



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 14 399 T2 2005.12.08**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 206 571 B1**

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/68**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 14 399.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/11651**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 928 615.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/66783**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.05.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.11.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.05.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.12.2005**

(30) Unionspriorität:
132443 P 04.05.1999 US

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

(73) Patentinhaber:
**Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, N.Y.,
US**

(72) Erfinder:
**BELLY, T., Robert, Webster, US; SUN, Jianbo,
Rochester, US**

(74) Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(54) Bezeichnung: **SCHNELLE UND WIRKSAME DNS-IMMOBILISIERUNG AUS EINER PROBE OHNE DIE VERWEN-
DUNG VON ZELLYSREAGENZIEN**

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

BEREICH DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren für die Zubereitung einer Probe durch das Fangen und die selektive Freisetzung von Nukleinsäuren für den Nachweis. Insbesondere betrifft es ein Verfahren für das Fangen und die Freisetzung von Nukleinsäuren für eine anschließende Behandlung wie eine Vervielfältigung. Sie betrifft auch Testkits für die Verwendung in diesem Verfahren.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Technologie zum Nachweis minimaler Nukleinsäuremengen ist über die letzten zwei Jahrzehnte rasch vorangeschritten, umfassend die Entwicklung höchst anspruchsvoller Vervielfältigungsverfahren wie der Polymerasekettenreaktion (PCR = „polymerase chain reaction“). Die Forscher haben ohne weiteres den Wert solcher Technologien erkannt, um Nukleinsäuren nachzuweisen, die einen Hinweis auf Erkrankungen und genetische Merkmale im menschlichen oder tierischen Testproben darstellen. Die Verwendung von Sonden und Primern in solchen Technologien beruht auf dem Konzept der Komplementarität, daß bedeutet der Bindung zweier Stränge einer Nukleinsäure über Wasserstoffbrückenbindung zwischen komplementären Nukleotiden (auch als Nukleotidpaarung bekannt).

[0003] Die PCR ist ein wesentlicher Fortschritt im Stand der Technik, um den Nachweis sehr niedriger Konzentration einer Zielnukleinsäure zu erlauben. Die Details der PCR werden beispielsweise in dem U.S. Patent Nr. 4,683,195 (Mullis et al.), U.S. Patent Nr. 4,683,202 (Mullis) und U.S. Patent Nr. 4,965,188 (Mullis, et al.) beschrieben, obwohl es ein sich rasch vergrößernden Umfang an Literatur in diesem Bereich gibt.

[0004] Um eine Zielnukleinsäure effektiv zu vervielfältigen und nachzuweisen, ist es normalerweise notwendig die Nukleinsäure aus zellulären und anderen Trümmern der Probe zu isolieren. Verschiedene Lyseverfahren sind bekannt, die das Einfrieren, die Behandlung mit Verdauungsenzymen wie Proteasen (beispielsweise Proteinase K), das Kochen und die Verwendung verschiedener Detergenzien (siehe beispielsweise U.S. Ser. No. 178,202, die am 6. April 1998 durch Higuchi eingereicht wurde, und EP-1-0 428 197, die am 22. Mai 1991 publiziert wurde), Lösungsmittelpräzipitation und Erhitzungsprotokolle umfassen.

[0005] Zirkulierende DNA ist im Blutserum und im Plasma nachgewiesen wurden. Nanogrammmengen werden in normalen Personen nachgewiesen (Steinman, C. R., J. Clin. Invest. 56: 512,515, 1975 und Raptis, L., et al., J. Clin. Invest. 66: 1391-1399, 1980) und erhöhte Mengen werden in chronischen Autoimmunerkrankungen (Leon, S. A., et al., Cancer Res., 37: 646-650, 1977) und in Krebspatienten nachgewiesen (Stroun, M., et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 28: 707-712, 1987; Maebo, A., Jpn. J. Thorac. Dis 28:1085-1091, 1990; Fournie, G. J., et al., Cancer Lett., 91: 221-227, 1995; Lin, A., et al., Bio Techniques 24: (6) 937-940; 1998; und Sorenson, G. D., et al., Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 3: 67-71, 1994). Kürzlich ist es offensichtlich geworden, daß freie extrazelluläre DNA, die im Blutserum und im Plasma vorhanden ist, für die Genotypenanalyse (Lin, A., et al., Bio Techniques 24: (6) 937-940, 1998), für den Nachweis von Krebs (Mulcahy, H. E., et al., Clin. Cancer Res. 4: 271-275, 1998) verwendet werden kann und die DNA im mütterlichen Serum kann in der pränatalen Diagnostik verwendet werden (Lo Dennis, et al., Am. J. Human. Genet. 62: 768-775, 1998). Die in einem primären Tumor vorhandenen Mutationen können auch häufig unter Verwendung von DNA aus Blutplasma oder von Serum-DNA nachgewiesen werden (Sorenson, G. D., et al., Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 3: 67-71, 1994; Vasyukhin, V., et al., In Challenges of Modern Medicine, Vol. 5, Biotechnology Today, R. Verna, und A. Shamoo, Herausgeber, 141-150. Aera-Serono Symposia Publications, Rom; Mulcahy, H. E., et al., supra.; Kopeski, M. S., et al., Brit. J. Cancer 76: 1293-1299, 1997; Chen, X., et al. Nature Medicine 2: 1033-1035, 1996; Vasioukin, V., et al., Brit. J. Haematology 86: 774-779, 1994; und Tada, M., et al., Cancer Res. 53: 2472-2474, 1993). Somit stellt die im Serum und Plasma vorhandene DNA eine minimal invasive Quelle für Informationen, die mit der Krebsdiagnostik, -prognostik und -therapie in Verbindung stehen, zur Verfügung.

[0006] Um eine Zielnukleinsäure effektiv zu vervielfältigen und nachzuweisen, ist es üblicherweise notwendig, die Nukleinsäuren von störenden Substanzen, die in der interessierenden Probe vorhanden sind, abzutrennen. Mehrere verschiedene Ansätze sind verwendet worden, um DNA aus Blutserum oder Plasma zu konzentrieren und zu reinigen. Viele dieser Verfahren beinhalten mehrere Schritte, die eine Phenol-, Ether- und Chloroformbehandlung, Dialyse, die Hindurchführung durch Concanavalin-A-Sepharose, um Polysaccharide zu entfernen, und dann die Zentrifugation im Cesiumfluoridgradienten (Vasyukhin, V., et al., supra.) umfassen.

[0007] Kürzlich hat Quiagen ein System für die DNA-Konzentration und Reinigung, das auf einem Zentrifugensäulenprotokoll beruht, kommerzialisiert. Das Quiagen-Protokoll ist komplex und beinhaltet eine Gesamtzahl von acht Schritten, Behandlung mit Protease, Inkubation bei 70°C und erfordert die Verwendung von mindestens drei verschiedenen Puffern zusätzlich zu einem Kieselerdezentrifugationssäulenzentrifugationsschritt.

[0008] Kürzlich hat Goecke et al. (WO 97/34015) über den Nachweis extrazellulärer Tumorassoziierte Nukleinsäure im Blutplasma und Serum unter Verwendung von Nukleinsäurevervielfältigungstestverfahren berichtet. In ihren bevorzugten Verfahren wird die DNA aus Plasma und Serum unter Verwendung eines Mehrschrittprotokolls, das eine anfängliche Co-Präzipitation durch Gelatine gefolgt von einer Lösungsmittelbehandlung und Zentrifugation beinhaltet, co-präzipitiert. Andere zeitaufwendige und komplexe Protokolle, die die Verwendung von Glasperlen, Silicapartikeln oder Kieselgur für die Extraktion der DNA aus Serum oder Plasma beinhalten, werden auch beschrieben.

[0009] Die Verwendung von schwachbasischen Polymeren für das Fangen und die selektive Freisetzung von Nukleinsäuren ist in dem U.S. Patent Nr. 5,622,822 (Ekeze et al.), U.S. Patent Nr. 5,582,988 (Backus et al.) und U.S. Patent Nr. 5,434,270 (Ponticello, et al.) beschrieben. Die in den vorangehend erwähnten Patenten beschriebenen Protokolle beruhen auf der Verwendung eines Zellysierungsmittels oder eines Zellysierungsschritts. Oberflächen-aktive Substanzen werden häufig als Zellysierungsmittel verwendet. Die Verwendung von Oberflächenaktiven Substanzen und anderer Lysierungsmittel führen zu der Freisetzung von Nukleinsäuren aus Zellen und von zellulären Bestandteilen im Blut; was eine hohe Konzentration von Hintergrund-DNA auslöst.

[0010] Die WO 97/34015 beschreibt ein Verfahren für den Nachweis und die Isolierung extrazellulärer DNA aus Blutplasma. Die Plasmaprobe, die extrazelluläre DNA enthält, wird zuerst mit einem Phenol:Chloroform:Isoamyl-Extraktionsschritt gefolgt von einem Gelatinepräzipitationsschritt der DNA in Gegenwart von Ethanol behandelt. Nach der Zentrifugation wird die DNA gefriergetrocknet und in destilliertem Wasser für die Vervielfältigungsreaktion bereit resuspendiert.

[0011] Die WO 95/16792 beschreibt die Isolierung freizirkulierender DNA aus Plasma. Die DNA wird nach einem Phenol/Chloroform-Extraktionsschritt isoliert und eine ConA-Sepharoseaffinitätssäule wird verwendet.

[0012] Die EP 707 077 beschreibt die Verwendung eines schwachbasischen Polymers, das für das Fangen der DNA bei saurem pH verwendet wird, um ein Verfahren für die Isolierung von Nukleinsäuren für die weitere Behandlung zur Verfügung zu stellen.

[0013] Anker P. et al., Gastroenterology, 1997, 112 (4), S. 1114–1120 beschreiben ein Verfahren für den Nachweis von K-ras-Mutationen in freizirkulierender DNA aus dem Plasma von Krebspatienten.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0014] Die mit der Verwendung von Lysierungsmitteln im Verfahren des Stands der Technik verbundenen Probleme sind durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung ausgeräumt worden.

[0015] Das Verfahren dieser Erfindung beinhaltet die Verwendung eines schwachbasischen Polymers, wie in den oben angeführten U.S. Patenten beschrieben, für das Fangen und die selektive Freisetzung der gefangenen Nukleinsäuren von dem Polymer aber ohne die Verwendung eines Lysierungsschritts oder eines Lysierungsmittels, wie es unter Verwendung von Verfahren des Stands der Technik durchgeführt wird.

[0016] Gemäß eines Aspekts der Erfindung wird ein vereinfachtes, leicht zu verwendendes Verfahren für die Wiedergewinnung von DNA aus Blutserum oder Plasma zur Verfügung gestellt. Das Verfahren beinhaltet die Verwendung eines schwachbasischen Polymers für die Bindung von DNA aus einer Probe wie Blutserum oder Plasma. Nach dem Binden der DNA wird das Polymer unlöslich. Die Polymer-gebundene DNA wird dann von dem flüssigen Gemisch, das die nicht erwünschten löslichen Substanzen enthält, abgetrennt. Die DNA wird dann von dem Polymer mittels des Hinzufügens von Alkali freigesetzt. Somit erfordert das Verfahren der vorliegenden Erfindung nur drei Schritte: (a) das In-Kontakt-bringen einer Probe mit Puffer, (b) das In-Kontakt-bringen und die Inkubation des im Schritt (a) gebildeten Gemischs mit einem schwachbasischem Polymer und (c) die Freisetzung der im Schritt (b) an das Polymer gebundenen DNA durch Kontakt mit Alkali. Das Verfahren beseitigt die Notwendigkeit der Extraktion mit Alkohol oder anderem Lösungsmittel und toxischer Materialien wie Phenol oder Chloroform und Lysierungsmittel werden nicht verwendet. Das Verfahren vereinfacht nicht nur die DNA-Wiedergewinnung sondern führt auch zu einer verbesserten Ausbeute vervielfältigbarer Ziel-DNA.

Obwohl das Verfahren vorzugsweise im Zusammenhang mit Serum und Blut als Probe verwendet wird, ist es auf andere Körperflüssigkeiten, die Urin, Gallensäure, Rückenmarksflüssigkeit, bronchiale Lavage (BAL), Magenwaschungen und Stuhl umfassen, aber nicht darauf beschränkt sind, anwendbar. Zusätzlich können Proben jedes Typs verwendet werden, umfassend die, die aus tierischen, menschlichen Umgebungs- und mikrobiellen Proben gesammelt werden.

[0017] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Vervielfältigung und den Nachweis von Ziel-DNA unter Verwendung des DNA-Wiedergewinnungsverfahrens, das hierin oben beschrieben wurde.

[0018] Die erfinderischen Verfahren der Erfindung umfassen die Schritte:

- A) bei einem pH von weniger als 7 das In-Kontakt-bringen einer Probe, von der vermutet wird, das sie eine Nukleinsäure enthält, mit einem wasserlöslichen schwachbasischen Polymer in einer Menge, die ausreichend ist, um ein wasserunlösliches Präzipitat des schwachbasischen Polymers mit allen in der Probe vorhandenen Nukleinsäuren zu bilden,
- B) das Abtrennen des wasserunlöslichen Präzipitats aus der Probe und,
- C) das In-Kontakt-bringen des Präzipitats mit einer Base, um den pH der Lösung auf größer als 7 anzuheben und dadurch die Nukleinsäure aus dem schwachbasischen Polymer freizusetzen, wobei das schwachbasische Polymer wiederkehrende Einheiten umfaßt, die durch die Additionspolymerisation eines oder mehrerer ethylenisch ungesättigter, polymerisierbarer Monomere abgeleitet sind, die eine Amingruppe, die bei saurem pH protoniert werden kann, aufweisen.

[0019] Diese Erfindung stellt auch ein Verfahren für die Vervielfältigung und den Nachweis einer Zielnukleinsäure zur Verfügung, das:

I) Das zur Verfügung stellen einer Zielnukleinsäure unter Verwendung der Schritte von:

- A) bei einem pH von 7 oder weniger das In-Kontakt-bringen einer Probe, von der vermutet wird, daß sie eine Nukleinsäure enthält, mit einem wasserlöslichen, schwachbasischem Polymer in einer Menge, die ausreichend ist, um ein wasserunlösliches Präzipitat des schwachbasischen Polymers mit allen in der Probe vorhandenen Nukleinsäuren umfassend die Zielnukleinsäure zu bilden,
- B) das Abtrennen des wasserunlöslichen Präzipitats aus der Probe und
- C) das In-Kontakt-bringen des Präzipitats mit einer Base, um den pH der Lösung auf größer als 7 anzuheben und dadurch die Nukleinsäuren, die Zielnukleinsäure umfassen, aus dem schwachbasischen Polymer freizusetzen, wobei das basische Polymer, wiederkehrende Einheiten umfaßt, die durch Additionspolymerisation eines oder mehrerer ethylenisch ungesättigter, polymerisierbarer Monomere abgeleitet sind, die eine Amingruppe, die bei einem saurem pH protoniert werden kann, aufweisen,

II) das Vervielfältigen der Zielnukleinsäure, die zwischen den freigesetzten Nukleinsäuren vorhanden ist, und

III) das Nachweisen der vervielfältigten Zielnukleinsäure umfaßt.

[0020] Ein Testkit für die Vervielfältigung der Zielnukleinsäure umfaßt separat verpackt:

- a) ein Vervielfältigungsreaktionsgemisch, das ein oder mehrere Vervielfältigungsreagenzien umfaßt, und
- b) ein schwachbasisches Polymer, das wiederkehrende Einheiten umfaßt, die durch Additionspolymerisation eines oder mehrerer ethylenisch ungesättigter, polymerisierbarer Monomere abgeleitet sind, die eine Amingruppe, die bei saurem pH protoniert werden kann, aufweisen.

[0021] Die vorliegende Erfindung stellt ein schnelles, einfaches und wirksames Verfahren für die selektive Isolierung und das zur Verfügung stellen von Nukleinsäuren für die weitere Behandlung wie Hybridisierungstestverfahren oder Vervielfältigungsverfahren zur Verfügung. Diese Erfindung räumt die oben erwähnten Probleme, die mit üblichen Isolierungsmitteln in Verbindung stehen, die die Verwendung von Polyethylenimin umfassen, aus. Zusätzlich werden die Probleme, die durch die Verwendung von Polyethylenimin in Kombination mit einer fluorierten Oberflächen-aktiven Substanz des Phosphattyps hervorgerufen werden, auch vermieden, da die Oberflächen-aktive Substanz nicht erforderlich ist. Das Probenvorbereitungsverfahren dieser Erfindung ist nicht beschwerlich und erfordert nur minimale Schritte, wodurch es leichter automatisiert werden kann. Es kann üblicherweise innerhalb von 15 Minuten (vorzugsweise innerhalb von 10 Minuten) ausgeführt werden.

[0022] Diese Vorteile werden durch die Verwendung eines „schwachbasischen“ Polymers, das kationisch und bei saurem pH wasserlöslich ist, das aber bei einem basischem pH, der deutlich über dem pKa des Polymers liegt, deprotoniert wird, anstelle von Polyethylenimin zur Verfügung gestellt. Mit „schwachbasisch“ wird gemeint, daß der Polymer pKa weniger als 7 beträgt und wahrscheinlicher weniger als 6,5. Somit kann das Polymer bei niedrigem pH verwendet werden, um Nukleinsäuren auf Grund der ionischen Wechselwirkung des

kationischen Polymers und des anionischen Phosphatrückrats der Nukleinsäuren verwendet werden.

[0023] Nach dem Entfernen des nicht-komplexierten Materials und nach der pH-Anpassung auf basische Bedingungen, werden die Nukleinsäuren aus dem schwachbasischem Polymer des Präzipitats freigesetzt (oder dekomplexiert) und sind für weitere Behandlungen wie die Vervielfältigung erhältlich. Die Vervielfältigungsverfahren können unter basischen Bedingungen ausgeführt werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0024] [Fig. 1](#) stellt eine Standardkurve für DNA dar, wie sie durch TaqMan-Vervielfältigung mit dem β -Actin-Gen nach 40 PCR-Zyklen bewertet wurde.

[0025] [Fig. 2](#) stellt die Ergebnisse von Analysen für eine K-12-ras-Mutation dar, wie sie durch Gelelektrophorese nach REMS-PCR in Übereinstimmung mit Beispiel 7 bestimmt wurde.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0026] Die vorliegende Erfindung ist insbesondere für die Extraktion und den Nachweis von einem oder mehreren Zielnukleinsäuren, die in einer Probe einer beliebigen Sorte, die aus Tieren, Menschen, der Umgebung oder mikrobiellen Proben gesammelt wurden, geeignet. Die so erhaltenen Nukleinsäuren können durch das Aussetzen dieser gegenüber üblichen Hybridisierungstestverfahren, deren Verfahren im Stand der Technik gut bekannt sind (beispielsweise U.S. Patent Nr. 4,994,373), weiter behandelt werden.

[0027] Die verbleibende Diskussion wird jedoch auf die bevorzugten Ausführungsformen gerichtet sein, wobei die Nukleinsäuren Vervielfältigungsverfahren, insbesondere der PCR, unterzogen werden. Es ist jedoch nicht beabsichtigt, daß der Umfang dieser Erfindung, so eingeschränkt werden soll, da auch andere Vervielfältigungsverfahren (wie die LCR) verwendet werden können.

[0028] Die grundsätzlichen Prinzipien und Bedingungen für die Vervielfältigung und den Nachweis von Nukleinsäuren unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion sind gut bekannt und die Details davon werden in einer Vielzahl von Publikationen, die das U.S. Patent Nr. 4,683,195 (Mullis et al.), U.S. Patent Nr. 4,682,202 (Mullis), U.S. Patent Nr. 4,965,188 (Mullis et al.) und WO-A-91/12342 umfassen, zur Verfügung gestellt. Im Hinblick auf diese Lehre im Stand der Technik und die hierin zur Verfügung gestellte spezifische Lehre, sollte ein Fachmann keine Schwierigkeiten bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung durch die Kombination des Vorbereitungsverfahrens dieser Erfindung mit dem Polymerasekettenreaktionsverfahren oder mit einem beliebigen anderem im Stand der Technik bekannten Vervielfältigungsverfahren haben.

[0029] Andere Vervielfältigungsverfahren, die in der Ausführung dieser Erfindung verwendet werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, die Ligasekettenreaktion wie beispielsweise EP-A-0 320 308 (im Dezember 1987 publiziert) und EP-A-0 439 182 (im Januar 1990 publiziert) beschrieben.

[0030] Testproben („Proben“) können Körperflüssigkeiten oder andere Materialien, die genetische DNA oder RNA enthalten, umfassen. Die Zielnukleinsäure kann von jeder geeigneten menschlichen, tierischen, mikrobiellen, viralen oder Pflanzenquelle extrahiert werden.

[0031] Die hierin offenbarte Verbesserung erwägt, daß vor dem Kontakt mit dem hierin- definiertem schwach-basischen Polymer keine Extraktion der Nukleinsäuren aus der Probe erforderlich ist. Während der Stand der Technik verschiedene im Stand der Technik bekannte Lysierungsverfahren lehrt (umfassend die, die durch Laure et al. in The Lancet S. S38–S40 (3. Sep. 1988), Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, S. 280–281 (1982), Gross-Belland et al. in Eur. J. Biochem. 36, 32 (1973) und U.S. Patent Nr. 4,965,188 (oben erwähnt) beschrieben wurden). Die Extraktion von DNA aus Gesamtblut oder Bestandteilen davon wird beispielsweise in EP-A-0 393 744 (am 24. Oktober 1990 publiziert), dem U.S. Patent Nr. 5,231,015 (Cummins et al.) und dem U.S. Patent Nr. 5,334,499 (Burdick et al.) beschrieben; das Lysierungsverfahren hängt von der Sorte der Probe, die als Quelle für die Nukleinsäure verwendet wird ab; ein bevorzugtes Lysierungsverfahren beinhaltet die Erhitzung der Probe in der Gegenwart einer geeigneten nicht-ionischen Oberflächen-aktiven Substanz von der eine Vielzahl im Stand der Technik gut bekannt sind.

[0032] Die Probe, die zuerst verdünnt und mit einem Puffer unter einem pH von etwa 7,0 gemischt wird, wird mit einem schwachbasischem Polymer (hierin unten definiert) in einer Menge gemischt, die ausreichend ist, um alle in der Probe vorhandenen Nukleinsäuren zu komplexieren, wobei ein wasserunlösliches Präzipitat ge-

bildet wird. Dieses Polymer ist bei saurem pH wasserlöslich. Im allgemeinen beträgt die Menge des vorhandenen Polymers mindestens etwa 0,01 Gew.%, wobei von etwa 0,05 bis etwa 0,5 Gew.% bevorzugt ist. Natürlich würde der Fachmann wissen, wie er die Menge des Polymers anpassen müßte, um der Menge der Nukleinsäuren Rechnung zu tragen. Das Mischen kann in jeder geeigneten Weise für bis zu 30 Minuten (im allgemeinen weniger als 5 Minuten) und bei jeder geeigneten Temperatur (im allgemeinen von 15°C bis 35°C) ausgeführt werden.

[0033] Geeignete Puffer für das Mischen mit der Probe umfassen die Puffer, die einen pKa von weniger als 7, vorzugsweise von weniger als pKa 6,5 aufweisen, umfassend MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure) bei pK 6,1, BIS-TRIS (bis[2-Hydroxyethyl]iminotris-[hydroxymethyl]methan; 2-bis[2-Hydroxyethyl]amino-2-[hydroxymethyl]-1,3-propandiol) bei pK 6,5, ADA (N-[2-Acetamido]-2-iminodiessigsäure; N-[Carbamoylmethyl]iminodiessigsäure) bei pK 6,6, ACES (N-[Carbamoylmethyl]-2-aminoethansulfonsäure; N-[2-Acetamido]-2-aminoethansulfonsäure) bei pK 6,8, PIPES (Piperazin-N,n'-bis[2-ethansulfid]; 1,4-Piperazindiethansulfonsäure) bei pK 6,8, MOPSO (3-[N-Morpholino]-2-hydroxypropanesulfonsäure) bei pK 6,9, BIS-TRIS-Propan (1,3-bis[tris(Hydroxymethyl)methylamino]propan) bei pK 6,8, PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) und TRIS (tris(Hydroxymethyl)aminomethan), das schwachbasische Polymer kann in seiner wasserlöslichen freien Form oder an einem wasserunlöslichen Substrat, wie einer Affinitätssäule, befestigt oder an Polymeren, Glass oder anderen anorganischen Partikeln befestigt, verwendet werden. Somit kann das Polymer unter üblichen Mitteln (beispielsweise Absorption, kovalente Bindungen oder spezifische Bindungsreaktionen) an ein geeignetes Substrat, das Glass, Polymer oder magnetische Partikel, Filter oder Filme umfaßt, befestigt werden. Wenn das schwachbasische Polymer selbst bei basischem pH wasserunlöslich ist, kann es durch Filtration, Zentrifugation, oder andere übliche Mittel nach dem die Nukleinsäuren freigesetzt sind, entfernt werden.

[0034] Während sie an das schwachbasische Polymer gebunden sind, sind die Nukleinsäuren jedoch nicht nützlich. Es ist dann notwendig das wasserunlösliche Präzipitat aus dem Rest der Probe, die beachtenswerte zelluläre Bruchstücke und überschüssiges Polymer enthalten kann, abzutrennen. Diese Abtrennung kann unter Verwendung verschiedener üblicher Verfahren, die die Zentrifugation oder die Filtration umfassen, nach der die Flüssigkeit verworfen wird, erreicht werden. Die Zentrifugation ist in der Ausführung dieser Erfindung bevorzugt und kann bei mehr als etwa 1000 × g für 1 Minute bis 5 Minuten ausgeführt werden.

[0035] Nach dem Trennungsschritt kann die Nukleinsäure von dem schwachbasischen Polymer durch das In-Kontakt-bringen des Präzipitats mit einer Base mit oder ohne Erhitzung dekomplexiert oder freigesetzt werden. Starke Basen können ohne Erhitzung verwendet werden und sie umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniumhydroxid, Lithiumhydroxid, Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, ein tertiäres Amin, (wie Triethylamin, Diisopropylethylamin und Lutidin), Tricin, Bicin oder jede andere organische oder anorganische Base, die dem Fachmann ohne weiteres ersichtlich wäre. Nützliche schwächere Basen umfassen basische Puffer wie tris(Hydroxymethyl)aminomethan (oder Säureadditionssalze davon), N,N-bis(2-Hydroxyethyl)glycin, N-tris(Hydroxymethyl)methyl-glycin und andere im Stand der Technik gut bekannte. Die Erhitzung kann notwendig sein, wenn schwächere Basen verwendet werden.

[0036] Solches Erhitzen kann für bis zu 15 Minuten (im allgemeinen weniger als 5 Minuten) bei einer Temperatur, die mindestens etwa 50°C und vorzugsweise von etwa 95 bis etwa 125°C beträgt, unter geeignetem Druck ausgeführt werden. Wie in diesem Paragraph verwendet, bezeichnet „etwa“ +/- 0,5°C.

[0037] In bevorzugten Ausführungsformen können schwächere Basen mit Erhitzung verwendet werden, um die Nukleinsäuren aus dem Präzipitat freizusetzen. Dies stellt eine Lösung zur Verfügung, die Nukleinsäure enthalten, die ohne weitere Behandlung für die Vervielfältigung bereit sind. Solche schwächeren Basen können Puffer wie tris(Hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid sein.

[0038] In einigen Ausführungsformen sind die Polymere, die in solchen Ausführungsformen verwendet werden, die (unten definierten) die selbst bei basischem pH wasserunlöslich sind. Solche Polymere können wenn gewünscht aus dem System nach der Freisetzung der Nukleinsäuren und vor der Vervielfältigung entfernt werden.

[0039] Die sich ergebende Lösung, die die freigesetzten Nukleinsäuren enthält, hat einen basischen pH. In einigen Fällen können die Nukleinsäuren ohne weitere Behandlung des pHs behandelt werden. In anderen Ausführungsformen, bei denen eine starke Base verwendet wird, kann der pH der Lösung (im allgemeinen nach unten) auf etwa 6 bis etwa 9 (vorzugsweise von etwa 7,5 bis etwa 9) unter Verwendung jeder geeigneten Säure oder jedes Puffers wie tris(Hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid, N,N-bis(2-Hydroxyethyl)glycin, N-tris(Hydroxymethyl)methylglycin und andere, die dem Fachmann ohne weiteres erkennbar wären, angepaßt

werden. Die Mengen solcher Materialien, die erforderlich sind, um den gewünschten pH zu erreichen, würden dem Fachmann ohne weiteres erkennbar sein. Bei basischem pH kann das für das Fangen der Nukleinsäure verwendete Polymer entweder wasserlöslich oder wasserunlöslich sein und Monomere, die für die zur Verfügungstellung solcher Eigenschaften erforderlich sind, werden unten beschrieben.

[0040] Das beschriebene Verfahren des Fangens und des Freisetzen von Nukleinsäuren dieser Erfindung, wird typischerweise innerhalb von etwa 20 Minuten und vorzugsweise innerhalb von 10 Minuten ausgeführt.

[0041] Wie hierin verwendet, wenn nicht anders bemerkt, bezeichnet der Modifikator „etwa“ eine Varianz von 110% der erwähnten Werte. Wenn im Zusammenhang mit pH-Werten verwendet, bezeichnet „etwa“ +/- 0,5 pH-Einheiten.

[0042] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfaßt ein Verfahren für die Vervielfältigung den Nachweis einer Zielnukleinsäure:

I) das zur Verfügung stellen einer Probe, von der vermutet wird, daß sie eine Nukleinsäure enthält

II) das Unterziehen der Zielnukleinsäure unter die Schritte:

A) bei einem pH von weniger als 7 das In-Kontakt-bringen der Zielnukleinsäure mit einem wasserlöslichen, schwachbasischen Polymer in einer Menge, die ausreichend ist, um ein wasserunlösliches Präzipitat des schwachbasischen Polymers mit allen in der Probe vorhandenen Nukleinsäuren, die die Zielnukleinsäure umfassen, zu bilden,

B) das Abtrennen des wasserunlöslichen Präzipitats aus der Probe und

C) das In-Kontakt-bringen des Präzipitats mit einer Base, um den pH der Lösung auf größer als 7 anzuheben und dadurch die Nukleinsäuren, die die Zielnukleinsäure umfassen, aus dem schwachbasischen Polymer freizusetzen,

wobei das schwachbasische Polymer wiederkehrende Einheiten umfaßt, die durch Additionspolymerisation eines oder mehrerer ethylenisch ungesättigter, polymerisierbarer Monomere abgeleitet sind, eine Amingruppe, die bei saurem pH protoniert werden kann, aufweist,

III) ohne weitere Anpassung des pHs, das Vervielfältigen der freigesetzten Zielnukleinsäure und

IV) das Nachweisen der vervielfältigten Nukleinsäure.

[0043] In dem vorangehenden Verfahren ist es noch weiter bevorzugt, daß das schwachbasische Polymer bei einem basischen pH wasserunlöslich ist und daß das Verfahren des weiteren den Schritt der Entfernung des wasserunlöslichen Polymers nach der Freisetzung der Zielnukleinsäure aber vor deren Vervielfältigung umfaßt.

[0044] Das schwachbasische Polymer, daß in der Ausführung dieser Erfindung verwendet wird, wird aus einem oder mehreren ethylenisch ungesättigten, polymerisierbaren Monomeren zubereitet, wobei eines davon eine Amingruppe aufweist, die bei saurem pH protoniert werden kann. Somit ist das Polymer bei saurem pH protoniert, um das Säureadditionssalz desamins zu bilden. Bei basischem pH liegt das Polymer als freie Base vor.

[0045] Insbesondere können „schwachbasische Gruppen“, die einen Teil eines polymerisierbaren Monomers, das in dieser Erfindung nützlich ist, ausmachen können, zyklische Amingruppen oder primäre, sekundäre oder tertiäre Aminoalkylgruppen, die bei azidem pH protoniert werden können, umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt. Nützliche zyklische Amingruppen umfassen Imidazolyl-, Isooxazolyl-, Pyridyl-, Piperidyl-, Piperazinyl-, Pyrazolyl-, Triazolyl-, Tetrazolyl-, Oxadiazolyl-, Pyridazinyl-, Pyrimidyl-, Pyrazinyl-, Quinolinylnyl- und Quinazolinylnylgruppen, sind aber nicht darauf beschränkt. Die bevorzugten Gruppen sind zyklische Gruppen, die aromatisch sind und die Imidazolylgruppe ist die am meisten bevorzugte. Nützliche Aminoalkyle oder zyklische Amingruppen sind mit Vinylgruppen des Monomers unter Verwendung von zweckmäßigen Verknüpfungsgruppen, die Alkyl-, Amido- oder Estergruppen umfassen, verknüpft und mehrfach Alkylengruppen können mit Imino-, Oxy-, Amid-Carbonyl- oder Estergruppen verknüpft sein.

[0046] Im allgemeinen werden nützliche Polymere für das Fangen von Nukleinsäuren aus wiederkehrenden Einheiten, die durch Additionspolymerisation von:

a) von etwa 15–100 Gew.% eines wasserlöslichen, schwachbasischen, ethylenisch ungesättigten polymerisierbaren Monomers, das mindestens eine Gruppe aufweist, die bei saurem pH protoniert werden kann und das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminoalkyl, Imidazolyl, Isoxazolyl, Pyridyl, Piperidyl, Piperazinyl, Pyrazolyl, Triazolyl, Tetrazolyl, Oxadiazolyl, Pyridazinyl, Pyrimidyl, Pyrazinyl, Quinolinylnyl und Quinazolinylnyl,

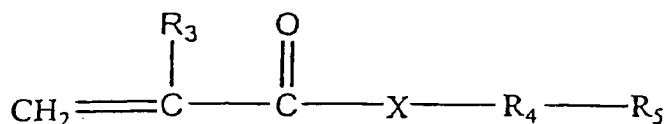
b) von 0 bis etwa 35 Gew.% eines nicht-ionischen, hydrophilen, ethylenisch ungesättigten polymerisierba-

ren Monomers und

c) von 0 bis etwa 85 Gew.% eines nicht-ionischen, hydrophilen, ethylenisch ungesättigten polymerisierbaren Monomers.

[0047] Vorzugsweise besteht das basische Polymer aus wiederkehrenden Einheiten von etwa 20 bis etwa 100 Gew.% von a), von 0 bis etwa 25 Gew.% von b), und von 0 bis etwa 80 Gew.% von c).

[0048] Eine spezifischere Klasse von Monomeren, die in a) oben nützlich sind, sind die, die durch die Struktur (I) wiedergegeben werden:

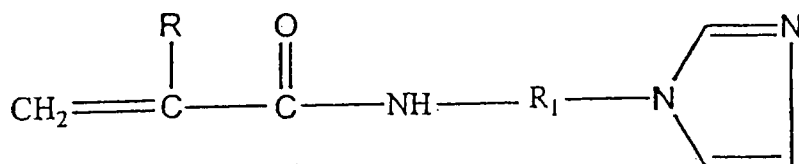


wobei R^3 Wasserstoff oder Methyl und X Oxy oder Imino ist. Zusätzlich ist R^4 eine divalente Kohlenwasserstoffverknüpfungsgruppe, die in der Kette von 1–8 Kohlenstoff- und Heteroatome aufweisen kann und ein oder mehrere Alkylgruppen (wie Methylen, Ethylen, n-Propylen, Isopropylen und n-Pentylen) umfaßt unter der Voraussetzung, daß wenn es mehr als eine Alkylgruppe gibt, sie in R^4 mit einer oder mehreren Carbonyl-, Oxy-, Imino-, Ester- oder Amidogruppen in einer funktionsfähigen Kombination verknüpft sind. Mit „funktionsfähigen Kombinationen“ ist gemeint, daß diese Gruppen mit den Alkylgruppen in jeder chemisch möglichen Konfiguration kombiniert werden können, und in Kombination (untereinander verbunden) in chemisch möglichen Wegen (wie Oxycarbonyl, Kohlenstoffamido und andere dem Fachmann ohne weiteres erkennbare) verwendet werden können. Es wird auch verstanden, daß R^4 mit einer Carbonyl-, Oxy-, Imino-, Ester- oder Amidogruppe abgeschlossen (oder mit R^5 verbunden) werden kann.

[0049] R^5 ist ein zyklisches Amin oder eine primäre, sekundäre oder tertiäre Aminoalkylgruppe, wie oben definiert, die bei saurem pH protoniert werden kann.

[0050] Beispiele nützlicher Monomere des Typs (a) umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, 1-Vinylimidazol, 2-Methyl-1-vinylimidazol, 2-Vinylpyridin, 1-Hydroxy-6-vinyl-1H-benzotriazol, 2-Aminoethylmethacrylathydrochlorid, 2-Aminoethylacrylatehydrochlorid, N-(3-Aminopropyl)methacrylamid, 2-Vinylquinolin, N-(3-Imidazolylpropyl)methacrylamid, N-(2-Imidazolethyl)methacrylamid, N-(3-Imidazolylpropyl)acrylamid, N-(1,1-Dimethyl-3-N-imidazolylpropyl)acrylamid, N-(Imidazolylmethyl)acrylamid, 1-Vinylpyrrolidon, 3-(N,N-Dimethylamino)propylmethacrylat und Säureadditionssalze, der erwähnten freien Basen.

[0051] Eine Klasse neue Monomere des Typs a) dieser Erfindung kann verwendet werden; um entweder Homopolymere oder Copolymere herzustellen. Diese Monomere werden durch die Struktur (II) definiert:



wobei R Wasserstoff oder Methyl bedeutet. Vorzugsweise ist R Methyl. Zusätzlich ist R^1 verzweigtes oder lineares Alkyl mit 1–3 Kohlenstoffatomen (wie Methylen, Ethylen, Trimethylen oder Propylen). Vorzugsweise ist R^1 Alkyl mit 2 oder 3 Kohlenstoffatomen. Noch bevorzugter ist R^1 Trimethylen.

[0052] Besonders nützliche Monomere, die die Struktur II aufweisen, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, N-(3-Imidazolylpropyl)methacrylamid, N-(2-Imidazolethyl)methacrylamid, N-(3-Imidazolylpropyl)acrylamid, N-(1,1-Dimethyl-3-N-imidazolylpropyl)acrylamid, N-(imidazolylmethyl)acrylamid und ihre Säureadditionssalze. Von den hierin beschriebenen neuen Monomeren ist die erste Verbindung die am meisten bevorzugte.

[0053] Bevorzugte Monomere des Typs a) umfassen 1-Vinylimidazol und N-2-Methyl-1-vinylimidazol.

[0054] Wenn die Monomere des Typs a) eine niedrige oder keine Wasserlöslichkeit aufweisen, können sie auch in der Form von Säureadditionssalzen (wie Hydrochloride oder Hydrobromide) polymerisiert werden.

[0055] Monomere, die als Monomere des Typs b) bezeichnet werden, sind die, die hierin als „hydrophil“ definiert sind, was bedeutet, daß sie, wenn sie homopolymerisiert sind, Homopolymere zur Verfügung stellen, die bei pH 7 oder darüber wasserlöslich sind. Im allgemeinen weisen solche Monomere hydrophile Gruppen, wie Hydroxy-, Amin- (primäre, sekundäre, tertiäre und zyklische), Amid-, Sulfonamid- und Polyethylenoxygruppen auf, aber es ist nicht notwendig, daß sie solche Gruppen umfassen, wenn der erwähnte Homopolymerwasserlöslichkeitsparameter erreicht wird.

[0056] Beispielhafte Monomere des Typs b) umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf, Acrylamid, 2-Hydroxyethylacrylat, 2,3-Dihydroxypropylacrylat, 2,3-Dihydroxypropylmethacrylat, Poly(ethylenoxy)ethylmethacrylat (das 2–10 Ethylenoxygruppen aufweist) und N,N-Dimethylacrylamid. Ein bevorzugtes Monomer ist Acrylamid.

[0057] Monomere, die als Monomere des Typs c) bezeichnet werden sind die, die hierin als „hydrophob“ definiert sind, was die bedeutet, die wenn sie homopolymerisiert sind, Homopolymere zur Verfügung, stellen, die bei pH 7 oder darüber wasserunlöslich sind unabhängig von der Sorte von Seitengruppen, die sie vielleicht aufweisen.

[0058] Beispielhafte Monomere des Typs c) umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Methacrylamid, 2-Hydroxymethacrylat, N-t-Butylmethacrylamid, Ethylacrylat, Methylacrylat, Butylacrylat, Methylmethacrylat, Styrol, Vinyltoluol und andere Vinylaromaten und andere, die für den Fachmann ohne weiteres ersichtlich wären. Ein bevorzugtes Monomer ist 2-Hydroxyethylmethacrylat.

[0059] Die Monomeren des Typs a), b) und c), die nicht neu sind, sind im allgemeinen ohne weiteres von kommerziellen Quellen erhältlich oder unter Verwendung üblicher Verfahren und Ausgangsmaterialien herstellbar.

[0060] Die neuen Monomere der Struktur (II) können allgemein durch Konzentration von 1-(Aminoalkyl)imidazol mit einem (Meth)acryloylchlorid unter Verwendung geeigneter Bedingungen, die dem Fachmann ohne weiteres offensichtlich wären, hergestellt werden. Eine beispielhafte Zubereitung eines bevorzugten Monomers wird hierin unten vor den Beispielen zur Verfügung gestellt. Weitere Details über solche Monomere können aus der gemeinsam besessenen U.S. Patent Nr. 5,434,270, Ponticello et al., das mit „Schwachbasische polymerisierbare Monomere und daraus hergestellte Polymere“ betitelt ist, erhalten werden.

[0061] Die hierin beschriebenen Homopolymere und Copolymere können unter Verwendung üblicher Lösungspolymerisationsverfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, hergestellt werden, obwohl es bestimmte bevorzugte Bedingungen gibt, die in den Herstellungsverfahren, wie sie unten vor den Beispielen zur Verfügung gestellt werden, beispielhaft dargestellt sind. Das Verhältnis der verschiedenen Monomere kann angepaßt werden, wie es ein Fachmann wissen würde, um Polymere zur Verfügung zu stellen, die bei einem basischen pH entweder wasserunlöslich oder wasserlöslich sind, solange solche Polymere bei saurem pH wasserlöslich bleiben.

[0062] Die Lösungspolymerisation beinhaltet im allgemeinen das Auflösen der Monomere in einem geeigneten Lösungsmittel (umfassend Wasser oder verschiedene Wasser-mischbare organische Lösungsmittel) und das Polymerisieren in der Gegenwart eines geeigneten freien Radikalinitiators. Das sich ergebende Polymer ist bei saurem pH wasserlöslich, so daß es bei der Verwendung eines Lösungsmittels wie Aceton präzipitiert, gereinigt und in Wasser für die weitere Verwendung wieder aufgelöst werden kann.

[0063] Hierin beschriebene besonders nützliche Polymere umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf Poly[N-(3-imidazolylpropyl)methacrylamidhydrochlorid-co-acrylamid], Poly[N-(3-imidazolylpropyl)methacrylamidhydrochlorid-co-2-hydroxyethylmethacrylat], Poly[1-vinylimidazol], Poly(2-aminoethylmethacrylathydrochlorid-co-2-hydroxyethylmethacrylat), Poly(1-vinylimidazolhydrochlorid-co-2-hydroxyethylmethacrylat), Poly[N-(1,1-dimethyl-3-imidazolylpropyl)acrylamid], Poly[N-2-methyl-1-vinylimidazol] und Säureadditionssalze der freien Basenpolymere.

[0064] In bevorzugten Ausführungsformen sind die verwendeten Polymere bei basischem pH wasserunlöslich. Solche Polymere werden unter Verwendung von Monomeren des Typs a) sowie von Monomeren des Typs c) aber mit beschränkten Mengen (weniger als 15 Gewicht von Monomeren des Typs b)) zubereitet, um die Lösung des Polymers bei basischen pH zu verhindern. Repräsentative Polymere dieses Typs umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf, Poly[N-(3-imidazolylpropyl)-methacrylamidhydrochlorid-co-2-hydroxyethylmethacrylat], Poly(1-vinylimidazol), Poly(2-aminoethylmethacrylathydrochlorid-co-2-hydroxyethylmethacrylat) und Poly(1-vinylimidazolhydrochlorid-co-2-hydroxyethylmethacrylat).

[0065] Die vorliegende Erfindung ist auch auf die Vervielfältigung oder den Nachweis von einer oder mehreren spezifischen Nukleinsäuresequenzen gerichtet, die in einer oder mehreren, wie oben erwähnt, freigesetzten Zielnukleinsäuren vorhanden sind. Darüber hinaus kann eine Vielzahl von Zielnukleinsäuren unter Verwendung korrespondierender Primergruppen und Nachweismittel jede spezifische Nukleinsäure gleichzeitig vervielfältigt nachgewiesen werden. Mehrere Sequenzen in derselben Nukleinsäure können auch vervielfältigend nachgewiesen werden.

[0066] Ein „PCR-Reagenz“ bezeichnet jedes Reagenz, das im allgemeinen für die PCR als nützlich erwo-gen wird, insbesondere eine Gruppe von Primern für jede Zielnukleinsäure, eine DNA-Polymerase, ein DNA-Polymerasekofaktor und zwei oder mehr Deoxyribonukleosid-5'-Trisphosphate (dNTP).

[0067] Wie hierin beim Hinweis auf Primer und Sonden verwendet, bezeichnet der Begriff „Oligonukleotid“ ein Molekül, daß aus vier oder mehr Deoxyribonukleotiden oder Ribonukleotiden und vorzugsweise mehr als 10 besteht. Seine genaue Größe ist nicht kritisch, hängt aber von vielen Faktoren, die die letztliche Verwendung oder Funktion des Oligonukleotids umfassen, ab. Das Oligonukleotid kann durch jedes im Stand der Technik bekannte Verfahren abgeleitet werden.

[0068] Der Begriff „Primer“ bezieht sich auf ein Oligonukleotid, ob natürlich vorkommend oder synthetisch produziert, das dazu in der Lage ist als Initiationspunkt der Synthese zu wirken, wenn es unter Bedingungen gebracht wird, in denen die Synthese eines Primerverlängerungsprodukts das zu einem Nukleinsäurestrang komplementär ist (das ein Template ist) induziert wird. Solche Bedingungen umfassen die Gegenwart von Nukleotiden (wie die vier Standard Deoxyribonukleosid-5'-triphosphate), eine DNA-Polymerase und einen DNA-Polymerasekofaktor und eine geeignete Temperatur und pH. Üblicherweise sind dies die Bedingungen, die im Stand der Technik als „hoch stringente“ Bedingungen bekannt sind, so daß eine nicht-spezifische Vervielfältigung minimiert wird. Die Primer müssen lang genug sein, um die Synthese von Verlängerungsprodukten in Gegenwart der DNA-Polymerase zu initiieren. Die exakte Größe des Primers wird von der erwo-genen Verwendung, der Komplexität der Zielsequenz, der Reaktionstemperatur und der Quelle des Primers abhängen. Im allgemeinen werden die Primer, die in dieser Erfindung verwendet werden, von 10 bis 60 Nukleotiden aufweisen.

[0069] Primer, die hierin nützlich sind, können von einer Anzahl von Quellen erhalten werden oder unter Verwendung bekannter Verfahren und einer Vorrichtung, die beispielsweise den ABI-DNA-Synthesizer (erhältlich von Applied Biosystems) oder einem Biosearch 8600 Serie oder 8800 Serie-Synthesizer (erhältlich von Milligen-Biosearch, Inc.) umfaßt, und bekannte Verfahren für deren Verwendung (beispielsweise in U.S. Patent Nr. 4,965,188 beschrieben) hergestellt werden. Natürlich vorkommende Primer, die aus biologischen Quellen isoliert werden, sind auch nützlich (wie Restriktionsendonukleaseverdaue). Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „Primer“ ein Gemisch aus Primern. Somit kann jede Gruppe von Primern für eine gegebene Zielnukleinsäure zwei oder mehr Primer für jeden gegenüberliegenden Zielstrang umfassen.

[0070] Einer oder beide Primer kann (können) mit derselben oder einen verschiedenen Markierung für den Nachweis oder das Fangen des vervielfältigten Produkts markiert werden. Verfahren für die Befestigung von Markierungen und die Herstellung von Primern sind im Stand der Technik gut bekannt, beispielsweise wie durch Agrawal et al., Nucleic Acid Res., 14, S. 6227–45 (1986), U.S. Patent Nr. 4,924,210 (Levenson et al.), das sich auf Biotinmarkierungen bezieht, U.S. Patent Nr. 4,962,029 (Levenson et al.), das sich auf Enzymmarkierungen bezieht und den darin erwähnten Verweisen beschrieben. Nützliche Markierungen umfassen auch Radioisotope, Elektronen-dichte Reagenzien, Chromogene, Fluorogene, phosphoreszente Gruppen, Feritin und andere magnetische Teilchen (siehe U.S. Patent Nr. 4,795,698 von Owen et al. und U.S. Patent Nr. 4,920,061 von Poynton et al.), chemilumineszente Gruppen (wie Luminol) und andere spezifisch bindende Spezies (Avidin, Streptavidin, Biotin, Zucker oder Lectine). Bevorzugte Markierungen sind Enzyme, Radioisotope und spezifisch bindende Spezies (wie Biotin). Nützliche Enzyme umfassen Glukoseoxidase, Peroxidasen, Urikasen, alkalische Phosphatasen und andere im Stand der Technik bekannte und können an Oligonukleotiden unter Verwendung bekannter Verfahren befestigt werden. Die Reagenzien, um ein kolorimetrisches oder chemilumineszentes Signal solchen Enzymen zur Verfügung zu stellen, sind wohl bekannt.

[0071] Wenn die Markierung ein Enzym wie eine Peroxidase ist, werden an einem Punkt in dem Testverfahren Wasserstoffperoxid und geeignete Farbstoff-bildende Zusammensetzungen hinzugefügt, um einen nachweisbaren Farbstoff zur Verfügung zu stellen. Beispielsweise umfassen nützliche Farbstoff zur Verfügung stellende Reagenzien Tetramethylbenzidin und Derivate davon und Leukofarbstoffe, wie die wasserunlöslichen Triarylimidazoleleukofarbstoffe (wie in U.S. Patent Nr. 4,089,747 von Bruschi beschrieben) oder andere Verbindungen, die reagieren, um einen Farbstoff in der Gegenwart von Peroxidase und Wasserstoffperoxid zur Verfügung zu

stellen. Besonders nützliche Farbstoff zur Verfügung stellende Zusammensetzungen werden in EP-A-0 308 236 (am 22. März 1989 publiziert) beschrieben. Chemilumineszente Signale in Antwort auf eine Peroxidase-markierung können auch unter Verwendung geeigneter Reagenzien erzeugt werden.

[0072] Wenn einer oder beide Primer biotinyliert ist (sind), kann die vervielfältigte Nukleinsäure unter Verwendung nachweisbar markierten Avidins oder einem Äquivalent davon (wie Streptavidin) nachgewiesen werden. Beispielsweise kann Avidin mit einem Enzym konjugiert werden oder ein Radioisotop unter Verwendung bekannter Technologie aufweisen. Biotin an dem vervielfältigten Produktkomplexen wird mit de Avidin und einem geeigneten Detektionsverfahren, um ein radioaktives, kolorimetrisches oder chemilumineszentes Signal nachzuweisen, verwendet.

[0073] Wie hierin verwendet ist eine Fänger-„Sonde“ ein Oligonukleotid, das im wesentlichen zu einer Nukleinsäuresequenz von einem oder mehreren Strängen der Zielnukleinsäure komplementär ist, und das dabei verwendet wird, die vervielfältigte Nukleinsäure unlöslich zu machen. Das Sondenoligonukleotid wird im allgemeinen an einem geeigneten wasserunlöslichen Substrat wie Polymeren oder Glasperlen einer Mikrotiterplattenvertiefung, einem dünnen Polymere- oder Zellulosefilm oder anderen Materialien, die dem Fachmann ohne weiteres offensichtlich sind, befestigt. Das Oligonukleotid weist im allgemeinen eine Länge von etwa 12 bis etwa 40 Nukleotide auf, obwohl die Länge nicht kritisch ist.

[0074] Ein DNA-Polymeraseenzym ist ein Enzym, das Deoxynukleosidmonophosphatmoleküle an das 3'-Hydroxyende des Primers und der Vorlage anfügt, aber dieses Anfügen findet in einer Vorlagen abhängigen Weise statt (das bedeutet abhängig von den spezifischen Nukleotiden in der Vorlage). Viele nützliche DNA-Polymerasen sind im Stand der Technik bekannt. Vorzugsweise ist die Polymerase „hitzestabil“ was bedeutet, daß sie gegenüber Hitze insbesondere den hohen Temperaturen, die für die Denaturierung von DNA-Strängen verwendet werden, stabil ist. Insbesondere werden die thermostabilen DNA-Polymerasen bei den hohen Temperaturen, die in der hierin beschriebenen PCR verwendet werden, nicht wesentlich inaktiviert. Über eine Anzahl thermostabiler DNA-Polymerasen ist im Stand der Technik berichtet worden, umfassend die, die im Detail in dem U.S. Patent Nr. 4,965,188 (oben erwähnt) und in dem U.S. Patent Nr. 4,889,818 (Gelfand et al.) erwähnt werden. Besonders nützliche Polymerasen sind die, aus verschiedenen bakteriellen Thermospezies wie *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus filiformis* oder *Thermus flavus* erhalten werden. Andere nützliche, thermostabile Polymerasen werden aus einer Vielzahl anderer mikrobieller Quellen, die *Thermococcus litoralis*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermotoga* sp. und die in WO-A-89/06691 (am 27. Juli 1989 publiziert) beschriebenen umfassen, erhalten. Einige nützliche Polymerasen sind kommerziell erhältlich. Eine Anzahl von Verfahren für die Isolierung natürlich, auftretender Polymerasen aus Organismen und für die Erzeugung genetisch veränderter Enzyme unter Verwendung rekombinanter Verfahren, wie in dem in diesem Paragraph zitiertem Stand der Technik, sind bekannt.

[0075] Ein DNA-Polymerasekofaktor bezeichnet eine nicht-Proteinverbindung von dem das Enzym für seine Aktivität abhängig ist. Eine Anzahl solcher Materialien sind bekannte Kofaktoren, die Mangan- und Magnesiumsalze umfassen. Nützliche Kofaktoren umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Mangan- und Magnesiumchloride, Sulfate, Acetate und Fettsäuresalze (beispielsweise Butter-, Capron-, Capryl-, Caprin- und Laurinsäuresalze). Die kleineren Salze, das bedeutet Chloride, Sulfate und Acetate, sind bevorzugt.

[0076] Für die PCR werden auch zwei oder mehr Deoxyribonukleotide-5'-Trisphosphate, wie dATP, dCTP, dGTP, dUTP oder dTTP benötigt. Üblicherweise werden dATP, dCTP, dGTP und dTTP alle in der PCR verwendet. Analoge wie dITP und 7-deaza-dGTP sind auch nützlich.

[0077] Bei der Ausführung der Erfindung ist auch ein Antikörper, der für die DNA-Polymerase spezifisch ist, wobei der Antikörper die Enzymaktivität bei Temperaturen unter 50°C verhindert, aber wobei der Antikörper bei höheren Temperaturen inaktiviert wird, nützlich. Beispielhafte monoklonale Antikörper, die diese Eigenschaften haben sind in der U.S. Patent Nr. 5,338,671 (Sclaice et al.) beschrieben. Anstelle von Gesamtmolekülen können Antikörperfragmente verwendet werden, wenn sie vergleichbare Eigenschaften aufweisen.

[0078] Die hierin beschriebenen PCR-Reagenzien werden in der PCR in geeigneten Konzentrationen zur Verfügung gestellt und verwendet, um eine Vervielfältigung der Zielnukleinsäure zur Verfügung zu stellen. Die minimalen Mengen der DNA-Polymerase betragen im allgemeinen wenigstens etwa 1 Einheit/100 µl Lösung, wobei von etwa 4 bis etwa 25 Einheiten/100 µl bevorzugt ist. Eine „Einheit“ wird hierin als die Menge der Enzymaktivität definiert, die erforderlich ist, um 10 mmol Gesamtnukleotide (dNTP) in eine sich verlängernde Nukleinsäurekette in 30 Minuten bei 74°C aufzunehmen. Die Konzentration jedes Primers beträgt mindestens etwa 0,075 µmol/l wobei von etwa 0,2 bis etwa 1 µmol/l bevorzugt ist. Alle Primer sind in etwa derselben Menge

(mit Variationen von 10% für jeden) vorhanden. Der Kofaktor ist im Allgemeinen in einer Menge von etwa 1 bis etwa 15 mmol/l vorhanden und jedes dNTP ist im allgemeinen in einer Menge von etwa 0,1 bis etwa 3,5 mmol/l in dem Reaktionsgemisch vorhanden. Wie in diesem Paragraph verwendet, bezeichnet der Modifikator „ungefähr“ eine Varianz von +/- 10% des erwähnten Wertes.

[0079] Die PCR-Reagenzien können einzeln oder in gepufferten Lösungen, die einen pH im Bereich von etwa 7 bis etwa 9 aufweisen, unter Verwendung jedes geeigneten Puffers zur Verfügung gestellt werden.

[0080] Da die Zielnukleinsäure, die vervielfältigt und nachgewiesen werden soll, üblicherweise in ihrer doppelsträngigen Form vorliegt, müssen die zwei Stränge bevor das Primen stattfinden kann, getrennt werden (das bedeutet denaturiert). Dies kann während des Extraktionsprozess stattfinden, findet aber bevorzugt in einem getrennten Schritt danach statt. Das Erhitzen auf eine geeignete Temperatur (als „erste Temperatur“ oder hierin als T_1 bezeichnet) ist ein bevorzugtes Mittel für die Denaturierung. Im allgemeinen liegt diese erste Temperatur im Bereich von etwa 85°C bis etwa 100°C für eine geeignete Zeit beispielsweise für 1 bis etwa 240 Sekunden (vorzugsweise 1 bis etwa 40 Sekunden). Dieser erste Denaturierungsschritt kann auch in dem ersten Vervielfältigungszyklus beinhaltet sein. In solchen Fällen kann die Denaturierung im ersten Zyklus länger sein (beispielsweise bis zu 240 Sekunden) wobei spätere Zyklen viel kürzere Denaturierungsschritte aufweisen können (beispielsweise bis zu 30 Sekunden).

[0081] Die denaturierten Stränge werden dann mit einer geeigneten Primergruppe durch das Abkühlen des Reaktionsgemischs auf eine zweite Temperatur T_2 , die im allgemeinen innerhalb des Bereiches von etwa 55°C bis etwa 70°C liegt, angelagert. Es ist gewünscht, daß das Kühlen so schnell wie möglich durchgeführt wird, aber mit gegenwärtig bekanntem Gerät findet es im allgemeinen über einen Zeitraum von etwa 5 bis etwa 14 Sekunden und bevorzugter von etwa 5 bis etwa 20 Sekunden statt.

[0082] Sobald die denaturierten Stränge abgekühlt werden, wird das Reaktionsgemisch, das die PCR-Reagenzien enthält, bei einer dritten Temperatur T_3 , im allgemeinen für von 1 bis etwa 120 Sekunden und vorzugsweise für von 1 bis etwa 80 Sekunden inkubiert, um die Bildung von Primerverlängerungsprodukten zu bewirken. Im allgemeinen liegt die dritte Temperatur innerhalb des Bereiches von etwa 55°C bis etwa 74°C. Vorzugsweise liegt sie im Bereich von etwa 62° bis etwa 70°C.

[0083] In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform sind die zweiten und dritten Temperaturen dieselben und liegen innerhalb eines Bereiches von etwa 62° bis etwa 70°C, Somit werden das Primen und die Primerverlängerung vorzugsweise im selbem Schritt ausgeführt.

[0084] Somit umfaßt ein Vervielfältigungszyklus die oben beschriebenen Denaturierungs-, Priming-(oder Anlagerungs-) und Primerverlängerungsschritte. Im allgemeinen werden mindestens 15 solcher Vervielfältigungszyklen bei der Ausführung dieser Erfindung ausgeführt, wobei die maximale Anzahl der Zyklen im Ermessen des jeweiligen Benutzers liegt. In den meisten Fällen werden 15 bis 50 Vervielfältigungszyklen in dem Verfahren verwendet, wobei 15 bis 40 Zyklen bevorzugt sind. Jeder Vervielfältigungszyklus dauert im allgemeinen von etwa 20 bis etwa 360 Sekunden, wobei eine Zykluszeit von etwa 30 bis etwa 120 Sekunden bevorzugt ist und von etwa 30 bis etwa 90 Sekunden noch bevorzugter ist. Längere oder kürzere Zykluszeiten können jedoch, wenn gewünscht, verwendet werden.

[0085] Wenn im Zusammenhang mit der Zeit für einen gegebenen Schritt in dem Vervielfältigungsverfahren verwendet, bezeichnet der Begriff „etwa“ +/- 10% der Zeitgrenze. Darüber hinaus bezeichnet der Begriff „etwa“, wenn unter Verweis auf Temperaturen verwendet +/- 0,5°C.

[0086] Der Nachweis von Vervielfältigungsprodukten kann unter Verwendung jedes bekannten Verfahrens umfassend Southern-Blottingverfahren, wie in dem U.S. Patent Nr. 4,965,188 (oben erwähnt) oder durch die Verwendung von markierten Sonden oder Primern, wie im Stand der Technik bekannt ist, erreicht werden.

[0087] Alternativ zu den oben beschriebenen Ausführungsformen können die Vervielfältigungsprodukte unter Verwendung eines markierten Oligonukleotids, das zu einem der Primerverlängerungsprodukte komplementär ist, nachgewiesen werden.

[0088] Alle Reagenzien für die Durchführung des TaqMan-Testverfahrens wurden von Applied Biosystems, einer Abteilung der Perkin-Elmer Co., Foster City, CA, umfassend β -Actin-Nachweisreagenzien (Kat. Nr. 401846), der DNA-Vorlagenreagenzien (Kat. Nr. 401970) und des TaqMan-PCR-Core-Reagenzkits (Kat. Nr. N808-0228) gekauft. Die Testverfahren wurden unter Verwendung des PCR-Mastermix und der Temperatur-

zyklusprofile für das β -Actin-TaqMan-Testverfahren, die vom Hersteller zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt. Ein Mikroliter des DNA-Vorlagenreagenzes wurde zu 49 μ l PCR- β -Actin-Mastermix in einem ABI-Prism-7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) hinzugefügt und die Fluoreszenz wurde während der 40 PCR-Zyklen gemessen.

[0089] Die [Fig. 1](#) zeigt eine Kalibrierungskurve für verschiedene DNA-Anfangsmengen im Vergleich zu Grenzwertzykluszahl, welches der Wert ist, der durch das Instrument bestimmt wurde und die geschätzte Anzahl der PCR-Zyklen wiedergibt, bei der ein vorgewähltes Fluoreszenzsignal erhalten werden wird. Somit stellt das TaqMan-Testverfahren für ein β -Actin-Genfragment ein gutes analytisches Werkzeug für das Messen der DNA-Konzentration, die in der Probe vorhanden ist, zur Verfügung.

[0090] In den folgenden Beispielen wurde DNA von dem β -Actingen, das in einer einzelnen Kopie vorhanden ist (pro Zelle), für die angegebenen Proben gemäß dem Verfahren der Erfindung oder unter Verwendung des angegebenen Verfahrens des Stands der Technik, das ein Zellysierungsreagenz verwendet, extrahiert. Die dadurch extrahierte β -Aktin-DNA wurde unter Verwendung des PCR-Mastermix und thermischer Zyklierungsprofile und des TaqMan-Nachweises, nach dem vom Hersteller empfohlenen Verfahren, vervielfältigt.

[0091] In den heterogenen Nachweissystemen dieser Erfindung werden die vervielfältigten Produkte auf einem wasserunlöslichen Substrat einer bestimmten Art gefangen und andere Materialien in dem Reaktionsgemisch werden in geeigneter Weise, wie durch Filtration, Zentrifugation, Waschen oder andere Separationsverfahren entfernt.

[0092] Die Fängersonden können an wasserunlöslichen Trägern unter Verwendung bekannter Befestigungsverfahren (umfassend Absorption und kovalente Reaktion) befestigt werden. Eine solche Technik wird in der EP-A-0 439 222 (am 18. September 1992 veröffentlicht) beschrieben. Andere Verfahren werden beispielsweise in U.S. Patent Nr. 4,713,326 (Dattagupta et al.), U.S. Patent Nr. 4,914,210 (Levenson et al.) und EP-B-0 070 687 (am 26. Januar 1983 publiziert) beschrieben. Nützliche Separationsmittel umfassen die Filtration durch mikroporöse Polyamidmembranen, die kommerziell von der Pall Corporation erhältlich sind.

[0093] Es kann jedoch jeder nützliche feste Träger verwendet werden, um die Fängersonde und das mögliche Hybridisierungsprodukt, umfassend Mikrotiterplatten, Teströhrchen, Bechergläser, magnetische oder polymere Teilchen, Metalle, Keramiken und Glaswolle, um nur einige zu nennen, verwendet werden. Besonders nützliche Materialien sind magnetische oder polymere Teilchen, die reaktive Gruppen aufweisen, die für die kovalente Befestigung der Fängersonde nützlich sind. Solche Artikel weisen im allgemeinen von etwa 0,001 bis etwa 10 μ m auf. Weitere Details über Beispiele solcher Materialien sind in der U.S. Patent Nr. 4,997,772 (Sutton et al.), U.S. Patent Nr. 5,147,777 (Sutton et al.), U.S. Patent Nr. 5,155,166 (Danielson et al.) und U.S. Patent Nr. 4,795,698 (Owen et al.) zur Verfügung gestellt.

[0094] Die Fängerprobe kann an einem flachen Träger, wie einem polymeren Film, Membranen, Filterpapieren oder Harz-beschichtetem oder -unbeschichtetem Papier befestigt werden. Die Fängersonde; die an polymeren Teilchen befestigt ist, kann auch auf solchen flachen Trägern in einer geeigneten Weise beispielsweise als getrocknete Ablagerung oder durch Hitzefusion oder mit Klebstoffen befestigt werden. Die Fängersonde kann beispielsweise an einem flachen Träger in der abgeschlossenen Testvorrichtung dieser Erfindung befestigt werden. Andere Details solcher Materialien werden in der EP-A-0 408 738 (die am 23. Januar 1991 publiziert wurde), der WO 92/16659 (die am 1. Oktober 1992 publiziert wurde) und dem U.S. Patent Nr. 5,173,260 (Sutton et al.) zur Verfügung gestellt.

[0095] Die Fängersonden können auf einem geeigneten Träger in jeder beliebigen Konfiguration beispielsweise in Reihen oder runden Ablagerungen oder Streifen angeordnet sein.

[0096] Die vorliegende Erfindung kann auch in dem, das als „homogene“ Vervielfältigungsverfahren bekannt ist, verwendet werden, wobei die Zielnukleinsäuren ohne die Notwendigkeit für Fängerreagenzien nachgewiesen werden. Die Details solcher Testverfahren sind im Stand der Technik wie in der EP-A-0 487 218 (die am 27. Mai 1992 publiziert wurde) und der EP-A-0 512 334 (die am 11. November 1992 publiziert wurde) bekannt.

[0097] Die Vervielfältigungsreaktionszusammensetzung kann als eine individuell verpackte Komponente des Testkits, das für verschiedene Vervielfältigungstestverfahren nützlich ist, enthalten sein. Das Kit kann weitere Reagenzien, Lösungen, Vorrichtungen und Instruktionen, die in dem Verfahren dieser Erfindung nützlich sind, umfassend Fängerreagenzien, die auf einem wasserunlöslichen Substrat immobilisiert sind, Waschlösungen, Nachweisreagenzien und andere Materialien, die dem Fachmann ohne weiteres ersichtlich sind, umfassen.

Zusätzlich kann das Testkit ein separat verpacktes schwachbasisches Polymer, wie hierin oben beschrieben, Puffer, schwache oder starke Basen, andere Reagenzien, die entweder für die Vervielfältigung oder die Probenzubereitung oder für beides verwendet werden, umfassen. Das Testkit kann auch eine Testvorrichtung umfassen, die ein oder mehrere andere Kitbestandteile enthält. Diese Testvorrichtung ist vorzugsweise „abgeschlossen“ wie dieser Begriff im Stand der Technik verstanden wird. Andere Kits können das hierin beschriebene schwachbasische Polymer und ein oder mehrere Reagenzien (wie Nachweis- oder Fängersonden), die in Hybridisierungstestverfahren verwendet wurden, umfassen.

[0098] Die folgenden Beispiele sind umfaßt, um die Ausführung dieser Erfindung zu verdeutlichen und sind in keiner Weise beschränkend gemeint. Alle Prozentzahlen sind, wenn nicht anders erwähnt, nach Gewicht.

MATERIALIEN UND VERFAHREN FÜR DIE BEISPIELE

[0099] Herstellung von N-(3-Imidazolylpropyl)-methacrylamid Dieses Verfahren zeigt die Zubereitung eines neuen Monomers der Struktur (I), oben wiedergeben, aber die Zubereitung ist beispielhaft dafür, wie andere Monomere, die im Umfang dieser Erfindung liegen ohne weiteres zubereitet werden könnten.

[0100] Ein Lösungsgemisch wurde durch das Mischen von Wasser (100 ml), das Natriumhydroxid (12,8 g, 0,32 mol) enthielt, und Dichlormethan (200 ml), das 1-(3-Aminopropyl)imidazol (37,5 g, 0,3 mol) enthielt, hergestellt und in einem Eisbad gekühlt. Zu diesem Gemisch wurde Methacryloylchlorid (34,8 g, 0,3 mol) in Dichlormethan (100 ml) unter kräftigem Rühren unter einer Stickstoffatmosphäre alles auf einmal hinzugefügt. Hitze wurde gebildet, wobei sich die Temperatur des Gemisches auf etwa 60°C erhöhte und das Gemisch wurde für weitere 10 Minuten heftig gemischt und dann wurde es der organischen Phase erlaubt, sich abzutrennen. Die Wasserschicht wurde zweimal mit Dichlormethan (100 ml jedes Mal) extrahiert. Die verbundene organische Lösung (die organische Lösungsschicht und die Extrakte) wurden mit gesättigtem Natriumchlorid (100 ml) gewaschen über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde entfernt. Der Rückstand wurde in Chloroform (50 ml) aufgelöst, gefolgt von dem Hinzufügen von Ethylether (50 ml) bis zum Trübungspunkt.

[0101] Das sich ergebende Reaktionsprodukt kristallisierte bei etwa 0°C und wurde abfiltriert, um einen weißen Feststoff zu ergeben, der einen Schmelzpunkt von 45° bis 46°C aufwies. Die Ausbeute betrug 70%.

[0102] Die analytischen Daten umfaßten: m/e (M-193), ¹H NMR (DMSO d₆) 1,8 (m, 2H, C-CH₂-, CH₃), 3,02 (m, 2H, N-H₂), 3,95 (t, 2H, im-CH₂), 5,25 und 5,6 (AB, 2H; Vinyl-CH₂), 6,82 und 7,15 (AB, 2H, 4,5-H von im), 7,6 (s, 1H, 2-H von im), 7,95 (m, 1H, NH).

Herstellung des Homopolymers

[0103] Ein bevorzugtes Homopolymer, das aus einem hierin beschriebenen neuen Monomer hergestellt wurde, wurde durch das Hinzufügen von 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) (300 mg) zu einer Lösung aus n-(3-Imidazolylpropyl)methacrylamid (12,5 g, 0,065 mol) in Wasser (90 ml) und Isopropanol (10 ml), das unter einer Stickstoffatmosphäre gehalten wurde, zubereitet. Die sich ergebende Lösung wurde, während sie gerührt wurde, auf 65° bis 70°C in einem Wasserbad für 3 Stunden erhitzt. Nach etwa 1,5 Stunden dieser Zeit wurde konzentrierte HCl (3 ml) hinzugefügt und das Rühren wurde unter Stickstoff für die verbleibende Zeit fortgesetzt. Die Lösung wurde dann in einem Rotationsverdampfer auf etwa 25 ml konzentriert und das sich ergebende Polymerprodukt wurde in Aceton (über 4 Liter) präzipitiert, filtriert und in deionisiertem Wasser (80 ml) aufgelöst. Die Lösung enthielt 12% Feststoffe.

Zubereitung des ersten Copolymers

[0104] Poly[N(3-imidazolylpropyl)methacrylamidhydrochlorid-co-acrylamid] (90:10 Gewichtsverhältnis) wurde durch das Hinzufügen von 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) (400 mg) zu einer Lösung aus N-(3-Imidazolylpropyl)methacrylamid (18 g, 0,09 mol) und Acrylamid (2 g, 0,028 mol) in deionisiertem Wasser (120 ml) und Isopropanol (15 ml), das unter Stickstoffatmosphäre gehalten wurde, zubereitet. Die Lösung wurde dann unter Rühren für 4 Stunden auf 65–70°C erhitzt, gefolgt von dem Hinzufügen von verdünnter HCl, um den pH auf etwa 2 zu verringern. Das Rühren und das Erhitzen wurden für eine weitere Stunde fortgesetzt und der Lösung wurde es dann erlaubt, über Nacht Raumtemperatur zu erreichen.

[0105] Die Lösung wurde unter Verwendung eines Rotationsverdampfers auf etwa 75 ml konzentriert und das sich ergebende Dimer wurde in Aceton (etwa 4 Liter) präzipitiert, filtriert und in deionisiertem Wasser (50 ml)

aufgelöst. Eine weitere Konzentration auf etwa 125 ml wurde ausgeführt, um Acetonrückstände zu entfernen und das Polymer war mit 15,5% Feststoffen vorhanden.

Zubereitung des zweiten Copolymers

[0106] Poly[2-aminoethylmethacrylathydrochlorid-co-2-hydroxyethylmethacrylat] (20:80 Gewichtsverhältnis) wurde durch das Hinzufügen von 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) (400 mg) zu einer Lösung aus 2-Aminoethylmethacrylathydrochlorid (4 g, 0,02 mol) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (16 g, 0,12 mol) in deionisiertem Wasser (180 ml) und Ethanol (20 ml), das unter einer Stickstoffatmosphäre gehalten wurde, zubereitet. Die Lösung wurde unter Rühren für 4 Stunden auf 65–70°C erhitzt. Das Rühren und das Erhitzen wurden für eine weitere Stunde fortgesetzt und der Lösung wurde es dann erlaubt über Nacht Raumtemperatur zu erreichen.

[0107] Das sich ergebende Polymer wurde in Aceton (etwa 4 Liter) präzipitiert, filtriert und in deionisiertem Wasser (150 ml) aufgelöst. Eine weitere Konzentration auf etwa 125 ml wurde ausgeführt, um einen Acetonrückstand zu entfernen. Das Polymer war mit 5,6% Feststoffen vorhanden.

Zubereitung des dritten Copolymers

[0108] Poly[1-vinylimidazol-co-2-hydroxyethylmethacrylat] (50:50 Gewichtsverhältnis) wurde durch das Hinzufügen von 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) (350 mg) zu einer Lösung aus 1-Vinylimidazol (10 g, 0,1 mol) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (10 g, 0,077 mol) in N,N-Dimethylformamid (160 ml), das unter einer Stickstoffatmosphäre gehalten wurde, zubereitet. Die Lösung wurde unter Rühren für 7 Stunden auf 65–70°C erhitzt.

[0109] Nach dem Ruhen bei Raumtemperatur über Nacht wurde das Polymer in Aceton (etwa 4 Liter) präzipitiert, filtriert und in deionisiertem Wasser (200 ml), das konzentrierte HCl (8,5 ml) enthielt, aufgelöst. Eine Wasserkonzentration wurde durchgeführt, um Restaceton zu entfernen. Das Polymer war mit 12,4% Feststoffen vorhanden.

[0110] Die Zubereitung des vierten Copolymers Poly(1-vinylimidazol-co-2-hydroxyethylmethacrylat) (25:75 Gewichtsverhältnis) wurde in einer Weise ähnlich dem „Dritten Copolymer“ hergestellt. Die sich ergebende Lösung enthielt 13,7% Feststoffe.

[0111] Deoxyribonukleotide (dNTP's), tris(Hydroxymethyl)aminomethanpuffer und lyophilisierte Kalbsthymus-DNA wurde von Sigma Chemical Co. erhalten.

[0112] Die Gelelektrophorese wurde durch das Hinzufügen des Vervielfältigungsproduktreaktionsgemischs (6,75 µl) zu Agarosegelen (2,5%), die mit Ethidiumbromid (0,4 mg/ml Endkonzentration) vorgefärbt worden waren, ausgeführt. Die Gele wurden bei etwa 8 Volt/cm für etwa 1 Stunde unter Verwendung eines Elektrophoresepuffers (600 ml), der Ethidiumbromid (0,4 mg/ml Endkonzentration) enthielt, elektrophoriert. Der Puffer war ein Gemisch aus tris(Hydroxymethyl)aminomethan, Borat und Ethylendiamintetraessigsäure. Die sich ergebenden Banden wurden mit üblichen Molekulargewichtsmarkern verglichen und die Produktbandenintensität (ein 115-mer für HIV1 und ein 383-mer für M. tuberculosis) wurde auf einer Skala von 0 bis 5, wobei 0 kein nachweisbares Signal bedeutet und 5 das höchste Signal bedeutet, bewertet.

[0113] Andere Reagenzien und Materialien wurden entweder von kommerziellen Quellen erhalten oder unter Verwendung ohne weiteres erhältlicher Ausgangsmaterialien und üblicher Verfahren hergestellt.

[0114] Die Erfindung ist im Detail mit bestimmtem Verweis auf bevorzugte Ausführungsformen davon beschrieben worden, aber es wird verstanden werden, daß Veränderungen und Modifikationen innerhalb des Geistes und des Umfangs der Erfindung ausgeführt werden können.

BEISPIEL 1 - FANGEN UND FREISETZEN VON DNA UNTER VERWENDUNG DES SCHWACHBASISCHEN HOMOPOLYMERS

[0115] Dieses Beispiel verdeutlicht die Ausführung der Erfindung, um eine Nukleinsäure unter Verwendung von Poly(1-vinylimidazol) zu fangen und freizusetzen.

[0116] Verschiedene Volumen von Poly(1-vinylimidazol) [von einer 1:10 Verdünnung einer 2,4% Stammlösung (pH 2,3)] wurden mit Kalbsthymus-DNA (100 µl, 0,5 µg/µl) gemischt und gevortext, um ein Präzipitat aus Nukleinsäure und Polymer zu bilden. Das Zentrifugieren wurde dann für 1 Minute ausgeführt. Eine weitere Po-

lymermenge (10 µl der 2,4% Stammlösung) wurde dann zu jedem Überstand hinzugefügt und die sich ergebenden Gemische wurde gevortext und zentrifugiert, um zu bestimmen, ob die erste Präzipitation quantitativ war. Die Tabelle I unten zeigt die Mengen des verwendeten Polymers und die Sorte der für jede Probe beobachteten Präzipitation.

TABELLE I

Polymervolumen (µl)	Erster Präzipitationsniederschlag	Zweiter Präzipitationsniederschlag
5	fast nicht sichtbar	groß
10	klein bis mittel	klein
25	groß	nicht sichtbar
50	sehr groß	nicht sichtbar

[0117] Es wurde beobachtet, daß die Präzipitation unter sauren Bedingungen (pH 2,3) auftrat und das 50 µl der 1:10-Verdünnung der Polymerstammlösung verwendet werden konnte, um 100 µl der Kalbsthymus-DNA-Lösung (0,5 µg/µl) Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, in nahezu quantitativer Weise zu präzipitieren. Die Beobachtung wurde auch durch die Verwendung üblicher Gelelektrophoreseverfahren bestätigt.

[0118] Experimente wurden ausgeführt, um zu bestimmen, wie das Präzipitat löslich gemacht werden kann, um dadurch die Nukleinsäure für die spätere Verwendung freizusetzen. Die Tabelle II unten zeigt die verschiedenen Niederschlagslöslichkeitsbedingungen, die versucht wurden, und die sich ergebende Niederschlagsgröße. Die nützlichste Technik war die Verwendung von Hitze in Kombination mit einem basischem pH (kein Pellet). Standardgelelektrophorese deutete klar darauf hin, daß bei basischem pH das Polymer und die Nukleinsäuren als freie Materialien vorhanden waren. Somit standen die Nukleinsäuren für die spätere Verwendung wie in der PCR zur Verfügung.

TABELLE II

Löslichkeitsbedingungen	Niederschlagsgröße
50 µl NaCl (4 mmol/l)	kein
50 µl NaOH (50 mmol/l) mit Erhitzung bei 55°C für 5 Minuten	klein
50 µl NaOH (100 mmol/l) mit Erhitzung bei 55°C für 5 Minuten	kein
50 µl NaOH (50 mmol/l) mit Erhitzung bei 100°C für 10 Minuten	kein
50 µl NaOH (25 mmol/l) mit Erhitzung bei 100°C für 10 Minuten	kein
50 µl „TE“-Puffer* mit Erhitzung bei 100°C für 10 Minuten	groß
50 µl Wasser mit Erhitzung bei 100°C für 10 Minuten	groß
„TE“-Puffer enthält Ethylendiamintetraessigsäure (1 mmol/l) in tris(Hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridpuffer (10 mmol/l, pH 8)	

[0119] Die Tabelle III unten zeigt die Wirkung des pHs auf die Bildung eines Präzipitats zwischen dem Polymer (50 µl einer 1:10-Verdünnung der Stammlösung) und der Kalbsthymus-DNA (100 µl der 0,5 µg/µl Lösung). Ein saurer pH war eindeutig für das wirksame Fangen der Nukleinsäure durch die Bildung eines Präzipitats (Niederschlags) erforderlich.

TABELLE III

pH	Niederschlagsgröße
2,3	groß
3	groß
4	groß
7	klar, dicke Masse
12	nahezu unsichtbar

BEISPIEL 2 - VERGLEICH DES POLYMERFANGS VON DNA MIT UND OHNE EIN LYSIERUNGSMITTEL

[0120] Die DNA-Menge, die aus weißen Blutzellen freigesetzt wird, die mit einem Lysierungsmittel (Kontrolle) in Kontakt gebracht wurden, wird mit der Menge verglichen, die aus Zellen freigesetzt wird, die nicht mit einem Lysierungsmittel (Verfahren der Erfindung) in Kontakt gebracht wurden, aber anderenfalls identisch behandelt wurden.

[0121] In diesem Beispiel wurden 10 ml Blut in eine VACUTAINER CPT Zellzubereitungsröhre (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ) gezogen und die weißen Blutzellen (WBZ) wurden mittels Zentrifugation gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll abgetrennt. Die WBZ-Endkonzentration wurde beruhend auf Mikroskopie mit $3,5 \times 10^5/\text{ml}$ bestimmt.

[0122] Zweihundert Mikroliter der WBZ-Suspension wurde in jedes von acht 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf North America, Inc., Madison, WI) eingebracht. Die weißen Blutzellen wurden zentrifugiert und dreimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, 0,15 mol/l NaCl und 0,05 mol/l Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5) gewaschen.

KONTROLLE – VERWENDUNG VON LYSIERUNGSMITTEL

[0123] Für Proben, die mit Lysierungsmittel behandelt wurden, wurde der Niederschlag in jeder von vier getrennten Röhrchen wie folgt behandelt: Achtzig Mikroliter Lysierungspuffer (10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0 und 0,5% TWEEN 20) wurden hinzugefügt, gefolgt von 10 μl der thermostabilen Protease Pre-Taq, (1 U/ μl Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) und die Röhrchen wurden für 5 Minuten auf 100°C erhitzt. Nach der Hitzebehandlung wurden 10 μl 250 mmol/l NaOH hinzugefügt und die Röhrchen wurden erneut auf 105°C für 10 Minuten erhitzt gefolgt von einer Zentrifugation bei 14.000 rpm für 2 Minuten.

VERFAHREN DER ERFINDUNG – KEINE VERWENDUNG VON LYSIERUNGSMITTEL

[0124] Die Proben, die nicht mit Lysierungsmittel behandelt wurden, wurden wie folgt behandelt: Der Niederschlag aus jedem von vier separaten Röhrchen wurde in 100 μl PBS resuspendiert.

[0125] Die Proben wurden unter Verwendung der beiden obigen Verfahren identisch behandelt: Die Röhrchen wurden bei 14.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert, die Überstandsflüssigkeit wurde aus jedem Röhrchen vorsichtig in neue Röhrchen dekantiert und bei Raumtemperatur vor der Analyse aufbewahrt. Der DNA-Gehalt wurde für jedes Röhrchen unter Verwendung des TaqMan β -Actintestverfahrens und eines ABI Prism 7700 Sequence Detectors, wie oben beschrieben, mit Kalibrierung, die auf DNA-Standards beruhte, die von Perkin Elmer gekauft wurden, analysiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle IV zusammengefaßt.

TABELLE IV

VERGLEICH DER AUS WEIßEN BLUTZELLEN FREIGESETZTEN DNA MIT UND OHNE BEHANDLUNG MIT LYSIERUNGSMITTEL

#	Zellbehandlung	DNA ng/ μ l	Durchschnitt
1	Kontrolle	2,2	2,93
2	Kontrolle	3,0	
3	Kontrolle	3,6	
4	Kontrolle	2,4	
5	Erfindung	0,006	0,01
6	Erfindung	0,016	
7	Erfindung	0,011	
8	Erfindung	0,007	

[0126] Diese Daten deuten darauf hin, daß in der Gegenwart des Lysierungsmittels eine etwa 300-fach größere DNA-Menge aus den weißen Blutzellen freigesetzt wird. Da nicht erwartet wird, daß DNA aus weißen Blutzellen es Mutation, Deletionen und andere spezifische Krebsmarker beinhaltet, die im Blut aus einem Primärtumor zirkulieren, erhöht solche DNA, die nicht mit dem Ziel in Verbindung steht, den nicht-spezifischen Hintergrund und hat somit eine nachteilige Auswirkung auf das Testverfahren für entweder freie zirkulierende DNA in Körperflüssigkeiten, das auf der spezifischen Veränderung der DNA beruht, die in Verbindung mit Krebs stehen.

BEISPIEL 3 - VERGLEICH DER ERFINDUNG MIT DEM QIAGEN-KITVERFAHREN FÜR DIE EXTRAKTION VON DNA AUS SERUM

[0127] Das folgende Beispiel demonstriert einen Vergleich des kommerziellen Qiagen-Kits und des Verfahrens der vorliegenden Erfindung für die Extraktion von DNA aus demselben Serumpool.

[0128] Für die Isolierung von DNA aus Serum oder Plasma beruhend auf dem Verfahren der Erfindung werden alle anfänglichen Schritte auf Eis durchgeführt, um den möglichen Abbau der DNA durch Serumnukleasen zu minimieren. Der ACES-Puffer (N-(2-Acetamid)-2-aminoethansulfonsäure) von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, wurde als eine 250 mmol/l Stammlösung, pH 6,8, zubereitet. Das DNA-Fängerpolymer Poly(1-vinylimidazolhydrochlorid-co-2-hydroxyethylmethacrylat) mit einem 76:24-Monomergewichtsverhältnis und mit 2,4% Feststoffen wurde durch Verfahren, die in U.S. Patent Nr. 5,582,988 beschrieben sind, synthetisiert. Es ist ein lineares Zufallsvinyladditionscopolymer, das unter Verwendung üblicher Lösungscopolymerisation in N,N-Dimethylformamid mit einem Azo-Initiator hergestellt wird. Das Copolymer (oder einfach das Polymer) wurde mit einem Überschuß Wasser gemischt und konzentrierte HCl wurde hinzugefügt bis eine klare Lösung erhalten wurde. Die Lösung wurde dann diafiltriert.

[0129] Zweihundert Mikroliter Serum oder Plasma wurden zu einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen hinzugefügt gefolgt von dem Hinzufügen von 100 μ l der ACES-Pufferstammlösung. Nach dem Mischen mittels eines Vortexmischers wurden 15 μ l der wäßrigen Fängerpolymerlösung zu dem Röhrchen hinzugefügt und die Probe wurde erneut für 5 Sekunden unter Verwendung eines Vortexmixers gemixt. Das Röhrchen wurde mittels eines Eppendorf Mikrozentrifugenmodells 5415 (Brinkman Instruments, Westbury, N.Y.) bei Maximalgeschwindigkeit für 2 Minuten zentrifugiert und die Überstandsflüssigkeit wurde dekantiert. 100 μ l 20 mmol/l NaOH wurden zu dem Röhrchen, das den Niederschlag enthielt, hinzugefügt und das Röhrchen wurde mittels eines Vortexmixers gerührt, gefolgt vom Erhitzen bei 100°C für 5 Minuten. Proben wurden entweder bei 4°C aufbewahrt und unmittelbar nach der Extraktion getestet oder vor der Verwendung gefroren aufbewahrt.

[0130] Für den Vergleich wurde DNA auch aus Serum oder Plasma unter Verwendung des QIAmp Blood Kits (Kat. 29104) von der Qiagen Corp., Chatsworth, CA, gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Verfahren extrahiert. Die Puffer AL, AW und AE wurden in dem Kit zur Verfügung gestellt. 200 μ l des Serums wurden mit 200 μ l 0,05 mol/l Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 und 200 μ l Puffer AL und 25 μ l Proteinase K-Lösung (Lysierungsmittel), die in dem Kit zur Verfügung gestellt wurden, verbunden und der Inhalt wurde unmittelbar für 15 Sekunden unter Verwendung eines Vortexmischers gemischt. Nach der Inkubation bei 70°C für 10 Minuten wurden 210 μ l Ethanol hinzugefügt und die Probe wurde erneut unter Verwendung des Vortexmischers ge-

mischt. Die DNA wurde mittels einer QIAmp-Spinsäule in ein 2 ml Sammelgefäß extrahiert. Nach dem Auftragen der Probe wurde das Röhrchen bei $6.000 \times g$ für 1 Minute zentrifugiert. Das Röhrchen, das das Filtrat enthielt, wurde verworfen. 500 μ l des Puffers AW wurden hinzugefügt und die Säule wurde erneut für 1 Minute zentrifugiert und das Röhrchen, das das Filtrat enthielt wurde verworfen. Die Säule wurde dann ein weiteres Mal mit dem Puffer AW gewaschen und die DNA wurde dann von der Säule mit 200 μ l Puffer AE oder destilliertem Wasser, das auf 70°C vorgeheizt war, eluiert. Nach dem Hinzufügen des Puffers oder des Wassers wurde das Röhrchen bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubiert und dann bei $6.000 \times g$ für 1 Minute zentrifugiert.

[0131] Ein Vergleich der Schritte in dem Qiagen-Kitverfahren und dem Verfahren der vorliegenden Erfindung sind in der Tabelle V gezeigt. Das Qiagen-Kit erfordert mindestens acht Schritte im Vergleich zum Verfahren der Erfindung, das drei Schritte erfordert.

TABELLE V

VERGLEICH DER SCHRITTE, DIE AN DER DNA-EXTRAKTION UNTER VERWENDUNG DES VERFAHRENS DER ERFINDUNG UND DES QIAGENVERFAHRENS BETEILIGT SIND

IzMn (76/24)

Polymerfang	Qiagen-Kit
1 ACES-Pufferhinzufügung	1 PBS-Pufferhinzufügung
2 Polymerhinzufügung	2 QIAGEN-Proteasebehandlung
3 DNA-Freisetzung durch NaOH	3 Inkubation bei 70°C für 10 Minuten
	4 Ethanolhinzufügung
	5 Lade QIAmp-Spinsäulen und Spin
	6 Puffer zum Waschen der Säule, 1 Min. drehen
	7 Puffer zum Waschen der Säule, 3 Min. drehen
	8 Puffer, um die Säule zu eluieren

[0132] Ein Vergleich der vervielfältigbaren β -Aktin-DNA wie durch das TaqMan β -Actin-Protokoll (acht Wiederholungen) gemessen wird, in der Tabelle IV gezeigt und deutet auf eine 58%ige Verbesserung der wieder-gewinnbaren vervielfältigbaren DNA unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung (60,6 ng/ml Serum) im Vergleich zu den Qiagenverfahren (25,3 ng/ml Serum) hin.

TABELLE VI

VERGLEICH DER β -ACTIN-DNA-EXTRAKTION UNTER VERWENDUNG DES VERFAHRENS DER ERFINDUNG UND DES QIAGENVERFAHRENS

Muster #	DNA-Zuber.	Serum Volumen (μ l)	DNA ng/ μ l	AVEG	SDTEV	ng DNA/ μ l Serum	ng DNA/ml Serum
1	Polymer	200	0,038	0,060625	0,016475	0,0606	60,63
2	Polymer	200	0,06				
3	Polymer	200	0,06				
4	Polymer	200	0,095				
5	Polymer	200	0,051				
6	Polymer	200	0,06				
7	Polymer	200	0,068				
8	Polymer	200	0,053				
1	Qiagen	200	0,032	0,02525	0,014945	0,0253	25,25
2	Qiagen	200	0,013				
3	Qiagen	200	0,022				
4	Qiagen	200	0,025				
5	Qiagen	200	0,059				
6	Qiagen	200	0,016				
7	Qiagen	200	0,015				
8	Qiagen	200	0,02				

BEISPIEL 4 - DIE WIEDERGEGWINNUNG VON β -ACTIN-DNA AUS SERUM ODER INDIVIDUEN DIE MIT BAUCHSPEICHELDRÜSENKREBS DIAGNOSTIZIERT WURDEN UND KONTROLLEN UNTER VERWENDUNG VON VERFAHREN DER ERFINDUNG

[0133] Dieses Beispiel stellt die Ergebnisse von Experimenten zur Verfügung, die eine quantitative Messung der β -Actin-DNA-Menge, die aus dem Serum normaler und Pankreaskrebspatienten gewonnen wurden, unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung mit Übereinstimmung mit den Materialienverfahren des Beispiels 8 hierin zur Verfügung. Die so aus jeder Probe gewonnene β -Actin-DNA wurde unter Verwendung des früher beschriebenen TaqMan- β -Actin-Protokolls quantifiziert.

[0134] Wie in der Tabelle VII unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung gezeigt, ergab eine Gesamtheit von 8 Replikas aus demselben menschlichen Pool einen Durchschnitt von 12 ng β -Actin-DNA/ml Serum, wobei die β -Actin-DNA in dem Serum von 10 verschiedenen Pankreaskrebspatienten, die unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung gewonnen wurde, stark erhöhte war (Durchschnitt = 146 ng/ml). Diese Beobachtung der erhöhten β -Aktin-DNA im Serum von Individuen, die Pankreaskrebs aufweisen, im Vergleich zu normalen, wird durch mehrere Berichte in der Literatur (4, 9) unterstützt.

TABELLE VII

DIE β -ACTIN-DNA-EXTRAKTION AUS EINEM NORMALEN SERUMPOOL UND AUS SERUM VON INDIVIDUEN, DIE VON BAUCHSPEICHELDRÜSENKREBS BETROFFEN SIND, UNTER VERWENDUNG DES VERFAHRENS DER ERFINDUNG

Probe #	Probenquelle	Menge ng/ μ l	AVEG	SDTEV	ng DNA/ μ l im Serum	ng DNA/ml im Serum
1	menschlicher Serum- pool	0,045	0,072875	0,049543	0,0121	12
2		0,056				
3		0,19				
4		0,056				
5		0,072				
6		0,032				
7		0,078				
8		0,054				
1	Serum aus Bauch- speicheldrüsenkrebs- patienten	1	0,881875	1,07686	0,1470	146
2		0,33				
3		0,16				
4		0,88				
5		0,69				
6		0,075				
7		0,32				
8		0,43				
9		3,4				
10		1,1				

BEISPIEL 5 – VERGLEICH DES VERFAHRENS DER ERFINDUNG UND DES QIAGEN-VERFAHRENS FÜR DIE WIEDERGEWINNUNG DER β -ACTIN-DNA AUS SERUM VON INDIVIDUEN, DIE MIT BAUSPEICHELDRÜSENKREBS DIAGNOSTIZIERT WURDEN

[0135] In diesem Beispiel wurde die β -Actin-DNA-Wiedergewinnung aus 6 Patienten mit bestätigtem Bauchspeicheldrüsenkrebs unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung und des Qiagen-Verfahrens in Übereinstimmung mit den hier in Beispiel 3 beschriebenen Materialien und Verfahren verglichen. Im allgemeinen, wie in der Tabelle VIII gezeigt, ergibt das Verfahren der Erfindung höhere oder vergleichbare β -Actin-DNA-Mengen wie durch den TaqMan β -Actin-Test gemessen. Abhängig von der Probe reichten die meßbaren DNA-Konzentrationen von 31 bis 310 ng/ml.

TABELLE VIII

VERGLEICH DER β -ACTIN-DNA-EXTRAKTION AUS SERUM VON INDIVIDUEN, DIE VON BAUCHSPEICHELDRÜSENKREBS BETROFFEN SIND, UNTER VERWENDUNG DES VERFAHRENS DER ERFINDUNG UND DES QIAGENVERFAHRENS

Probe #	Verfahren	ng DNA/ml Serum
1	Qiagen	263
1	Polymerfang	260
2	Qiagen	95
2	Polymerfang	102
3	Qiagen	88
3	Polymerfang	235
4	Qiagen	310
4	Polymerfang	275
5	Qiagen	31
5	Polymerfang	38
6	Qiagen	57
6	Polymerfang	65

[0136] Die Ergebnisse stellen dem Durchschnitt von 4 Wiederholungen pro Probe dar mit einer Ausnahme für die Probe 1 und 2, die den Durchschnitt von 6 Wiederholungen darstellen. Die Probe 2, die mit dem Qiagen-Protokoll bewertet wurde, stellt den Durchschnitt von 2 Wiederholungen dar.

BEISPIEL 6 - ISOLIERUNG ZIERKULIERENDER DNA AUS SERUM VON NORMALEN UND KREBSPATIEN- ENTEN UNTER VERWENDUNG DES VERFAHRENS DER ERFINDUNG

[0137] Dieses Beispiel verdeutlicht die Nützlichkeit des Verfahrens der Erfindung für die Isolierung zirkulierender DNA aus dem Serum von 20 Normalen und 30 Individuen, die eine bestätigte Krebsdiagnose aufweisen. Die Krebspatientenserum umfaßten 10 bestätigte Bauchspeicheldrüsenkrebspatienten und 20 Darmkrebspatienten (8 Dukes B, 5 Dukes C, und 7 Dukes D). Die DNA wurde gemäß dem Verfahren der Erfindung wie in den hierin im Beispiel 2 beschriebenen Verfahren isoliert. Die DNA wurde unter Verwendung des TaqMan β -Actin-Testverfahrens quantifiziert. Der Polymerfang ohne die Verwendung von Lysierungsmitteln erlaubte es, zirkulierende DNA mit einer minimalen oder ohne Kontamination mit DNA aus einer unerwünschten Zellyse und der Entfernung von PCR-Störsubstanzen, die im Serum vorhanden sein könnten, zu konzentrieren. Die DNA in jedem Serum wurde mittels des TaqMan-Testverfahrens auf das β -Actin-Gens unter Verwendung der hier in [Fig. 1](#) gezeigten Standardkurve quantifiziert.

[0138] Die Ergebnisse der Analysen auf freie zirkulierende DNA in jeder Probe werden in den Tabellen IX A und IX B gezeigt und deuten daraufhin, daß die DNA-Mengen im Serum aus Krebspatienten im Vergleich zu Serum aus normalen Individuen erhöht sind.

TABELLE IX A

DNA-GEHALT IM SERUM VON KREBSPATIENTEN

#	D.S. Unterstützung #	Diagnose	DNA ng/ μ l	ng/ml	Durchschnitts ng/ml
1	139980708	Pankreas	0,035	17,5	26,4
2	310980084	Pankreas	0,024	12	
3	310980107	Pankreas	0,02	10	
4	310980130	Pankreas	0,017	8,5	
5	310980153	Pankreas	0,029	14,5	
6	310980176	Pankreas	0,037	18,5	
7	1111980333	Pankreas	0,22	110	
8	2510980006	Pankreas	0,043	21,5	
9	2510980012	Pankreas	0,054	27	
10	2510980017	Pankreas	0,049	24,5	
11	139980709	Dukes B	0,17	85	
12	1110980326	Dukes B	0,14	70	
13	1110980328	Dukes B	0,1	50	

14	1110980332	Dukes B	0,11	55	135,5
15	2410980054	Dukes B	0,03	15	
16	2410980059	Dukes B	0,048	24	
17	2611980009	Dukes B	1,4	700	
18	2611980018	Dukes B	0,17	85	
19	139980701	Dukes C	0,011	5,5	100,13
20	1110980312	Dukes C	0,21	105	
21	1110980319	Dukes C	0,39	195	
22	1110980324	Dukes C	0,19	95	
23	2411980086	Dukes C	N.D.	N.D.	
24	310980121	Dukes D	0,05	25	66,08
25	310980144	Dukes D	0,055	27,5	
26	310980190	Dukes D	0,051	25,5	
27	2411980074	Dukes D	0,057	28,5	
28	2611980003	Dukes D	0,093	46,5	
29	2611980004	Dukes D	0,05	25	
30	2611980012	Dukes D	0,61	305	

TABELLE IX B

DNA-GEHALT IM SERUM NORMALER

#	Einheit #	DNA ng/2 µl	ng/ml
1	M58234	ND*	ND
2	M58088	ND	ND
3	M58089	0,0510	6,38
4	M58090	ND	ND
5	M58091	ND	ND
6	M58092	0,0300	3,75
7	M58093	ND	ND
8	M58094	0,0190	2,38
9*	M58095	0,0360	4,50
10	M58111	0,0400	5,00

#	Einheit #	DNA ng/2 µl	ng/ml
11	M58112	0,0370	4,63
12	M58113	ND	ND
13	M58115	0,0310	3,88
14	M58116	ND	ND
15	M58118	0,0230	2,88
16	M58120	0,1200	15,00
17	M58121	0,0390	4,88
18	M58124	0,0190	2,38
19	M58126	0,0590	7,38
20*	M58128	0,0290	3,63

*ND = unter der Nachweisgrenze

BEISPIEL 7 - NACHWEIS DER K-RAS MUTATION IM SERUM VON BAUCHSPEICHELDRÜSENKREBSPATIENTEN

[0139] In diesem Beispiel wurde eine Ausführungsform der Erfindung, die das Polymerfangen der DNA aus dem Serum von Bauchspeicheldrüsenkrebspatienten beinhaltet, verwendet. Eine Restriktionserdonukleasen-vermittelte selektive PCR (REMS = PCR) wurde durchgeführt (Robers, N. J. et al., 1999, BioTechniques 27: (3) 418–422, Ward, R. et al., 1998, Am. J. Pathol. 153 (2): 373–379 und WO 96/32500) gefolgt von einer Gelanalyse und wurde verwendet, um die Gegenwart einer K-ras-Mutation im Kodon 12 (K12-ras) nachzuweisen.

[0140] Das Serum oder Plasma (300 µl) aus drei Bauchspeicheldrüsenkrebspatienten wurde zu getrennten Mikrozentrifugenröhrchen hinzugefügt, gefolgt von dem Hinzufügen von 100 µl 250 mmol/l ACES (N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure)-Puffer (pH 6,8 bei 23°C). Fünfzehn Mikroliter (15 µl) des Polymers Poly(1-vinylimidazol)-co-2-hydroxyethylmethacrylat (Gewichtsverhältnis 77/23) wurde hinzugefügt (siehe U.S. Patent Nrn. 5,434,270; 5,523,368 und 5,582,988) und die Röhrchen wurden mittels eines Minivortexers (VWR Scientific, Rochester, N.Y.) für 10 Sekunden gemischt. Die Röhrchen wurden dann in einer Eppendorf Mikrozentrifuge, Model 5415, bei der Maximalgeschwindigkeit für 2 Minuten zentrifugiert. Die Überstandsflüssigkeit wurde dekantiert und 100 µl 20 mmol/l Natriumhydroxid wurden zu jedem Röhrchen hinzugefügt und der Niederschlag wurde durch das Mischen und Erhitzen für 10 Minuten auf 100°C resuspendiert.

[0141] Jeder PCR-Mix enthielt drei Primergruppen. Die diagnostischen Primer führten eine Bstn 1-Restriktionsstelle in das Wild-Typ ras aber nicht in einer Mutation des ras-Kodons 12 ein. Daher wird ras Wild-Typ-DNA während des PCR-Thermozyklirens selektiv gespalten und mutierte Sequenzen des ras am Kodon 12 werden angereichert. Das PCR-Kontrollprimerpaar wird verwendet, um zu bestätigen, daß die PCR amplifizierbare DNA extrahiert worden ist und das Enzymkontrollprimerpaar bestätigt, daß das Restriktionsenzym während des Thermozyklirens funktioniert. Die Reaktionsgemische enthielten 12 Einheiten/ 100 µl rekombinanter Taq-Polymerase und einen 5-fachen Überschuß nach Gewicht (0,842 µl) des Taq-inhibierenden Antikörpers TP4-9.2 (siehe U.S. Patente 5,338,671 und 5,587,287) im Verhältnis zu Polymerase, 1 mmol/l HT50-Puffer (100 mmol/l Natriumchlorid und 50 mmol/l Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), pH 8,3, 0,3 µmol/l diagnostische Primer (siehe unten), 5K15S (SEQ ID NR: 1) und 5K37 (SEQ ID NR: 2), 0,05 µmol/l PCR-Kontrollprimerpaare, 3K42 (SEQ ID NR: 3) und 5BK5 (SEQ ID NR: 4), 0,1 µmol/l Enzymkontrollprimerpaare, 5N12A (SEQ ID NR: 5) und 3N13A (SEQ ID NO: 6), 0,2 mmol/l Gesamtdinukleosidtriphosphate (dNTP), 0,3 Einheiten/µl Bsl1 (New England BioLabs, Beverly, MA), 1 mmol/Dithiothreitol (DTT), 5 mmol/l Magnesiumchlorid, Probe (typischerweise 3 µl) und deionisiertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 100 µl. Die Taq-Polymerase und die anti-Taq-Antikörper wurden kombiniert und für 10–15 Minuten vor dem Hinzufügen der anderen PCR-Bestandteile inkubiert. Die Thermozyklirungsparameter waren wie folgt: 1 Zyklus bei 94°C für 100 Sekunden und 36 Zyklen bei 92°C für 15 Sekunden und 60°C für 60 Sekunden. Die Primersequenzen sind wie folgt:

SEQ ID NR: 1 (5K15S)

TGAATATAAA CTTGTGGTAC CTGGAGC T

SEQ ID NR: 2 (5K37)

ATATAAACTT GTGGTAGTTC CAGCTGGT

SEQ ID NR: 3 (3K42)

GAATTAGCTG TATCGTCAAG GCACTC

SEQ ID NR: 4 (5BK5)

TCAGCAAAGA CAAGACAGGT A

SEQ ID NR: 5 (5N12A)

TATAGATGGT GAAACCTGTT TGTTGG

SEQ ID NR: 6 (3N13A)

CTTGCTATTA TTGATGGCAA CCACACAGA

[0142] Die Proben wurden durch Elektrophorese auf einen 4% w/v NUSieve-Agarosegel (FMC Bioproducts, Rockland, ME) und mittels eines Stratagene Eagle Eye II-Videosystems (La Jolla, CA) abgebildet.

[0143] Die [Fig. 2](#) zeigt die Ergebnisse der Analyse für eine K-12 ras-Mutation wie durch die Gelelektrophorese nach der REMS-PCR bestimmt. Die Spur 1 zeigt die Ergebnisse für K-562, welches im Hinblick auf ras Wild-Typ ist. Die Spur 2 zeigt die Ergebnisse für Calul-DNA, die heterozygot für eine K-ras-Mutation im Kodon 12 ist (Capon, D.J. et al. 1983, Nature 403: 507–513) und einen 10-fachen Überschuss von Wild-Typ K-562-DNA. Diese Probe zeigt eine starke PCR-Kontrollbande bei 167 bp und eine starke diagnostische Bande bei 68 bp. Sowohl dem Serum und dem Plasma aus dem Patienten 1 fehlte eine diagnostische Bande bei 68 bp und sie waren negativ für K-ras. Die Gegenwart von PCR-vervielfältigbarer DNA wird durch die PCR-Kontrollbande bei 167 bp nachgewiesen. Dem Plasma- und Serumproben aus dem Patienten 2 fehlt eine PCR-Kontrollbande bei 167 bp, was darauf hindeutet, daß es keine nachweisbare zirkulierende vervielfältigbare DNA in dieser Probe gibt. Sowohl das Serum und das Plasma aus dem Bauchspeicheldrüsenpatienten 3 waren für die K-12 ras Mutation positiv, was durch eine Bande bei 68 bp sowie eine starke PCR-Kontrollbande bei 167 bp aufgezeigt wird. Eine Enzymkontrollbande bei 126 bp ist bei allen Proben in der [Fig. 2](#) abwesend, was darauf hindeutet, daß das Restriktionsenzym während des PCR-Zyklierens aktiv war.

<110> Belly, Robert T
Sun, Jianbo

<120> SCHNELLES UND EFFIZIENTES FANGEN VON DNA AUS EINER PROBE OHNE DIE
VERWENDUNG VON LYSIERUNGSMITTEL

<130> CDS219CKB_PCT_SEQUENZEN

<140>

<141>

<150> 60/132,443

<151> 1999-05-04

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> MENSCHLICH

<400> 1

tgaatataaa cttgtggtac ctggagct

28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> MENSCHLICH

<400> 2

atataaactt gtggtagttc cagctggt

28

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> MENSCHLICH

<400> 3

gaattagctg tatcgtcaag gcactc

26

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> MENSCHLICH

<400> 4

tcagcaaaga caagacaggt a

21

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> MENSCHLICH

<400> 5
tatagatggt gaaacctgtt tgttgg 26

<210> 6
<211> 29
<212> 219
<213> MENSCHLICH

<400> 6
cttgctatta ttgatggcaa ccacacaga 29

Patentansprüche

1. Verfahren für das zur Verfügung stellen einer Nukleinsäure aus einer Probe ohne die Verwendung einer Zell-lyisierenden Reagenz, umfassend die Schritte:

A) In-Kontaktbringen einer Probe, von der vermutet wird, daß sie eine Nukleinsäure enthält, mit einem wasserlöslichen, schwach basischen Polymer, das wiederkehrende Einheiten umfaßt, die durch die Additionspolymerisation von:

1) von etwa 15 bis 100 Gew.% eines wasserlöslichen, schwach basischen, ethylenisch ungesättigten, polymerisierbaren Monomers, das mindestens eine Gruppe aufweist, die bei sauren pH protoniert werden kann und die aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Aminoalkyl, Imidazolyl, Isoxazolyl, Pyridyl, Piperidyl, Piperazinyl, Pyrazolyl, Triazolyl, Tetrazolyl, Oxadiazolyl, Pryidazinyl, Pyrimidyl, Pyrazinyl, Quinolinyl und Quinazolinyl,

2) von 0 bis etwa 35 Gew.% eines nicht-ionischen hydrophilen, ethylenisch ungesättigten, polymerisierbaren Monomers und

3) von 0 bis etwa 85 Gew.% eines nicht-ionischen, hydrophoben ethylenisch ungesättigten, polymerisierbaren Monomers in einer Menge, die ausreichend ist, um ein wasserunlösliches Präzipitat des schwach basischen Polymers mit allen im Lysat enthaltenen Nukleinsäuren zu bilden, abgeleitet sind, bei einem pH von weniger als 7,

B) Abtrennen des wasserunlöslichen Präzipitats aus der Probe und

C) In-Kontaktbringen des Präzipitats mit einer Base, um den pH der Lösung auf größer als 7 anzuheben und dadurch die Nukleinsäure aus dem schwach basischen Polymer freizusetzen, wobei das schwach basische Polymer, das wiederkehrende Einheiten umfaßt, die durch Additionspolymerisation eines oder mehrerer ethylenisch ungesättigter, polymerisierbarer Monomere abgeleitet ist, eine Amingruppe, die bei sauren pH protoniert werden kann, aufweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, des weiteren umfassend den Schritt:

D) Anpassen des pHs der Lösung, die die freigesetzten Nukleinsäuren enthält, von etwa 6 auf etwa 9.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Base Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Amoniumhydroxid, Lithiumhydroxid, Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, ein tertiäres Amin oder Tris(hydroxymethyl)aminomethan ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das schwach basische Polymer im Schritt (A) in einer Menge von etwa 0,01 bis etwa 0,5 Gew.% verwendet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eine schwache Base im Schritt (C) verwendet wird, begleitet vom Erhitzen des wasserunlöslichen Präzipitats bei von etwa 50 bis etwa 125°C.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eine starke Base im Schritt (C) ohne Erhitzen des wasserunlöslichen Präzipitats verwendet wird.

7. Verfahren für die Vervielfältigung und den Nachweis einer Zielnukleinsäure ohne die Verwendung eines Zell-lyisierenden Reagenz umfassend:

I) das zur Verfügungstellen einer Probe, von der vermutet wird, das sie eine Zielnukleinsäure enthält,

II) das Unterziehen der Probe, die die Zielnukleinsäure enthält, der Schritte:

A) In-Kontaktbringen der Zielnukleinsäure mit einem wasserlöslichen schwach-basischen Polymer, das wiederkehrende Einheiten umfaßt, die durch Additionspolymerisation von:

1) von etwa 15 bis 100 Gew.% eines wasserlöslichen, schwach basischen, ethylenisch ungesättigten, poly-

risierbaren Monomers, das mindestens eine Gruppe aufweist, die bei sauren pH protoniert werden kann und die aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Aminoalkyl, Imidazolyl, Isoxazolyl, Pyridyl, Piperidyl, Piperazinyl, Pyrazolyl, Triazolyl, Tetrazolyl, Oxadiazolyl, Pryidazinyl, Pyrimidyl, Pyrazinyl, Quinolinyl und Quinazolinyl,

2) von 0 bis etwa 35 Gew.% eines nicht-ionischen hydrophilen, ethylenisch ungesättigten, polymerisierbaren Monomers und

3) von 0 bis etwa 85 Gew.% eines nicht-ionischen, hydrophoben ethylenisch ungesättigten, polymerisierbaren Monomers in einer Menge, die ausreichend ist, um ein wasserunlösliches Präzipitat des schwach basischen Polymers mit allen in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren zu bilden, die die Zielnukleinsäuren umfassen, abgeleitet sind, bei einem pH von weniger als 7,

B) Abtrennen des wasserunlöslichen Präzipitats aus der Probe und

C) In-Kontaktbringen des Präzipitats mit einer Base, um den pH der Lösung auf größer als 7 anzuheben und dadurch die Nukleinsäure aus dem schwach basischen Polymer freizusetzen,

wobei das schwach basische Polymer, das wiederkehrende Einheiten umfaßt, die durch Additionspolymerisation eines oder mehrerer ethylenisch ungesättigter polymerisierbarer Monomere abgeleitet ist, eine Amingruppe, die bei sauren pH protoniert werden kann, aufweist,

III) Vervielfältigen der freigesetzten Zielnukleinsäure ohne weitere Anpassung des pHs und

IV) Nachweisen der vervielfältigten Zielnukleinsäure.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das schwach basische Polymer bei basischem pH wasserunlöslich ist und das Verfahren des weiteren den Schritt der Entfernung des wasserunlöslichen Polymers nach der Freisetzung der Zielnukleinsäure davon und vor der Vervielfältigung dieser umfaßt.

9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Zielnukleinsäure eine K-ras-Sequenz ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

Standardkurve für die DNA wie sie durch TaqMan-Vervielfältigung mit dem β -Actin-Gen nach 40 PCR-Zyklen bewertet wurde

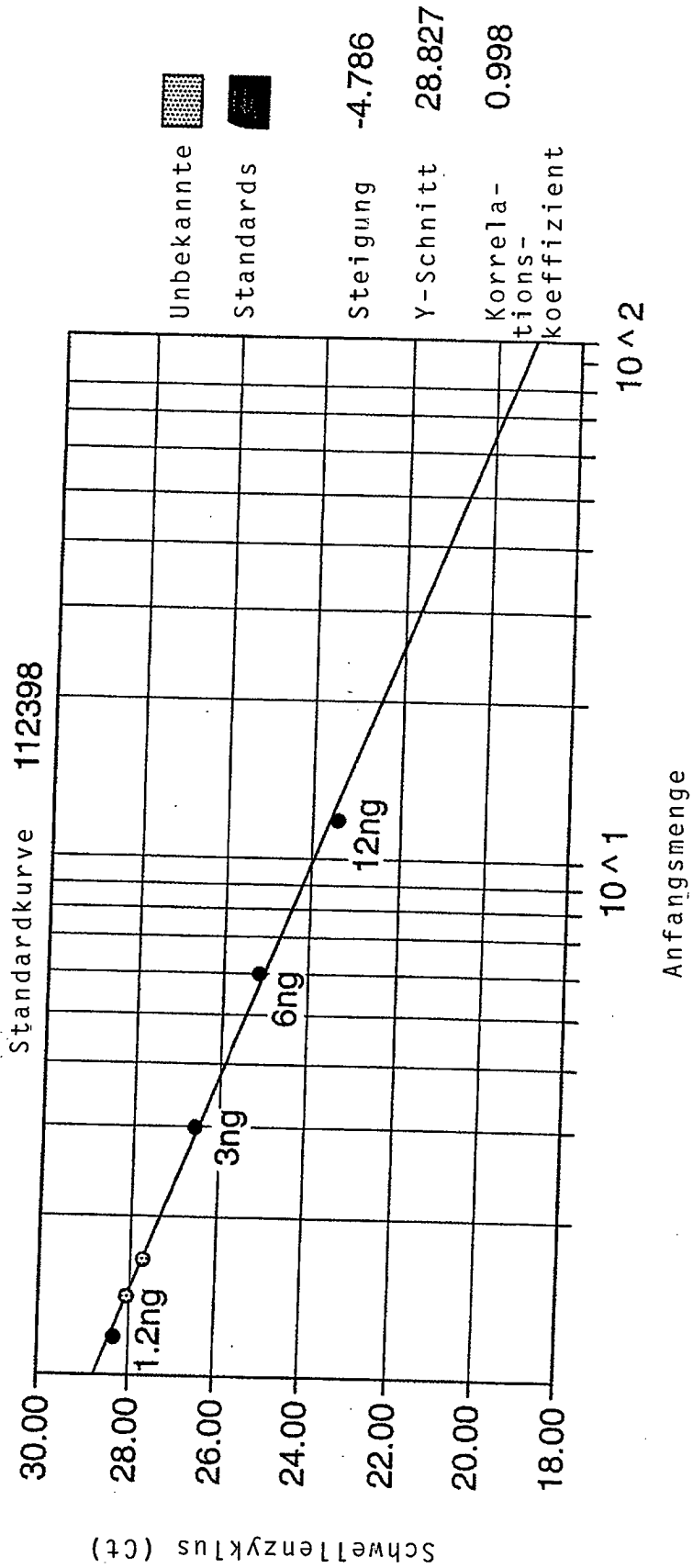


FIG. 2

