(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 283 649 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz
der DDR vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 Q 1/68

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 Q / 326 428 1	(22)	09.03.89	(44)	17.10.90
(31)	8805692	(32)	10.03.88	(33)	GB
	8814170.0		15.06.88		

(71) siehe (73)
(72) Newton, Clive Robert; Markham, Alexander Fred, GB
(73) Imperial Chemical Industries PLC,London SW1P 3JF, GB
(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von wenigstens einer Nucleotid-Variation in einer oder mehreren Nucleinsäuren sowie Testsätze zur Durchführung des Verfahrens

(55) Nachweisverfahren; Anwesenheit; Abwesenheit; Nucleotid-Variationen; in Nucleinsäuren; Diagnostik; Erbkrankheiten

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von wenigstens einer Nucleotid-Variation in einer oder mehreren Nucleinsäuren sowie Testsätze zur Durchführung des Verfahrens. Das Verfahren besteht darin, daß eine Probe einer Nucleinsäure mit einem Starter für diagnostische Zwecke in Kontakt gebracht wird, wobei dieser im wesentlichen komplementär zu einem für diagnostische Zwecke geeigneten Teil der Zielbasensequenz ist, wodurch eine Verlängerung des Starters für diagnostische Zwecke an einer Zielmatrize unter geeigneten Bedingungen nur in den Fällen erreicht wird, in denen ein endständiges Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke komplementär zu entweder einem vermuteten abweichenden Nucleotid oder einem entsprechenden normalen Nucleotid der Zielbasensequenz ist, und die Anwesenheit oder Abwesenheit eines Verlängerungsproduktes nachgewiesen wird. Anwendungsgebiet ist die Diagnostik, insbesondere die Prüfung von DNS-Proben auf Erbkrankheiten.

ISSN 0433-6461

32 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von wenigstens einer Nucleotid-Variation in einer oder mehreren Nucleinsäuren, die in einer Probe enthalten sind, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Probe gemeinsam oder nacheinander mit geeigneten Nucleosid-Triphosphaten, einem Mittel zur Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate und einem Starter für diagnostische Zwecke für einen für diagnostische Zwecke vorgesehenen Abschnitt einer Ziel-Basensequenz versetzt wird unter den Bedingungen für die Hybridisation, wobei die Nucleotid-Sequenz des Starters für diagnostische Zwecke derart ist, daß sie im wesentlichen zu dem Abschnitt für die Diagnose komplementär ist, ein terminales Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke entweder komplementär zu einer vermuteten Nucleotid-Variation oder zu dem entsprechenden normalen Nucleotid ist, wodurch ein Extensionsprodukt des Starters für diagnostische Zwecke synthetisiert wird, wenn das genannte terminale Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Ziel-Basensequenz ist, jedoch kein Extensionsprodukt synthetisiert wird, wenn das besagte terminale Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke nicht komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Ziel-Basensequenz ist, und daß die Anwesenheit oder Abwesenheit der vermuteten Nucleotid-Variation durch die Anwesenheit oder Abwesenheit eines Extensionsproduktes nachgewiesen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß 1) eine Probe zusammen oder nacheinander mit geeigneten Nucleosid-Triphosphaten, einem Mittel für die Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate, einem Starter für diagnostische Zwecke für einen für diagnostische Zwecke vorgesehenen Abschnitt einer Ziel-Basensequenz und einem entsprechenden Starter für die Verstärkung unter Hybridisationsbedingungen versetzt wird, wobei die Nucleotidsequenz des besagten Starters für diagnostische Zwecke derart ist, daß sie im wesentlichen komplementär zu dem besagten Abschnitt, der zur Diagnose geeignet ist und ein terminales Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke entweder komplementär zu der vermuteten Nucleotid-Variation oder zu dem normalen entsprechenden Nucleotid ist, wodurch ein Extensionsprodukt des Starters für diagnostische Zwecke synthetisiert wird, wenn das besagte endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Ziel-Basensequenz ist, jedoch kein Extensionsprodukt synthetisiert wird, wenn das besagte, endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke zu dem entsprechenden Nucleotid in der Ziel-Basensequenz nicht komplementär ist, daß ein so synthetisiertes Extensionsprodukt des Starters für diagnostische Zwecke in der Lage ist, als Templat für die Synthese eines Extensionsproduktes des besagten Starters für die Amplifizierung nach seiner Abtrennung vom Komplementär zu dienen;
   2) die Probe unter denaturierenden Bedingungen behandelt wird, um das Extensionsprodukt des Starters von seinem Templat zu trennen, wenn ein solches Extensionsprodukt synthetisiert worden ist;
   3) die Einzelstränge, die in der Stufe (2) hergestellt worden sind, entweder zusammen oder nacheinander mit geeigneten Nucleosid-Triphosphaten, einem Mittel zur Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate, einem Starter für diagnostische Zwecke und einem Starter für die Amplifizierung, wie sie hierin definiert worden sind, in Kontakt gebracht werden, wodurch, wenn es möglich ist, weitere Extensionsprodukte synthetisiert werden, wobei die Einzelstränge, die in der Stufe (2) hergestellt worden sind, als Template verwendet werden;
   4) die Stufen (2) und (3) ausreichend oft wiederholt werden, so daß eine nachweisbare Verstärkung der entsprechenden Nucleotid-Sequenz erhalten wird, und
   5) die Anwesenheit oder Abwesenheit einer vermuteten Nucleotid-Variation durch die Anwesenheit oder Abwesenheit eines in der Stufe (4) erhaltenen Verstärkungsproduktes nachgewiesen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß eine Probe gleichzeitig oder nacheinander entweder mit (a) einem ersten Starter für diagnostische Zwecke, der eine Sequenz aufweist, die im wesentlichen komplementär zu einem Abschnitt einer ersten Nucleinsäuresequenz, die für diagnostische Zwecke vorgesehen ist, ist und dieser erste Starter für diagnostische Zwecke ein terminales Nucleotid aufweist, das zu der vermuteten Nucleotid-Variation komplementär ist, und einem zweiten Starter für diagnostische Zwecke, der eine Sequenz aufweist, die im wesentlichen komplementär zu einem Abschnitt einer zweiten Nucleinsäuresequenz, die für diagnostische Zwecke vorgesehen ist, ist und der zweite Starter für diagnostische Zwecke ein terminales Nucleotid aufweist, das komplementär zu dem Komplement der vermuteten Nucleotid-Variation ist,

oder (b) einem ersten Starter für diagnostische Zwecke, der eine Sequenz aufweist, die im wesentlichen komplementär zu einem Abschnitt einer ersten Nucleinsäuresequenz ist, der für diagnostische Zwecke vorgesehen ist, und der erste Starter für diagnostische Zwecke ein endständiges Nucleotid aufweist, das zu dem normalen Nucleotid komplementär ist, das der besagten, vermuteten Nucleotid-Variation entspricht, und mit einem zweiten Starter für diagnostische Zwecke, der eine Sequenz aufweist, die im wesentlichen komplementär zu dem Abschnitt einer zweiten Nucleinsäuresequenz ist, der für diagnostische Zwecke vorgesehen ist, wobei der zweite Starter für diagnostische Zwecke ein endständiges Nucleotid aufweist, das komplementär zu dem normalen Nucleotid ist, das der besagten vermuteten Nucleotid-Variation entspricht, versetzt wird,
wobei das besagte endständige Nucleotid des ersten Starters für diagnostische Zwecke und das besagte endständige Nucleotid des zweiten Starters für diagnostische Zwecke entweder beide am 5'-Ende oder beide am 3'-Ende der betreffenden Starter stehen und sich die erste Nucleinsäuresequenz im entgegengesetzten Sinne zu der zweiten Nucleinsäuresequenz befindet.

4. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß zuerst wenigstens ein Teil einer Nucleinsäureprobe, die die vermutete Nucleotid-Variation enthält, verstärkt wird und das Amplifikationsprodukt, das so erhalten wird, als die zu behandelnde Probe eingesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3, **gekennzeichnet dadurch,** daß zuerst wenigstens ein Teil einer Nucleinsäureprobe, die die vermutete Nucleotid-Variation enthält, verstärkt wird und das so erhaltene Amplifikations-Produkt als die zu behandelnde Probe eingesetzt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Behandlung der Nucleinsäureprobe wenigstens einmal wiederholt wird, wodurch eine lineare Verstärkung eines Extensionsproduktes erreicht wird, wobei die gleiche Ziel-Basensequenz als Templat verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **gekennzeichnet dadurch,** daß das endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke entweder zu der vermuteten Nucleotid-Variation oder zu dem entsprechenden normalen Nucleotid komplementär ist und sich am 3'-Ende des Starters für diagnostische Zwecke befindet.
8. Verfahren nach Anspruch 6, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Probe mit 1, 2 oder 3 Nucleosid-Triphosphaten versetzt wird, wodurch ein etwa hergestelltes Extensionsprodukt nur so weit wachsen kann, wie die Anwesenheit von nur 1, 2 oder 3 Nucleosid-Triphosphaten erlaubt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Probe mit drei Nucleosid-Triphosphaten umgesetzt wird.
10. Testsatz zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von wenigstens einer Nucleotid-Variation in einer oder mehreren Nucleinsäuren, die in einer Probe enthalten sind, **dadurch gekennzeichnet,** daß er besteht aus
(1) einem Starter für diagnostische Zwecke für jeden Abschnitt einer Ziel-Basensequenz, der für diagnostische Zwecke vorgesehen ist, wobei die Nucleotid-Sequenz eines jeden Starters für diagnostische Zwecke derart ist, daß sie im wesentlichen komplementär zu dem Abschnitt, der für diagnostische Zwecke vorgesehen ist, und ein endständiges Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke entweder komplementär zu der vermuteten Nucleotid-Variation oder zu dem entsprechenden normalen Nucleotid ist, so daß bei der Anwendung ein Extensionsprodukt des Starters für diagnostische Zwecke synthetisiert ist, wenn das besagte endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Ziel-Basensequenz ist, jedoch kein Extensionsprodukt synthetisiert wird, wenn das besagte endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke nicht komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Ziel-Basensequenz ist; (2) jedem einzelnen der vier unterschiedlichen Nucleosid-Triphosphate; und
(3) einem Mittel für die Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate in (2).
11. Testsatz nach Anspruch 10, **gekennzeichnet dadurch,** daß er besteht aus einem Satz von zwei Startern für diagnostische Zwecke für jeden Abschnitt einer Ziel-Basensequenz, der für diagnostische Zwecke vorgesehen ist, wobei ein endständiges Nucleotid einer Sequenz komplementär zu einer vermuteten Nucleotid-Variation ist, die mit einer bekannten genetischen Krankheit in Verbindung steht, und ein endständiges Nucleotid der anderen Sequenz komplementär zu dem entsprechenden normalen Nucleotid ist.

Hierzu 8 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit einer oder mehrerer abweichender Nucleotid-Sequenzen durch deren Verstärkung oder durch deren Abwesenheit sowie Testsätze zur Durchführung des Verfahrens. Diese Erfindung ist von besonderem Interesse bei der Prüfung von DNS-Proben für Diagnosezwecke auf Erbkrankheiten, Veranlagungen dafür oder somatische Mutationen und stellt unter anderem eine allgemeine Methode zum einfachen Nachweis von Punktmutationen dar. Sie ist weiterhin zum Nachweis und zur Klassifizierung von infektiösen Pathogenen durch die Analyse von deren DNS oder RNS geeignet.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß mehrere hundert genetisch bedingte Erkrankungen beim Menschen vorkommen, die sich aus bestimmten Mutationen auf dem DNS-Niveau herleiten. Die molekulare Basis für bestimmte dieser Krankheiten ist bereits bekannt und durch die Forschung wird mit hoher Geschwindigkeit an der Erkenntnis der molekularen Basis für diejenigen genetisch bedingten Krankheiten gearbeitet, von denen die Art der Mutation bisher unbekannt ist. Wo die genaue molekulare Basis der Erbkrankheiten nicht bekannt ist, kann die Diagnose der Krankheit oder die Ermittlung von Trägern durch informative Stammbäume durch die RFLP-Technik unter Verwendung von DNS-Sonden mit einem genetischen Zusammenhang zu dem Locus für die Krankheit erfolgen. So können gegenwärtig unter anderem die Duchenne'sche Muskel-Dystrophie, die cystische Fibrose und die Chorea Huntington z. B. durch die Anwendung der RFLP-Technik diagnostiziert werden. Diese Untersuchungen müssen jedoch für jede Krankheit getrennt durchgeführt werden und es ist ein hoher Arbeitsaufwand nötig, wobei in jedem Falle unter anderem die Reinigung der DNS, der Abbau mit Restriktionsenzymen, Elektrophorese in Agarosegelen, Transfer nach Southern, Hybridisierung, Nachweis der hybridisierten genetischen Sonde und die Analyse des Stammbaumes durchgeführt werden müssen. Es ist bekannt, daß bestimmte Erbkrankheiten mit Punktmutationen in Genen im Zusammenhang stehen, jedoch muß jede dieser Krankheiten für sich analysiert werden, und weitere, spezielle Probleme entstehen kann, wenn die Punktmutationen heterogen sind. So kann z. B. die β-Thalassämie durch 40 unterschiedliche Punktmutationen hervorgerufen werden und wenigstens 5, wahrscheinlich aber mehr als 12 Punktmutationen können zur Hämophilie A führen. Für jede dieser heterogenen Erkrankungen ist es zum gegenwärtigen Zeitpunkt notwendig, jede potentielle Punktmutation für sich getrennt zu analysieren. Das kann die komplexe RFLP-Analyse der Haplotypen mit einer Vielzahl von Restriktionsenzymen einschließen.
Eine Reihe von Punktmutationen in somatischen Zellen wurde mit der Entwicklung von verschiedenen Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht, z. B. Punktmutationen innerhalb des ras-Oncogens (J. L. Boos et al., Nature **327** [1987], 293).
In der Europäischen Patentanmeldung Nr. 87302196.8 (Veröffentlichungs-Nr. 237.362) der Cetus Corporation wird ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von wenigstens einer Nucleotidvariation in einer Sequenz in bezug auf eine oder mehrere Nucleinsäuren, die in der Probe enthalten ist, beschrieben. Dieses Verfahren besteht darin, daß
(a) eine Probe gleichzeitig oder nacheinander mit vier unterschiedlichen Nucleotid-Triphosphaten, einem Mittel zur Polymerisation der Nucleotid-Triphosphats und einem Oligonucleotid-Starter (Primer) für jeden Strang jeder Nucleinsäure, von dem angenommen wird, daß er die genannte Variation aufweist, unter den Bedingungen der Hybridisation versetzt wird, so daß für jeden Nucleinsäurestrang, der jede unterschiedliche nachzuweisende Variation enthält, ein Extensionsprodukt von jedem Starter synthetisiert wird, das zu jedem Nucleinsäurestrang komplementär ist, worin dieser oder diese Starter so ausgewählt wird/werden, daß er/sie im wesentlichen komplementär zu jedem Nucleinsäurestrang ist/sind, der jede unterschiedliche Variation enthält, so daß das von einem Starter synthetisierte Extensionsprodukt, wenn es von seinem Komplementär getrennt wird, als Templat für die Synthese des Extensionsproduktes des anderen Starters dienen kann;
(b) die Probe denaturierend behandelt wird, um die Extensionsprodukte der Starter von ihren Templaten zu trennen, wenn die nachzuweisende(n) Variation(en) anwesend ist/sind;
(c) die Probe gleichzeitig oder nacheinander mit den genannten vier Nucleotidtriphosphaten, einem Mittel zur Polymerisation der Nucleotidtriphosphate und Oligonucleotid-Startern versetzt wird, so daß ein Starter-Extensionsprodukt unter Verwendung eines jeden des in Stufe (b) produzierten Einzelstranges als Templat synthetisiert wird, wobei die Stufen (b) und (c) ausreichend oft wiederholt werden, so daß eine nachweisbare Verstärkung der Nucleinsäure, die die Sequenz-Variation(en) enthält, wenn sie vorhanden ist, erfolgt;
(d) das Produkt der Stufe (c) an eine Membran fixiert wird;
(e) die Membran unter Hybridisationsbedingungen mit einer markierten, sequenzspezifischen Oligonucleotid-Sonde versetzt wird, die in der Lage ist, mit der amplifizierten Nucleinsäure-Sequenz nur dann zu hybridisieren, wenn eine Sequenz der Sonde zu einem Abschnitt der amplifizierten Sequenz komplementär ist; und
(f) der Nachweis geführt wird, ob die Sonde mit einer amplifizierten Sequenz in der Nucleinsäureprobe hybridisiert hat. Der Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit wenigstens einer Nucleotid-Variation kann unter bestimmten, besonderen Bedingungen mittels unterschiedlicher Methoden erfolgen. So kann in den ungewöhnlichen Fällen, in denen die Punktmutation einen Restriktionsort schafft oder beseitigt (z. B. bei der Sichelzellanämie), die Methode des Abbaus mit Restriktionsenzymen entweder vor oder nach der Verstärkung angewendet werden (F. F. Chebab et al., Nature **329** [1987], 293). Weiterhin können in bezug auf große, deletierte Nucleinsäuresequenzen Starter für die Verstärkung für Bereiche innerhalb der vermuteten Deletionen hergestellt werden, z. B. bei der 23 kb – Deletion, die die α-Thalassaemie hervorruft. In diesen Fällen bestätigt die Unmöglichkeiten zur Verstärkung der deletierten Sequenz die Deletion und ist so ein diagnostisches Mittel für die α-Thalassaemie (F. F. Chebab et al., Nature **329** [1987], 293).
Das Verstärkungsverfahren entsprechend der Europäischen Patentveröffentlichung Nr. 237.362 weist bestimmte Vorteile gegenüber der RFLP-Methode (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus) und der Allele-spezifischen Oligonucleotid-Methode auf, wie sie z. B. von Kan und Dozy, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) **75** (1978), 5631; Rubin und Kan, Lancet, 1985-I, 75 (1985); Conner et al., Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), **80** (1983), 78; Kidd et al., Nature **304** (1983), 230, und Piratsu et al., New England Journal of Medicine **309** (1983), 284, beschrieben worden sind.

In der Europäischen Patentveröffentlichung Nr. 237.362 wird trotz allem ein Verfahren beschrieben, das die unterschiedslose Verstärkung einer bestimmten interessierenden Sequenz beinhaltet, was unvermeidbar zur Notwendigkeit der Durchführung einer Reihe zeitaufwendiger weiterer Nachweisschritte führt, die entweder die nachfolgende Verwendung einer markierten, sequenzspezifischen Olgionucleotidsonde erfordert, die in der Lage sein müßte, zwischen Sequenzen zu unterscheiden, die sich nur durch ein einziges Nucleotid unterscheiden und/oder in der begrenzten Anzahl von Fällen, in denen die interessierende Punktmutation eine Enzymerkennungssequenz schafft oder beseitigt, die Verwendung einer spezifischen Restriktions-Endonuclease notwendig und/oder die Anwendung direkter Sequenzierungs-Verfahren für die amplifizierte DNS erforderlich macht (siehe C. Wong et al., Nature **330** [1987], 384).

Ziel der Erfindung

Mit der vorliegenden Erfindung wird ein vereinfachtes Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von wenigstens einer Nucleotid-Variation in einer oder mehreren Nucleinsäuren bereitgestellt, das zur Diagnose von genetisch bedingten Erkrankungen sowie zum Nachweis und zur Klassifizierung von infektiösen Pathogenen geeignet ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein einfaches Verfahren zum direkten Nachweis wenigstens einer unterschiedlichen Base in Nucleinsäuren, z. B. genomischer DNS, in dem die Nachweisstufen auf ein Minimum reduziert werden, aufzufinden, das schnell, genau und einfach mit einem minimalen Fachwissen des Bearbeiters durchgeführt werden kann. Diese Erfindung basiert auf der Entdeckung, daß es durch die auf geeignete Art und Weise durchgeführte Auswahl der Nucleotidsequenz eines Oligonucleotid-Starters möglich ist, eine selektive Starter-Extension entweder einer Sequenz, die die vermutete Nucleotid-Variation aufweist, oder der entsprechenden Sequenz, die das normale Nucleotid aufweist, herbeizuführen oder eine solche Starter-Extension zu verhindern und so die notwendigen Nachweisverfahren wesentlich zu vereinfachen.
Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit wenigstens einer Nucleotid-Variation in einer oder mehreren Nucleinsäuren, die in einer Probe vorliegen, zur Verfügung gestellt wird, wobei dieses Verfahren darin besteht, daß die Probe zusammen oder nacheinander mit geeigneten Nucleosid-Triphosphaten, einem Mittel zur Polymerisation der Nucleotid-Triphosphate und einem für diagnostische Zwecke geeigneten Starter für einen diagnostisch geeigneten Teil der Zielbasen-Sequenz und den Bedingungen der Hybridisation versetzt wird, wobei die Nucleotid-Sequenz des besagten, für diagnostische Zwecke geeigneten Starters derart ist, daß sie im wesentlichen komplementär zu dem genannten Teil für diagnostische Zwecke ist, ein endständiges Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke entweder komplementär zu der vermuteten Nucleotid-Variation oder zu dem normalen Nucleotid ist, wodurch ein Extensions-Produkt des für diagnostische Zwecke geeigneten Starters synthetisiert wird, wenn das genannte endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Zielbasen-Sequenz ist, jedoch kein Extensions-Produkt synthetisiert wird, wenn das genannte endständige Nucleotid des für diagnostische Zwecke geeigneten Starters nicht komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Zielbasen-Sequenz ist, und die Anwesenheit oder Abwesenheit der vermuteten Nucleotid-Variation durch die Anwesenheit oder Abwesenheit eines Extensionsproduktes nachgewiesen wird.
Es wird in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß, während das erfindungsgemäße Verfahren von besonderem Interesse für den Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von Punktmutationen ist, das Verfahren gleichermaßen anwendbar auf den Nachweis der Abwesenheit oder Anwesenheit von Deletionen, einschließlich von Deletionen von mehr als einem Nucleotid sowie auf den Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von Substitutionen von mehr als einem Nucleotid anwendbar ist. In dieser Hinsicht ist es einfach nur notwendig, die relevanten Nucleotide zu kennen, insbesondere die relevanten, endständigen Nucleotide, so daß der/die notwendige/n Starter für diagnostische Zwecke entsprechend konstruiert werden kann/können.
Es ist offensichtlich, daß ein beliebiges, auf diese Weise hergestelltes Extensions-Produkt auf übliche Art und Weise, z. B. in einzelsträngiger oder doppelsträngiger Form, nachgewiesen werden kann.
Weiterhin ist es erkennbar, daß jedes so hergestellte Extensionsprodukt gegebenenfalls durch die Polymer-ase-Kettenreaktion (PCR) verstärkt werden kann, wie es in den US-Patenten Nr. 4683195 und 4683202 beschrieben worden ist, durch die Verwendung der Q-Beta-Replicase, wie es in der PCT-Patentveröffentlichung WO 87/06.270 und in Biotechnology Vol. 6, Oktober 1988, beschrieben wurde, durch die Verwendung der Methode der Nucleinsäureverstärkung auf der Basis der Transkription von der Siska-Corporation, wie es in der PCT-Patentveröffentlichung WO 88/10.315 beschrieben wurde, oder durch die Verwendung der linearen Verstärkung. In diesem Zusammenhang wird der Begriff „lineare Verstärkung" so verwendet, daß damit die Verstärkung unter Verwendung eines einzigen Starters für jeden diagnostisch geeigneten Abschnitt in Gegenwart eines Mittels zur Polymerisation und von geeigneten Nucleotid-Triphosphaten, wodurch die Verstärkung durch Extension am Starter auf der Grundlage der Verwendung eines Einzelstranges der Nucleinsäureprobe als Templat bewirkt wird, bezeichnet wird.
Entsprechend einer ersten und besonders bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung besteht das Verfahren darin, daß
(1) die Probe zusammen oder nacheinander mit geeigneten Nucleosid-Triphosphaten, einem Mittel zur Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate, einem für diagnostische Zwecke geeigneten Starter für einen diagnostisch geeigneten Anteil einer Zielbasensequenz und einem entsprechenden Starter für die Amplifizierung unter den Bedingungen der Hybridisation versetzt wird, wobei die Nucleotid-Sequenz des genannten Starters derart ist, daß sie im wesentlichen komplementär zu dem genannten, diagnostisch geeigneten Anteil ist, ein endständiges Nucleotid des für diagnostische Zwecke geeigneten Starters entweder komplementär zu der vermuteten Nucleotid-Variation oder zu dem normalen Nucleotid ist, wodurch ein Extensionsprodukt des

Starters für diagnostische Zwecke synthetisiert wird, wenn das besagte endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Zielbasensequenz ist, kein Extensionsprodukt synthetisiert wird, wenn das genannte endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke zu dem entsprechenden Nucleotid in der Zielbasensequenz nicht komplementär ist, ein beliebiges Extensionsprodukt am Starter für diagnostische Zwecke, das so hergestellt worden ist, als Templat für die Synthese eines Extensionsproduktes des genannten Starters für die Amplifizierung nach seiner Trennung von seinem Komplementär dienen kann;
(2) die Probe unter denaturierenden Bedingungen behandelt wird, um das Extensionsprodukt des Starters von seinem Templat zu trennen, wenn ein solches Extensionsprodukt hergestellt worden ist;
(3) Einzelstränge, die in der Stufe (2) hergestellt worden sind, entweder zusammen oder nacheinander mit geeigneten Nucleosid-Triphosphaten, einem für diagnostische Zwecke geeigneten Starter und einem Starter für die Verstärkung, wie sie hierin definiert worden sind, in Kontakt gebracht werden, wodurch, wenn es möglich ist, unter Verwendung der in der Stufe (2) hergestellten Einzelstränge als Templates weitere Extensionsprodukte hergestellt werden;
(4) die Stufen (2) und (3) ausreichend oft wiederholt werden, so daß sich eine nachweisbare Verstärkung der entsprechenden Nucleotidsequent ergibt; und
(5) die Anwesenheit oder Abwesenheit der vermuteten Nucleotid-Variation aus der Anwesenheit oder Abwesenheit eines in der Stufe (4) erhaltenen Verstärkungsproduktes nachgewiesen wird.
In einer zweiten Ausführungsform dieser Erfindung wird die genannte Probe entweder zusammen oder nacheinander mit entweder
(a) einem ersten, für diagnostische Zwecke geeigneten Starter, der eine Sequenz aufweist, die im wesentlichen komplementär zu einem für diagnostische Zwecke geeigneten Anteil einer ersten Nucleinsäuresequenz ist, dieser erste, für diagnostische Zwecke geeignete Starter ein endständiges Nucleotid aufweist, das zu der besagten, vermuteten Nucleotid-Variation komplementär ist, und einem zweiten, für diagnostische Zwecke geeigneten Starter, der eine Nucleotid-Sequenz aufweist, die im wesentlichen komplementär zu einem für diagnostische Zwecke geeigneten Anteil einer zweiten Nucleinsäuresequenz ist, wobei der zweite, für diagnostische Zwecke geeignete Starter ein endständiges Nucleotid aufweist, das komplementär zu der komplementären, vermuteten Nucleotid-Variation ist; oder
(b) einem ersten Starter für diagnostische Zwecke mit einer Sequenz, die im wesentlichen komplementär zu einem für diagnostische Zwecke geeigneten Anteil einer ersten Nucleinsäuresequenz ist, wobei der erste für diagnostische Zwecke geeignete Starter ein endständiges Nucleotid aufweist, das komplementär zu dem normalen Nucleotid ist, das der vermuteten Nucleotid-Variation entspricht, und einem zweiten Starter für diagnostische Zwecke, der eine Sequenz aufweist, die im wesentlichen komplementär zu einem für diagnostische Zwecke geeigneten Anteil einer zweiten Nucleotidsequenz ist, wobei der zweite Starter für diagnostische Zwecke ein endständiges Nucleotid aufweist, das komplementär zu dem normalen Nucleotid ist, das der besagten vermuteten Nucleotid-Variation entspricht,
versetzt wird, wobei die genannten endständigen Nucleotide des ersten Starters für diagnostische Zwecke und des zweiten Starters für diagnostische Zwecke entweder beide am 5'-Ende oder beide am 3'-Ende des betreffenden Starters befindlich und die erste Nucleinsäuresequenz im entgegengesetzten Sinn zu der zweiten Nucleinsäuresequenz sind.
Deshalb kann in dieser Ausführungsform der zweite Starter für diagnostische Zwecke als ein Verstärkungs-Starter betrachtet werden, wie auf ihn hierin weiter oben und im folgenden Bezug genommen wird.
Durch diese zweite Ausführungsform wird es möglich, die Diskriminierung und Spezifizität zu erhöhen, da irgendwelche als Artefakte zu betrachtenden Produkte es notwendig machen, daß der Start am relevanten Terminus (im allgemeinen am 3'-Terminus) von zwei Oligonucleotiden mit fehlender Übereinstimmung und nicht an einem einzelnen Ende auftritt, wie es der Fall ist, wenn nur ein einziger Starter für diagnostische Zwecke verwendet wird. Der Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit einer vermuteten Nucleotid-Variation kann z. B. so ausgeführt werden, wie es hierin im folgenden beschrieben wird.
Nach einer dritten Ausführungsform dieser Erfindung wird eine Probe, die aus DNS mit einer vermuteten Nucleotid-Variation besteht, der Verstärkung unterworfen, z. B. durch lineare Verstärkung, wie sie hierin definiert wurde oder wie sie z. B. in den US-Patenten Nr. 4.683.195 und 4.683.202, in der PCT-Patentveröffentlichung WO 87/06.270, in Biotechnology Band 6, Oktober 1988 oder in der PCT-Patentveröffentlichung WO 88/10.315 beschrieben worden ist, und das Produkt dieser Verstärkung mit einem Starter für diagnostische Zwecke für einen für diagnostische Zwecke geeigneten Anteil einer Zielbasensequenz unter Hybridisierungsbedingungen in Gegenwart geeigneter Nucleosid-Triphosphate und einem Mittel zur Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate versetzt wird, wobei die Nucleotid-Sequenz des genannten Starters für diagnostische Zwecke derart ist, daß sie im wesentlichen komplementär zu dem genannten Anteil für diagnostische Zwecke ist, ein entständiges Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke entweder komplementär zu der vermuteten Nucleotid-Variation oder zu dem entsprechenden, normalen Nucleotid ist.
So kann nach dieser dritten Ausführungsform der Erfindung eine herkömmliche Verstärkung mit der gewünschten Anzahl von Zyklen und eine Hybridisation mit einem Starter für diagnostische Zwecke als Folgeschritt vor dem Nachweisschritt durchgeführt werden. Es ist nicht notwendig, einen Starter für die Verstärkung zu verwenden.
Diese dritte Ausführungsform ist deshalb von Interesse, da die für die Polymerisation benötigten Mittel wesentlich reduziert werden können (z. B. wenigstens halbiert), wie auch die Menge der verwendeten Nucleosid-Triphosphate und die Anzahl der für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendeten Heizvorrichtungen verringert werden können. Durch diese dritte Ausführungsform wird es folglich möglich, beträchtliche Kosten einzusparen.
Darüber hinaus wird durch diese dritte Ausführungsform, da der Verstärkungsschritt innerhalb eines Bereiches günstiger Temperaturen ohne Nachteil ausgeführt werden kann, nur erforderlich, daß der temperaturempfindlichere Hybridisationsversuch mit der diagnostischen Sonde einmal durchgeführt wird und somit das Risiko eines falschen Starts an einem endständigen, nicht in Übereinstimmung (im allgemeinen einem in 3'-Position nicht in Übereinstimmung) befindlichen Starter für diagnostische Zwecke weiter vermindert wird. Durch diese dritte Ausführungsform wird somit eine potentiell verläßlichere und robustere Methode auch für die Anwendung durch den Nichtfachmann zur Verfügung gestellt, die nicht so empfindlich auf Fehler des Bearbeiters reagiert. Diese dritte Ausführungsform macht weiterhin die Notwendigkeit einer besonderen Polymerase-Kettenreaktion als Kontrollstufe überflüssig, da die zu Beginn erfolgende Verstärkung eine eigene innere Kontrolle darstellt.

Wenn es gewünscht wird, kann der Starter für diagnostische Zwecke eine Markierung oder ein Signal aufweisen, die nicht dem Risiko des Abbaus, z.B. bei der Anwendung einer im Kreislauf betriebenen Methode bei erhöhter Temperatur wie der PCR-Technik, ausgesetzt sind. So kann die Markierung z.B. unter Verwendung einer geeigneten markierenden oder signalgebenden Gruppierung wie der Alkalischen Phosphatase oder der Merrettich-Peroxidase durchgeführt werden, wie es beschrieben worden ist.
In diesem Zusammenhang kann die Verwendung thermostabiler Enzyme zur Markierung, z.B. einer vom Thermus aquaticus abgeleiteten Phosphatase, von Interesse sein.
Eine vierte und bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung modifiziert die dritte Ausführungsform dieser Erfindung durch die Einführung der Besonderheit, daß zwei Starter für diagnostische Zwecke verwendet werden, wie es in der zweiten Ausführungsform dieser Erfindung beschrieben worden ist, wobei der zweite Starter für diagnostische Zwecke als ein Starter für die Verstärkung dient.
Somit wird nach der vierten Ausführungsform dieser Erfindung eine Probe, die aus DNS besteht, die eine vermutete Nucleotid-Variation enthält, einer Verstärkung unterworfen und das verstärkte Produkt zusammen oder nacheinander entweder mit
(a) einem ersten Starter für diagnostische Zwecke mit einer Sequenz, die im wesentlichen komplementär zu einem für diagnostische Zwecke geeigneten Anteil einer ersten Nucleinsäuresequenz ist, wobei der erste Starter für diagnostische Zwecke ein endständiges Nucleotid aufweist, das zu der vermuteten Nucleotid-Variation komplementär ist, und einem zweiten Starter für diagnostische Zwecke mit einer Sequenz, die im wesentlichen komplementär zu einem für diagnostische Zwecke geeigneten Anteil einer zweiten Nucleinsäuresequenz ist, wobei der zweite Starter für diagnostische Zwecke ein endständiges Nucleotid aufweist, das komplementär zu dem Nucleotid ist, das komplementär zu der genannten, vermuteten Nucleotid-Variation ist, oder
(b) einem ersten Starter für diagnostische Zwecke mit einer Sequenz, die im wesentlichen komplementär zu einem für diagnostische Zwecke geeigneten Anteil einer ersten Nucleinsäuresequenz ist, wobei der erste Starter für diagnostische Zwecke ein endständiges Nucleotid aufweist, das komplementär zu dem normalen Nucleotid ist, das der genannten, vermuteten Nucleotid-Variation entspricht, und einem zweiten Starter für diagnostische Zwecke mit einer Sequenz, die im wesentlichen komplementär zu einem für diagnostische Zwecke geeigneten Anteil einer zweiten Nucleinsäuresequenz ist, wobei der zweite Starter für diagnostische Zwecke ein endständiges Nucleotid aufweist, das komplementär zu dem Nucleotid ist, das komplementär zu dem genannten normalen Nucleotid ist, das der genannten, vermuteten Nucleotid-Variation entspricht, versetzt wird,
wobei das genannte endständige Nucleotid des ersten Starters für diagnostische Zwecke und das genannte endständige Nucleotid des zweiten Starters für diagnostische Zwecke entweder beide am 5'-Ende oder beide am 3'-Ende des betreffenden Starters stehen und die erste Nucleinsäuresequenz komplementär zu der zweiten Nucleinsäuresequenz ist.
Im allgemeinen befinden sich die genannten endständigen Nucleotide des ersten Starters für diagnostische Zwecke und des zweiten Starters für diagnostische Zwecke jeweils am 3'-Ende ihres betreffenden Starters.
Durch die vierte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden somit die potentiellen Vorteile der oben beschriebenen zweiten und dritten Ausführungsformen dieser Erfindung kombiniert. Diese sind unter anderem eine potentielle Steigerung der Spezifizität, gesenkter Kosten und eine robustere, nutzerfreundliche Technik.
Der Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit einer vermuteten Nucleotid-Variation kann z.B. so durchgeführt werden, wie es hierin im folgenden beschrieben wird.
Es ist für den Fachmann ersichtlich, daß das verstärkte Produkt, wenn es einmal mit (a) oder (b) versetzt worden ist, wie es hierin bereits beschrieben worden ist, gegebenenfalls in einem oder mehreren Finalzyklen gefahren werden kann. Wenn dieser Zyklus mehrmals durchlaufen wird, kann weiteres Produkt erhalten werden, das ein Hybrid des Verlängerungsproduktes des Starters für diagnostische Zwecke darstellt. Die unterschiedlichen Produkte werden in Verhältnissen zueinander erhalten, die von den unterschiedlichen Verhältnissen der ursprünglich verwendeten Oligonucleotid-Starter für die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und den als Starter für diagnostische Zwecke eingesetzten Oligonucleotiden abhängen.
In den Fällen, in denen die Verstärkung entweder durch die Verwendung von Startern für die Diagnose und Verstärkung oder durch die Verwendung von zwei Startern für diagnostische Zwecke, wie es z.B. in den ersten und zweiten Ausführungsformen dieser Erfindung beschrieben worden ist oder wie es als Teil der Verstärkungsvorschrift, die in der Europäischen Patentveröffentlichung Nr. 237.362 beschrieben worden ist, durchgeführt wird, werden die Stufen (a) Denaturierung zum Trennen der Extensionsprodukte des Starters von ihren Templaten und (b) In-Kontakt-Bringen der dadurch erhaltenen Einzelstränge, entweder zusammen oder nacheinander, mit geeigneten Nucleosid-Triphosphaten, einem Mittel zur Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate und den betreffenden Startern, um weitere Extensionsprodukte zu erzeugen, vorzugsweise wenigstens fünfmal (fünf Zyklen) wiederholt, können jedoch eine unbegrenzte Anzahl von Zyklen wiederholt werden, insbesondere dann, wenn der Starter der Verstärkung schwer zugänglich ist, ohne der Erfindung abträglich zu sein. Noch bevorzugter werden 15 bis 60, z.B. 15 bis 30, Zyklen durchlaufen, wenn die Probe humane genomische DNS enthält. Wenn die Probe aus Zellen besteht, werden sie vor der Durchführung der Stufe (a) vorzugsweise erwärmt, um die darin befindlichen Nucleinsäuren den Reagenzien auszusetzen. Durch diese Stufe wird eine Reinigungsvorstufe vor der Zugabe der Reagenzien vermieden. In dieser Hinsicht wird durch den Fachmann anerkannt werden, daß diese Erfindung eine wesentliche Verbesserung gegenüber den bekannten Verfahren darstellt, sogar dann, wenn die Reinigung der DNS aus einer Probe vor der angestrebten Verstärkung vorgenommen wird.
Es ist offensichtlich, daß in der Stufe (b) der Kontakt zwischen den Einzelsträngen, die in der Stufe (a) hergestellt worden waren, und den geeigneten Nucleosid-Triphosphaten, den/dem Starter(n), z.B. den Starter(n) für diagnostische Zwecke und/oder den Starter(n) für die Verstärkung entweder durch die Zugabe dieser Stoffe zum Reaktionsgemisch nach der Abtrennung des Starter-Extensions-Produktes von seinem Templat (Stufe b) erfolgen kann, oder es kann den Stoffen vertraut werden, die sich bereits im Reaktionsgemisch befinden. Tatsächlich können ein beliebiges oder mehrere verschiedene Nucleosid-Triphosphate und/oder das Mittel für die Polymerisation und/oder der/die Starter, z.B. der/die Starter für diagnostische Zwecke und/oder der Starter für die Verstärkung in jeder Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens zugegeben werden.

Nach einer fünften und bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt, wie es hierin bereits definiert worden ist, in dem die Verstärkung dadurch erreicht wird, daß die Starter-Extension auf der Grundlage der Verwendung eines Einzelstranges einer Nucleinsäure-Probe als Templat durchgeführt wird.
Danach wird nach dieser Ausführungsform die Starter-Extension auf der Grundlage der Verwendung des gleichen Stranges der Nucleinsäure als Templat durchgeführt, wobei kein Starter für die Verstärkung anwesend ist. Dadurch ist die Verstärkung arithmetisch und nicht exponentiell, eine exponentielle Verstärkung ist jedoch, zumindest theoretisch, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erreichbar. Der Vorteil dieser fünften Ausführungsform dieser Erfindung (hierin im folgenden auch als lineare Verstärkung bezeichnet) besteht darin, daß, wenn Produkte als Artefakte produziert werden, diese selbst nicht eine exponentielle Verstärkung ergeben können.
Eine lineare Verstärkung kann durch ein beliebiges, zur Verfügung stehendes Mittel erfolgen und kann folglich unter Verwendung von komplementären Nucleosidtriphosphaten in Gegenwart eines Mittels zur Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate durchgeführt werden, wodurch ein Extensionsprodukt des Starters von mittlerer Länge erzeugt wird, in dem eine ausreichende Anzahl komplementärer Nucleinsäuren zwischen dem Starter für diagnostische Zwecke und der Nucleinsäure-Probe anwesend ist.
Vorzugsweise wird, wenn alle komplementären Nucleosid-Triphosphate verwendet werden sollen, die Nucleinsäure-Probe einem Abbau durch Endonuclease unterworfen, wobei die Restriktions-Endonuclease derart ausgewählt wird, daß sichergestellt wird, daß die Spaltung der Nucleinsäure-Probe an einem Ort durchgeführt wird, der geeignet ist, die Bildung von Extensions-Produkten am Starter mit einer feststehenden Länge zu erlauben. Vorteilhafterweise kann die lineare Verstärkung jedoch in Gegenwart von nur 1, vorteilhafterweise nur 2 oder vorzugsweise nur 3 Nucleosid-Triphosphaten durchgeführt werden, so daß der Starter für diagnostische Zwecke in seinem gebundenen Zustand (d. h. hybridisiert zu der Nucleinsäure-Probe) nur so weit verlängert werden kann, wie die Anwesenheit der 1, 2 oder 3 Nucleosid-Triphosphate es erlaubt. Sobald in der Nucleinsäure-Probe ein Nucleosid-Triphosphat anwesend ist, für das kein komplementäres Nuclesoid-Triphosphat existiert, wird die Starter-Extension aufhören.
Die lineare Verstärkung kann gegebenenfalls bei der Schmelztemperatur (T_m) der Sequenz durchgeführt werden. Bei dieser Temperatur befindet sich der Starter für diagnostische Zwecke, der zu der komplementären Sequenz in der Nucleinsäure-Probe hybridisiert ist, im Gleichgewicht mit dem Starter für diagnostische Zwecke, der sich in der Lösung frei beweglich befindet, und so wird der Starter für diagnostische Zwecke (gegebenenfalls in Form des Extensionsproduktes) schnell an die Nucleinsäure-Probe hybridisiert oder von ihr denaturiert. Gegebenenfalls kann die lineare Verstärkung auch durch thermisches Oszillieren durchgeführt werden. Ein solches thermisches Oszillieren schließt im allgemeinen einen schnellen Temperaturwechsel um den Schmelzpunkt der Sequenz ein.
Wenn nur 1, 2 oder 3 Nucleosid-Triphosphate anwesend sind, wird am Starter für diagnostische Zwecke nur so lange eine Extension eintreten, wie es die Anwesenheit dieser Nucleosid-Triphosphate gestattet. Wie oben bereits gesagt, wird, wenn es z. B. zwischen dem 3'-endständigen Nucleosid des Starters für diagnostische Zwecke und dem entsprechenden Nucleosid-Triphosphat in der Nucleinsäure-Probe keine Übereinstimmung gibt, keine Extension am Starter einsetzen. Wenn jedoch das terminale Nucleosid-Triphosphat am 3'-Ende komplementär zu dem entsprechenden Nucleosid-Triphosphat in der Nucleinsäure-Probe ist, wird eine Starterextension durchgeführt werden.
In den Fällen, in denen nur 1, 2 oder 3 Nucleosid-Triphosphate verwendet werden und in Verwendung sind, wird das terminale Nucleosid-Triphosphat des verlängerten Starters für diagnostische Zwecke nur einmal verwendet. Dann kann es vorteilhaft sein, ein Dideoxy-Nucleosid-Triphosphat als Nucleosid-Triphosphat zu verwenden, das dann bei der Verwendung das terminale Nucleosid-Triphosphat des Extensionsproduktes des Starters für diagnostische Zwecke darstellt. Dies unterstützt die Erzeugung eines eindeutig terminierten Extensionsproduktes am Starter für diagnostische Zwecke.
Wenn es gewünscht wird, können ein oder mehrere Nucleosid-Triphosphate, die im Reaktionsgemisch vorhanden sind und in den/die verlängerten Starter eingebaut werden sollen, auf eine beliebige, geeignete Art und Weise markiert oder gekennzeichnet sein. So können z. B. ein oder mehrere der verwendeten Nucleosid-Triphosphate fluoreszenzmarkiert sein. Diese Art der Markierung der Nucleosid-Triphosphate ist von besonderer Bedeutung in Beziehung zu der fünften Ausführungsform dieser Erfindung, bei der die Erzeugung eines Extensionsproduktes am Starter für diagnostische Zwecke durch den Nachweis des markierten oder gekennzeichneten Nucleosid-Triphosphates, das/die in das Extensionsprodukt eingebaut wurde/n, nachgewiesen wird. Wenn jedoch kein Extensionsprodukt erzeugt wird, erfolgt kein Einbau und das markierte oder gekennzeichnete Nucleosid-Triphosphat kann z. B. ausgewaschen werden. Insbesondere wird durch die fünfte Ausführungsform das Problem umgangen, Artefakt-Produkte zu verstärken, so daß eine gute Unterscheidung in Gegenwart markierter oder gekennzeichneter Nucleosid-Triphosphat(e) erreicht wird. In den Fällen, in denen eine Verstärkung durchgeführt wird, z. B. unter Anwendung der PCR-Technik, kann die Erzeugung eines Artefakt-Produktes zu einer Verstärkung dieses Produktes führen und somit zu einem Einbau eines markierten oder gekennzeichneten Nucleosid-Triphosphates, wodurch die Unterscheidbarkeit vermindert wird.
Zusätzlich zu dem oben Gesagten kann es wünschenswert sein, daß der Starter für diagnostische Zwecke einen Bestandteil eines immunologischen Bindungspaares trägt, z. B. ein Antigen oder einen Antikörper, oder einen Bestandteil eines komplexbildenden Paares, z. B. Biotin, wodurch der andere Bestandteil dieses Bindungspaares gebunden werden kann oder dieses Paar gebildet wird, um dann an einer festen Phase immobilisiert zu werden.
Entsprechend einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung wird ein Testsatz (Kit) zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit wenigstens einer Nucleotid-Variation in einer oder mehreren Nucleinsäuren, die in einer Probe enthalten sind, zur Verfügung gestellt, und dieser Testsatz besteht aus:
(1) einem Starter für diagnostische Zwecke für jeden zur Diagnose geeigneten Anteil einer Ziel-Basen-Sequenz, wobei die Nucleotidsequenz jedes Starters für diagnostische Zwecke derart ist, daß sie im wesentlichen komplementär zu dem genannten, diagnostisch geeigneten Anteil ist, ein endständiges Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke entweder komplementär zu der vermuteten Nucleotid-Variation oder zu dem entsprechenden, normalen Nucleotid ist, so daß bei der Verwendung ein Extensionsprodukt des Starters für diagnostische Zwecke synthetisiert wird, wenn das besagte endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid der Ziel-Basen-Sequenz ist, jedoch kein Extensionsprodukt synthetisiert wird, wenn das besagte endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke nicht komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Ziel-Basen-Sequenz ist;

(2) jedes der vier verschiedenen Nucleosid-Triphosphate; und
(3) ein Mittel zur Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate unter (2).
Vorteilhafterweise enthält der erfindungsgemäße Testsatz zusätzlich einen Starter für die Verstärkung, der jedem Starter für diagnostische Zwecke entspricht, wobei die Nucleotid-Sequenz des der Verstärkung dienenden Starters derart ist, daß jedes Extensionsprodukt des entsprechenden Starters für diagnostische Zwecke nach seiner Abtrennung von seinem Komplementär als Templat für die Synthese eines Extensionsproduktes des Starters für die Verstärkung dienen kann. So enthält der erfindungsgemäße Testsatz z. B. entweder einen oder beide Sätze an Startern für diagnostische Zwecke, wie sie weiter oben unter Bezug auf die zweite Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, wie sie oben definiert worden ist, im Detail beschrieben wurden.
Der erfindungsgemäße Testsatz kann auch gegebenenfalls innere Starter als Kontrollen enthalten, wenn das angemessen erscheint. Es wird jedoch besonders bevorzugt, daß der erfindungsgemäße Testsatz Starter für die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und einen Starter für diagnostische Zwecke (wie er hierin weiter unten definiert wird) hinsichtlich jeder vermuteten Nucleotid-Variation enthält. Gegebenenfalls kann der Testsatz zusätzlich dazu entweder einen oder beide Sätze der Starter für diagnostische Zwecke, wie sie weiter oben unter Bezugnahme auf die zweite Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens im Detail beschrieben worden sind, enthalten.
Jeder der unter (1), (2) und (3) und/oder die Starter zur Verstärkung können günstigerweise in getrennte Behälter verpackt werden, können aber auch vorteilhafterweise in einem einzigen Behälter enthalten sein, zu dem dann das zu analysierende Material zugegeben wird. Vorteilhafterweise wird der einzelne Behälter zusätzlich Puffer enthalten.
Es ist verständlich, daß, wenn der erfindungsgemäße Testsatz beide Sätze an Startern für diagnostische Zwecke (a) und (b), wie sie oben in Beziehung zu der zweiten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben worden sind, enthält, beide Sätze der Starter für diagnostische Zwecke nicht zusammen in einem Behälter vorliegen, obwohl jeder Startersatz zusammen mit jedem der Stoffe, die unter (2) und (3) und/oder den Startern für die Verstärkung im Detail beschrieben worden sind, in getrennten Behältern vorliegen kann. Wenn die zu untersuchende Probe zu Beginn verstärkt werden soll, wie es in der Europäischen Patentveröffentlichung Nr. 237.362 beschrieben worden ist, kann es vorteilhaft sein, sowohl die Starter für die PCR-Reaktion als auch die/den Starter für diagnostische Zwecke in einem einzigen Behälter zusammen mit den oben beschriebenen Stoffen (2) und (3) vorzusehen. Gegebenenfalls können jedoch der/die Starter für diagnostische Zwecke in einem getrennten Behälter zur späteren Verwendung, wenn die Verstärkung durchgeführt worden ist, enthalten sein.
Der Begriff „Nucleosid-Triphosphat", wie er hierin verwendet wird, betrifft Nucleoside, die entweder in der DNS oder in der RNS vorhanden sind und schließt damit Nucleoside, die Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin und Uracil als Basen enthalten, ein, wobei die Zuckereinheit Desoxyribose oder Ribose ist. Im allgemeinen werden die Desoxyribonucleoside in Kombination mit einer DNS-Polymerase verwendet. Es ist jedoch offensichtlich, daß andere modifizierte Basen, die in der Lage sind, mit einer der üblichen Basen Adenosin, Cytosin, Guanin, Thymin und Uracil Basenpaare auszubilden, verwendet werden können. Unter diesen modifizierten Basen sind z. B. 8-Azaguanin und Hypoxanthin.
Der Begriff „Nucleotid", wie er hierin verwendet wird, kann sich auf Nucleotide beziehen, die entweder in der DNS oder RNS anwesend sind. Sie schließen somit Nucleotide ein, die Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin und Uracil als Base enthalten und worin die Zuckereinheit Desoxyribose oder Ribose ist. Es ist jedoch offensichtlich, daß andere modifizierte Basen, die in der Lage sind, Basenpaare auszubilden mit einer der üblichen Basen Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin und Uracil, im Starter für diagnostische Zwecke verwendet werden können innerhalb dieser Erfindung. Derartige modifizierte Basen sind z. B. 8-Azaguanin und Hypoxanthin.
Es wird jedoch anerkannt werden, daß in den Fällen, in denen das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit einer vermuteten Nucleotid-Variation, die einem Abschnitt der Zielbasensequenz benachbart ist, die nicht alle vier verschiedenen Nucleotide enthält, verwendet werden soll, ein Extensionsprodukt des Starters für diagnostische Zwecke und gegebenenfalls ein Extensionsprodukt des Starters für die Amplifikation gebildet werden kann, wenn nur eines der geeigneten entsprechenden Nucleosidtriphosphate anwesend ist, so daß nicht alle vier verschiedenen Nucleosid-Triphosphate notwendig wären. Das Mittel zur Polymerisation der Nucleosid-Triphoshate kann eine beliebige Verbindung oder ein beliebiges System sein, das so funktioniert, daß die Starter-Extensions-Produkte synthetisiert werden, einschließlich Enzyme. Geeignete Enzyme für diesen Zweck sind u. a. z. B. E. coli DNS-Polymerase I, das Klenow-Fragment der E. coli DNS-Polymerase I, T4 DNS-Polymerase, andere verfügbare DNS-Polymerasen, reverse Transciptase und andere Enzyme, einschließlich thermostabiler Enzyme. Der Begriff „thermostabile Enzyme", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Enzym, das gegenüber Wärme stabil ist und wärmestabil ist und die Kombination der Nucleotide auf die gewünschte Weise katalysiert (erleichtert), wodurch die Starter-Extensions-Produkte gebildet werden, die zu jedem Nucleinsäurestrang komplementär sind. Im allgemeinen wird die Synthese am 3'-Ende eines jeden Starters begonnen werden und wird dann in der Richtung auf das 5'-Ende fortschreiten entlang des Stranges des Templates, bis die Synthese beendet wird, wodurch Moleküle unterschiedlicher Länge synthetisiert werden. Es kann auch Enzyme geben, z. B. thermostabile Enzyme, die die Synthese am 5'-Ende initiieren und in die andere Richtung fortschreiten, wobei das gleiche Verfahren verwendet wird, wie es oben beschrieben worden ist. Ein bevorzugtes thermostabiles Enzym, das im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann, ist jenes, das aus Thermus aquaticus extrahiert und gereinigt werden kann. Dieses Enzym weist eine Molmasse von ungefähr 86000 bis 90000 Dalton auf, wie in der Europäischen Patentveröffentlichung Nr. 237.362 beschrieben worden ist (siehe auch Europäische Patentveröffentlichung Nr. 258.017). Der Stamm YT1 des Thermus aquaticus ist ohne Einschränkungen erhältlich von der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA, als ATCC 25.104.
Der Begriff „Abschnitt für diagnostische Zwecke", wie er hierin verwendet wird, bezeichnet den Abschnitt der Zielbasensequenz (wie es hierin weiter unten definiert wird), der als endständiges Nucleotid die potentielle Nucleotid-Variation enthält, deren Anwesenheit oder Abwesenheit nachgewiesen werden soll. Im allgemeinen wird sich die potentielle Nucleotid-Variation am 5'-Ende des Abschnittes für diagnostische Zwecke befinden, da im allgemeinen die Synthese der Starter-Extensions-Produkte am 3'-Ende eines jeden Starters initiiert wird, wie es oben beschrieben worden ist. In den Fällen, in denen jedoch ein Mittel für die Polymerisation verwendet werden soll, das die Synthese am 5'-Ende des Starters für diagnostische Zwecke initiiert und in die Richtung des 3'-Endes entlang des Stranges des Templates fortschreitet, bis die Synthese den „Abschnitt für diagnostische Zwecke" beendet, wird die potentielle Nucleotid-Variation an seinem 3'-Ende aufweisen. Die Starter für diagnostische Zwecke

werden auf geeignete Art und Weise konstruiert in dieser Hinsicht, wie es weiter unten ausgeführt wird.
Der Begriff „Zielbasensequenz", wie er hierin verwendet wird, bezeichnet eine Nucleotidsequenz, die wenigstens einen Abschnitt für diagnostische Zwecke aufweist, wie er hierin oben definiert worden ist. So kann z. B. in einem Einzeltest auf β-Thalassaemien die Zielbasensequenz bis zu 60, z. B. 50 Abschnitte für diagnostische Zwecke enthalten, wobei jeder Abschnitt für diagnostische Zwecke eine einzige potentielle Nucleotid-Variation aufweist.
Der Begriff „Oligonucleotid", wie er hierin verwendet wird, wird als ein Molekül definiert, das aus zwei oder mehr Desoxyribonucleotiden oder Ribonucleotiden, vorzugsweise mehr als drei davon, aufgebaut ist. Seine genaue Größe wird von vielen Faktoren abhängen, z. B. von der Temperatur der Reaktion, der Salzkonzentration, der Anwesenheit von Formamid und der Anwesenheit anderer naher Mutation(en), z. B. wie in der Sichelzell-Hb C-Krankheit, was wiederum von der schließlichen Funktion oder Verwendung des Oligonucleotids abhängt. Tatsächlich kann die genaue Sequenz des Oligonucleotids auch von einer Reihe von Faktoren abhängen, wie sie hierin weiter unten beschrieben werden. Das Oligonucleotid kann synthetisch hergestellt oder durch Clonierung gewonnen werden.
Der Begriff „Starter", wie er hierin verwendet wird, bezeichnet ein Oligonucleotid, das natürlich wie in gereinigten, durch Restriktionsabbau erhaltenen Produkten vorkommt oder synthetisch hergestellt wurde, das in der Lage ist, als Ort der Initiierung der Synthese zu wirken, wenn es unter Bedingungen eingesetzt wird, unter denen die Synthese eines Starter-Extensions-Produktes, das komplementär zu einem Nucleinsäurestrang ist, induziert wird, d. h. in Gegenwart geeigneter Nucleosid-Triphosphate und einem Mittel zur Polymerisation, z. B. DNS-Polymerase, in einem geeigneten Puffer („Puffer" schließt den *p*H-Wert, Ionenstärke, Cofaktoren usw. ein) und bei einer geeigneten Temperatur.
Um eine maximale Wirksamkeit bei der Amplifizierung zu erreichen, ist der Starter vorzugsweise einzelsträngig, kann jedoch alternativ dazu doppelsträngig sein. Wenn er doppelsträngig ist, wird der Starter zunächst auf eine solche Weise behandelt, daß seine Stränge gespalten werden, bevor er eingesetzt wird, um Extensionsprodukte herzustellen. Vorzugsweise ist der Starter ein Oligodesoxyribonucleotid. Der Starter muß ausreichend lang sein, um die Synthese von Extensionsprodukten in Gegenwart eines Mittels zur Polymerisation zu starten. Die genaue Länge des Starters ist abhängig von vielen Faktoren, einschließlich der Temperatur, der Herkunft des Starters und der verwendeten Methode. In Abhängigkeit von der Komplexizität der Zielsequenz enthalten z. B. die Starter für diagnostische Zwecke und zur Amplifizierung typischerweise 12 bis 35, z. B. 15 bis 35 Nucleotide, obwohl sie auch mehr oder weniger als diese Nucleotide enthalten können. Kurze Startermoleküle benötigen im allgemeinen niedrigere Temperaturen, um ausreichend stabile Hybridkomplexe mit dem Templat auszubilden.
Der Begriff „komplementär zu" wird hierin unter Bezugnahme auf Nucleotide verwendet und bedeutet, daß ein Nucleotid mit einem anderen spezifischen Nucleotid Basenpaare ausbilden wird. So ist Adenosintriphosphat komplementär zu Uridintriphosphat oder Thymidintriphosphat und Guanosintriphosphat ist komplementär zu Cytidintriphosphat. Es ist offenkundig, daß, während Thymidintriphosphat und Guanosintriphosphat unter bestimmten Bedingungen Basenpaare ausbilden können, sie unter den Gesichtspunkten dieser Beschreibung nicht als komplementär betrachtet werden. Weiterhin wird anerkannt, daß, während Cytosintriphosphat und Adenosintriphosphat unter bestimmten Bedingungen Basenpaare ausbilden können, sie im Sinne dieser Beschreibung nicht als komplementär betrachtet werden. Das gleiche trifft auf Cytosintriphosphat und Uraciltriphosphat zu.
Die hierin verwendeten Starter werden so ausgewählt, daß sie „im wesentlichen" komplementär zu den verschiedenen Strängen jeder spezifischen Sequenz, die verstärkt werden soll, sind. Das bedeutet, daß die Starter ausreichend komplementär sein müssen, um mit ihren entsprechenden Strängen zu hybridisieren. Deshalb ist es nicht notwendig, daß die Startersequenz die genaue Sequenz des Templates widerspiegelt. Wenn z. B. der Starter für diagnostische Zwecke aus einer Nucleotidsequenz besteht, in der das am 3'-Ende befindliche Nucleotid komplementär entweder zu einer vermuteten Nucleotid-Variation oder zu einem normalen Nucleotid ist, kann an das 5'-Ende des Starters ein nichtkomplementäres Nucleotidfragment gebunden werden, wobei der Rest der Startersequenz komplementär zu dem Abschnitt für diagnostische Zwecke einer Zielbasensequenz ist. Üblicherweise sind die Starter jedoch exakt komplementär, ausgenommen in den Fällen, wenn nichtkomplementäre Nucleotide anwesend sind bei einem vorher festgelegten Starter-Terminus, wie es hierin weiter oben beschrieben worden ist.
Es ist jedoch möglich, daß unter bestimmten Bedingungen die Synthese eines Extensionsproduktes eines Starters für diagnostische Zwecke sogar in Gegenwart eines nichtkomplementären Restes am 3'-Ende induziert werden kann. Dieser Artefakt kann aus der Anwendung einer zu niedrigen Temperatur resultieren, so daß in solchen Fällen die Temperatur erhöht werden kann, aus einer zu langen Zeit der Inkubation/Anlagerung, so daß in diesem Fall diese Zeiten reduziert werden können, aus einer zu hohen Salzkonzentration, so daß in diesen Fällen die Salzkonzentration erniedrigt werden kann, aus einer zu hohen Enzymkonzentration, aus einer zu hohen Konzentration des Nucleosidtriphosphates, aus einem falschen *p*H-Wert oder einer falschen Länge des als Starter eingesetzten Oligonucleotids. Alle diese Faktoren werden in der Europäischen Patentveröffentlichung Nr. 237.362 diskutiert. Eine Hauptursache für das Auftreten von Artefakten ist wahrscheinlich, daß die Temperatur auf zu niedrige Werte abfallen gelassen wird, wodurch eine zu niedrige Stärke (low stringency) erlaubt wird, z. B. durch Entnahme des Reaktionsgemisches aus den Wärmeumlaufvorrichtungen, sogar kurzzeitig z. B. bei der Zugabe des Mittels für die Polymerisation (z. B. Taq-Polymerase) insbesondere im ersten Reaktionszyklus. Zusätzlich zu dem oben dargelegten wurde von uns festgestellt, daß solche Artefakte auch aus der Verwendung eines Starters für diagnostische Zwecke resultieren können, der besonders reich an G- (Guanosin-) und C- (Cytosin-) Resten ist. Ein Starter für diagnostische Zwecke kann in dieser Hinsicht zu Schwierigkeiten führen, wenn er insgesamt G/C-reich ist oder insbesondere dann, wenn er reich an G/C an seinem relevanten, üblicherweise 3'-Ende ist. Darüber hinaus kann die exakte Art und Weise der Basenpaarung in dem Bereich des relevanten, üblicherweise 3'-Endes des Starters für diagnostische Zwecke, wenn er angewendet wird, die Ursache von Artefakten sein. So scheint die Anwesenheit von As (Adenosin) bei der Basenpaarung im Bereich des relevanten, üblicherweise 3'-Endes des Starters für diagnostische Zwecke zu einer Verbesserung der Spezifizität zu führen, während das bei der Anwesenheit von Gs (Guanosin) nicht der Fall ist. Weiterhin kann die genaue Art und Weise der Basenfehlpaarung am relevanten, üblicherweise 3'-Ende des Starters für diagnostische Zwecke ein wesentlicher Faktor dafür sein, ob ein Artefakt erhalten wird oder nicht. So führt zum Beispiel eine AA- oder CT-Basenfehlpaarung üblicherweise nicht zur Hybridisation, jedoch kann eine GT- oder AC-Basenfehlpaarung ein ausreichendes Maß an Hybridisation ergeben, um zur Bildung von Artefakt(en) zu führen. Man kann Artefakte vermeiden, wenn man von vornherein einen oder mehrere Reste mit Basenfehlpaarung einsetzt oder gegebenenfalls Deletionen oder Inserts innerhalb des Starters für diagnostische Zwecke, um den Starter zu destabilisieren, indem die Bindung während der Hybridisation weiter reduziert wird.

So können z. B. eines oder mehrere der 10, z. B. 6, Nucleotide, die der endständigen Basenfehlpaarung benachbart sind, verändert werden, um eine weitere Basenfehlpaarung einzuführen. Im allgemeinen kann nur eine Basenfehlpaarung zusätzlich zu der endständigen Basenfehlpaarung notwendig sein, die z. B. 1, 2 oder 3 Basen von der endständigen Basenfehlpaarung entfernt ist. So haben wir z. B. hinsichtlich der Bestimmung der Anwesenheit eines normalen Homozygoten, Heterozygoten oder kranken Homozygoten in bezug auf das Z-Allel des α 1-Antitrypsin-Gens gefunden, daß man gute Ergebnisse dann erhalten kann, wenn das dritte Nucleotid des 3'-terminalen Nucleotids verändert wird, wodurch bei der Anwendung eine Basenfehlpaarung erreicht wird. So wurde z. B. von uns gefunden, daß die Anwesenheit eines C an Stelle eines A als drittes Nucleotid vom 3'-Ende des Starters für diagnostische Zwecke an gelesen, leicht zur Unterscheidung von normalen Homozygoten, Heterozygoten und kranken Homozygoten in bezug auf das Z-Allel herangezogen werden kann. Die beste Konstruktion eines Starters für diagnostische Zwecke kann somit durch genau durchgeführte Versuche auf der Grundlage der oben genannten Kriterien bestimmt werden, wobei die Durchführung dieser Experimente innerhalb der Fähigkeiten eines ausgebildeten Molekularbiologen liegt.

Der Begriff „Starter für diagnostische Zwecke", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Starter (Primer), die eine solche Nucleotidsequenz aufweisen, bei der ein terminales Nucleotid so ausgewählt wird, daß es entweder komplementär zu einer vermuteten Nucleotid-Variation oder zu einem entsprechenden normalen Nucleotid ist, so daß ein Extensionsprodukt des Starters für diagnostische Zwecke synthetisiert wird, wenn das terminale Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke komplementär zu dem entsprechenden terminalen Nucleotid des entsprechenden Abschnittes für diagnostische Zwecke der Zielbasensequenz ist, jedoch kein solches Extensionsprodukt synthetisiert wird, wenn das terminale Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke nicht homolog mit dem entsprechenden terminalen Nucleotid des entsprechenden Abschnitts für diagnostische Zwecke der Zielbasensequenz ist.

Der Begriff „Starter für die Amplifizierung (Verstärkung)" wird hierin verwendet, um einen Starter (Primer) zu bezeichnen, der in der Lage ist, mit einem Nucleinsäurestrang zu hybridisieren, der komplementär zu dem Nucleinsäurestrang ist, mit dem der Starter für diagnostische Zwecke hybridisieren kann, wobei der Starter für die Amplifizierung eine solche Nucleotidsequenz aufweist, daß diese in der Lage ist, mit einem Extensionsprodukt eines Starters für diagnostische Zwecke nach der Abtrennung von ihrem Komplementär zu hybridisieren, wodurch das Extensionsprodukt des Starters für diagnostische Zwecke als Templat für die Synthese eines Extensionsproduktes des Starters für die Amplifizierung dienen kann und somit die Verstärkung unterstützt. Diese Erfindung betrifft somit, wenigstens zum Teil, eine Verbesserung des Verstärkungsverfahrens, z. B. eines Verfahrens, wie es in der Europäischen Patentveröffentlichung Nr. 237.362 beschrieben worden ist, wobei diese Verbesserung es möglich macht, entweder eine Sequenz mit einer vermuteten Nucleotid-Variation, wenn diese anwesend ist, oder eine Sequenz, die ein normales entsprechendes Nucleotid enthält, wenn dieses anwesend ist, selektiv zu verstärken und somit den Nachweis zu vereinfachen, wobei eine Sequenzierung, allelspezifische Oligonucleotide und Restriktionsenzym-Abbau nicht notwendig sind. So kann für eine gegebene Nucleotid-Variation, z. B. eine Punktmutation, deren Anwesenheit oder Abwesenheit nachgewiesen werden entweder

1) durch Konstruktion des Starters für diagnostische Zwecke derart, daß er ein geeignetes terminales Nucleotid aufweist, das komplementär zu der vermuteten Nucleotid-Variation ist, so daß die Synthese eines verstärkten Produktes als Indikation für die Anwesenheit der vermuteten Nucleotid-Variation dient und die Abwesenheit einer vermuteten Nucleotid-Variation dient oder
2) durch die Konstruktion des Starters für diagnostische Zwecke auf solche Weise, daß er ein endständiges geeignetes Nucleotid aufweist, das komplementär zu dem entsprechenden normalen Nucleotid ist, so daß die Synthese eines Verstärkungsproduktes als Indikation für die Abwesenheit einer vermuteten Nucleotid-Variation dient und die Abwesenheit eines Verstärkungsproduktes als Indikation für die Anwesenheit einer vermuteten Nucleotid-Variation dient.

In diesem Zusammenhang betrifft die Bezugnahme hierin auf ein „geeignetes terminales Nucleotid" ein endständiges Nucleotid des Starters, von dem die Synthese initiiert werden würde, wenn diese möglich ist. Da folgerichtig das Mittel für die Polymerisation im allgemeinen die Synthese am 3'-Ende des Starters initiieren würde, wird das geeignete terminale Nucleotid im allgemeinen das 3'-terminale Nucleotid sein.

Die Bestätigung für die Abwesenheit oder Anwesenheit von z. B. einer gegebenen Punktmutation kann dadurch erhalten werden, daß beide alternativen Verfahren (1) und (2), wie sie oben beschrieben worden sind, übernommen werden. Durch die Kombination dieser zwei Ansätze wird ein Verfahren zum Nachweis von Heterozygoten zur Verfügung gestellt, das bei der Analyse von dominierenden Erbkrankheiten und beim Nachweis von Trägern für rezessive Erbkrankheiten von Wert ist.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform betrifft diese Erfindung den Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von mehr als einer vermuteten Nucleotid-Variation in der gleichen Probe. Durch die Möglichkeit, mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens selektiv Sequenzen in Abhängigkeit von vorher bestimmten Nucleotid-Sequenzen des Starters für diagnostische Zwecke zu verstärken, werden vielfache Verstärkungsprodukte zur Verfügung gestellt, die auf einfache, genaue Art und Weise und mit einer minimalen Ausbildung des Durchführenden unterschieden werden können, wodurch eine robuste Technik zur Verfügung gestellt wird, mit der eine einzige Probe für eine Vielzahl von Nucleotid-Variationen untersucht werden kann. Diese Erfindung ist daher von besonderem Interesse für das Screening einer einzigen Probe DNS oder RNS auf eine Reihe von Erbkrankheiten hin, z. B. genetisch bedingter Erkrankungen, Veranlagungen und somatische Mutationen, die zu den verschiedensten Krankheiten führen. Solche Proben von können z. B. aus Blut oder Gewebematerial wie Chlorion-villi oder amniotischen Zellen durch eine Anzahl von Methoden gewonnen werden, z. B. nach denen, die von Maniatis et al., Molecular Cloning (1982), S. 280–281 beschrieben worden sind. Darüber hinaus können, wenn die molekularen Grundlagen für weitere Erbkrankheiten erforscht ist, diese dann bekannten Krankheiten einfach in das Screening-Verfahren nach dieser Erfindung mit aufgenommen werden.

Die Vielzahl an Amplifikationsprodukten kann durch eine Reihe von Verfahren unterschieden werden. So können z. B. für jedes vermutete verstärkte Produkt Sonden verwendet werden, wobei jede Sonde ein unterschiedliches und unterscheidbares Signal oder einen solchen Rest trägt, der in der Lage ist, ein Signal hervorzurufen.

Solche Signale und Reste, die in der Lage sind, ein Signal hervorzurufen, werden in der Europäischen Patentveröffentlichung Nr. 246.864 im Detail diskutiert, können jedoch auch z. B. ein Verstärkungssystem an fester Phase mit einschließen, wie es von C. G. Wang in World Biotech Report 1986, Band 2, Teil 2, auf den Seiten 33 bis 37 (Diagnostics Healthcare Proceedings der Konferenz vom November 1986 in San Francisco) beschrieben worden ist, wonach Mikrokugeln, die mit einer Vielzahl ausgewählter Spurenelemente hergestellt worden waren, an die Sonde konjugiert werden. Die Anwesenheit bestimmter Sonden kann dann durch Röntgenstrahl-Fluoreszenz-Analyse nachgewiesen werden. Dieserart Verfahren können im allgemeinen einfach und direkt angewendet werden, da es nur notwendig ist, die Anwesenheit eines Verstärkungsproduktes nachzuweisen und nicht zwischen Sequenzen zu unterscheiden, die sich nur in einem einzigen Nucleotid unterscheiden.
Eine viel einfachere und bevorzugte Methode zum Unterscheiden zwischen Verstärkungsprodukten besteht darin, die Nucleotid-Sequenz des Starters für die Verstärkung derart auszuwählen, daß die Länge eines jeden Verstärkungsproduktes, das während der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellt wird, unterschiedlich ist. In dieser Beziehung wird die Anzahl der Basenpaare, die in einem Verstärkungsprodukt vorhanden ist, durch den Abstand zwischen den Startern für diagnostische Zwecke und für die Verstärkung bestimmt. Somit können die Starter für die Verstärkung derart ausgewählt werden, daß jede potentielle Nucleotid-Variation mit einem potentiellen Verstärkungsprodukt unterschiedlicher Länge zusammenhängt.
Die Anwesenheit oder Abwesenheit einer gegebenen, potentiellen Nucleotid-Variation kann so vorteilhafterweise durch elektrophoretische Verfahren nachgewiesen werden, in denen die unterschiedlichen Verstärkungsprodukte, die so erhalten wurden, entsprechend ihren Molmassen aufgetrennt und damit z. B. durch Autoradiographie oder Fluoreszenznachweise identifiziert werden.
Die Längen der verschiedenen Produkte können nur um ein einziges Nucleotid differieren, jedoch sollen die Längen vorzugsweise um wenigstens drei Nucleotide unterschiedlich sein. Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise unter Verwendung eines Intercalations-Farbstoffes, z. B. Ethidiumbromid, durchgeführt, der als orange Fluoreszenz bei der Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. So kann die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Vielzahl von potentiellen Nucleotid-Variationen in einer einzigen Probe schnell, genau und leicht festgestellt werden. Gegebenenfalls können die Starter für diagnostische Zwecke und zur Verstärkung markiert werden, z. B. durch die Verwendung eines Fluorophors. So kann z. B. jeder Starter für diagnostische Zwecke und zur Verstärkung ein unterschiedliches Fluorophor tragen, so daß die Ergebnisse einer Reihe von Versuchen von einem Elektrophoresegel abgelesen werden können, z. B. mit einem Laserstrahl-Detektor, so daß dieses erfindungsgemäße Verfahren automatisiert werden kann. Andererseits kann die Anwesenheit oder Abwesenheit eines Verstärkungsproduktes einfach durch Verwendung eines Lösungsmittels festgestellt werden, welches in der Lage ist, Nucleosid-Triphosphate selektiv zu lösen, jedoch nicht in der Lage ist, eine Nucleotid-Sequenz (z. B. DNS) aufzulösen. Ein Beispiel für ein solches Lösungsmittel ist Trichloressigsäure (TCA). So kann z. B. die Anwesenheit oder Abwesenheit eines Verstärkungsproduktes durch TCA-Fällung der verstärkten Reaktionsgemische festgestellt werden. Wenn die entsprechenden Nucleosid-Triphosphate in einer Serie von Reaktionen mit exponentieller Verdünnung eingesetzt wurden, werden im wesentlichen immer größere Mengen an in TCA unlöslichem Material vorhanden sein, während in den Fällen, wo keine Extension des Starters für diagnostische Zwecke stattgefunden hat, das nicht der Fall ist. Die quantitative Bestimmung des Anteils an unlöslichem Material kann nach bekannten Verfahren durchgeführt werden. So kann z. B. das Nucleosid-Triphosphat markiert werden (z. B. durch radioaktive oder Fluoreszenz-Markierung), das Reaktionsgemisch kann z. B. zentrifugiert werden, die obenstehende Flüssigkeit abdekantiert werden und entweder die Flüssigkeit oder das unlösliche Produkt mit einer geeigneten Nachweismethode gemessen werden, z. B. durch Szintillationszählung oder Fluoreszenzmessung.
Nach einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung wird durch uns eine Nucleotid-Sequenz von ungefähr 5 bis ungefähr 50 bp zur Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren zur Verfügung gestellt, wobei ein endständiges Nucleotid dieser Sequenz entweder zu einer vermuteten Nucleotid-Variation, die mit einer genetischen Erkrankung bekanntermaßen in Verbindung steht, oder zu einem entsprechenden normalen Nucleotid komplementär ist, der Rest der besagten Sequenz im wesentlichen komplementär zu einer entsprechenden Zielbasensequenz in Nachbarschaft zu der vermuteten Nucleotid-Variation oder dem entsprechenden normalen Nucleotid ist, wobei diese Nucleotid-Sequenz derart beschaffen ist, daß, wenn die als Starter für diagnostische Zwecke verwendet wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren, ein Extensionsprodukt des Starters für diagnostische Zwecke synthetisiert wird, wenn das beschriebene endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Zielbasensequenz ist, jedoch kein Extensionsprodukt synthetisiert wird, wenn das beschriebene endständige Nucleotid des Starters für diagnostische Zwecke nicht komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid in der Zielbasensequenz ist.
Am besten befindet sich das endständige Nucleotid, das entweder zu einer vermuteten Nucleotid-Variation oder zu dem entsprechenden normalen Nucleotid komplementär ist, am 3'-Ende der Nucleotid-Sequenz. Vorzugsweise resultiert die vermutete Nucleotid-Variation aus einer Punktmutation der entsprechenden normalen Sequenz.
Diese Nucleotid-Sequenz kann z. B. aus 10 bis 50 Basenpaaren bestehen, z. B. aus 10 bis 36 bp.
Entsprechend vier weiteren Ausführungsformen dieser Erfindung stellen wir Nucleotid-Sequenzen zur Verfügung, wie sie gerade oben beschrieben worden sind, in denen ein endständiges Nucleotid der Nucleotidsequenz komplementär zu einer Nucleotid-Variation ist, die aus einer Veränderung des entsprechenden normalen Nucleotids in (i) A, (ii) G, (iii) C bzw. (iv) T oder U resultiert.
Nach einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung wird durch uns ein Satz von zwei Nucleotidsequenzen zur Verfügung gestellt, wie sie oben definiert worden sind, in denen ein endständiges Nucleotid einer Sequenz komplementär zu einer vermuteten Nucleotid-Variation, die in Zusammenhang mit einer bekannten genetischen Erkrankung steht, und einem endständigen Nucleotid der anderen Sequenz, das zu dem entsprechenden normalen Nucleotid komplementär ist, anwesend ist.
Entsprechend einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung werden Sonden zur Verfügung gestellt, die aus einer Nucleotid-Sequenz bestehen, wie sie hierin vorher definiert worden ist, die eine markierte Komponente oder eine Markierung aufweisen.
Als Beispiele werden die folgenden bekannten genetischen Erkrankungen im Detail aufgeführt, die die Mutationen darstellen, die für die Krankheit verantwortlich sind sowie für jede Mutation eine relevante Literaturstelle. Nucleotid-Sequenzen und Sonden, wie sie hierin bereits definiert worden sind, können z. B. auf den genetischen Krankheiten, die unten aufgeführt sind, basieren, wobei die Sequenz der relevanten Nucleotid-Sequenz oder Sonde aus der relevanten Literaturstelle, die in der Tabelle angegeben ist, abgeleitet werden kann.

Tabelle: Mutationen, die genetische Erkrankungen hervorrufen

A: Autosomale

Krankheit	Mutation	Literaturzitat
Antithrombin-III-Mangel	CG—TG	Duchange et al., Nucl. Acids Res. **14**, 2408 (1986)
Amyloide Polyneuropathie	CG—CA	S. Maeda et al., Mol. Biol. Med. 329–338 (1986)
	AC—GC	M. R. Wallace et al., J. Clin. Invest. **78**, 6–12 (1986)
	AG—GG	M. R. Wallace et al., J. Clin. Invest. **78**, 6–12 (1986)
Alpha-1-Antitrypsin-Mangel	TG—CG	T. Nukiwa et al., J. Biol. Chem. **261**, 15989–15994 (1986)
	CG—CA	V. J. Kidd et al., Nature **304**, 230–334 (1983)
	GAT–GTT	Asp 256–Val, Exon III; unveröffentlicht
	CTT–CTC	Deletion des Kodons 51 (normal), M. Malton, im Druck
	GGC–TGC	Arg^{39}-Cys, Exon II, I Variante, unveröffentlicht

Basenpaar	Mutation	Literaturzitat
Adenosin-deaminase-Mangel	CG—CA	D. T. Bonthron et al., J. Clin. Invest. **76**, 894–897 (1985)
	AA—AG	D. Valerio et al., EMBO J. **5**, 113–119 (1986)
	CT—CG	dto.
Apolipoprotein E-Mangel	GT—GC	Cladaras et al., J. Biol. Chem. **262**, 2310–2315 (1987)
Diabetes mellitus, leicht	TC—CC	M. Haneda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 6366–6370 (1983)
	TC—TG	S. Shoelson et al., Nature **302**, 540–543 (1983)
	TG—TT	dto.
Gaucher-Krankheit, Typ 2	CT—CC	S. Tsuji et al., N. Engl. J. Med. **316**, 570–575 (1987)
Hyperinsulinaemie, familiär	CG—CA	Y. Shibasaki et al., J. Clin. Invest. **76**, 378–380 (1985)
	CA—GA	S. J. Chan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 2194–2197 (1987)

Erkrankung	Mutation	Literaturzitat
Immunoglobulin kappa-Mangel	CT—CG	J. Stavnezer-Nordgren et. al., Science **230**, 458–461 (1985)
	CG—TG	dto.
LDL-Rezeptor-Mangel	GG—GA	M. A. Lehrmann et al., Cell **41**, 735–743 (1985)
Osteogenesis imperfecta, Typ II	TG—TT	D. H. Cohn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 6045–6047 (1986)

Krankheit	Mutation	Literaturzitat
Phenylketonurie	AG—AA	A. G. Dilella et al., Nature **322**, 799–803 (1986)
	CG—TG	A. G. Dilella et al., Nature **327**, 333–336 (1987)
Protein C-Mangel	CG—ATG	G. Romeo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 2829–2832 (1987)
	GG—GC	dto.
Purin-Nucleosid-Phosphorylase-Mangel	TG—TA	S. R. Williams et al., J. Biol. Chem. **262**, 2332–2339 (1987)
Sichelzell-Anämie	GAG–GTG	J. C. Chang und Y. W. Kan, Lancet **2**, 1127–1129 (1981); S. H. Orkin et al., New Eng. J. Med. **307**, 32–36 (1982) B. J. Connor et al., Proc. Natl. Sci. USA **80**, 278–282 (1983)
Tanger-Krankheit	AG—AT	S. W. Law, H. B. Brewer, J. Biol. Chem. **260**, 12810–12814 (1985)
β-Thalassaemie		

Mutanten-Klasse	Typ	Literaturzitat
a) Nichtfunktionelle mRNS-Nonsens-Mutanten		
(1) Codon 17 (A–T)	0	J. C. Chang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 2886 (1979)
(2) Codon 39 (C–T)	0	R. F. Trecartin et al., J. Clin. Invest **68**, 1012 (1981) und F. F. Chehab et al., Lancet **1**, 3 (1986)
(3) Codon 15 (C–A)	0	H. H. Kazazian et al., Eur. Molec. Biol. Org. J. **3**, 593 (1984)
(4) Codon 37 (G–A)	0	C. D. Boehm et al., Blood **67**, 1185 (1986)
(5) Codon 121 (G–T)	0	H. H. Kazazian et al., Am. J. Hum. Genet. **38**, A 860 (1986)
Rasterverschiebungs-Mutanten		
(6) –2 Codon 8	0	S. H. Orkin et al., J. Biol. Chem. **256**, 9782 (1981)
(7) –1 Codon 16	0	H. H. Kazazian et al., Eur. Molec. Biol. Org. J. **3**, 593 (1984)
(8) –1 Codon 44	0	A. J. Kinniburgh et al., Nucl. Acids Res. **10**, 5421 (1982)
(9) –1 Codons 8/9	0	H. H. Kazazian et al., Eur. Molec. Biol. Org. J. **3**, 593 (1984) und C. Wong et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 6529 (1986)
(10) –4 Codons 41/42	0	H. H. Kazazian et al., Eur. Molec. Biol. Org. J. **3**, 593 (1984) und A. Kimura et al., J. Biol. Chem. **258**, 2748 (1983)
(11) –1 Codon 6	0	H. H. Kazazian et al., Am. J. Hum. Genet. **35**, 1028 (1983)
(12) +1 Codons 71/72	0	T. C. Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 2821 (1984)
(b) RNA verarbeitende Mutanten		
Veränderungen der Verknüpfungen (splice junctions)		
(1) IVS 1 Position 1 GT—AT	0	S. H. Orkin et al., Nature **296**, 627 (1982) und R. Treisman et al., Nature **302**, 591 (1983)
(2) IVS 1 Position 1 GT—TT	0	H. H. Kazazian et al., Eur. Molec. Biol. Org. J. **3**, 593 (1984)
(3) IVS 2 Position 1 GT—AT	0	S. H. Orkin et al., Nature **296**, 627 (1982) und R. Treisman et al., Cell **29**, 903 (1982)

Mutanten-Klasse		Typ	Literaturzitat
(4) IVS 1	3'-Ende, 17 bp	0	H. F. Bunn et al., Haemoglobin – molecular, genetic and clinical aspects, S. 283 (Saunders, Philadelphia, 1986)

Mutanten-Klasse		Typ	Literaturzitat
(5) IVS 1	3'-Ende: −25 bp	0	H. H. Kazazian et al., Eur. Molec. Biol. Org. J. **3**, 593 (1984) und S. H. Orkin et al., J. Biol. Chem. **258**, 7249 (1983)
(6) IVS 2	3'-Ende: AG––CG	0	B. J. Padanilam et al., Am J. Hematol. **22**, 259 (1986)
(7) IVS 2	3'-Ende: AG––CG	0	S. E. Antonarakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1154 (1984) und G. F. Atweh et al., Nucl. Acids Res. **13**, 777 (1985)
Wechsel des Consensus			
(8) IVS 1	Position 5 (G–C)	+	H. H. Kazazian et al., Eur. Molec. Biol. Org. J. **3**, 593 (1984) und R. Treisman et al., Nature **302**, 591 (1983)
(9) IVS 1	Position (G–T)	0	C. Wong et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 6529 (1986) und G. F. Atweh, et al., Nucl. Acids Res. **13**, 777 (1985)
(10) IVS 1	Position 6 (T–C)	+	S. H. Orkin et al., Nature **296**, 627 (1982) und G. F. Atweh et al., Am J. Hum. Genet. **38**, 85 (1986)
Innere IVS-Wechsel			
(11) IVS 1	Position 110 (G–A)	+	D. Westaway et al., Nucl. Acids Res. **9**, 1777 (1981)
(12) IVS 2	Position 705	+	C. Dobkin et al., Proc. Natl. Acad. SCi. USA **80**, 1184 (1983)
(13) IVS 2	Position 745 (C–G)	+	S. H. Orkin et al., Nature **296**, 627 (1982) und R. Treisman et al., Nature **302**, 591 (1983)
(14) IVS 2	Position 654 (C–T)	0	T. C. Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 2821 (1984)
(15) IVS 1	Position 116 (T–G)	?	E. A. Feingold et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. **445**, 159 (1985)

Mutanten-Klasse	Typ	Literaturzitat
Substitution in kodierenden Bereichen		
(16) Kodon 26 (G–A)	β^+,β^e	S. L. Thein et al., J. Med. Genet. (im Druck 1986) und S. H. Orkin et al., Nature **300**, 768 (1982)
(17) Kodon 24 (T–A)	+	Goldsmith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 2318 (1983)
(18) Kodon 27 (G–T)	β^+,βKnossos	S. H. Orkin et al., Blood **64**, 311 (1984)
(c) Transkriptions-Mutanten		
(1) −88 C––T	+	C. Wong et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA **83**, 6529 (1986) und S. H. Orkin et al., J. Biol. Chem. **259**, 8679 (1984)
(2) −87 C––G	+	S. H. Orkin et al., Nature **296**, 627 (1982) und R. Treisman et al., Nature **302**, 591 (1983)
(3) −31 A––G	+	Y. Takihara et al., Blood **67**, 547 (1986)
(4) −29 A––G	+	S. E. Antonarakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1154 (1984) und C. Wong et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA **83**, 6529 (1986)
(5) −28 A––C	+	S. Surrey et al., J. Biol. Chem. **260**, 6507 (1985)
(6) −28 A––G	+	S. H. Orkin et al., Nucl. Acids Res. **11**, 4727 (1983)
(d) Polyadenylierungs-Mutante		
(1) AATAAA––AACAAA	+	S. H. Orkin et al., Eur. Molec. Biol. Org. J. **4**, 453 (1985)
(e) Deletionen		
(1) 3'β(−619 bp)	0	R. A. Spritz et al., Nucl. Acids. Res. **10**, 8025 (1982) und S. H. Orkin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 2400 (1979)
(2) 5'β (−1.35 kb)	0 HbF	B. J. Padanilam et al., Blood **64**, 941 (1984)
(3) β (−10 kb)	0 HbF	J. G. Gilman et al., Br. J. Haemat. **56**, 339 (1984)

+ = β-Thalassaemie-Mutante (β^-), die eine verminderte β-Globinketten-Produktion bewirkt; 0 = eine Mutante (B^0), die eine abwesende β-Globin-Produktion bewirkt.

Krankheit	Mutation	Literaturzitat
Triosephosphat-Isomerase-Mangel	AG–AC	I. O. Daar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 7903–7907 (1986)
Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Mangel	GG–GA	H. DeVerneuil et al., Science **234**, 732–734 (1986)

Verbindung B–X

Krankheit	Gen	Mutation	Literaturzitat
Haemophilie A	Faktor VIII	CG–TG (24)	J. Gitschier et al., Nature **315**, 427–430 (1985)
		CG–TG (26)	J. Gitschier et al., Nature **315**, 427–430 (1985)
		CG–TG (18)	S. E. Antonarakis et al., N. Engl. J. Med. **313**, 842–8 (1985)
		CG–CA (26)	J. Gietschier et al., Science **232**, 1415–1416 (1986)
		CG–TG (18)	H. Youssoufian et al., Nature **324**, 380–382 (1986)
		CG–TG (22)	H. Youssoufian et al., Nature **324**, 380–382 (1986)
		CG–TG (22)	H. Youssoufian et al., Nature **324**, 380–382 (1986)

Krankheit	Gen	Mutation	Literaturzitat
Haemophilie B	Faktor IX	CG–CA	A. K. Bentley et al., Cell **45**, 343–348 (1986)
		GT–TT	D. J. G. Rees et al., Nature **316**, 643–645 (1985)
		GA–GG	L. M. Davis et al., Blood **69**, 140–143 (1987)

Beispiele für Deletionen können gefunden werden bei:
S. M. Forrest, G. C. Cross, A. Speer, D. Gardner-Medwin, J. Burn und K. E. Davies (1987), Preferential Deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies, Nature **320**, 638–640.
M. Koenig, E. P. Hoffman, C. J. Bertelson, A. P. Monaco, C. Feener und L. M. Kunkel (1987), Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organisation of the DMD gene in normal and affected individuals, Cell **50**, 509–517. S. B. Malhorta, K. A. Hart, H. J. Klamut, N. S. T. Thomas, S. E. Bodrug, A. M. H. Burghes, M. Bobrow, P. S. Harper, M. W. Thompson, P. N. Ray und R. G. Worton (1988), Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy, Science **242**, 755–759.
A. P. Read, R. C. Mountfort, S. M. Forrest, S. J. Kenwrick, K. E. Davies und R. Harris (1988), Patterns of exon deletions in Duchenne and Becker muscular dystrophy, Hum. Genet. **80**, 152–156.
J. S. Chamberlain, R. A. Gibbs, J. E. Ranier, P. N. Nguyen und C. T. Caskey (1988), Deletion screening of the DMD locus via multiplex DNA amplification, Nucl. Acids Res. **16**, 23, 11141–11156.
R. G. Roberts, C. G. Cole, K. A. Hart, M. Bobrow und D. R. Bentley (1989), Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy, Nucl. Acids Res. **17**, 2, 811.
Oftmals stehen nur kleine Mengen genomischer DNS zur Analse zur Verfügung. Es wurde festgestellt, daß die Spezifizität der Starter für diagnostische Zwecke für relevante normale und abweichende Nucleotidsequenzen einfach durch die Erhöhung der Anzahl der Nucleotidsequenz(en) in der Hybridisationskammer beurteilt werden kann. Das kann z. B. dadurch erreicht werden, daß eine doppelsträngige „Kassette" konstruiert wird, die aus einer normalen Sequenz besteht, die an eine Sequenz-Variation angeschmolzen ist, wobei die Basenfehlpaarung zwischen zwei Nucleotiden auf benachbarten Strängen vorzugswseise nahe der Kassettenmitte angeordnet ist. Kopien von dieser Kassette können dann leicht durch ihre Insertion in einen Plasmid-Wirt und anschließender Replikation des Plasmids und Isolation der gewünschten Sequenzen erhalten werden, wobei in allen Fällen nach dem Stand der Technik bekannte Verfahren angewendet werden. Diese Technik wird in der Abbildung 10 erläutert.

Ausführungsbeispiele

Zum besseren Verständnis dieser Erfindung wird sie im hierin folgenden Teil in Form von Beispielen unter Bezugnahme auf die angefügten Zeichnungen näher beschrieben. In diesen Zeichnungen bedeuten:
Abbildungen (1 a) und (1 b) erläutern die erste Ausführungsform der Erfindung, Abbildung (1 c) zeigt ein typisches Ergebnis eines solchen Tests, wie es durch Elektrophorese gezeigt werden kann. Die Abbildungen (2 a) und (2 b) erläutern die zweite Ausführungsform dieser Erfindung.
Die Abbildung 3 erläutert die bevorzugte Methode zur Unterscheidung zwischen einer Vielzahl von Amplifizierungsprodukten.
Die Abbildungen (4 a) und (4 b) erläutern die Ausführungsform dieser Erfindung.
Die Abbildungen (5 a), (5 b) und (5 c) illustrieren die vierte Ausführungsform dieser Erfindung.
Die Abbildung 6 (nicht maßstabsgerecht) stellt das humane α1-Antitrypsin-Gen dar und die Abbildung 7 zeigt das Ergebnis der Sichtbarmachung der Banden im Gel, das in den Beispielen 1 und 2 erhalten wurde.
In der Abbildung 8 wird das Ergebnis der Sichtbarmachung von Banden in einem Gel dargestellt, worin die Bahnen 1 bis 4 die Ergebnisse von Beispiel 3, die Bahnen 5 bis 8 einen Teil der Ergebnisse von Beispiel 4 und die Bahn 9 einen Größenreferenzsatz darstellen.
In der Abbildung 9 wird das Gel, das in Beispiel 4 erhalten worden ist, nach der Sichtbarmachung der Banden gezeigt.
In der Abbildung 10 wird die Verwendung eines Kassettenplasmid-Systems zur Verstärkung eines gewünschten DNS-Doppelstranges illustriert.
In der Abbildung 11 wird die fünfte Ausführungsform dieser Erfindung (lineare Verstärkung) erläutert.
In der Abbildung 12 werden die Ergebnisse nach der Sichtbarmachung der Banden vom Gel in Beispiel 5 dargestellt.
In der Abbildung 13 werden die Ergebnisse der Sichtbarmachung von Banden des Gels, das in Beispiel 6 erhalten wurde, dargestellt.
In der Abbildung 1 wird die Methode nach der ersten Ausführungsform dieser Erfindung erläutert. In der Abbildung (1 a) werden denaturierte genomische DNS-Stränge, die ein normales Nucleotid (N) an dem Ort aufweisen, an dem z. B. im Ergebnis einer genetischen Erkrankung eine vermutete Nucleotid-Variation vorhanden sein kann, dargestellt. Wird der Nucleinsäurestrang unter Hybridisations-Bedingungen mit einer Sonde für diagnostische Zwecke in Kontakt gebracht, die am 3'-Ende ein terminales Nucleotid aufweist, das zu dem normalen Nucleotid komplementär ist (–N), wobei ein geeignetes Nucleosid-Triphosphat und ein Mittel für die Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate anwesend sind, so erhält man eine Ketten-Extension des Starters für diagnostische Zwecke in der 3'-Richtung, wie es in der Abbildung (1 b) gezeigt wird. Eine solche Kettenverlängerung tritt nicht ein, wenn ein Starter für diagnostische Zwecke verwendet wird, bei dem das Nucleotid am 3'-Ende komplementär zu einer vermuteten Nucleotid-Variation (–M) ist. Ein etwa entstandenes Extensionsprodukt am Starter für diagnostische Zwecke kann dann denaturiert werden und ein Starter für die Amplifikation (A) an das denaturierte Produkt, das so erhalten wurde, hybridisiert werden, so daß ein weiteres Kettenverlängerungsprodukt erhalten wird. Das Kettenverlängerungsprodukt kann dann denaturiert werden und dieser Vorgang wiederholt, so daß eine Amplifizierung erreicht wird. Der Abschnitt der genomischen DNS, der Gegenstand der Amplifizierung mit dem Starter für diagnostische Zwecke ist, wird in der Abbildung 1 (b) mit DG bezeichnet. Die Produkte für diagnostische Zwecke, die von diesem Abschnitt erhalten werden, sind die Ursache für die Banden, die in der Abbildung 1 (c) mit DG bezeichnet werden. Als Kontrolle können an einer abgetrennten Stelle des Nucleinsäurestranges oder an einem anderen Nucleinsäurestrang, z. B. an einem anderen Chromosom, das bearbeitet wird, z. B. von humaner DNS, Starter (P) für die PCR (Polymerage-Kettenreaktion), die in der Abbildung 1 (a) mit P bezeichnet werden, verwendet werden. Diese getrennte Bahn wird in der Abbildung 1 (c) mit PCR bezeichnet und die durch PCR erhaltenen Produkte auf der Kontrollbahn von dieser Bahn sind verantwortlich für die Banden, die in der Abbildung 1 (c) mit PCR bezeichnet sind. Es ist verständlich, daß die mit PCR

bezeichneten Banden entweder größere oder kleinere Produkte anzeigen als die Produkte, die durch die Bande repräsentiert werden, die mit DG bezeichnet ist.
In der Abbildung 1 (c) werden die nach der Methode, die in der Abbildung 1 (a) und 1 (b) dargestellt ist, erhaltenen Ergebnisse in Form von Banden gezeigt, die durch Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese in Hinblick von z. B. genetischer Erkrankung, die durch eine Punktmutation hervorgerufen wird, erhalten wurden, wobei die Analyse unter Verwendung entweder des -M- oder N-Starters für diagnostische Zwecke durchgeführt wurde, wie es angebracht war. Im Falle der untersuchte Proband ein Träger (C) der genetischen Erkrankung ist, werden sowohl Banden für die normalen Nucleotidsequenzen (N) als auch für die Nucleotidsequenz-Variation auftreten. Normale Homozygoten (N) werden eine Bande aufweisen, die bei der normalen Nucleotidsequenz auftritt, aber keine Bande [die in Form von () dargestellt ist], die bei der Nucleotid-Variation auftritt, und Homozygoten mit der Krankheit, die die Mutation bedingt [Probanden mit der genetischen Krankheit (D) werden keine Bande aufweisen (dargestellt als ()], werden an dem Ort der Bande bei der normalen Nucleotid-Sequenz keine Bande aufweisen, jedoch wird eine Bande dort auftreten, wo die für die Nucleotidsequenz-Variation auftritt.
In der Abbildung 2 wird die zweite Ausführungsform dieser Erfindung illustriert. Für jeden Strang einer doppelsträngigen DNS wird ein Starter für diagnostische Zwecke verwendet. In (a) werden diese Starter für diagnostische Zwecke derart konstruiert, daß das terminale Nucleotid am 3'-Ende komplementär zu dem normalen Nucleotid ist. Das Verfahren läuft dann ab, wie es für die Abbildung 1 beschrieben worden ist, jedoch mit zwei unterschiedlichen Startern für diagnostische Zwecke, die die Amplifizierung initiieren, wenn das relevante Nucleotid anwesend ist. So ist nach dieser Ausführungsform der zweite Starter für diagnostische Zwecke äquivalent zu dem Amplizierungs-Starter (A) in der Abbildung 1. Demnach wird nach der Abbildung 2 (a) die Amplifizierung durch die Starter (-N und N-) initiiert, jedoch nicht durch die Starter für diagnostische Zwecke mit terminalen Nucleotiden am 3'-Ende, die komplementär zu der Nucleotidsequenz-Variation sind (-M und M-). Das umgekehrte ist gültig in der Abbildung 2 (b), da die Sequenz-Variation in den Nucleinsäuresträngen der Probe vorliegt. Die Ergebnisse nach der Durchführung des Verfahrens, das in der Abbildung 2 dargestellt ist, können auf eine Art und Weise wie in der Abbildung 1 (c) dargestellt werden, jedoch wird der Bezug darin auf normale Nucleotide und Nucleotid-Variation (N und M) sich auf Paare dieser Sequenzen erstrecken. In der Abbildung 2 bezeichnet der Buchstabe P die PCR-Starter, die als Kontrolle verwendet worden sind.
In der Abbildung 3 wird ein Weg gezeigt, auf dem eine Vielzahl von Amplifizierungsprodukten voneinander unterschieden werden kann, wodurch eine einzige Probe von RNS oder DNS auf eine Reihe von genetischen Krankheiten hin untersucht werden kann. Zwei Stränge (denaturiert) der DNS oder RNS einer Probe werden dargestellt, als ob sie drei getrennte Orte enthalten, die mit 1, 2 und 3 bezeichnet sind. Ein weiterer Abschnitt, der von diesen Abschnitten entfernt ist, wird zur Verstärkung durch die PCR verwendet und dient als Kontrolle. In bezug auf den Locus (1) wird ein diagnostischer Starter mit 20 Nucleotiden (20-mer) (5'-N 3') zusammen mit einem weiteren 20-mer-Oligonucleotid als Starter für diagnostische Zwecke verwendet (3' N-5'). Wenn am Locus (1) eine Verstärkung stattfindet, wird ein 39-mer-Oligonucleotid als Verstärkungsprodukt erhalten. Da in der Abbildung das Nucleotid am 3'-Ende ein normales ist ebenso wie das relevante Nucleotid in der zu untersuchenden Probe, wird eine Verstärkung stattfinden. Ebenso wird eine Verstärkung stattfinden, wenn das relevante Nucleotid in der zu untersuchenden Probe eine Nucleotid-Variation ist und die verwendeten Starter für diagnostische Zwecke ebenfalls am 3'-Ende eine Nucleotid-Variation besitzen.
Es wird jedoch dann keine Verstärkung stattfinden, wenn eine Basenfehlpaarung zwischen dem relevanten Nucleotid in der Probe und dem Nucleotid am 3'-Ende des Starters für diagnostische Zwecke auftritt. Am Locus (2) sind die Starter für diagnostische Zwecke derart konstruiert, daß sie als Verstärkungsprodukt ein 49-mer-Oligonucleotid ergeben, wenn eine Verstärkung stattfindet, und am Locus (3) sind die Starter für diagnostische Zwecke so konstruiert, daß sie ein 59-mer-Oligonucleotid als Verstärkungsprodukt liefern, wenn eine Verstärkung stattfindet. Aus dem oben Gesagten kann ersehen werden, daß es möglich ist, weil die Bandengröße des Verstärkungsproduktes die Summe der Größe der beiden Starter für diagnostische Zwecke minus eins ist, eine Vielzahl von Versuchen an einer einzigen Probe in einem einzigen Reaktionsgefäß durch geeignete Konstruktion der einzelnen Starter für diagnostische Zwecke durchzuführen, um jeden interessierenden Ort zu charakterisieren. Da die Größe der Summe der Größen der Starter für diagnostische Zwecke steigt, so kann man z. B. die Verstärkungsprodukte durch Elektrophorese an Agarosegelen auftrennen. Eine verbesserte Auflösung kann dann möglich werden, wenn die Starter für diagnostische Zwecke auf geeignete Art und Weise markiert oder gekennzeichnet sind und dann z. B. durch Elektrophorese an einem Acrylamidgel aufgetrennt werden. In der Abbildung 3 bezeichnet der Buchstabe P die Starter für die PCR, die als Kontrolle verwendet wurden.
In der Abbildung 4 wird die dritte Ausführungsform dieser Erfindung illustriert, in der eine konventionelle Verstärkung einer Nucleinsäuresequenz mit einem normalen Nucleotid an dem Ort, an dem eine vermutete Nucleotid-Variation vorhanden sein kann, durchgeführt wird, wo z. B. konventionelle Starter für die PCR verwendet werden. Es würde ebenso eine konventionelle Verstärkung stattfinden, wenn an Stelle des normalen Nucleotids eine vermutete Nucleotid-Variation vorhanden wäre. Das Verstärkungsprodukt wird mit einem Starter für diagnostische Zwecke in Kontakt gebracht, wie es hierin weiter oben beschrieben worden ist hinsichtlich der dritten Ausführungsform dieser Erfindung. Wenn das Verstärkungsprodukt eine Nucleinsäuresequenz mit einem normalen Nucleotid darstellt, wie es oben beschrieben worden ist, und der verwendete Starter für diagnostische Zwecke ein normales Nucleotid am 3'-Ende aufweist, wird ein Extensionsprodukt am Starter für diagnostische Zwecke gebildet werden [wobei die Nucleotidsequenz, die durch konventionelle PCR-Verstärkung erzeugt wird, als Templat verwendet wird (die hierin als das PCR-Kontrollprodukt bezeichnet wird)], vorausgesetzt ein geeignetes oder geeignete Nucleosid-Triphosphate und ein Mittel zur Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate sind anwesend. Ein Starter für die Verstärkung ist nicht nötig, da das Templat zur Erzeugung eines Extensionsproduktes am Starter für diagnostische Zwecke bereits verstärkt worden ist. Die Anwesenheit oder Abwesenheit des Starters für diagnostische Zwecke mit seinem Extensionsprodukt, was als DG in der Abbildung 4 (b) bezeichnet wird, sowie die Anwesenheit des PCR-Kontrollproduktes (in der Abbildung 4 (b) als PCR bezeichnet) können z. B. durch elektrophoretische Verfahren nachgewiesen werden.
Aus dem oben gesagten wird deutlich, daß ein Extensionsprodukt an einem Starter für diagnostische Zwecke auch dann gebildet wird, wenn das PCR-Kontrollprodukt eine Nucleotid-Variation enthält und der verwendete Starter für diagnostische Zwecke eine komplementäre Nucleotid-Variation am 3'-Ende aufweist.

Die für die Produkte erhaltenen Banden können z. B. wie in der Abbildung 4 (b) sichtbar gemacht werden. Die Symbole N-, M-, C-, N, D, DG und PCR sind wie in bezug auf die Abbildung 1 (c) definiert. Die Bande für das Extensionsprodukt des Starters für diagnostische Zwecke weist jedoch ein niedrigeres Molekulargewicht als die Bande für das PCR-Kontrollprodukt (wie in der Abbildung 4b dargestellt) auf. In diesem Falle stellt die Bande für das Kontrollprodukt eine echte innere Kontrolle dar, da einer der Starter für die PCR als Starter für die Amplifikation zur Verstärkung des Extensionsproduktes für den Starter für diagnostische Zwecke dient. Wenn das PCR-Kontrollprodukt eine Nucleotid-Variation enthält und der Starter für diagnostische Zwecke ein normales Nucleotid am 3'-Ende aufweist oder umgekehrt, wird kein Extensionsprodukt gebildet.
Gegebenenfalls kann die dritte Ausführungsform dieser Erfindung so durchgeführt werden, daß die zu untersuchende Probe zu Beginn der Untersuchung nicht nur mit Startern für die PCR, sondern auch mit dem Starter für diagnostische Zwecke in Kontakt gebracht wird. Somit ist es nicht notwendig, die Verwendung des Starters für diagnostische Zwecke so lange hinauszuschieben, bis der gewünschte Verstärkungsgrad des PCR-Kontrollproduktes erreicht worden ist. Tatsächlich kann der Starter für diagnostische Zwecke zusammen mit oder eine beliebige Zeit nach der Anwendung der Starter für die PCR verwendet werden. Dieses Experiment kann deshalb z. B. durch einfache Zugabe der zu untersuchenden Probe zu einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden, wobei dieses Reaktionsgefäß den Starter für die PCR, den Starter für diagnostische Zwecke, geeignete Nucleosid-Triphosphate und ein Mittel für die Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate enthält. Die dadurch erhaltenen Produkte sowie deren sichtbar gemachte Banden werden kann die gleichen sein, wie sie oben beschrieben worden sind und in der Abbildung 4 dargestellt werden.
In der Abbildung 5 wird die vierte Ausführungsform dieser Erfindung beschrieben. Es wird die konventionelle Verstärkung durchgeführt, wie sie bezüglich der Abbildung 4 dargestellt wurde. Das dadurch erhaltene Amplifizierungsprodukt wird dann unter Hybridisationsbedingungen entweder (a) mit zwei unterschiedlichen Startern für diagnostische Zwecke, wie sie hierin bereits definiert wurden, die am 3'-Ende jeweils ein normales Nucleotid aufweisen, oder (b) mit zwei Startern für diagnostische Zwecke, wie sie hierin bereits definiert worden sind, die jeweils am 3'-Ende eine Nucleotid-Variation aufweisen, in Kontakt gebracht (siehe Abbildung 5a). Die Bildung der Extensionsprodukte nach einem einzigen Zyklus wird dann zeigen, ob die Nucleinsäureprobe das normale oder die vermutete Nucleotid-Variation enthält, durch Elektrophorese-Verfahren erhält man ein Bandenmuster, das gleich dem in der Abbildung 5b ist. Jedoch ist deutlich, daß bei der Verwendung von zwei Startern für diagnostische Zwecke ein solcher Starter als Starter für die Amplifizierung des anderen Starters für diagnostische Zwecke dient. Gegebenenfalls können deshalb alle erhaltenen Extensionsprodukt(e) selbst der Verstärkung unterworfen werden. Nach einer Reihe von weiteren Zyklen werden so Produkte mit niedrigerer Molmasse erhalten werden wie jene, die in der Abbildung 5c durch zusätzliche Banden gezeigt werden, wobei die Verhältnisse von den relativen Verhältnissen der ursprünglich anwesenden Starter-Oligonucleotide für die PCR und den zugegebenen Startern für diagnostische Zwecke abhängen. Die Verstärkungsprodukte der PCR können von den Verstärkungsprodukten der Starter für diagnostische Zwecke leicht z. B. durch Erhöhung oder Verringerung der Abstände zwischen den Bindungsstellen der PCR-Starter auf dem Genom unterschieden werden.
Wenn es gewünscht wird, kann die vierte Ausführungsform dieser Erfindung so durchgeführt werden, daß die zu untersuchende Probe zu Beginn der Untersuchung nicht nur mit den Startern für die PCR, sondern auch mit den Startern für diagnostische Zwecke in Kontakt gebracht wird. Es ist somit nicht notwendig, die Anwendung der Starter für diagnostische Zwecke so lange hinauszuschieben, bis ein gewünschter Verstärkungsgrad des PCR-Kontrollproduktes erreicht ist. Tatsächlich können die Starter für diagnostische Zwecke zusammen mit oder zu einer beliebigen Zeit nach der Verwendung der Starter für die PCR angewendet werden. Diese Untersuchung kann deshalb z. B. durch einfache Zugabe der zu untersuchenden Probe zu einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden, wobei dieses Reaktionsgefäß die Starter für die PCR, die Starter für diagnostische Zwecke, geeignete Nucleosid-Triphosphate und ein Mittel für die Polymerisation der Nucleosid-Triphosphate enthält. Wenn dieser Versuch auf diese Art und Weise durchgeführt wird, werden die oben genannten niedermolekularen Produkte vom Starter für diagnostische Zwecke gebildet, so daß die zusätzlichen Banden erhalten werden, wie sie in der Abbildung 5 dargestellt werden.
In der Abbildung 6 (nicht maßstabsgerecht) ist das humane α1-Antitrypsingen dargestellt, das nach dem Stand der Technik bekannt ist (G. L. Long et al., Biochemistry, Band 23 (1984), S. 4828–4837). Es wird unter anderem die relative Stellung der Exons III und V zueinander gezeigt, die jeweils die potentiellen S- und Z-Mutationen des α1-Antitrypsin-Proteins tragen. Insbesondere wird in dieser Abbildung das Exon III des α1-Antitrypsin-Gens dargestellt und die Stellung der S-Variante gezeigt, in der das Codon GAA zu GTA mutiert ist, was zu der Produktion eines Valinrestes bei der Aminosäure 264 an Stelle eines Glutaminsäurerestes führt.
Ein Starter I mit der Squenz

5' CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG 3' (I)

der an die Positionen 7440–7469 des α1-Antitrypsin-Gens hybridisiert, und entweder ein Starter II mit der Sequenz

5' GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG 3' (II)

oder ein Starter IIa (mit einer CT-Basenfehlpaarung am 3'-Ende bezogen auf II) mit der Sequenz

5' GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTT 3' (IIa)

die jeweils für die Positionen 7770–7799 des α1-Antitrypsin-Gens konstruiert sind, kann sehr gut verwendet werden. Die Abbildung stellt weiterhin das Exon V des α1-Antitrypsin-Gens dar und zeigt die Position der Z-Variante, in der das Codon GAG zu AAG mutiert ist, was in der Produktion eines Lysinrestes an der Stelle der Aminosäure in Position 342 an Stelle eines Glutaminsäurerestes resultiert. Es können ein Starter III mit der Sequenz

5' TGTCCACGTGAGCCTTGCTCGAGGCCTGGG 3' (III)

der an die Positionen 9890–9919 des α1-Antitrypsin-Gens hybridisiert wird, und ein Starter IV mit der Sequenz

5′ GAGACTTGGTATTTTGTTCAATCATTAAG 3′ (IV)

der an die Positionen 10081–10109 des α1-Antitrypsin-Gens hybridisiert, gut verwendet werden. Die oben verwendete Basenzählung stimmt mit der in Biochem. **23**, 4828–4837 (1984), überein.
In der Abbildung 7 wird das Ergebnis der Sichtbarmachung von Banden im Gel, das in den Beispielen 1 und 2 erhalten wurde, gezeigt. Die Bahn 1 stellt ein Plasmid mit dem Exon V dar, das mit Alu I gespalten wurde; die Bahn 2 zeigt einen Markersatz für die Größe aus der Bacteriophage ØX174-DNS, die mit Hae III gespalten wurde; die Bahn III zeigt die Verstärkung des Exon III mit den Startern I und II, wie sie hierin oben definiert wurden, und die Verstärkung des Exons V mit den Startern III und IV, wie sie hierin oben definiert worden sind, wobei das gleiche Reaktionsgemisch verwendet wird und Produkte mit einer Länge von 360 bp bzw. 220 bp erhalten werden. Die Bahn 4 zeigt, daß bei Verwendung der Starter I und II a, wie sie hierin definiert worden sind, keine Verstärkung des Exons III stattgefunden hat, daß jedoch eine Verstärkung des Exons V mit den Startern III und IV, wie sie hierin definiert worden sind, bewirkt wurde. Die Bahn 5 zeigt eine Negativkontrolle, in der die Starter I, II, III und IV unter den Bedingungen anwesend sind, die zur Verstärkung geeignet sind, wo jedoch keine genomische DNS mit verwendet wurde.
In der Abbildung 8 werden in den Bahnen 1 bis 3 die Ergebnisse von Beispiel 3, in den Bahnen 5 bis 8 die Ergebnisse unter Verwendung normaler und mutanter Starter für diagnostische Zwecke dargestellt. Es wurde keine Destabilisierung nach Beispiel 4 durchgeführt. Und in der Bahn 9 werden die Marker für die Größe aus der Bacteriophage ØX174 gezeigt. Die Bahn 1 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotidsequenz

5′ TGGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTT (V)

als Starter für diagnostische Zwecke und das Oligonucleotid, das mit I bezeichnet wurde und hierin bereits definiert ist, als Starter für die Verstärkung. Die verwendete humane, genomische DNS war von einem normalen Homozygoten mit dem normalen Nucleotid (A), das an dem potentiellen S-Mutationspunkt des humanen α1-Antitrypsin-Gens anwesend ist. Das erwartete Verstärkungsprodukt mit 267 bp ist deutlich zu sehen. Die Bahn 2 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotidsequenz

5′ TGGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTA (VI)

als Starter für diagnostische Zwecke und das Oligonucleotid, das mit I bezeichnet wird und hierin definiert wurde, als Starter für die Amplifizierung. Die verwendete humane genomische DNS war von einem normalen Homozygoten mit dem normalen Nucleotid (A) an dem potentiellen S-Mutationspunkt des humanen α1-Antitrypsin-Gens. In Gegenwart einer A–A Basenfehlpaarung wird kein Amplifikationsprodukt mit 267 bp gebildet. In der Bahn 3 wird eine Kontrollbande gezeigt, die auf dem humanen Apolipoprotein B-Gen basiert. Die benutzten Sequenzen sind

AATGAATTTATCAGCCAAAACTTTTACAGG (XIII)

und

CTCTGGGAGCACAGTACGAAAAACCACTT (XIV)

Die Bahn 4 war eine Leerbahn.
Die Bahn 5 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz

5′ CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACG 3′ (VII)

als Starter für diagnostische Zwecke im Beispiel 4. Der Starter für diagnostische Zwecke trägt als entständiges Nucleotid am 3′-Ende (G), das in der Lage ist, mit dem normalen Nucleotid (C) am potentiellen Mutationspunkt Z eine Basenpaarung einzugehen, und ist ansonsten vollständig komplementär zu der DNS der Probe. Die DNS der Probe stammte von einem normalen Homozygoten mit einem normalen Nucleotid (C) an dem potentiellen Mutationspunkt Z des humanen α1-Antitrypsingens. Die Bahn 6 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz

5′ CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACA 3′ (VIII)

als Starter für diagnostische Zwecke im Beispiel 4. Der Starter für diagnostische Zwecke trägt am 3′-Ende das Nucleotid (A), das in der Lage ist, mit dem Nucleotid der Mutation (T) am Mutationspunkt Z eine Basenpaarung einzugehen, ist ansonsten aber vollständig komplementär zu der DNS der Probe. Die als Probe verwendete DNS war von einem normalen Homozygoten mit einem normalen Nucleotid (C) an dem potentiellen Mutationspunkt Z des humanen α1-Antitrypsin-Gens. Die Bahn 7 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz der Formel (VII) als Starter für diagnostische Zwecke im Beispiel 4. Die verwendete DNS-Probe stammte von einem Homozygoten, der die humane α1-Antitrypsin genetische Erkrankung aufwies und eine Nucleotid-Mutation (T) am Mutationspunkt Z aufwies. Die Bahn 8 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz der Formel (VIII) als Starter für diagnostische Zwecke im Beispiel 4. Die als Probe verwendete DNS stammte von einem Homozygoten mit der genetischen Krankheit des humanen α1-Antitrypsins und mit der Nucleotid-Mutation (T) am Mutationspunkt Z. Die Nucleotid-Sequenz des in jedem dieser Versuche verwendeten Starters für die Amplifizierung, die in den Bahnen 5 bis 8 gezeigt werden, war die der Formel (IV), wie sie hierin definiert worden ist. Aus dieser Abbildung kann entnommen werden, daß die Synthese des Amplifizierungsproduktes mit 150 bp durch die Anwesenheit einer A–C-Basenfehlpaarung nicht vollständig unterdrückt wird und sogar noch weniger durch eine G–T-Basenfehlpaarung unterdrückt wird (Bahn 7).
In der Abbildung 9 wird das Ergebnis der Sichtbarmachung der Banden eines Gels vom Beispiel 4 dargestellt. Die Bahnen 1 und 14 zeigen die DNS der Bacteriophage X174, die mit Hae III gespalten wurde, als Marker; die Bahn 2 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz

5′ CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATAGACG 3′ (IX)

als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer Probe einer DNS mit einem normalen Nucleotid (C) an dem potentiellen Mutationspunkt Z des humanen α1-Antitrypsin-Gens (DNS-Probe von einem normalen Homozygoten). Der Starter für diagnostische Zwecke trägt eine absichtliche Veränderung (in der Sequenz IX unterstrichen – A an Stelle von C) in bezug auf das fünfte Nucleotid vom 3'-Ende aus, jedoch ein Nucleotid am 3'-Ende (G), das in der Lage ist, mit einem normalen Nucleotid (C), das am potentiellen Mutationspunkt anwesend ist, eine Basenpaarung einzugehen. Die Bahn 3 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATAGACA 3' (X)

als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe mit einem normalen Nucleotid (C) am potentiellen Mutationspunkt Z (DNS-Probe von einem normalen Homozygoten). Der Starter für diagnostische Zwecke weist eine vorsätzliche Veränderung (in der Sequenz X unterstrichen – A an Stelle von C) in bezug auf das fünfte Nucleotid vom 3'-Ende an auf und ein 3'-terminales Nucleotid (A), das in der Lage ist, mit einem Nucleotid einer Mutante (T) eine Basenpaarung einzugehen, wenn diese am potentiellen Mutationspunkt Z anwesend ist. Die Bahn 4 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz IX (wie sie hierin bereits definiert worden ist) als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe von einem Heterozygoten für die Mutation am Punkt Z und somit eines Trägers der genetischen Erkrankung des humanen α1-Antitrypsin-Mangels. Die Bahn 5 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz X (wie sie hierin bereits definiert worden ist) als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe von einem Heterozygoten mit der Mutation am Punkt Z und somit eines Trägers der genetischen Erkrankung des humanen α1-Antitrypsin-Mangels. Die Bahn 6 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz IX (wie sie hierin bereits definiert worden ist) als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe von einem Homozygoten, der an der genetischen Erkrankung des humanen α1-Antitrypsin-Mangels erkrankt ist. Die Bahn 7 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz X (wie sie hierin bereits definiert worden ist) als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe von einem Homozygoten, der an der genetischen Krankheit des humanen α1-Antitrypsin-Mangels erkrankt ist.
Die Bahn 8 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGCCG 3' (XI)

als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe mit dem normalen Nucleotid (C) am potentiellen Mutationspunkt Z des humanen α1-Antitrypsin-Gens (DNS-Probe von einem normalen Homozygoten). Der Starter für diagnostische Zwecke trägt eine vorgegebene Veränderung (in der Sequenz XI unterstrichen – C an Stelle von A) in bezug auf das dritte Nucleotid vom 3'-Ende an gesehen, jedoch ein Nucleotid am 3'-Ende (G), das in der Lage ist, mit einem normalen Nucleotid (C) am potentiellen Mutationspunkt Z eine Basenpaarung einzugehen. Die Bahn 9 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz

5' CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGCCA 3' (XII)

als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe mit dem normalen Nucleotid (C) an dem potentiellen Mutationspunkt Z (DNS-Probe von einem normalen Homozygoten). Der Starter für diagnostische Zwecke weist eine vorgegebene Veränderung (in der Sequenz XII unterstrichen, C an Stelle von A) in Bezug auf das dritte Nucleotid vom 3'-Ende an gesehen und ein Nucleotid am 3'-Ende (A) auf, das in der Lage ist, mit einer Nucleotid-Mutation (T), wenn diese an dem potentiellen Mutationspunkt anwesend ist, eine Basenpaarung einzugehen. Die Bahn 10 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz XI (wie sie hierin definiert worden ist) als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe von einem Heterozygoten für die Mutation am Punkt Z und somit eines Trägers der genetischen Erkrankung des humanen α1-Antitrypsin-Mangels. Die Bahn 11 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz XII, wie sie hierin bereits definiert worden ist, als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe von einem Heterozygoten für die Mutation am Punkt Z und somit eines Trägers der genetischen Erkrankung des humanen α1-Antitrypsin-Mangels. Die Bahn 12 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz XI (wie sie hierin bereits definiert worden ist) als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe von einem Homozygoten, der an der genetischen Krankheit des humanen α1-Antitrypsin-Mangels erkrankt ist. Die Bahn 13 zeigt das Ergebnis bei Verwendung der Nucleotid-Sequenz XII (wie sie hierin bereits definiert worden ist) als Starter für diagnostische Zwecke in Gegenwart einer DNS-Probe von einem Homozygoten, der an der genetischen Krankheit des humanen α1-Antitrypsin-Mangels erkrankt ist.
Bei jeder der Bahnen 2 bis 13 wurde die Nucleotid-Sequenz der Formel (IV) als Starter für die Amplifikation und die Nucleotid-Sequenzen der Formel (XIII)

AATGAATTTATCAGCCAAAACTTTTACAGG (XIII)

und der Formel (XIV)

CTCTGGGAGCACAGTACGAAAAACCACTT (XIV)

wurden als Kontrollen verwendet. Die den Kontrollen entsprechenden Banden werden in der Abbildung 9 mit (C) gekennzeichnet und entsprechen einem Amplifizierungsrodukt von 510 bp vom Exon 26 des humanen Apolipoprotein-B-gens aus.
Die Abbildung 10 illustriert die Verwendung eines Kassetten-Plasmid-Systems. Das Plasmid pAT 153 mit Bereichen, die die Resistenz gegenüber den Antibiotika Ampicillin (Ap') und Tetracyclin (TC') übertragen, sowie mit den Restrictionsorten EcoRI, BamHI und SalI wird mit EcoRI und BamHI gespalten. Die synthetisch hergestellte Kassette, die ein DNS-Duplex mit einem Nucleotid mit Basenfehlpaarung (im Zentrum) wegen der Anwesenheit sowohl eines normalen Nucleotids als auch einer Nucleotid-Variation enthält, wird unter Verwendung von T4-DNS-Ligase in das Wirts-Plasmid ligiert, wie es dargestellt ist. Das Plasmid wird dann repliziert und selektiert, wie es dargestellt ist.

Das System wird wie folgt genauer illustriert: Es wurden synthetisch DNS-Kassetten hergestellt, die jeweils zwei gekoppelte 65mere mit EcoRI- und BamHI-Restriktionsenden und ein Mittelbasenpaar, das wegen einer Nucleotid-Variation eine Basenfehlpaarung aufweist, enthielten. Diese Kassetten wurden in die Wirts-Plasmide pAT153 eingeführt, wie es oben beschrieben worden ist und nach der Transformation wurden die gegen Tetracyclin empfindlichen Klone isoliert und das Plasmid extrahiert. Die Plasmid-Extrakte wurden dann in einer zweiten Transformation verwendet, wodurch Klone mit entweder normalen Inserts oder Isert-Variationen erhalten wurden. Um zu bestätigen, daß die Klone jeweils die vollständige normale Sequenz oder die Mutanten-Sequenz enthielten, wurden jeweils ungefähr 2 µg nach der Denaturierung mit NaOH sequenziert, wobei T4-DNS-Polymerase (Sequenase, US Biochemicals) und ein mit ^{32}P endmarkierter Starter verwendet wurden. Sobald schließlich eine normale und eine Variante von jedem Typ gefunden wurden, wurde ein repräsentativer Klon von jedem in Menge angezüchtet, das Plasmid extrahiert und unter Verwendung eines CsCl-Gradienten gereinigt.
Die Kassetten wurden dann mit SalI abgebaut, mit Phenol/Chloroform extrahiert, gefällt und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Danach waren die Kassetten fertig zur Verwendung, z. B. bei den Polymerase-Kettenreaktionen zur Bestimmung der Empfindlichkeit und Spezifizität der verschiedenen Oligonucleotide.
Die Abbildung 11 illustriert die fünfte Ausführungsform dieser Erfindung (lineare Verstärkung). Unter a) wird eine normale, genomische DNS zusammen mit zwei Startern für diagnostische Zwecke, von denen einer an seinem 3'-Ende komplementär zu der normalen genomischen DNS-Sequenz ist und der zweite Starter ein Nucleotid an seinem 3'-Ende aufweist, das komplementär zu der vermuteten Nucleotid-Variation ist, gezeigt. In b) wird eine genomische DNS-Sequenz-Variation zusammen mit den gleichen Startern für diagnostische Zwecke gezeigt. Wenn eine dieser genomischen DNS-Sequenzen mit den Startern unter Bedingungen in Kontakt gebracht wird, die eine Hybridisation der Komplementäre erlauben, wird in beiden Fällen eine Hybridisation eintreten. Die Zugabe aller vier Nucleosid-Triphosphate unter den Bedingungen, die ein Wachstum am Starter gestatten, wird jedoch nur zu einem Wachstumsprodukt im Falle von a) beim Starter für die normale Sequenz und b) beim Starter für die Sequenz-Variation führen, das Wachstum am anderen Starter wird durch die Basenfehlpaarung verhindert. Wenn jedoch, wie im Falle von c) gezeigt wird, nur drei oder weniger geeignete Nucleosid-Triphosphate an Stelle aller vier zugegeben werden, wird das Wachstum am entsprechenden Starter an einem gegebenen Punkt durch den Mangel am entsprechenden Nucleosid-Triphosphat verhindert.
In der Abbildung 12 werden die Ergebnisse der Sichtbarmachung der Banden im Gel von Beispiel 5 gezeigt.
Die Bahnen 1 und 2 entsprechen DNS von einem normalen Homozygoten (MM), die Bahnen 3 und 4 DNS von einem Heterozygoten (MS) und die Bahnen 5 und 6 DNS von einer Homozygoten-Variation (SS). Bei den Bahnen 1, 3 und 5 wurde das Oligonucleotid XXII (normal) verwendet, und bei den Bahnen 2, 4 und 6 wurde das Oligonucleotid XXI (Variation) verwendet. Wie vorausgesagt wurde, trat bei den Bahnen 2 oder 3 keine Extension des Oligonucleotids ein. Die nachgewiesenen Produktbanden werden durch Winkel angezeigt. In der Abbildung 13 werden die Ergebnisse der Sichtbarmachung der Banden des Gels, das in Beispiel 6 erhalten wurde, gezeigt. Die Bahn auf der ganz linken Seite zeigt die Marker für die Größe, um die Größe der Produkte, die erhalten worden sind, zu bestätigen. Die Bahnen 1 und 2 entsprechen DNS von einem normalen Homozygoten (MM), die Bahnen 3 und 4 entsprechen der DNS von einem Heterozygoten (MZ) und die Bahnen 5 und 6 der DNS von einer Homozygoten-Variation (ZZ). Bei den Bahnen 1, 3 und 5 wurden die Starter XIX und XI verwendet, bei den Bahnen 2, 4 und 6 wurden die Starter XII und XX verwendet. Wie erwartet, trat bei den Bahnen 2 und 5 keine Extension der Starter ein. Die nachgewiesenen Produktbanden werden durch Winkel angezeigt.

Sequenz des α1-Antitrypsin-S-Locus (Exon III)
Die Basen, die im unteren Fall dargestellt sind, zeigen die normale Sequenz von jedem Locus. Unterstrichene Basen in den Startern zeigen die vorsätzliche Basenfehlpaarung, die eingefügt worden ist, um die Starter zu destabilisieren. Die Koordinaten werden nach Log et al., Biochemistry **23**, 4828–4837 (1984) zugeordnet.

```
          5'GCCTGATGAGGGAAACTACAGCACCTGGT                    XXI
          5' GCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGA                  XXII
5'        CTTCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACACCACCTGCa
3'        GAAGGACGGACTACTCCCCTTTGATGTCGTGGACCt
          7642                  7718
aAAATGAACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAA    3'
tTTTACTTGAGTGGGTGCTATAGTAGTGGTTCAAGGACCTTT    5'
TTTTACTTGAGTGGGTGCTATAGTAGTGGT      5'                XXIII
ATTTACTTGAGTGGGTGCTATAGTAGTGGT      5'                XXIV
CACACCTCTTAGCCATGTTGGGACTGAGGCCCATCAGGACTGGC  3'
GTGTGGAGAATCGGTACAACCCTGACTCCGGGTAGTCCTGACCG  5'
                                    7811
GTGGAGAATCGGTACAACCCTGACTCCGGG 5'
TTGGAGAATCGGTACAACCCTGACTCCGGG 5'
```

Sequenz des α1-Antitrypsin-Z-Locus (Exon 5)
Die Basen, die im unteren Rahmen dargestellt sind, stellen die normale Sequenz für jeden Locus dar. In den Startern unterstrichene Basen zeigen die vorgegebene Basenfehlpaarung, die zur Destabilisierung der Starter eingefügt worden ist.

5′	CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCCTCGACA	XVI
5′	CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCCTCGACG	XV
5′	CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATAGACA	X
5′	CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATAGACG	IX
5′	CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGCCA	XII
5′	CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGCCG	XI
5′	CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACA	VIII
5′	CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACG	VII
5′	TCCAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACg	
3′	AGGTCCGGCACGTATTCCGACACGACTGGTAGCTGc	

9954 10030

gAGAAAGGGACTGGAAGCTGCTGGGCCATGTTTTTAGAGGCC	3′	
cTCTTTCCCTGACTTCGACGACCCCGGTACAAAAATCTCCGG	5′	
CTCTTTCCCTGACTTCGACGACCCCGGTAC	5′	XVII
TTCTTTCCCTGACTTCGACGACCCCGGTAC	5′	XVIII
CTCATTCCCTGACTTCGACGACCCCGGTAC	5′	XIX
TTCATTCCCTGACTTCGACGACCCCGGTAC	5′	XX

Die Erfindung wird nun durch die folgenden Beispiele erläutert, jedoch nicht eingegrenzt. In den Beispielen sind die verwendeten Stoffe in den folgenden Mengen oder Konzentrationen anwesend, wenn nichts anderes angegeben ist:
DNS Substrat: 1 µg humane, genomische DNS
Oligonucleotide: 100 pMol von jedem geeigneten Ologonucleotid.
Desoxynucleosid-Triphosphate: Jedes mit einer Finalkonzentration von 1,5 mM
Puffer (Endkonzentrationen im Reaktionsgemisch):
67 mM Tris (pH 8,8 mit HCl)
16,6 mM Ammoniumsulfat
6,7 mM Magnesiumchlorid
10 mM β-Mercaptoethanol
6,7 µM EDTA
Auftragepuffer: 35 % Ficoll 70 (Ficoll 70 ist ein synthetisches Polymer, das durch Copolymerisation von Saccharose und Epichlorhydrin hergestellt wird. Das Copolymer weist eine ungefähre mittlere Molmasse von 70 000 auf; Produkt der Firma Pharmacia)
200 mM Tris-Acetat
100 mM Natriumacetat
5 mM EDTA
0,2 % Bromphenolblau
Größen-Marker: Bacteriophage ØX174, DNS gespalten mit Hae III; Größe der Banden in Basenpaaren: 1 353, 1 078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 und 72.

Beispiel 1
1 µg humaner, genomischer DNS, 100 pg jedes der Oligonucleotide I, II, III und IV, wie sie hierin definiert worden sind, 1,5 mM (Finalkonzentration) von jedem der vier Desoxynucleotid-Triphosphate und Puffer in den Finalkonzentratinen, wie er oben beschrieben worden ist, wurden in einem Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubkappe miteinander vermischt und das Volumen auf 100 µl mit sterilem, destilliertem Wasser eingestellt. Das Röhrchen wurde verschlossen und 5 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Taq-Polymerase, die 1 Einheit des Enzyms enthielt, gestartet (Anglian Biotech Batch 3, verdünnt auf 1 Einheit/µl mit dem oben beschriebenen Puffer). Das Röhrchen wurde dann 4 Minuten bei 58°C und anschließend 2 Minuten auf 91°C inkubiert. Das Heiz/Kühl-Regime bei 58°C/91°C wurde noch mit fünf weiteren Zyklen fortgesetzt, und an diesem Punkt 1 weitere Einheit des Enzyms (wie oben) zugegeben. Danach wurde das Heiz/Kühl-Regime bei 58°C/91°C noch mit sechs weiteren Zyklen fortgesetzt und danach 1 weitere Einheit des Enzyms zugegeben (wie oben). Das oben beschriebene Heiz/Kühl-Regime wurde für weitere sechs Zyklen fortgesetzt und danach 1 weitere Einheit des Enzyms (wie oben) zugegeben, danach weitere 5 Zyklen fortgesetzt und wieder eine weitere Einheit des Enzyms (wie oben) zugegeben, danach weitere 5 Zyklen fortgesetzt und wieder eine weitere Einheit des Enzyms (wie oben) zugegeben. Danach wurde das Regime weitere zwei Zyklen fortgesetzt und wieder 1 weitere Einheit des Enzyms (wie oben) zugesetzt. Nach diesem Regime wurden 20 Minuten bei 58°C inkubiert.
Der Nachweis der Amplifikationsprodukte wurde durch Vereinigen von 15 µl des Reaktionsgemisches mit einem 5-µl-Aliquot des Auftragepuffers und anschließender Elektrophorese an einem Agarosegel (3% „NuSieve"), das Ethidiumbromid (2 µg/ml) enthielt, durchgeführt. Die Elektrophorese wurde gegen Größen-Marker durchgeführt, um die richtige Größe der Amplifizierungsprodukte zu bestätigen. Die Banden im Gel wurden mittels eines Transilluminators (Wellenlänge 300 nm) sichtbar gemacht und ein Photo mit einer Polaroid-Kamera aufgenommen. Die Bahn 3 in der Abbildung 7 zeigt das Ergebnis dieses Nachweises. So zeigt die Bahn 3 die Verstärkung des Exons III mit den Startern I und II, wie sie hierin bereits definiert worden sind, wodurch ein Produkt mit 360 bp erhalten wurde, und eine Amplifizierung des Exons V mit den Startern III und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, wodurch ein Produkt mit 220 bp erzeugt wurde.

Beispiel 2
Das Beispiel 1 wurde wiederholt, jedoch wurde der Starter II durch den Starter IIa, wie sie hierin bereits definiert worden sind, ersetzt. In der Abbildung 7, Bahn 4, wird das Ergebnis der Sichtbarmachung der Banden im Gel, das durch dieses Beispiel erhalten worden ist, dargestellt. Es kann daraus ersehen werden, daß keine Verstärkung des Exons III bei Verwendung der Starter I und IIa, wie sie hierin bereits definiert worden sind, stattgefunden hat, daß jedoch eine Verstärkung des Exons V mit den Startern III und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, erreicht wurde, wodurch das gleiche Produkt mit 220 bp wie in Beispiel 1 erzeugt wurde.
Durch das Beispiel 2 wird damit demonstriert, daß eine Basenfehlpaarung am 3'-Ende des als Starter verwendeten Oligonucleotids die Initiierung der Polymerase-Aktivität verhindert oder wenigstens wesentlich hemmt.

Beispiel 3
S-Allel des humanen α1-Antitrypsins
1 µg humaner, genomischer DNS, 100 pMol von jedem der Oligonucleotide, wie sie unten aufgeführt sind, 1,5 mM Endokonzentration von jedem der vier Desoxynucleosid-Triphosphate und Puffer mit einer Finalkonzentration, wie sie oben genannt wurde, wurden in einem 1,5ml-Mikrozentrifugenröhrchen vermischt und das Volumen mit sterilem, destilliertem Wasser auf 100 µl eingestellt. Das Röhrchen wurde verschlossen und 5 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Taq-Polymerase, die 1 Einheit des Enzyms enthielt, initiiert (Anglian Biotech Batch 3, verdünnt auf 1 Einheit/µl mit dem oben beschriebenen Puffer). Das Röhrchen wurde 4 Minuten bei 58 °C inkubiert und danach 2 Minuten bei 91 °C. Das Heiz/Kühl-Regime bei 58°C/91 °C wurde weitere 5 Zyklen fortgesetzt und an diesem Punkt 1 weitere Einheit des Enzyms (wie oben) zugesetzt. Das Heiz/Kühl-Regime wurde danach weitere 6 Zyklen fortgesetzt und danach 1 weitere Einheit des Enzyms (wie oben) zugegeben. Das oben beschriebene Heiz/Kühl-Regime wurde weitere 6 Zyklen fortgesetzt und danach 1 weitere Einheit des Enzyms (wie oben) zugegeben, danach wurden 5 weitere Zyklen durchgeführt und wieder 1 weitere Einheit des Enzyms (wie oben) zugegeben, danach wurden weitere 2 Zyklen durchgeführt und 1 weitere Einheit des Enzyms (wie oben) zugegeben. Nach diesem Regime wurde 20 Minuten bei 58 °C inkubiert.
Auf der Grundlage des oben beschriebenen Protokolls wurden folgende Versuche durchgeführt:

a) die verwendeten Oligonucleotide waren

5' TGGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTT V

und das Oligonucleotid, das hierin vorher schon mit I bezeichnet worden war. Die verwendete humane, genomische DNS war von einem normalen Homozygoten, der nicht an der genetischen Krankheit des humanen α1-Antitrypsin-Mangels erkrankt war; und
b) die verwendeten Oligonucleotide waren

TGGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTA VI

und das Oligonucleotid, das mit I bezeichnet und hierin bereits definiert worden ist. Die verwendete humane, genomische DNS war von einem normalen Homozygoten, der nicht an der genetischen Krankheit des humanen α1-Antitrypsin-Mangels erkrankt ist. Der Nachweis der Verstärkungsprodukte wurde durch Vereinigung von 15 µl des Reaktionsgemisches mit 5 µl des Auftragepuffers für das Gel und anschließender Elektrophorese an einem Agarose-Gel (3% „NuSieve"), das 2 µg Ethidiumbromid je ml enthielt, durchgeführt. Die Elektrophorese wurde gegen Größen-Marker (Abbildung 8, Bahn 9) durchgeführt, um die korrekte Größe der Verstärkungsprodukte zu bestätigen. Die Banden im Gel wurden mittels eines Transilluminators (Wellenlänge 300 nm) sichtbar gemacht und ein Photo mit einer Polaroid-Kamera aufgenommen. In der Abbildung 8 werden in den Bahnen 1 und 2 die Ergebnisse dieser Sichtbarmachung gezeigt. So zeigt die Bahn 1, daß eine Verstärkung dort erreicht wurde, wo die Nucleotid-Sequenz der Formel V verwendet wurde, die am 3'-Ende ein terminales Nucleotid aufweist, das komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid an dem potentiellen Mutationspunkt S in der verwendeten DNS-Probe ist, wodurch ein Amplifizierungsprodukt mit 267 bp gebildet wurde. Die Bahn 2 demonstriert jedoch, daß keine Verstärkung erfolgt, wenn am 3'-Ende des Starters für diagnostische Zwecke eine Basenfehlpaarung erfolgt, wenn der verwendete Starter für diagnostische Zwecke an seinem 3'-Ende das Nucleotid (A) aufweist, das mit dem Nucleotid (A) am potentiellen Mutationspunkt S der DNS-Probe von einem normalen Homozygoten zu einer Basenfehlpaarung führt.

Beispiel 4
Z-Allel
1 µg humane, genomische DNS, 100 pMol von jedem der unten im Detail aufgeführten Nucleotide, 1,5 mM Finalkonzentration von jedem der vier Desoxynucleosid-Triphosphate und Puffer mit der Endkonzentration, wie sie oben angegeben wurde, wurden in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß vermischt und das Volumen mit sterilen, destilliertem Wasser auf 100 µl eingestellt. Das Röhrchen wurde verschlossen und 5 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Taq-Polymerase, die 0,5 Einheiten des Enzyms enthielt, gestartet (Anglian Biotech Batch 9, verdünnt auf 0,5 Einheiten/µl mit dem oben beschriebenen Puffer). Das Röhrchen wurde dann 4 Minuten bei 60 °C und 2 Minuten bei 91 °C inkubiert. Das Heiz/Kühl-Regime bei 60 °C/91 °C wurde weitere fünf Zyklen fortgesetzt, danach wurden weitere 0,5 Einheiten des Enzyms (wie oben) zugegeben. Das Heiz/Kühl-Regime bei 60 °C/91 °C wurde dann weitere 6 Zyklen fortgesetzt, wonach weitere 0,5 Einheiten des Enzyms (wie oben) zugegeben wurden. Das oben beschriebene Heiz/Kühl-Regime wurde weitere 6 Zyklen fortgesetzt und weitere 0,5 Einheiten des Enzyms (wie oben) danach zugegeben. Danach wurde das Regime weitere 5 Zyklen fortgesetzt und anschließend weitere 0,5 Einheiten des Enzyms (wie oben) zugegeben, danach wurden weitere 3 Zyklen durchgeführt und anschließend weitere 0,5 Einheiten des Enzyms (wie oben) zugesetzt. Anschließend an dieses Regime wurde 20 Minuten bei 60 °C inkubiert.

Auf der Grundlage des oben beschriebenen Protokolls wurden folgende Versuche durchgeführt:
a) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln IX und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die humane, genomische DNS war von einem normalen Homozygoten, der an der genetischen Krankheit des humanen α1-Antitrypsin-Mangels nicht erkrankt ist.
b) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln X und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die humane, genomische DNS war von einem normalen Homozygoten, der an der genetischen Krankheit des humanen α1-Antitrypsin-Mangels nicht erkrankt ist.
c) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln IX und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die verwendete humane, genomische DNS war von einem Heterozygoten für das humane α1-Antitrypsin-Z-Allel.
d) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln X und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die verwendete humane genomische DNS war von einem Heterozygoten für das humane α1-Antitrypsin-Z-Allel.
e) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln IX und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die verwendete humane, genomische DNS war von einem Homozygoten (ZZ), der von der Krankheit des α1-Antitrypsin-Mangels befallen ist.
f) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln X und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die verwendete humane, genomische DNS war von einem Homozygoten (ZZ), der von der Krankheit des α1-Antitrypsin-Mangels befallen ist.
g) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln XI und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die humane, genomische DNS, die verwendet wurde, war von einem normalen Homozygoten, der an der genetischen Krankheit des humanen α1-Antitrypsin-Mangels nicht erkrankt war.
h) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln XII und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die verwendete humane, genomische DNS war von einem normalen Homozygoten, der an der genetischen Krankheit des α1-Antitrypsin-Mangels nicht erkrankt ist.
i) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln XI und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die verwendete humane, genomische DNS war von einem Heterozygoten für das humane α1-Antitrypsin-Z-Allel.
j) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln XII und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die verwendete humane, genomische DNS war von einem Heterozygoten für das humane α1-Antitrypsin-Z-Allel.
k) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln XI und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die verwendete humane, genomische DNS war von einem Homozygoten (ZZ), der an der genetischen Krankheit des α1-Antitrypsin-Mangels erkrankt ist.
l) Die verwendeten Oligonucleotide waren die der Formeln XII und IV, wie sie hierin bereits definiert worden sind, und die verwendete humane, genomische DNS war von einem Homozygoten (ZZ), der an dem α1-Antitrypsin-Mangel erkrankt ist.
Bei jedem Versuch wurden die Nucleotid-Sequenzen der Formeln XIII und XIV als Kontrolle für die Amplifizierung verwendet. Der Nachweis der Amplifikationsprodukte erfoglte durch Vereinigung von 15 µl des Reaktionsgemisches mit 5 µl des Auftragepuffers für das Gel und anschließender Elektrophorese an einem 1,4% Agarose-Gel, das 0,5 µg Ethidiumbromid/ml enthielt. Die Elektrophorese wurde gegen Marker für die Größe, wie sie hierin bereits definiert worden sind, durchgeführt, um die korrekte Größe der Verstärkungsprodukte zu bestätigen. Die Banden im Gel wurden mittels eines Transilluminators (Wellenlänge 300 nm) sichtbar gemacht und Photos mit einer Polaroid-Kamera aufgenommen. In der Abbildung 9 zeigen die Bahnen 2 bis 13 das Ergebnis dieser Sichtbarmachung, wobei die Bahnen 1 und 14 die Banden der Größen-Marker darstellen. So zeigen die Bahnen 2 bis 7, daß die Destabilisierung des Starters für diagnostische Zwecke durch Veränderung des fünften Nucleotids vom 3'-Ende an nicht voll wirksam ist, daß der Starter zwischen einer normalen DNS-Probe und einer Probe einer DNS-Mutation unter diesen Reaktionsbedingungen unterscheiden kann. Die Bahnen 8 bis 13 zeigen jedoch, daß die Veränderung des dritten Nucleotids vom 3'-Ende an im Starter für diagnostische Zwecke wirksam ist, damit der Starter zwischen einer normalen DNS-Probe und einer Probe einer DNS-Mutation unterscheiden kann und damit für normale Homozygoten, Heterozygoten (Träger) oder ZZ-Homozygoten, die an der genetischen Erkrankung des α1-Antitrypsin-Mangels erkrankt sind, unterscheiden kann und damit diagnostisch wirksam wird.
Die oben beschriebenen Versuche dieses Beispiels wurden auch unter Verwendung eines Starters für diagnostische Zwecke durchgeführt, in dem keine zusätzlichen, destabilisierenden Veränderungen der Nucleotid-Sequenz vorgenommen wurden und in dem das siebente Nucleotid vom 3'-Ende an verändert wurde (A in C), um eine Destabilisierung zu erreichen. In jedem Falle war der Starter für diagnostische Zwecke nicht voll effektiv, um zwischen einer normalen DNS und einer Probe einer DNS-Mutation zu unterscheiden. Diese Ergebnisse werden in der Abbildung 8, Bahnen 5 bis 8, unter Bezugnahme auf einen Starter für diagnostische Zwecke mit keinen zusätzlichen destabilisierenden Veränderungen der Nucleotid-Sequenz illustriert.

Beispiel 5

Die Oligonucleotide XXII (normal) und XXI (Variation) wurden als Starter verwendet. In diesem Beispiel wird das Gemisch der dNPT von A, G und T zu einem Starter-Extensionsprodukt mit sieben Basen am Templat führen, bevor zu weiterem Wachstum das C-Nucleosid-Triphosphat benötigt wird. Die Tm wurde für diese Oligonucleotide auf 94°C berechnet, wobei die Formel

$$Tm = 4(G + C) \text{ und } 2(A + T)$$

verwendet wurde; es wird jedoch angenommen, daß diese nur für Oligonucleotide bis zu 23-meren gültig ist, so daß eine Temperatur von 75°C vorher festgelegt wurde.
Die Oligonucleotide (jeweils 8 pMol) wurden an der 5'-terminalen Hydroxylgruppe unter Verwendung von $d^{32}P$-ATP (Amersham 2 µCi) und T_4-Polynucleotid-Kinase (4 Einheiten) in einem Reaktionsvolumen von 80 µl, das 5 mM Tris-HCl, *p*H = 7,6; 10 mM $MgCl_2$; 5 mM DTT, 100 µM Spermidin und 100 µm EDTA enthielt, markiert. Die Kinase-Reaktion wurde 20 Minuten bei 37°C durchgeführt, danach wurden die markierten Oligonucleotide durch Elektrophorese an einem 15%igen, denaturierenden Polyacrylamid/Harnstoff-Gel (Vorelektrophorese 1 Stunde, 500 V; Elektrophorese 4 Stunden, 800 V) überprüft.

Es wurden zwei Plasmide verwendet, von denen das eine die normale Sequenz (MM) des S-Locus des Exons III des humanen α1-Antitrypsin-Gens und das andere die Sequenzvariation enthielt, die der Homozygoten-Variation (SS) entspricht. Es wurden sechs Röhrchen vorbereitet, jeweils 2 von jedem möglichen DNS-Typ. Es wurde 1 fMol jedes entsprechenden Plasmids bei den Homozygoten verwendet, der Heterozygot wurde jedoch unter Verwendung von 0,5 fMol von jedem der beiden Plasmide simuliert. In jedem Röhrchen wurde ein 200facher Überschuß an markiertem Oligonucleotid eingestellt, indem 200 fMol (2 µl der markierten Lösung) entweder zu dem normalen Oligonucleotid (XXII) oder zu der Oligonucleotid-Variation (XXI) von jedem DNS-Typ zugegeben wurden. Jedes Röhrchen enthielt die drei dNPT's A, G und T (Pharmacia) mit jeweils einer Finalkonzentration von 5 mM in einem Reaktionsvolumen von 20 µl, worin 6,7 mM EDTA, 6,7 mM $MgCl_2$, 67 mM Tris-HCl, *p*H = 8,8, 10 mM Mercaptoethanol und 16,6 mM Ammoniumsulfat anwesend waren. Die Reaktionsvolumina wurden verdreifacht, d.h. in jedem einzelnen Fall 60 µl verwendet, um die Einflüsse der Verdampfung zu vermindern. Die Röhrchen wurden dann 5 Minuten gekocht und danach in Eis gestellt. Anschließend wurden 3 Einheiten Taq-Polymerase (Cetus 1 zu 5 verdünnt mit 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris, *p*H = 8,3 und 0,01 % Gelatine, so daß 1 Einheit/µl erhalten wurde) zu jedem Röhrchen hinzugefügt. Die Röhrchen wurden mit 13000 U/min 2 Minuten zentrifugiert und ein 2 µl Aliquot zu 5 µl Formamid/ Bromphenolblau hinzugefügt. Die Röhrchen wurden dann bei 75°C in einem Wasserbad stehen gelassen. Nach 4 Stunden wurden die Röhrchen entnommen, 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert und ein weiteres Aliquot von 2 µl entnommen und zu 5 µl Farbstofflösung hinzugefügt. Nach 6 Stunden wurden die Röhrchen wieder entnommen und weitere 3 Einheiten Taq-Polymerase zu jedem Röhrchen hinzugefügt, danach eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert und ein Tropfen leichtes Mineralöl (Sigma) hinzugefügt, um die Verdampfung zu minimieren, jedoch kein Aliquot entnommen. Die Röhrchen wurden dann bei 75°C über Nacht stehen gelassen. Nach 24 Stunden, gerechnet vom Ende des ersten Zentrifugierens an, wurden die Röhrchen aus dem Wasserbad entnommen, 1 Minute zentrifugiert und die letzten 2 µl Aliquots zu 5 µl Farbstofflösung zugegeben. Alle Aliquots wurden durch Elektrophorese analysiert, wobei ein 15%iges, denaturierendes Polyacrylamid/ Harnstoff-Gel in 1 × TBE-Puffer (0,089 M Tris/Borat, 0,089 mM Borsäure, 0,002 M EDTA) nach Vorelektrophorese verwendet wurde und die Elektrophorese in 5,5 Stunden bei 880 V durchgeführt wurde. Die Gele wurden dann über Nacht bei Zimmertemperatur ohne Intensivierungsfolie auf wenig empfindlichen fotographischen Film autoradiographiert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12 dargestellt.
Die Bahnen 1 und 2 entsprechen der DNS von einem normalen Homozygoten (MM), die Bahnen 3 und 4 der DNS von einem Heterozygoten (MS) und die Bahnen 5 und 6 der DNS von einer Homozygoten-Variation (SS). Bei den Bahnen 1, 3 und 5 wurde das Oligonucleotid XXII (normal) verwendet, und bei den Bahnen 2, 4 und 6 wurde das Oligonucleotid XXI (Variation) verwendet. Wie erwartet, trat bei den Bahnen 2 oder 5 keine Extension am Oligonucleotid ein. Die nachgewiesenen Banden der Produkte werden durch Winkel angezeigt.

Beispiel 6
1 ng der Kassetten-Plasmid-DNS, 100 pMol von jedem der als Starter verwendeten Oligonucleotide

TTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA und
TATGCGACTCCCTGCATTAGGAGCAGCCCA

1,5 mM (Finalkonzentration) von jedem der vier Desoxynucleosid-Triphosphate und Puffer mit den Finalkonzentrationen, die oben angegeben sind, wurden in 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel vermischt und das Volumen mit sterilem, entionisiertem Wasser (Milli-Q) auf 100 µl eingestellt. Das Röhrchen wurde verschlossen und 5 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 Einheiten Taq-Polymerase (Cetus) initiiert und das Röhrchen mit dem Gemisch verschlossen und leichtes Mineralöl zugesetzt (Sigma), um ein Verdampfen zu verhindern. Das Röhrchen wurde vier Minuten bei 60°C und danach 2 Minuten bei 90°C inkubiert. Dieses Verfahren wurde insgesamt dreißig Zyklen wiederholt. 60 µl des Reaktionsgemisches wurden dann entnommen und 60 pMol entweder der Starter XIX und XI (normal) oder der Starter XII und XX (Variation) dazu zugegeben. Anschließend wurde 1 Einheit Taq-Polymerase (Cetus) zugegeben, um weitere Umsetzungen zu initiieren. Das Gemisch wurde zwei Minuten bei 92°C und danach vier Minuten bei 60°C inkubiert. Dieses Verfahren wurde insgesamt mit vier Zyklen wiederholt. Der Nachweis der Verstärkungsprodukte erfolgte dadurch, daß Aliquots von 10 µl des Reaktionsgemisches mit dem Auftragepuffer für das Gel vermischt wurden und dann eine Elektrophorese an einem 3% Agarose-Gel („NuSieve", FMC Bioproducts), das 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, durchgeführt wurde. Die Banden im Gel wurden mittels eines Transilluminators (Wellenlänge 300 nm) sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera eine Fotographie angefertigt. Die Ergebnisse werden in der Abbildung 13 dargestellt. Die Bahn ganz links zeigt die Marker für die Größe, die verwendet wurden, um die Größe der erhaltenen Produkte zu bestätigen. Die Bahnen 1 und 2 entsprechen der DNS von einem normalen Homozygoten (MM), die Bahnen 3 und 4 der DNS von einem Heterozygoten (MZ) und die Bahnen 5 und 6 der DNS von einer Homozygoten-Variation (ZZ). Bei den Bahnen 1, 3 und 5 wurden die Starter XIX und XI verwendet; bei den Bahnen 2, 4 und 6 wurden die Starter XII und XX verwendet. Wie erwartet, trat bei den Bahnen 2 oder 5 keine Extension am Starter ein. Die nachgewiesenen Banden der Produkte werden durch Winkel angezeigt.

Fig.1(a)

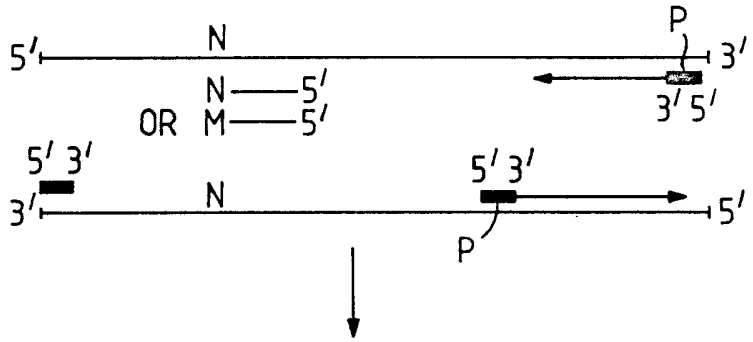


Fig.1(b)

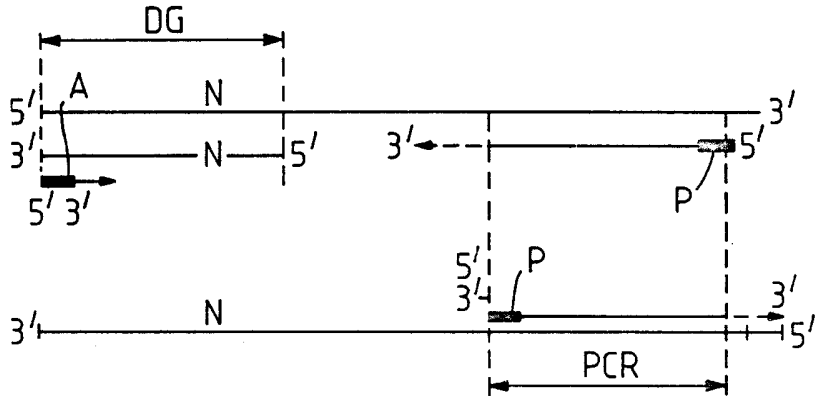


Fig.1(c)

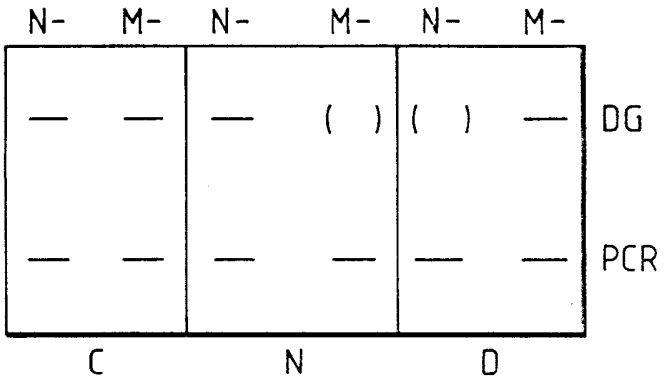
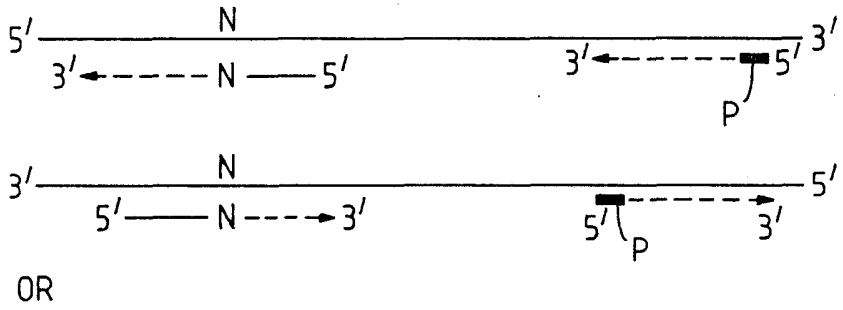


Fig.2(a)



OR

Fig.2(b)

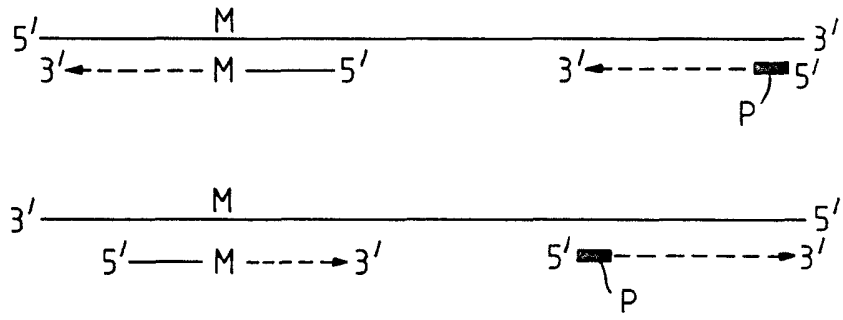


Fig.3.

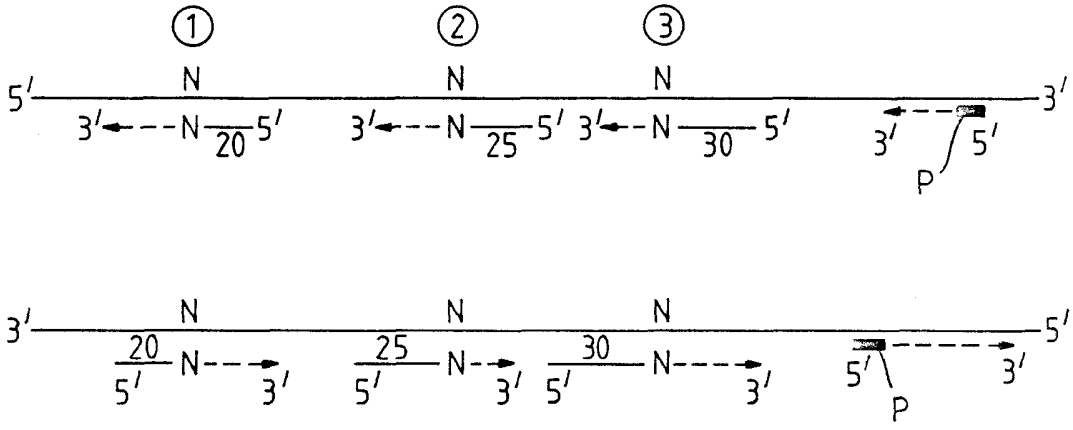


Fig.4(a)

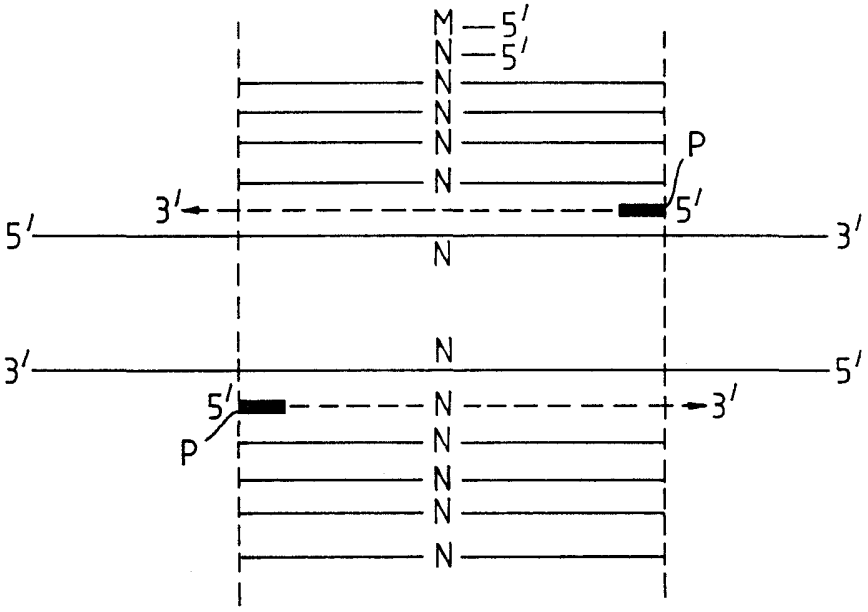


Fig.4(b)

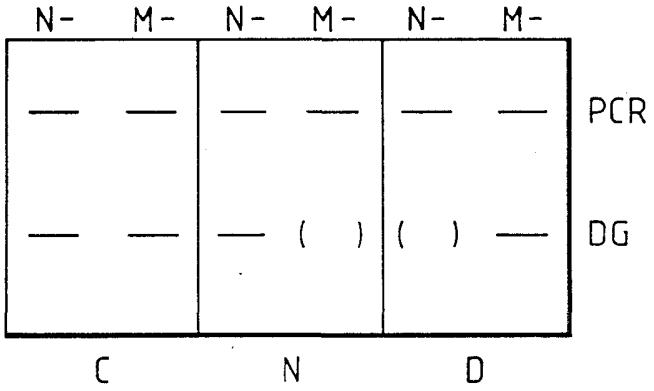


Fig.6.

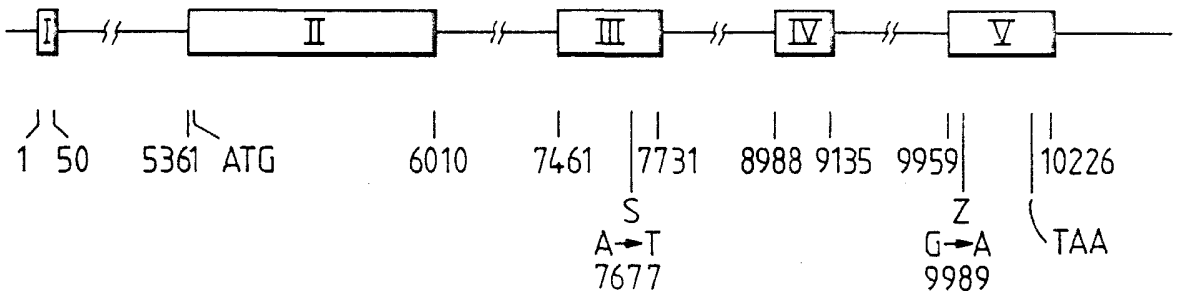


Fig.5(a)

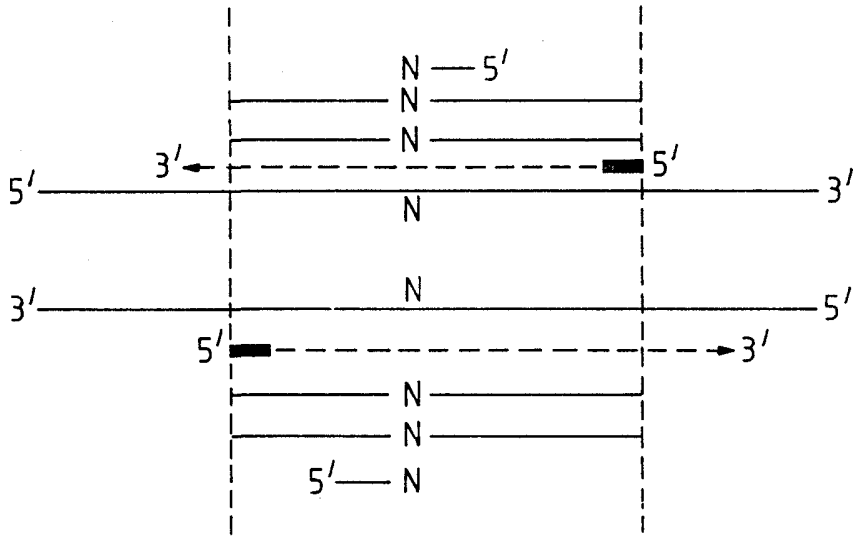


Fig.5(b)

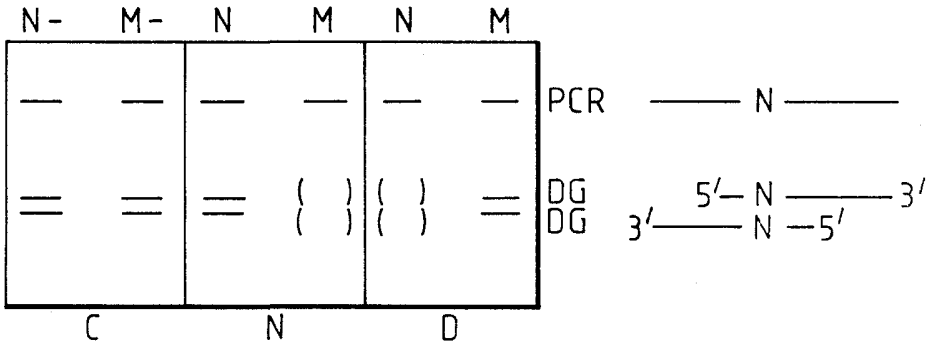


Fig.5(c)

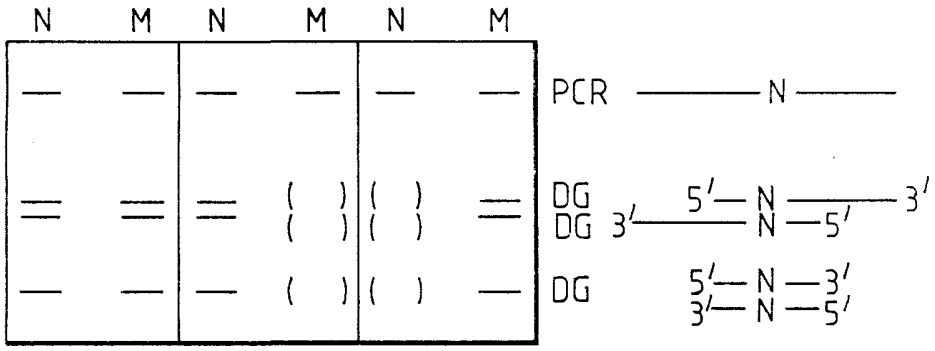


Fig.7.

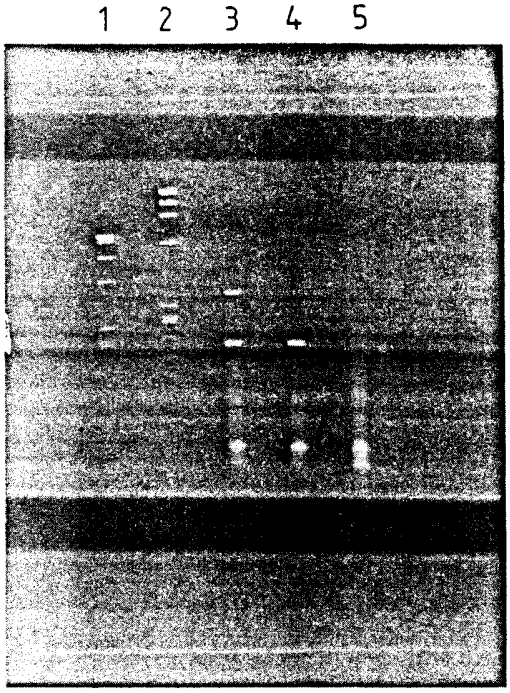


Fig.8.

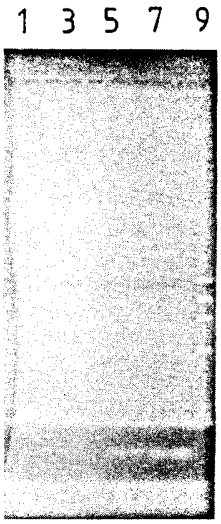


Fig.9.

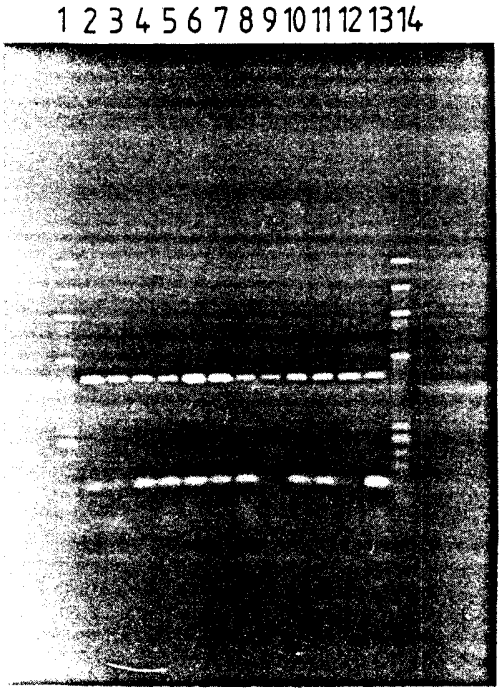


Fig. 10.

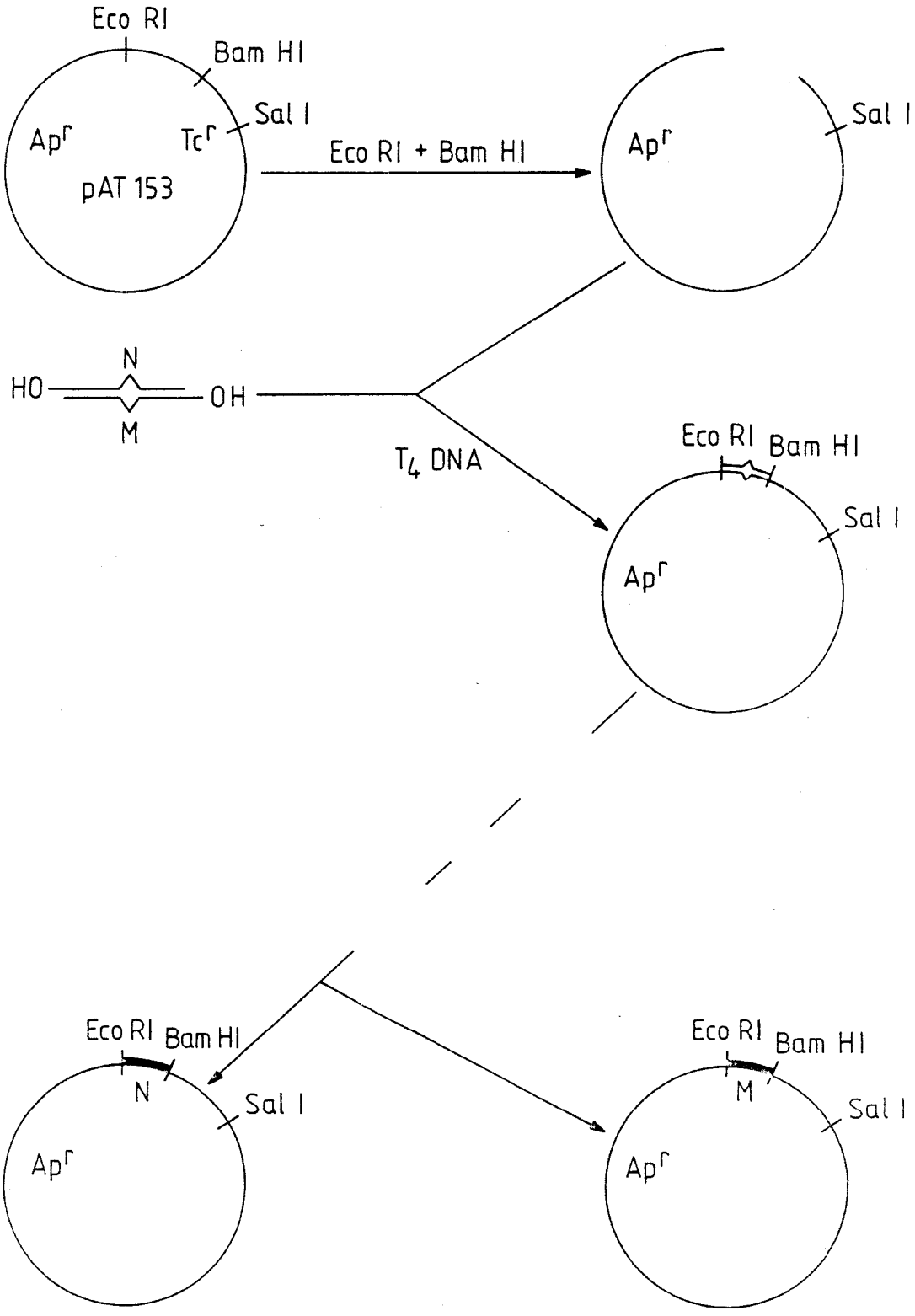

Eco RI
Bam HI
Sal I
Ap^r
Tc^r
pAT 153
Eco RI + Bam HI
Ap^r
Sal I
N
HO
OH
M
T$_4$ DNA
Eco RI
Bam HI
Sal I
Ap^r
Eco RI
Bam HI
N
Sal I
Ap^r
Eco RI
Bam HI
M
Sal I
Ap^r

Fig. 11(a)

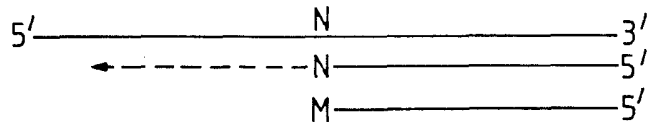


Fig. 11(b)

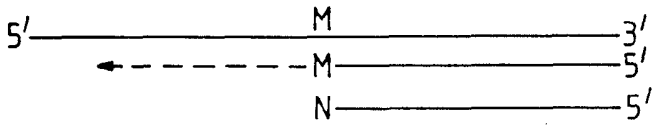


Fig. 11(c)

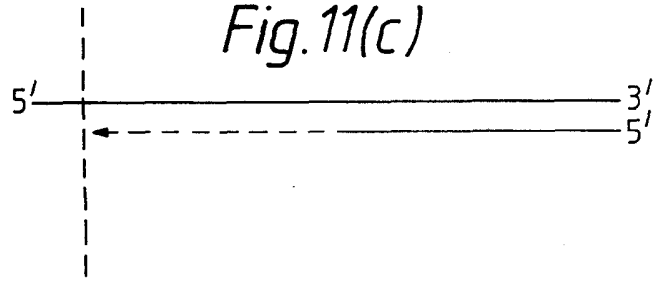


Fig. 13.

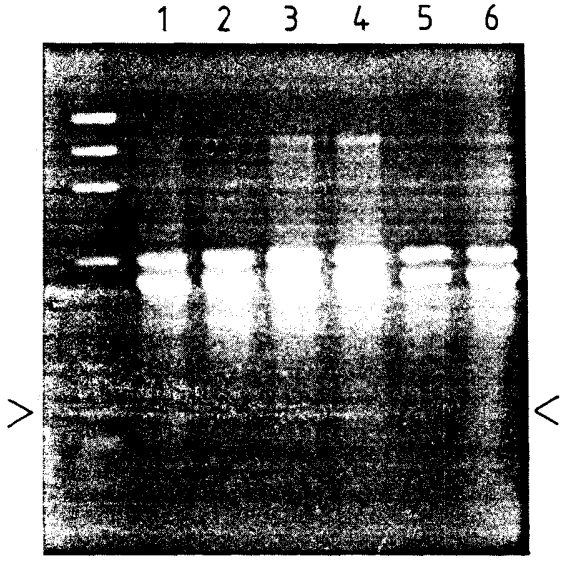
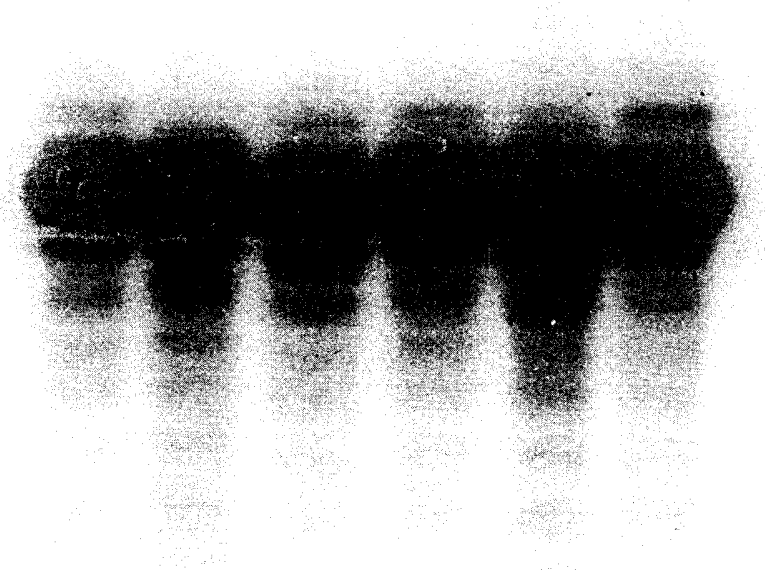


Fig. 12.

1 2 3 4 5 6