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

(10) **DE 694 33 136 T2** 2004.07.08

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 728 198 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 136.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB94/02469**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 900 235.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/013368**
(86) PCT-Anmeldetag: **10.11.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **18.05.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.08.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **10.09.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/10**
C12Q 1/68

(30) Unionspriorität:
9323305 **11.11.1993** **GB**

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

(73) Patentinhaber:
Qiagen AS, Oslo, NO

(74) Vertreter:
Patentanwälte Westphal Mussgnug & Partner, 78048 Villingen-Schwenningen

(72) Erfinder:
BREIVIK, Jarle, N-0027 Oslo, NO; GAUDERNACK, Gustav, N-0027 Oslo, NO; SPURKLAND, Anne, N-0027 Oslo, NO

(54) Bezeichnung: **NUKLEINSÄURE-ISOLIERUNG**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Isolierung von Nucleinsäure, vornehmlich DNA, und insbesondere auf ein Verfahren zur Herstellung von Nucleinsäureproben zur anschließenden Verwendung in Amplifikationsverfahren.

[0002] Techniken zur Amplifikation von Nucleinsäuren revolutionierten in letzter Zeit die Molekularbiologie und sind nun bei vielen Verfahren als unabdingbares Werkzeug etabliert, beispielsweise bei der Detektion und Diagnose von genetischen und infektiösen Erkrankungen, bei der Gerichtsmedizin, bei der Identifizierung neuer Gene oder alleler Variationen oder Mutationen und bei der Unterstützung routinemäßiger genetischer Manipulationen, z. B. der Sequenzierung.

[0003] Obwohl ständig neue und verbesserte Amplifikationsverfahren entwickelt werden, treten dennoch in bestimmten Fällen besondere Nachteile auf, welche die Nützlichkeit der Technik einschränken. So erwiesen sich beispielsweise auf der DNA-Amplifikation beruhende Diagnosetechniken auf DNA-Basis zum Detektieren des Vorkommens mikrobieller Gene z. B. mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als nützlich für die Detektion bakterieller und viraler infektiöser Stoffe und Krankheitserreger und gewinnen rasch an Bedeutung. Dennoch sind diese Techniken in Anbetracht bestimmter Probleme nicht für alle diagnostischen Anwendungen geeignet. Ein Hauptproblem besteht darin, dass Amplifikationstechniken wie z. B. die PCR nicht direkt auf klinische Proben, namentlich Fäkalien oder Blut, welche die Amplifikationsenzyme, z. B. Polymerasen, hemmende Substanzen enthalten, anwendbar sind. Die Gegenwart von roten Blutkörperchen oder Hämoglobin stellt ein besonderes Problem dar, und diese müssen im Allgemeinen entfernt werden. Zu einem ähnlichen Problem kommt es im Fall des Nachweisens einer mikrobiellen Verunreinigung in Lebensmittelproben, welche ebenfalls oft hemmende Substanzen enthalten.

[0004] Für eine erfolgreiche Amplifikation muss die Probe entweder sehr oft verdünnt oder die DNA aus der Probe isoliert und herausgesäubert werden. In ersterem Fall führt die Verdünnung bis zu einem Grad, der ausreicht, um eine Amplifikation zu ermöglichen, häufig zu einem inakzeptablen Empfindlichkeitsverlust. In letzterem Fall sind Techniken zur Nucleinsäurereinigung, welche beispielsweise eine Extraktion mit Phenolen, Chloroform und Alkoholen umfassen, häufig mühsam, kompliziert und zeitaufwendig und können zu einem Verlust an Proben-DNA führen, was ein Problem darstellen kann, wenn die Probe klein ist.

[0005] Die PCR erwies sich auch als schwer auf Proben anwendbar, die alt sind, die chemisch behandelt wurden (beispielsweise durch Fixierung oder Einbettung) oder die anderweitig belastet sind. Dies beeinträchtigt beträchtlich die Nützlichkeit der Technik z. B. bei der Analyse eines fixierten Archivmaterials oder von Blut- und Gewebeproben, die nicht frisch sind oder nicht unter Kühlung gelagert wurden. Die derzeit allgemein angewandten Fixierungstechniken ermöglichen keine leichte Freisetzung von DNA, welche für die nachfolgende Amplifikation unter Anwendung herkömmlicher Techniken geeignet ist, und obwohl sich verbesserte, weniger schädliche Fixierungstechniken in Entwicklung befinden, ist die Situation nicht gänzlich zufriedenstellend. Komplizierte Behandlungsverfahren, z. B. die Entparaffinierung eines in Paraffin eingebetteten Materials, ein Proteinase-Aufschluss etc., sind im Allgemeinen erforderlich, und in vielen Fällen kann überhaupt keine Anplifikation erzielt werden. Dies trifft auch im Fall gealterter oder nicht gekühlter Proben zu.

[0006] Die EP 0393744 beschreibt ein Verfahren zum Extrahieren, Amplifizieren und Detektieren einer Nucleinsäure aus Vollblut oder einer Fraktion von peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) davon. Die Extraktion aus der PBMC-Fraktion wird bewerkstelligt, indem die Fraktion bei oder nahe dem Siedepunkt von Wasser einige Minuten lang erhitzt wird und danach die abgeschiedene Nucleinsäure gewonnen wird. Vollblut kann ebenfalls erhitzt werden, nachdem es mit einer Salzlösung, die ein Polysaccharid, wie z. B. Dextran, enthält, vermischt wurde. Die abgeschiedene Nucleinsäure wird daraufhin aus der erhitzten Mischung gewonnen. Die EP 0389063 beschreibt ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäure aus einem Nucleinsäure enthaltenden Ausgangsmaterial, wie z. B. Vollblut, Blutserum, Urin, Fäkalien und Zellkulturen. Dieses Verfahren ist gekennzeichnet durch das Vermischen des Ausgangsmaterials mit einer chaotropen Substanz und einer Nucleinsäure-bindenden Festphase. Die Festphase mit der gebundenen Nucleinsäure wird dann von der Flüssigkeit abgetrennt. Die erhaltenen Festphase-Nucleinsäure-Komplexe werden gewaschen und, falls erforderlich, kann die Nucleinsäure aus diesen Komplexen eluiert werden.

[0007] Es besteht ein Bedarf an einem verbesserten Verfahren zur Herstellung von Nucleinsäure zur Verwendung in Amplifikationsverfahren, welches rasch und einfach durchzuführen ist und auf gealterte, nicht gekühlte, fixierte oder anderweitig behandelte oder belastete Proben anwendbar ist. Die vorliegende Erfindung spricht diesen Bedarf an.

[0008] Wir fanden nunmehr heraus, dass Nucleinsäure durch eine einfache und leicht durchzuführende Verfahrensweise in einer Form aus einer Probe isoliert werden kann, die direkt für eine Amplifikation geeignet ist, welche Verfahrensweise das Kochen oder Erhitzen der Probe auf eine hohe Temperatur und das Abkühlenlassen sowie das Ablagern der Nucleinsäure auf einem festen Träger umfasst. Diese Verfahrensweise vermeidet viele der komplizierten und zeitaufwendigen Behandlungsschritte des Stands der Technik und kann, was noch wichtiger ist, erfolgreich direkt auf klinische und andere bluthaltige

Proben sowie auf Proben, die gealtert, nicht gekühlt oder fixiert sind, angewandt werden, also dort, wo sich frühere Techniken als erfolglos erwiesen. Genauer gesagt, die Erfindung beruht auf der überraschenden Entdeckung, dass bei einer in dieser Weise erfolgenden Probenbehandlung freigesetzte Nucleinsäure um den Träger kondensieren kann, wodurch ein Abtrennen derselben von der Probe ermöglicht wird, wobei zugleich ihre Fähigkeit, bei einer nachfolgenden Amplifikationsreaktion als Matrize zu fungieren, erhalten bleibt.

[0009] Gemäß einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung somit ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäure aus einer fixierten oder gealterten Probe bereit, wobei dieses Verfahren das Kochen der Probe oder das Erhitzen der Probe auf eine hohe Temperatur zwecks Freisetzung von Nucleinsäure sowie das Abkühlenlassen und das Binden der Nucleinsäure an einen festen Träger mit großem Oberflächenbereich umfasst.

[0010] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sieht ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäure aus einer Probe vor, wobei das Verfahren das Kochen der Probe oder das Erhitzen der Probe auf eine hohe Temperatur zwecks Freisetzung von Nucleinsäure sowie das Abkühlenlassen und das Binden der Nucleinsäure an einen magnetische Partikel enthaltenden, festen Träger mit großem Oberflächenbereich umfasst.

[0011] Wie obenstehend erwähnt, besitzt dieses Verfahren eine besondere Nützlichkeit bei der Herstellung von Nucleinsäureproben für Amplifikationsverfahren, da die sich ergebenden kondensierten Nucleinsäureproben direkt als Matrize für eine Amplifikation verwendet werden können, ohne zuvor vom Träger entfernt werden zu müssen.

[0012] Die Nucleinsäure kann DNA, RNA oder irgendeine Modifikation davon sein. Vorzugsweise ist die Nucleinsäure jedoch eine DNA, die genomisch oder eine cDNA und einzel- oder doppelsträngig sein kann. Wird das Verfahren zur Herstellung von Nucleinsäure für eine Amplifikation eingesetzt, so handelt es sich vorzugsweise um eine doppelsträngige genomische DNA.

[0013] Die Probe kann jegliche Nucleinsäure enthaltende Probe sein, ist jedoch vorzugsweise eine klinische Probe, wie z. B. eine Blutprobe, eine aus Blut gewonnene Probe, eine Stuhl- oder Gewebeprobe oder eine Probe, die gealtert oder behandelt ist. Behandelte Proben umfassen solche, die fixiert wurden, beispielsweise in Formalin, Aceton, Alkoholen, oder irgendeinem bekannten oder patentrechtlich geschützten Fixiermittel, z. B. Omnifix, oder eingebettet wurden, beispielsweise in Paraffinwachs oder in künstlichen oder natürlichen Harzen. Gealterte Proben umfassen alle Proben, die nicht frisch entnommen oder sofort gekühlt wurden. Solche gealterten oder behandelten Proben umfassen somit jede Nucleinsäurequelle, Pflanze oder Tier. Neben Archivmaterial, das sehr viele Jahre alt sein kann, z. B. über hundert oder noch bevorzugter über 50 oder 20 Jahre alt, umfassen solche Proben daher Proben aus irgendeinem biologischen Gewebe oder Fluid (z. B. Blut, Plasma, Serum, Organ- oder andere Gewebebiopsien), welche nicht sofort gekühlt oder verarbeitet wurden, z. B. in entfernten Gebieten entnommene klinische Proben, die transportiert und/oder manchmal für einen Zeitraum von Tagen, Wochen oder Monaten gelagert werden müssen, bevor sie verarbeitet oder analysiert werden können.

[0014] Dies stellt einen wichtigen Vorteil der vorliegenden Erfindung dar, da es sich in der Vergangenheit als extrem schwierig, wenn nicht unmöglich, erwies, eine PCR oder andere Amplifikationen an klinischen Proben, z. B. Blut oder Biopsien, durchzuführen, die beispielsweise mit der Post zur Analyse an ein Referenzlabor verschickt werden mussten. Somit kann die vorliegende Erfindung vorteilhaft verwendet werden, wenn medizinische Studien in entfernten Bereichen der Welt durchgeführt werden, wo eine Fachausrüstung und Fachpersonal fehlen und wo die Proben vor der Analyse eine Fixierung und/oder Lagerung über ausgedehnte Zeiträume hinweg benötigen. Besonders vorteilhaft ist, dass die Notwendigkeit einer Kühlung vermieden werden kann, was dort, wo Proben z. B. mit der Post transportiert werden müssen, einen bedeutenden Vorteil darstellt.

[0015] Andere Proben, bei denen sich herausstellte, dass bei ihnen die Erfindung zur Herstellung von Nucleinsäure für die Amplifikation erfolgreich funktioniert, wo frühere Verfahren versagten, umfassen Haarwurzeln und Zellen des Wangeninneren, welche durch Mundwaschungen, Abschabungen etc. erhalten werden. Es zeigte sich, dass das erfindungsgemäße Verfahren bei Proben, die eine fragmentierte Nucleinsäure enthalten, besonders gut funktioniert. "Kochen", wie hierin verwendet, umfasst das Erhitzen der Probe auf eine hohe Temperatur, z. B. auf mindestens 80°C, noch bevorzugter mindestens 85 oder 90°C.

[0016] Die Dauer und die Temperatur, die im Schritt des Kochens/Erhitzens eingesetzt werden, hängen im gewissen Maß von der Beschaffenheit und dem Zustand der nucleinsäurehaltigen Probe ab. Chemisch behandelte, z. B. Formalin-behandelte, oder gealterte Proben erfordern im Allgemeinen eine aggressivere Behandlung als frische Zellsuspensionen und können dieser widerstehen. Im Allgemeinen wird die Stufe des Kochens/Erhitzens zweckmäßigerweise 10 Sekunden bis 1 Stunde lang ausgeführt oder, falls angebracht, länger, beispielsweise 30 Sekunden bis 30 Minuten lang oder noch genauer 3 bis 15 Minuten lang. Zum Beispiel ermöglicht somit bei den meisten Proben eine 10-minütige Behandlung bei 94°C normalerweise eine Nucleinsäureisolierung, welche zur Ermöglichung einer wirksamen Amplifikation ausreicht.

[0017] Der Träger kann während der Wärmebehandlung zusammen mit der Probe anwesend sein oder kann danach, sogar Tage oder Stunden nach

dem Abkühlenlassen der Probe, eingebracht werden. Bei frischen Zellsuspensionen ist es im Allgemeinen zweckmäßig, den Träger vor, während oder kurz nach der Stufe des Kochens/Erhitzens einzubringen; bei Proben, bei denen als Folge der Stufe des Kochens/Erhitzens Mengen an Detritus abgesondert werden, wird im Allgemeinen jedoch bevorzugt, den Träger nach der Entfernung eines solchen Detritus einzubringen. Somit erzeugt das Kochen/Erhitzen bei Proben wie z. B. in Paraffin eingebettetem Gewebe eine inhomogene Mischung, die Gewebe- und Wachsfragmente enthält. Es wird bevorzugt, die nucleinsäurehaltige Flüssigphase nach dem Kochen/Erhitzen und gegebenenfalls nach dem Abkühlen z. B. durch Abgießen oder Pipettieren von diesen Mischungen abzutrennen und danach diese Flüssigphase mit dem Träger in Kontakt zu bringen, um das Auftreten der Nucleinsäurekondensation zu ermöglichen.

[0018] Die Nucleinsäurekondensation (und vorzugsweise auch die Schritte des Kochens/ Erhitzens und Abkühlens) wird bzw. werden beim erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise in einer hoch salzigen wässrigen Lösung (z. B. mit einer Osmolalität, die jener von mindestens 1 M wässriger NaCl-Lösung entspricht) durchgeführt.

[0019] Wird die Kondensation durch das In-Kontakt-Bringen des Trägers mit einer bereits gekochten/erhitzten und abgekühlten, nucleinsäurehaltigen wässrigen Probe erzielt, so wird ein solcher Kontakt vorzugsweise für eine Zeitdauer von einigen Minuten, z. B. 1 bis 60, insbesondere 10 bis 20 Minuten, ausgeführt, um zu ermöglichen, dass die Kondensation, d. h. das Binden der Nucleinsäure an den Träger, in einem angemessenen Ausmaß erfolgt.

[0020] Der Träger mit großem Oberflächenbereich kann irgendein bekannter oder herkömmlicher fester Träger sein, der einen großen Oberflächenbereich für die Kondensation der Nucleinsäure bietet. Derartige Träger haben im Allgemeinen eine unregelmäßige Oberfläche und können beispielsweise porös oder teilchenförmig sein, z. B. Teilchen, Fasern, Gewebe, Sinter oder Siebe. Die Kondensation der Nucleinsäure kann auf dem oder um den Träger herum stattfinden, oder darin, falls er beispielsweise eine poröse Struktur besitzt. Beispiele für geeignete feste Träger umfassen Mikrotitermulden, Kapillaren, Fasern, Filter und Pegelmessstäbe, obwohl bestimmte Träger im Allgemeinen bevorzugt werden, insbesondere Perlen, da diese mit ihrer eingefangenen, "kondensierten" Nucleinsäure leicht direkt in einem nachfolgenden Amplifikationsschritt eingesetzt werden können, ohne dass die kondensierte Nucleinsäure vom Träger abgelöst werden müsste.

[0021] Zweckmäßigerweise umfasst ein erfindungsgemäß verwendeter teilchenförmiger fester Träger kugelförmige Perlen. Die Größe der Perlen ist nicht entscheidend, sie können jedoch beispielsweise einen Durchmesser in der Größenordnung von mindestens 1 und vorzugsweise mindestens 2 μm und einen Höchstdurchmesser von vorzugsweise nicht mehr als 10 und noch bevorzugter nicht mehr als 6 μm aufweisen. Es zeigte sich, dass Perlen mit Durchmessern von 2,8 μm und 4,8 μm gut funktionieren.

[0022] Monodisperse Partikel, d. h. solche, die eine im Wesentlichen gleichmäßige Größe aufweisen (z. B. eine Größe mit einer Durchmesser-Standardabweichung von weniger als 5%), haben den Vorteil, dass sie eine sehr einheitliche Wiederholbarkeit der Reaktion bieten. Monodisperse Polymerpartikel, die mittels der in der US-A-4336173 beschriebenen Technik hergestellt werden, sind besonders geeignet.

[0023] Nicht magnetische Polymerperlen, die zur Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind, sind bei Dyno Particles AS (Lillestrøm, Norwegen) sowie bei Qiagen, Pharmacia and Serotec erhältlich.

[0024] Magnetische Partikel werden jedoch als erfindungsgemäßer fester Träger besonders bevorzugt, da sie eine Reihe von Vorteilen bieten. Vor allem bietet die magnetische Aggregation eine rasche, einfache und effiziente Methode zur Abtrennung der Partikel nach dem Kondensationsschritt und ist ein viel weniger drastisches Verfahren als die traditionellen Techniken, wie z. B. die Zentrifugation, welche Scherkräfte erzeugen, die Nucleinsäuren abbauen.

[0025] Magnetische Partikel, die zur Verwendung als Träger im erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind, sind bei Dynal, Advanced Magnetics Inc., Biotechnologies Ltd., Amersham, Promega, Scigen, Advanced Genetic Technologies and Seradyn, erhältlich.

[0026] Besonders bevorzugt werden superparamagnetische Partikel, beispielsweise solche, die von Sintef in der WO-A-83/03920 beschrieben werden, da eine magnetische Aggregation und ein Verklumpen der Partikel während der Reaktion vermieden werden kann, wodurch ein gleichmäßiges Abziehen von Nucleinsäure sichergestellt wird.

[0027] Die wohlbekannten magnetischen Partikel, welche von Dynal AS (Oslo, Norwegen) als DYNABEADS verkauft werden, sind besonders für die Verwendung bei der vorliegenden Erfindung geeignet. Besonders zu erwähnen sind die Dynabeads® M-450 und M-280.

[0028] Es ist anzumerken, dass das erfindungsgemäße Verfahren gut funktioniert, obwohl frühere Studien, bei welchen solche magnetische Partikel verwendet werden, gezeigt haben, dass die nicht spezifische Bindung der DNA und/oder RNA an derartige Oberflächen sehr schwach ist.

[0029] Um die Selektivität und Leistung der Technik insbesondere dort, wo nur winzige Probenmengen verfügbar sind, zu verbessern, können zusätzlich für bestimmte Gene oder Nucleotidsequenzen spezifische Oligonucleotidsonden eingesetzt werden, gegebenenfalls zusammen mit einem stringenten Waschen. Somit kann eine spezifische Sonde in die Probe eingebracht werden, die an eine spezifische Zielsequenz bindet. Um die Isolierung der Zielnuclein-

säure aus der Probe zu ermöglichen, kann der feste Träger mit Mitteln zum Einfangen der Sonde versehen werden. Im Allgemeinen wird dies bewerkstelligt, indem Sonde und Träger jeweils mit einem von einem Paar übereinstimmender Affinitätsbindungspartner versehen werden, so dass die Sonde und der Träger selektiv und, falls gewünscht, reversibel aneinandergebunden werden können. Am zweckmäßigsten umfassen die Affinitätsbindungspartner Biotin und Avidin/Streptavidin, wobei das Biotin an die Sonde und das Avidin/Streptavidin an den Träger gebunden wird. Sowohl die Biotin-markierten Oligonucleotidsonden als auch die Streptavidin-beschichteten magnetischen Partikel sind im Handel erhältlich (Dynal AS).

[0030] Andere Bindungspartnersysteme können jedoch auch verwendet werden, beispielsweise DNA-bindende Proteine, die an spezifische Bereiche der Oligonucleotidsonde binden, z. B. das lac-Repressorprotein Lac I, das an eine lac-Operator (LacOP)-Stelle bindet, welche an der Sonde vorhanden sein kann. Alternativ kann die Oligonucleotidsonde mit einem Hapten, wie z. B. Digoxigenin, markiert und der Träger mit einem Anti-Hapten-Antikörper versehen werden. Techniken zur Markierung von Oligonucleotiden mit Haptenen, wie z. B. Digoxigenin, sind im Stand der Technik wohlbekannt, ebenso Verfahren zur Anbringung von Antikörpern an festen Trägern.

[0031] Ein solches System eignet sich besonders zur Herstellung von Proben für Amplifikationsreaktionen, welche Proben spezifische Zielnucleinsäuresequenzen, die von Interesse sind, enthalten. Insbesondere zeigten wir, dass dort, wo Verfahren des Stands der Technik, welche auf der Isolierung einer Ziel-DNA für eine PCR durch Verwendung spezifischer Biotin-markierter, an Streptavidin-beschichtete magnetische Perlen gebundener Sonden beruhen, versagt haben, z. B. im Fall bluthaltiger Proben oder gealteter oder fixierter Proben, das erfindungsgemäße Verfahren erfolgreich funktioniert hat.

[0032] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung somit ein Verfahren zur Herstellung einer Nucleinsäureprobe für die in vitro-Amplifikation bereit, wobei dieses Verfahren der Reihe nach oder gleichzeitig das In-Kontakt-Bringen der Probe mit einer für eine Zielnucleotidsequenz in dieser Probe spezifischen Oligonucleotidsonde und das Isolieren von Nucleinsäure aus der Probe durch ein obenstehend beschriebenes Verfahren umfasst, wobei die Oligonucleotidsonde und der feste Träger jeweils mit einem von einem Paar Affinitätsbindungspartner versehen werden, wodurch die Sonde und daher die Zielnucleotidsequenz an den Träger gebunden wird.

[0033] Alternativ betrachtet, sieht dieser Aspekt der Erfindung ein Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäure in einer Probe vor, wobei dieses Verfahren die Schritte des (a) der Reihe nach erfolgenden oder gleichzeitigen In-Kontakt-Bringens der Probe mit einer für eine Zielnucleotidsequenz in dieser Probe spezifischen Oligonucleotidsonde und des Isolierens von Nucleinsäure aus der Probe durch ein obenstehend beschriebenes Verfahren umfasst, wobei die Oligonucleotidsonde und der feste Träger jeweils mit einem von einem Paar Affinitätsbindungspartner versehen werden, wodurch die Sonde und daher die Zielnucleotidsequenz an den Träger gebunden wird, sowie (b) des Aussetzens der durch Schritt (a) isolierten Nucleinsäure einer in vitro-Amplifikationsreaktion.

[0034] Zweckmäßigerweise kann die Probe in Gegenwart eines festen Trägers abkühlen gelassen werden, wodurch die Nucleinsäure am oder im Träger kondensiert.

[0035] Im Allgemeinen umfasst das Affinitätsbindungspartnerpaar, wie obenstehend erwähnt, Biotin/Streptavidin. Dieses Bindungspartnersystem wird häufig bei Anwendungen der Molekularbiologie eingesetzt, und viele Verfahren zum Einbauen oder Anbringen von Biotin und Streptavidin in die bzw. an der Sonde/in den bzw. am Träger sind bekannt. So - kann zum Beispiel Biotin eingebaut und der Träger mit Streptavidin beschichtet werden, wie von Dynal AS in deren "Technical handbook, molecular biology" besprochen. Die Länge der Oligonucleotidsonde ist nicht entscheidend, aber kann zweckmäßigerweise in einem Bereich von 10–200 Nucleotiden, bevorzugter 15–50 Nucleotiden, liegen.

[0036] Falls der feste Träger in Form von Partikeln vorliegt, sind die Funktionalisierung der Partikel und die nachfolgende Anbindung der Sonden zweckmäßigerweise solcherart, dass jeder Partikel 10^3–10^6 Sonden oder Sondenbindungsstellen trägt.

[0037] Eine Reihe von in vitro-Amplifikationstechniken wurden entwickelt und können erfindungsgemäß eingesetzt werden. Die PCR und deren Modifikationen, z. B. die Verwendung eingenisteter Primer, ist jedoch im Allgemeinen die Haupttechnik, welche einzusetzen ist.

[0038] Bei einer klassischen PCR sind zwei Primer erforderlich, und diese können entweder für eine Ziel-DNA-Sequenz, die von Interesse ist, spezifisch sein oder ein oder zwei Standard-PCR-Primer sein. Dies kann es erforderlich machen, gemäß im Stand der Technik wohlbekannter Techniken, z. B. durch Restriktion und. Ligasierung, eine Hybridisierungsstelle für einen Standard-PCR-Primer einzubringen.

[0039] Eine Einnistungs-PCR umfasst die Verwendung zweier weiterer sogenannter "innerer" Primer, welche zwischen dem ersten "äußeren" Primerpaar in einer zweiten Reihe von Amplifikationszyklen hybridisieren oder "sich einnisten". Die Anwendung von vier getrennten Primervorgängen führt zu einer erhöhten Spezifität der Amplifikationsreaktion.

[0040] Die Einnistungs-Primertechnik wurde weiters im DIANA (Detection of Immobilised Amplified Nucleic Acids)-System modifiziert (siehe Wahlberg et al., Mol. Cell Probes 4: 285 (1990)), wobei das innere zweite Primerpaar Mittel zur Immobilisierung zwecks Ermöglichung eines Einfangens von amplifizierter DNA bzw. eine Markierung oder Mittel zum Anbrin-

gen einer Markierung zwecks Ermöglichung einer Erkennung trägt. Dies liefert die doppelten Vorteile eines reduzierten Hintergrundsignals und eines raschen und einfachen Mittels zum Detektieren der amplifizierten DNA.

[0041] Andere erwähnenswerte Amplifikationstechniken umfassen die selbsterhaltende Sequenzreplikation (SSR), das Q-Beta-Replikase-Amplifikationssystem und die Ligase-Amplifikationsreaktion (LAR).

[0042] Bei der SSR werden Primer verwendet, die Polymerase-Bindungsstellen tragen, welche die Tätigkeit einer Reverse Transcriptase zulassen, um eine Ziel-RNA oder ssDNA zu amplifizieren.

[0043] Im Q-Beta-Replikasesystem fängt eine immobilisierte Sonde einen Strang einer Ziel-DNA ein und wird danach dazu gebracht, mit einer RNA-Sonde zu hybridisieren, welche als Matrizenbereich eine als MDV-1 bekannte Tertiärstruktur für eine RNA-gerichtete RNA-Polymerase, normalerweise Q-Beta-Replikase, trägt.

[0044] Die LAR hybridisiert zwei Oligonucleotidsonden mit benachbarten Positionen an der Zielnucleinsäure, so dass eine Ligasierung, z. B. unter Verwendung von T4-Ligase, eine längere Sequenz erzeugt, welche nach der Strangtrennung als Matrize für weitere Hybridisierungen und Ligasierungen fungieren kann.

[0045] Bei den erfindungsgemäßen Verfahren ist die Reihenfolge, in der die verschiedenen Schritte ausgeführt werden, nicht entscheidend und sind Variationen und Modifikationen möglich. Beispielsweise kann der feste Träger vor dem Kochen/Erhitzen oder nach dem Schritt des Kochens/Erhitzens zur Probe hinzugefügt werden. Die zur Amplifikation erforderlichen Primer/Sonden können ebenso vor dem Kochschritt, unmittelbar nach dem Kochen/Erhitzen oder nach dem Schritt der Kühlkondensation hinzugefügt werden.

[0046] Die Verwendung von magnetischen Partikeln als feste Träger erleichtert insbesondere die Schritte des Waschens und Abtrennens und bietet einen signifikanten Vorteil, da alle Reaktionen, einschließlich der Amplifikation, in einem Reaktionsbehälter durchgeführt werden können, wodurch der Reaktionsprozess beträchtlich vereinfacht wird und ein Verlust von an den Behälterwänden haftenden Nucleinsäurefragmenten vermieden wird.

[0047] Das Kochen/Erhitzen der Probe kann in jedem bekannten oder herkömmlichen Medium, welches im Stand der Technik für die Manipulation von Nucleinsäuren bekannt ist, stattfinden. So sind beispielsweise viele typische Puffer, z. B. Waschpuffer, bekannt und können verwendet werden. Im Allgemeinen wird die Verwendung hoch salziger (z. B. 1–4 M) wässriger Medien bevorzugt. Beispielhafte Puffer umfassen Tris-gepufferte Salzlösungen, und der Bindungs- und Waschpuffer von Dynal AS (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2,0 M NaCl, pH 7.5) ist besonders geeignet. Ähnliche Puffer können für alle dazwischenliegenden Waschstufen, die erforderlich sein mögen, eingesetzt werden. Es erwies sich als günstig, Salz, z. B. 1 bis 4 M NaCl, vorzugsweise 2 M NaCl, in das Kochmedium aufzunehmen.

[0048] Die Inkubationszeiten für das Kochen/Erhitzen können zwischen 10 Sekunden und mehreren Stunden, günstiger zwischen 1 und 15 Minuten, variieren. So wurden beispielsweise günstige Ergebnisse erzielt, indem die Proben über einen Zeitraum von 10 Minuten oder in manchen Fällen 3 bis 5 Minuten auf eine Temperatur von 80 bis 100°C erhitzt wurden.

[0049] Die Abkühlung kann stattfinden, indem die Probe einfach bei Umgebungstemperatur beispielsweise für einen Zeitraum von 3 bis 20 Minuten stehengelassen wird.

[0050] Falls spezifische Oligonucleotidsonden verwendet werden, kann es möglich sein, den Grad der Nucleinsäurefragmentierung und den Grad der Nucleinsäuredenaturierung und -kondensierung und folglich den Grad der Spezifität bis zu einem gewissen Grad zu steuern, indem die Dauer und/oder Temperatur des Schritts des Kochens/Erhitzens reduziert wird.

[0051] Es zeigte sich, dass die erfindungsgemäßen Verfahren bei Probenvolumen von 0,1 µl bis 100 ml erfolgreich funktionieren. Im Algemeinen werden kleine Probenvolumen von 1 bis 100 µl, z. B. 10 bis 20 µl, bevorzugt. Bei Verwendung von Partikeln als fester Träger können zweckmäßigerweise Mengen von 1 bis 500 µg, vorzugsweise 20 bis 200 µg, eingesetzt werden.

[0052] Die Fähigkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens, mit derart kleinen Probenmengen durchgeführt zu werden, ist von besonderem Vorteil, da die verfügbare Probenmenge häufig sehr limitiert ist, z. B. bei einer Nadelbiopsie und bei forensischen Proben oder dort, wo es wichtig ist, die Probe für eine weitere Studie aufzubewahren.

[0053] Wird eine Oligonucleotidsonde zur Verstärkung der Spezifität eingesetzt, so können Mengen von 0,1 pmol bis 50 pmol, z. B. 1 bis 5 pmol, verwendet werden.

[0054] Die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erforderlichen Bestandteile können zweckmäßigerweise in Form von Kits geliefert werden, und solche Kits bilden einen weiteren Aspekt der Erfindung. Bei einer bevorzugten Ausführungsform würde ein solches Kit im Allgemeinen jene Reagenzien umfassen; die zur Identifizierung bestimmter Gensegmente aus jeglichem gegebenen Probentyp nötig sind, und besondere Beispiele solcher Kits gäbe es für die selektive Amplifikation von ras- oder HLA-Genen oder deren Mutationen, z. B. K-ras und deren 12/13-Codon-Punktmutationen. Typischerweise enthalten derartige Kits magnetische Perlen für die Nucleinsäurekondensation; wässriges Medium, z. B. gepufferte Salzlösung, für den Wärmebehandlungsschritt; 5'- und 3'-Endprimer, Nucleinsäure-Polymerase und Restriktionsenzyme für die PCR-Amplifikation und, falls gewünscht, einen RFLP-Assay; und gegebenenfalls Oligonucleotidsonden, welche mit den

Perlen konjugiert oder konjugierbar sind (z. B. biotinylierte Sonden, die mit Streptavidinbeschichteten Perlen konjugierbar sind), und welche mit einigen oder allen Gensequenzen oder benachbarten Sequenzen hybridisieren.

[0055] Wie obenstehend erwähnt, besitzt das erfindungsgemäße Verfahren eine Reihe von Verwendungen und Anwendungen. Diese umfassen beispielsweise die Detektion von Krankheitserregern, Erkrankungen und allelen Variationen. Klinische Proben können auf epidemiologische Informationen untersucht werden. Eine Hauptverwendung, die vorgeschlagen wird, besteht in der Analyse klinischer Proben, welche an entfernten Orten entnommen und zu Referenzlaboratorien gebracht werden; Blutproben können beispielsweise ohne Kühlung direkt verschickt werden, sobald die Nucleinsäurekondensation und die Aussonderung von Plasma- und Zellfragmenten stattgefunden haben. Somit können die Proben durch den einfachen Kochschritt vor Ort behandelt werden, um die Nucleinsäure auf einen festen Träger zu kondensieren, bevor andere Rückstände von der Probe gespült und diese anschließend transportiert wird.

[0056] Die Technik ist auch nützlich in der Gerichtsmedizin und in allen Disziplinen, worin eine Lagerung von Proben oder Präparaten erforderlich ist, z. B. in der Zoologie, Botanik, Erhaltungs- und Evolutionsbiologie, dem Studium der biologischen Vielfalt oder der ökologischen Prozesse.

[0057] Die Erfindung wird nunmehr anhand der nachfolgenden, nicht einschränkenden Beispiele unter Bezugnahme auf die Zeichnungen beschrieben, wobei:

[0058] **Fig.** 1 Folgendes zeigt:

(a) die Ergebnisse einer Gelelektrophorese nach einer Restriktionsfragmentlänge-Polymorphismus (RFLP)-Analyse der PCR-Produkte des Beispiels 1:

Bahn 1:	Marker-DNA.
Bahn 2:	PCR von magnetisch isolierter DNA aus einer geringen Menge von fixiertem Tumorgewebe.
Bahn 3:	PCR von 5 µl Flüssigkeit aus der gekochten Probe.
Bahn 4:	PCR von 1 µg mutierter Kontroll-DNA (positive Kontrolle).
Bahn 5:	PCR ohne DNA (negative Kontrolle);

(b) Gelelektrophorese, welche die Ergebnisse einer Festphasensequenzierung des mutierten PCR-Produkts zeigt (ras-Genmutation) (Bahn 2 der **Fig.** 1(a)), Mutation durch Pfeil angezeigt;

[0059] **Fig.** 2 Folgendes zeigt:

(a) die Ergebnisse einer Gelelektrophorese nach einer Restriktionsfragmentlänge-Polymorphismus (RFLP)-Analyse der PCR-Produkte des Beispiels 2:

Bahn 1:	Marker-DNA.
Bahn 2:	PCR von magnetisch isolierter DNA aus einer Blutprobe.
Bahn 3:	PCR von 5 µl Flüssigkeit aus der gekochten Probe.
Bahn 4:	PCR von 1 µg Kontroll-DNA (positive Kontrolle).
Bahn 5:	PCR ohne DNA (negative Kontrolle);

(b) Gelelektrophorese, welche die Ergebnisse einer Festphasensequenzierung des mutierten PCR-Produkts zeigt (HLA-DQB-Gensequenz) (Bahn 2 der **Fig.** 2(a)).

Beispiel 1

Identifizierung einer K-ras-Mutation eines Bauchspeicheldrüsenkarzinoms

[0060] Zwei 5 µm dicke Plättchen werden vom Paraffinblock einer Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Nadelbiopsie eines Bauchspeicheldrüsenkarzinoms geschnitten und zu 400 µl Bindungs- und Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 2,0 M NaCl), enthaltend 3 pmol biotinyliertes, zum 5'-Ende des K-ras-Gensegments komplementäres Oligonucleotid (z. B. 5'-B-ACTGA ATATA AACTT GTGGT AGTTG GACCT-3'), hinzugefügt.

[0061] Die Röhrchen werden bei 94°C 5 Minuten lang inkubiert, und während dieser Inkubation werden die Inhalte zweimal mit einem Wirbelmischer 20 Sekunden lang vermischt.

[0062] Nachdem die Röhrchen in einem Thermozykler etwa 3 Minuten lang auf Umgebungstemperatur abgekühlt wurden, wird die Flüssigphase abpipettiert und mit 20 µg Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Perlen (Dynabeads® M-280 Streptavidin, Dynal, Norwegen) vermischt.

[0063] Die Mischung wird 15 Minuten lang bei Um-

gebungstemperatur gelassen.

[0064] Die Perlen werden durch magnetische Trennung isoliert (Dynal MPC®-E, Dynal, Norwegen) und als Matrize zu einer K-ras-spezifischen PCR-Reaktionsmischung hinzugefügt (z. B. unter Verwendung des 5'- und des 3'-Endprimers 5'-ACTGA ATATA AACTT GTGGT AGTTG GACCT-3' und 5'-TCAAA GAATG GTCCT GGAAC-3' und Taq-DNA-Polymerase). Vor dem Hinzufügen der Perlen gesammelte 5 µl der gekochten Flüssigkeit werden in einem parallelen Kontrollverfahren als Matrize verwendet.

[0065] Es werden drei serielle PCRs mit zwei dazwischen stattfindenden Zerstörungen von nicht mutierten Allelen mittels spezifischer Endonuclease (z. B. Bst NI) durchgeführt.

[0066] Für eine RFLP-Analyse werden die Amplifikationsprodukte aufgeschlossen, z. B. mit Bst NI, und unter Anwendung einer Gelelektrophorese analysiert, die Ergebnisse werden in **Fig.** 1a gezeigt. Ein nachweisbares Amplifikationsprodukt (Bahn 2) wird aus jener PCR erhalten, bei der DNA-tragende Perlen als Matrize dienten, allerdings nicht dort, wo die perlenfreie gekochte Flüssigkeit verwendet wurde (Bahn 3).

[0067] Das PCR-Produkt wird durch RFLP als mutiert identifiziert, und die Nucleotidsequenz wurde mittels Festphasensequenzierung bestimmt (**Fig.** 1b), wobei das Vorhandensein einer Punktmutation im Codon 12 angezeigt wurde.

[0068] Eine herkömmliche PCR-Amplifikation von und RFLP-Analysen hinsichtlich ras-Oncogenen wurden in mehreren Publikationen besprochen, und die herkömmlicherweise verwendeten Primer und Enzyme können beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden. Derartige Publikationen umfassen Kahn et al. Amplifications 4: 22–26 (1990), Chen et al. Anal. Biochem. 195: 51–56 (1991), Kahn et al. Oncogene 6: 1079–1083 (1991), Haliassos et al. Nucleic Acids Research 17: 3606 (1989) und Kumar et al. Oncogene 3: 647–651 (1988).

Beispiel 2

HLA-Typisierung einer alten Blutprobe

[0069] 10 µl EDTA-Blut, das 7 Tage lang bei Umgebungstemperatur gelagert wurde, wurden zu 200 µl Bindungs- und Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, m 1 mM EDTA, 2,0 M NaCl), der mit 20 µg paramagnetischen Perlen (Dynabeads® M-450, Dynal, Norwegen) vermischt war, hinzugefügt. Eine parallele Kontrollprobe wurde ohne Perlen hergestellt.

[0070] Die Röhrchen wurden danach bei 94°C 10 Minuten lang inkubiert und auf Umgebungstemperatur abgekühlt.

[0071] Die Perlen wurden durch magnetische Trennung isoliert (Dynal MPC®-E, Dynal, Norwegen) und zu einer HLA-DQB-spezifischen PCR-Reaktionsmischung hinzugefügt (z. B. unter Verwendung der 5'- und des 3'-Endprimer DQ-AMP A: 5'-GCATG TGCTA CTTCA CCAAC G-Biotin-3' und DQ-AMP B: 5'-CAGGT AGTTG TGTCT GCACA C-3' und Taq-DNA-Polymerase). 5 µl der ohne Perlen hergestellten Probenlösung wurden in einem parallelen Kontrollverfahren als Matrize verwendet.

[0072] Eine 30-Zyklen-PCR wurde durchgeführt.

[0073] Für eine RFLP-Analyse wurden die Amplifikationsprodukte unter Anwendung einer Gelelektrophorese analysiert. Die Ergebnisse werden in **Fig.** 2a gezeigt.

[0074] Ein nachweisbares Amplifikationsprodukt (Säule 2) wurde aus jener PCR erhalten, bei der DNA-tragende Perlen als Matrize dienten, allerdings nicht dort, wo die perlenfreie gekochte Flüssigkeit verwendet wurde (Säule 3).

[0075] Die Nucleotidsequenz wurde mittels Festphasensequenzierung bestimmt (**Fig.** 2b).

Allgemeine Verfahrensschritte

[0076] Für den Einsatz in einer Nucleinsäurefragment-Amplifikation kann das erfindungsgemäße Verfahren somit zweckmäßigerweise unter Anwendung der folgenden Schritte durchgeführt werden:

Schritt 1:

[0077] Das Freisetzen von Nucleinsäure aus einer Probe durch Kochen/Erhitzen in Gegenwart (Beispiel 2) oder Abwesenheit (Beispiel 1) eines festen Trägers und in Gegenwart (Beispiel 1) oder Abwesenheit (Beispiel 2) einer Oligonucleotidsonde.

Schritt 2:

[0078] Das Binden von Nucleinsäure an einen festen Träger.

a) Das Abkühlen in Gegenwart eines festen Trägers (Beispiel 2).

b) Das Hinzufügen eines festen Trägers zur abgekühlten Flüssigkeit (Beispiel 1).

Schritt 3:

[0079] Das Isolieren eines festen Trägers mit gebundener Nucleinsäure (z. B. magnetische Trennung).

Schritt 4:

[0080] Der feste Träger mit der gebundenen Nucleinsäure wird in einer nachfolgenden Amplifikationsreaktion als Matrize verwendet.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäure aus einer fixierten oder gealterten Probe, wobei das Verfahren das Kochen der Probe oder das Erhitzen der Probe auf eine hohe Temperatur zwecks Freisetzung

von Nucleinsäure sowie das Abkühlenlassen und das Binden der Nucleinsäure an einen festen Träger mit großem Oberflächenbereich umfasst.

2. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäure aus einer Probe, wobei das Verfahren das Kochen. der Probe oder das Erhitzen der Probe auf eine hohe Temperatur zwecks Freisetzung von Nucleinsäure sowie das Abkühlenlassen und das Binden der Nucleinsäure an einen magnetische Partikel enthaltenden, festen Träger mit großem Oberflächenbereich umfasst.

3. Verfahren wie im Anspruch 1 oder 2 beansprucht, wobei die Probe gekocht wird.

4. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 3 beansprucht, wobei die Nucleinsäure DNA ist.

5. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 beansprucht, wobei die Probe eine klinische Probe ist.

6. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 5 beansprucht, wobei die Probe fixiert ist.

7. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 beansprucht, wobei die Probe gealtert ist.

8. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 7 beansprucht, wobei der Schritt des Kochens/Erhitzens durch Erhitzen der Probe auf mindestens 80°C bewirkt wird.

9. Verfahren wie im Anspruch 8 beansprucht, wobei die Probe 10 Sekunden bis 1 Stunde lang erhitzt wird.

10. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 9 beansprucht, wobei der Träger vor oder während des Schritts des Kochens/Erhitzens zur Probe hinzugefügt wird.

11. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 9 beansprucht, wobei der Träger nach dem Schritt des Kochens/Erhitzens zur Probe hinzugefügt wird.

12. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 11 beansprucht, wobei die Schritte des Kochens/Erhitzens und/oder Abkühlens und/oder der Kondensation in einer hoch salzigen wässrigen Lösung ausgeführt werden.

13. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 12 beansprucht, wobei der feste Träger teilchenförmig ist.

14. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 13 beansprucht, wobei der feste Träger magnetische Partikel umfasst.

15. Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 14 beansprucht, weiters umfassend das Hinzufügen einer für Zielnucleinsäure spezifischen Oligonucleotidsonde zur Probe und das Versehen des Trägers mit Mitteln zum Einfangen der Sonde.

16. Verfahren zur Herstellung einer Nucleinsäureprobe für in vitro-Amplifikation, wobei dieses Verfahren der Reihe nach oder gleichzeitig das In-Kontakt-Bringen der Probe mit einer für eine Zielnucleotidsequenz in dieser Probe spezifischen Oligonucleotidsonde und das Isolieren von Nucleinsäure aus der Probe durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 umfasst, wobei die Oligonucleotidsonde und der feste Träger jeweils mit einem von einem Paar Affinitätsbindungspartner versehen werden, wodurch die Sonde und daher die Zielnucleotidsequenz an den Träger gebunden wird.

17. Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäure in einer Probe, wobei dieses Verfahren die Schritte des (a) der Reihe nach erfolgenden oder gleichzeitigen In-Kontakt-Bringens der Probe mit einer für eine Zielnucleotidsequenz in dieser Probe spezifischen Oligonucleotidsonde und des Isolierens von Nucleinsäure aus der Probe durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 umfasst, wobei die Oligonucleotidsonde und der feste Träger jeweils mit einem von einem Paar Affinitätsbindungspartner versehen werden, wodurch die Sonde und daher die Zielnucleotidsequenz an den Träger gebunden wird, sowie (b) des Aussetzens der durch Schritt (a) isolierten Nucleinsäure einer in vitro-Amplifikationsreaktion.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

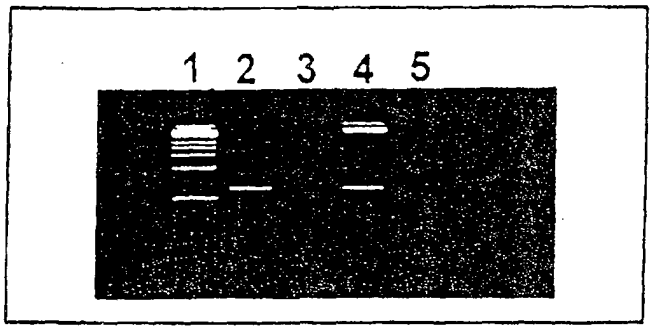


FIG. 1a

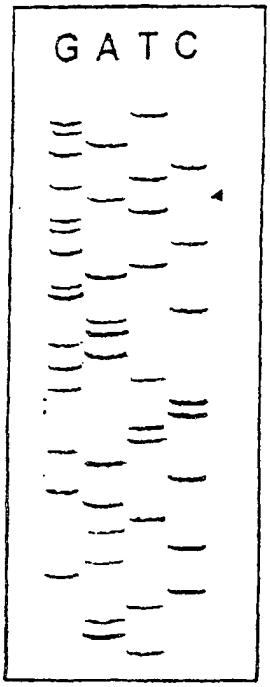


FIG. 1b

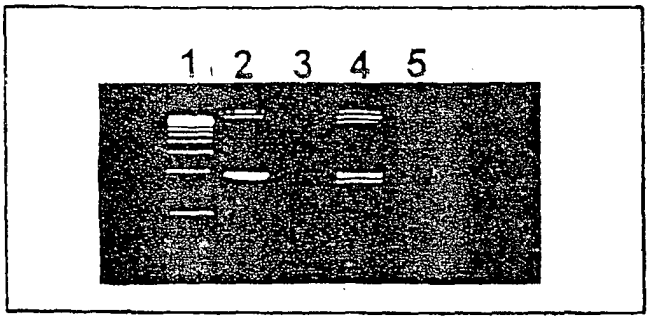


FIG. 2a

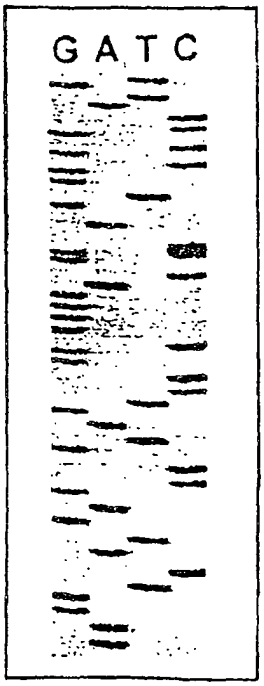


FIG. 2b