

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. Januar 2012 (26.01.2012)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/010708 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/062692

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Juli 2011 (22.07.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2010 038 330.9 23. Juli 2010 (23.07.2010) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **AJ INNUSCREEN GMBH** [DE/DE]; Robert-
Roessle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HILLEBRAND, Timo**
[DE/DE]; Bogenstrasse 29, 15366 Hoppegarten (DE).
GRASER, Elmara [DE/DE]; Grosse Seestrasse 18,
13086 Berlin (DE). **DASKALOW, Katjana** [—/DE];
Deutschland (DE).

(74) Anwälte: **WEHLAN, Helmut** et al.; WEHLAN &
WEHLAN, Moellendorffstrasse 49, 10367 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

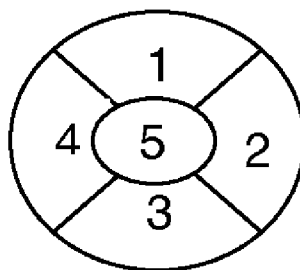
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: METHOD, DEVICE AND TEST KIT FOR MOLECULAR-BIOLOGICAL REACTIONS

(54) Bezeichnung : VERFAHREN, VORRICHTUNG UND TESTKIT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE REAKTIONEN

Figur 3



(57) Abstract: The invention relates to a device, method and test kit for carrying out molecular-biological reactions, wherein the different components for the molecular-biological reactions are located on a solid carrier in different, spatially separated compartments prior to the start of the reaction. The carrier is preferably a porous filter disk made of polyethylene. Fields of application are the amplification of nucleic acids, for example PCR or RealTime PCR, the reverse transcription of RNA in DNA enzyme-substrate interactions or antigen-antibody interactions, or protein synthesis.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung, ein Verfahren und ein Testkit zur Durchführung molekularbiologischer Reaktionen, wobei sich die verschiedenen Komponenten für die molekularbiologische Reaktionen vor dem Reaktionsstart

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2012/010708 A1



auf einem festen Träger in unterschiedlichen, räumlich getrennten, Kompartimenten befinden. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Träger um eine poröse Filterscheibe aus Polyethylen. Anwendungsgebiete sind die Amplifikation von Nukleinsäuren, z.B. PCR oder RealTime-PCR, die reverse Transkription von RNA in DNA Enzym- Substrat-, Antigen- Antikörper Wechselwirkungen oder die Proteinsynthese.

VERFAHREN, VORRICHTUNG UND TESTKIT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE REAKTIONEN

[0001] Gegenstand der Erfindung sind Reagenzienkomponenten für die Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen, insbesondere unter Feldbedingungen. Diese Reagenzienformulierungen sind auch bei Umgebungstemperatur lagerstabil. Mögliche Anwendungsgebiete sind die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die reverse Transkription (RT) Enzym-Substrat-, Antigen-Antikörper- Wechselwirkungen, und die Proteinsynthese.

Stand der Technik

[0002] Die Untersuchung diagnostisch relevanter biologischer Proben wie Serum, Plasma, Blut, Urin, Tupferproben oder Organabriebe zum Nachweis infektiöser Erreger hat in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen. Virusinfektionen wie HIV, HCV oder HBV sind weltweit auf dem Vormarsch. Darüber hinaus sind auch bakterielle Infektionen weltweit verstärkt vertreten, u.a. auch als Ergebnis beginnender klimatischer Veränderungen. Das Auftreten neuer, z.T. tödlich verlaufender Krankheiten mit einem extrem hohen Infektionspotential (Schweres Akutes Atemwegssyndrom (SARS), Vogelgrippe) zeigt immer deutlicher, dass in Zukunft eine schnelle und vor Ort durchführbare Diagnostik entscheidend für die Verhinderung von Epidemien sein wird. Darüber hinaus spielen einfach handhabbare, zuverlässige und zugleich relativ preiswerte diagnostische Systeme vor allem für Entwicklungsländer eine bedeutende Rolle bei der Bekämpfung der Ausbreitung von Infektionskrankheiten. Die derzeit vor allem für die Detektion viraler Infektionskrankheiten (HIV, HCV, HBV, Dengue, u.a.m.) eingesetzten Tests basieren mehrheitlich auf einer invasiven Probennahme und auf die Durchführung von Real-Time-PCR's. Diese Tests sind an extrem teure gerätetechnische Voraussetzungen und Reagenzien gebunden. Die Durchführung dieser Methode kann nur durch geschultes Fachpersonal in Speziallaboratorien erfolgen.

[0003] Ein weiterer Schwerpunkt betrifft die Durchführung von diagnostischen Tests in Bezug auf die Früherkennung von bioterroristischen Anschlägen (Pocken, Pest, Anthrax). In diesem Kontext ist es extrem wichtig, mobile Detektionssysteme einsetzen zu können. Einige wenige mobile Detektionssysteme sind mittlerweile verfügbar. Allerdings sind deren Applikationsfelder zurzeit noch sehr begrenzt. Diese Systeme basieren dabei prinzipiell auf der Um-

setzung klassischer diagnostischer Verfahren, welche unter Laborbedingungen standardisiert eingesetzt werden. Nach Isolierung der Nukleinsäuren erfolgen eine spezifische Amplifizierungsreaktion und ein spezifischer Nachweis der PCR-Produkte.

[0004] Problematisch für den Einsatz der klassischen labordiagnostischen Nachweisverfahren unter Feldbedingungen ist dabei aber, dass unter Feldbedingungen keine Kühlkapazitäten verfügbar sind und dass die umfangreichen Schritte der Pipettierung von Reaktionsansätzen (z.B. für eine PCR) ebenfalls unter Feldbedingungen nicht durchführbar sind. Diese Reaktionen sind in der Regel nur vom Fachpersonal durchzuführen.

[0005] Der Erfindung lag deshalb unter anderem die Aufgabe zugrunde, alle für molekular-diagnostische Detektionsverfahren benötigten kritischen Reagenzienkomponenten in einer Form zur Verfügung zu stellen, die:

1. eine sehr einfache Handhabung der Herstellung von Reaktionsansätzen erlauben und
2. auch ohne Kühlung und unter Umgebungstemperaturbedingungen einsetzbar sind.

[0006] Für molekulargenetische Nachweisverfahren ist eine Reihe von unterschiedlichsten Komponenten erforderlich. Dabei handelt es sich z.B. um Amplifizierungspuffer, Salze, Enzyme, dNTPs, Nukleinsäuren etc. Um die Reproduzierbarkeit und Funktionalität der Nachweisreaktion gewährleisten zu können, müssen sämtliche Komponenten für die Nachweisreaktion, einschließlich der Biomoleküle, möglichst über einen längeren Zeitraum stabil vorliegen. Eine Zusammenstellung mehrerer Lösungen (Kitkomponenten) ist nur so lange haltbar wie seine empfindlichste Komponente. Bei dieser kritischen Komponente handelt es sich häufig um Biokatalysatoren oder Proteine, die entsprechend der Anwendung in nativer und/ oder aktiver Form vorliegen müssen. Hochproblematisch sind auch Nukleotide (dNTPs), die oftmals einen einsatzlimitierenden Faktor darstellen, da sie sehr schnell inaktiv werden.

[0007] Um eine längere Haltbarkeit solcher Biomoleküle zu gewährleisten, werden diese häufig gekühlt verschickt und bei $\leq 4^{\circ}\text{C}$ gelagert. Dabei führt häufiges Einfrieren und Auftauen zum Aktivitätsverlust bzw. zur Zerstörung des Biomoleküls. Ursache dafür ist die Ausbildung von Eiskristallen im Lösungsmittel, welche die Proteine spalten können. Um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, werden häufig 50% des wässrigen Lösungsmittels durch Glycerin ersetzt. Dies kann jedoch nur dann zugegeben werden, wenn die Aktivität der Biomoleküle nicht beeinflusst wird und Glycerin die nachfolgenden Anwendungen nicht stört oder hemmt. Alternativ zu Glycerin können auch Polydextrose, Mannitol oder Sorbit als Feuchthaltemittel

eingesetzt werden, da sie Wasser funktionell ersetzen. Diese Art der Stabilisierung ist ebenfalls häufig an eine Kühlmöglichkeit gebunden, so dass der Abbau des Biomoleküls über einen längeren Zeitraum nicht ausgeschlossen werden kann. Eine erfolgreiche Lagerung von Enzym (vorzugsweise eine Taq HOT Start Polymerase), Primer, Sonde, dNTPs und eine interne Positivkontrolle ist in der US Patentanmeldung US 02005 006 98 98A1 beschrieben. Hier wurden die entsprechenden Chemikalien zusammen mit HEPES auf ein Kügelchen mit Mannitol aufgebracht, welches für die PCR in Wasser gelöst und anschließend eingesetzt wird. Ein ähnliches Prinzip findet sich auch in der Natur: Aufgrund einer hohen Konzentration nicht-reduzierender Zucker gelingt es einigen Organismen (Mikroorganismen, Pflanzen, Tiere), eine fast vollständige Dehydration (Anhydrobiose) zu überstehen und nach der Rehydratation den normalen Stoffwechsel fortzusetzen (Teramoto N, Sachinvala ND, Shibata M. Trehalose and trehalose-based polymers for environmentally benign, biocompatible and bioactive materials. *Molecules*. 2008 Aug 21;13(8):1773-816). Bei dem Zucker handelt es sich in der Regel um Trehalose, einem Zweifachzucker aus zwei Molekülen Glukose, welcher umgangssprachlich als „natürliches Frostschutzmittel“ bezeichnet wird. Es wird angenommen, dass Trehalose Wassermoleküle funktionell substituiert und so die molekulare Integrität des Biomoleküls erhält. Ein entsprechendes Patent (US Patent 4891319) beschreibt den Schutz von Proteinen und anderen biologischen Molekülen durch Zugabe von Trehalose zu einer wässrigen Lösung. Eine erfolgreiche Stabilisierung unter Erhalt der Aktivität der Komponenten ist so beispielsweise über 6 Monate bei 40°C für Blutgerinnungsfaktoren gelungen (US Patent 7501493) sowie für andere Moleküle (Paz-Alfaro KJ, Ruiz-Granados YG, Uribe-Carvajal S, Sampedro JG. Trehalose-mediated thermal stabilization of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J Biotechnol*. 2009 May 20;141(3-4):130-6. Epub 2009 Mar 25 und Morana A, Stiuso P, Colonna G, Lamberti M, Carteni M, De Rosa M. Stabilization of S-adenosyl-L-methionine promoted by trehalose. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Nov 14;1573(2):105-8). Entsprechend erfolgreich konnten auch Primer und Nukleinsäuren in Trehalose stabil gelagert werden, wie im Patent DE 10 2006 056 790 B3 beschrieben. Nachteil einer Lagerstabilisierung mit Zuckern ist, dass eine geringe Anwesenheit von Wasser bzw. ein unvollständiges Trocknen der Reagenzien die Gefahr einer Kontamination mit Bakterien oder Pilzen birgt.

[0008] Eine weitere Möglichkeit einer längeren Lagerstabilität bietet der generelle Entzug von Wasser. So können Biomoleküle gefriergetrocknet und vor Gebrauch wieder rehydriert werden. Allerdings müssen auch hier die getrockneten Biomoleküle kühl gelagert werden. In diesem Zusammenhang seien auch die 2,6 nm großen, lyophilisierten Partikel der Firma

Cepheid (Sunnyvale, CA) erwähnt. Hier werden dNTPs, Polymerase, Magnesiumchlorid und Puffer in einem Partikel kombiniert und können nach Zugabe von Wasser und Primern für weitere Applikationen (PCR) verwendet werden. Cepheid greift dafür auf ein von ABAXIS Inc. entwickeltes Verfahren der Gefriertrocknung zurück, der sogenannten „Orbos Technology“ (http://www.abaxis.com/about_us/history.html). Nachteil der Methode des Eintrocknens ist der recht hohe Geräteaufwand für eine Gefriertrocknung.

[0009] Darüber hinaus wäre es sinnvoll, auch Primer und Sonden mit eintrocknen zu können. Dies ist jedoch in dieser Form nicht möglich, da das Mischen von Primer und Sonde zu Primer-Dimeren und anderen Artefakten führen würde, wodurch eine einwandfreie anschließende PCR nicht mehr gewährleistet werden kann. Darüber hinaus würde dies bei einer Reihe von Amplifizierungsreaktionen und insbesondere Reaktionen, welche eine Amplifizierungsreaktion mit einer Sondenhybridisierung koppeln, zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Die Dimerbildung stellt daher bei der Stabilisierung von PCR-Ansätzen ein wesentliches Problem dar, da mehrere einzelne Reaktionsgefäße notwendig wären um den optimalen Reaktionsablauf gewährleisten zu können. Eine solche Lösung ist allerdings für Feldversuche unhandlich, birgt eine Verwechslungs- und Kontaminationsgefahr und erschwert die Handhabbarkeit des gesamten Systems. Prinzipiell nachteilig ist auch, dass diese Gemische auf Grund der Beimischung von Lagerstabilisatoren stark hygroskopisch (wasseranziehend) wirken, sodass die Aktivität und Lagerstabilität der Komponenten rasch bei unsachgemäßer Lagerung abnimmt. Um dem entgegenzuwirken, kann das eingetrocknete Gemisch mit einer Paraffinschicht überzogen. Durch Zugabe einer wässrigen Lösung und durch Erwärmung schmilzt die Paraffinschicht, die getrockneten Substanzen lösen sich auf und sind für die PCR-Methode zugänglich. Diese Methode wird im EU Patent DE 10 2004 021 822 B3 offenbart. Hier werden die für die PCR notwendigen Reagenzien direkt an der Kavität eingetrocknet, wo auch die PCR Reaktion stattfindet.

[0010] Weitere lagerstabile bzw. präformulierte Reaktionsmixturen sind kommerziell von der Firma GE Healthcare verfügbar. Bei der Produktlinie „Ready-to-go“ handelt es sich um teilweise stabilisierte Komponenten für die PCR. So sind auf kleinen Kügelchen Taq-Polymerase, dNTPs und Amplifikationspuffer aufgebracht. Diese Kügelchen sind bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum stabil. Der Nachteil dieser Methode ist, dass Primer und Sonde frisch vom Kunden zugegeben werden müssen, was diese Methode ungeeignet macht für die Anwendung außerhalb eines Labors. Dieser Nachteil wird bei einer von Klatser et al. (Klatser PR, Sjoukje Kuijper, van Ingen CW, Kolk AHJ. Stabilized, Freeze-dried PCR

Mix for detection of Mycobacteria. J Clin Microb, 1998 Jun 36(6):1798-1800 1998) entwickelten Methode ausgeglichen. Hierbei werden Primer, Puffer, dNTPs, Uracil-DNA-Glykosylase und Polymerase mit 5% Trehalose gefriergetrocknet. Wurden die Ansätze bei 4 oder 20°C gelagert, waren sie bis zu einem Jahr nach der Trocknung noch aktiv. Eine Lagerung bei 37°C verkürzte die Lagerzeit auf 3 Monate bzw. bei 56°C auf 1 Woche. Die Autoren verwendeten 2 verschiedenen Polymerasen. Dabei stellte sich heraus, dass ein höherer Gehalt an Glycerol die Lagerstabilität negativ beeinflusst, da Glycerol hygroskopisch wirkt. Nachteilig hierbei ist aber, dass Trehalose eine Reihe von Amplifizierungsreaktionen und insbesondere Reaktionen, welche eine Amplifizierungsreaktion mit einer Sondenhybridisierung koppeln, inhibiert. Damit ist ein solches Mittel in keiner Weise universell einsetzbar. Ein ähnliches Verfahren wurde auch im Patent DE 10 2006 056 790 B3 offengelegt. Hier wurden sämtliche Komponenten in einem geeigneten Gefäß eingetrocknet und kurz vor der PCR mit Wasser in Lösung gebracht. Auch hier wurde das eingetrocknete Gemisch durch einen Kohlenwasserstoffwachs zur besseren Lagerstabilität überzogen. Diese Methode wurde auch durch Wolff et al. für eine nested PCR in einem Reaktionsgefäß beschrieben (Wolff C, Hörnschemeyer D, Wolff D, Kleesiek K. Single-tube nested PCR with room-temperature-stable reagents. PCR Methods Appl. 1995 4:376-379). Laut der Patentschrift DE 60 2004 002 48/5 T2 kann die durch Trehalose vermittelte Stabilisierung der Reagenzien noch erhöht werden, indem wie in diesem Fall Prionex zugegeben wurde, ein Polypeptid aus porcinem Hautkollagen. Hier betrug die Stabilität der Reagenzien statt 30 Tage bei 37°C vier Mal solange nach Zugabe des Polypeptids als mit Trehalose allein.

[0011] Ein weiteres Verfahren zur Stabilisierung von Biomolekülen besteht darin, diese an einen Formträger zu binden. Über eine Kopplungsreaktion mit einer Aminogruppe bindet das Biomolekül stabil und dauerhaft an das Trägermaterial und kann so für Nachweisreaktionen genutzt werden. Diese Methode ist patentiert und offengelegt (European Patent Application EP0511559). Eine abgewandelte, ebenfalls patentierte Methode zur stabilen Immobilisierung von Antikörpern (U.S. Patent 4,948,836) und Oligonukleotiden (Deutsches Patent DE 10053553C2) ist ebenfalls beschrieben. Die Trocknung erfolgt teilweise nach Inkubation in einer Protein-Zuckerlösung. Dieses Verfahren ist sehr umständlich und zeitaufwendig und kann in dieser Form nicht für eine Mischung verschiedener Substanzen, wie sie für eine PCR notwendig sind, realisiert werden.

[0012] Die für ein molekulargenetisches Nachweisverfahren (beispielsweise PCR oder reverse Transkription) notwendigen Komponenten sind Nukleotidtriphosphate (dNTPs), Primer,

ggf. Sonde, Puffer und ein Enzym (Taq oder Reverse Transkriptase), wobei letzteres die Reaktion katalysiert. Eine der kritischen Komponenten für die Lagerstabilität der einzelnen Lösungen sind die dNTPs, die bei einem physiologischen pH-Wert (pH 7,0 bis 7,5) zu entsprechenden Diphosphaten und Monophosphaten zerfallen. So nimmt unter physiologischen Bedingungen der Gehalt an funktionellen dNTPs nach 10 Tagen bei 37°C bereits um 2-3% ab. Um diesem entgegenzuwirken, können die dNTPs bei Anwesenheit eines entsprechenden Stabilisators gelagert werden. Insbesondere die Stabilität von Adenosintriphosphat konnte unter Anwesenheit von EDTA (pH 8,3 bis 9,2), Guanidin/ Aminoguanidin (pH 9,0 bis 10,0) oder Glycerol/ Hydrogenphosphat (pH 3,7) als Stabilisatoren bestätigt werden (EP0941370 B1). Eine stabile Langzeitlagerung ohne die Notwendigkeit eines Stabilisators wird im Patent EP 0941370B1 offengelegt. Hier wird die Stabilität der dNTPs bei einem pH-Wert zwischen 8,0 bis 10,0 beschrieben, wobei der Wert sowohl durch Zugabe von Basen, als auch durch Zugabe von Puffern (Tris-Puffer, Natriumcarbonat-Puffer, Phosphatpuffer) eingestellt werden kann.

[0013] Zum Stand der Technik gehören auch die Druckschriften US 3645853 A, DE 2800437 A1, DE1220083 A, WO 98/37229 A1, EP0733714A2, EP0823972 A1 und EP0925113 A1.

[0014] Im US-Patent 3,645,853 wird eine diagnostische Zusammensetzung und ein Verfahren zum Nachweis der Nitratreduktion beschrieben. Es wird ein schwammartiges Material offenbart, das mindestens vier imprägnierte Zonen enthält. Die Kompartimentierung erfolgt dadurch, dass Lösungen einzeln auf Papier aufgetragen werden und nach vollständiger Trocknung dann manuell zusammengefügt werden. Eine Kompatibilität von Natur aus ist nicht vorhanden. Nur von einer Seite wird Substanz abgelöst. Übrige Komponenten werden nicht in Lösung gebracht, sondern es erfolgt ein direkter Farbumschlag nach Mischen der Lösungen auf dem Streifen.

[0015] DE 2800437 A1 erwähnt eine Vorrichtung zum Erhalt einer nicht-toxischen Atmosphäre zur Verwendung beim Züchten von anaeroben Mikroorganismen, wobei die Oberflächenfläche und die Permeabilität einer Membran so ausgewählt sind, dass die Zutrittsgeschwindigkeit der Flüssigkeit und damit auch die Erzeugungsgeschwindigkeit der Gasatmosphäre kontrolliert wird.

[0016] Die Offenlegungsschrift DE 1220083 A beschreibt Teilkammern, die in eine Hauptkammer integriert sind und durch einschiebbare Plättchen voneinander trennbar sind.

[0017] In der internationalen Patentanmeldung WO 98/37229 A1 wird ein Verfahren und Apparatur für einen schnellen Hygiene-Test vorgeschlagen. Dabei wird eine Flüssigkeit, die ein Extraktionsreagens einschließen kann, wird auf eine Testoberfläche aufgebracht. Es liegt keine Kompartimentierung vor.

5 [0018] In EP 0 733 714 A2 wird eine Nukleinsäure-Amplifikations-Methode und -apparatur beschrieben. Eine Probe wird vom Probenauftrag zum Reaktionsbereich gepumpt. Der Reaktionsbereich wird bevorzugt als kontinuierlicher Kanal beschrieben: "Although it is preferred to provide the sample area and reaction area in the form of a continuous, undivided channel as shown, it is within the scope of the present invention to provide partitions or barriers between
10 these areas if desired. It is also within the scope of the invention to provided partitions or barriers between the decontamination zone and amplification zone of the reaction area." Allerdings besteht für die Autoren keine Intention, die Produkte voneinander zu trennen.

[0019] Gegenstand der Druckschrift EP0733714A2 ist eine diagnostische Vorrichtung, bei der das Freisetzungs- und Einfangmedium ein zweiphasiges chromatographisches Substrat
15 bilden. Beide Medien sind getrennt voneinander und bestehen aus unterschiedlichen Materialien. Das Einfangmedium hat keine weitere immobilisierten Komponenten und dient der Adsorption. Das FreisetzungsmEDIUM ist ein hydrophiles Material zur Halterung, Freisetzung und Transport des immunologischen Materials. Das Aufbringen erfolgt durch Kapillarwirkungen der Testlösungen. Ein Vermischen wird dabei nicht gezielt verhindert.

20 [0020] EP 0 925 113 A1 berichtet über eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Aufbewahren und Verteilen biochemischen Reagenzien. Jedes Reagenz ist in je einem Raum angeordnet, wobei die Räume voneinander getrennt sind. Die Reagenz-Patrone ist ein Einzelgegenstand. Reagenz-Patronen werden zur Kassetten Patrone kombiniert.

[0021] Die Analyse des Standes der Technik zeigt damit eindrucksvoll, dass es eine Vielzahl
25 von Offenbarungen gibt, welche sich mit der Stabilisierung von Reaktionskomponenten für molekulargenetische Nachweisverfahren beschäftigen. Dabei handelt es sich aber immer um Lösungsansätze, welche keine universelle Anwendung der eigentlichen Nachweisreaktion garantieren können oder nicht den gesamten erforderlichen Reaktionsmix stabilisieren können.

30

Aufgabe der Erfindung

[0022] Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, die im Stand der Technik genannten Nachteile zu beseitigen.

5 Lösung der Aufgabe

[0023] Die Aufgabe wurde gemäß den Merkmalen der Patentansprüche gelöst. Erfindungsgemäß wurde mit der vorliegenden Erfindung ein molekulardiagnostisches Detektionsverfahren bereitgestellt, dass alle benötigten kritischen Reagenzienkomponenten in einer Form ent-
10 hält, welche:

1. eine sehr einfache Handhabung eines molekulargenetischen Nachweisverfahrens erlaubt und
2. auch ohne Kühlung unter Umgebungstemperaturbedingungen universell einsetzbar sind.

15

[0024] Insbesondere die räumliche Trennung der Komponenten, die bei der Amplifizierung bzw. reversen Transkription beteiligt sind, ist bei keiner der bisher offenbarten Lösung berücksichtigt worden. Das erfindungsgemäße Mittel berücksichtigt aber gerade die räumliche Trennung der Komponenten, welche für die Reaktionen benötigt werden und ermöglicht so
20 einen Schutz der beteiligten Komponenten voneinander. Diese Herangehensweise macht so einen unerwünschten Start von nichtspezifischen Reaktionen (z.B. Bildung von Primerdimären, unspezifische Amplifizierung bei den suboptimalen Bedingungen etc.) unmöglich.

[0025] Die Erfindung wird nachfolgend beschrieben:

25 [0026] Für eine PCR-basierte Amplifizierungsreaktion (Standard PCR oder Real-Time PCR) benötigte Polymerase, Primer oder Primer und Sonden werden auf eine poröse Filterscheibe (z.B. aus Polyethylen) verbracht. Die Verwendung eines solchen Materials zeigt überraschenderweise eine Reihe von Vorteilen. Es ist möglich die Komponenten als Einzelkomponente an destingten Orten auf der Filterscheibe zu positionieren und damit kompartimentiert zu lagern.
30 Damit kommen die zu kombinierenden Komponenten nicht in Kontakt zueinander. Dies hat den Vorteil, dass eine unerwünschte Reaktion der Komponenten untereinander vermieden

werden kann. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass durch das Eindringen der Komponenten in die Poren der Filterscheibe ein viel besser Schutz gegenüber schädigenden Umwelteinflüssen besteht, was sich günstig auf eine Lagerung bei Umgebungstemperatur ohne Aktivitätsverlust auswirkt. Nach Verbringung aller jeweils benötigten Komponenten auf die poröse Filterscheibe werden die Komponenten eingetrocknet (z.B. Inkubation bei 37°C für 1h) oder aber auch lyophilisiert. Nachfolgend wird die Filterscheibe trocken gelagert. Das Freisetzen der verbrachten Reaktionskomponenten erfolgt dadurch, dass man der Filterscheibe eine wässrige Lösung zuführt, welche alle weiteren für die Amplifizierungsreaktion/Detekti-
5 on/Detekti-reaktion benötigten Reaktionskomponenten in der jeweils optimalen Konzentration enthält (dNTPs, Amplifikationspuffer, Magnesium und ggf. weitere Additive). Diese wässrige Lösung kann vorab als Mastermix vorbereitet werden und kann auch schon die zu untersuchende Nukleinsäure enthalten. Vorzugsweise wird der wässrigen Lösung ein Detergenz (z.B. ein Octylphenoethoxylate oder Polysorbat) zugegeben. Dieses Detergenz verbessert die Freisetzung der auf der Filterscheibe befindlichen Komponenten. Nach kurzer Inkuba-
10 tion wird der Ansatz in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und die Reaktion durchgeführt.

[0027] Neben der Verbringung einer Polymerase, Primern bzw. Primern und Sonde kann auf die Filterscheibe zusätzlich auch die benötigte Menge an dNTPs kompartmentiert und damit räumlich getrennt von den anderen Reaktionskomponenten verbracht werden. Die Herstellung der lagerstabilen Filterscheibe und die Lagerung erfolgt wie beschrieben. Das Freisetzen der verbrachten Reaktionskomponenten erfolgt wiederum dadurch, dass man der Filterscheibe eine wässrige Lösung zuführt, welche alle weiteren für die Amplifizierungsreaktion/Detekti-
20 on/Detekti-reaktion benötigten Reaktionskomponenten in der jeweils optimalen Konzentration enthalten. Diese wässrige Lösung kann vorab vorbereitet werden und kann auch schon die zu untersuchende Nukleinsäure enthalten. Vorteilhaft bei dieser Ausführungsform ist, dass auch die dNTPs lagerstabil auf der Filterscheibe verbracht wurden. Damit muss diese Komponente der wässrigen Lösung zur Freisetzung der Reaktionskomponenten nicht mehr enthalten sein. Das erleichtert die Durchführung einer Nachweisreaktion, z.B. unter Feldbedingungen zusätzlich, da die wässrige Lösung nur noch Amplifikationspuffer, Magnesium und ggf. weitere Additive, vorzugsweise das schon aufgeführte Detergenz, enthält. Eine solche Lösung
25 ist auch unter Umgebungstemperatur problemlos lagerbar. In Kombination mit der lagerstabilen Filterscheibe steht damit ein Mittel zur Verfügung, was den Zielstellungen der Erfindung in idealster Weise gerecht wird.

[0028] Das erfindungsgemäße Mittel kann aber auch für die Durchführung einer reversen Transkriptasereaktion zur Untersuchung einer Ziel-RNA eingesetzt werden. Dazu werden auf die Filterscheibe kompartimentiert die Reverse Transkriptase, dNTPs, der konzentrierte Puffer und für die Reaktion benötigte Primer (z.B. Random Primer) verbracht. Die Ablösung der Komponenten erfolgt dann wieder mit einer wässrigen Lösung, welche alle anderen benötigten Reaktionskomponenten enthält (umzuschreibende RNA; ggf. ein Detergenz und RNA-stabilisierende Reagenzien). Neben der Stabilisierung der Reagenzien hat diese Methode noch einen weiteren Vorteil: Die Menge der eingesetzten RNA kann dadurch beträchtlich erhöht werden, da die notwendigen Komponenten nicht als wässrige Lösung zugegeben sondern direkt in der umzuschreibenden RNA gelöst werden. Dies erhöht die Sensitivität der Testmethode.

[0029] Im Fall einer sog. One-Step PCR (cDNA Synthese und PCR im gleichen Reaktionsgefäß) werden auf der Filterscheibe der Reaktionspuffer, der Enzymmix, die dNTPs und die für die Reaktion benötigten Primer und Sonde kompartimentiert verbracht und stabilisiert. Das Ablösen der Komponenten erfolgt wie auch im Fall einer Two-Step PCR (cDNA Synthese und PCR in verschiedenen Reaktionsgefäßen) mit einer wässrigen Lösung, welche die zu untersuchende RNA enthält.

[0030] Darüber hinaus kann die Kompartimentierung und lagerstabile Immobilisierung einzelnen Reaktionskomponenten bei unterschiedlichen Gemischen und enzymkatalysierten Reaktionen eingesetzt werden. Sie ist immer dann ideal, wenn die benötigten Reaktionspartner vor einer Reaktion nicht miteinander in Wechselwirkung treten dürfen.

[0031] Das Verbringen von unterschiedlichen Reaktionskomponenten, die für eine Reaktion benötigt werden, in räumlich voneinander getrennter Anordnung kann auch ohne poröses Material auf räumlich getrennten Arealen eines Gefäßes erfolgen. Wie auch im Fall der Filterscheibe werden die einzelnen Komponenten durch Herauswaschen mit einer wässrigen Lösung unmittelbar vor dem Anfang der Reaktion zusammengebracht. Eine kleine Einschränkung besteht dabei darin, dass die erfindungsgemäße Filterscheibe einen größeren Schutz gegenüber exogener Faktoren bietet (z.B. Sauerstoff, Feuchtigkeit, Licht).

Definitionen

[0032] Unter dem Begriff "molekularbiologische Reaktionen" (im folgenden „Reaktion“ genannt) versteht man eine Zusammenwirkung von biologischen Molekülen. „Biologische Moleküle“ umfassen jedwede Substanzen und Verbindungen im wesentlichen biologischen Ursprungs, die über Eigenschaften verfügen, welche im Rahmen wissenschaftlicher, diagnostischer und/oder pharmazeutischer Anwendungen relevant sind.

[0033] Umfasst sind nicht nur native Moleküle, wie sie aus natürlichen Quellen isoliert werden können, sondern auch davon abgeleitete Formen, Fragmente und Derivate, sowie rekombinante Formen und artifizielle Moleküle, sofern sie mindestens eine Eigenschaft der nativen Moleküle aufweisen.

[0034] Darunter fallen die Amplifizierung, Detektion oder Umschreibung von Nukleinsäuren, Enzym-Substrat-, Antigen-Antikörper Wechselwirkungen und die Proteinsynthese. Dazu zählen beispielsweise die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) von DNA und die RT (reverse Transkription) von RNA in DNA.

[0035] Unter "Primer" oder "Sonden" versteht der Fachmann Oligonukleotide, wobei Primer für eine Amplifizierung oder reverse Transkription notwendig sind. Die Sonden können markiert sein. Markierungen von Sonden sind dem Fachmann bekannt.

[0036] Unter dem Begriff "Enzyme" fallen Polymerase und reverse Transkriptase und andere in der Molekularbiologie verwendbare Enzyme wie Peroxydasen, Dehydrogenasen, Phosphatasen etc..

[0037] dNTPs sind Desoxyribosenucleotidtriphosphate. Es sind dies die Bausteine, die während einer PCR angefügt werden, um einen neuen Strang zu synthetisieren. Beispiele sind: dATP (Adenosintriphosphat), dUTP (Uracyl), dCTP (Cytidin), dTTP (Thymidin) und dGTP (Guanosin).

[0038] Der Begriff "Puffer" steht für Reaktionspuffer. Dem Fachmann sind entsprechende Reaktionspuffer bekannt.

[0039] Weitere bekannte Komponenten zur Durchführung einer Reaktion sind z.B. Salze und Puffersubstanzen, z.B. Magnesiumverbindungen.

[0040] Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen beschrieben. Diese stellen dabei keine Einschränkung der Erfindung dar.

Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiel 1

5 **Herstellung eines kompartmentierten lagerstabilen Reaktionansatzes und Verwendung in einem Lagerversuch zur Amplifikation einer humanspezifischen Targetsequenz**

A. Herstellung eines kompartmentierten lagerstabilen Reaktionansatzes

[0041] Als poröse Träger wurden Polyethylen Filterscheiben verwendet.

10 [0042] Auf unterschiedlichen Zonen der Filterscheibe erfolgte die Zugabe folgender Komponenten (Figur 1):

[0043] Figur 1 zeigt eine Filterscheibe mit unterschiedlichen Zonen und PCR-Materialien.

1 Ligand-modifizierte Hot-Start Taq DNA Polymerase stabilisiert mit 10 % Sorbitol und 3,75 % FCS im Endansatz

2 dNTPs

15 3 Primer (sense)

4 Primer (antisense)

[0044] Die Komponenten wurden in der Menge, die einem 100µl-PCR-Ansatz entspricht, aufgetragen.

20 [0045] Die Lösungen wurden auf die Filterscheibe gebracht und für ca. 2 h unter physiologischen Temperaturbedingungen (37°C) getrocknet. Nach erfolgter Eintrocknung wurden die Filterscheiben in ein 2 ml Schraubgefäß überführt, mit einem Deckel fest verschlossen und bei Raumtemperatur für 3 Monate gelagert und nach dieser Lagerzeit in einer Vergleichsreaktion mit frisch zugegebenen Reaktionskomponenten getestet.

25 ***B. Amplifikation einer humanspezifischen Targetsequenz mit frischen Reagenzien bzw. unter Nutzung der erfindungsgemäß hergestellten Reaktionsansatzes nach Lagerung für 3 Monate***

[0046] Die Amplifikationsreaktion erfolgte mittels eines SpeedCyclers (Analytik Jena AG).

Ansätze:

1) "Frisch"

5 µl DNA (human)

10 µl Amplifikationspuffer, incl. Magnesiumchlorid (10x)

5 2 µl dNTPs (12,5 mM, jeweils)

0,7 µl Primer (sense; 50 pmol)

0,7 µl Primer (antisense; 50 pmol)

5 Units Taq Polymerase

Auffüllen mit Wasser auf Finalvolumen von 100 µl

10

2) "Lagerstabile Filterscheibe"

5 µl DNA (human)

10 µl Amplifikationspuffer, incl. Magnesiumchlorid (10x)

Auffüllen mit Wasser auf Finalvolumen von 100 µl

15

[0047] Die DNA-Puffer-Mischung wurde auf die Filterplatte im 2ml-Röhrchen gegeben und 1 min gevortext. Die jeweils 100 µl vom PCR-Ansatz wurden auf 6 Wells einer SpeedCycler-Platte zu je 15 µl verteilt. Nach Durchführung der Amplifikations-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte auf einem Agarosegel ausgewertet (Figur 2).

20

[0048] Figur 2 zeigt PCR Produkte nach Amplifikation genomischer DNA mit frischen und lagerstabilen Reagenzien.

M ... DNA Marker

Spuren 1 – 6 ... Amplifikationsprodukte unter Verwendung der lagerstabil beschichteten Filterscheibe (Ansatz 1)

25

Spuren 7 – 12 ... Amplifikationsprodukte unter Verwendung frisch zugegebener Reaktionskomponenten (Ansatz 2)

[0049] Das Beispiel illustriert eindrucksvoll, dass die Verwendung der lagerstabil beschichteten Filterscheibe nach Lagerung von 3 Monaten bei Raumtemperatur keinerlei Aktivitätsverlust im Vergleich zu frisch zugegeben Reaktionskomponenten zeigt.

Ausführungsbeispiel 2

Herstellung eines kompartmentierten lagerstabilen Reaktionansatzes und Verwendung in einem Lagerversuch zur Amplifikation und Hybridisierung einer *Salmonella enterica* spezifischen Targetsequenz.

[0050] Die kompartmentierten Reagenzien wurden für die Durchführung eines sondenbasierten-LFA-Assays präpariert. Bei der Durchführung des Assays ist es essentiell, dass die FITC-markierte Sonde und der Biotin-markierte Primer keine Dimerisationsprodukte vor der Reaktion bilden. Erfindungsgemäß soll die kompartmentierte Verbringung der einzelnen Reaktionskomponenten einen irregulären Reaktionsstart verhindern und damit das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen verhindern.

A. Herstellung eines kompartmentierten lagerstabilen Reaktionsansatzes

[0051] Als poröse Träger wurden Polyethylen Filterscheiben verwendet.

[0052] Auf unterschiedlichen Zonen der Filterscheibe erfolgte die Zugabe folgender Komponenten (Figur 3):

[0053] Figur 3 zeigt die Aufsicht auf eine Filterscheibe. Kompartimentierung lagerstabiler Komponenten für einen sondenbasierten LFA-Assay.

1 dNTPs

2 FITC markierte Sonde

3 Primer 1, unmarkiert

4 Primer 2, Biotin markiert

5 Ligand-modifizierte Hot-Start Taq DNA Polymerase stabilisiert mit 10 % Sorbitol und 3,75 % FCS im Endansatz

[0054] Die Reagenzien wurden in der Menge, die einem 100µl-PCR-Ansatz entsprechen, aufgetragen. Die Lösungen wurden auf die Filterscheibe pipettiert und für ca. 2 h unter physiologischen Temperaturbedingungen von 37°C getrocknet.

[0055] Nach erfolgter Eintrocknung wurden die Filterscheiben in ein 2 ml Schraubgefäß platziert, mit einem dafür vorgesehenen Deckel fest verschlossen und bei RT für 3 Monate gelagert und in einer Vergleichsreaktion mit frisch zugegebenen Reaktionskomponenten getestet.

5 ***B. Amplifikation einer humanspezifischen Targetsequenz***

[0056] Die Amplifikationsreaktion erfolgte mittels eines SpeedCyclers (Analytik Jena AG).

Ansätze:

1) "Frisch"

10 µl Amplifikationspuffer, incl. Magnesiumchlorid (10x)

10 2 µl dNTPs (12,5 mM, jeweils)

0,35 µl Primer (unmarkiert; 50 pmol)

0,7 µl Primer (Biotin markiert; 50 pmol)

0,7 µl Sonde (FITC markiert; 50 pmol)

5 Units Taq Polymerase

15 Auffüllen mit Wasser auf Finalvolumen von 100 µl.

[0057] 2x15 µl des Ansatzes wurden als Negativkontrolle abpipettiert, zu dem Rest des Mastermixes wurden 5 µl *S. enterica*-DNA zugegeben und davon wurden 2x15 µl des PCR Ansatzes in das Well einer PCR-Platte für den SpeedCycler gegeben.

20 2) "Lagerstabile Filterscheibe"

10 µl Amplifikationspuffer, incl. Magnesiumchlorid (10x)

Auffüllen mit Wasser auf ein Finalvolumen von 100 µl

[0058] Die DNA-Puffer-Mischung wurde auf die Filterscheibe im 2 ml-Röhrchen gegeben, mit einem Deckel verschlossen und 1 min gevortext. 2x15 µl des Ansatzes wurden als Negativkontrolle abpipettiert, zu dem Rest des Mastermixes wurden 5 µl *S. enterica*-DNA zugegeben und davon wurden 2x15 µl des PCR Ansatzes in das Well einer PCR-Platte für den SpeedCycler gegeben.

3) „Frisch + Primer/Sonde Mix“

[0059] Bei diesem Ansatz wurden Primer und Sonde in der gegebenen Menge (siehe „Frisch“-Ansatz) 2 Stunden vor der Reaktion zusammengemischt und bei Raumtemperatur gelagert, um die Dimerbildung zu begünstigen. 2x15 µl des Ansatzes wurden als Negativkontrolle abpipettiert, zu dem Rest des Mastermixes wurden 5 µl *S. enterica*-DNA zugegeben und davon wurden 2x15 µl des PCR Ansatzes in das Well einer PCR-Platte für den SpeedCycler gegeben.

[0060] Nach Durchführung der Amplifikations/Hybridisierungs-Reaktion mittels eines SpeedCyclers wurden die jeweils 2 gleichen Ansätze zusammengemischt. Eine Hälfte wurde auf einen Agarosegel aufgetragen (Figur 4A). Die andere Hälfte wurde auf einen Lateral-Flow-Streifen aufgetragen (Figur 4B).

[0061] Figur 4 zeigt einen Amplifikations-Hybridisierungs-Reaktion (RAH Technologie) nach Auswertung des PCR-Ansatzes auf dem Gel (A) und auf einem LFA (B).

1 ... Ansatz 1 (Frisch), Positive PCR; 2 ... Ansatz 1, Negativkontrolle; 3 ... Ansatz 2 (lagerstabile Filterscheibe), Positive PCR; 4 ... Ansatz 2, Negativkontrolle; 5 ... Ansatz 3 (Frisch + Primer/Sonde Mix), Positive PCR; 6 ... Ansatz 3, Negativkontrolle

[0062] Dieses Beispiel zeigt, dass eine lange Inkubation von Primer und Sonde bei Raumtemperatur zur Bildung von Dimeren zwischen der markierten Sonde und dem markierten Primer führen kann. Dieses Phänomen ist zwar auf dem Agarosegel nicht sichtbar (die Negativkontrolle bleibt negativ), führt aber zu falschpositiven Testergebnissen auf einem Lateral-Flow-Streifen, wo alle doppeltmarkierten Dimere sichtbar werden und so ein falsch-positives Testergebnis vermitteln. Bei einer kompartimentierten Immobilisierung können die benötigten Reaktionskomponenten bereits in den vorgegebenen Mengen zusammengebracht werden. Die Möglichkeit eines unerwünschten Reaktionsstarts oder der Dimerbildung bestehen aber infolge der räumlichen Trennung der Komponenten nicht.

Ausführungsbeispiel 3

Herstellung eines kompartmentierten lagerstabilen Reaktionansatzes und Verwendung desselben zur OneStep cDNA-Synthese und Amplifikation von einem Influenza A Virus.

A. Herstellung eines kompartmentierten lagerstabilen Reaktionsansatzes

[0063] Als poröse Träger wurden Polyethylen Filterscheiben verwendet.

5 [0064] Auf unterschiedlichen Zonen der Filterscheibe erfolgte die Zugabe folgender Komponenten (Figur 5):

[0065] Figur 5 zeigt die Aufsicht auf eine Filterscheibe. Kompartimentierung lagerstabiler Komponenten für eine OneStep PCR.

1. FITC markierte Sonde

10 2. Primer 1, unmarkiert

3. Primer 2, Biotin markiert

4. Affinityscript Enzymmix für OneStep RT-PCR (ggf. stabilisiert)

5. Darüber hinaus wurde Puffer, dNTPs enthaltend, auf dem Boden des Reaktionsgefäßes eingetrocknet (Herculase® II RT-PCR 2x Mastermix, Agilent).

15

[0066] Die Chemikalien wurden in der Menge, die einem 100µl -Ansatz entsprechen, aufgetragen. Die Lösungen wurden auf die Filterscheibe bzw. auf dem Boden eines 2 ml Schraubgefäßes gebracht, mit einem Deckel verschraubt und für ca. 2 h bei physiologischen Temperaturbedingungen von 37°C getrocknet.

20 [0067] Nach erfolgter Eintrocknung wurden die Filterscheiben in einem 2 ml Schraubgefäß platziert und bei RT für 3 Monate gelagert und einer Vergleichsreaktion mit frisch zugegebenen Reaktionskomponenten getestet.

B. OneStep RT-PCR einer Influenza A - spezifischen Targetsequenz

25 [0068] Die Amplifikationsreaktion erfolgte mittels eines SpeedCyclers (Analytik Jena AG).
RNA-Proben:

[0069] Es wurde eine Verdünnungsreihe an RNA-Proben aus angezüchteten Influenza-A-Viren hergestellt. Die Proben wurden so verdünnt, dass 12 µl RNA jeweils 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 Viruspartikeln entsprachen.

Ansätze:

5 1) "Frisch"

12 µl Virus-RNA

50 µl Herculase® II RT-PCR 2x Mastermix (Agilent)

0,35 µl Primer (unmarkiert; 50 pmol)

0,7 µl Primer (Biotin markiert; 50 pmol)

10 0,7 µl Sonde (FITC markiert; 50 pmol)

1 µl Affinityscript Enzymmix (Agilent)

Auffüllen mit Wasser auf ein Finalvolumen von 100 µl

2) "Lagerstabile Filterscheibe"

12 µl Virus-RNA

15 Auffüllen mit Wasser auf Finalvolumen von 100 µl

[0070] Die RNA-Lösung wurde auf die Filterplatte im 2ml-Röhrchen gegeben und 1 min gevortext.

[0071] Nach Durchführung der OneStep RT-PCR und einer anschließenden Hybridisierung der Sonde mittels eines SpeedCyclers wurden die Reaktionsprodukte auf Lateral-Flow-Streifen aufgetragen (Figur 6).

20

[0072] Figur 6 zeigt unterschiedliche Virusverdünnungen wurden mit frisch angesetzten Komponenten (frisch) oder lagerstabilen Komponenten (eingetrocknet) auf einer Filterscheibe in einer OneStep RT-PCR amplifiziert und auf einem Lateral-Flow-Streifen nachgewiesen.

[0073] Das Beispiel illustriert, dass die Verwendung der lagerstabil beschichteten Filterscheibe auch bei einer OneStep RT-PCR-Reaktion keinerlei Aktivitätsverlust im Vergleich zu frisch zugegeben Reaktionskomponenten zeigt.

25

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Durchführung einer molekularbiologischen Reaktion, dadurch gekennzeichnet, dass die einzelnen für eine Reaktion benötigten Komponenten sich
5 zwar am gleichen Reaktionsort befinden, jedoch vor der Reaktion auf einem Trägermaterial räumlich voneinander getrennt sind, so dass eine unerwünschte Zusammenwirkung der Einzelkomponenten vor dem Reaktionsstart unmöglich ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den
10 molekularbiologische Reaktionen um
- a) Amplifikation von Nukleinsäuren, z.B. PCR oder RealTime-PCR oder
 - b) reverse Transkription von RNA in DNA oder
 - c) Enzym-Substrat.-Wechselwirkungen oder
 - d) Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen oder
 - 15 e) Proteinsynthesen
- handelt.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem
20 festen Träger um einen porösen Träger, vorzugsweise eine poröse Filterscheibe, handelt.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem
festen Träger um eine Oberfläche handelt auf die die Reaktionskomponenten räumlich
getrennt aufgetragen werden.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der
25 Träger aus Polyethylen besteht.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass sich
- f) Primer und Enzyme oder
 - 30 g) Primer, Enzyme und Sonde oder
 - h) Primer, Enzyme, Sonde und dNTPs oder
 - i) Primer, Enzyme, Sonde, dNTPs und Puffer oder

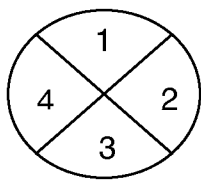
- j) Enzym und Coenzym oder
- k) zwei oder mehrere unterschiedliche Antikörper

auf dem Träger in unterschiedlichen, räumlich getrennten, Kompartimenten befinden.

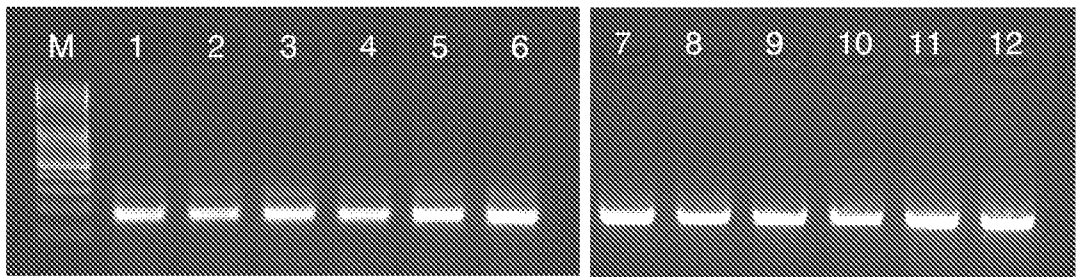
- 5 7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die genannten Komponenten für die Reaktion auf dem Träger in unterschiedlichen Kompartimenten immobilisiert sind.
- 8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Komponenten durch
10 Wasserentzug oder Wassersubstitution, vorzugsweise durch Eintrocknen oder Gefriertrocknung, auf dem Träger stabilisiert werden.
- 9. Verfahren zur Durchführung einer Reaktion, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
 - a) Bereitstellen des festen Trägers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8
 - 15 b) Hinzugabe einer Flüssigkeit mit dem nachzuweisenden Biomolekül und ggf. anderen für die Reaktion benötigten Substanzen
 - c) Inkubation und Durchführung der Reaktion nach bekannten Verfahren.
- 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Flüssigkeit reines
20 Wasser, eine Lösung, eine Detergenzhaltige Lösung, eine die zu testende Probe enthaltende Lösung, eine weitere Reaktionskomponenten enthaltende Lösung ist.
- 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Detergenz Nichtionische Tenside verwendet werden.
- 25 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass für den Fall, dass der Träger nicht alle für die Reaktion benötigten Substanzen enthält, sich diese Komponenten in der Lösung befinden.
- 30 13. Molekulardiagnostisches Testkit, umfassend einerseits einen festen Träger gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 und andererseits eine Lösung gemäß einem der Ansprüche 9 bis 12.

14. Testkit nach Anspruch 13, dass es weitere bekannte Komponenten zur Durchführung und Auswertung einer molekulardiagnostischen Reaktion enthält.
- 5 15. Verwendung des Testkits gemäß Anspruch 13 oder 14 zur Durchführung molekulardiagnostischen Tests, insbesondere unter Feldbedingungen.

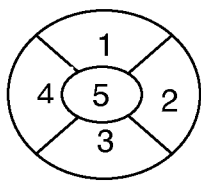
Figur 1



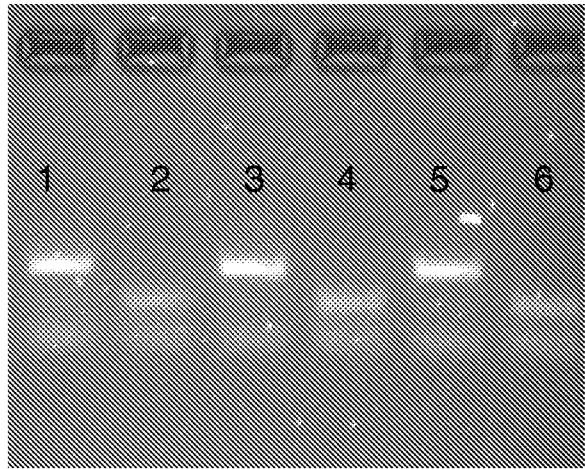
Figur 2



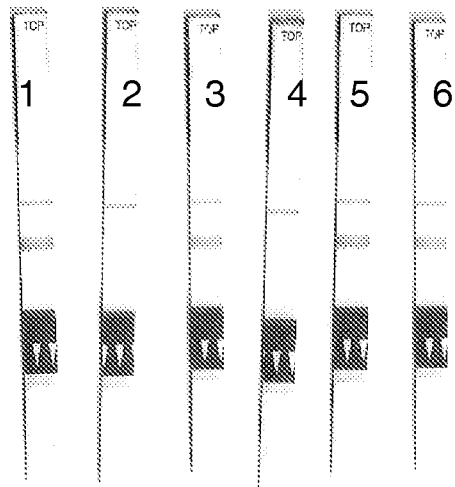
Figur 3



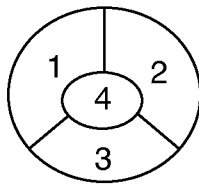
Figur 4A



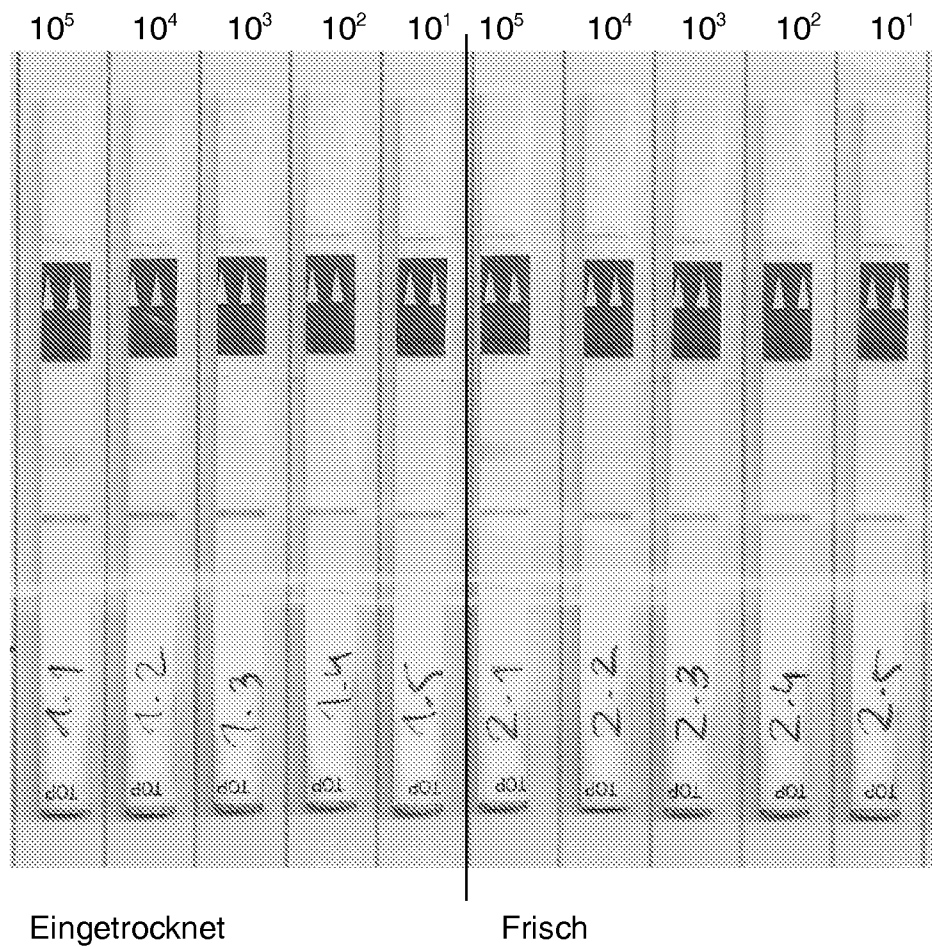
Figur 4B



Figur 5



Figur 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/062692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 795 612 A1 (EIKEN CHEMICAL [JP]) 13 June 2007 (2007-06-13) paragraphs [0009], [0010], [0021], [0043], [0065], [0066], [0070]; claims 1, 4, 6, 7, 11, 13, 15; figure 1; examples 1-5	1-9, 12-15
X	----- WO 2005/118849 A1 (ABACUS DIAGNOSTICA OY [FI]; Korpimaeki Teemu [FI]; Loevgren Timo [FI];) 15 December 2005 (2005-12-15)	1-3,6-12
A	abstract; claims 1, 4-6, 13	4,13-15
A	----- WO 01/92569 A2 (TEPNEL MEDICAL LTD [GB]; Oultram John Douglas [GB]; Mulrooney Conor JO) 6 December 2001 (2001-12-06) the whole document	1-15
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 October 2011

Date of mailing of the international search report

04/11/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Franz, Cerstin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/062692

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 726 310 A1 (GEN PROBE INC [US]) 14 August 1996 (1996-08-14) the whole document -----	1-15
A	US 5 861 251 A (PARK HAN-OH [KR] ET AL) 19 January 1999 (1999-01-19) the whole document -----	1-15
A	US 5 939 259 A (HARVEY MICHAEL A [US] ET AL) 17 August 1999 (1999-08-17) the whole document -----	1-15
A	CAGGANA M ET AL: "Rapid, efficient method for multiplex amplification from filter paper", HUMAN MUTATION, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 11, no. 5, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 404-409, XP002556364, ISSN: 1059-7794, DOI: - the whole document -----	1-15
A	KLINE M ET AL: "Polymerase Chain Reaction Amplification of DNA from Aged Blood Stains: Quantitative Evaluation of the Suitability for Purpose of Four Filter Papers as Archival Media", ANALYTICAL CHEMISTRY,, vol. 74, no. 8, 15 April 2002 (2002-04-15), pages 1863-1869, XP008116287, DOI: 10.1021/AC015715E the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/062692

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1795612	A1	13-06-2007	CN 101048515 A	03-10-2007
			WO 2006025264 A1	09-03-2006
			US 2009226892 A1	10-09-2009

WO 2005118849	A1	15-12-2005	AT 411401 T	15-10-2008
			EP 1766055 A1	28-03-2007
			ES 2314664 T3	16-03-2009
			JP 2008501331 A	24-01-2008

WO 0192569	A2	06-12-2001	AU 6248301 A	11-12-2001
			EP 1290223 A2	12-03-2003

EP 0726310	A1	14-08-1996	AT 244759 T	15-07-2003
			AU 699590 B2	10-12-1998
			AU 4916796 A	27-08-1996
			CA 2210584 A1	15-08-1996
			DE 69628959 D1	14-08-2003
			DE 69628959 T2	13-05-2004
			ES 2202387 T3	01-04-2004
			JP 3282819 B2	20-05-2002
			JP H10503383 A	31-03-1998
			WO 9624664 A1	15-08-1996
			US 5556771 A	17-09-1996
			US 5614387 A	25-03-1997

US 5861251	A	19-01-1999	NONE	

US 5939259	A	17-08-1999	US 6168922 B1	02-01-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/062692

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12Q1/68
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherhierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12Q

Recherhierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherhierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 795 612 A1 (EIKEN CHEMICAL [JP]) 13. Juni 2007 (2007-06-13) Absätze [0009], [0010], [0021], [0043], [0065], [0066], [0070]; Ansprüche 1, 4, 6, 7, 11, 13, 15; Abbildung 1; Beispiele 1-5	1-9, 12-15
X	----- WO 2005/118849 A1 (ABACUS DIAGNOSTICA OY [FI]; KORPIMAEKI TEEMU [FI]; LOEVGREN TIMO [FI];) 15. Dezember 2005 (2005-12-15)	1-3,6-12
A	Zusammenfassung; Ansprüche 1, 4-6, 13	4,13-15
A	----- WO 01/92569 A2 (TEPNEL MEDICAL LTD [GB]; OULTRAM JOHN DOUGLAS [GB]; MULROONEY CONOR JO) 6. Dezember 2001 (2001-12-06) das ganze Dokument	1-15
	----- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Oktober 2011

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/11/2011

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Franz, Cerstin

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 726 310 A1 (GEN PROBE INC [US]) 14. August 1996 (1996-08-14) das ganze Dokument -----	1-15
A	US 5 861 251 A (PARK HAN-OH [KR] ET AL) 19. Januar 1999 (1999-01-19) das ganze Dokument -----	1-15
A	US 5 939 259 A (HARVEY MICHAEL A [US] ET AL) 17. August 1999 (1999-08-17) das ganze Dokument -----	1-15
A	CAGGANA M ET AL: "Rapid, efficient method for multiplex amplification from filter paper", HUMAN MUTATION, JOHN WILEY & SONS, INC, US, Bd. 11, Nr. 5, 1. Januar 1998 (1998-01-01), Seiten 404-409, XP002556364, ISSN: 1059-7794, DOI: - das ganze Dokument -----	1-15
A	KLINE M ET AL: "Polymerase Chain Reaction Amplification of DNA from Aged Blood Stains: Quantitative Evaluation of the Suitability for Purpose of Four Filter Papers as Archival Media", ANALYTICAL CHEMISTRY,, Bd. 74, Nr. 8, 15. April 2002 (2002-04-15), Seiten 1863-1869, XP008116287, DOI: 10.1021/AC015715E das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/062692

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1795612 A1	13-06-2007	CN 101048515 A	03-10-2007
		WO 2006025264 A1	09-03-2006
		US 2009226892 A1	10-09-2009

WO 2005118849 A1	15-12-2005	AT 411401 T	15-10-2008
		EP 1766055 A1	28-03-2007
		ES 2314664 T3	16-03-2009
		JP 2008501331 A	24-01-2008

WO 0192569 A2	06-12-2001	AU 6248301 A	11-12-2001
		EP 1290223 A2	12-03-2003

EP 0726310 A1	14-08-1996	AT 244759 T	15-07-2003
		AU 699590 B2	10-12-1998
		AU 4916796 A	27-08-1996
		CA 2210584 A1	15-08-1996
		DE 69628959 D1	14-08-2003
		DE 69628959 T2	13-05-2004
		ES 2202387 T3	01-04-2004
		JP 3282819 B2	20-05-2002
		JP H10503383 A	31-03-1998
		WO 9624664 A1	15-08-1996
		US 5556771 A	17-09-1996
		US 5614387 A	25-03-1997

US 5861251 A	19-01-1999	KEINE	

US 5939259 A	17-08-1999	US 6168922 B1	02-01-2001
