktionen verwendet. Nach 10 DNA-Syntheseyklen wird die Probe mit dem markierten, selektiven Sondenmolekül versetzt. Sodann wird die Hybridisierung durchgeführt und die Hybride werden gesammelt. Die DNA aus dem Urin des Patienten zeigt in den Hybriden eine deutlich erhöhte Radioaktivität, während die des gesunden Kindes lediglich Hintergrund-Radioaktivität zeigt. Die tatsächlichen cpm-Werte sind 2300 bzw. 240.

Beispiel 4

Nachweis von SFV (Semliki Forest-Virus)-RNA mit Einfangsonden als modifizierte Primer

Beispiel 4 zeigt, dass das erfindungsgemässe Verfahren auch für den Nachweis von RNA geeignet ist. Als Modellsystem wird SFV (Semliki Forest-Virus)-RNA verwendet.

Die verwendeten Reagenzien sind zwei 5'-biotinylierte, als Einfangsonde wirkende Primer (vgl. Fig. 2), die wie in Beispiel 2 beschrieben hergestellt wurden, eine einzige 5'-³²P-markierte, selektive Detektorsonde, die wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt wurde, reverse Transkriptase (Promega Biotech) und DNA-Polymerase, Klenow-Fragment (Boehringer Mannheim).

Der erste Schritt beim Nachweis der SFV-RNA ist die Synthese einer cDNA-Kopie. In 20 µl Reaktionsgemisch sind 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 0,5 mM von jedem der vier Desoxynucleosidtriphosphate, 0,5 µg t-RNA, 10 pg SFV-RNA, 10 pM als Einfangsonde wirkender Primer P_a und 100 Einheiten reverse Transkriptase enthalten. Dieses Reaktionsgemisch wird 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Sodann wird das Gemisch 5 Minuten auf 100°C erhitzt und bei Umgebungstemperatur abgekühlt. Anschliessend wird das Reaktionsgemisch mit 50 µl einer Lösung, enthaltend 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 10 pM des als Einfangs-sonde wirkenden Primers P_b und mit 0,5 mM von jedem der vier Desoxynucleosidtriphosphate versetzt. Die Temperatur wird auf 37°C erhöht. Nach 5 Minuten wird 1 Einheit DNA-Polymerase zugegeben. Es wird 10 Minuten inkubiert und das Reaktionsgemisch wird 5 Minuten auf 100°C erhitzt. Sodann wird das Reaktionsgemisch auf 37°C abgekühlt. Insgesamt werden 5 DNA-Syntheseyklen durchgeführt. Nach einem letzten Denaturierungsschritt werden 0,1 pMol (1,2 × 10⁶ cpm) der selektiven Detektorsonde in 80 µl 1M NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM Natriumphosphat (pH 7,5) und 0,1% Natriumdodecylsulfat zugegeben. Die Lösung wird 2 Stunden bei 55°C inkubiert. Anschliessend werden die Hybride gesammelt und wie in Beispiel 1 beschrieben gewaschen.

Als negative Kontrolle für die Reaktionen wird eine identische Probe in gleicher Weise behandelt, jedoch ohne Zugabe der reversen Transkriptase. Die Probe, in der ausgehend von der RNA mit reverser Transkriptase eine cDNA-Kopie hergestellt wurde, ergibt eine ³²P-Aktivität von 420 cpm in den eingefangenen Hybriden, während die negative Kontrolle lediglich 50 cpm ergibt.

Beispiel 5

Vergleich verschiedener Methoden zum Nachweis von vervielfältigter DNA

In diesem Beispiel werden drei Methoden zum Nachweis von vervielfältigter DNA verglichen. Es werden die Reagenzien und das Vervielfältigungsverfahren von Beispiel 1 und 2 verwendet. Jedoch werden als selektive Einfangs- oder Detektorsonden M13-Clone verwendet, die etwa 100 Nucleotide zwischen den Primern erkennen.

Die M13-Clone werden durch Subclonierung eines HaeIII-Restriktionsfragmentes des rekombinanten Plasmids pBR322/CMV HindIII L in den Phagen Vektor M13mp10 in üblicher Weise erhalten. Die als selektive Einfangsonden zu verwendenden M13-Clone werden unter Verwendung von Photoprobe®-Biotin (Vector Laboratories) mit Biotin modifiziert. Die als selektive Detektorsonden zu verwendenden M13-Clone werden mit ³²P-dCTP unter Verwendung von DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) und Primer-Verlängerung markiert, so dass die spezifische Aktivität 2 × 10⁸ cpm/µg beträgt; vgl. Hu und Messing, Gene 17 (1982), S. 271–277.

Jetzt werden 10 Vervielfältigungscyclen von 3 × 10⁵ Molekülen (0,5 × 10⁻¹⁶ Mol) des linearisierten Plasmids pBR322/CMV HindIII L durchgeführt. Zum Nachweis nach der Methode 1 und 2 werden jeweils 2 pMol der ³²P-markierten, als Detektorsonde wirkenden Primer P_a und P_b verwendet. Das Vervielfältigungsverfahren wird gemäss Beispiel 1 durchgeführt. Zum Nachweis nach der Methode 3 werden 25 pMol der biotinylierten als Einfangs-sonde wirkenden Primer im Vervielfältigungsverfahren verwendet. Dabei wird die Reaktion wie in Beispiel 2 beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse der Nachweismethode 1: Verwendung einer selektiven Einfangs-sonde zum Einsammeln der in Lösung mit den Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure gebildeten Hybride.

Bei dieser Nachweismethode werden biotinylierte selektive M13 Einfangs-onden zum Einsammeln der vervielfältigten DNA-Fragmente verwendet. Nach dem letzten Vervielfältigungscyclus wird das Probengemisch auf 100°C erhitzt und mit jeweils 2 × 10⁹ Molekülen der biotinylierten, selektiven Anfangs-

sonden sowie mit NaCl (0,6 M), EDTA (5 mMol) Natriumphosphat (20 mMol) und SDS (0,1%) versetzt. Angegeben sind die Endkonzentrationen in einem Endvolumen von 100 µl. Das Reaktionsgemisch wird 2 Stunden bei 65°C inkubiert. Die gebildeten Hybride werden an Streptavidin-Agarose wie in Beispiel 1 beschrieben, abgetrennt, jedoch wird zusätzlich zweimal jeweils 1 Minute bei 50°C mit 15 mM NaCl, 1,5 mM Natriumcitrat und 0,2% SDS gewaschen. Die Radioaktivität der abgetrennten Hybride wird gemessen.

Nachweismethode 2: Verwendung von vor der Hybridisierung mit den Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure immobilisierten, selektiven Einfangsonden

Bei dieser Methode werden immobilisierte, selektive M13-Sondenmoleküle zum Einfangen der vervielfältigten DNA verwendet. Nach den letzten Vervielfältigungscyclen werden die Proben auf 100°C erhitzt. Sodann werden sie mit NaCl (0,6 M), Natriumcitrat (60 mM), Ficoll® (0,02%), Polyvinylpyrrolidon (0,02%), Rinderserumalbumin (0,02%) und denaturierter Heringspermien-DNA (0,2 mg/ml) versetzt. Wie angegeben, sind die Endkonzentrationen in einem Endvolumen von 100 µl. Sodann wird jede Probe mit einer Nitrocellulosefilterscheibe versetzt, an der 5×10^{10} Moleküle von jedem der selektiven Sondenmoleküle nach dem in der US-PS 4 486 539 beschriebenen Verfahren immobilisiert sind. Das Gemisch wird 2 oder 18 Stunden bei 65°C mit Filtern inkubiert. Nach der Hybridisierung werden die Filter zweimal jeweils 20 Minuten bei 50°C mit 15 mM NaCl, 1,5 mM Natriumcitrat und 0,2% SDS gewaschen und die an die Filter gebundene Radioaktivität wird gemessen.

Nachweismethode 3: Verwendung einer selektiven Detektorsonde zum Nachweis

Bei dieser Methode werden ^{32}P -markierte, selektive M13-Detektorsonden zum Nachweis der vervielfältigten DNA verwendet. Die Hybride werden mit Hilfe der als Anfangssonde wirkenden Primer abgetrennt, die an ihren 5'-Enden gemäss Beispiel 2 biotinyliert sind. Die vervielfältigten Proben werden auf 100°C erhitzt und mit 2×10^8 Molekülen (2×10^5 cpm) von jedem der ^{32}P -markierten, selektiven Sondenmoleküle wie bei Nachweismethode 1 mit Salzen versetzt. Die Hybridisierung und die Abtrennung der gebildeten Hybride wird gemäss Nachweismethode 1 durchgeführt.

Die bei den drei Nachweismethoden erhaltenen Ergebnisse werden in Tabelle III zusammengefasst und verglichen.

Die Methoden 1 und 3 haben den Vorteil einer höheren Hybridisierungsgeschwindigkeit in Lösung, verglichen zur Filterhybridisierung bei der Methode 2. Die höchste ^{32}P -Aktivität wird bei der Methode 3 erhalten, da die selektive Detektorsonde viele ^{32}P -Atome pro Molekül enthält.

Tabelle III

Methode	Primer	Selektives M13-Sondenmolekül	Hybridisierungszeit, Std.	^{32}P -Aktivität in den Hybridmolekülen (cpm) ^a
1	^{32}P -markierter Primer als Detektorsonde	biotinylierte Einfangsonde	2	870
2	^{32}P -markierter Primer als Detektorsonde	immobilisierte Einfangsonde	2 18	43 920
3	biotinylierter Primer als Einfangsonde	^{32}P -markierte Detektorsonde	2	7800

^a Mittel aus drei Messungen (cpm über Hintergrund)

Beispiel 6

Vervielfältigung von Cytomegalievirus-DNA mit biotinyliertem als Detektorsonde wirkenden Primern und indirekte Bestimmung mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase

Bei diesem Beispiel wird die Vervielfältigung des CMV-Plasmids (pBR322/CMV HindIII L) mit den als Detektorsonde wirkenden, biotinylierten Primern Pa und Pb gemäss Beispiel 2 durchgeführt. Die in Beispiel 5 beschriebenen M13-Clone werden mit Sulfongruppen modifiziert und als selektive Einfangsonden verwendet. Die gebildeten Hybride werden in den Bohrungen von Mikrotiterplatten abgetrennt, die mit Disulfon-modifizierte DNA erkennenden Antikörpern beschichtet sind. Der Nachweis der gebildeten Hybride wird schliesslich mit einem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat durchgeführt, das die Biotinreste der Primermoleküle nachweist.

Die M13-Clone werden durch eine Sulfonierungsreaktion modifiziert. Dabei werden die von der Firma Organics Ltd (Yavne, Israel) empfohlenen Reagenzien und Verfahren verwendet. Polystyrol-Mikrotiterplatten (Nunc, Dänemark) werden mit 10 µg/ml IgG in 10 mM Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,6) über Nacht bei 4°C beschichtet. Das IgG wurde durch Reinigung eines monoclonalen Antikörpers gegen mit Sulfongruppen modifizierte DNA erhalten (Organics Ltd.).

Reaktionsgemische enthalten 3×10^5 Moleküle des linearisierten Plasmids pBR322/CMV HindIII L oder Kontrollen ohne Plasmid und 25 pMol von jedem der biotinylierten Primer P_a und P_b werden unter den in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen 10 Vervielfältigungscyclen unterworfen. Die Proben werden auf 100°C erhitzt und dann mit jeweils 2×10^9 Molekülen von jeder der sulfonierten, selektiven Einfangsonden zusammen mit den in Beispiel 5 für die Methode 1 angegebenen Reagenzien versetzt.

Das Gemisch wird 2 Stunden bei 65°C inkubiert, mit 100 µl 0,2% Tween 20 verdünnt und in die beschichteten Mikrotiterplatten überführt. Die Hybride werden 2 Stunden bei 37°C an die Bohrungen der Mikrotiterplatte gebunden. Das Reaktionsgemisch wird verworfen und die Bohrungen werden jeweils 3mal mit 0,1% Tween 20 in 0,15 molar Natriumchlorid, 20 mM Natriumphosphat (pH 7,5) (PBS) gewaschen. Es werden 200 µl eines Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugats (Amersham, UK) zugesetzt, das 1:2000 in einer einprozentigen Rinderserumalbumin-Lösung mit 0,1% Tween 20 in PBS verdünnt ist. Die Bohrungen der Mikrotiterplatte werden 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise wird viermal gewaschen. Sodann werden 200 µl einer Substratlösung, bestehend aus 0,46 mg/ml o-Phenylendiamin, 0,01% H₂O₂ in 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 5,0) zugegeben. Nach 15 Minuten bei 22° wird die Umsetzung durch Zugabe von 50 µl 2N H₂SO₄ gestoppt, und die Absorption des farbigen Reaktionsprodukts bei 492 nm wird mit einem Photospektrometer gemessen. Diese Abtrennungs- und Nachweisverfahren wurden bereits von Syvänen et al in Nucleic Acids Res. 14 (1986), S. 5037–5048 beschrieben.

Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle IV zusammengefasst. 3×10^5 Moleküle ($0,5 \times 10^{-18}$ Mol) des nachzuweisenden Plasmids sind nach 10 Vervielfältigungscyclen deutlich nachweisbar.

Tabelle IV

Menge der nachzuweisenden Nucleinsäure (Mol)	Absorption bei 492 nm ^a
$0,5 \times 10^{-18}$	0,348
0	0,120
^a Mittelwert aus drei Messungen.	

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren durch Hybridisierung, dadurch gekennzeichnet, dass man dabei als Einfangsonden Primer verwendet, die mindestens einen geeigneten Teil eines Affinitäts-paares oder mindestens eine spezifische Stelle aufweisen, an die mindestens ein geeigneter Teil eines Affinitäts-paares gebunden werden kann, welche Einfangsonden in Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure eingebaut werden, und sodann die Kopien durch mindestens eine selektive Detektorsonde nachweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man

(a) mindestens einen Primer der nachzuweisenden Nucleinsäure mit mindestens einem Teil eines Affinitäts-paares oder mit mindestens einer spezifischen Stelle bereitstellt, an der mindestens ein Teil eines Affinitäts-paares gebunden werden kann;

(b) den oder die als Einfangsonde wirkenden Primer mit der einzelsträngigen, nachzuweisenden Nucleinsäure unter Bedingungen reagieren lässt, die eine matrizenabhängige Polymerisationsreaktion gestatten;

(c) die einzelsträngigen Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure, in die die als Einfangsonde wirkenden Primer eingebaut sind, mit einer Detektorsonde hybridisiert, die selektiv mit der nachzuweisenden Nucleinsäure zu hybridisieren vermag;

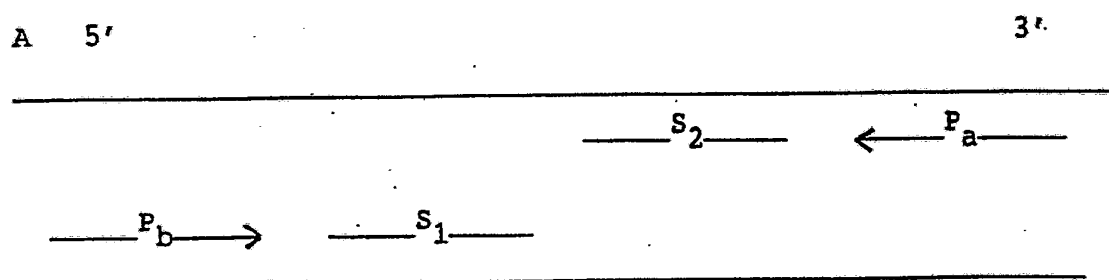
(d) die Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure, in die die als Einfangsonde wirkenden Primer eingebaut sind, mit Hilfe des anderen Teils des Affinitäts-paares abtrennt; und

(e) die vorliegenden selektiven Detektorsonden nachweist, die mit den Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure hybridisiert haben.

3. Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren durch Hybridisierung, bei dem man als Detektorsonden Primer verwendet, die mindestens eine geeignete, nachweisbare Markierung oder mindestens eine spezifische Stelle aufweisen, an die mindestens eine geeignete, nachweisbare Markierung gebunden werden kann, welche Detektorsonden in Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäuren eingebaut werden, dadurch gekennzeichnet, dass man die Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäuren, in die die Detektorsonden eingebaut sind, zuerst mit mindestens einer selektiven Einfangsonde hybridisiert, das gebildete Hybrid mit Hilfe der Einfangsonde abtrennt und sodann das vorliegende Hybrid nachweist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man
- (a) mindestens einen Primer der nachzuweisenden Nucleinsäure mit mindestens einer nachweisbaren Markierung oder mindestens einer spezifischen Stelle bereitstellt, an die mindestens eine nachweisbare Markierung gebunden werden kann;
 - 5 (b) den oder die als Detektorsonde wirkenden Primer mit der einzelsträngigen, nachzuweisenden Nucleinsäure unter Bedingungen reagieren lässt, die eine matrizenabhängige Polymerisationsreaktion gestatten;
 - (c) die einzelsträngigen Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure, in die die als Detektorsonde wirkenden Primer eingebaut sind, mit einer Einfangs-sonde hybridisiert, die selektiv mit der nachzuweisenden Nucleinsäure zu hybridisieren vermag;
 - 10 (d) die Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure, in die die als Detektorsonde wirkenden Primer eingebaut sind, mit Hilfe der selektiven Einfangs-sonde abtrennt; und
 - (e) die vorliegenden Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäuren nachweist.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die selektive Einfangs-sonde mindestens einen Teil eines Affinitäts-paares oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die mindestens ein Teil eines Affinitäts-paares gebunden werden kann.
6. Reagenzienkombination zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 3 zum Nachweis von Nucleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass sie folgende Bestandteile enthält:
- (a) als Detektorsonde mindestens einen Primer einer nachzuweisenden Nucleinsäure, der mindestens eine nachweisbare Markierung oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die mindestens eine nachweisbare Markierung gebunden werden kann; und
 - 20 (b) mindestens eine Einfangs-sonde, die selektiv mit der nachzuweisenden Nucleinsäure zu hybridisieren vermag und mindestens einen Teil eines Affinitäts-paares oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die mindestens ein Teil eines Affinitäts-paares gebunden werden kann.
7. Reagenzienkombination zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 zum Nachweis von Nucleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass sie folgende Bestandteile enthält:
- (a) als Einfangs-sonde mindestens einen Primer einer nachzuweisenden Nucleinsäure, der mindestens einen Teil eines Affinitäts-paares oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die mindestens ein Teil eines Affinitäts-paares gebunden werden kann; und
 - 30 (b) mindestens eine Detektorsonde, die selektiv mit der nachzuweisenden Nucleinsäure zu hybridisieren vermag und mindestens eine nachweisbare Markierung oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die eine nachweisbare Markierung gebunden werden kann.
8. Besteck zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 3 zum Nachweis von Nucleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Bestandteile enthält:
- 35 (a) als Detektorsonde mindestens einen Primer einer nachzuweisenden Nucleinsäure, der mindestens eine nachweisbare Markierung oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die mindestens eine nachweisbare Markierung gebunden werden kann;
 - (b) mindestens eine Einfangs-sonde, die selektiv mit der nachzuweisenden Nucleinsäure zu hybridisieren vermag und mindestens einen Teil eines Affinitäts-paares oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die mindestens ein Teil eines Affinitäts-paares gebunden werden kann;
 - 40 (c) ein Gefäß, enthaltend mindestens ein Reagens zur matrizenabhängigen Polymerisation; und/oder
 - (d) ein Gefäß mit den vier Desoxynucleosidtriphosphaten; und/oder
 - (e) eine Einrichtung zur Durchführung der Polymerisation und der Hybridisierung; und/oder
 - (f) eine Einrichtung zum Abtrennen der Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure; und/oder
 - 45 (g) eine Einrichtung zum Nachweis der Markierung.
9. Besteck zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 zum Nachweis von Nucleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Bestandteile enthält:
- (a) als Einfangs-sonde mindestens einen Primer der nachzuweisenden Nucleinsäure, der mindestens einen Teil eines Affinitäts-paares oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die mindestens ein Teil eines Affinitäts-paares gebunden werden kann;
 - 50 (b) mindestens eine Detektorsonde, die selektiv mit der nachzuweisenden Nucleinsäure zu hybridisieren vermag und die mindestens eine nachweisbare Markierung oder mindestens eine spezifische Stelle aufweist, an die mindestens eine nachweisbare Markierung gebunden werden kann;
 - (c) ein Gefäß, enthaltend mindestens ein Reagens zur matrizenabhängigen Polymerisation; und/oder
 - 55 (d) ein Gefäß mit den vier Nucleosidtriphosphaten; und/oder
 - (e) eine Einrichtung zur Durchführung der Polymerisation und der Hybridisierung; und/oder
 - (f) eine Einrichtung zur Abtrennung der Kopien der nachzuweisenden Nucleinsäure; und/oder
 - (g) eine Einrichtung zum Nachweis der Markierung.

Fig. 1



B 3' 5'

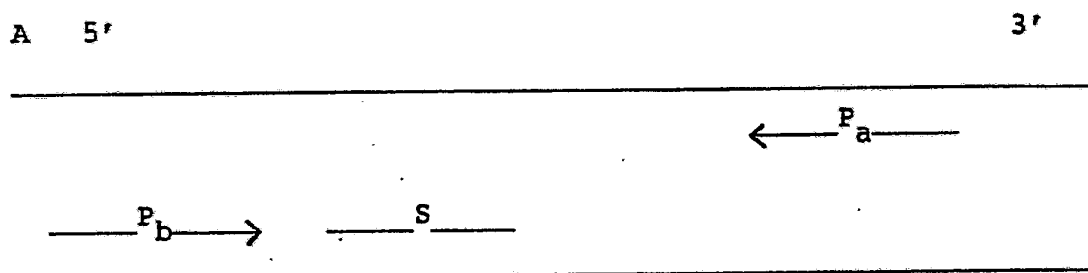
P_a : 5'-GAA CAT GTA GTC GGC CAC GG

P_b : 5'-AGC TCT TTC CCG GCC TGG CT

S_1 : 5'-ACG TCG CGA GGA CAG CGC CG

S_2 : 5'-ATG AGC AGC GCC GCC GCC GT

Fig. 2



B 3' 5'

P_a : 5'-TGC TCT GGC ATT TGC ATG

P_b : 5'-GAG GCT GAC AGC CCA TTC

S 5'-CAT TTC CGT CGT TCG AGG TGG AGT CAT TGC