



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 691 33 574 T2 2008.03.06**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 302 549 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12Q 1/68 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **691 33 574.5**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 000 776.9**

(96) Europäischer Anmeldetag: **06.08.1991**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.04.2003**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **27.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.03.2008**

(30) Unionspriorität:  
**563758            06.08.1990    US**

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

(73) Patentinhaber:  
**F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH**

(72) Erfinder:  
**Gelfand, David, Oakland, CA 94611, US; Holland,  
Pamela, Seattle, WA 98109, US; Saiki, Randall,  
Alameda, CA 94501, US; Watson, Robert, San  
Leandro, CA 94577, US**

(74) Vertreter:  
**Vossius & Partner, 81675 München**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Unterscheidung von Sequenz Varianten**

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 Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der Nucleinsäurechemie. Genauer betrifft sie die Verwendung der 5' zu 3'-Nuclease-Aktivität einer Nucleinsäurepolymerase zum Abbau eines markierten Oligonucleotids in einem hybridisierten Doppelstrang, bestehend aus dem markierten Oligonucleotid und einer Oligonucleotid-Zielsequenz, und zur Bildung nachweisbarer markierter Fragmente.

**[0002]** Neue mikrobiologische Techniken werden routinemäßig in diagnostischen Untersuchungen angewendet. Zum Beispiel offenbart das US-Patent Nr. 4,358,535 ein Verfahren zum Nachweis von Pathogenen durch Aufbringen einer Probe (z.B. Blut, Zellen, Speichel etc.) auf einen Filter (z.B. Nitrocellulose), Lysierung der Zellen und Fixierung der DNA durch chemische Denaturierung und Erhitzung. Dann werden markierte DNA-Sonden hinzu gegeben, und man lässt sie mit der fixierten DNA der Probe hybridisieren, Hybridisierung zeigt die Anwesenheit von Pathogen-DNA an. Die Proben-DNA kann in diesem Fall durch Züchten der Zellen oder Organismen vor Ort auf dem Filter amplifiziert werden.

**[0003]** Als erhebliche Verbesserung der DNA-Amplifikation wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Technik in den US-Patenten Nr. 4,683,202; 4,683,195; 4,800,159 und 4,965,188 offenbart. In ihrer einfachsten Form ist die PCR ein in vitro-Verfahren für die enzymatische Synthese spezieller DNA-Sequenzen mit der Verwendung zweier Oligonucleotid-Primer, die an gegenläufige Stränge hybridisieren und die interessierende Region in der Ziel-DNA flankieren. Eine wiederholte Serie von Reaktionsschritten, die Matrizen-Denaturierung, Primer-Anlagerung und die Verlängerung der angelagerten Primer umfasst, führt zu der exponentiellen Anhäufung eines bestimmten Fragments, dessen Enden durch die 5'-Enden der Primer definiert sind. Die PCR ist in der Lage, eine selektive Anreicherung einer spezifischen DNA-Sequenz um den Faktor  $10^9$  zu erzeugen. Das PCR-Verfahren wird auch von Saiki et al., 1985, Science 230:1350 beschrieben.

**[0004]** Nachweisverfahren, die allgemein bei Standard-PCR-Techniken eingesetzt werden, verwenden eine markierte Sonde mit der amplifizierten DNA in einem Hybridisierungstest. Zum Beispiel offenbaren EP-Veröffentlichung Nr. 237.362 und PCT-Veröffentlichung Nr. 89/11548 Testverfahren, worin die PCR-amplifizierte DNA zunächst auf einem Filter fixiert wird und dann eine spezifische Oligonucleotid-Sonde zugegeben und eine Hybridisierung zugelassen wird. Bevorzugt ist die Sonde markiert, z.B. mit  $^{32}\text{P}$ , Biotin, Meerrettichperoxidase (HRP), etc., um den Nachweis der Hybridisierung zu ermöglichen. Es wurde auch der umgekehrte Fall vorgeschlagen, das heißt, dass die Sonde stattdessen an die Membran gebunden ist und die PCR-amplifizierte Proben-DNA zugegeben wird.

**[0005]** Andere Nachweismethoden schließen die Verwendung von Fragmentlängen-Polymorphismus (PCR-FLP), Hybridisierung mit Allel-spezifischen Oligonucleotid (ASO)-Sonden (Saiki et al., 1986, Nature 324:163) oder direkte Sequenzierung mittels des Didesoxy-Verfahrens unter Verwendung von amplifizierter DNA anstatt von clonierter DNA ein. Bei der Standard-PCR-Technik wird im Wesentlichen mit der Replikation einer DNA-Sequenz, die zwischen zwei Primern liegt, gearbeitet, woraus man als Hauptprodukt der Reaktion eine DNA-Sequenz von bestimmter Länge, begrenzt von dem Primer am 5'-Ende jedes Stranges, erhält. Auf diese Weise ergeben Insertionen und Deletionen zwischen den Primern Produktsequenzen verschiedenener Längen, die durch eine Größenbestimmung des Produktes mittels PCR-FLP nachgewiesen werden können. In einem Beispiel einer ASO-Hybridisierung wird die amplifizierte DNA auf einem Nylonfilter in einer Reihe von „Dot Blots“ fixiert (z.B. durch UV-Bestrahlung), dann wird Hybridisierung mit einer Oligonucleotidsonde, die unter stringenten Bedingungen mit HRP markiert ist, ermöglicht. Nach dem Waschen werden Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid zugegeben: HRP katalysiert die Wasserstoffperoxid-Oxidation von TMB zu einem löslichen blauen Farbstoff, der ausgefällt werden kann und die hybridisierte Sonde anzeigt.

**[0006]** Während die PCR-Technik, wie sie gegenwärtig praktiziert wird, ein außerordentlich wirkungsvolles Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuresequenzen darstellt, erfordert der Nachweis des amplifizierten Materials zusätzliche Manipulation und nachträgliche Behandlung der PCR-Produkte um festzustellen, ob die Ziel-DNA vorhanden ist. Es wäre wünschenswert, die Anzahl der nachträglichen Behandlungsschritte, die gegenwärtig zum Nachweis des amplifizierten Materials erforderlich sind, zu verringern. Ein „homogenes“ Testsystem, das heißt, eines, das ein Signal sendet, während die Ziel-DNA amplifiziert wird, und damit minimale Behandlung nach der Amplifikation erfordert, wäre ideal.

**[0007]** Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Unterscheidung von Sequenzvarianten einer Ziel-Nucleinsäuresequenz in einer Probe bereit, wobei das Verfahren die wie in Anspruch 1 definierten Schritte umfasst.

[0008] Dieses Verfahren ist besonders für die Analyse von Nucleinsäure geeignet, die mit PCR amplifiziert wurde. Dieses Verfahren ist eine Verbesserung von bekannten PCR-Nachweisverfahren, weil es sowohl die Amplifikation eines Zieles, als auch die Freisetzung einer Markierung zum Nachweis in einem Reaktionssystem zusammen führt, ohne auf zahlreiche Behandlungsschritte des amplifizierten Produktes zurückgreifen zu müssen. So wird in einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ein Polymerasen-Kettenreaktion-Amplifikationsverfahren zur Unterscheidung von Sequenzvarianten einer Ziel-Nucleinsäuresequenz in einer Probe bereit gestellt. Dieses Verfahren umfasst die in Anspruch 10 definierten Schritte.

[0009] [Fig. 1](#) ist ein Autoradiogramm einer DEAE-Cellulose-Dünnschichtchromatographie (TLC)-Platte, das die Freisetzung markierter Fragmente von der gespaltenen Sonde zeigt.

[0010] [Fig. 2](#) ist ein Autoradiogramm einer DEAE-Cellulose-DC-Platte, das die Thermostabilität der markierten Sonde zeigt.

[0011] [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) sind Autoradiogramme von DEAE-Cellulose-DC-Platten, die zeigen, dass die Menge des freigesetzten markierten Sondenfragments mit der Zunahme der PCR-Zyklenzahl und der Anfangskonzentration von Matrizen-DNA korreliert.

[0012] [Fig. 4](#) zeigt die polymerisationsunabhängige 5' zu 3'-Nuclease-Aktivität von Tag-DNA-Polymerase, die im Autoradiogramm gezeigt wird, unter Verwendung von Primern, die sich 0 bis 20 Nucleotide stromaufwärts der Sonde anlagern.

[0013] [Fig. 5](#) ist ein Autoradiogramm, das die Freisetzung von markierten Sondenfragmenten unter ansteigenden Inkubationstemperaturen und -zeiten zeigt, wobei die Zusammensetzung am 5'-Ende der Sonde GC-reich ist.

[0014] [Fig. 6](#) ist ein Autoradiogramm, das die Freisetzung von markierten Sondenfragmenten unter ansteigenden Inkubationstemperaturen und -zeiten zeigt, wobei die Zusammensetzung am 5'-Ende der Sonde AT-reich ist.

[0015] [Fig. 7](#) zeigt eine Analyse mittels 5 %-Acrylamid-Gelelektrophorese eines 142 Basenpaare umfassenden HIV-Produktes, das in Anwesenheit oder Abwesenheit einer markierten Sonde amplifiziert wurde.

[0016] [Fig. 8](#) ist eine Zusammenstellung zweier Autoradiogramme von DC-Analysen von Aliquots von PCR-Amplifikationsprodukten, die zeigt, dass eine Freisetzung der Radiomarkierung auftritt, die in der Menge sowohl mit Erhöhung der Start-Matrize, als auch mit längeren The mozyklen zunimmt.

[0017] [Fig. 9](#) ist ein Schema für eine Reaktion, in der ein NHS-aktives Esterderivat von Biotin zu dem 3'-Amin einer Oligonucleotidsonde gegeben wird.

[0018] [Fig. 10](#) ist ein Schema für eine Reaktion, in der ein Biotinhydrazid verwendet wird, um eine Oligonucleotidsonde, die ein 3'-Ribonucleotid aufweist, zu markieren.

[0019] [Fig. 11](#) ist ein Schema zur Markierung einer Oligonucleotidsonde mit Biotin unter Verwendung eines Biotinphosphoramidits.

[0020] [Fig. 12](#) zeigt ein Reagens zur Markierung von Oligonucleotidsonden mit Biotin.

[0021] [Fig. 13](#) zeigt eine Oligonucleotidsonde, die mit Rhodamin-X-590 und Kristallviolett markiert ist.

[0022] [Fig. 14](#) zeigt ein Schema für eine Reaktion, um ein aktives Acylazid von Kristallviolett zu erzeugen.

[0023] [Fig. 15](#) zeigt ein Schema für eine Reaktion, um ein Amin an ein Thymidin zur Verwendung bei der Bindung einer Markierung an eine Oligonucleotidsonde anzufügen.

[0024] [Fig. 16](#) zeigt typische Ergebnisse und die Beziehung von Signal zu Anzahl der anfänglichen Zielsequenzen für das vorliegende Verfahren unter Verwendung von Bakerbond™ PEI-Festphasen-Extraktionsmittel.

[0025] Der hierin verwendete B griff „Probe“ bezieht sich auf eine beliebige Substanz, die Nucleinsäure ent-

hält oder vermutlich enthält, und umfasst eine Probe von Gewebe oder Flüssigkeit, die von einem Individuum oder von Individuen isoliert wurde, einschließlich, aber nicht begrenzt auf zum Beispiel Haut, Plasma, Serum, Hirnflüssigkeit, Lympheflüssigkeit, Gelenkflüssigkeit, Urin, Tränen, Blutzellen, Organe, Tumoren und auch Proben von in vitro-Zellkulturbestandteilen (einschließlich, aber nicht begrenzt auf ein konditioniertes Medium, erhalten durch das Wachstum von Zellen in Zellkulturmedium, von rekombinanten Zellen und Zellbestandteilen).

**[0026]** Die hierin verwendeten Begriffe „Nucleinsäure“, „Polynucleotid“ und „Oligonucleotid“ beziehen sich auf Primer, Sonden, Oligomerfragmente, die nachzuweisen sind, Oligomerkontrollen und unmarkierte blockierende Oligomere und allgemein auf Polydesoxyribonucleotide (enthaltend 2-Desoxy-D-Ribose), auf Polyribonucleotide (enthaltend D-Ribose) und auf jeden anderen Typ von Polynucleotid, das ein N-Glycosid einer Purin- oder Pyrimidinbase oder von modifizierten Purin- oder Pyrimidinbasen ist. Es nicht beabsichtigt mit den Begriffen „Nucleinsäure“, „Polynucleotid“ und „Oligonucleotid“ Längenunterschiede zu bezeichnen, und diese Begriffe werden untereinander austauschbar verwendet. Diese Begriffe beziehen sich nur auf die Primärstruktur der Moleküle. Daher umfassen diese Begriffe sowohl doppel- und einsträngige DNA als auch doppel- und einsträngige RNA. Das Oligonucleotid besteht aus einer Sequenz von etwa mindestens 6 Nucleotiden, bevorzugt aus mindestens etwa 10–12 Nucleotiden und mehr bevorzugt aus mindestens etwa 15–20 Nucleotiden, die einer Region der ausgewählten Nucleotidsequenz entsprechen. „Entsprechen“ bedeutet identisch oder komplementär zu der ausgewählten Sequenz.

**[0027]** Das Oligonucleotid stammt nicht notwendigerweise physisch von einer existierenden oder natürlichen Sequenz ab, sondern kann in jeder Weise erzeugt werden, einschließlich durch chemische Synthese, DNA-Replikation, reverse Transkription oder eine Kombination hieraus. Mit den Begriffen „Oligonucleotid“ oder „Nucleinsäure“ ist ein Polynucleotid einer genomischen DNA oder RNA, cDNA semisynthetischen oder synthetischen Ursprungs gemeint, das aufgrund seiner Herkunft oder durch Manipulation: (1) nicht mit dem ganzen oder einem Teil des Polynucleotides, mit dem es natürlicherweise assoziiert ist, assoziiert ist; und/oder (2) an ein Polynucleotid gebunden ist, das ein anderes ist, als das, an das es natürlicherweise gebunden ist; und das (3) nicht in der Natur gefunden wird.

**[0028]** Weil Mononucleotide bei der Bildung von Oligonucleotiden in der Weise reagieren, dass das 5'-Phosphat eines Mononucleotid-Pentoserings mit dem 3'-Sauerstoff seines Nachbarn in einer Richtung über eine Phosphodiester-Bindung verbunden wird, wird ein Ende eines Oligonucleotids als das „5'-Ende“ bezeichnet, wenn sein 5'-Phosphat nicht mit einem 3'-Sauerstoff eines Mononucleotid-Pentoserings verbunden ist, und als „3'-Ende“, wenn sein 3'-Sauerstoff nicht mit einem 5'-Phosphat des folgenden Mononucleotid-Pentoserings verbunden ist. Im vorliegenden Fall gilt, dass die Enden einer Nucleinsäuresequenz, selbst wenn sie innerhalb eines größeren Oligonucleotids liegt, ebenfalls als 3'- und 5'-Enden bezeichnet werden können.

**[0029]** Wenn sich zwei verschiedene, nicht überlappende Oligonucleotide an verschiedene Regionen derselben linearen, komplementären Nucleotidsequenz anlagern, und das 3'-Ende eines Oligonucleotids in die Richtung des 5'-Endes des anderen weist, kann das erste als das „stromaufwärts“ gelegene Oligonucleotid und das folgende als das „stromabwärts“ gelegene Oligonucleotid bezeichnet werden.

**[0030]** Der Begriff „Primer“ kann sich auf mehr als einen Primer beziehen und bezieht sich auf ein Oligonucleotid, das entweder natürlich vorkommt, wie in einem gereinigten Restriktionsverdau, oder synthetisch hergestellt wird, und das in der Lage ist, als Ausgangspunkt der Synthese entlang eines komplementären Stranges zu wirken, wenn es Bedingungen ausgesetzt ist, unter denen die Synthese eines Primer-Verlängerungsproduktes, das komplementär zu einem Nucleinsäurestrang ist, katalysiert wird. Solche Bedingungen umfassen die Anwesenheit von vier verschiedenen Desoxyribonucleosidtriphosphaten und einem die Polymerisation induzierenden Agens wie etwa DNA-Polymerase oder reverse Transkriptase in einem geeigneten Puffer („Puffer“ umfasst Substituenten, die Cofaktoren sind oder die auf den pH-Wert, Ionenstärke etc. wirken) und bei geeigneter Temperatur. Der Primer ist bevorzugt einsträngig zur maximalen Wirksamkeit bei der Amplifikation.

**[0031]** Der hierin verwendete Begriff Komplement einer Nucleinsäuresequenz bezieht sich auf ein Oligonucleotid, das sich in „antiparalleler Assoziation“ befindet, wenn es in der Weise mit der Nucleinsäuresequenz verbunden ist, dass das 5'-Ende der einen Sequenz mit dem 3'-Ende der anderen gepaart ist. Bestimmte Basen, die normalerweise nicht in natürlichen Nucleinsäuren gefunden werden, können in die Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung eingeschlossen werden und umfassen zum Beispiel Inosin und 7-Deazaguanin. Die Komplementarität muss nicht perfekt sein; stabile Doppelstränge können falsche Basenpaarungen oder ungepaarte Basen enthalten. Fachleute auf dem Gebiet der Nucleinsäure-Technologie können Doppelstrangstabilität unter Berücksichtigung einer Reihe von Variablen, zum Beispiel der Länge des Oligonucleotids, der Basenzusammensetzung und der Sequenz des Oligonucleotids, der Ionenstärke und dem Vorkommen von falsch ge-

paarten Basenpaaren, bestimmen.

**[0032]** Stabilität eines Nucleinsäuredoppelstrangs wird durch die Schmelztemperatur, oder „ $T_M$ “, gemessen. Die  $T_M$  eines bestimmten Nucleinsäuredoppelstrangs unter spezifischen Bedingungen ist die Temperatur, bei der sich die Hälfte der Basenpaare getrennt haben.

**[0033]** Der hierin verwendete Begriff „Zielsequenz“ oder „Zielnucleinsäuresequenz“ bezieht sich auf eine Region des Oligonucleotids, die entweder amplifiziert oder nachgewiesen werden soll oder beides. Die Zielsequenz liegt zwischen den beiden Primersequenzen, die für die Amplifikation verwendet werden.

**[0034]** Der hierin verwendete Begriff „Sonde“ bezieht sich auf ein markiertes Oligonucleotid, das mit einer Sequenz in der Zielnucleinsäure eine Doppelstrangstruktur bildet, entsprechend der Komplementarität von mindestens einer Sequenz in der Sonde mit einer Sequenz in der Zielregion. Die Sonde enthält vorzugsweise keine Sequenz, die komplementär zu Sequenz(en) ist, die als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden. Im allgemeinen wird das 3'-Ende der Sonde „blockiert“ sein, um den Einbau der Sonde in ein Primer-Verlängerungsprodukt zu verhindern. „Blockierung“ kann durch die Verwendung von nicht komplementären Basen oder durch Zugabe einer chemischen Einheit wie etwa Biotin oder einer Phosphatgruppe zum 3'-Hydroxyl des letzten Nucleotids erreicht werden, was, abhängig von der verwendeten Einheit, einen doppelten Zweck erfüllen kann, indem es als Markierung für den anschließenden Nachweis oder das Einfangen der an die Markierung gebundenen Nucleinsäure dient. Blockierung kann auch durch das Entfernen der 3'-OH-Gruppe oder durch Verwendung eines Oligonucleotids, dem eine 3'-OH-Gruppe fehlt, wie etwa eines Didesoxynucleotids, erreicht werden.

**[0035]** Der hierin verwendete Begriff „Markierung“ bezieht sich auf jedes Atom oder Molekül, das verwendet werden kann, ein nachweisbares (bevorzugt quantifizierbares) Signal zu erzeugen, und das an eine Nucleinsäure oder ein Protein gebunden werden kann. Markierungen können nachweisbare Signale durch Fluoreszenz, Radioaktivität, Colorimetrie, Gravimetrie, Röntgenstrahl-Diffraktion oder -Absorption, Magnetismus, enzymatische Aktivität und dergleichen liefern.

**[0036]** Die hierin verwendeten Begriffe „5'→3'-Nuclease-Aktivität“ oder „5' zu 3'-Nuclease-Aktivität“ bezieht sich auf die Aktivität einer Matrizen-spezifischen Nucleinsäure-Polymerase, einschließlich entweder einer 5'→3'-Exonuclease-Aktivität, traditionell verbunden mit einigen DNA-Polymerasen, wobei Nucleotide in sequenzieller Art vom 5'-Ende eines Oligonucleotids entfernt werden, (z.B. hat E. coli-DNA-Polymerase I diese Aktivität, während das Klenow-Fragment sie nicht hat), oder einer 5'→3'-Endonuclease-Aktivität, wobei Spaltung bei mehr als einer Phosphodiesterbindung (Nucleotid) vom 5'-Ende auftritt, oder beides.

**[0037]** Der hierin verwendete Begriff „benachbart“ bezieht sich auf die Positionierung des Primers in Bezug auf die Sonde auf ihrem komplementären Strang auf der Matrizen-Nucleinsäure. Der Primer und die Sonde können durch 1 bis etwa 20 Nucleotide, mehr bevorzugt durch etwa 1 bis 10 Nucleotide, getrennt sein oder können direkt aneinander stoßen, wie es für einen Nachweis mit einem polymerisationsunabhängigen Prozess wünschenswert sein kann. Alternativ, zur Anwendung in dem polymerisationsabhängigen Prozess, wenn das vorliegende Verfahren in der PCR-Amplifikation und den hierin beschriebenen Nachweisverfahren angewendet werden, kann die „Nachbarschaft“ irgendwo innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz liegen, irgendwo stromabwärts eines Primers, so dass Primer-Extension die Polymerase so positioniert, dass eine Abspaltung der Sonde eintritt.

**[0038]** Der hierin verwendete Begriff „thermostabile Nucleinsäure-Polymerase“ bezieht sich auf ein Enzym, das im Vergleich zu zum Beispiel Nucleotid-Polymerasen von E. coli relativ stabil gegenüber Hitze ist, und das die Polymerisation von Nucleosidtriphosphaten katalysiert. Allgemein wird das Enzym die Synthese am 3'-Ende des an die Zielsequenz angelagerten Primers initiieren und wird in der 5'-Richtung entlang der Matrize fortfahren, und wenn es eine 5' zu 3'-Nuclease-Aktivität besitzt, hydrolysiert es eine eingeschobene, angelagerte Sonde, um sowohl markierte als auch unmarkierte Sondenfragmente frei zu setzen, bis die Synthese endet. Ein repräsentatives thermostabiles Enzym, das aus *Thermus aquaticus* (Taq) isoliert wird, ist im US-Patent Nr. 4,889,818 beschrieben, und ein Verfahren zu seiner Anwendung in herkömmlicher PCR ist in Saiki et al., 1988, Science 239:487 beschrieben.

**[0039]** Taq-DNA-Polymerase hat eine von der DNA-Synthese abhängige, Strang ersetzende 5'-3'-Exonuclease-Aktivität (vgl. Gelfand, „Taq DNA Polymerase“ in PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich, Hrsg., Stockton Press, N.Y. (1989), Kapitel 2). In Lösung findet, wenn überhaupt, geringer Abbau von markierten Oligonucleotiden statt.

**[0040]** Bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung werden, soweit nicht anders angegeben, herkömmliche Techniken der Molekularbiologie, Mikrobiologie und rekombinante DNA-Techniken eingesetzt, die in der Fachwelt verwendet werden. Diese Techniken sind in der Literatur vollständig beschrieben. Vgl. z.B. Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage (1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, Hrsg., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Harnes & S.J. Higgins, Hrsg., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal, 1984); und eine Reihe, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.). Alle hierin sowohl vorstehend als auch nachstehend erwähnten Patente, Patentanmeldungen und Veröffentlichungen werden hiermit durch Bezugnahme eingeschlossen.

**[0041]** Die verschiedenen Aspekte der Erfindung beruhen auf einer speziellen Fähigkeit der Nucleinsäure-Polymerasen. Nucleinsäure-Polymerasen können mehrere Aktivitäten besitzen, darunter eine 5' zu 3'-Nuclease-Aktivität, wobei die Nucleinsäure-Polymerase Mononucleotide oder kleine Oligonucleotide von einem Oligonucleotid, das an sein größeres, komplementäres Polynucleotid angelagert ist, abspalten kann. Soll die Abspaltung wirksam verlaufen, muss ein stromaufwärts gelegenes Oligonucleotid ebenfalls an dasselbe, größere Polynucleotid angelagert sein.

**[0042]** Das 3'-Ende dieses stromaufwärts gerichteten Oligonucleotids liefert die Ausgangsbindungsstelle für die Nucleinsäure-Polymerase. Sobald die gebundene Polymerase auf das 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligonucleotids trifft, kann die Polymerase Mononucleotide oder kleine Oligonucleotide davon abspalten.

**[0043]** Die beiden Oligonucleotide können so hergestellt werden, dass sie sich in enger Nachbarschaft an der komplementären Zielnucleinsäure anlagern, so dass die Bindung der Nucleinsäure-Polymerase am 3'-Ende des stromaufwärts gelegenen Oligonucleotids sie automatisch mit dem 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligonucleotids in Kontakt bringt. Da Polymerisation nicht erforderlich ist, um die Nucleinsäure-Polymerase zur Durchführung der Abspaltung in Position zu bringen, wird dieser Prozess „polymerisationsunabhängige Abspaltung“ genannt.

**[0044]** Alternativ, wenn sich die beiden Oligonucleotide an weiter auseinander liegenden Regionen auf der Matrize der Zielnucleinsäure anlagern, muss eine Polymerisation erfolgen, bevor die Nucleinsäure-Polymerase das 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligonucleotids erreicht. Wenn die Polymerisation fortschreitet, spaltet die Polymerase kontinuierlich Mononucleotide oder kleine Oligonucleotide vom 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligonucleotids ab. Diese Abspaltung setzt sich so lange fort, bis der Rest des stromabwärts gelegenen Oligonucleotids in solchem Ausmaß destabilisiert worden ist, dass es vom Matrizenmolekül abdissoziiert. Dieser Prozess wird „polymerisationsabhängige Spaltung“ genannt.

**[0045]** In der vorliegenden Erfindung ist an dem stromabwärts gelegenen Oligonucleotid ein Marker angebracht. Auf diese Weise können die abgespaltenen Mononucleotide oder kleinen Oligonucleotide, die von der 5' zu 3'-Nuclease-Aktivität der Polymerase abgespalten werden, nachgewiesen werden.

**[0046]** Anschließend kann jede der zahlreichen Strategien eingesetzt werden, um die nicht abgespaltenen markierten Oligonucleotide von den abgespaltenen Fragmenten derselben zu unterscheiden. Auf diese Weise ermöglicht die vorliegende Erfindung die Identifizierung jener Nucleinsäureproben, die Sequenzen enthalten, die zu den stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Nucleotiden komplementär sind.

**[0047]** Die vorliegende Erfindung nutzt diese 5' zu 3'-Nuclease-Aktivität der Polymerase, wenn sie in Verbindung mit der PCR verwendet wird. Dies unterscheidet sich von zuvor beschriebenen PCR-Amplifikation, worin die Post-PCR amplifizierten Ziel-Oligonucleotide nachgewiesen werden, zum Beispiel durch Hybridisierung mit einer Sonde, die bei stringenten bis moderat stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen einen stabilen Doppelstrang mit jenem der Zielsequenz bilden. Im Gegensatz zu jenen bekannten Nachweisverfahren, die nach PCR-Amplifikationen verwendet werden, erlaubt die vorliegende Erfindung den Nachweis von Zielnucleinsäuresequenzen während der Amplifikation dieser Zielnucleinsäure. In der vorliegenden Erfindung wird ein markiertes Oligonucleotid zusammen mit dem Primer zu Beginn der PCR zugegeben, und das Signal, das von der Hydrolyse des markierten Nucleotids/der markierten Nucleotide der Sonde erzeugt wird, liefert ein Mittel zum Nachweis der Zielsequenz während der Amplifikation.

**[0048]** Die vorliegende Erfindung ist jedoch kompatibel mit anderen Amplifikationssystemen, etwa dem Transkriptions-Amplifikationssystem, in dem einer der Primer einen Promotor codiert, der dazu benutzt wird, RNA-Kopien der Zielsequenz zu erstellen. In ähnlicher Weise kann die vorliegende Erfindung in einem selbst-unterstützenden Sequenzreplikations-(3SR)System verwendet werden, in dem eine Reihe von Enzymen eingesetzt werden, um RNA-Transkripte herzustellen, die dann zur Erstellung von DNA-Kopien verwendet wer-

den, alles bei einer einzigen Temperatur. Durch Einbau einer Polymerase mit 5'→3'-Exonuclease-Aktivität in ein Ligase-Kettenreaktions-(LCR-)System zusammen mit geeigneten Oligonucleotiden kann man die vorliegende Erfindung auch zum Nachweis von LCR-Produkten einsetzen.

**[0049]** Natürlich kann die vorliegende Erfindung auch bei Systemen eingesetzt werden, die keine Amplifikation beinhalten. Tatsächlich ist es für die vorliegende Erfindung nicht einmal erforderlich, dass eine Polymerisation erfolgt. Ein Vorteil des polymerisationsunabhängigen Prozesses liegt darin, dass eine Amplifikation der Zielsequenz nicht länger notwendig ist. In Abwesenheit von Primerverlängerung ist die Zielnucleinsäure im Wesentlichen einsträngig. Vorausgesetzt, der Primer und das markierte Oligonucleotid sind benachbart an die Zielnucleinsäure gebunden, können sequenzielle Runden von Oligonucleotidanlagerung und Abspaltung von markierten Fragmenten auftreten. Auf diese Weise kann eine ausreichende Menge an markierten Fragmenten erzeugt werden, die den Nachweis ohne Polymerisation möglich macht. Das während der PCR-Amplifikation erzeugte Signal könnte mit Hilfe dieser polymerisationsunabhängigen Aktivität verstärkt werden, was Fachleute schätzen würden.

**[0050]** In jedem hier beschriebenen Prozess wird eine Probe verwendet, bei der die Vermutung besteht, dass sie die bestimmte Oligonucleotidsequenz von Interesse, die „Zielnucleinsäure“ enthält. Die in der Probe enthaltene Zielnucleinsäure kann zunächst, falls erforderlich, durch reverse Transkription in cDNA transkribiert werden, und dann unter Verwendung eines geeigneten Denaturierungsverfahrens, einschließlich physikalischer, chemischer oder enzymatischer Mittel, die Fachleuten bekannt sind, denaturiert werden. Ein bevorzugtes physikalisches Mittel zu Strangtrennung ist die Erhitzung der Nucleinsäure, bis sie vollständig (> 99 %) denaturiert ist. Typische Denaturierung durch Hitze erfordert Temperaturen im Bereich von etwa 80°C bis etwa 105°C in einem Zeitraum von einigen Sekunden bis zu Minuten. Als eine Alternative zur Denaturierung kann die Zielnucleinsäure in einsträngiger Form in der Probe vorliegen, wie etwa zum Beispiel bei einzelsträngigen RNA- oder DNA-Viren.

**[0051]** Die denaturierten Nucleinsäurestränge werden dann mit zuvor ausgewählten Oligonucleotid-Primern und markiertem Oligonucleotid (hierin auch als „Sonde“ bezeichnet) unter Hybridisierungsbedingungen, Bedingungen, die die Bindung von Primern und Sonden an die einfachen Nucleinsäurestränge erlauben, inkubiert. Wie in der Fachwelt bekannt, werden die Primer so ausgewählt, dass ihre relativen Positionen entlang des Doppelstrangs derart sind, dass ein von dem einen Primer synthetisiertes Verlängerungsprodukt nach Trennung des Verlängerungsproduktes von seiner Matrize (Komplement) als eine Matrize für die Verlängerung des anderen Primers dient, um eine Replikationskette von definierter Länge zu erhalten.

**[0052]** Weil die komplementären Stränge länger als entweder die Sonde oder die Primer sind, haben die Stränge mehr Kontaktpunkte und daher eine größere Chance, einander innerhalb jedes gegebenen Zeitraums zu finden. Ein hoher molarer Überschuss von Sonde plus Primer trägt dazu bei, das Gleichgewicht zugunsten der Anlagerung von Sonde und Primer anstatt zugunsten einer Wiederauslagerung der Matrizen zu verschieben.

**[0053]** Der Primer muss von ausreichender Länge sein, um die Synthese von Verlängerungsprodukten in Anwesenheit des Polymerisationsmittels in Gang zu setzen. Die genaue Länge und Zusammensetzung des Primers wird von zahlreichen Faktoren abhängen, einschließlich der Temperatur der Anlagerungsreaktion, Herkunft und Zusammensetzung des Primers, Nähe der Sonden-Anlagerungsstelle zu der Primer-Anlagerungsstelle und das Verhältnis der Konzentration Primer: Sonde. Zum Beispiel enthält das Primeroligonucleotid, abhängig von der Komplexität der Zielsequenz, typischerweise etwa 15–30 Nucleotide, obwohl ein Primer auch aus mehr oder weniger Nucleotiden bestehen kann. Die Primer müssen ausreichend komplementär sein, um sich selektiv an ihre entsprechenden Stränge anzulagern und stabile Doppelstränge zu bilden.

**[0054]** Die hierin verwendeten Primer sind so ausgewählt, dass sie „im Wesentlichen“ komplementär zu den verschiedenen Strängen jeder spezifischen, zu amplifizierenden Sequenz sind. Die Primer müssen nicht die exakte Sequenz der Matrize widerspiegeln, sie müssen aber ausreichend komplementär sein, um selektiv mit ihren entsprechenden Strängen zu hybridisieren. Nicht komplementäre Basen oder längere Sequenzen können innerhalb des Primers verteilt oder an den Enden des Primers lokalisiert sein, vorausgesetzt, der Primer behält ausreichende Komplementarität mit einem Matrizenstrang, um mit ihm einen stabilen Doppelstrang zu bilden. Die nicht komplementären Nucleotidsequenzen der Primer können Restriktionsenzymstellen enthalten.

**[0055]** Bei der Durchführung der Erfindung muss das markierte Sondenoligonucleotid zuerst an eine komplementäre Nucleinsäure angelagert werden, bevor die Nucleinsäure-Polymerase diese Doppelstrangregion erreicht und damit der 5' zu 3'-Nuclease-Aktivität erlaubt, markierte Oligonucleotidfragmente abzuspalten und frei

zu setzen.

**[0056]** Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass das markierte Oligonucleotid sich an eine komplementäre Nucleinsäure angelagert hat, bevor die Primer-Verlängerungspolymerisation diese Doppelstrangregion erreicht, oder bevor die Polymerase im polymerisationsunabhängigen Prozess an das stromaufwärts gelegene Oligonucleotid bindet, können eine Reihe von Techniken angewendet werden. Bei dem polymerisationsabhängigen Prozess kann man die Sonde so positionieren, dass das 5'-Ende der Sonde relativ weit vom 3'-Ende des Primers entfernt liegt, womit der Sonde mehr Zeit gegeben wird, sich anzulagern, bevor die Primerverlängerung die Sondenbindungsstelle blockiert. Kurze Primermoleküle erfordern allgemein niedrigere Temperaturen, um ausreichend stabile Hybridkomplexe mit der Zielnucleinsäure zu bilden. Daher kann das markierte Oligonucleotid so gestaltet werden, dass es länger als der Primer ist, sodass das markierte Oligonucleotid sich bevorzugt bei relativ zur Primeranlagerung höheren Temperaturen an die Zielsequenz anlagert.

**[0057]** Man kann auch Primer und markierte Oligonucleotide verwenden, die eine unterschiedliche Hitzestabilität aufweisen. Zum Beispiel kann die Nucleotidzusammensetzung des markierten Oligonucleotids so gewählt werden, dass sie einen höheren C/G-Gehalt, und damit folglich eine größere Hitzestabilität als der Primer aufweist. In ähnlicher Weise kann man modifizierte Nucleotide in die Sonde einbringen, wobei diese modifizierten Nucleotide Basenanaloga enthalten, die stabilere Basenpaare bilden als die Basen, die typischerweise in natürlich vorkommenden Nucleinsäuren vorkommen.

**[0058]** Modifizierungen der Sonde, die Sondenbindung vor Primerbindung erleichtern sollen, um die Wirksamkeit des vorliegenden Tests zu maximieren, umfassen den Einbau von positiv geladenen oder neutralen Phosphodiesterbindungen in die Sonde, um die Abstoßung des polyanionischen Rückgrats von Probe und Ziel zu vermindern (vgl. Letsinger et al., 1988, J. Amer. Chem. Soc. 110:4470); den Einbau von alkylierten oder halogenierten Basen wie etwa 5-Bromuridin in die Sonde, um Basenstapelung zu erhöhen; den Einbau von Ribonucleotiden in die Sonde, um den Sonde:Zieldoppelstrang in eine „A“-Struktur zu zwingen, die erhöhte Basenstapelung aufweist; und die Substitution einiger oder aller Adenosine der Sonde durch 2,6-Diaminopurin (Aminoadenosin). Bei der Herstellung solcher modifizierter Sonden der Erfindung sollte man zur Kenntnis nehmen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Doppelstrangbildung die „Nucleation“ ist, die Bildung eines einzelnen Basenpaares, und daher kann die Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften eines Abschnitts der Sonde, zum Beispiel nur des 3'- oder 5'-Endabschnitts, ausreichen, das gewünschte Ergebnis zu erlangen. Da zusätzlich der 3'-Endabschnitt der Sonde (die 3'-endständigen 8 bis 12 Nucleotide) nach dem Exonucleaseabbau des 5'-Endes durch die Polymerase abdissoziiert, können zusätzlich Modifikationen des 3'-Endes ohne Beachtung einer Wechselwirkung mit Polymerase/Nuclease-Aktivität vorgenommen werden.

**[0059]** Die Parameter der Thermozyklen können gleichfalls so verändert werden, dass die unterschiedliche Thermostabilität von dem markierten Oligonucleotid und Primer genutzt werden können. Zum Beispiel kann nach dem Denaturierungsschritt im Thermozyklus eine intermediäre Temperatur eingeführt werden, die die Bindung von markiertem Oligonucleotid, nicht aber des Primers erlaubt, und dann wird die Temperatur weiter gesenkt, um Primeranlagerung und -verlängerung zu ermöglichen. Man sollte jedoch beachten, dass für befriedigende Ergebnisse Sondenspaltung nur in späteren Zyklen des PCR-Prozesses erforderlich ist. Daher kann man das Reaktionsgemisch in der Weise ansetzen, dass, selbst wenn sich anfangs bevorzugt die Primer an die Sonden binden, die Primerkonzentration durch die Primerverlängerung so reduziert wird, dass in späteren Zyklen bevorzugt die Sonden an die Primer binden.

**[0060]** Um Bindung des markierten Oligonucleotids vor dem Primer zu begünstigen, kann auch ein hoher molarer Überschuss von markiertem Oligonucleotid gegenüber der Primerkonzentration verwendet werden. In dieser Ausführungsform sind die Konzentrationen markierter Oligonucleotide typischerweise im Bereich von etwa 2 bis 20 Mal höher als die entsprechende Primerkonzentration, die allgemein  $0,5\text{--}5 \times 10^{-7}$  M beträgt. Fachleute erkennen, dass Oligonucleotidkonzentration, -länge und – basenzusammensetzung alles wichtige Faktoren sind, die die  $T_m$  jedes einzelnen Oligonucleotids in einem Reaktionsgemisch beeinflussen. Jeder einzelne dieser Faktoren kann verändert werden, um eine thermodynamische Richtung zur Begünstigung von Sondenanlagerung gegenüber Primeranlagerung zu erzeugen.

**[0061]** Die Primer-Oligonucleotide und markierten Oligonucleotide können durch jedes geeignete Verfahren hergestellt werden. Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotiden mit bestimmter Sequenz sind in der Fachwelt bekannt und umfassen zum Beispiel Clonierung und Restriktion von geeigneten Sequenzen und direkte chemische Synthese. Verfahren chemischer Synthese können zum Beispiel das Phosphotriester-Verfahren, beschrieben von Narang et al., 1979, Methods in Enzymology 68:90, das Phosphodiester-Verfahren, veröffentlicht von Brown et al., 1979, Methods in Enzymology 68:109, das Diethylphosphoramidat-Verfahren, veröffent-

licht von Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Letters 22:1859, und das Festträger-Verfahren, offengelegt im US-Patent Nr. 4.458.066, einschließen.

**[0062]** Die Zusammensetzung des markierten Oligonucleotids kann so gewählt werden, dass Nucleaseaktivität vor Strangabspaltung (Mono- und Dinucleotidfragmente vor Oligonucleotiden) mit Hilfe der Auswahl von Sequenzen, die GC-reich sind, oder die sequenzielle As und Ts vermeiden und durch die Wahl der Position der Markierung in der Sonde begünstigt wird. Bei der Anwesenheit von AT-reichen Sequenzen in der 5'-komplementären Sondenregion tritt Spaltung etwa nach dem vierten, fünften oder sechsten Nucleotid auf. In einer GC-reichen 5'-komplementären Sondenregion tritt die Spaltung jedoch im Allgemeinen nach dem ersten oder zweiten Nucleotid auf. Alternativ kann der Einbau von modifizierten Phosphodiester-Bindungen (z.B. Phosphorothioat oder Methylphosphonate) in die markierte Sonde während der chemischen Synthese (Noble et al., 1984, Nuc. Acids Res. 12:3387–3403; Iyer et al., 1990, J. Am. Chem. Soc. 112:1253–1254) verwendet werden, um Spaltung an einer bestimmten Stelle zu verhindern. Abhängig von der Länge der Sonde, der Zusammensetzung des komplementären 5'-Bereichs der Sonde und der Position der Markers, kann man eine Sonde herstellen, um bevorzugt die Erzeugung von kurzen oder langen markierten Sondenfragmenten zur Verwendung bei der Durchführung der Erfindung zu begünstigen.

**[0063]** Wie nachfolgend beschrieben, ist das Oligonucleotid durch den Einbau von Einheiten markiert, die durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische oder chemische Methoden nachweisbar sind. Das Verfahren zur Bindung oder Konjugation der Marker an das Sondenoligonucleotid hängt natürlich von der Art der/des verwendeten Markers) und der Position des Markers in der Sonde ab.

**[0064]** Es sind eine Vielzahl von Markern, die zur Verwendung in der Erfindung geeignet sind, sowie Verfahren zu ihrem Einbau in der Fachwelt bekannt und umfassen, sind aber nicht auf diese beschränkt, Enzyme (z.B. alkalische Phosphatase und Meerrettichperoxidase) und Enzymsubstrate, radioaktive Atome, fluoreszierende Farbstoffe, Chromophoren, chemolumineszierende Markierungen, elektrochemolumineszierende Markierungen, wie etwa Origen™ (Igen), Liganden, die spezifische Bindungspartner haben, oder alle anderen Markierungen, die miteinander agieren können, um ein Signal zu verstärken, zu ändern oder auszulöschen. Wenn die PCR in einem Thermocycler durchgeführt wird, sollte der Marker die für diesen automatisierten Prozess erforderlichen Temperaturzyklen überstehen können.

**[0065]** Unter den radioaktiven Atomen wird  $^{32}\text{P}$  bevorzugt. Verfahren zum Einbau von  $^{32}\text{P}$  in Nucleinsäuren sind in der Fachwelt bekannt und umfassen zum Beispiel 5'-Markierung mit einer Kinase oder Zufallsinsertion durch Nick-Translation. Enzyme werden typischerweise durch ihre Aktivität nachgewiesen. „Spezifischer Bindungspartner“ bezieht sich auf ein Protein, das ein Ligandenmolekül mit hoher Spezifität binden kann, wie zum Beispiel in dem Fall eines Antigens und eines dafür spezifischen monoclonalen Antikörpers. Andere spezifische Bindungspartner umfassen Biotin und Avidin oder Streptavidin, IgG und Protein A und die zahlreichen in der Fachwelt bekannten Rezeptor-Ligand-Paare. Die vorstehende Beschreibung soll nicht dazu dienen, die verschiedenen Markierungen in bestimmte Klassen einzuordnen, denn die selbe Markierung kann auf mehrere unterschiedliche Weisen eingesetzt werden. Zum Beispiel kann  $^{125}\text{I}$  als radioaktive Markierung oder als elektronendichtes Reagens dienen. HRP kann als Enzym oder als Antigen für monoclonale Antikörper dienen. Darüber hinaus kann man verschiedene Markierungen für den gewünschten Effekt kombinieren. Zum Beispiel könnte man eine Sonde mit Biotin markieren und die Anwesenheit der Sonde durch mit  $^{125}\text{I}$  markiertes Avidin nachweisen oder mit einem monoclonalen Anti-Biotin-Antikörper, der mit HRP markiert ist. Andere Permutationen und Möglichkeiten werden Fachleuten auf diesem Gebiet sofort offensichtlich sein und werden als Äquivalente innerhalb des Rahmens der vorliegenden Erfindung angesehen.

**[0066]** Fluorophore zum Gebrauch als Markierungen bei der Konstruktion markierter Sonden der Erfindung umfassen Rhodamin und Derivate wie etwa Texas Red, Fluorescein und Derivate, wie etwa 5-Bromomethylfluorescein, Lucifer Yellow, IAEDANS, 7-Me<sub>2</sub>N-cumarin-4-acetat, 7-OH-4-CH<sub>3</sub>-cumarin-3-acetat, 7-NH<sub>2</sub>-4-CH<sub>3</sub>-cumarin-3-acetat (AMCA), Monobrombiman, Pyrentrisulfonate wie etwa Cascade Blue und Monobromtrimethylammoniumbiman. Im Allgemeinen werden Fluorophore mit großen Stokes-Verschiebungen bevorzugt, um sowohl den Einsatz von Fluorimetern mit Filtern, als auch eines Monochromometers zu erlauben, und um die Wirksamkeit des Nachweises zu steigern.

**[0067]** In einigen Situationen kann man zwei interaktive Markierungen auf einem einzelnen Oligonucleotid verwenden, wobei man auf, einen geeigneten Abstand zwischen den Markierungen auf dem Oligonucleotid achten sollte, um die Trennung der Markierungen während der Hydrolyse des Oligonucleotids zu gestatten. Rhodamin und Kristallviolett sind bevorzugte interaktive Markierungen.

**[0068]** In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann der Nachweis der hydrolysierten, markierten Sonde durchgeführt werden, indem man zum Beispiel Fluoreszenzpolarisierung verwendet, ein auf molekularer Rotationstechnik beruhendes Verfahren, um zwischen großen und kleinen Molekülen zu unterscheiden. Große Moleküle (z.B. intakte markierte Sonden) rotieren in Lösung weit langsamer als kleine Moleküle. Auf Grund der Bindung einer fluoreszierenden Einheit an das interessierende Molekül (z.B. das 5'-Ende einer markierten Sonde) kann diese fluoreszierende Einheit, basierend auf der molekularen Rotationstechnik, gemessen (und unterschieden) werden, womit zwischen intakter und gespaltener Sonde unterschieden wird. Der Nachweis kann direkt während der PCR gemessen werden, oder er kann nach der PCR durchgeführt werden.

**[0069]** In noch einer anderen Ausführungsform werden zwei markierte Oligonucleotide verwendet, jedes komplementär zu unterschiedlichen Regionen auf unterschiedlichen Strängen einer doppelsträngigen Zielregion, aber nicht zu einander, so dass ein Oligonucleotid sich stromabwärts jedes Primers anlagert. Zum Beispiel kann die Anwesenheit von zwei Sonden potentiell die Intensität des von einer einzelnen Markierung erzeugten Signals verdoppeln und kann außerdem dazu dienen, die Wiederanlagerung des Produktstrangs, die oft während der PCR-Amplifikation auftritt, zu reduzieren. Die Sonden werden so ausgewählt, dass die Sonden an Positionen binden, die jenen Positionen benachbart (stromabwärts) sind, an denen Primer binden.

**[0070]** Man kann die multiplen Sonden der vorliegenden Erfindung auch zum Erreichen anderer Vorteile einsetzen. Zum Beispiel könnte man eine Probe auf jede beliebige Anzahl von Pathogenen einfach dadurch untersuchen, dass man so viele Sonden wie gewünscht zu dem Reaktionsgemisch gibt: jede der Sonden könnte eine andere Markierung tragen, um den Nachweis zu erleichtern.

**[0071]** Man kann auch allelspezifische oder artspezifische (z.B. spezifisch für die verschiedenen Arten von *Borrelia*, dem die Lyme-Krankheit (Borreliose) verursachenden Agens) Unterscheidung mit der Verwendung multipler Sonden der vorliegenden Erfindung erreichen, zum Beispiel durch Verwendung von Sonden, die unterschiedlicher  $T_m$ s haben und die Anlagerungs/Spaltungsreaktion bei einer Temperatur durchführen, die nur für einen Sonde/Allel-Doppelstrang spezifisch ist.

**[0072]** Zum Beispiel kann man ein Primerpaar auswählen, das sowohl HTLVI, als auch HTLVII amplifiziert, und zwei Sonden verwenden, jede eindeutig markiert und entweder für HTLVI oder für HTLVII spezifisch. Man kann allelspezifische Unterscheidung auch dadurch erhalten, dass man nur eine einzige Sonde verwendet und die Arten der erzeugten Spaltungsprodukte untersucht. In dieser Ausführung der Erfindung wird die Sonde so hergestellt, dass sie zumindest in der 5'-terminalen Region exakt komplementär zu einem Allel, nicht aber zu dem/den anderen Allel/en ist. Für die anderen Allele gilt, dass die Sonde sich nicht mit der 5'-terminalen Region der Sonde paaren wird, so dass, verglichen mit dem Spaltungsprodukt, das erzeugt wird, wenn die Sonde an das exakt komplementäre Allel hybridisiert ist, ein unterschiedliches Spaltungsprodukt erzeugt wird.

**[0073]** Obwohl die Sondensequenz so gewählt werden kann, dass man wichtige Eigenschaften erhält, kann man auch durch die Auswahl der Sondenmarkierung(en) wichtige Vorteile erhalten. Die Markierungen können durch eine Reihe von Techniken direkt oder indirekt mit dem Oligonucleotid verbunden werden. Abhängig von dem genauen Typ der verwendeten Markierung, kann die Markierung am 5'- oder 3'-Ende der Sonde gelegen sein, kann im Innern der Sonde gelegen sein oder an Seitenarme von verschiedenen Größen und Zusammensetzungen gebunden sein, um Signal-Interaktionen zu vereinfachen. Mit der Verwendung von käuflich erwerbbaaren Phosphoramidit-Reagenzien kann man Oligomere herstellen, die funktionelle Gruppen (z.B. Thiole oder primäre Amine) entweder am 5'- oder am 3'-Terminus über ein angemessen geschütztes Phosphoamidit enthalten, und man kann sie anhand von Anleitungen markieren, wie sie zum Beispiel in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., Hrsg. Academic Press, Inc. 1990) beschrieben werden.

**[0074]** Verfahren zur Einführung von Reagenzien, die das Oligonucleotid funktionalisieren, um eine oder mehrere Sulfhydryl-, Amino- oder Hydroxyl-Einheiten in die Sequenz des Sondenoligonucleotids, typischerweise am 5'-Terminus, einzuführen, werden im US-Patent Nr. 4,914,210 beschrieben. Eine 5'-Phosphatgruppe kann als ein Radioisotop eingeführt werden, indem man Polynucleotidkinase und Gamma-<sup>32</sup>P-ATP verwendet, um eine nachzuweisende Gruppe zu erhalten. Biotin kann an das 5'-Ende angefügt werden, indem man einen Amino-thymidinrest oder einen 6-Aminohexylrest, die während der Synthese eingefügt wurden, mit einem N-Hydroxysuccinimidester des Biotins reagieren lässt. Für Markierungen am 3'-Terminus kann man Polynucleotid-Terminaltransferase zum Anfügen der gewünschten Einheit verwenden, wie etwa zum Beispiel Cordycepin <sup>35</sup>S-dATP und biotinyliertes dUTP.

**[0075]** Oligonucleotidderivate sind gleichfalls verfügbare Markierungen. Zum Beispiel sind Etheno-dA und Etheno-A bekannte fluoreszierende Adeninnucleotide, die in ein Sondenoligonucleotid eingefügt werden kön-

nen. In ähnlicher Weise sind Etheno-dC oder 2-Aminopurindeoxyribosid andere Analoge, die bei der Sonden-synthese verwendet werden können. Die Sonden, die solche Nucleotidderivate enthalten, können bei der Hydrolyse durch die 5' zu 3'-Nuclease-Aktivität viel stärker fluoreszierende Mononucleotide freisetzen, wenn DNA-Polymerase während der PCR einen Primer verlängert.

**[0076]** Matrizenabhängige Verlängerung des (der) Primer-Oligonucleotid(e) wird durch ein polymerisierendes Agens in der Anwesenheit adäquater Mengen der vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) oder Analoga, wie vorstehend erläutert, in einem Reaktionsmedium, bestehend aus den geeigneten Salzen, Metallkationen und pH-Pufferlösungssystem, katalysiert. Geeignete Polymerisationsmittel sind Enzyme, die dafür bekannt sind, Primer- und matrizenabhängige DNA-Synthese zu katalysieren und die 5'- zu 3'-Nuclease-Aktivität besitzen. Bekannte DNA-Polymerasen umfassen zum Beispiel *E. coli*-DNA-Polymerase I, *Thermus thermophilus* (Tth)-DNA-Polymerase, *Bacillus stearothermophilus*-DNA-Polymerase, *Thermococcus litoralis*-DNA-Polymerase und *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-Polymerase. Die Reaktionsbedingungen für die Katalyse von DNA-Synthese mit diesen DNA-Polymerasen sind in der Fachwelt gut bekannt. Um in der vorliegenden Erfindung von Nutzen zu sein, muss das Polymerisationsmittel das Oligonucleotid wirksam abspalten und markierte Fragmente freisetzen, so dass das Signal direkt oder indirekt erzeugt wird.

**[0077]** Die Produkte der Synthese sind Doppelstrangmoleküle, die aus den Matrizensträngen und den Primerverlängerungssträngen bestehen, die die Zielsequenz einschließen. Nebenprodukte dieser Synthese sind markierte Oligonucleotidfragmente, die aus einem Gemisch aus Mono-, Di- und größeren Nucleotidfragmenten bestehen. Wiederholte Denaturierungszyklen, Anlagerung von markiertem Oligonucleotid und Primer und Primerverlängerung und Abspaltung des markierten Oligonucleotids münden in der exponentiellen Anreicherung der Zielregion, die durch die Primer und die exponentielle Erzeugung von markierten Fragmenten definiert ist. Es werden genügend Zyklen durchgeführt, um eine nachweisbare Art von Markierung zu erhalten, die mehrere Größenordnungen größer sein kann als das Hintergrundsignal, obwohl in der allgemeinen Praxis solch hohe Verhältnisse von Signal zu Rauschen nicht immer erreicht werden oder erwünscht sind.

**[0078]** In einem bevorzugten Verfahren wird der PCR-Prozess als ein automatisierter Prozess durchgeführt, der ein thermostabiles Enzym verwendet. In diesem Prozess durchläuft das Reaktionsgemisch in Zyklen einen Denaturierungsschritt, einen Sonden- und Primer-Anlagerungsschritt und einen Syntheseschritt, wobei Spaltung und Entfernung gleichzeitig mit Primer-abhängiger Matrizenverlängerung auftritt. Es kann ein DNA-Thermostzykler, wie etwa das im Handel erhältliche Gerät von Perkin-Elmer Cetus Instruments, das speziell zur Nutzung mit einem thermostabilen Enzym entworfen wurde, verwendet werden.

**[0079]** Temperaturstabile Polymerasen werden in diesem automatisierten Prozess bevorzugt, weil die bevorzugte Art, die doppelsträngigen Verlängerungsprodukte zu denaturieren, darin besteht, sie während des PCR-Zyklus einer hohen Temperatur (etwa 95°C) auszusetzen. Zum Beispiel wird in dem US-Patent Nr. 4,889,818 ein repräsentatives thermostabiles Enzym, das aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde, offengelegt. Weitere repräsentative temperaturstabile Polymerasen umfassen z.B. Polymerasen, die aus den thermostabilen Bakterien *Thermus flavus*, *Thermus ruber*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* (das ein etwas tieferes Temperaturoptimum als die anderen angeführten aufweist), *Thermus lacteus*, *Thermus rubens*, *Thermotoga maritima*, *Thermococcus litoralis* und *Methanothermus fervidus* extrahiert wurden.

**[0080]** Nachweis oder Verifikation der markierten Oligonucleotidfragmente kann mit einer Reihe von Verfahren durchgeführt werden und kann von der Herkunft der verwendeten Markierung oder Markierungen abhängig sein. Eine vorteilhafte Ausführung der Erfindung ist, die Reaktionsprodukte, einschließlich der abgespaltenen markierten Fragmente, einer Größenanalyse zu unterziehen. Verfahren zur Größenbestimmung von markierten Nucleinsäurefragmenten sind in der Fachwelt bekannt und umfassen zum Beispiel Gelelektrophorese, Gradientensedimentation, Gel-Ausschlusschromatographie und Homochromatographie.

**[0081]** Während oder nach der Amplifikation kann die Trennung der markierten Fragmente aus dem PCR-Gemisch durchgeführt werden, zum Beispiel dadurch, dass man das PCR-Gemisch mit einem Festphasen-Extraktionsmittel (SPE) in Kontakt bringt. Zum Beispiel können Materialien mit einer Fähigkeit, Oligonucleotide aufgrund von Größe, Ladung oder Wechselwirkung mit den Oligonucleotidbasen zu binden, dem PCR-Gemisch unter Bedingungen zugegeben werden, bei denen markierte, ungespaltene Oligonucleotide gebunden und kurze, markierte Fragmente nicht gebunden sind. Solche SPE-Materialien umfassen Ionenaustauschharze oder -perlen, wie etwa die im Handel erhältlichen Bindungspartikel Nensorb (DuPont Chemical Co.), Nucleogen (The Nest Group), PEI, BakerBond™ PEI, Amicon PAE 1,000, SelectaceI™ PEI, Boronat SPE mit einer 3'-Ribose-Sonde, SPE, das Sequenzen, die zum 3'-Ende der Sonde komplementäre sind, enthält, und Hydroxylapatit. In einer speziellen Ausführungsform, wenn ein zweifach markiertes Oligonucleotid, das eine durch

eine auf Nuclease ansprechende Spaltungsstelle von einer 5'-Markierung getrennte 3'-Biotin-Markierung enthält, als ein Signal verwendet wird, kann das PCR-amplifizierte Gemisch mit Materialien in Kontakt gebracht werden, die einen spezifischen Bindungspartner wie etwa Avidin oder Streptavidin oder einen Antikörper oder monoclonalen Antikörper für Biotin enthalten. Solche Materialien können mit speziellen Bindungspartnern überzogene Perlen und Partikel umfassen und können auch magnetische Partikel umfassen.

**[0082]** Anschließend an den Schritt, in dem das PCR-Gemisch mit einem SPE in Kontakt gebracht wurde, kann das SPE-Material durch Filtration, Sedimentation oder magnetische Anziehungskraft entfernt werden, wobei die markierten Fragmente frei von ungespaltenen markierten Oligonucleotiden und einem Nachweisverfahren zugänglich zurückgelassen werden.

**[0083]** Reagenzien, die in den Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können in Diagnose-Kits zusammengestellt werden. Diagnose-Kits umfassen die markierten Oligonucleotide und die Primer in getrennten Behältern. Falls das Oligonucleotid nicht markiert ist, können die spezifischen Markierungsreagenzien ebenfalls in dem Kit enthalten sein. Der Kit kann ebenfalls andere geeignet zusammengestellte, für Amplifikation notwendige Reagenzien und Materialien enthalten, zum Beispiel Puffer, dNTPs und/oder Polymerisationsmittel und zum Beispiel Enzyme und Festphasen-Extraktionsmittel für die Nachweisanalyse, sowie Anleitungen zur Durchführung der Untersuchung.

**[0084]** Die nachstehend angeführten Beispiele sind zur Erläuterung der verschiedenen Verfahren und Bestandteile der Erfindung gedacht.

#### Beispiel 1

##### PCR-Freisetzung der Sondenmarkierung

**[0085]** Eine PCR-Amplifikation wurde durchgeführt, die das 5'-<sup>32</sup>P-markierte Ende einer komplementären Sonde freisetzte, wenn ein speziell beabsichtigtes Produkt synthetisiert wurde.

##### A. Markierung der Sonde mit gamma-<sup>32</sup>P-ATP und Polynucleotidkinase.

**[0086]** Zehn pmol jeder Sonde (BW31 BW33, BW35, Sequenzen nachstehend gezeigt) wurden einzeln mit 15 Einheiten T4-Polynucleotidkinase (New England Biolabs) und 15,3 pmol gamma-<sup>32</sup>P-ATP (New England Nuclear, 3000 Ci/mmol) in einem 50 µl Reaktionsvolumen, enthaltend 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM Spermidin und 0,1 mM EDTA, für 60 Minuten bei 37°C gemischt. Das Gesamtvolumen wurde dann mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol ausgefällt, wie von Sambrook et al., Molecular Cloning, zweite Auflage (1989) beschrieben. Die Sonden wurden in 100 µl TE-Pufferlösung resuspendiert und durchliefen eine Sephadex G-50 Spin-Dialysesäule, um das nicht inkorporierte <sup>32</sup>P-ATP zu entfernen, wie von Sambrook et al., vorstehend, gelehrt. Die TCA-Fällung der Reaktionsprodukte zeigte die folgenden spezifischen Aktivitäten:

BW31:  $1,98 \times 10^6$  cpm/pmol

BW33:  $2,54 \times 10^6$  cpm/pmol

BW35:  $1,77 \times 10^6$  cpm/pmol

**[0087]** Die Endkonzentration von allen drei Sonden betrug 0,10 pmol/µl.

##### B. Amplifikation

**[0088]** Die amplifizierte Region war ein Produkt mit 350 Basenpaaren des Bakteriophagen M13mp10w, erhalten mit den Primern BW36 und BW42. Die Region jeder nummerierten Primersequenz, die hierin erwähnt wird, folgt dem standardisierten M13 Nucleotidsequenz-Gebrauch.

SEQ ID NR: 1 BW36 = 5' 5241-5268 3'

5'-CCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGC-3'

SEQ ID NR: 2 BW42 = 5' 5591-5562 3'

5'-GAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGC-3'

**[0089]** Es wurden drei verschiedene Sonden verwendet; alle enthielten die zu M13mp10w exakt komplementäre 30 Basen-Sequenz, unterschieden sich aber in der in der Länge der nicht komplementären 5'-Schwanz-Regionen. Die Sonden wurden synthetisiert, so dass sie ein 3'-PO<sub>4</sub> anstatt eines 3'-OH hatten, um jegliche Verlängerung durch Taq-Polymerase zu blockieren.

SEQ ID NR: 3 BW31 = 5' 5541-5512 3'

5'-\*CGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCX-3'

SEQ ID NR: 4 BW33 = 5' 5541-5512 3'

5'-\*gatCGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGCX-3'

SEQ ID NR: 5 BW35 = 5' 5541-5512 3'

5'-\*cgtcaccgatCGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCgcgcx-3'

X = 3'-Phosphat

a,t,g,c = Basen nicht komplementär zum Matrizenstrang

\* = gamma <sup>32</sup>P-ATP Markierung

**[0090]** Zur Amplifikation des 350-bp-Fragments wurden  $10^{-3}$  pmol der M13mp10w-Zielsequenz zu einem 50 µl Reaktionsvolumen zugegeben, das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, je 10 pmol der Primer BW36 und BW42, 200 µM von jeder der vier Desoxyribonucleosidtriphosphate, 1,25 Einheiten Taq-DNA-Polymerase und entweder 1, 10 oder 20 pmol der Isotopen-verdünnten Sonde BW31. BW33 oder BW35 enthielt. Die Menge der radiomarkierten Sonde wurde konstant auf 0,4 pmol pro Reaktion gehalten und auf 1, 10 oder 20 pmol mit nicht radioaktiver Sonde verdünnt. Taq-Polymerase wurde mit 4 µl pro Reaktion mit 0,3125 U/µl zugegeben und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % NP40, 0,5 % Tween 20 und 500 µg/ml Gelatine verdünnt.

**[0091]** Es wurde ein Stamm-Reaktionsgemisch angesetzt, das ausreichende Mengen Reaktionspuffer, Nucleosidtriphosphate, beide Primer und Enzym enthielt. Aus diesem Stammgemisch wurden Aliquots entnommen, und zu diesen wurden Matrize und verschiedene Konzentrationen jeder Sonde gegeben. Kontrollreaktionen bestanden aus der Zugabe aller Reaktionskomponenten ausgenommen Matrize und aller Reaktionskomponenten ausgenommen Sonde. Jedes Reaktionsgemisch wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet, um Verdunstung zu verhindern, für 45 Sekunden mikrozentrifugiert und dann in einen Thermozykler gestellt. Die Reaktionsgemische wurden dem folgenden Reaktionsschema unterworfen:

15 Zyklen: 96°C Denaturierung, 1 min

60°C Anagerung/Verlängerung, 1,5 min

Ein Zyklus: 96°C Denaturierung, 1 min

60°C Anlagerung/Verlängerung, 5,5 min

**[0092]** Nach Durchlauf der Zyklen wurde das Mineralöl mit 50 µl Chloroform extrahiert, die Gemische wurden bei 4°C gelagert, und die folgenden Untersuchungen wurden durchgeführt.

### C. Analyse

**[0093]** Für die Acrylamidgel-Analyse wurden 4 µl von jeder Amplifikationsreaktion mit 3 µl von 5X Gel-Ladungsgemisch (0,125 % Bromophenol Blue, 12,5 % Ficoll 400 in H<sub>2</sub>O) gemischt und auf ein 4 %iges Acrylamidgel (10 ml 10X TBE-Pufferlösung, 1 ml 10 % Ammoniumpersulfat, 10 ml 40 % Bisacrylamid 19:1, 50 µl TEMED, und 79 ml H<sub>2</sub>O) in 1X TBE Puffer (0,089 M Tris, 0,089 M Borsäure und 2 mM EDTA) gegeben und eine Elektrophorese für 90 Minuten bei 200 Volt ausgeführt. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid wurde die DNA durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht.

**[0094]** Die Ergebnisse zeigten, dass die Anwesenheit keiner dieser drei Sonden in den verschiedenen Konzentrationen einen Einfluss auf die Menge des erzeugten amplifizierten Produkts hatte. Probenbahnen, die keine Sonde enthielten, zeigten diskrete 350-Basenpaar-Banden mit hoher Intensität, die mit der gewünschten Sequenz übereinstimmen. Alle Bahnen, die Sonde enthielten, zeigten das gleiche und zusätzlich ein paar schwache Banden bei leicht höherem Molekulargewicht.

**[0095]** Kontrollbahnen ohne Matrizenzugabe zeigten, wenn überhaupt, keine Banden bei 350 Basen, und nur Banden mit geringerer Intensität, die die Primer bei 30–40 Basen repräsentierten.

**[0096]** Nach fotografischen Aufnahmen wurde das Gel auf Whatman-Papier übertragen, mit Saran Wrap bedeckt und einer Autoradiographie unterzogen. Eine Aufnahme über Nacht zeigte, dass sich 90–95 % der Radiomarkierung nahe des Gelbodens befand, wohin Sondenmaterial oder teilweise abgebautes Sondenmaterial wandern würde.

**[0097]** Für die Analyse mit denaturierendem Gel wurden 2 µl von jeder Amplifikationsreaktion mit 2 µl Formamid-Ladungspuffer (0,2 ml 0,5 M EDTA pH 8, 10 mg Bromophenolblau, 10 mg Xylolcyanol und 10 ml Forma-

mid) gemischt, dann für 3–5 min auf 96°C erhitzt und auf Eis gelegt. Die Proben wurden auf ein 6,2 %iges denaturierendes Gradienten-Polyacrylamidgel (7 M Harnstoff sowohl mit einem Saccharose- als auch einem Puffergradienten) nach dem Verfahren von Sambrook et al., vorstehend, gegeben. Das Gel wurde für 90 Minuten bei 2000 V, 45 W der Elektrophorese ausgesetzt, dann auf Whatman-Papier übertragen und autoradiographiert.

**[0098]** Ergebnisse aus dem denaturierenden Gel zeigten, dass etwa 50 % von jeder Sonde in kleinere markierte Fragmente zerlegt waren. Annähernd 50 %-60 % der Zählimpulse liegen im 30–40 Basen-Bereich, entsprechend nicht abgebauten Sondenmaterial. Eine sehr schwache Bande ist bei 300 Basen für alle Amplifikationsreaktionen sichtbar, was nahe legt, dass ein sehr kleiner Prozentsatz der Sonden eine 3'-PO<sub>4</sub>-Gruppe verloren oder nie besessen hat und verlängert wurden. Die restlichen Zählimpulse liegen in dem Bereich zwischen null und 15 Basen. Die Auflösung auf solch einem Gel gibt nicht die exakte Größe von Produkten wieder, die besser mit einer homochromatographischen Analyse bestimmt werden kann.

**[0099]** Für eine Homochromatographie-Analyse wurden 1 µl-Proben von jeder Probe in 1,2 cm Entfernung auf eine Polygram-CEL 300 DEAE 20 × 20 cm Cellulose-Dünnschichtplatte aufgebracht, auf der zuvor 5 µl-Proben von gescherter Heringssperma-DNA (150 µg/ml) aufgebracht worden waren, die man trocknen ließ. Nachdem die Probe getrocknet war, wurde die Platte in ein Gefäß mit destilliertem Wasser gestellt, so dass das Wasser gerade eben über die Probenauftragungsfläche laufen konnte. Die Platte wurde dann in einem gläsernen Entwicklungstank, der gefiltertes Homo-Mix III (Jay et al., 1979, Nuc. Acid Res. 1 (3):331–353) enthielt, eine Lösung von zum Teil hydrolysiertes RNA mit 7 M Harnstoff, bei 70°C in einen Ofen gegeben. Man ließ den Homo-Mix durch Kapillarkraft zum oberen Rand der Platte wandern, zu welchem Zeitpunkt die Platte entfernt, getrocknet, mit Saran Wrap bedeckt und dann autoradiographiert wurde.

**[0100]** Eine Exposition der Homochromatographie-Platte über Nacht zeigte ebenfalls, dass etwa 40 % der Sonden in kleinere Fragmente abgebaut waren. Diese Fragmente waren von sehr spezifischer Größe, abhängig von der Länge des nicht komplementären 5'-Schwanzes jeder Sonde. [Fig. 1](#) zeigt ein Autoradiogramm der TCL-Platte. Sonde BW31 (Bahnen 1–3), die vollständig komplementär zu der M13mp10w-Matrize war, erzeugte markierte Fragmente von vorwiegend ein bis zwei Basen Länge. Sonde BW33 (Bahnen 4–6), die eine nicht komplementäre 5'-Region von 3 Basen enthielt, setzte Produkte von vorwiegend vier bis sechs Basen Länge frei. BW35 (Bahnen 7–9) hatte einen nicht komplementären 5'-Schwanz von 10 Basen und setzte Produkte mit einer Länge von vorwiegend 12 bis 13 Basen frei. Die Bahnen 10–12 sind Kontrollreaktionen, die nach 15 Zyklen entweder BW31, BW33 oder BW35 und alle PCR-Bestandteile ausgenommen Matrizenmaterial enthielten. Während der DNA-Synthese entfernte das Enzym die ersten ein oder zwei gepaarten Basen, auf die es traf, und spaltete dann an jener Stelle, was auf eine Endonuclease-ähnliche Aktivität hinweist. Die Ergebnisse zeigen spezifische Sonden-Freisetzung, koordiniert mit Produktanreicherung während der PCR.

## Beispiel 2

### Spezifität der Freisetzung von Sondenmarkierung

**[0101]** Die Spezifität der Freisetzung markierten Sondenmaterials wurde mittels der Durchführung einer PCR-Amplifikation unter Verwendung von Lambda-Bakteriophagen-DNA und Primern und einer Reihe von nicht komplementären, Kinase-behandelten Sonden untersucht.

**[0102]** Die zu amplifizierende Region war eine 500 Nucleotide umfassende Region auf der Lambda-Bakteriophagen-DNA aus dem GeneAmp® DNA-Amplifikationsreagenzien-Kit (Perkin-Elmer Cetus), flankiert von den Primern PCRO1 und PCRO2, ebenfalls aus dem GeneAmp® DNA-Kit.

SEQ ID NR:6 PCRO1 = 5' 7131-7155 3'

5'-GATGAGTTCGTGTCCGTACAACCTGG-3'

SEQ ID NR: 7 PCRO2 = 5' 7630-7606 3';

5'-GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC-3'

**[0103]** Aliquots derselben drei Sonden BW31, BW33 und BW35, die in Beispiel 1 identifiziert worden waren, wurden verwendet, alle waren vollständig nicht komplementär zur Zielsequenz.

**[0104]** Zur Amplifikation der 500 bp-Region wurden 0,5 ng der Lambda-DNA-Zielsequenz (Kontrollmatrize Lot #3269, 1 µg/ml, Verdünnung 1:10 in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA und 10 mM NaCl als Stammlösung) zu einem 50 µl Reaktionsvolumen gegeben, das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, je 1 µM von den Primern PCRO1 (Lot #3355) und PCRO2 (Lot #3268), je 200 µM der vier Desoxynucleosidtriphospha-

te, 1,25 Einheiten Taq-DNA-Polymerase und entweder 2, 10 oder 20 pmol der mit Isotopen verdünnten Sonden BW31, BW33 oder BW35 enthielt. Die Menge der radiomarkierten Sonde wurde konstant auf 0,4 pmol pro Reaktion gehalten und auf 1, 10 oder 20 pmol mit nicht radioaktivem Sondenmaterial verdünnt. Taq-DNA-Polymerase wurde mit 4 µl pro Reaktion zu 0,3125 Einheiten/µl zugegeben und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % NP40, 0,5 % Tween 20 und 500 µg/ml Gelatine verdünnt.

**[0105]** Das Stamm-Reaktionsgemisch wurde, wie vorstehend beschrieben, zusammen mit den Kontrollreaktionsgemischen minus Sonde oder minus Enzym angesetzt. Die Reaktionsgemische wurden nach den Zyklusbedingungen, die in Beispiel 1B festgesetzt wurden, amplifiziert und dann wie folgt analysiert. Für Acrylamidgel-Analysen wurden 4 µl von jeder Amplifikationsreaktion, gemischt mit 3 µl 5X-Ladungsgemisch, auf ein 4 %iges Acrylamidgel in 1X TBE-Pufferlösung gegeben und für 90 Minuten bei 200 Volt eine Elektrophorese ausgeführt. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid wurde die DNA durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht.

**[0106]** Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit keiner dieser Sonden in keiner Konzentration einen Einfluss auf die Menge des erzeugten amplifizierten Produkts hat. Kontrollbahnen der Proben, die keine Sonde enthielten, und alle Bahnen, die Sondenmaterial enthielten, zeigten eine diskrete 500-Basenpaar-Bande mit hoher Intensität, die der gewünschten Sequenz entsprachen. Kontrollbahnen ohne Enzymzugabe zeigten keinerlei Produkt-Banden, sondern nur Banden mit geringerer Intensität, die Primer und Sonde von annähernd 30–40 Nucleotiden repräsentierten.

**[0107]** Die homochromatographische Analyse, dargestellt in [Fig. 2](#), zeigt eine Exposition der Platte über Nacht, in der kein Abbau der Sonden beobachtet wurde. Alle Zählimpulse lagen am Ausgangspunkt und zeigten keine Freisetzung von markierten Fragmenten. Bahnen 1–3 sind Reaktionen mit der Sonde BW31; Bahnen 4–6 umfassen die Sonde BW33; Bahnen 7–9 umschließen Sonde BW35; und Bahnen 10–12 sind Kontrollreaktionen ohne Matrize. Die Ergebnisse zeigen, dass die Sonde nicht abgebaut wird, solange sie nicht spezifisch an die Zielsequenz gebunden ist, und imstande ist, den Bedingungen der PCR-Zyklen zu widerstehen.

**[0108]** In der denaturierenden Gelanalyse wurden 2 µl jeder Amplifikationsreaktion mit 2 µl Formamid-Ladungspuffer (in Beispiel 1 beschrieben) gemischt und bei 96°C für 3–5 min auf einen Heizblock gestellt. Die Proben wurden sofort in Eis gegeben und auf ein 6,2 %iges denaturierendes Gradientenacrylamidgel aufgetragen und für 90 Minuten bei 2000 Volt eine Elektrophorese durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman-Papier übertragen, mit Saran Wrap überdeckt und autoradiographiert.

**[0109]** Eine Exposition über Nacht zeigte, dass alle Zählimpulse im Bereich der 30–40 Basenpaare lagen, entsprechend den Größen der Sonden. Wiederum war kein Sonden-Abbau zu erkennen, was weiterhin bestätigt, dass eine Sonde spezifisch an die Matrize gebunden sein muss, bevor irgendein Abbau stattfinden kann.

### Beispiel 3

#### Spezifität der Freisetzung von Sondenmarkierung in der Anwesenheit genomischer DNA

**[0110]** In diesem Beispiel wurde die Spezifität der Freisetzung von Sondenmarkierung mittels Durchführung einer PCR-Amplifikation in Anwesenheit von abgebauter oder nicht abgebauter menschlicher genomischer DNA untersucht.

**[0111]** Die in diesem Experiment verwendete, mit Kinase behandelte Sonde BW33 hatte eine spezifische Aktivität von  $5,28 \times 10^6$  cpm/pmol, bestimmt durch TCA-Fällung nach der Kinasereaktion. Die amplifizierte Region war die aus 350 Basenpaaren bestehende Region von M13mp10w, flankiert von den Primern BW36 und BW42. Primersequenzen und Positionen sind in Beispiel 1 aufgelistet. Die genomische DNA vom Menschen stammte aus der Zelllinie HL60 und wurde nicht abgebaut oder durch Scheren in einer French Press auf eine durchschnittliche Größe von 800 Basenpaaren abgebaut verwendet.

**[0112]** Jedes 50 µl Amplifikationsreaktionsgemisch bestand aus  $10^{-2}$  oder  $10^{-3}$  pmol M13mp10w-Zielsequenz, 1 µg von entweder abgebauter oder nicht abgebauter HL60-genomischer DNA, die zu einem aus 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 3mM MgCl<sub>2</sub>, je 10 pmol der Primer BW36 und BW42, je 200 µM der vier Desoxyribonucleosidtriphosphate, 1,25 Einheiten Taq-DNA-Polymerase und 10 pmol der Isotopen-verdünnten Sonde BW33 bestehenden Reaktionsgemisch hinzugegeben wurden.

**[0113]** Ein Stamm-Reaktionsgemisch wurde angesetzt, das ausreichende Mengen an Reaktionspuffer, Nucleosidtriphosphaten, Primern, Sondenmaterial und Enzym enthielt. Aliquots wurden entnommen und zu diesen

wurde M13mp10w-Matrize und/oder genomische DNA gegeben. Kontrollreaktionen umfassten alle Reaktionskomponenten ausgenommen M13mp10w Ziel-DNA oder alle Reaktionskomponenten ausgenommen genomische DNA.

**[0114]** Jedes Reaktionsgemisch wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet, mikrozentrifugiert und in einen Thermozykler gestellt. Die Reaktionsgemische wurden dem folgenden Amplifikationsschema unterworfen:

Für 10, 15 oder 20 Zyklen: 96°C Denaturierung, 1 min

60°C Anlagerung/Verlängerung, 1,5 min

letzter Zyklus: 96°C Denaturierung, 1 min

60°C Anlagerung/Verlängerung, 5,5 min

**[0115]** Nach Durchlauf der Zyklen wurde das Mineralöl mit 50 µl Chloroform extrahiert, und die Proben wurden bei 4°C gelagert. Die Proben wurden anschließend mit einer Elektrophorese mit 4 %igem Acrylamidgel und einer Homochromatographie-Analyse analysiert.

**[0116]** Für die Acrylamidgel-Analyse wurden 4 µl jedes Reaktionsgemisches mit 3 µl von 5X Gel-Ladungsgemisch vermischt, auf ein 4 % Acrylamidgel in 1X TBE Pufferlösung gegeben und der Elektrophorese für 90 Minuten bei 220 Volt ausgesetzt. Die DNA wurde nach Anfärbung mit Ethidiumbromid durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht.

**[0117]** In den zu den Kontrollproben gehörenden Bahnen, die keine M13mp10w Ziel-DNA enthielten, gab es keine sichtbaren Produktbanden, was die Abwesenheit aller Crossover-Verunreinigung von M13mp10w anzeigt. Alle folgenden Bahnen zeigten eine Bande bei 350 Basen, entsprechend der erwarteten Sequenz. Die Intensität der Bande war größer, wenn  $10^{-2}$  pmol der M13mp10w Ziel-DNA gegenüber  $10^{-3}$  pmol in Abwesenheit oder Anwesenheit von genomischer DNA (abgebaut oder nicht abgebaut) anwesend war. Die Intensität der Produkt-Bande wuchs mit steigender Anzahl der Amplifikationszyklen. 20 Zyklen erzeugten eine Bande mit einer Intensität, die doppelt so stark wie nach 10 Zyklen beobachtet war, und 15 Zyklen erzeugten eine Bande mit intermediärer Intensität. Die Menge an vorhandenem PCR-Produkt variierte mit der Menge der Ziel-Matrize zu Beginn und der Anzahl der Zyklen, und die Anwesenheit von 1 µg menschlicher genomischer DNA, gleich ob abgebaut oder nicht abgebaut, zeigte keinerlei Auswirkung auf diese Produktbildung.

**[0118]** In der Homochromatographie-Analyse wurden 1 µl von jedem Reaktionsgemisch punktförmig auf eine DEAE-Dünnschichtplatte aufgetragen und bei 70°C in eine Entwicklungskammer mit Homo-Mix III gestellt. Nach 90 Minuten wurde die Platte herausgenommen, getrocknet, mit Saran Wrap bedeckt und autoradiographiert. Eine Exposition über Nacht wird in **Fig. 3** gezeigt; in **Fig. 3A** zeigen die Bahnen 1 bis 6 PCR-Zyklen in Abwesenheit von M13mp10w DNA, die abwechselnd abgebaute oder nicht abgebaute HL60-DNA nach 10, 15 und 20 Zyklen enthält; und die Bahnen 7–12 sind doppelte Ladungskontrollreaktionen, die M13mp10w-Matrizen-DNA ohne menschliche genomische DNA nach 10, 15 und 20 Zyklen enthalten. In **Fig. 3B** werden Reaktionen über 5 zunehmende Zyklusanstiege beginnend mit 10 Zyklen, amplifiziert. Die in den Bahnen 1, 2, 5, 6, 9 und 10 gezeigte DNA-Konzentration der M13mp10w-Matrize in den Reaktionsgemischen ist  $10^{-2}$  pmol, während sie in den Bahnen 3, 4, 7, 8, 11 und 12  $10^{-3}$  beträgt. Die in den Bahnen mit ungerader Nummerierung von 1 bis 11 gezeigten Reaktionen enthalten abgebaute menschliche genomische DNA, und die gerade nummerierten Bahnen enthalten nicht abgebaute menschliche genomische DNA. Markierte Sondenfragmente waren als zwei gut definierte Punkte zu erkennen, die etwa über eine Länge von 4 und 5 Basen auf der Dünnschichtplatte gewandert waren. Wenn die Startkonzentration der Matrize erhöht wurde und/oder wenn die Anzahl der Zyklen erhöht wurde, stieg die Menge der freigesetzten markierten Sondenfragmente ebenfalls. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von abgebaute oder nicht abgebaute menschlicher genomischer DNA führte nicht zu einer Wechselwirkung oder Verstärkung hinsichtlich Hybridisierung und Abbau der Sonde.

**[0119]** Die Ergebnisse zeigen, dass erhöhte Mengen von freigesetzten, kleinen Sondenfragmenten koordiniert und gleichzeitig mit spezifischer Produkthanreicherung im Verlauf einer PCR-Untersuchung auftreten. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von entweder einer großen Menge hochkomplexer menschlicher genomischer DNA oder einer großen Anzahl von zufälligen DNA-"Enden" hat keinen Einfluss auf die spezifische Produkthanreicherung oder den Grad der Sondenfreisetzung. Und schließlich führt die Anwesenheit einer großen Menge hochkomplexer menschlicher genomischer DNA zu keiner nachweisbaren Sondenfreisetzung in Abwesenheit von spezifischer Produkthanreicherung.

## Beispiel 4

## PCR mit 3'-markierter Sonde

**[0120]** Es wurde eine PCR-Amplifikation durchgeführt, die eine hybridisierte 3'-radiomarkierte Sonde in kleinere Fragmente freisetzte, wenn die Sonde an die Matrize angelagert war. Die Sequenzen dieser Sonden waren wie folgt:

SEQ ID NR: 8 DG46 = 5' 5541-5512-3'

5'-CGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGC-3'

SEQ ID NR: 9 BW32 = 5' 5541-5512-3'

5'-gatCGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGC-3'

SEQ ID NR: 10 BW34 = 5' 5541-5512-3'

5'-cgtcaccgatCGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGC-3'

A. Markierung von Sonden mit <sup>32</sup>P-Cordycepin und terminaler Transferase

**[0121]** Fünf pmol von jeder Sonde (DG46, BW32 und BW34) wurden einzeln mit 17,4 Einheiten terminaler Transferase (Stratagene) und 10 pmol [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-Cordycepin (Cordycepin: 3'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat, New England Nuclear, 5000 Ci/mmol, 3X verdünnt mit ddATP [Pharmacia]) in einem 17,5  $\mu$ l Reaktionsvolumen, das 100 mM Kaliumcacodylat, 25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM CoCl<sub>2</sub> und 0,2 mM Dithiothreitol enthielt, für 60 Minuten bei 37°C gemischt. Das gesamte Volumen wurde dann mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die Sonden wurden in 50  $\mu$ l TE-Pufferlösung resuspendiert und man ließ sie nach dem Verfahren von Sambrook et al., Molecular Cloning, vorstehend, über eine Sephadex G-50 spin-Dialysesäule laufen. Die Endkonzentration der Sonden betrug 0,1 pmol/ $\mu$ l. TCA-Fällung der Reaktionsprodukte zeigte die folgenden spezifischen Aktivitäten:

DG46:  $2,13 \times 10^6$  cpm/pmol

BW32:  $1,78 \times 10^6$  cpm/pmol

BW34:  $5,02 \times 10^6$  cpm/pmol

**[0122]** Ein Vergleich der Denaturierungsgradienten-Gel-Analyse der 3'-radiomarkierten Sonden mit den Kinasen-behandelten 5'-Sonden BW31, BW33 und BW35 zeigt, dass die 3'-radiomarkierten Sonden in ähnlicher Weise laufen wie die 5'-radiomarkierten Sonden.

**[0123]** Wiederum war die amplifizierte Region die 350-Basen-Region auf M13mp10w, definiert durch die Primer BW36 und BW42. Primer-Sequenzen und Lokalisierungen sind in Beispiel 1 aufgelistet. Jedes Amplifikationsgemisch wurde hergestellt durch Zugabe von  $10^{-3}$  pmol der M13mp10w-Ziel-DNA zu 50  $\mu$ l Reaktionsvolumen, das 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH 8,3, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, je 10 pmol der Primer BW36 und BW42, je 200  $\mu$ M der vier Desoxynucleosidtriphosphate, 1,25 Einheiten Taq-DNA-Polymerase und entweder 2, 10 oder 20 pmol der Isotopen-verdünnten Sonden DG46, BW32, oder BW34 enthielt.

**[0124]** Ein Stamm-Reaktionsgemisch, das geeignete Mengen an Reaktionspuffer, Nucleosidtriphosphaten, Matrize und Enzym enthielt, wurde angesetzt. Aliquots wurden entnommen und zu ihnen wurden die geeigneten Mengen an Primern und Sonden hinzu gegeben. Kontrollreaktionen umfassten alle Reaktionsbestandteile außer den Primern und alle Reaktionsbestandteile außer dem Sondenmaterial.

**[0125]** Die Reaktionsgemische wurde mit 50  $\mu$ l Mineralöl überschichtet, mikrozentrifugiert und in einen Thermozykler gestellt. Das Amplifikationsschema war wie folgt:

15 Zyklen: 96°C Denaturierung, 1 min

60°C Anlagerung/Extension, 1,5 min

letzter Zyklus: 96°C Denaturierung, 1 min

60°C Anlagerung/Extension, 5,5 min

**[0126]** Nach Durchlauf der Zyklen wurde das Mineralöl mit 50  $\mu$ l Chloroform extrahiert, und die Proben wurden bei 4°C gelagert.

**[0127]** Die Proben wurden mit einem 4 %igen Acrylamidgel, einem 8 %igen Denaturierungsgradienten-Acrylamidgel und durch Homochromatographie-Analyse analysiert. Bei allen drei Analysen war die Handhabung der Reaktionsgemische wie vorstehend beschrieben.

**[0128]** Bei der 4 %-Acrylamidgel-Analyse war in allen Reaktionsgemischen außer den Kontrollreaktionsgemischen

schen minus Primer eine scharfe Bande sichtbar, die dem gewünschten Produkt von 350 Basen entsprach. In allen Reaktionsgemischen, die sowohl Primer als auch Sonde enthielten, war eine zweite Bande bei etwa 300 Basen sichtbar. Diese zweite Bande gewann mit steigender Sondenkonzentration an Intensität und entsprach vermutlich Sondenmaterial, das entweder nicht wirksam am 3'-Ende radiomarkiert war oder die Radiomarkierung verloren hatte, was Sondenverlängerung und Bildung eines Produktes zulässt.

**[0129]** Eine Exposition des 8 %-Denaturierungsgradienten-Acrylamidgels über Nacht zeigte eine Verteilung der Produkte, die von der vollständigen Sonde bis zu weniger als 15 Basen nach dem Durchlauf aller drei Sonden reichte. Wie erwartet, baute die 5'-3'-Nuclease-Aktivität von Taq-DNA-Polymerase die Sonde bis zu einem Punkt ab, an dem die abgebaute Sonde von der Matrize dissoziierte.

**[0130]** Die weite Größenverteilung von Produkten war kennzeichnend für die beständig wechselnden Konzentrationen von Reaktanten und Temperaturwechsel während der PCR-Zyklen. Solche Variationen würden zu Änderungen in der Anlagerungskinetik von Sonde und Enzym führen, was der Sonde erlaubt, in einer Vielzahl von Größen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den Zyklusdurchläufen zu dissoziieren.

**[0131]** Die Homochromatographie-Platte zeigte, dass das kleinste Produkt bei allen untersuchten Sonden eine Länge von etwa 10 bis 12 Basen hat. Da alle drei Sonden bis auf die 5'-Schwanzregion eine identische Sequenz hatten, zeigt dieses Ergebnis, dass bei dieser bestimmten Sondensequenz bei einer Anlagerungs/Verlängerungs-Temperatur von 60°C die Sonde auf etwa 10 Basen abgebaut wurde und dann von der Matrize abdissoziierte.

#### Beispiel 5

**[0132]** Polymerisationsunabhängige 5'-3'-Nuclease-Aktivität von Taq DNA-Polymerase Taq-DNA-Polymerase war in der Lage, das 5'-<sup>32</sup>P-markierte Ende einer hybridisierten Sonde freizusetzen, wenn sie durch einen stromaufwärts gelegenen Primer in der Nähe dieser Sonde positioniert wurde. Eine Reihe von Primern wurde entworfen, um 0 bis 20 Basen stromaufwärts der hybridisierten, mit Kinase behandelten Sonde BW33 zu liegen. Diese Primer werden nachstehend gezeigt.

BW37 SEQ ID NR: 11 Delta-0 5' 5571-5542 3'

5'-GCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCA-3'

BW38 SEQ ID NR: 12 Delta-1 5' 5572-5543 3'

5'-GGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTC-3'

BW39 SEQ ID NR: 13 Delta-2 5' 5573-5544 3'

5'-GGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGT-3'

BW40 SEQ ID NR: 14 Delta-5 5' 5576-5547 3'

3'-AGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGC-3'

BW41 SEQ ID NR: 15 Delta-10 5' 5581-5552 3'

5'-AAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGT-3'

BW42 SEQ ID NR: 16 Delta-20 5' 5591-5562 3'

5'-GAAGAAAGCGGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGC-3'

**[0133]** Etwa 0,5 pmol der Sonde BW33 und 0,5 pmol von je einem der Primer wurden in 10,5 µl Reaktionsvolumen, enthaltend 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, und 3 mM MgCl<sub>2</sub>, an 0,5 pmol M12mp10w angelagert. Kontrollreaktionsgemische enthielten entweder 20 µM oder 200 µM von jedem der vier Desoxynucleosidtriphosphate. Es wurde ein zusätzlicher Primer, DG47, 530 Basen stromaufwärts der Sonde gelegen, verwendet.

DG47 SEQ ID NR: 17 Delta-530 5' 6041-6012 3'

5'-CGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGC-3'

**[0134]** Die Reaktionsgemische wurden für 1 min auf 98°C erhitzt und bei 60°C für 30 min angelagert. Die Röhrchen wurden dann mikrozentrifugiert und in ein Wasserbad bei 70°C gestellt. Nach ausreichender Zeit, in der die Reaktionsgemische sich an die Temperatur anpassen konnten, wurden 10, 5, 2,5, 1,25 oder 0,3125 Einheiten Taq-DNA-Polymerase zugegeben und 4 µl-Aliquots wurden nach 2, 5 und 10 Minuten entnommen. Das Enzym wurde durch die Zugabe von 4 µl von 10 mM EDTA zu jedem Aliquot und Inkubation bei 4°C inaktiviert. Die Reaktionsgemische wurden mittels Homochromatographie-Analyse untersucht.

**[0135]** In der Homochromatographie-Analyse wurden 1 µl jeder Probe punktförmig auf DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen und bei 70°C in eine Homo-Mix III enthaltende Entwicklungskammer gestellt. Man ließ Homo-Mix zum oberen Rand jeder Platte wandern, worauf die Platten entfernt, getrocknet, mit

Saran Wrap bedeckt und einer Autoradiographie unterzogen wurden. [Fig. 4](#) zeigt die Ergebnisse dieses Experiments.

**[0136]** In [Fig. 4](#) enthalten die Bahnen 1 bis 3 radiomarkierte Marker für Oligonucleotid-Molekulargrößen von 6, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 Nucleotiden. Bahnen 4–10 zeigen Reaktionen für die Primer BW37, BW38, BW39, BW40, BW41, BW42 beziehungsweise DG47 bei Abwesenheit von dNTPs. Bahnen 11–24 zeigen Kontrollreaktionen für alle Primer in Anwesenheit von 20 mM oder 200 mM dNTP.

**[0137]** In Abwesenheit von dNTPs erzeugte die Taq-DNA-Polymerase markierte Sondenfragmente aller Primer, wobei mit steigender Entfernung Primer-Sonde merklich weniger Markierung frei gesetzt wurde. Diese Wirkung wurde bei allen untersuchten Enzymkonzentrationen (0,3125 U bis 10 U/Reaktion) und zu allen Zeitpunkten beobachtet. Die Größe der freigesetzten Fragmente war die gleiche, etwa zwei und drei Basen Länge; die primäre Art variierte jedoch abhängig davon, welcher Primer zugegeben wurde. Die Hauptart, die von den Delta-null- und Deltazwei-Primern frei gesetzt wurde, war um eine Base kleiner als die von den Deltaeis-, Delta-fünf-, zeh- und 20-Primern freigesetzt wurden. Diese Nuclease-Aktivität war polymerisationsunabhängig und nachbarschaftsabhängig.

**[0138]** In Anwesenheit von Nucleosidtriphosphaten waren die Größe der freigesetzten Sondenfragmente und die relativen Proportionen der einzelnen identisch für alle untersuchten Primer. Auch war die Größe der Produkte um eine oder zwei Basen größer, wenn dNTPs anwesend waren. Es kann sein, dass das Enzym, während es polymerisiert wurde, einen „fliegenden Start“ hatte, und als es die hybridisierte Sonde erreichte, gleichzeitig eine oder zwei Basen ersetzte und dann schnitt, wodurch ein größeres Fragment erzeugt wurde.

**[0139]** Es gab keinen nachweisbaren Unterschied in der Menge frei gesetzter Produkte, wenn dNTPs mit je 20  $\mu\text{M}$  oder 200  $\mu\text{M}$  vorlagen, und es wurden keine signifikanten Unterschiede aufgrund von Verlängerungszeiten oder Enzymkonzentrationen bei der Anwesenheit von dNTPs beobachtet.

#### Beispiel 6

Beispiel zur Veranschaulichung der Natur von freigesetztem Produkt, basierend auf Sondensequenz am 5'-Ende

**[0140]** Der Einfluss von starker oder schwacher Basenpaarung an der 5'-komplementären Region einer Sonde auf die Größe des freigesetzten Produkts wurde untersucht. Zwei Sonden, BW50 und BW51 wurden so entworfen, dass sie entweder eine CGreiche oder eine AT-reiche 5'-komplementäre Region trugen. BW50 und BW51 wurden mit der in Beispiel V verwendeten Sonde BW33 verglichen.

SEQ ID NR: 18 BW50 = 5' 5521-5496 3'

5'-taICCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACA-3'

SEQ ID NR: 19 BW51 = 5' 5511-5481 3'

5'-gcaTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGG-3'

a,t,g,c = Basen, die nicht komplementär zum Matrizenstrang sind

BW50, BW51 und BW33 wurden mit  $^{32}\text{P}$ -ATP unter Verwendung von Polynucleotidkinase markiert und hatten die folgenden Aktivitäten:

BW50:  $1,70 \times 10^6$  cpm/pmol

BW51:  $2,22 \times 10^6$  cpm/pmol

BW33:  $1,44 \times 10^6$  cpm/pmol

**[0141]** Die Endkonzentration von allen drei Sonden betrug 0.10 pmol/ $\mu\text{l}$ .

**[0142]** Je 0,5 pmol von den Sonden BW50, BW51 oder BW33 und 0,5 pmol des Primers BW42 wurden in einem Reaktionsvolumen von 10,5  $\mu\text{l}$ , enthaltend 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH 8,3, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  und je 200  $\mu\text{M}$  der vier Desoxynucleosidtriphosphaten, an 0,5 pmol M13mp10w angelagert. Kontrollproben enthielten alle Reaktionskomponenten ausgenommen Matrize. Für den Anlagerungsschritt wurden die Reaktionsgemische für 1 Minute auf 98°C erhitzt und bei 60°C für 30 Minuten angelagert. Die Röhrchen wurden dann mikrozentrifugiert und in ein Wasserbad bei 50°C, 60°C oder 70°C gestellt. Nach ausreichender Zeit, in der die Reaktionsgemische sich an die Temperatur anpassen konnten, wurden 0,3125 Einheiten Taq-DNA-Polymerase zugegeben. Vier  $\mu\text{l}$ -Aliquots wurden nach 1, 2 und 5 Minuten entnommen. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 4  $\mu\text{l}$  von 10 mM EDTA zu jedem Aliquot und Lagerung bei 4°C inaktiviert. Die Proben wurden mittels Hochromatographie-Analyse untersucht, und die Ergebnisse sind in den [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) gezeigt.

**[0143]** [Fig. 5](#) zeigt die Reaktionsgemische mit der CG-reichen Sonde BW50. Bahnen 1–3 enthalten Oligonucleotid-Molekulargrößen-Marker aus 6, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 Nucleotiden. Bahnen 4–6 zeigen Verlängerungsreaktionen, die bei 50°C über 1, 2 und 5 Minuten durchgeführt wurden. Bahnen 7 bis 9 zeigen Verlängerungsreaktionen bei 60°C über 1, 2 und 5 Minuten. Bahnen 10–12 zeigen Reaktionen bei 70°C über 1, 2 und 5 Minuten. Bahnen 13–15 sind Kontrollreaktionen, die alle Komponenten außer Matrize enthielten, inkubiert bei 70°C über 1, 2 und 5 Minuten.

**[0144]** [Fig. 6](#) zeigt die Reaktionen mit der AT-reichen Sonde BW51. Wie in [Fig. 5](#) sind die Bahnen 1–3 Oligonucleotid Molekulargrößen-Marker mit 6, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 Nucleotiden. Bahnen 4–6 sind Verlängerungsreaktionen, durchgeführt bei 50°C über 1, 2 und 5 Minuten. Bahnen 7 bis 9 sind Verlängerungsreaktionen bei 60°C über 1, 2 und 5 Minuten. Bahnen 10–12 sind Reaktionen bei 70°C über 1, 2 und 5 Minuten. Bahnen 13–15 sind Kontrollreaktionen, die alle Komponenten außer Matrize enthielten, inkubiert bei 70°C über 1, 2 und 5 Minuten.

**[0145]** Die Ergebnisse zeigen, dass die Art der Freisetzung der Sondenmarkierung abhängig von der Temperatur und der Rasenzusammensetzung am 5'-Ende war. Die stabilere GC-reiche Sonde BW50 zeigte geringe Freisetzung der Markierung bei 50°C ([Fig. 5](#), Bahnen 4–6) und zunehmend mehr bei 60°C ([Fig. 5](#), Bahnen 7–9) und 70°C ([Fig. 5](#), Bahnen 10–12). Die meisten freigesetzten Produkte hatten eine Länge von etwa 3–5 Basen. BW51, das AT-reich am 5'-Ende war, zeigte bei 50°C ([Fig. 6](#), Bahnen 4–6) genau so viel Freisetzung von Markierung, wie bei höheren Temperaturen beobachtet wurde. Zusätzlich erzeugte die AT-reiche Sonde größere Produkte als die GC-reiche Sonde. Die Basenzusammensetzung der AT-reichen Sonde kann die Möglichkeit für eine größere „Bewegungsfreiheit“ geben, und auf diese Weise mehr Sondenablösung vor dem Schneiden zulassen, und bei niedrigeren Temperaturen als die GC-reiche Sonde.

#### Beispiel 7

#### HIV-Einfangtest

**[0146]** Das Folgende ist ein Beispiel für die Verwendung einer doppelt markierten Sonde mit Biotin in einer PCR, um die Anwesenheit einer Zielsequenz nachzuweisen. Zwei Oligonucleotide, BW73 und BW74, jedes komplementär zu einem Abschnitt aus dem HIV-Genom, wurden mit einem Biotinmolekül, das an dem 3'-Ende des Oligonucleotids befestigt war, synthetisiert. Das 5'-Ende jedes Oligonucleotids wurde zusätzlich mit <sup>32</sup>P unter Verwendung von Polynucleotidkinase und gamma-<sup>32</sup>P-ATP markiert. Die beiden Oligonucleotide PH7 und PH8 sind ebenfalls komplementär zu dem HIV-Genom, flankieren die Region, die Homologie zu den beiden Sonden-Oligonucleotiden enthält, und können als PCR-Primer dienen, die ein 142 Basen-Produkt definieren. Die Sequenzen dieser Oligonucleotide sind nachstehend gezeigt.

SEQ ID NR: 20 BW73 = <sup>32</sup>P-GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT-Y

SEQ ID NR: 21 BW74 = <sup>33</sup>P-gtgGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT-Y

SEQ ID NR: 22 PH7 = AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT

SEQ ID NR: 23 PH8 = TGCTATGTCAGTTCCCCTTGGT

**[0147]** In den Sequenzen ist „Y“ ein Biotin, und kleine Buchstaben bezeichnen Basen, die nicht komplementär zu dem Matrizenstrang sind.

**[0148]** Es wurde ein Satz von 50 µl Polymerase-Kettenreaktionen konstruiert, der entweder BW73 oder BW74, jeweils doppelt markiert, als Sondenoligonucleotide mit 2 nM enthielt. Zusätzlich wurde HIV-Matrize in Form eines Plasmid-Clons entweder mit 10<sup>2</sup> oder 10<sup>3</sup> Kopien pro Reaktion zugegeben, und die Primer-Oligonucleotide PH7 und PH8 wurden mit je 0,4 µM zugegeben. Taq-Polymerase wurde mit 1,25 Einheiten pro Reaktion zugegeben und dNTPs mit je 200 µM. Jede Reaktion wurde mit 50 µl Öl überschichtet, kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, um alle Flüssigkeiten am Boden des Röhrchens zu sammeln, und dann im Thermozykler zwischen 95°C und 60°C, mit Pausen von 60 Sekunden bei jeder Temperatur, über 30, 35 oder 40 Zyklen behandelt. Zum Abschluss der Thermozyklen wurde jedes Reaktionsgemisch mit 50 µl CHCl<sub>3</sub> extrahiert und die wässrige Phase gesammelt.

**[0149]** Jede Reaktion wurde auf Amplifikation untersucht, indem 3 µl auf ein 5 %iges Acrylamid-Elektrophoresegel gegeben und auf das erwartete 142 Basenpaare-Produkt untersucht wurde. Zusätzlich wurde 1 µl jedes Reaktionsgemischs mit TLC-Homochromatographie auf DEAE-Celluloseplatten untersucht. Schließlich wurde jedes Reaktionsgemisch darüber hinaus analysiert, indem das verbleibende Volumen mit 25 µl einer 10 mg/ml-Suspension von DYNABEADS M-280, Streptavidin-markierten, superparamagnetischen Polystyrolperlen, in Kontakt gebracht wurde. Nach Reaktion mit den Perlen wurde das Gemisch durch Filtration durch einen

Costar Spin X-Zentrifugenfilter abgetrennt, das Filtrat gesammelt und die Anwesenheit von frei gesetzten Radiomarkierungen bestimmt.

**[0150]** Fig. 7 enthält Abbildungen der beiden verwendeten Gele und zeigt, dass das 142 Basenpaar-Produkt in allen Reaktionsgemischen, mit oder ohne Sonde, auftritt und in der Menge sowohl durch die Erhöhung der Startmatrize von  $10^2$  auf  $10^3$  Kopien als auch durch die Fortsetzung der Thermozyklen von 30 auf 35 und 40 Zyklen ansteigt.

**[0151]** Fig. 8 ist eine Zusammensetzung aus zwei Autoradiogrammen der TLC-Analyse von Aliquots der PCRs und zeigt, dass Freisetzung von Radiomarkierungen auftritt und sowohl durch Erhöhung der Startmatrize als auch durch Verlängerung der Thermozyklen in ihrer Menge ansteigt. In der ersten TLC von PCRs mit Verwendung von BW73 enthalten die Bahnen 1 und 3 radiomarkierte Oligonucleotide von 2 und 3 Basen Länge als Größenstandards. Die Bahnen 4, 5 und 6 enthalten Proben von PCR mit  $10^2$  Startkopien der Matrize und die Bahnen 7, 8 und 9 mit  $10^3$  Startkopien. Die Proben in den Bahnen 4 und 7 durchliefen 30 Zyklen im Thermozykler; in den Bahnen 5 und 8 35 Zyklen; und in den Bahnen 6 und 9 40 Zyklen. In der zweiten TLC von PCR unter Verwendung von BW74 sind die Bahnen 1 und 2 die radiomarkierten 2-Mere und 3-Mere, die Bahnen 4, 5 und 6 enthalten Proben von PCR mit  $10^2$  Startkopien der Matrize mit entsprechend 30, 35 und 40 Zyklen im Thermozykler, und die Bahnen 7, 8 und 9 mit  $10^3$  Kopien der Startmatrize mit entsprechend 30, 35 und 40 Zyklen im Thermozykler. Die Größe der frei gesetzten Markierung ist kleiner mit BW73, das keine 5'-nicht komplementären Basen hat, und größer mit BW74, das eine 5'-drei Basen nicht komplementäre Verlängerung hat. Jedes Chromatogramm wurde zusätzlich durch eine zweidimensionale Radioisotop-Abbildung mit einem Ambis-Counter analysiert. Die Ergebnisse der Ambis-Zählung und der Zählung des Perleneinfangens werden in Tabelle 1 gezeigt. Die gute Übereinstimmung der beiden Verfahren bei der Messung der Freisetzung von Markierungen zeigt die Praktikabilität der Verwendung von markierten, biotinylierten Sonden und avidinylierten Perlen in PCR, um die Produktbildung zu bestimmen.

Tabelle 1

		Anzahl der Zyklen	% freigesetzter Markierung	
			Ambis	Einfangen
BW73		30	6.9	10.8
	$10^2$ Kopien	35	29.0	32.7
		40	47.2	47.2
	$10^3$ Kopien	30	11.8	16.8
		35	35.6	39.3
		40	53.4	52.5
BW74		30	8.3	7.9
	$10^2$ Kopien	35	20.7	25.2
		40	43.2	48.3
	$10^3$ Kopien	30	15.7	14.7
		35	32	37.7
		40	46	47.9

Beispiel 8

#### Sondenmarkierung und Verfahren mit Festphasen-Extraktionsmitteln

**[0152]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Trennschritt nach der Sondenabspaltung, aber vor der Bestimmung der Menge der abgespaltenen Sonde eingeführt, um abgespaltene Sondenprodukte von ungespaltener Sonde zu trennen. Zwei alternative Trennverfahren werden bevorzugt: (1) die Verwendung von avidinylierten oder streptavidinylierten magnetischen Partikeln, um Sonden zu binden, die am 3'-Ende mit Biotin und am 5'-Ende mit einem Fluorophor markiert sind; die magnetischen Partikel binden sowohl die ungespaltene Sonde als auch das 3'-Fragment, das das Produkt von Sondenabspaltung ist; und (2) die Verwendung von magnetischen Ionenaustausch-Partikeln, die Oligonucleotide binden, nicht aber Mono- oder Dinucleotide, die typischerweise am 5'-Ende mit einem Fluorophor oder  $^{32}\text{P}$  markiert sind. Verschiedene

Aspekte dieser beiden Strategien werden nachstehend diskutiert.

#### A. Avidinylierte magnetische Partikel

**[0153]** Das Trennungssystem, das 3'-biotinylierte Sonden und magnetische, avidinylierte (oder streptavidinylierte) Kügelchen verwendet, wird vorzugsweise mit Kügelchen wie etwa Dynabeads™ von Dynal durchgeführt; diese Kügelchen haben eine Biotin-Bindungskapazität von etwa 100 pmol pro 50 µl Kügelchen. Nicht-spezifische Adsorption wird minimiert, indem die Kügelchen zuerst sowohl mit Denhardt-Lösung als auch mit Träger-DNA behandelt werden.

**[0154]** Die Sonde für Trennverfahren mit Streptavidin-Biotin benötigt eine Biotin-Einheit am 3'-Terminus und ein Fluorophor am 5'-Terminus. Das 3'-Biotin dient sowohl als Ligand für die Trennung mit streptavidinylierten (oder avidinylierten) Kügelchen als auch als Blockierung zur Verhinderung der Verlängerung der Sonde während der Amplifikation. Postsynthetische Modifikationen können vereinfacht werden, indem jedes Ende der Probe mit einem unterschiedlichen Nucleophil verlängert wird; zum Beispiel kann man ein Amin an das 3'-Ende zur Addition von Biotin und ein blockiertes Thiol an das 5'-Ende zur späteren Addition des Fluorophors anhängen. Die 3'-biotinylierten Sonden können auf eine Vielzahl von Arten hergestellt werden; von denen einige nachstehend erläutert werden.

**[0155]** Ein NHS-aktives Esterderivat von Biotin kann mit Hilfe des in [Fig. 9](#) gezeigten Reaktionsmechanismus an das 3'-Amin der Sonde angefügt werden. Die resultierende Bindung erzeugt ein sekundäres Hydroxyl in gamma-Position zu dem Amidcarbonyl, was zu Instabilität während der wiederholten thermischen Zyklen einer typischen PCR führen kann. Zum Beispiel können Thermozyklen mit 40 Zyklen dazu führen, dass bis zu 6 % der anfänglich zugegebenen Sonde nicht mehr fähig sind, an magnetische, avidinylierte Partikel zu binden. Wenn die Bindung zwischen der Sonde und dem angehängten Biotin infolge thermischer Zyklen zusammenbricht, kann die Sonde nicht mehr von den abgespaltenen Produkten unterschieden werden und trägt zum Hintergrund bei. Obwohl man dazu beitragen kann, dieses Problem zu überwinden, indem man mehr als ein Biotin an die Sonde anfügt, können mehrere alternative Verfahren zum Anfügen von Biotin an ein Oligonucleotid stabilere Produkte ergeben.

**[0156]** Man kann Biotinhydrazid mit Aldehyden, die von einer 3'-Ribose aus der Sonde erzeugt werden, reagieren lassen, um ein biotinyliertes Oligonucleotid zu erhalten. Für diese Strategie enthält das 3'-Nucleotid der Sonde einen Ribosezucker anstelle des Desoxyribosezuckers. Während der Synthese wird die 3'-Ribose entweder über ihr 2'- oder 3'-OH an den festen Träger gebunden. Im Anschluss an die Synthese wird das ergänzte Oligonucleotid vom festen Träger frei gesetzt und die benachbarten Dirole der Ribose werden mit Natriumperjodat ( $\text{NaIO}_4$ ) zu Aldehyden oxidiert, die dann mit dem Biotinhydrazid reagieren, wie in [Fig. 10](#) gezeigt, und das Produkt wird mit Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) reduziert. Die resultierende biotinylierte Sonde bindet jedoch nicht wirksam an avidinylierte magnetische Partikel. Die Verwendung von Biotin-Langkettens-Hydrazid, eine Verbindung, die ebenfalls in [Fig. 10](#) gezeigt wird, kann dieses Problem lösen.

**[0157]** Man kann das Biotin während der Sondensynthese an die Sonde binden, indem man ein lösliches Biotinphosphoramidit verwendet, wie in [Fig. 11](#) gezeigt. Die Synthese beginnt mit einer Base, die an kontrolliertes Porenglas (CPG) gebunden ist, die letztlich verworfen wird. Ein Phosphoramidit, das bei der Ammoniumhydroxid-Schutzgruppenabspaltung von dem synthetischen Oligonucleotid die Bildung eines 3'-Phosphats ermöglicht, wird zugegeben. Das Biotinphosphoramidit wird dann zugegeben und das synthetisierte Oligonucleotid ist wie in [Fig. 11](#) dargestellt, die auch das Endprodukt zeigt. Dieses Verfahren des Anfügens erlaubt die Verwendung von 5'-Amin-terminierten Oligonucleotiden zum Anfügen eines Fluorophors. Die Verwendung eines 3'-Amins zum Anfügen von Biotin begrenzt die Chemie des Anfügens eines Fluorophors auf 5'-Thiole. Die Verwendung eines Biotinphosphoramidits, in dem einer der Biotin-Stickstoffe blockiert ist, kann die Synthese der Biotin-markierten Sonde verbessern.

**[0158]** Man kann auch ein kommerzielles Reagens verwenden, das aus direkt an poröses Glas gebundenem Biotin besteht; das Reagens ist das Startsubstrat für die Sondensynthese und ist in [Fig. 12](#) dargestellt. Dieses Anheftungsverfahren erlaubt die Verwendung von 5'-Amin-terminierten Oligonucleotiden zum Anfügen eines Fluorophors. Die Verwendung eines 3'-Amins zum Anfügen von Biotin begrenzt die Chemie des Anfügens eines Fluorophors auf 5'-Thiole. Enzymatische Verfahren zur Anfügen modifizierter Nucleotide an die 5'-Enden von Oligonucleotiden sind ebenfalls verfügbar, jedoch in ihrer Allgemeingültigkeit und Durchführbarkeit begrenzt.

## B. Magnetische Ionenaustausch-Matrizen

**[0159]** Man kann im Handel erhältliche Polyethylenimin (PEI)-Matrizen (auf der Basis von Cellulose-, Silica- und Polyol-Polymer)-Partikel verwenden, um abgespaltene von ungespaltener Sonde zu trennen. Zum Beispiel sind Hydrophase PEI, Selectacel™ PEI, Bakerbond™ PEI und Amicon PAE 300, 1000 und 1000L im Handel erhältliche PEI-Matrizen, die Trennung von ungespaltener Sonde von abgespaltenen Sondenprodukten ermöglichen.

**[0160]** Käuflich zu erwerbende aktivierte, magnetische Cellulosepartikel, wie etwa Cortex MagaCell™-Partikel, können mit PEIs verschiedener Länge, wie etwa PEI600, PEI1800 und PEI10.000, und mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen von PEI pro Gramm Matrix derivatisiert werden. Alle Größen von Oligonucleotiden und Cumarin-markierte Oligonucleotide binden jedoch an magnetische Cellulose- und Agarose-Kügelchen, ob sie mit PEI derivatisiert wurden oder nicht (die mit Oligonucleotiden auf im Handel erhältliche PEI-Matrizen beobachtete Spezifität geht verloren, wenn man die Oligonucleotide mit Cumarin markiert). Die Zugabe von hohen Konzentrationen an Salz (2,0 M NaCl) oder N-Methylpyrrolidon (10 bis 20 %) erhöht die Spezifität zum Teil; andere Cosolvenzien, wie etwa SDS, Brij 35, Guanidin und Harnstoff können ebenfalls verwendet werden, um die Spezifität der Bindung zu erhöhen. 8 M Harnstoff führt jedoch zu einer wirkungsvollen Blockierung der nicht spezifischen Bindung von Cumarin-markierten Di- und Trinucleotiden sowohl an Bakerbond™-PEI als auch an magnetische PEI-derivatisierte Cortex™-Partikel, obwohl die Verwendung von N-substituierten Harnstoffen stärker bevorzugt sein kann.

**[0161]** Wie vorstehend erwähnt, vertreibt Cortex Biochem eine Reihe von aktivierten, mit Cellulose ummantelten magnetischen Partikeln, die an PEI gebunden werden können. Unter diesen ist die Periodat-aktivierte Matrix am geeignetsten. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll zur Bindung von Aminen an die Periodat-aktivierte Matrix birgt jedoch mehrere Probleme: die Reaktion eines Amins mit einem Aldehyd führt zu Iminen, die labil sind und hydrolysiert werden oder wiederum mit Aminen reagieren können; während des Schrittes zur Blockierung der verbleibenden Aldehyde durch die Zugabe eines Überschusses an Ethanolamin, kann das PEI durch Ethanolamin ersetzt werden, wodurch das PEI von der Matrix entfernt wird; während der Konjugationsreaktion unter basischen Bedingungen kann Aldol-Kondensation zu einer Reaktion unter den Aldehydgruppen führen, wobei es zu einer Aggregation der Partikel kommt; und die Reaktion von Aldehyden unter basischen Bedingungen kann zu freien Radikalen führen, die die Cellulose angreifen können und an einer Vielzahl von Reaktionen teilnehmen können.

**[0162]** Um das Imin zu stabilisieren, kann ein Reduktionsschritt (mit  $\text{NaBH}_4$  und  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) eingeschlossen werden; dieser Schritt kann jedoch zu der Produktion von Gas, einem Masseverlust der Partikel und Partikel-Agglutination führen. Diese unerwünschten Effekte können von der Produktion freier Radikale verursacht sein. Die Komplikationen, die aus der Bindung mit aktiven Aldehyden resultieren, können durch die Anwendung der Epoxidchemie vermieden werden. Die entstehenden Beta-Hydroxyamine sind stabil und erfordern keine Reduktion. Weil Sauerstoff bei der Erzeugung von freien Radikalen beteiligt sein kann, sollte das Entfernen von Sauerstoff aus dem System zusätzlich die Bildung von freien Radikalen minimieren, besonders während des Reduktionsschrittes. Bei einer Synthese von PEIderivatisierten, Cellulose-ummantelten magnetischen Partikeln wurde der Blockierungsschritt mit Ethanolamin eliminiert und das Erzeugnis über Nacht vor und während der Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid mit Helium gereinigt. Es fand sich geringe Aggregation im fertigen Präparat.

**[0163]** Magnetische Polyacrolein-Partikel können sowohl mit PEI600, als auch mit Ethylendiamin derivatisiert werden und die nicht spezifische Bindung von Cumarinmarkierten Di- und Trinucleotiden kann durch hohe Konzentrationen von NMP verhindert werden. Die Verwendung von länger-kettigen PEI-Polymeren kann die nicht spezifische Wechselwirkung des Gerüsts mit kleinen, Cumarin-markierten Oligonucleotiden maskieren.

**[0164]** Ein wichtiger Faktor bei der Auswahl einer magnetischen Matrix zur Verwendung im vorliegenden Verfahren ist die Höhe der von der Matrix stammenden Hintergrundfluoreszenz. Eine Strategie zur Minimierung dieser Hintergrundfluoreszenz besteht darin, Fluorophore mit Anregungs- und Emissionsmaxima auszuwählen, die sich möglichst gering mit dem Hintergrundfluoreszenzspektrum von Puffer, Matrix und klinischen Proben überschneiden. Darüber hinaus kann der fluoreszierende Hintergrund aus der Anwesenheit von Verunreinigungen in der Matrix resultieren, die durch gründliche Vorbehandlung vor der Bindung entfernt werden können.

## C. Chemie der Bindung des Fluorophors an die Sonde

**[0165]** Wie vorstehend erwähnt, ist die bevorzugte Markierung für eine Sonde, ohne Berücksichtigung der Trennungsstrategie, ein Fluorophor. Es scheint eine Wechselwirkung zwischen der Oligonucleotidsonde und dem angehängten Fluorophor zu geben. Diese Wechselwirkung könnte für das berichtete Quenching verantwortlich sein, das beobachtet wird, wenn Fluorophore an Oligonucleotide angehängt worden sind. Man sollte Fluorophore auswählen, die nur minimal mit der DNA in Wechselwirkung treten, wenn sie an den 5'-Terminus einer Nucleinsäure angehängt werden.

**[0166]** Drei bevorzugte Fluorophore sind 7-Diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methyl-Cumarin (CPM), 6-(Bromomethyl)-Fluorescein (BMF), Luzifergelb-Iodacetamid (LYIA) und 5-(und 6-)Carboxy-X-Rhodaminsuccinimidylester, wobei CPM aufgrund zahlreicher Eigenschaften bevorzugt wird: großer Extinktionskoeffizient, große Mengenausbeute, geringes Ausbleichen und große Stokes-Verschiebung. Das Fluorophor kann durch ein Thiol angefügt werden, das an die 5'-Phosphatgruppe der Sonde gebunden ist, aber im Fall von CPM bildet dieser Prozess ein Arylmaleimid, das unter thermozyklischen Bedingungen instabil sein kann.

**[0167]** Eine Reihe von im Handel erhältlichen Instrumenten stehen für die Analyse von fluoreszenz-markierten Materialien zu Verfügung. Zum Beispiel kann der ABI Gene Analyzer verwendet werden, um attomolare Quantitäten von DNA, die mit Fluorophoren wie ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin), Rhodamin-NHS, TAMRA (5/6-Carboxytetramethyl-Rhodamin-NHS) und FAM (5'-Carboxyfluorescein-NHS) markiert sind, zu analysieren. Diese Verbindungen werden über eine Amidbindung mit einem 5'-Alkylamin der Sonde an die Sonde gebunden. Andere nützliche Fluorophore umfassen CNHS (7-Amino-4-methyl-cumarin-3-essigsäuresuccinimidylester), der ebenfalls über eine Amidbindung angefügt werden kann.

**[0168]** Modifizierungen im Markierungsprozess können notwendig sein, um eine wirksame Bindung eines gegebenen Fluorophors an ein bestimmtes Sondenoligonucleotid zu erreichen. Zum Beispiel war die Anfangsreaktion zwischen einer 5'-Amin-terminierten Sonde und einem 7-Diethylaminocumarin-3-carboxylat-NHS-Ester sehr ineffizient. Die Sonde, die am 3'-Ende phosphoryliert worden war, um eine Verlängerung der Sonde während der Amplifikation zu verhindern, hatte eine signifikante Sekundärstruktur, wobei eine dieser Konformationen das 5'-Amin und das 3'-Phosphat dicht genug zusammenbrachte, um eine Salzbrücke auszubilden. Diese Struktur kann verhindert haben, dass das 5'-Amin für die Reaktion mit dem NHS-Ester zur Verfügung stand, und so die geringe Ausbeute an Produkten verursacht haben. Die Zugabe von 25 %-N-Methylpyrrolidinon (NMP) verbesserte den Wirkungsgrad der Reaktion wesentlich.

**[0169]** Man kann auch sowohl ein Fluorophor, als auch ein quenchendes Agens verwenden, um die Sonde zu markieren. Wenn die Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenz des Fluorophors vom Quencher gequencht. Während des vorliegenden Verfahrens wird die Sonde zwischen dem Fluorophor und dem Quencher gespalten, wodurch die volle Ausprägung der Fluoreszenz des Fluorophors ermöglicht wird. Quenchen erfordert Transfer von Energie zwischen dem Fluorophor und dem Quencher; das Emissionsspektrum des Fluorophors und das Absorptionsspektrum des Quenchers müssen sich überschneiden. Eine bevorzugte Kombination für diesen Aspekt der vorliegenden Erfindung ist das Fluorophor Rhodamin 590 und der Quencher Kristallviolett.

**[0170]** Eine derartige Sonde ist in [Fig. 13](#) dargestellt. Die Synthese dieser Konstruktion erfordert die Bindung eines Rhodaminderivats über ein 5'-Thiol und die Bindung von Kristallviolett durch ein von einem zwei Basen entfernten Thymidin herrührenden Amin. Die Trennung der beiden Einheiten durch zwei Phosphodiester-Bindungen erhöht die Chance für eine Spaltung durch die DNA-Polymerase zwischen ihnen.

**[0171]** Anfängliche Versuche, das Kristallviolett über eine Reaktion zwischen einem Lacton und einem Amin zu binden, waren nicht erfolgreich. Das Kristallviolett wurde modifiziert, um ein aktives Acylazid zu erzeugen, dargestellt in [Fig. 14](#). Diese Form des Kristallvioletts ließ man mit Amin-modifizierter DNA reagieren, und das gewünschte Produkt wurde mit einer Umkehrphasen-HPLC gereinigt.

**[0172]** Versuche, die Rhodamin-X-Maleimid-Gruppe mit dem 5'-Thiol reagieren zu lassen, waren nicht erfolgreich. Dies war auch der Fall, wenn man das Rhodamin-X-Maleimid vor der Zugabe des Kristallvioletts reagieren ließ. Dies kann so sein, weil das entblockierte 5'-Thiol mit der Acrylamid-Doppelbindung in dem Thymidin-Seitenarm (vgl. [Fig. 13](#)) reagiert. Ein alternatives Verfahren zum Anfügen einesamins an das Thymidin ist in [Fig. 15](#) dargestellt.

**[0173]** Dieses Beispiel stellt eine allgemeine Anleitung für die Anfügung eines Biotins an das 3'-Ende einer Oligonucleotidsonde und eines Fluorophors an das 5'-Ende einer Oligonucleotidsonde bereit. Fachleute auf

dem Gebiet werden feststellen, dass eine Reihe von Verfahren für solche Anfügungen in der Fachwelt bekannt sind, und dass die vorliegende Erfindung nicht auf das im Einzelnen gewählte Verfahren zur Markierung der Sonde beschränkt ist.

#### Beispiel 9

##### Protokoll für AmpliWax™-vermittelte PCR mit UNG und dUTP

**[0174]** Der PCR-Prozess kann im Hinblick auf die Spezifität der Amplifikation durch Verfahren und Reagenzien, die ausführlicher in der PCT-Patentanmeldung, Seriennr. 91/01039, eingereicht am 15. Februar 1991; US-Patentanmeldung, Seriennr. 481,501, eingereicht am 16. Februar 1991, PCT-Patentanmeldung, Seriennr. PCT/US 91/05210, eingereicht am 23. Juli 1991, und der US-Patentanmeldung, Seriennr. 609,157, eingereicht am 2. November 1990 und US-Patentanmeldung, Seriennr. 557,517, eingereicht am 24. Juli 1990 beschrieben sind, verbessert werden. Die Offenbarungen dieser Patentanmeldungen sind durch Bezugnahme hier miteinander geschlossen, und das folgende Protokoll zeigt, wie diese verbesserten PCR-Verfahren in Verbindung mit dem vorliegenden Verfahren für hervorragende Ergebnisse eingesetzt werden können. Alle Reagenzien können von Perkin-Elmer Cetus Instruments (PECI, Norwalk, CT) bezogen werden.

**[0175]** Dieses Protokoll betrifft im wesentlichen drei Komponenten: MikroAmp™-Röhrchen, die dNTPs, Primer, Magnesium und Tris mit Wachs abgedeckt enthalten; Premix B, zu dem AmpliTaq®-DNA-Polymerase und UNG zugegeben wird (und daher das Enzymgemisch genannt wird); und Premix C, zu dem die Testprobe und Sonde zugegeben werden. Das Enzymgemisch und die Testprobe mit Sonde werden hergestellt und oberhalb der Wachsschicht zugegeben. Die Röhrchen werden dann in einen TC9600-Thermozykler gestellt und durchlaufen die Thermozyklen. Das nachstehende Protokoll geht von einem 50 µl-Reaktionsvolumen mit Testproben von nicht mehr als 27 µl aus, und das Ziel ist HIV.

**[0176]** Die Reagenzien werden vorzugsweise wie folgt bereitgestellt: MicroAmp™-Röhrchen mit 12,5 µl Premix A und einem 12 mg AmpliWax™-PCR-Kügelchen pro Röhrchen werden vorbereitet. Premix A enthält 1 µM SK145-Primer und 1 µM SK431-Primer (keiner der Primer ist biotinyliert), 800 µM dATP, 800 µM dGTP, 800 µM dCTP, 800 µM dUTP, 15 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM Tris-HCl, pH 8,3. Das AmpliWax™-Kügelchen besteht aus einem bei 55°C schmelzenden Paraffin (Aldrich Chemical Co.), das 0,15 % Tween 65 enthält, und das Wachs-kügelchen und die Premix A-Bodenschicht werden in einem DNA-freien Raum zusammengegeben. Das Wachs-kügelchen wird dann geschmolzen, um eine Verdunstungsbarriere am oberen Rand zu bilden. Diese Barriere wird unversehrt bleiben, wenn die Röhrchen bei 4 bis 25°C gelagert werden, und die PCR-Reagenzien unterhalb der Barriere sind bei 4°C für Monate lagerungsstabil. Es gibt keine Vermischung mit Material, das oberhalb der Barriere zugegeben wird, bis das Wachs während der Anfangsstufen der thermalen Zyklen geschmolzen ist. Kontrollröhrchen sind identisch, enthalten aber keinen Primer.

**[0177]** Premix B-Pufferlösung enthält 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, und 50 mM KCl und wird für die Verdünnung der Enzyme AmpliTaq®-DNA-Polymerase und UNG verwendet. Etwa 2,6 µl Premix B-Pufferlösung werden pro Reaktion benötigt.

**[0178]** Premix C-Pufferlösung wird als 10X-Konzentrat hergestellt, das 105 mM Tris-HCl, pH8,3, und 715 mM KCl enthält, und wird zur Test-DNA-Probe gegeben, so dass die Endkonzentrationen von Tris und KCl in der Endreaktion entsprechend 10 mM und 50 mM betragen. Die Sonde wird ebenfalls in dieser Schicht zugegeben, wie auch die Träger-DNA, falls vorhanden. Wenn Plasmidkontrollen durchgeführt werden, wird gewöhnlich 1 µg menschlicher Plazenta-DNA (1 µg/µl in 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA und 10 mM NaCl, die geschert, Phenol/Chloroform-extrahiert, Chloroformextrahiert und Ethanol-gefällt wurde) pro Reaktion als Träger-DNA zugegeben. Etwa 3,3 µl der 10X Stammlösung von Premix C werden pro Reaktion hinzugefügt.

**[0179]** Die Sonde wird als 5 µM-Ausgangslösung angesetzt und als LG101C bezeichnet. Sonde LG101C hat ein 3'-Phosphat, um die Verlängerung der Sonde zu verhindern, und ein 7-Diethylaminocumarin-3-carboxylat über eine Amidbindung an eine 5'-aminoaliphatische Gruppe auf dem Oligonucleotid gebunden. Die Nucleotidsequenz der Sonde ist nachstehend angegeben:

SEQ ID NR: 24 LG101C: 5'-GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT

**[0180]** Diese Sonde sollte bei -20°C im Dunkeln gelagert werden.

**[0181]** AmpliTaq®-DNA-Polymerase wird in einer Ausgangskonzentration von 5 U/µl von PECI geliefert, und UNG wird in einer Ausgangskonzentration von 1 U/µl vom selben Händler geliefert. Man kann auch Plas-

mid-Kalibrierungsproben verwenden, und für diesen Zweck ist die Herstellung von Ausgangsverdünnungen (Kopien/ml) von 300, 1000, 3000, 30.000, 100.000 und 1.000.000 mit GeneAmplimer™ Positive Control-DNA hilfreich. Diese DNA besteht aus dem HIVZ6-Genom, neu geordnet, um die pol-Region zu unterbrechen und so Infektivität zu blockieren, inseriert in das Plasmid pBR322.

**[0182]** Jedes fertige Reaktionsgemisch besteht aus 12,5 µl Premix A, 2,6 µl Premix B, 3,3 µl Premix C, 2 µl der Sonde LG101C, 27 µl der Testprobe, 0,4 µl AmpliTaq®-DNA-Polymerase und 2 µl UNG, was ein Endvolumen von 49,8 µl ergibt. Dieses Gemisch enthält 250 nM von jedem Primer, 200 µM von jedem dNTP, 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 200 nM Sonde, 2 Einheiten UNG und 2 Einheiten Polymerase.

**[0183]** Um die Reaktion ablaufen zu lassen, stellt man zunächst das Enzymgemisch unter einem DNA-freien Abzug oder in einem DNA-freien Raum her, indem man pro Reaktion 2,6 µl Premix B-Pufferlösung, 0,4 µl AmpliTaq®-DNA-Polymerase und 2 µl UNG zusammenmischt. Für jeweils 16 Reaktionen, die durchgeführt werden sollen, sollte man genug Enzymgemisch für 18 Reaktionen herstellen, um ausreichend Material bereit zu stellen. Das Enzymgemisch wird dann zu jedem MicroAmp™-Röhrchen, das das mit Wachs verschlossene Premix A enthält, unter einem DNA-freien Abzug oder in einem DNA-freien Raum über das Wachs gegeben. Eine einzelne Probennehmerspitze kann für alle Transfers ausreichen, und 5 µl Enzymgemisch werden zu jedem Röhrchen zugegeben.

**[0184]** Im Bereich für die Probenherstellung wird das Probengemisch durch Vermischen von 3,3 µl von 10X Premix C-Pufferlösung, 27 µl Probe (für Quantifizierungskontrollen 10 µl Ausgangsverdünnung und 17 µl Wasser zugeben) und 2 µl Sonde (Träger-DNA, falls vorhanden, wird mit der Probe vermischt) pro Reaktion hergestellt. Dann werden mit einer separaten Probennehmerspitze für jeden Transfer 32,3 µl Probengemisch zu jedem Röhrchen gegeben; die Volumenungleichheit zwischen Enzymgemisch und Probengemisch gewährleistet vollständige Durchmischung. Man sollte auch zwei Kontrollröhrchen ohne Primer ansetzen, die als Maß für die aus den Thermozyklen resultierende Sondenspaltung dienen. Diese Kontrolle enthält typischerweise 1.000 Kopien der Kontrollmatrize. Zusätzlich sollte man eine Verdünnungsreihe vom Plasmid ansetzen, um die Untersuchung zu kalibrieren. Diese Kalibrierung liegt typischerweise im Bereich von 3 bis 10.000 Kopien von HIV-Zielsequenz pro Probe. Wenn die vorstehenden Schritte abgeschlossen sind, werden die Röhrchen verschlossen und im TC9600 -Gestell gesammelt.

**[0185]** Das Thermozykler-Profil ist wie folgt: 1 Zyklus bei 50°C für 2 Minuten; 5 Zyklen bei 95°C für 10 Sekunden; 55°C für 10 Sekunden und 72°C für 10 Sekunden; und 35 Zyklen bei 90°C für 10 Sekunden, 60°C für 10 Sekunden und 72°C für 10 Sekunden. Wenn die Thermozyklen beendet sind, werden die Röhrchen aus dem TC9600 heraus genommen und gegebenenfalls bei -20°C gelagert. Längeres Inkubieren der Röhrchen bei über 70°C ist nicht zu empfehlen, und alkalische Denaturierung sollte nicht angewendet werden.

**[0186]** Eine Reihe von Kontrollen sind hilfreich, einschließlich einer Kontrolle ohne Matrize, um die Verunreinigung der Reaktionsgemische sowie die Amplifikation von nicht spezifischen Produkten zu bestimmen, was zur Sondenspaltung führen und nicht spezifische Signale ergeben kann; einer Kontrolle ohne Primer als ein Maß für nichtamplifikationsabhängige Spaltung der Sonde, die zum Hintergrund beitragen könnte (man könnte auch einige klinische Proben in die Tests einschließen, um die Anwesenheit von Bestandteilen nachzuweisen, die zu Sondenspaltung führen könnten); und Quantifizierungskontrollen.

**[0187]** Um das PCR-Produkt unter der sich nach der Amplifikation nach dem vorstehenden Protokoll bildenden Wachsschicht hervorzuholen, kann man die Probe entnehmen, nachdem man eine Probennehmerspitze durch das Zentrum der Wachsschicht gestoßen hat, indem man die Spitze langsam und mit sanftem Druck einführt, um die Möglichkeit zu minimieren, dass das Reaktionsgemisch an der Spitze vorbei spritzt und das Labor verunreinigt. Führen des Probennehmers mit einem Finger der Hand, die das Reaktionsgefäß hält, erhöht die Kontrolle wesentlich. Schlanke Probennehmerspitzen (zum Laden von Gel) durchstoßen das Wachs besonders gut. Eine schneidende Bewegung anstatt einer stechenden Bewegung erleichtert das Durchdringen ebenfalls und hilft sicherzustellen, dass die Spitze nicht mit Wachs verstopft. Wenn die Spitze ein Stück Wachs aufspießt, kann das Wachs normaler Weise durch sanftes Reiben an dem verbliebenen Wachs entfernt werden.

**[0188]** Man kann die Reaktionsgefäße auch einfrieren, (z.B. in Trockeneis-Ethanol oder über Nacht in einer Tiefkühltruhe), sie auftauen und kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren (Winkelrotor). Die Wachsschicht wird stark aufgebrochen sein, was das Eindringen des Probennehmers ohne jede Gefahr einer Verstopfung gestattet. Wachsfragmente können von der Probennehmerspitze gegen die innere Wand des Röhrchens abgestreift werden. Dieses Verfahren ist besonders für Wechselprobennehmer geeignet, die oft so dicke Spitzen haben, dass das direkte Durchstoßen der unversehrten Wachsschicht nur schwer möglich ist. Jedes der vor-

stehenden Verfahren sollte Wachs in der entfernten Probe so vollständig ausschließen, dass eine Chloroform-Extraktion nicht erforderlich ist. Obwohl die vorliegende Erfindung zum Zweck der Erläuterung detailliert beschrieben wurde, ist es offensichtlich, dass Änderungen und Modifikationen innerhalb des Schutzbereichs der angefügten Ansprüche vom Durchschnittsfachmann durchgeführt werden können.

#### Beispiel 10

##### Festphasen-Extraktion mit Bakerbond™PEI

**[0189]** Dieses Beispiel stellt ein Protokoll zur Untersuchung eines PCR-Gemischs bereit, in dem die Amplifikation in Gegenwart einer Fluoreszenz-markierten (ein Cumarin-Derivat) Sonde nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurde.

**[0190]** Die Herstellung bestimmter Ausgangsreagenzien erleichtert die Anwendung dieses Protokolls. Ein solches Reagens sind Eppendorfgeläße, die 50 mg vorgewaschener Bakerbond PEI-Matrix enthalten. Die Bakerbond™ PEI kann von J.T.Baker (Produkt Nr. 7264-00) bezogen werden und zwar 40 µm-Partikel mit 275 Angstrom Porengröße auf Silica-Basis. Die Matrix wird vorbereitet, indem sie zuerst mit Wasser, dann Ethanol, dann Wasser und dann einem Gemisch aus 10 mM Tris, pH 8,3, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl und 8 M Harnstoff gewaschen und dann mit 10 mM Tris, pH 8,3, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl und 8 M Harnstoff äquilibriert wird. Nach der Aufteilung werden 15 µl Wasser zu jedem Gefäß zugegeben, um die Matrix feucht zu halten. Die Gefäße sollten bei 4°C gelagert werden.

**[0191]** Der Bindungspuffer kann ebenfalls als Ausgangslösung hergestellt werden, und die Zusammensetzung ist 10 mM Tris, pH 8, 500 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, und 8 M Harnstoff. Der Bindungspuffer sollte bei 4°C gelagert werden, obwohl Harnstoff bei dieser Temperatur ausfallen kann. Der Bindungspuffer kann vor Gebrauch kurz aufgewärmt werden, um den Harnstoff zu resuspendieren.

**[0192]** Eine bestimmte Ausrüstung ist bei der Durchführung dieses Protokolls von Nutzen. Während des Bindungsschrittes sollten die Gefäße durchmischt werden, um die Matrix in Suspension zu halten, und ein Vortex Genie 2-Schüttler (zu beziehen von Fischer Scientific, Kat. Nr. 12-812, mit Halterung für 60 Mikrogefäße, Kat. Nr. 12-812-B) ist für diesen Zweck hilfreich. Zusätzlich sind auch eine Eppendorf-Mikrofuge, ein Hitachi-Spektrofluorometer, Modell 2000, und Mikrofluorimeter-Quarzküvetten mit 2 mm lichter Weite, und 2,5 mm Basis-Pfadlänge (zu beziehen von Starna Cells, Inc., Nr. 18F Q 10 mm 5) nützlich für die Durchführung dieses Protokolls. Angemessene Kontrollen sollten ebenfalls durchgeführt werden, und der Bindungsschritt erfordert drei Kontrollen. Die Kontrolle der Hintergrundfluoreszenz bedingt die Herstellung einer Probe, die alle Komponenten der PCR-Amplifikation außer der Sonde enthält. Die Kontrollprobe sollte identisch mit den aktuellen Testproben behandelt werden, indem 20 µl zur Matrix gegeben werden und die auftretende Fluoreszenz im Überstand gemessen wird. Diese Kontrolle stellt einen Weg bereit, Hintergrundfluoreszenz zu messen, die in Matrix, Bindungspuffer, und bei einigen Bestandteilen in dem PCR-Amplifikationsgemisch auftritt, und ermöglicht auch eine Messung der in klinischen Proben vorhandenen Menge der Fluoreszenz.

**[0193]** Die zweite Kontrolle stellt eine Messung für ein nicht beabsichtigtes Sondenversagen und für die Bindungsreaktion bereit und besteht aus einem Schein-PCR-Amplifikationsgemisch, das alle Komponenten einschließlich Sonde enthält, jedoch nicht den thermischen Zyklen unterzogen wird. Die Kontrollprobe sollte identisch mit den aktuellen Testproben behandelt werden, indem 20 µl zur Matrix zugegeben werden und die Fluoreszenz im Überstand gemessen wird. Diese Kontrolle stellt sowohl einen Weg zur Messung des Vorliegens von Sonden-Versagen während der Lagerung als auch zur Messung der Wirksamkeit der Bindungsreaktion bereit. Wenn kein Versagen auftritt und die Bindungsreaktion vollständig ist, sollte die Fluoreszenz des Überstandes nach der Bindung an Bakerbond™ PEI ähnlich der des Hintergrundes sein, die in der ersten Kontrolle gemessen wurde.

**[0194]** Die dritte Kontrolle stellt einen Weg zur Messung der Ausgangsmenge der Sonde bereit. Die Probe, die für die zweite Kontrolle hergestellt wurde, kann für diese Messung verwendet werden. In diesem Fall werden jedoch 20 µl in ein Gefäß gegeben, das 290 µl Bindungspuffer ohne Matrix enthält. Diese Kontrolle kann verwendet werden, um die Ausgangsmenge der Sonde zu bestimmen.

**[0195]** Um mit dem Protokoll zu beginnen, bestimmt man zuerst die Anzahl der benötigten Bindungsgefäße; diese Zahl ist die Summe aus Testproben und Kontrollen. Die Kontrollen sind eine Kontrolle ohne Matrize, eine Kontrolle ohne Primer, Kalibrierungskontrollen und die erste und zweite der vorstehend erläuterten Kontrollen. Die Kontrollen können in dreifacher Ausführung durchgeführt werden. Zu jedem Gefäß gibt man 235 µl Bin-

dungspuffer.

**[0196]** Man bereitet auch ein Gefäß zur Messung der Ausgangsmengen vor, indem man in ein leeres Eppendorfgefäß gibt: 290 µl Bindungspuffer, was dem Volumen in den Gefäßen mit Matrix äquivalent ist (235 µl Bindungspuffer, 15 µl Wasser und 40 µl, die durch das Matrix-Volumen beigetragen werden). Die Bestimmung der Ausgangsmengen kann in dreifacher Ausführung durchgeführt werden.

**[0197]** Zu den Matrix enthaltenden Gefäßen (die Testproben und die ersten und zweiten Kontrollen) gibt man 20 µl der Probe. Zu den Pufferlösung enthaltenden Gefäßen (die dritte Kontrolle) gibt man 20 µl Schein-PCR-Amplifikationsgemisch. Die Proben werden dann auf einem Vortex Genie 2-Schüttler auf Stufe 4 bei Raumtemperatur für 30 Minuten gemischt. Die Gefäße werden dann in einer Eppendorf-Microfuge (16.000 × g) 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die oberen 200 µl des Überstands von jedem Gefäß werden entfernt, ohne das Pellet oder die Matrix, die sich an der Wand des Gefäßes befindet, zu zerstören, und in ein sauberes Eppendorfgefäß gegeben.

**[0198]** Die Fluoreszenz des Überstands wird mit einem Hitachi Modell 2000 in den vorstehend beschriebenen Küvetten gemessen. Für Sonden, die mit 7-Diethylamino-3-(4'-maleimidophenyl)-4-methyl-cumarin markiert sind, wird das Spektrofluorometer wie folgt eingestellt: die PM-Spannung beträgt 700 V; die Anregungswellenlänge ist 432 nm; die Emissionswellenlänge ist 480 nm; die Schlitzweite für die Anregung beträgt 10 nm; und die Schlitzweite für die Emission beträgt 20 nm. Man sollte die Exposition der Probe gegenüber Anregungslicht minimieren; wenn die Probe für einen längeren Zeitraum im Spektrofluorometer bleiben soll, sollte der Verschluss geschlossen sein.

**[0199]** Die Anzahl der pMol der gespaltenen Sonde ist der gebräuchlichste Weg, die Signalmenge zu bewerten. Um die Signalmenge zu bewerten, muss man dann zuerst das Ausgangssignal aus der dritten Kontrolle anhand der folgenden Berechnung bestimmen:

(Fluoreszenzsignal der dritten Kontrolle-Fluoreszenzsignal der ersten Kontrolle) × (310/20) 10 pmol

**[0200]** In dieser Formel korrigiert die Subtraktion alle Hintergrundfluoreszenz in den Testproben; 310/20 ist der Verdünnungsfaktor; und 10 pmol ist die Menge der zu den PCR-Amplifikationen gegebenen Sonde.

**[0201]** Die Menge an Testprobensignal wird anhand der folgenden Formel berechnet:

(Fluoreszenzsignal der Testprobe-Fluoreszenzsignal der ersten Kontrolle) × 310/20 Ausgangssignal

**[0202]** Das vorstehende Protokoll kann entsprechend des jeweiligen zur Markierung der Sonde verwendeten Fluorophors modifiziert werden und dient lediglich der Erläuterung der Erfindung.

**[0203]** [Fig. 16](#) zeigt typische Ergebnisse und ein typisches Verhältnis von Signal zu Menge des Ausgangs-Ziels für das vorliegende Verfahren unter Verwendung von Bakerbond™ PEI Festphasen-Extraktionsmittel.

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER

(A) NAME: F.HOFFMANN-LA ROCHE AG

(B) STRASSE: Grenzacherstrasse 124

(C) ORT: Basel

(D) BEZIRK: BS

(E) LAND: Schweiz

(F) POSTLEITZAHL: CH-4070

(G) TELEFON: 061-688 25 11

(H) TELEFAX: 061-688 13 95

(I) TELEX: 962292/965542 hlr ch

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Markierte Oligonucleotide

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 24

(iv) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) ART DES MEDIUMS: Floppy disk

(B) COMPUTER:

(C) BETRIEBSSYSTEM:

(D) SOFTWARE:

(v) DATEN DER ERSTEN ANMELDUNG:

ANMELDUNGSNUMMER: 563. 758

EINREICHUNGSDATUM: 6. August 1990

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 1:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 28 Basen

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 1:

**CCGATAGTTT GAGTCTTCT ACTCAGGC**

**28**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 2:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 30 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 2:

**GAAGAAAGCG AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC**

**30**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 3:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 31 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 3:

**CGCTGCGCGT AACCACCACA CCCGCCGCGC X**

**31**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 4:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 37 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 4:

GATCGCTGCG CGTAACCACC ACACCCGCCG CCGCGCX

37

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 5:

## (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 41 Basen

(B)TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 5:

CGTCACCGAT CGCTGCGCGT AACCACCACA CCCGCCGCGC X

41

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 6:

## (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 25 Basen

(B)TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 6:

GATGAGTTCG TGTCCGTACA ACTGG

25

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 7:

## (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 25 Basen

(B)TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 7:

GGTTATCGAA ATCAGCCACA GCGCC

25

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 8:

## (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 30 Basen

(B)TYP: Nucleinsäure

- (C) STRANGFORM: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 8:

**CGCTGCGCGT AACCACCACA CCCGCCGCGC**

**30**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 9:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 33 Basen
  - (B)TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 9:

**GATCGCTGCG CGTAACCACC ACACCCGCCG CGC**

**33**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 10:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 40 Basen
  - (B)TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 10:

**CGTCACCGAT CGCTGCGCGT AACCACCACA CCCGCCGCGC**

**40**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 11:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 30 Basen
  - (B)TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 11:

**GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA**

**30**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 12:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

- (A) LÄNGE: 30 Basen
- (B)TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 12:

**GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG TGTAGCGGTC**

**30**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 13:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 30 Basen
  - (B)TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 13:

**GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA GTGTAGCGGT**

**30**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 14:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 30 Basen
  - (B)TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 14:

**AGCGGGCGCT AGGGCGCTGG CAAGTGTAGC**

**30**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 15:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 30 Basen
  - (B)TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 15:

**AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT**

**30**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 16:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 30 Basen

(B)TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 16:

**GAAGAAAGCG AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC**

**30**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 17:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 30 Basen

(B)TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 17:

**CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG**

**30**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 18:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 29 Basen

(B)TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 18:

**TATCCCGCCG CGCTTAATGC GCCGCTACA**

**29**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 19:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

- (A) LÄNGE: 34 Basen
- (B)TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 19:

**GCATTAATGC GCCGCTACAG GCGCGTACT ATGG**

**34**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 20:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 33 Basen
  - (B)TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 20:

**GAGACCATCA ATGAGGAAGC TGCAGAATGG GAT**

**33**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 21:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 36 Basen
  - (B)TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 21:

**GTGGAGACCA TCAATGAGGA AGCTGCAGAA TGGGAT**

**36**

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 22:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 30 Basen
  - (B)TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: einfach
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 22:

AGTGGGGGGA CATCAAGCAG CCATGCAAAT

30

## 2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 23:

## (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 27 Basen

(B)TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 23:

TGCTATGTCA GTTCCCCTTG GTTCTCT

27

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 24:

## (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 33 Basen

(B)TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 24:

GAGACCATCA ATGAGGAAGC TGCAGAAATGG GAT

33

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Diskriminierung von Sequenzvarianten einer Ziel-Nucleinsäuresequenz in einer Probe, wobei das Verfahren umfasst:

(a) Inkontaktbringen einer einzelsträngige Nucleinsäuren umfassenden Probe mit einem ersten Oligonucleotid, das eine Sequenz enthält, die komplementär ist zu einem Bereich der Ziel-Nucleinsäure, und einem markierten Oligonucleotid, das eine Sequenz enthält, die komplementär ist zu einer der Sequenzvarianten in einem zweiten Bereich des gleichen Ziel-Nucleinsäuresequenzstranges, wobei sich die Sequenzvarianten in dem zweiten Bereich unterscheiden, unter Bedingungen, dass sich das erste Oligonucleotid und das markierte Oligonucleotid an die Ziel-Nucleinsäure anlagern, so dass das 3'-Ende des ersten Oligonucleotids an das 5'-Ende des markierten Oligonucleotids angrenzt oder stromaufwärts davon ist;

(b) Inkubieren des Gemischs aus Schritt (a) mit einer matrizenabhängigen Nucleinsäure-Polymerase, mit einer 5'- zu 3'- Nucleaseaktivität, unter Bedingungen, die ausreichen, um der 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität der Polymerase das Schneiden des angelagerten markierten Oligonucleotids zu erlauben, zur Erzeugung von Spaltprodukten bestehend aus freigesetzten markierten Fragmenten, wobei, abhängig von der vorhandenen Sequenzvariante, verschiedene Spaltprodukte erzeugt werden;

(c) Untersuchen der erzeugten Spaltprodukte;

(d) Identifizieren der vorhandenen Sequenzvariante aus den untersuchten Spaltprodukten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Nucleinsäure-Polymerase eine DNA-Polymerase mit einer 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das markierte Oligonucleotid genau komplementär zu einer der Sequenzvarianten ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das markierte Oligonucleotid mit einer fluoreszierenden Markierung markiert ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das markierte Oligonucleotid am 5'-Ende markiert ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das markierte Oligonucleotid intern markiert ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das markierte Oligonucleotid am 3'-Ende markiert ist.
8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Untersuchen der Spaltprodukte mittels Gelelektrophorese durchgeführt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Schritt (b) unter Bedingungen durchgeführt wird, welche zur Förderung der Nucleinsäurepolymerisierung ausreichen, wobei die Spaltprodukte während der Verlängerung des ersten Oligonucleotids erzeugt werden.
10. Polymerasen-Kettenreaktion(PCR)-Amplifikationsverfahren zur Diskriminierung von Sequenzvarianten einer Ziel-Nucleinsäuresequenz in einer Probe, wobei das Verfahren umfasst:
  - (a) Bereitstellen eines PCR-Reaktionsgemisches enthaltend die Probe, eine matrizenabhängige Nucleinsäure-Polymerase mit einer 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität, ein markiertes Oligonucleotid enthaltend eine Sequenz, die komplementär zu einem Bereich der Ziel-Nucleinsäure ist, wobei sich die Sequenzvarianten unterscheiden, und ein Oligonucleotidprimerpaar umfassend einen ersten Primer und einen zweiten Primer, wobei der erste Primer und das markierte Oligonucleotid mit dem gleichen Strang der Ziel-Nucleinsäure hybridisieren und wobei der erste Primer stromaufwärts von dem markierten Oligonucleotid hybridisiert;
  - (b) Behandeln des PCR-Reaktionsgemisches unter Amplifikationsbedingungen, umfassend einen Schritt, in dem der erste Primer und das markierte Oligonucleotid mit der Ziel-Nucleinsäure hybridisieren, der erste Primer durch die Nucleinsäure-Polymerase verlängert wird, während die 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität der Nucleinsäure-Polymerase die hybridisierten markierten Oligonucleotide zur Erzeugung von Spaltprodukten spaltet, bestehend aus freigesetzten markierten Fragmenten, wobei, abhängig von der vorhandenen Sequenzvariante, verschiedene Spaltprodukte erzeugt werden;
  - (c) Untersuchen der erzeugten Spaltprodukte;
  - (d) Identifizieren der vorhandenen Sequenzvariante aus den untersuchten Spaltprodukten.
11. PCR-Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Nucleinsäure-Polymerase ein thermostabiles Enzym ist.
12. PCR-Verfahren nach Anspruch 10, wobei das markierte Oligonucleotid ein blockiertes 3'-Ende hat, um die Verlängerung durch die Nucleinsäure-Polymerase zu verhindern.
13. PCR-Verfahren nach Anspruch 10, wobei das markierte Oligonucleotid genau komplementär zu einer der Sequenzvarianten ist.
14. PCR-Verfahren nach Anspruch 10, wobei das markierte Oligonucleotid mit einer fluoreszierenden Markierung markiert ist.
15. PCR-Verfahren nach Anspruch 10, wobei das markierte Oligonucleotid am 5'-Ende markiert ist.
16. PCR-Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Oligonucleotid intern markiert ist.
17. PCR-Verfahren nach Anspruch 10, wobei das markierte Oligonucleotid am 3'-Ende markiert ist.
18. PCR-Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Untersuchen der Spaltprodukte mittels Gelelektrophorese durchgeführt wird.
19. Kit zum Nachweis einer Ziel-Nucleinsäuresequenz in einer Probe, umfassend:
  - (a) mindestens ein markiertes Oligonucleotid, das eine Sequenz enthält, die komplementär zu einem Bereich der Ziel-Nucleinsäure ist, wobei sich das markierte Oligonucleotid an die Ziel-Nucleinsäuresequenz, die von den Oligonucleotidprimern aus Teil (b) eingegrenzt ist, anlagert, und ein Paar interaktive signalerzeugende Markierungen umfasst, die auf dem Oligonucleotid positioniert sind, um die Erzeugung eines detektierbaren Signals zu quenchen; und
  - (b) einen Satz von Oligonucleotidprimern, wobei

ein erster Primer eine Sequenz komplementär zu einem Bereich in einem Strang der Ziel-Nucleinsäuresequenz enthält und die Synthese eines Verlängerungsproduktes startet; und ein zweiter Primer eine Sequenz komplementär zu einem Bereich in einem zweiten Strang der Ziel-Nucleinsäuresequenz oder einem komplementären DNA-Strang enthält, und wobei jeder Oligonucleotidprimer so ausgewählt ist, dass er sich an seine komplementäre Matrize stromaufwärts von jedem an den gleichen Nucleinsäurestrang angelagerten markierten Oligonucleotid anlagert.

20. Kit nach Anspruch 19, zusätzlich umfassend eine Nucleinsäure-Polymerase mit einer 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität.

21. Kit nach Anspruch 20, wobei die Nucleinsäure-Polymerase ein thermostabiles Enzym ist.

22. Kit nach Anspruch 21, wobei das thermostabile Enzym eine DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* ist.

23. Kit nach einem der Ansprüche 19 bis 22, wobei die Oligonucleotide Desoxyribonucleotide umfassen.

24. Kit nach einem der Ansprüche 19 bis 23, wobei das markierte Oligonucleotid am 5'-Ende markiert ist.

25. Kit nach einem der Ansprüche 19 bis 24, wobei das markierte Oligonucleotid ferner eine Nucleotidsequenz umfasst, welche nicht-komplementär zu der Ziel-Nucleinsäuresequenz ist.

26. Kit nach einem der Ansprüche 19 bis 25, wobei das markierte Oligonucleotid mit einem Fluorophor markiert ist.

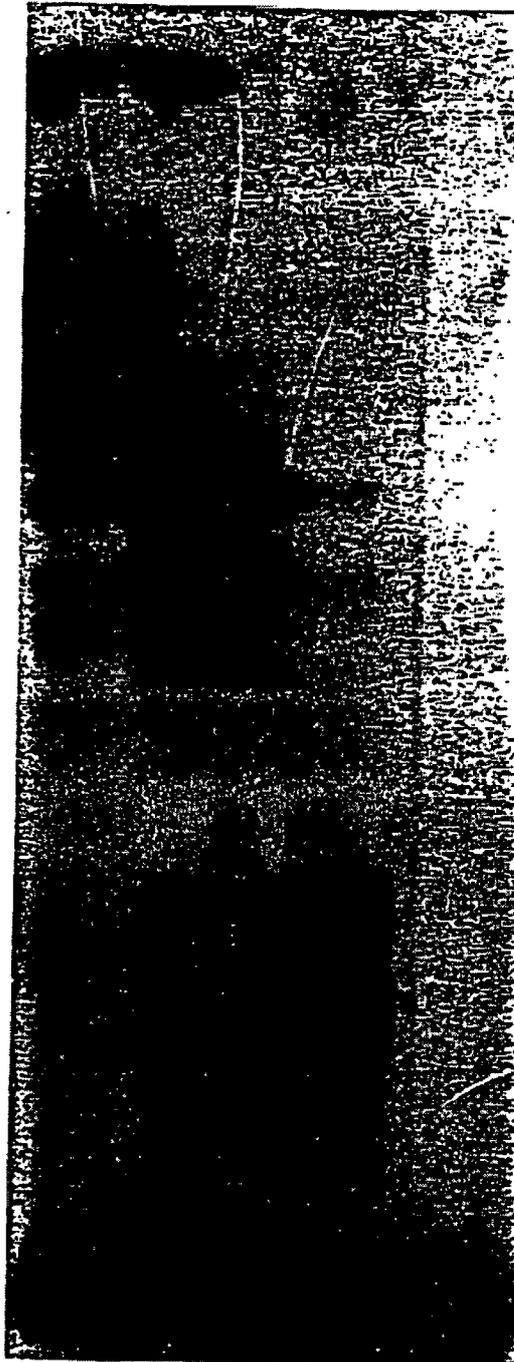
27. Kit nach Anspruch 26, wobei in dem markierten Oligonucleotid die erste Markierung ein Fluorophor ist und die zweite Markierung ein Quencher, der damit interagiert.

28. Kit nach einem der Ansprüche 19 bis 27, der in Teil (a) ein Paar markierter Oligonucleotidsonden enthält.

29. Kit nach einem der Ansprüche 19 bis 28, wobei die markierten Oligonucleotidsonden Sonden für multiple Allele oder artenspezifische Sonden sind.

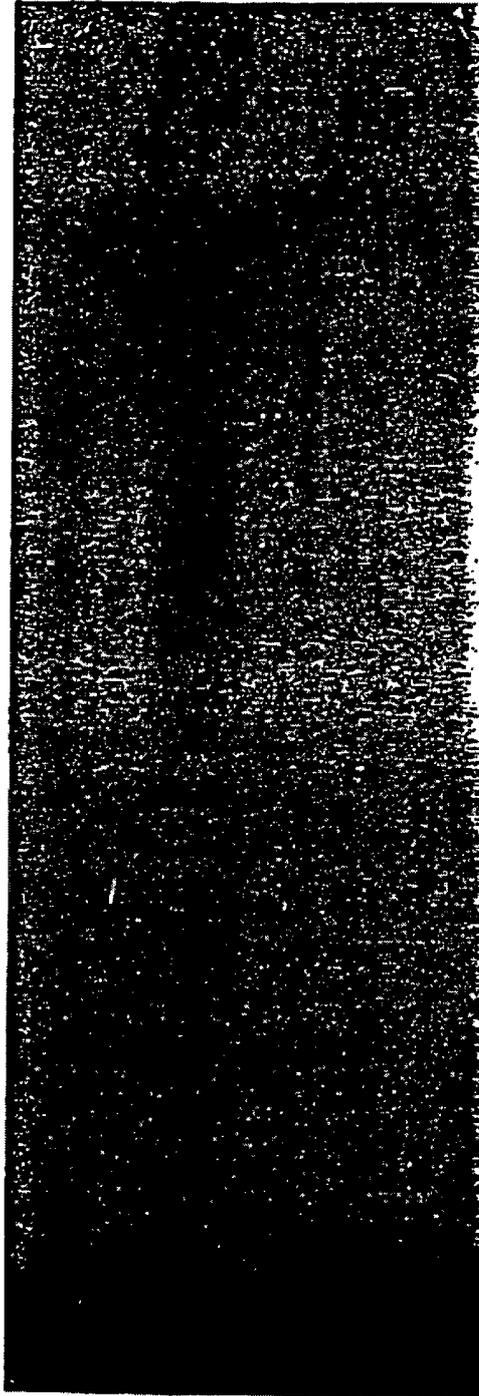
Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



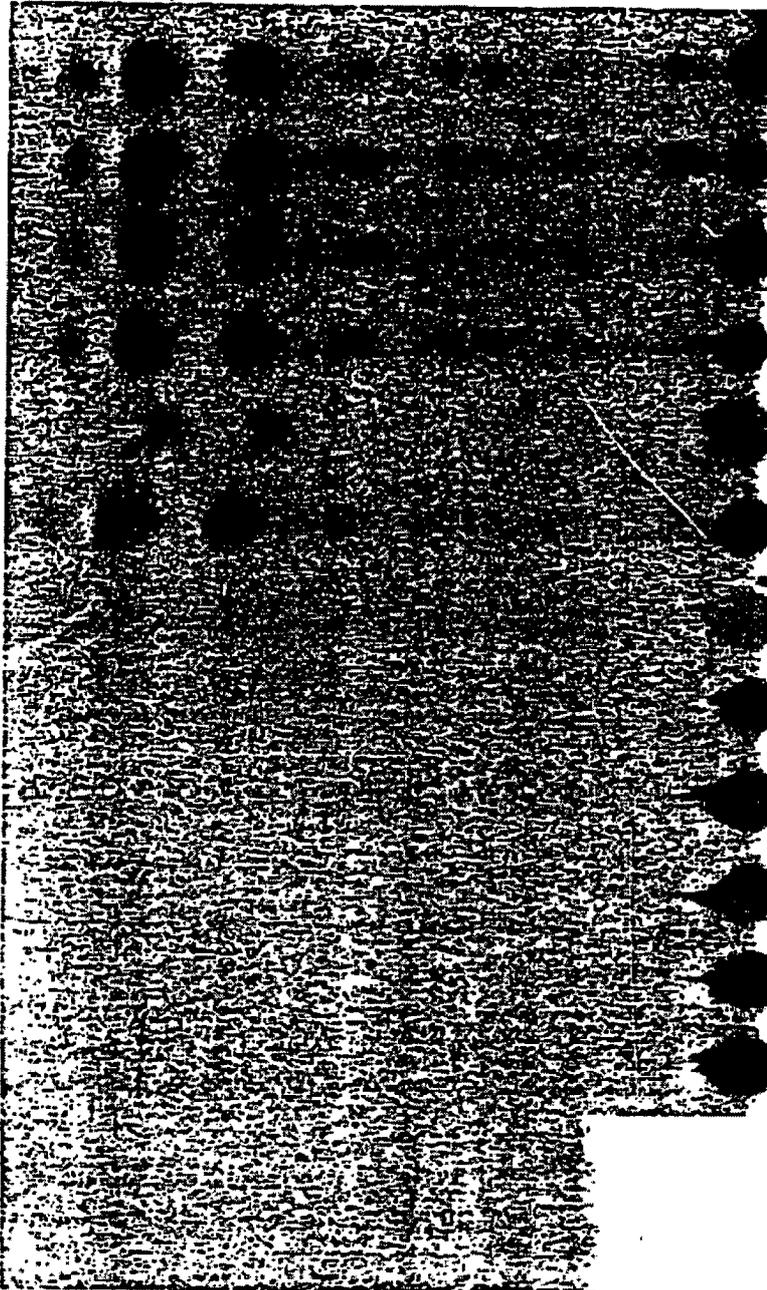
BAHN 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

**FIG. 1**



BAHN 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

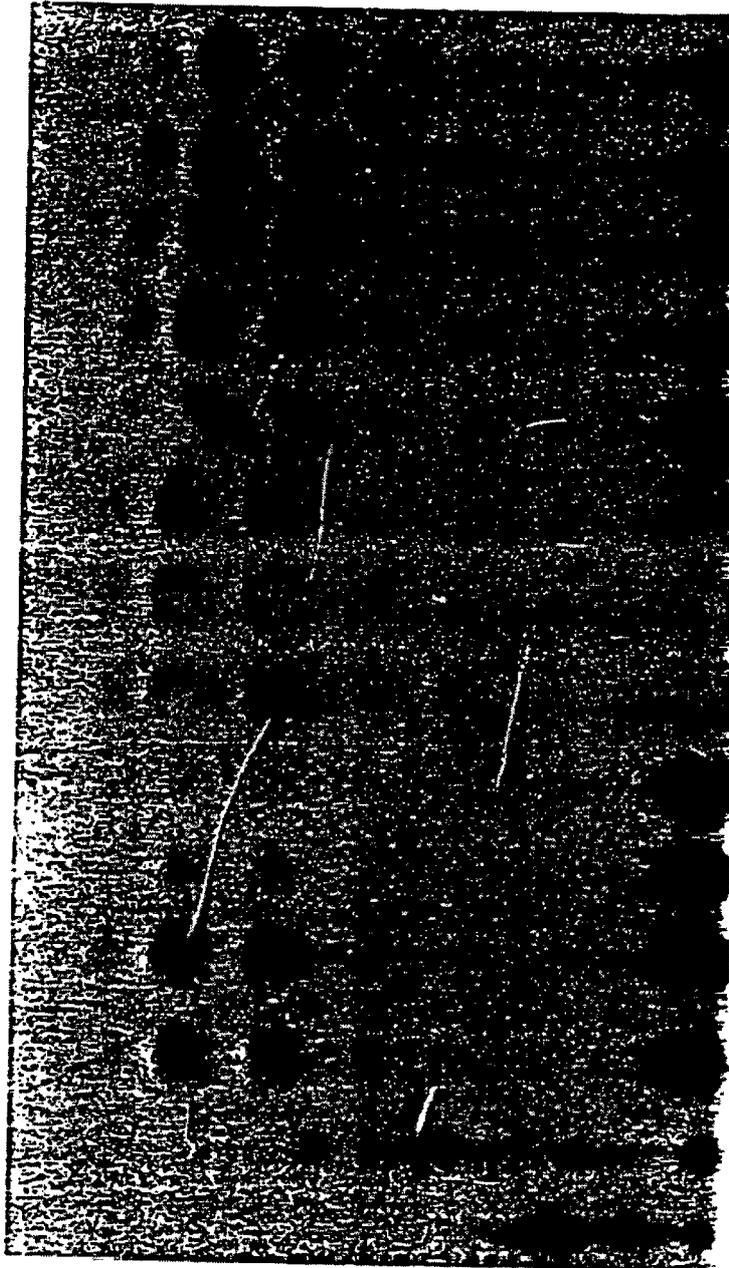
**FIG. 2**



BAHN  
ZYKLEN

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10		15		20		10		15		20	

**FIG. 3A**



BAHN 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12  
ZYKLEN 10 15 20

FIG. 3B

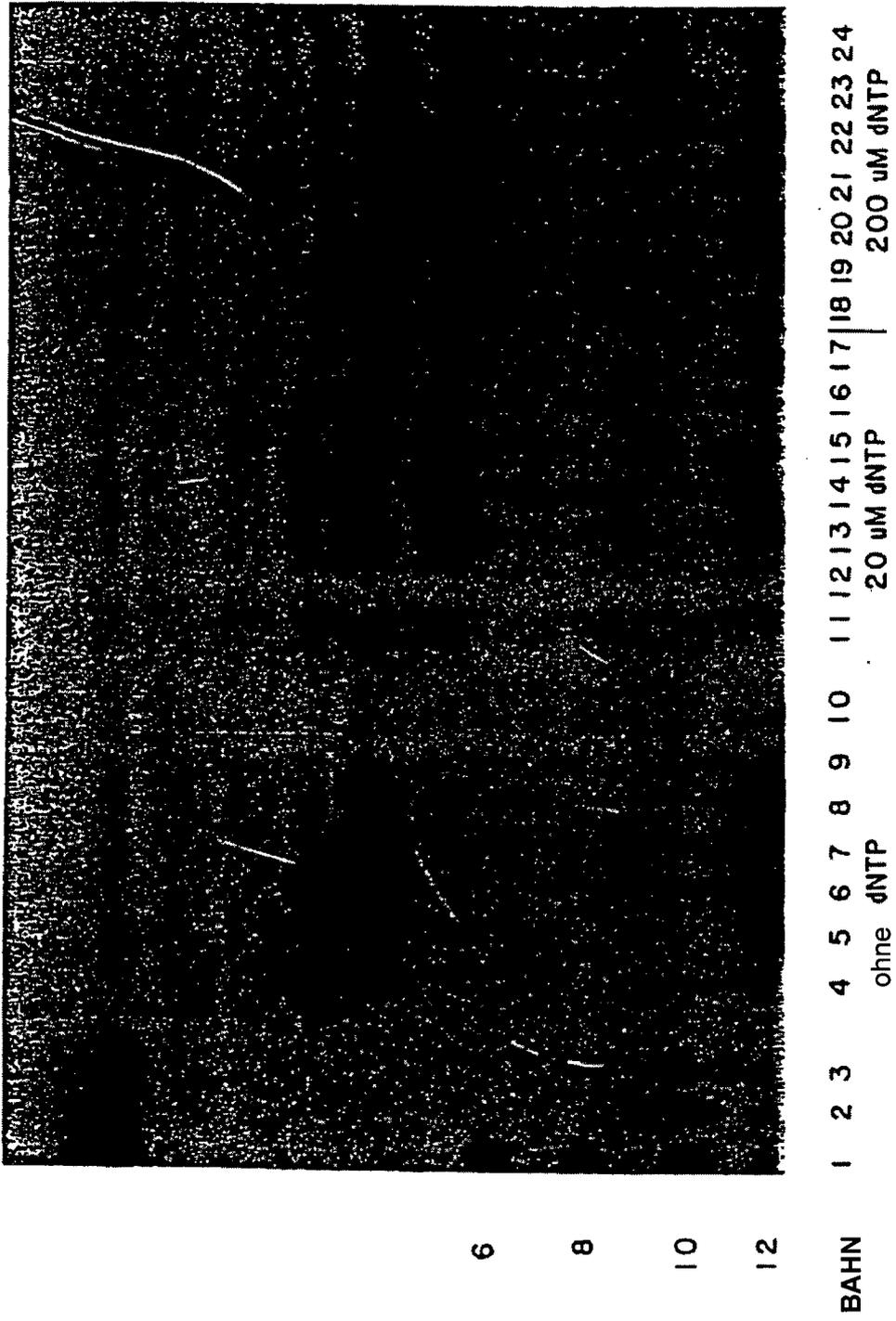
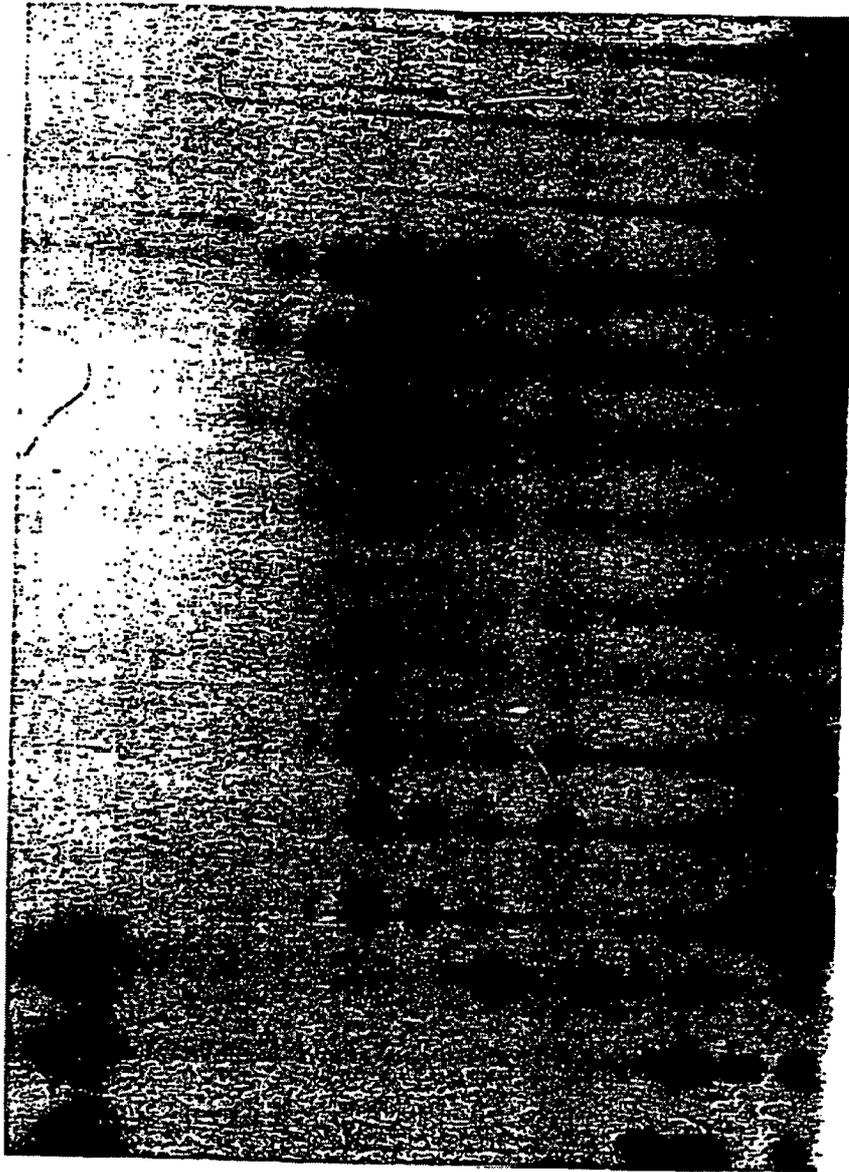


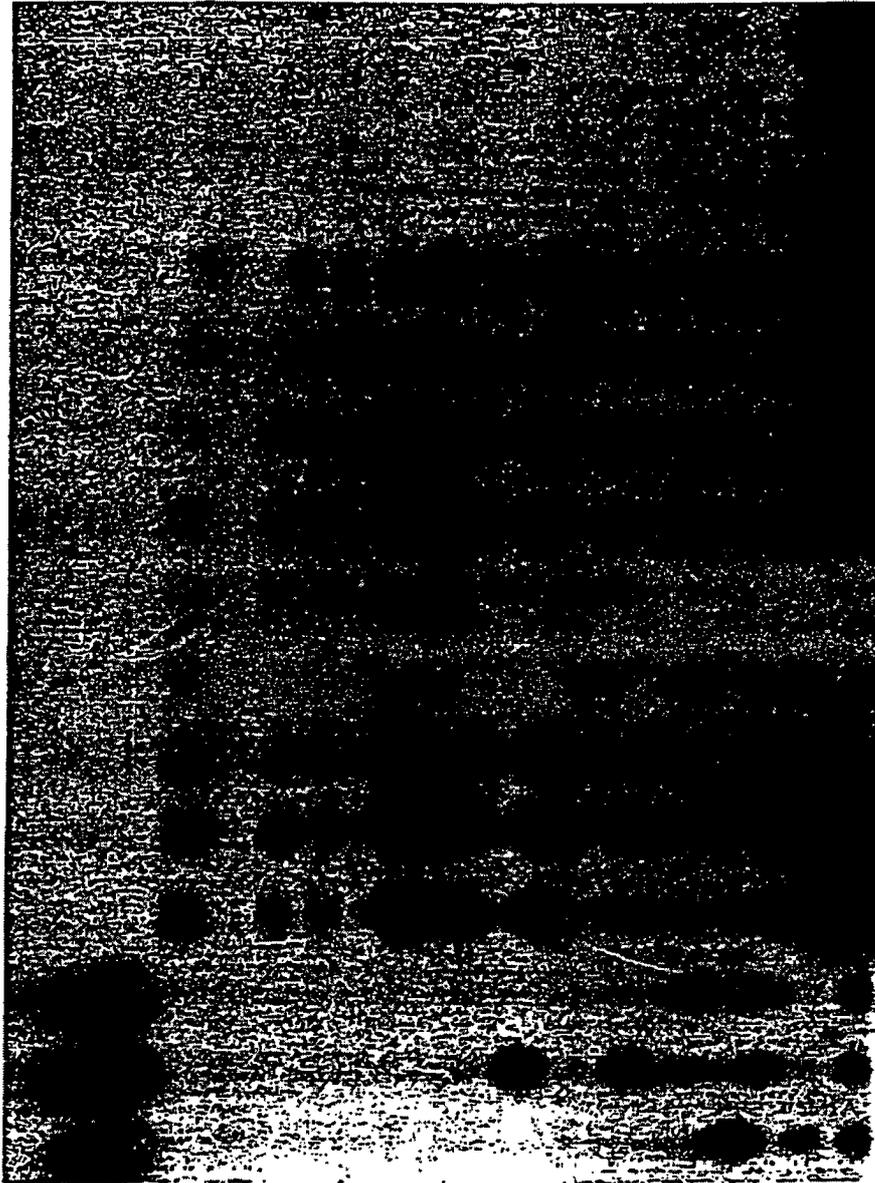
FIG. 4



6  
8  
9  
10  
12  
13

BAHN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
TEMP.					50C			60C			70C			70C	
MINUTEN				1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5
															OHNE MATRIZE

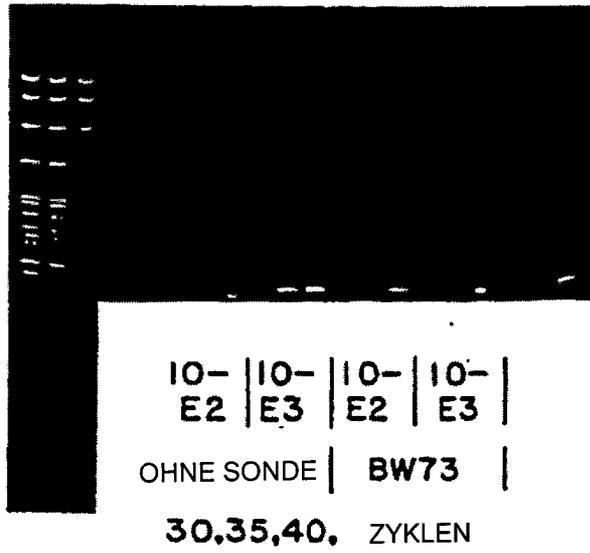
FIG. 5



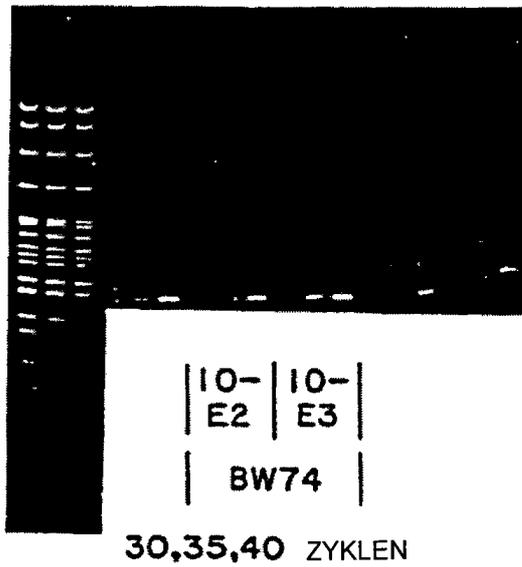
6  
8  
9  
10  
12

BAHN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
TEMP.				50C	50C	50C	60C	60C	60C	70C	70C	70C	70C	70C	70C
MINUTEN				1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5
															OHNE MATRITZE

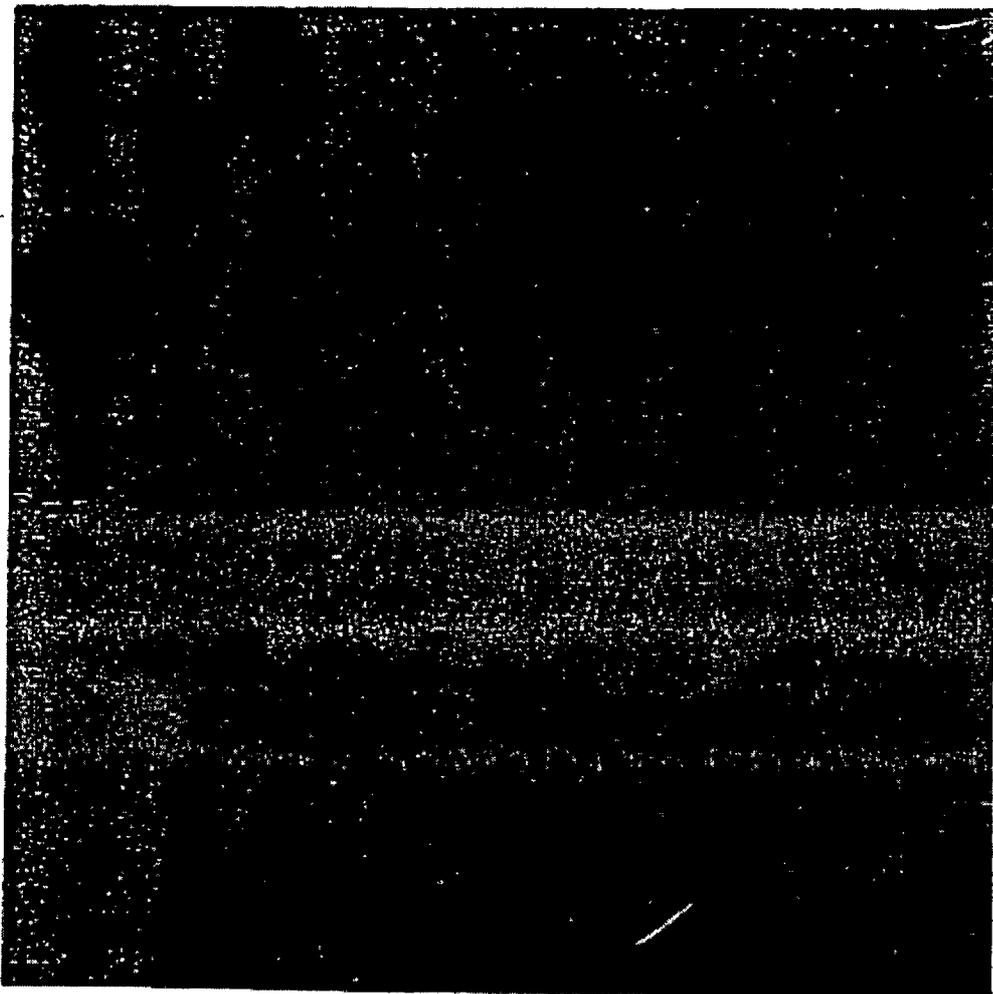
FIG. 6



**FIG. 7A**

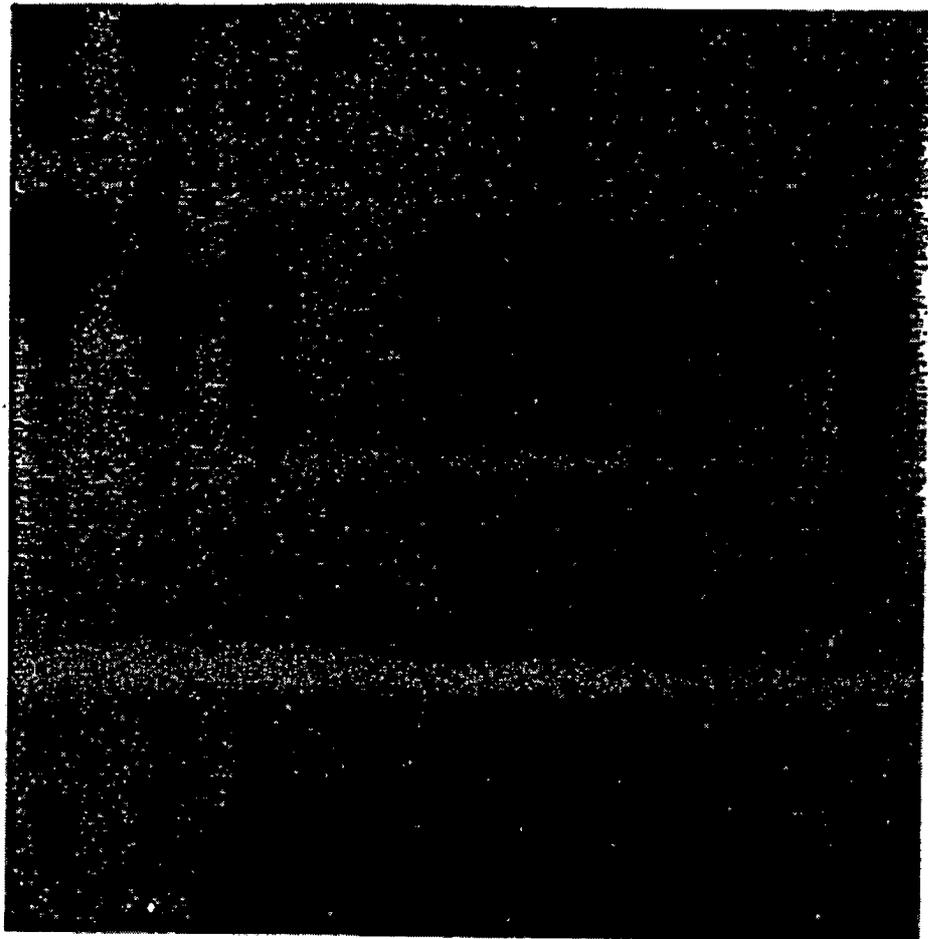


**FIG. 7B**



1 2 3 4 5 6 7 8 9

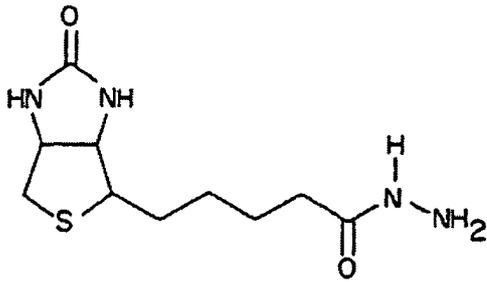
**FIG. 8A**



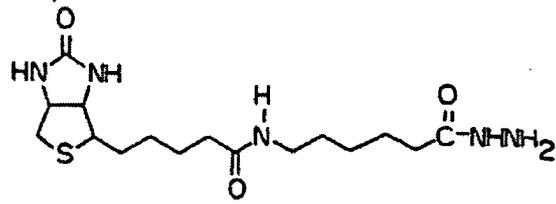
1 2 3 4 5 6 7 8 9

**FIG. 8B**





BIOTINHYDRAZID



LANGKETTIGES BIOTINHYDRAZID

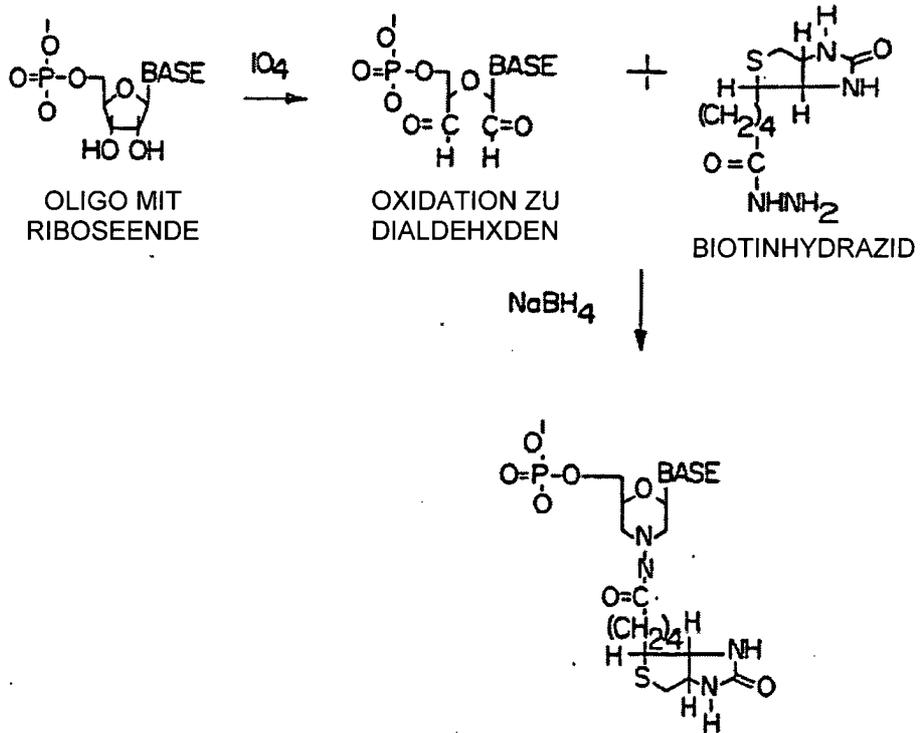
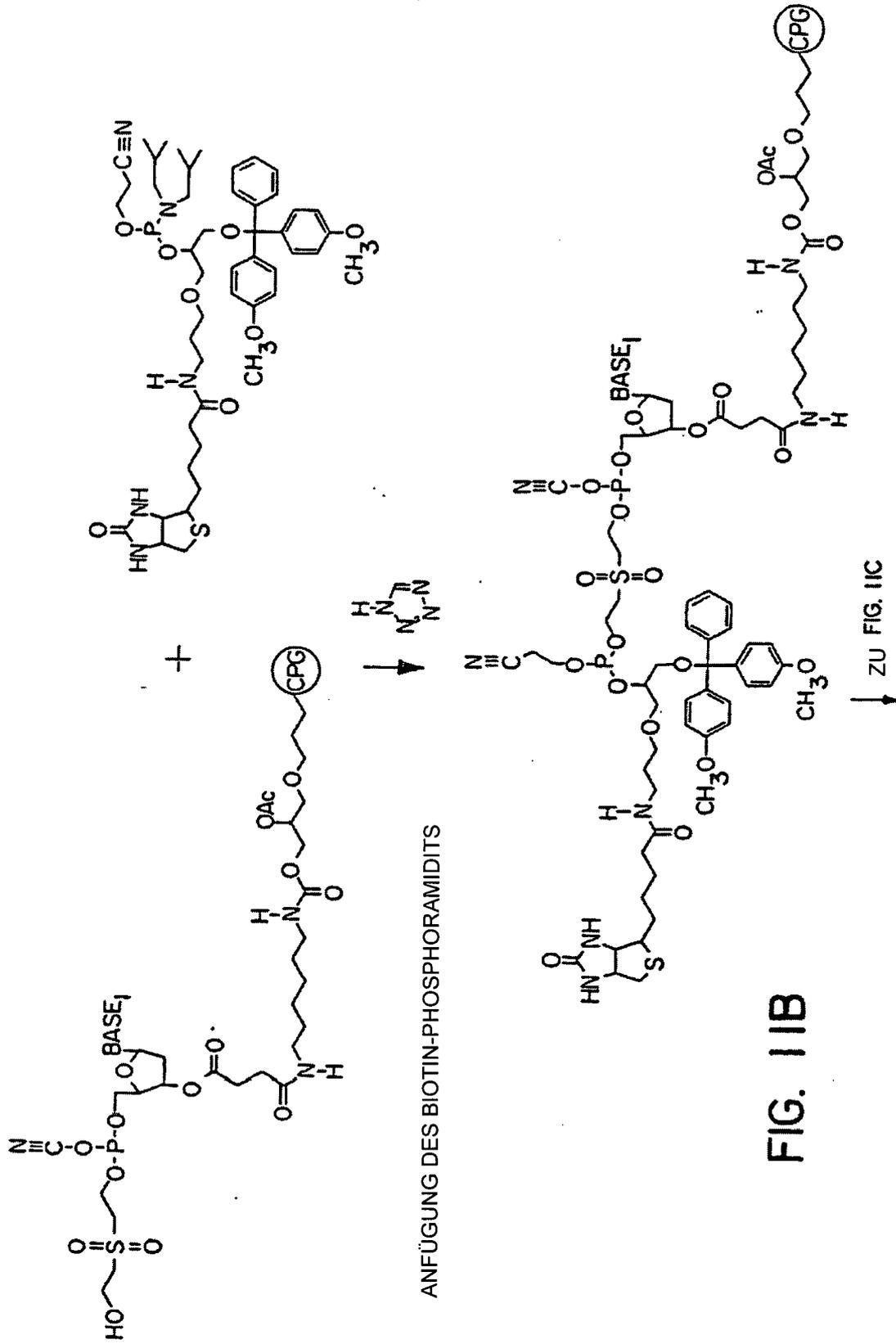


FIG. 10





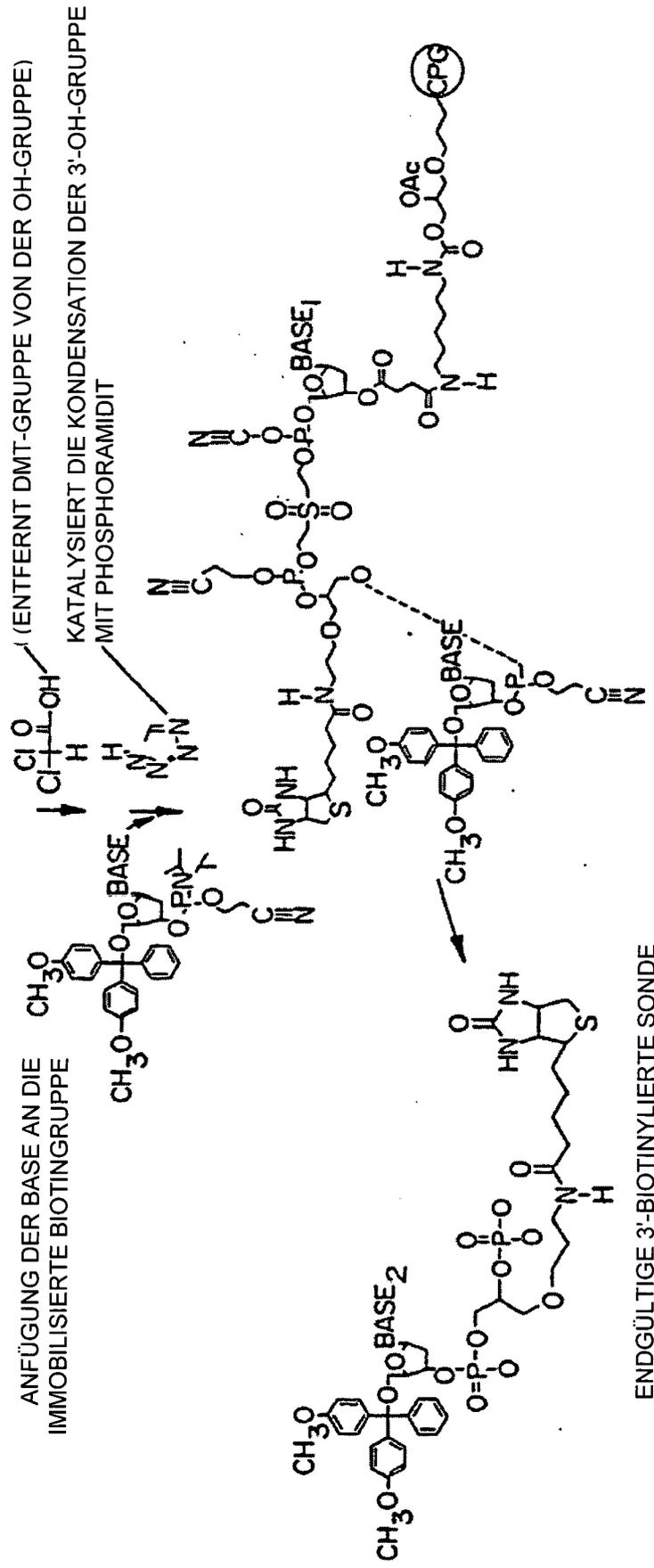


FIG. 11C

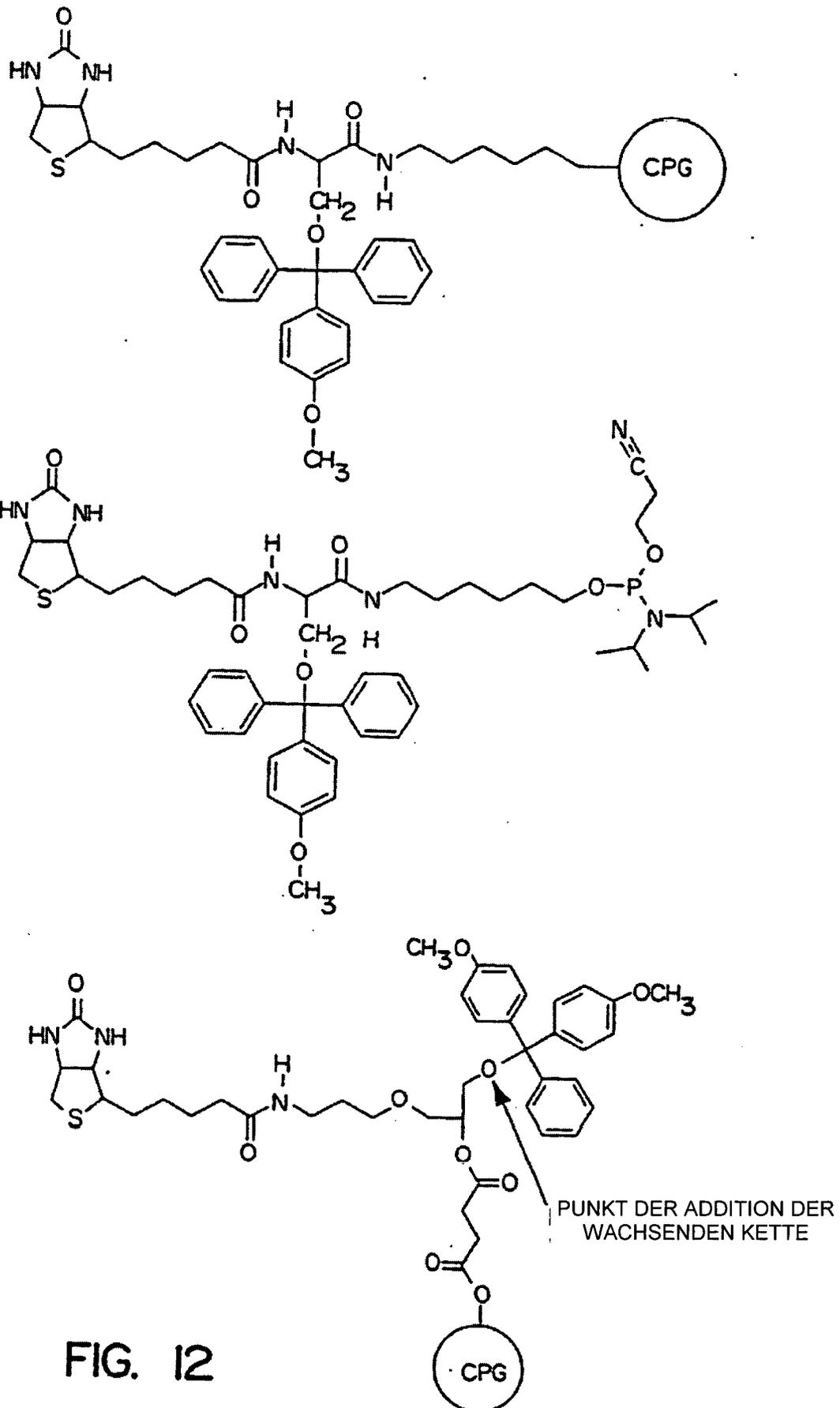


FIG. 12

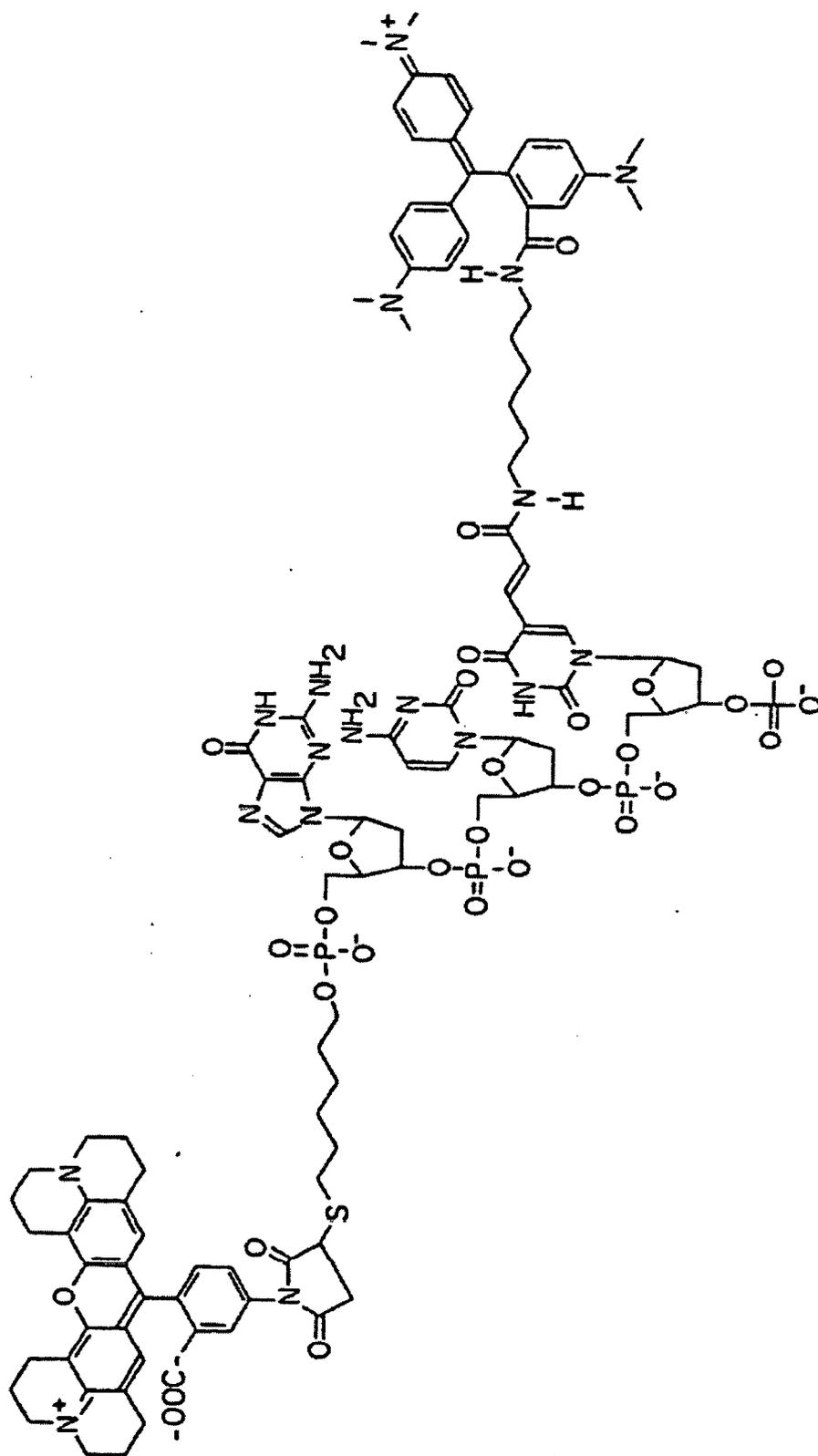


FIG. 13

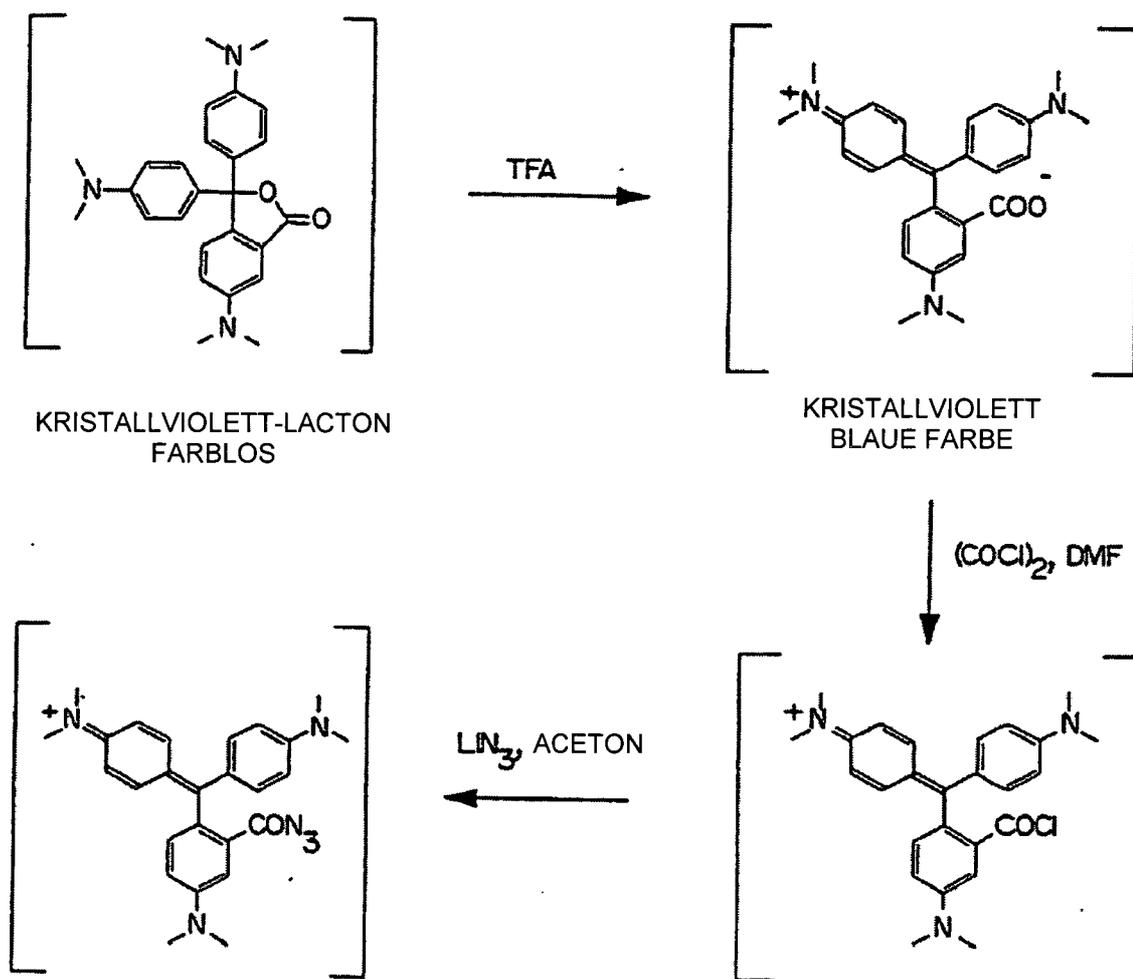


FIG. 14

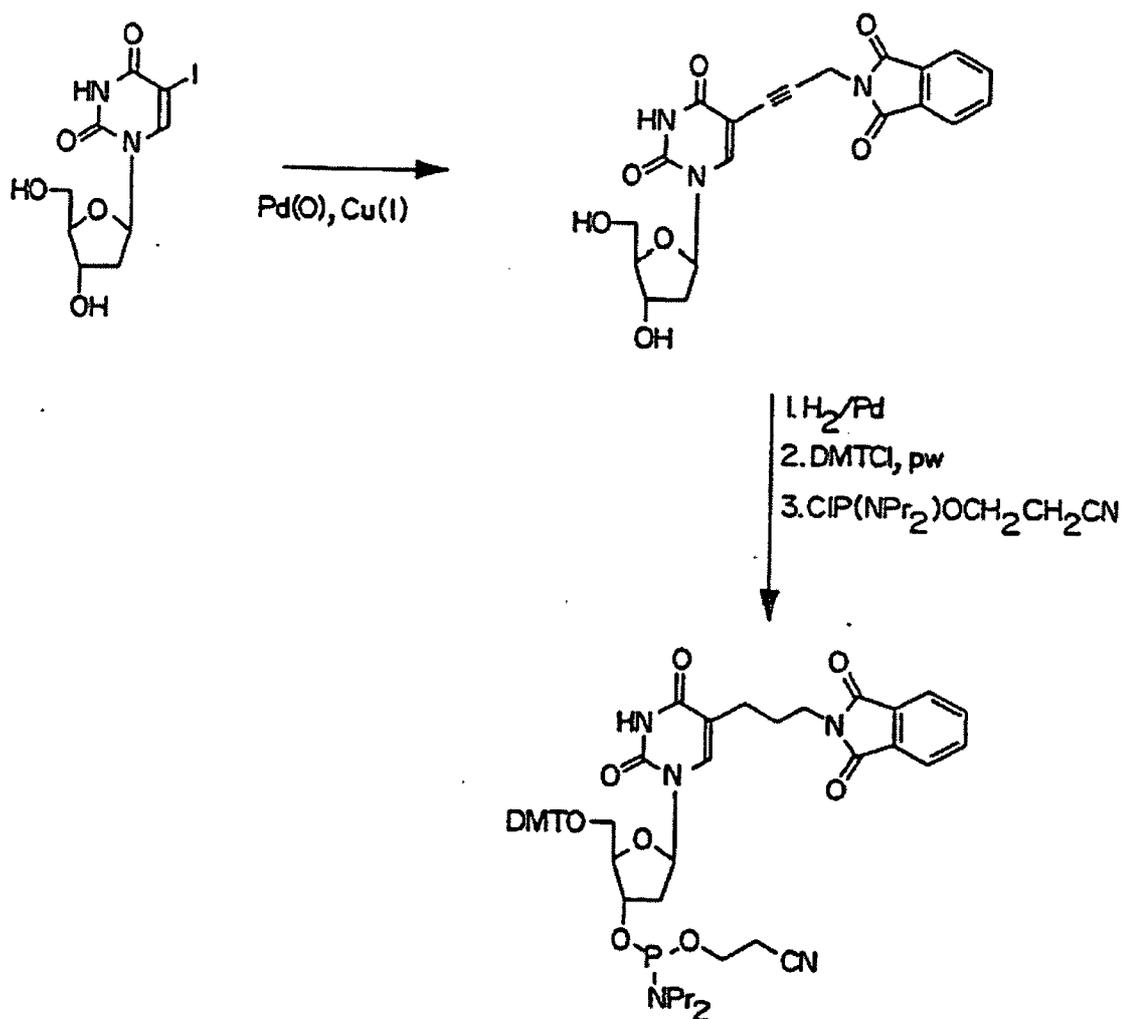


FIG. 15

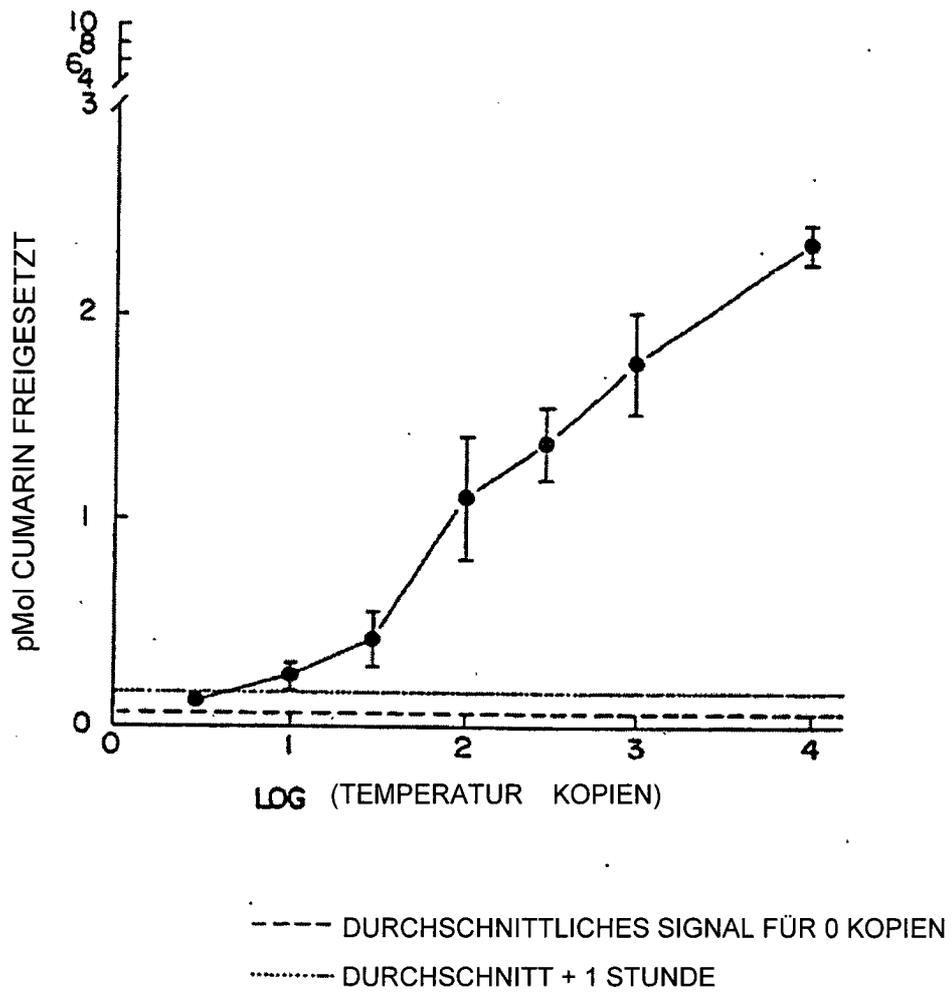


FIG. 16