(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 692 33 458 T2** 2005.12.29

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 576 558 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 33 458.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US92/01905**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 908 554.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 92/015712**
(86) PCT-Anmeldetag: **04.03.1992**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **17.09.1992**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.01.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **15.12.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12Q 1/68**
C08G 77/04

(30) Unionspriorität:

664837	**05.03.1991**	**US**
775786	**11.10.1991**	**US**

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

(73) Patentinhaber:
Orchid BioSciences, Inc., Princeton, N.J., US

(72) Erfinder:
GOELET, Philip, Cockeysville, US; KNAPP, Michael R., Baltimore, US; ANDERSON, Stephen, Princeton, US

(74) Vertreter:
Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

(54) Bezeichnung: **NUKLEINSÄURETYPISIERUNG DURCH POLYMERASEVERLÄNGERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN UNTER VERWENDUNG VON TERMINATOR-MISCHUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft das Gebiet des Nucleinsäuresequenz-Nachweises. Der Nachweis von Nucleinsäuresequenzen kann in zwei üblichen Zusammenhängen verwendet werden. Erstens kann der Nachweis von Nucleinsäuresequenzen zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit eines bestimmten genetischen Elements verwendet werden. Zweitens kann der Nachweis von Nucleinsäuresequenzen zur Bestimmung des spezifischen Typs eines bestimmten genetischen Elements, der vorliegt, verwendet werden. Üblicherweise existieren abweichende genetische Elemente. Es wurden viele Techniken entwickelt, um (1) die Anwesenheit spezifischer Nucleinsäuresequenzen zu bestimmen, und (2) homologe Nucleinsäuresequenz-Segmente zu vergleichen, um zu bestimmen, ob die Segmente identisch sind oder ob sie an einem oder mehreren Nucleotiden verschieden sind. Zu praktischen Anwendungen dieser Techniken gehören Diagnosen genetischer Krankheiten, Diagnosen infektiöser Krankheiten, forensische Techniken, Vaterschafts-Bestimmungen und Genomkartierung.

[0002] Im allgemeinen hängt der Nachweis von Nucleinsäuren in einer Probe und der Subtypen davon von der Technik spezifischer Nucleinsäure-Hybridisierung, mit der das Annealing der Oligonucleotid-Sonde unter Bedingungen hoher Stringenz an Nucleinsäuren in der Probe durchgeführt wird, und die erfolgreich hybridisierten Sonden nachfolgend nachgewiesen werden, ab (siehe Spiegelman, S., Scientific American, Vol. 210, S. 48 (1964)).

[0003] Das am besten unterscheidende Verfahren zum Vergleichen von DNA-Segmenten ist, die vollständige Nucleotidsequenz jedes Segments zu bestimmen. Beispiele dafür, wie eine Sequenzierung verwendet wurde, um Mutationen in menschlichen Genen zu studieren, sind in den Veröffentlichungen von Engelke, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 544–548 (1988), und Wong et al., Nature, 330: 384–386 (1987) enthalten. Gegenwärtig ist es nicht praktikabel, eine extensive Sequenzierung zu verwenden, um mehr als gerade einige wenige DNA-Segmente zu vergleichen, weil der Aufwand, der erforderlich ist, um Sequenzinformation zu bestimmen, zu interpretieren und zu vergleichen, zeitaufwendig ist.

[0004] Eine üblicherweise verwendete Durchmusterung auf DNA-Polymorphismen, die sich aus einer DNA-Sequenzvariation ergeben, besteht aus dem Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen und der Analyse der sich ergebenden Fragmente mittels Southern Blots, wie es von Botstein et al., Am. J. Hum. Genet., 32: 314–331 (1980) und White, et al., Sci. Am. 258: 40–48 (1988) beschrieben wird. Mutationen, die sich auf die Erkennungssequenz der Endonuclease auswirken, verhindern eine enzymatische Spaltung an dieser Stelle, wodurch sie das Spaltungsmuster der DNA verändern. DNAs werden verglichen, indem nach Unterschieden in den Restriktionsfragment-Längen gesucht wird. Ein Hauptproblem bei diesem Verfahren (das als Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Kartierung oder RFLP-Kartierung bekannt ist) ist seine Unfähigkeit, Mutationen nachzuweisen, die die Spaltung mit einer Restriktionsendonuclease nicht beeinflussen. Daher werden mit diesem Verfahren viele Mutationen nicht erfasst. Eine Studie von Jeffreys, Cell, 18: 1–18 (1979) war nur in der Lage, 0,7% der in einem Bereich von 40.000 Basenpaaren menschlicher DNA schätzungsweise anwesenden Mutationsvarianten nachzuweisen. Ein weiteres Problem ist, dass die zum Nachweis von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen verwendeten Verfahren sehr arbeitsintensiv sind, insbesondere die an der Southern Blot-Analyse beteiligten Techniken.

[0005] Eine Technik zum Nachweisen spezifischer Mutationen in irgendeinem DNA-Segment ist in Wallace et al., Nucl. Acids Res., 9: 879–894 (1981) beschrieben. Sie beinhaltet die Hybridisierung der zu analysierenden DNA (Ziel-DNA) mit einer komplementären, markierten Oligonucleotid-Sonde. Wegen der thermischen Instabilität von Duplex-DNAs, die nur eine einzige Basenpaar-Fehlpaarung enthalten, kann die verschiedene Schmelztemperatur verwendet werden, um Ziel-DNAs, die zur Sonde perfekt komplementär sind, von Ziel-DNAs, die nur in einem einzigen Nucleotid abweichen, zu unterscheiden. Bei einer verwandten Technik, die in Landegren, et al., Science, 41: 1077–1080 (1988) beschrieben ist, werden Oligonucleotid-Sonden so in Paaren aufgebaut, dass ihr Verbindungspunkt der Stelle auf der DNA, die hinsichtlich Mutation analysiert wird, entspricht. Diese Oligonucleotide werden dann an die DNA, die analysiert wird, hybridisiert. Basenpaar-Fehlpaarung zwischen irgendeinem Oligonucleotid und der Ziel-DNA an dem Verbindungsort verhindert die effiziente Vereinigung der zwei Oligonucleotid-Sonden durch DNA-Ligase.

A. Nucleinsäure-Hybridisierung

[0006] Die Basenpaarung von Nucleinsäuren in einer Hybridisierungsreaktion bildet die Basis der meisten

analytischen und diagnostischen Nucleinsäure-Techniken. In der Praxis funktionieren Tests, die nur auf Parametern von Nucleinsäure-Hybridisierung basieren, schlecht in Fällen, wo die Sequenzkomplexität der Testprobe hoch ist. Dies liegt teilweise an den kleinen thermodynamischen Unterschieden in der Hybridstabilität, die durch Einzelnucleotidveränderungen hervorgerufen werden, und an der Tatsache, dass eine Erhöhung der Spezifität durch Verlängern der Sonde die Wirkung hat, diesen Stabilitätsunterschied weiter zu verringern. Nucleinsäure-Hybridisierung wird daher im allgemeinen mit irgendeinem anderen Auswahl- oder Anreicherungs-Verfahren für analytische und diagnostische Zwecke kombiniert.

[0007] Das Kombinieren von Hybridisierung mit einer Größenauftrennung hybridisierter Moleküle als eine Selektionstechnik war ein üblicher diagnostischer Weg. Die Größenselektion kann vor der Hybridisierung durchgeführt werden. Die beste bekannte bisherige Größenselektionstechnik ist Southern Blotting (siehe Southern, E., Methods in Enzymology, 69: 162 (1980)). Bei dieser Technik wird eine DNA-Probe dem Verdau mit Restriktionsenzymen unterzogen, die Doppelstrangbrüche in das Phosphodiester-Rückgrat an oder nahe der Stelle einer kurzen Nucleotidsequenz, die für jedes Enzym charakteristisch ist, einführen. Das sich ergebende heterogene Gemisch von DNA-Fragmenten wird dann durch Gelelektrophorese aufgetrennt, denaturiert, und auf eine feste Phase übertragen, wo es unter Verwendung einer markierten Nucleinsäure-Sonde in situ der Hybridisierungsanalyse unterzogen wird. Fragmente, die zu der markierten Sonde komplementäre Sequenzen enthalten, werden visuell oder densitometrisch als Banden von hybridisierter Markierungssubstanz offenbart. Eine Abwandlung dieses Verfahrens ist Northern Blotting für RNA-Moleküre. Die Größenselektion wurde auch nach der Hybridisierung bei einer Anzahl von Techniken verwendet, insbesondere durch Hybridschutztechniken, durch Unterziehen von Sonde/Nucleinsäure-Hybriden dem enzymatischen Verdau vor der Größenanalyse.

B. Polymerase-Extension von Primer:Matrize-Duplexkomplexen

[0008] Hybride zwischen Primern und DNA-Zielen können durch Polymerase-Extension der Hybride analysiert werden. Eine Abwandlung dieser Methode ist die Polymerasekettenreaktion, in der die Reinigung durch sequenzielle Hybridisierungsreaktionen antiparalleler Primer, gefolgt von enzymatischer Amplifikation mit DNA-Polymerase, bewirkt wird (siehe Saiki, et al., Science 139: 487–491 (1988)). Durch Selektionieren nach zwei Hybridisierungsreaktionen liefert diese Methode die Spezifizität, die bei Techniken, die nur von einer einzigen Hybridisierungsreaktion abhängen, fehlt.

[0009] Es ist seit langem bekannt, dass Primer-abhängige DNA-Polymerasen im allgemeinen eine geringe Fehlerrate für die Hinzufügung von Nucleotiden, die zu einer Matrize komplementär sind, haben. Dieses Merkmal ist in der Biologie wesentlich für die Verhinderung genetischer Irrtümer, die schädliche Auswirkungen auf die Nachkommenschaft haben würden. Die Spezifizität, die dieser enzymologischen Reaktion innewohnt, wurde in breitem Umfang erforscht als die Basis der "Sanger-" oder Dideoxy-Kettenterminations-Sequenzierungsmethodik, die das grundlegende Nucleinsäure-Typisierungsexperiment ist. Eine Art des Sanger-DNA-Sequenzierungsverfahrens benutzt Mischungen der vier Deoxynucleosid-triphosphate, die normale DNA-Vorläufer sind, und eine benutzt die vier möglichen Dideoxynucleosid-triphosphate, die anstelle einer Hydroxylgruppe ein Wasserstoffatom an das 3'-Kohlenstoffatom der Ribose-Zuckerkomponente des Nucleotids gebunden haben. Eine DNA-Kettenverlängerung in der Richtung 5' zu 3' ("stromab") erfordert diese Hydroxylgruppe. Wenn ein Dideoxynucleotid in die wachsende DNA-Kette eingebaut wird, kann solchermaßen keine weitere Verlängerung auftreten. Mit einem Dideoxynucleotid in dem Gemisch können DNA-Polymerasen aus einer Primer:Matrize-Kombination eine Population von Molekülen veränderlicher Länge erzeugen, von denen alle nach der Hinzufügung von einem von den vier möglichen Nucleotiden enden. Die Reihe von vier unabhängigen Reaktionen, jede mit einem unterschiedlichen Dideoxynucleotid, erzeugt ein Satzbündel von Fragmenten, die alle am gleichen 5'-Ende des Primer-DNA-Moleküls beginnen und an allen möglichen 3'-Nucleotid-Positionen enden.

[0010] Eine weitere Verwendung von Dideoxynucleosid-triphosphaten und einer Polymerase bei der Analyse von DNA beinhaltet eine Markierung des 3'-Endes eines Moleküls. Eine ausgezeichnete Manifestation dieser Technik liefert die Mittel zur Sequenzierung eines DNA-Moleküls von seinem 3'-Ende her unter Verwendung des Maxam-Gilbert-Verfahrens. Bei dieser Technik wird ein Molekül mit einem überstehenden 3'-Ende mit terminaler Transferase in Anwesenheit von radioaktivem Dideoxy-ATP behandelt. Ein radioaktives Nucleotid wird hinzugefügt, was das Molekül geeignet zur Sequenzierung macht. Beide Verfahren der DNA-Sequenzierung, die markierte Dideoxynucleotide verwenden, erfordern eine elektrophoretische Trennung der Reaktionsprodukte, um die Typisierungsinformation herzuleiten. Beide Verfahren erfordern vier getrennte Gelspuren für jede Typisierungsbestimmung.

[0011] Die folgenden zwei Patente beschreiben andere Verfahren zur Typisierung von Nucleinsäuren, die Pri-

merextension und markierte Nucleotide einsetzen. Mundy (U.S.-Patent Nr. 4 656 127) beschreibt ein Verfahren, bei dem ein Primer komplementär zu einem Bereich einer interessierenden Ziel-Nucleinsäure aufgebaut wird, so dass sein 3'-Ende nahe an einem Nucleotid ist, in dem eine Variation auftreten kann. Dieses Hybrid wird der Primerextension in Anwesenheit einer DNA-Polymerase und von vier Deoxynucieosid-triphosphaten, von denen eines ein α-Thionucleotid ist, unterzogen. Das Hybrid wird dann unter Verwendung eines Exonuclease-Enzyms, das Thio-derivatisierte DNA nicht als ein Substrat für seine nucleolytische Tätigkeit verwenden kann (beispielsweise Exonuclease III von E. coli), verdaut. Wenn das Varianten-Nucleotid in der Matrize zu einem der Thionucleotide in dem Reaktionsgemisch komplementär ist, wird das sich ergebende verlängerte Primermolekül eine charakteristische Größe haben und gegen die Exonuclease beständig sein; Hybride ohne Thio-derivatisierte DNA werden verdaut werden. Nach einem geeigneten Enzymverdau zur Entfernung underivatisierter Moleküle kann das Thio-derivatisierte Molekül durch Gelelektrophorese oder eine andere Abtrennungstechnologie nachgewiesen werden.

[0012] Vary und Diamond (U.S. Patent Nr. 4 851 331) beschreiben ein Verfahren, das demjenigen von Mundy ähnlich ist, bei dem das letzte Nucleotid des Primers dem interessierenden Variantennucleotid entspricht. Da eine Fehlpaarung des Primers und der Matrize am 3'-terminalen Nucleotid des Primers kontraproduktiv für die Verlängerung ist, werden sich unter normalen Primer-Extensionsbedingungen signifikante Unterschiede in der Menge der Inkorporierung eines Indikatornucleotids ergeben. Dieses Verfahren hängt ab von der Verwendung einer DNA-Polymerase, z. B. reverser Transcriptase AMV, die keine zugehörige 3' zu 5'-Exonuclease-Aktivität hat.

[0013] Die Verfahren von Mundy und von Vary und Diamond haben Nachteile. Das Verfahren von Mundy ist brauchbar, aber beschwerlich, wegen der Erfordernisse des zweiten, verschiedenen enzymologischen Systems, wo die nicht-derivatisierten Hybride verdaut werden. Das Verfahren von Vary ist kompliziert wegen der Tatsache, dass es keine einzelnen Reaktionsprodukte erzeugt. Jegliches "falsches" Primen erzeugt ein beträchtliches Rauschen in einem derartigen System, das von einem echten Signal schwer zu unterscheiden wäre.

[0014] Die vorliegende Erfindung umgeht die mit den Verfahren von Mundy und von Vary und Diamond zur Typisierung von Nucleinsäuren hinsichtlich bestimmter Nucleotide verbundenen Probleme. Mit Verfahren, die Primerextension und eine DNA-Polymerase verwenden, erzeugt die gegenwärtige Erfindung eine einzelne molekulare Spezies, die eine Base länger ist als der Primer selbst. Bei vielen Verfahren, insbesondere jenen, die die Polymerasekettenreaktion verwenden, kann der Reaktionstyp, der zur Reinigung der interessierenden Nucleinsäure in dem ersten Schritt verwendet wird, auch in dem nachfolgenden Nachweisschritt verwendet werden. Schließlich ist es mit Terminatoren, die mit verschiedenen Detektor-Baueinheiten (beispielsweise verschiedenen Fluorophoren, die verschiedene spektrale Eigenschaften haben) markiert sind, möglich, nur ein Reagens für alle Sequenz-Nachweisexperimente zu verwenden. Darüber hinaus können, wenn Techniken zur Abtrennung der terminierten Primer nach der Reaktion verwendet werden, in demselben Rohr Sequenz-Nachweisexperimente an mehr als einem Ort durchgeführt werden.

[0015] Ein jüngerer Artikel von Mullis (Scientific American, April 1990, Seiten 56–65) schlägt ein Experiment vor, das offensichtlich nicht durchgeführt wurde, um die Identität eines Ziel-Basenpaars in einem Stück doppelsträngiger DNA zu bestimmen. Mullis schlägt die Verwendung von vier Arten von Dideoxynucleosid-triphosphaten, wobei eine Art von Dideoxynucleosid-triphosphat radioaktiv markiert ist, vor.

[0016] Die vorliegende Erfindung erlaubt Analysen von Nucleinsäure-Sequenzen, die bei der Diagnose infektiöser Krankheiten, der Diagnose genetischer Störungen und bei der Identifizierung von Individuen und ihrer Abstammung brauchbar sein können.

[0017] Für diese Zwecke ist eine Anzahl von Verfahren entwickelt worden. Derartige Methoden, obwohl wirkungsvoll, waren mühsam und teuer, wobei sie im allgemeinen eine Kombination von Techniken wie Gelelektrophorese, Blotting, Hybridisierung und Autoradiographie oder nicht-isotopische Entdeckung beinhalteten. Es werden einfachere Technologien gebraucht, um die weiter verbreitete Verwendung von Nucleinsäure-Analyse zu erlauben. Außerdem sind gegenwärtig Tests auf der Basis von Nucleinsäuren unter den teuersten der Laborverfahren und können aus diesem Grund nicht auf Routinebasis verwendet werden. Schließlich sind gegenwärtige Techniken nicht an automatisierte Verfahrensweisen, die notwendig wären, um die Analyse großer Anzahlen von Proben zu erlauben, und die die Kosten weiter verringern würden, angepaßt.

[0018] Die gegenwärtige Erfindung stellt ein Verfahren bereit, das zur Diagnose oder Charakterisierung von Nucleinsäuren in biologischen Proben ohne Rückgriff auf gelelektrophoretische Größentrennung der Nuclein-

säure-Spezies verwendet werden kann. Dieses Merkmal macht dieses Verfahren leicht an eine Automatisierung anpaßbar und erlaubt daher die Analyse großer Anzahlen von Proben bei relativ niedrigen Kosten. Weil Nucleinsäuren der wesentliche Bauplan des Lebens sind, kann jeder Organismus oder jedes Individuum durch identifizierbare Sequenzen von Nucleinsäuren in einzigartiger Weise charakterisiert werden. Es ist daher möglich, das Vorliegen bestimmter Organismen zu identifizieren oder die biologische Herkunft bestimmter Proben zu zeigen, indem diese spezifischen Nucleinsäure-Sequenzen nachgewiesen werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0019] Die Erfindung schafft ein Verfahren zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase an einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure, aufweisend:

(a) alternativ:

(i) wenn die interessierende Nucleinsäure doppelsträngig ist, Behandeln einer die Nucleinsäure enthaltenden Probe, um eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen zu erhalten, die eine Matrize aus ungepaarten, sich über die spezifische Position erstreckenden Nucleotidbasen aufweist, oder

(ii) wenn die interessierende Nucleinsäure einzelsträngig ist, Erhalten einer Probe der Nucleinsäure, um als eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen zu dienen, die eine Matrize aus ungepaarten, sich über die spezifische Position erstreckenden Nucleotidbasen aufweist;

(b) Erhalten eines Oligonucleotid-Primers mit einer Nucleotidsequenz, die zur Hybridisierung mit der Matrizen-Nucleinsäure fähig ist, um eine Duplex zu bilden, in der die zu identifizierende Nucleotidbase dem 3'-Ende des Primers unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist;

(c) Immobilisieren des Oligonucleotid-Primers auf einem festen Träger, um es dem immobiliserten Primer zu ermöglichen, mit der Matrizen-Nucleinsäure unter Bildung einer Duplex, in der die zu identifizierende Nucleotidbase dem 3'-Ende des Primers unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, zu hybridisieren;

(d) in Berührung Bringen des immobiliserten Oligonucleotid-Primers unter Hybridisierungsbedingungen mit der Matrizen-Probe mit ungepaarten Basen aus Schritt (a), um auf dem festen Träger eine Duplex zwischen dem immobilisierten Primer und der Matrizen-Nucleinsäure zu bilden, worin die zu identifizierende Nucleotidbase dem 3'-Ende des Primers in der Duplex unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist;

(e) in Berührung Bringen der Duplex aus Schritt (d) mit einer Reagens-Zusammensetzung, die einen wässerigen Träger und ein Gemisch von vier verschiedenen Terminatoren einer Nucleinsäure-Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion aufweist, wobei jeder der Terminatoren zur spezifischen Beendigung der Extensionsreaktion in einer streng von der Identität der ungepaarten Nucleotidbase in der Matrize, die dem 3'-Ende des Primers unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, abhängigen Weise fähig ist, wobei einer der Terminatoren zu der zu identifizierenden Nucleotidbase komplementär ist und mindestens einer der Terminatoren mit einer nachweisbaren Markersubstanz markiert ist, unter Bedingungen, die eine Basenpaarung des in dem Reagens vorhandenen komplementären Terminators mit der zu identifizierenden Nucleotidbase und das Auftreten einer Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion, um den komplementären Terminator am 3'-Ende des Primers unter Bildung eines verlängerten Primers dergestalt einzubauen, dass der Primer durch den komplementären Terminator verlängert wird, erlauben;

(f) Entfernen von nicht in den Primer eingebautem markierten Terminator von dem festen Träger; und

(g) Identifizieren irgendeiner an dem 3'-Ende des immobilisierten verlängerten Primers aus Schritt (e) vorhandenen nachweisbaren Markersubstanz auf dem festen Träger, um die Identität der zu identifizierenden Nucleotidbase zu bestimmen.

[0020] Die Erfindung schafft auch ein Verfahren zur Bestimmung des Genotyps eines Organismus an einem oder mehreren bestimmten Genorten, aufweisend:

(a) Erhalten einer genomische DNA enthaltenden Probe von dem Organismus; und

(b) Identifizieren der Nucleotidbase oder der Nucleotidbasen, die an jeder von einer oder mehreren spezifischen Positionen in interessierenden Nucleinsäuren vorhanden ist (sind), wobei eine derartige Base oder jede derartige Base unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens identifiziert wird, und dadurch Identifizieren von verschiedenen Allelen, und dadurch wiederum Bestimmen des Genotyps des Organismus an einem bestimmten Genort oder an mehreren bestimmten Genorten.

[0021] Die Erfindung schafft auch ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer bestimmten Nucleotidsequenz in einer interessierenden Nucleinsäure, aufweisend:

(a) alternativ:

(i) wenn die interessierende Nucleinsäure doppelsträngig ist, Behandeln einer die Nucleinsäure enthaltenden Probe, um eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen zu erhalten, die eine Matrize aus ungepaarten Nucleotidbasen aufweist, oder

(ii) wenn die interessierende Nucleinsäure einzelsträngig ist, Erhalten einer Probe der Nucleinsäure, um als

eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen, die eine Matrize aus ungepaarten Nucleotidbasen aufweist, zu dienen;

(b) Erhalten eines Oligonucleotid-Primers mit einer Nucleotidsequenz, die zur Hybridisierung mit der bestimmten Nucleotidsequenz fähig ist, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, um eine Primer-verlängerbare Duplex zwischen dem Primer und der bestimmten Nucleotidsequenz zu bilden, so dass der hybridisierte Primer an einem 3'-Ende durch eine Nucleinsäure-Matrizen-abhängige Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist;

(c) Immobilisieren des Oligonucleotid-Primers an einem festen Träger, um es zu ermöglichen, dass der immobilisierte Primer mit der Matrizen-Nucleinsäure unter Bildung einer Primer-verlängerbaren Duplex hybridisiert, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, so dass der hybridisierte Primer an dem 3'-Ende durch eine Nucleinsäure-Matrizen-abhängige Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist;

(d) in Berührung Bringen des immobiliserten Oligonucleotid-Primers unter Hybridisierungsbedingungen mit einer Matrizen-Probe mit ungepaarten Basen aus Schritt (a), um auf dem festen Träger eine Primer-verlängerbare Duplex zwischen dem immobiliserten Primer und der Matrizen-Nucleinsäure zu bilden, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, so dass der hybridisierte Primer an dem 3'-Ende durch eine Nucleinsäure-Matrizen-abhängige Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist;

(e) in Berührung Bringen der Primer-verlängerbaren Duplex aus Schritt (d), falls vorhanden, mit einer Reagens-Zusammensetzung, die einen wässerigen Träger und ein Gemisch von vier verschiedenen Terminatoren einer Nucleinsäure-Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion aufweist, wobei mindestens einer der Terminatoren mit einer nachweisbaren Markersubstanz markiert wird, wobei jeder der Terminatoren zur spezifischen Beendigung der Primer-Extensionsreaktion in einer von der Identität einer ungepaarten Nucleotidbase in einer Matrize, die dem 3'-Ende eines Primers, der an die Matrize so hybridisiert ist, dass der hybridisierte Primer an einem 3'-Ende durch die Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist, unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, abhängigen Weise fähig ist, wobei die Primer-verlängerbare Duplex, falls vorhanden, mit der Reagens-Zusammensetzung unter Bedingungen in Berührung gebracht wird, die eine Basenpaarung des in dem Reagens vorhandenen komplementären Terminators mit einer Nucleotidbase in der Matrizen-Nucleinsäure der Duplex, die dem 3'-Ende des hybridisierten Primers der Duplex unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, und das Auftreten der Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion, um den komplementären Terminator an dem 3'-Ende des Primers einzubauen, um einen verlängerten Primer zu bilden, so dass der Primer durch den komplementären Terminator verlängert wird, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, wobei kein derartiger verlängerter Primer gebildet wird, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure nicht vorhanden ist, erlauben;

(f) Entfernen von nicht in den Primer eingebautem markiertem Terminator von dem festen Träger; und

(g) Nachweisen der Anwesenheit oder Abwesenheit einer nachweisbaren Markierungssubstanz an dem 3'-Ende des immobilisierten Primers aus Schritt (e) auf dem festen Träger, um die Anwesenheit oder Abwesenheit der bestimmten Nucleotidsequenz in der interessierenden Nucleinsäure zu bestimmen.

[0022] Die Erfindung schafft auch ein Verfahren vor Typisierung einer Nucleinsäuren enthaltenden Probe, aufweisend:

(a) Bestimmen der Anwesenheit oder Abwesenheit einer oder mehrerer bestimmter Nucleotidsequenzen, wobei die Anwesenheit oder Abwesenheit jeder derartigen Nucleotidsequenz durch ein Verfahren, wie es unmittelbar darüber definiert wird, bestimmt wird; und gewünschtenfalls

(b) Identifizieren der Nucleotidbase oder der Nucleotidbasen, die an jeder von einer oder mehreren spezifischen Positionen vorhanden ist (sind), wobei jede derartige Nucleotidbase unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens identifiziert wird, und wobei jede derartige spezifische Position unter Verwendung eines unterschiedlichen Primers bestimmt wird.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0023] Fig. 1. Autoradiographie markierter DNA-Produkte nach Fraktionierung auf einem Polyacrylamid/Harnstoff-Gel. Feld A zeigt Produkte der "A"-Extensionsreaktion an Oligonucleotid-Primer 182, gesteuert durch Matrizenoligonucleotide 180 oder 181. Feld B zeigt Produkte der "B"-Terminationsreaktion an Oligonucleotid-Primer 182, der mit den Matrizenoligonucleotiden 180 oder 181 durch Annealing verbunden ist. Feld C zeigt die gleichen Produkte wie in Feld B nach Reinigung an magnetischen Perlen. Zur Beachtung: Oligodeoxynucleotid 182 wurde verwendet wie von Midland Certified Reagents geliefert, ohne weitere Reinigung. Die kleineren Banden über und unter der Hauptbande sind vermutlich Verunreinigungen aufgrund unvollständiger Reaktionen oder Nebenreaktionen, die während der schrittweisen Synthese des Oligonucleotids auftraten. Hinsichtlich einer Definition der "A"-Extensionsreaktion und der "B"-Terminationsreaktion siehe "A. Allgemeine

Verfahren" in der genauen Beschreibung der Erfindung.

[0024] Fig. 2. Nachweis von Sequenzpolymorphismen in PCR-Produkten. Polymorphe Ziel-DNA-Sequenz, die Kennzeichnungen für Amplifikationsprimer, Nachweisprimer und molekulare Klone (Plasmide) zeigt. Für jeden Primer sind die Stellen der Bindung an den einen oder den anderen Strang der Ziel-DNA-Sequenz durch Unterstreichung angegeben, und die Richtung der DNA-Synthese ist durch einen Pfeil angegeben. Die Numerierung für die Zielsequenz ist am rechten Rand gezeigt. Polymorphe Stellen an den Positionen 114 und 190 sind durch fettgedruckte Buchstaben und einen Schrägstrich zwischen den zwei polymorphen Möglichkeiten angegeben.

[0025] Fig. 3. Autoradiogramm eines Gel-analysierten Polymorphismustests an PCR-Produkten. Matrizen von PCR-Produkten von p183, p624 oder p814 wurden mit den Nachweisprimern TGL182 und TGL166 in einem matrizengesteuerten Kettenverlängerungsexperiment analysiert, wie es in der Beschreibung beschrieben ist. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem Polyacrylamid/Harnstoff-DNA-Sequenzierungsgel nach Größe fraktioniert, und der Einbau von [^{35}S]-α-Thio-dideoxyadenosin-monophosphat wurde durch Autoradiographie untersucht.

[0026] Fig. 4. Gelelektrophoretische Analyse der markierten Verlängerungsprodukte der Primer TGL346 und TGL391. Produktive Primer-Matrizen-Komplexe von TGL346 oder TGL391 mit der perlengebundenen Oligonucleotid-Matrize TGL382 wurden Primerextensions-Markierungsreaktionen mit den Gemischen der vier verschiedenen [α-Thio-^{35}S] Dideoxynucleosid-triphosphate unterzogen. Markierte Primer-DNA wurde von den gewaschenen Perlen freigesetzt und auf einem 8% Polyacrylamid/8 M Harnstoff DNA-Sequenzierungsgel (2,5 pmol Primer/Spur) einer Elektrophorese unterzogen, dann durch Autoradiographie analysiert. Die vier für den Primer TGL346 gezeigten Spuren weisen darauf hin, dass die Markierung hauptsächlich mit dem ddC-Gemisch stattfand, was darauf hinweist, dass die nächste dem 3'-Ende von TGL346 benachbarte, ungepaarte Base in der TGL382-Matrize ein G war (siehe in Beispiel 4 angegebene Sequenz). Die vier für den Primer TGL391 gezeigten Spuren weisen darauf hin, dass die Markierung hauptsächlich mit dem ddT-Gemisch stattfand, was darauf hinweist, dass die nächste dem 3'-Ende von TGL391 benachbarte ungepaarte Base in der TGL382-Matrize ein A war.

[0027] Fig. 5. Autoradiographische Analysen der an Perlen gebundenen Gesamtradioaktivität. Die Perlen-Suspensionen, die die Produkte der in Fig. 5 beschriebenen Verlängerungsreaktionen enthielten, wurden auf Filterpapier getupft (1 pmol Primer pro Fleck) und einem Röntgenfilm ausgesetzt, um die gesamte perlengebundene Radioaktivität zu untersuchen. Wie gezeigt ist, baute TGL346 hauptsächlich Markierungssubstanz aus dem ddC-Gemisch ein, und TGL391 baute hauptsächlich aus dem ddT-Gemisch ein.

[0028] Fig. 6. PCR-amplifizierter polymorpher Ort von Säugetier-DNA. Gezeigt ist ein 327 Basenpaar-Segment von Säugetier-DNA, das aus Proben genomischer DNA unter Verwendung der PCR-Primer TGL240 (biotinyliert) und TGL239 (nicht biotinyliert) amplifiziert wurde. DNA-Proben von zwei homozygoten Individuen, ESB164 (Genotyp AA) und EA2014 (Genotyp BB), wurden den in Beispiel 5 beschriebenen Analysen unterzogen. Die komplette DNA-Sequenz des A-Allels an diesem Ort ist gezeigt, wobei die polymorphen Stellen, wo sich die Sequenz des B-Allels von der Sequenz des A-Allels unterscheidet, durch die Basen unter der A-Sequenz angegeben sind. Der Nachweisprimer, TGL-308, ist basengepaart mit dem Matrizenstrang, der sich von dem biotinylierten Primer erstreckt, gezeigt. Für das A-Allel ist die erste ungepaarte Matrizenbase unmittelbar stromab des 3'-Endes von TGL308 ein C, und für das B-Allel ist diese Base ein A. Daher sollte das A-Allel zur Markierung von TGL308 nur durch das ddG-Gemisch führen, und das B-Allel sollte zur Markierung nur durch das ddT-Gemisch führen.

[0029] Fig. 7. Gelelektrophoretische Analysen von PCR-Produkten von zwei verschiedenen homozygoten Individuen. Die Primer TGL240 und TGL239 wurden verwendet, um genomische DNA (aus Blut erhalten) von zwei Individuen, ESB164 und EA2014, zu amplifizieren. Die Produkte der Extensionsreaktionen für Primer TGL308, durch Annealing gebunden an die perlengebundene, durch PCR erzeugte Matrize, wie in Fig. 7 dargelegt, wurden durch Elektrophorese an einem 8% Polyacrylamid/8 M Harnstoff-DNA-Sequenzierungsgel analysiert wie in Fig. 5 dargelegt. Für das Individuum ESB164 (Genotyp AA: Markierung erwartet von dem ddG-Gemisch) sind 250 fmol verlängerter Primer von den vier verschiedenen ddNTP-Markierungsreaktionen gezeigt. Für das Individuum EA2014 (Genotyp BB: Markierung erwartet von dem ddT-Gemisch) sind Beladungen von 25, 75 und 250 fmol verlängerter Primer von den vier verschiedenen ddNTP-Markierungsreaktionen gezeigt.

[0030] Fig. 8. Autoradiographische Analysen von gesamter und NaOH-eluierter Radioaktivität von

TGL308-Primer-Extensionsreaktionen. Der Primer TGL308 wurde verwendet, um die Genotypen der Individuen ESB164 und EA2014 zu analysieren, wie in Beispiel 5 und den Fig. 7 und Fig. 8 dargelegt. Die gesamte Perlen zugeordnete Radioaktivität wurde bestimmt durch direktes Tupfen einer Suspension von Perlen, die 75 fmol Primer enthielt, auf Filterpapier, gefolgt von autoradiographischem Nachweis der Markierungssubstanz in dem Fleck. Die spezifisch dem Primer TGL308 zugeordnete Radioaktivität wurde bestimmt durch magnetisch Immobilisieren der Perlen, Eluieren des Primers mit NaOH wie in den Beispielen 4 und 5 beschrieben, und Tupfen einer 75 fmol entsprechenden Menge auf Filterpapier. Die Markierungssubstanz in diesen Flecken wurde auch durch Autoradiographie nachgewiesen.

[0031] Fig. 9. Daten sind gezeigt von GBA an einzelsträngiger Nucleinsäure, die durch asymmetrische PCR aus menschlichen DNA-Proben verschiedener Genotypen erzeugt wurde. Die zu ergründende DNA-Sequenz ist von dem HLA-DPA1-Ort an der polymorphen Sequenz, die für die Aminosäure 31 der DP-Alphakette codiert (Marsh, S. G. E. und Bodmer, J. G., HLA Class II Nucleotide Sequences, 1991. Human Immunol. 31, 207–227 (1991]) und ist in der Mitte der Figur gezeigt. Die Identifizierung des Nucleotids unmittelbar stromab von dem Primer wird durch einen Enzym-Nachweis erreicht und wird als eine orange Farbveränderung in der Mulde, die dem Nucleotid entspricht, das durch die DNA-Polymerase T7 eingefügt wird, sichtbar gemacht. Homozygoten haben nur eine positive Mulde, Heterozygoten haben zwei. Die Sequenz des GBA-Primers wird durch einen Pfeil angegeben, dessen Schwanz das 5'-Ende und dessen Kopf das 3'-Ende des Oligonucleotids ist.

[0032] Fig. 10. Daten sind gezeigt von GBA an einzelsträngiger Nucleinsäure, die durch asymmetrische PCR aus Pferde-DNA-Proben unterschiedlicher Genotypen erzeugt wurde. Die DNA-Sequenz, die ergründet werden soll, ist von dem HLA-DPA1-Ort an der polymorphen Sequenz, die für Aminosäure 50 der DP-Alphakette codiert (Marsh, S. G. E. und Bodmer, J. G., HLA Class II Nucleotide Sequences, 1991. Human Immunol. 31, 207–227 [1991]) und ist in der Mitte der Figur gezeigt.

[0033] Fig. 11. Daten sind gezeigt von GBA an einzelsträngiger Nucleinsäure, die durch asymmetrische PCR aus Pferde-DNA-Proben verschiedener Genotypen erzeugt wurde. Die untersuchte DNA-Sequenz ist von dem anonymen Ort JH85 an der polymorphen Sequenz bei Nucleotid Nr. 122 bezüglich des ursprünglich geklonten genomischen Stücks (unveröffentlichte Ergebnisse) und ist in der Mitte der Figur gezeigt. In dieser Position enthält das "B"-Allel eine zusätzliche Base. Aus diesem Grund wird eine unterschiedliche Nucleotidposition mittels Primer Nr. 307 ergründet, im Vergleich zu Nr. 308. Nichts desto weniger erlauben die Ergebnisse beider Stranguntersuchungen eine zweifelsfreie Typisierung.

[0034] Fig. 12. Die gezeigten Daten sind die Ergebnisse einer quantitativen GBA des Pferde-Orts JH85. Nach der Zugabe von Substrat wurde die Mikroplatte kinetisch in einem "Vmax"-Modell 96-Mulden-Spektrophotometer (Molecular Devices, Inc., Menlo Park, CA) gelesen. Die Werte sind als Vmax in milli OD-Einheiten pro Minute ausgedrückt. Die GBA-Ergebnisse für die AA-homozygoten (ausgefüllte Balken), die AB-heterozygoten (nicht ausgefüllte Balken) und die BB-homozygoten (punktierte Balken) einzelsträngigen Matrizen sind angegeben für die vier biotinylierten ddNTPs, die in getrennten Mulden analysiert wurden. Die erhaltenen Zahlenwerte sind oben an jedem Balken angegeben.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0035] Die Erfindung schafft ein Verfahren zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase an einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure, aufweisend:

(a) alternativ:

(i) wenn die interessierende Nucleinsäure doppelsträngig ist, Behandeln einer die Nucleinsäure enthaltenden Probe, um eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen zu erhalten, die eine Matrize aus ungepaarten, sich über die spezifische Position erstreckenden Nucleotidbasen aufweist, oder

(ii) wenn die interessierende Nucleinsäure einzelsträngig ist, Erhalten einer Probe der Nucleinsäure, um als eins Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen zu dienen, die eine Matrize aus ungepaarten, sich über die spezifische Position erstreckenden Nucleotidbasen aufweist;

(b) Erhalten eines Oligonucleotid-Primers mit einer Nucleotidsequenz, die zur Hybridisierung mit der Matrizen-Nucleinsäure fähig ist, um eine Duplex zu bilden, in der die zu identifizierende Nucleotidbase dem 3'-Ende des Primers unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist;

(c) Immobilisieren des Oligonucleotid-Primers auf einem festen Träger, um es dem immobiliserten Primer zu ermöglichen, mit der Matrizen-Nucleinsäure unter Bildung einer Duplex, in der die zu identifizierende Nucleotidbase dem 3'-Ende des Primers unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, zu hybridisieren;

(d) in Berührung Bringen des immobiliserten Oligonucleotid-Primers unter Hybridisierungsbedingungen mit der Matrizen-Probe mit ungepaarten Basen aus Schritt (a), um auf dem festen Träger eine Duplex zwischen

dem immobilisierten Primer und der Matrizen-Nucleinsäure zu bilden, worin die zu identifizierende Nucleotidbase dem 3'-Ende des Primers in der Duplex unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist;
(e) in Berührung Bringen der Duplex aus Schritt (d) mit einer Reagens-Zusammensetzung, die einen wässerigen Träger und ein Gemisch von vier verschiedenen Terminatoren einer Nucleinsäure-Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion aufweist, wobei jeder der Terminatoren zur spezifischen Beendigung der Extensionsreaktion in einer streng von der Identität der ungepaarten Nucleotidbase in der Matrize, die dem 3'-Ende des Primers unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, abhängigen Weise fähig ist, wobei einer der Terminatoren zu der zu identifizierenden Nucleotidbase komplementär ist und mindestens einer der Terminatoren mit einer nachweisbaren Markersubstanz markiert ist, unter Bedingungen, die eine Basenpaarung des in dem Reagens vorhandenen komplementären Terminators mit der zu identifizierenden Nucleotidbase und das Auftreten einer Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion, um den komplementären Terminator am 3'-Ende des Primers unter Bildung eines verlängerten Primers dergestalt einzubauen, dass der Primer durch den komplementären Terminator verlängert wird, erlauben;
(f) Entfernen von nicht in den Primer eingebautem markierten Terminator von dem festen Träger; und
(g) Identifizieren irgendeiner an dem 3'-Ende des immobilisierten verlängerten Primers aus Schritt (e) vorhandenen nachweisbaren Markersubstanz auf dem festen Träger, um die Identität der zu identifizierenden Nucleotidbase zu bestimmen.

[0036] Bevorzugt wird jeder der vier Terminatoren mit einer nachweismäßig verschiedenen nachweisbaren Markersubstanz markiert.

[0037] Bevorzugt wird der Oligonucleotid-Primer an einem von einer Mehrzahl getrennter Testplätze auf dem festen Träger immobilisiert. In diesem Fall ist es bevorzugt, dass die Schritte (c) bis (g) viermal mit demselben Oligonucleotid-Primer aus Schritt (b) und mit derselben Matrizen-Probe mit ungepaarten Basen aus Schritt (a) an vier getrennten Testplätzen auf dem festen Träger wiederholt werden, wobei in Schritt (e) an jedem der vier Testplätze eine entsprechende der vier verschiedenen Reagenszusammensetzung verwendet wird, wobei in jeder der vier Reagenszusammensetzungen nur einer der Terminatoren mit einer nachweisbaren Markersubstanz markiert ist, wobei ein unterschiedlicher der vier Terminatoren in jeder der vier verschiedenen Reagenszusammensetzungen markiert ist, so dass das Identifizieren einer am 3'-Ende des immobilisierten verlängerten Primers von Schritt (e) vorhandenen nachweisbaren Markersubstanz an einem der vier Testplätze in Schritt (g) die Identität der zu identifizierenden Nucleotidbase bestimmt.

[0038] Bevorzugt weisen in dem Reagens von Schritt (e) die Terminatoren ein Nucleotid oder ein Nucleotid-Analog auf.

[0039] Bevorzugt weisen die Terminatoren Nucleotide, Nucleotid-Analoge, Dideoxynucleotide oder Arabinosid-triphosphate auf. Bevorzugter weisen die Terminatoren eines oder mehrere der Triphosphate Dideoxyadenosin-triphosphat (ddATP), Dideoxycytosin-triphosphat (ddCTP), Dideoxyguanosin-triphosphat (ddGTP), Dideoxythymidin-triphosphat (ddTTP), oder Dideoxyuridin-triphosphat (ddUTP) auf.

[0040] Der Terminatoren ist eine isotopisch markierte Baueinheit, ein Chromophor, ein Fluorophor, eine Protein-Baueinheit oder eine Baueinheit, an die eine isotopisch markierte Baueinheit, ein Chromophor, ein Fluorophor oder eine Protein-Baueinheit gebunden werden kann. Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Reagens bereit, bei dem jede der verschiedenen nachweisbaren Markersubstanzen ein verschiedenes Fluorophor ist.

[0041] Gewünschtenfalls weist das Gemisch von Terminatoren von Schritt (e) oben außerdem Pyrophosphatase auf.

[0042] Erfindungsgemäße Verfahren können in einer DNA-Polymerase-Primer-Extensionsreaktion zur Typisierung von interessierenden Nucleinsäuresequenzen, die zu einem oder mehreren Oligonucleotid-Primern komplementär sind, verwendet werden, indem die Polymerase-verlängerten Primer chemisch oder physikalisch von dem Kettenterminatorreagens abgetrennt werden und die anlagerungen am Ende analysiert werden. Es kann jede Art von Terminator verwendet werden, der eine weitere Verlängerung verhindert, beispielsweise ein Dideoxynucleosid-triphosphat. Zur Markierung und zum Nachweis von Terminatoren können mehrere Wege verwendet werden: (1) Radioaktivität und ihr Nachweis durch entweder Autoradiographie oder Szintillationszählung, (2) Fluoreszenz- oder Absorptionsspektroskopie, (3) Massenspektrometrie oder (4) Enzymaktivität, wobei eine Protein-Baueinheit verwendet wird. Die Identität jedes Terminators kann individuell, d. h. jeweils einer, oder gleichzeitig bestimmt werden.

[0043] In einer Ausführungsform verwendet Schritt (e) ein Reagens, das vier markierte Terminatoren enthält, wobei jeder Terminator mit einer unterschiedlichen nachweisbaren Markersubstanz markiert ist. Die Duplex aus Primer und der interessierenden Nucleinsäure wird mit dem Terminator-Gemisch unter Bedingungen, die eine Basenpaarung eines komplementären Terminators mit der zu identifizierenden Nucleotidbase und das Auftreten einer Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion, um den Terminator am 3'-Ende des Primers einzubauen, erlauben, in Berührung gebracht.

[0044] Das Nettoergebnis ist, dass der Oligonucleotid-Primer durch einen Terminator verlängert wurde. Als nächstes wird die Identität der nachweisbaren Markersubstanz, die an dem 3'-Ende des verlängerten Primers vorhanden ist, bestimmt. Die Identität der nachweisbaren Markersubstanz gibt an, welcher Terminator eine Basenpaarung mit der nächsten Base in der interessierenden Nucleinsäure eingegangen ist. Da der Terminator komplementär zu der nächsten Base in der interessierenden Nucleinsäure ist, wird dadurch die Identität der nächsten Base in der interessierenden Nucleinsäure bestimmt.

[0045] In einer anderen Ausführungsform hat nur einer der Terminatoren des Terminator-Gemisches von Schritt (e) eine nachweisbare Markersubstanz. Die Duplex aus Primer und der interessierenden Nucleinsäure wird mit dem Terminator-Gemisch unter Bedingungen in Berührung gebracht, die eine Basenpaarung eines komplementären Terminators mit der zu identifizierenden Nucleotidbase und das Auftreten einer Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion, um den Terminator an dem 3'-Ende des Primers einzubauen, erlauben. Das Nettoergebnis ist, dass der Oligonucleotid-Primer durch einen Terminator verlängert wurde.

[0046] Die Ausgangsduplex aus Primer und der interessierenden Nucleinsäure wird dann mit drei verschiedenen Reagenzien in Berührung gebracht, wobei in jedem der vier parallelen Reaktionsschritte jeweils ein unterschiedlicher der vier Terminatoren markiert ist. Als nächstes werden die Produkte der vier parallelen Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktionen untersucht, um zu bestimmen, welches der Produkte eine nachweisbare Markersubstanz hat. Das Produkt mit einer nachweisbaren Markersubstanz gibt an, welcher Terminator eine Basenpaarung mit der nächsten Base in der interessierenden Nucleinsäure eingegangen ist. Da der Terminator zu der nächsten Base in der interessierenden Nucleinsäure komplementär ist, wird dadurch die Identität der nächsten Base in der interessierenden Nucleinsäure bestimmt.

[0047] Beide Verfahren zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase an einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure markieren den Primer nach der Hybridisierung zwischen dem Primer und der Matrize. Wenn das Matrizen-abhängige Enzym keine Exonucleasefunktion hat, muß das 3'-Ende des Primers basengepaart werden, damit die Markierung durch einen Terminator auftritt.

[0048] Die vorliegende Erfindung schafft auch ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer bestimmten Nucleotidsequenz in einer interessierenden Nucleinsäure, aufweisend:

(a) alternativ:

(i) wenn die interessierende Nucleinsäure doppelsträngig ist, Behandeln einer die Nucleinsäure enthaltenden Probe, um eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen zu erhalten, die eine Matrize aus ungepaarten Nucleotidbasen aufweist, oder

(ii) wenn die interessierende Nucleinsäure einzelsträngig ist, Erhalten einer Probe der Nucleinsäure, um als eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen, die eine Matrize aus ungepaarten Nucleotidbasen aufweist, zu dienen;

(b) Erhalten eines Oligonucleotid-Primers mit einer Nucleotidsequenz, die zur Hybridisierung mit der bestimmten Nucleotidsequenz fähig ist, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, um eine Primer-verlängerbare Duplex zwischen dem Primer und der bestimmten Nucleotidsequenz zu bilden, so dass der hybridisierte Primer an einem 3'-Ende durch eine Nucleinsäure-Matrizen-abhängige Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist;

(c) Immobilisieren des Oligonucleotid-Primers an einem festen Träger, um es zu ermöglichen, dass der immobilisierte Primer mit der Matrizen-Nucleinsäure unter Bildung einer Primer-verlängerbaren Duplex hybridisiert, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, so dass der hybridisierte Primer an dem 3'-Ende durch eine Nucleinsäure-Matrizen-abhängige Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist;

(d) in Berührung Bringen des immobilisierten Oligonucieotid-Primers unter Hybridisierungsbedingungen mit einer Matrizen-Probe mit ungepaarten Basen aus Schritt (a), um auf dem festen Träger eine Primer-verlängerbare Duplex zwischen dem immobilisierten Primer und der Matrizen-Nucleinsäure zu bilden, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, so dass der hybridisierte Primer an dem 3'-Ende durch eine Nucleinsäure-Matrizen-abhängige Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist;

(e) in Berührung Bringen der Primer-verlängerbaren Duplex aus Schritt (d), falls vorhanden, mit einer Rea-

gens-Zusammensetzung, die einen wässerigen Träger und ein Gemisch von vier verschiedenen Terminatoren einer Nucleinsäure-Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion aufweist, wobei mindestens einer der Terminatoren mit einer nachweisbaren Markersubstanz markiert wird, wobei jeder der Terminatoren zur spezifischen Beendigung der Primer-Extensionsreaktion in einer von der Identität einer ungepaarten Nucleotidbase in einer Matrize, die dem 3'-Ende eines Primers, der an die Matrize so hybridisiert ist, dass der hybridisierte Primer an einem 3'-Ende durch die Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist, unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, abhängigen Weise fähig ist, wobei die Primer-verlängerbare Duplex, falls vorhanden, mit der Reagens-Zusammensetzung unter Bedingungen in Berührung gebracht wird, die eine Basenpaarung des in dem Reagens vorhandenen komplementären Terminators mit einer Nucleotidbase in der Matrizen-Nucleinsäure der Duplex, die dem 3'-Ende des hybridisierten Primers der Duplex unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, und das Auftreten der Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion, um den komplementären Terminator an dem 3'-Ende des Primers einzubauen, um einen verlängerten Primer zu bilden, so dass der Primer durch den komplementären Terminator verlängert wird, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, wobei kein derartiger verlängerter Primer gebildet wird, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure nicht vorhanden ist, erlauben;
(f) Entfernen von nicht in den Primer eingebautem markierten Terminator von dem festen Träger; und
(g) Nachweisen der Anwesenheit oder Abwesenheit einer nachweisbaren Markierungssubstanz an dem 3'-Ende des immobilisierten Primers aus Schritt (e) auf dem festen Träger, um die Anwesenheit oder Abwesenheit der bestimmten Nucleotidsequenz in der interessierenden Nucleinsäure zu bestimmen.

[0049] Bei einer Ausführungsform verwendet Schritt (e) vier markierte Terminatoren, wobei jeder Terminator mit einer unterschiedlichen nachweisbaren Markersubstanz markiert ist. Die Duplex aus Primer und der bestimmten Nucleotidsequenz, falls vorhanden, wird mit dem Reagens unter Bedingungen in Berührung gebracht, die eine Basenpaarung eines in dem Reagens anwesenden komplementären Terminators mit der ungepaarten Matrizen-Nucleotidbase stromab von dem 3'-Ende des Primers, wobei der Primer mit der bestimmten Nucleotidsequenz in der Matrize hybridisiert wird, und das Auftreten einer Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion, um den Terminator an dem 3'-Ende des Primers einzubauen, erlauben. Als nächstes werden die Abwesenheit oder Anwesenheit und die Identität einer nachweisbaren Markersubstanz an dem 3'-Ende des Primers bestimmt. Die Anwesenheit oder Abwesenheit der nachweisbaren Markersubstanz gibt an, ob der Primer an die Matrize hybridisiert hat. Wenn eine nachweisbare Markersubstanz abwesend ist, hat der Primer nicht an die Matrize hybridisiert, und daher ist die bestimmte Nucleotidsequenz nicht in der Probe von Nucleinsäuren anwesend. Wenn eine nachweisbare Markersubstanz anwesend ist, hat der Primer an die Matrize hybridisiert, und daher ist die bestimmte Nucleotidsequenz in der Probe von Nucleinsäuren anwesend.

[0050] Bei einer anderen Ausführungsform hat nur einer der Terminatoren eine nachweisbare Markersubstanz. Die Duplex aus Primer und der bestimmten Nucleotidsequenz, falls vorhanden, wird mit dem Reagens unter Bedingungen in Berührung gebracht, die eine Basenpaarung eines in dem Reagens vorhandenen komplementären Terminators mit der ungepaarten Matrizen-Nucleotidbase stromab von dem 3'-Ende des Primers, wobei der Primer mit der bestimmten Nucleotidsequenz in der Matrize hybridisiert wird, und das Auftreten einer Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion erlauben. Das Nettoergebnis ist der Einbau des Terminators an dem 3'-Ende des Primers.

[0051] Die Ausgangsduplex aus Primer und der bestimmten Nucleotidsequenz, falls vorhanden, wird dann mit drei verschiedenen Reagenzien in Berührung gebracht, wobei in jedem der vier parallelen Reaktionsschritte jeweils ein unterschiedlicher der vier Terminatoren markiert wird. Als nächstes werden die Produkte der vier parallelen Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktionen untersucht, um zu bestimmen, welche der Produkte, falls vorhanden, nachweisbare Markersubstanzen haben. Die Abwesenheit oder Anwesenheit und die Identität der nachweisbaren Markersubstanz gibt an, ob der Primer an die Matrize hybridisiert hat. Wenn in keinem der Produkte eine nachweisbare Markersubstanz anwesend ist, hat der Primer nicht an die Matrize hybridisiert, und daher war die bestimme Nucleotidsequenz in der Probe von Nucleinsäuren nicht vorhanden. Wenn eine nachweisbare Markersubstanz in irgendeinem der Produkte vorhanden ist, hat der Primer an die Matrize hybridisiert, und daher war die bestimmte Nucleotidsequenz in der Probe von Nucleinsäuren anwesend.

[0052] Verschiedene Versionen des Verfahrens zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase an einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure und des Verfahrens zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer bestimmten Nucleotidsequenz in einer Probe von Nucleinsäuren sind möglich. Bei der ersten Version ist die Matrize eine Deoxyribonucleinsäure, der Primer ist ein Oligodeoxyribonucleotid, ein Oligoribonucleotid oder ein Copolymer von Deoxyribonucleotiden und Ribonucleotiden, und das Matri-

zen-abhängige Enzym ist eine DNA-Polymerase. Diese Version ergibt ein DNA-Produkt. Bei einer zweiten Version ist die Matrize eine Ribonucleinsäure, der Primer ist ein Oligodeoxyribonucleotid, ein Oligoribonucleotid oder ein Copolymer von Deoxyribonucleotiden und Ribonucleotiden, und das Matrizen-abhängige Enzym ist eine reverse Transcriptase. Diese Version ergibt ein DNA-Produkt. Bei einer dritten Version ist die Matrize eine Deoxyribonucleinsäure, der Primer ist ein Oligoribonucleotid, und das Enzym ist eine RNA-Polymerase. Diese Version ergibt ein RNA-Produkt. Bei einer vierten Version ist die Matrize eine Ribonucleinsäure, der Primer ist ein Oligoribonucleotid, und das Matrizen-abhängige Enzym ist eine RNA-Replicase. Diese Version ergibt ein RNA-Produkt.

[0053] Bevorzugt wird vor der Durchführung der Primer-Extensionsreaktion die Matrize durch die Hinzufügung eines Terminators zu dem 3'-Ende der Matrize mit einer Kappe versehen. Der Terminator ist in der Lage, eine Matrizen-abhängige Primer-Extensionsreaktion zu beenden. Die Matrize wird mit einer Kappe versehen, so dass kein zusätzlicher markierter Terminator mit dem 3'-Ende der Matrize eine Bindung eingehen wird. Die Extensionsreaktion sollte an dem Primer stattfinden, nicht an der Matrize. Eine Dideoxynucleotid kann als ein Terminator verwendet werden, um die Matrize mit einer Kappe zu versehen.

[0054] Eine andere Abwandlung des Verfahrens zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase an einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure ist, den Primer von der interessierenden Nucleinsäure nach der Extensionsreaktion durch Verwendung geeigneter Denaturierungsbedingungen zu trennen. Die Denaturierungsbedingungen können Wärme, Alkali, Formamid, Harnstoff, Glyoxal, Enzyme und Kombinationen davon umfassen. Die Denaturierungsbedingungen können auch eine Behandlung mit 2,0 N NaOH umfassen.

[0055] Die interessierende Nucleinsäure kann nicht-natürliche Nucleotid-Analoge wie Deoxyinosin oder 7-Deaza-2'-deoxyguanosin umfassen. Diese Analogen destabilisieren DNA-Duplexverbindungen und könnten erlauben, dass ein Primer-Annealing und eine Extensionsreaktion in einer doppelsträngigen Probe stattfinden, ohne dass die Stränge vollständig getrennt werden.

[0056] Die Probe von Nucleinsäuren kann von irgendeiner Quelle stammen. Die Probe von Nucleinsäuren kann natürlich oder synthetisch (d. h. enzymatisch in vitro synthetisiert) sein. Die Probe von Nucleinsäuren kann Deoxyribonucleinsäuren, Ribonucleinsäuren oder Copolymere von Deoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure aufweisen. Die interessierende Nucleinsäure kann eine Deoxyribonucleinsäure, eine Ribonucleinsäure oder ein Copolymer von Deoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure sein. Die interessierende Nucleinsäure kann enzymatisch in vivo synthetisiert werden, enzymatisch in vitro synthetisiert werden oder nicht-enzymatisch synthetisiert werden. Die Probe, die die interessierende Nucleinsäure oder die interessierenden Nucleinsäuren enthält, kann genomische DNA von einem Organismus, RNA-Transkripte davon oder aus RNA-Transkripten davon hergestellte cDNA aufweisen. Die Probe, die die interessierende Nucleinsäure oder die interessierenden Nucleinsäuren enthält, kann auch extragenomische DNA von einem Organismus, RNA-Transkripte davon oder aus RNA-Transkripten davon hergestellte cDNA aufweisen. Die interessierende Nucleinsäure oder die interessierenden Nucleinsäuren können auch durch die Polymerasekettenreaktion synthetisiert werden.

[0057] Die Probe kann von irgendeinem Organismus genommen werden. Einige Beispiele für Organismen, auf die das Verfahren der vorliegenden Erfindung anwendbar ist, sind Pflanzen, Mikroorganismen, Viren, Vögel, Wirbeltiere, wirbellose Tiere, Säugetiere, Menschen, Pferde, Hunde, Rinder, Katzen, Schweine oder Schafe.

[0058] Die interessierende Nucleinsäure kann eine oder mehrere Baueinheiten aufweisen, die eine Affinitätstrennung der interessierenden Nucleinsäure von dem nicht eingebauten Reagens und/oder dem Primer erlauben. Die interessierende Nucleinsäure kann Biotin aufweisen, das eine Affinitätstrennung der interessierenden Nucleinsäure von dem nicht eingebauten Reagens und/oder dem Primer über eine Bindung des Biotins an Streptavidin, das an einen festen Träger gebunden ist, erlaubt. Die Sequenz der interessierenden Nucleinsäure kann eine DNA-Sequenz aufweisen, die eine Affinitätstrennung der interessierenden Nucleinsäure von dem nicht eingebauten Reagens und/oder dem Primer über eine Basenpaarung an eine komplementäre Sequenz, die in einer an einen festen Träger gebunden Nucleinsäure vorhanden ist, erlaubt. Die interessierende Nucleinsäure kann mit einer nachweisbaren Markersubstanz markiert werden; diese nachweisbare Markersubstanz kann von irgendeiner nachweisbaren Markersubstanz, die in dem Reagens anwesend ist oder an den Primer gebunden ist, verschieden sein.

[0059] Der Oligonucleotid-Primer kann ein Oligodeoxyribonucleotid, ein Oligoribonucleotid oder ein Copoly-

mer von Deoxyribonucleotiden und Ribonucleotiden sein. Der Oligonucleotid-Primer kann entweder natürlich oder synthetisch sein. Der Oligonucleotid-Primer kann entweder enzymatisch in vivo, enzymatisch in vitro oder nicht-enzymatisch in vitro synthetisiert werden. Der Oligonucleotid-Primer kann mit einer nachweisbaren Markersubstanz markiert werden; diese nachweisbare Markersubstanz kann von irgendeiner nachweisbaren Markersubstanz, die in dem Reagens anwesend ist oder an die interessierende Nucleinsäure gebunden ist, verschieden sein. Außerdem muß der Oligonucleotid-Primer zur Hybridisierung oder zum Annealing mit Nucleotiden, die in der interessierenden Nucleinsäure der zu identifizierenden Nucleotidbase unmittelbar benachbart und stromab von ihr vorhanden sind, in der Lage sein. Ein Weg, die gewünschte Hybridisierung zu erreichen, ist, dass der Matrizen-abhängige Primer im wesentlichen komplementär oder völlig komplementär zu der der zu identifizierenden Base unmittelbar benachbarten, bekannten Basensequenz ist.

[0060] Der Oligonucleotid-Primer kann eine oder mehrere Baueinheiten aufweisen, die eine Affinitätstrennung des Primers von dem nicht eingebauten Reagens und/oder der interessierenden Nucleinsäure erlauben. Der Oligonucleotid-Primer kann Biotin aufweisen, das eine Affinitätstrennung des Primers von dem nicht eingebauten Reagens und/oder der interessierenden Nucleinsäure über eine Bindung des Biotins an Streptavidin, das an einen festen Träger gebunden ist, erlaubt. Die Sequenz des Oligonucleotid-Primers kann eine DNA-Sequenz aufweisen, die eine Affinitätstrennung des Primers von dem nicht eingebauten Reagens und/oder der interessierenden Nucleinsäure über eine Basenpaarung an eine komplementäre Sequenz, die in einer an einen festen Träger gebundenen Nucleinsäure vorhanden ist, erlaubt.

[0061] Die vorliegende Erfindung schafft auch ein Verfahren zur Typisierung einer Probe von Nucleinsäuren, das das Identifizieren der Base oder der Basen, die an jeder von einer oder mehreren spezifischen Positionen vorhanden sind, wobei jede derartige Nucleotidbase unter Verwendung eines der Verfahren zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase an einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure, wie oben dargelegt, identifiziert wird, umfaßt. Jede spezifische Position in der interessierenden Nucleinsäure wird unter Verwendung eines unterschiedlichen Primers bestimmt. Die Identität jeder Nucleotidbase oder der Nucleotidbasen an jeder Position kann individuell bestimmt werden, oder die Identitäten der Nucleotidbasen an verschiedenen Positionen können gleichzeitig bestimmt werden.

[0062] Die vorliegende Erfindung schafft auch ein weiteres Verfahren zur Typisierung einer Probe von Nucleinsäuren, das die Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer oder mehrerer bestimmter Nucleotidsequenzen aufweist, wobei die Anwesenheit oder Abwesenheit jeder derartigen Nucleotidsequenz unter Verwendung eines der Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer bestimmten Nucleotidsequenz in einer Probe von Nucleinsäure, wie oben dargelegt, bestimmt wird.

[0063] Die vorliegende Erfindung schafft auch ein zusätzliches Verfahren zur Typisierung einer Nucleinsäuren enthaltenden Probe. Zuerst wird die Anwesenheit oder Abwesenheit einer oder mehrerer bestimmter Nucleotidsequenzen bestimmt; die Anwesenheit oder Abwesenheit einer jeden derartigen Nucleotidsequenz wird unter Verwendung eines der Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer bestimmten Nucleotidsequenz in einer Probe von Nucleinsäuren, wie oben dargelegt, bestimmt. Zweitens wird die Nucleotidbase oder die Nucleotidbasen, die an jeder von einer oder mehreren spezifischen Positionen vorhanden ist (sind), identifiziert; jede derartige Base wird unter Verwendung eines der Verfahren zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase an einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure, wie oben dargelegt, identifiziert.

[0064] Die vorliegende Erfindung schafft weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung verschiedener Allele in einer Nucleinsäuren enthaltenden Probe, das das Identifizieren der Base oder der Basen, die an jeder von einer oder mehreren spezifischen Positionen anwesend sind, aufweist. Die Identität jeder Nucleotidbase wird durch das Verfahren zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure, wie oben dargelegt, bestimmt.

[0065] Die vorliegende Erfindung schafft auch ein Verfahren zur Bestimmung des Genotyps eines Organismus an einem oder mehreren bestimmten Genorten, das das Erhalten einer genomische DNA enthaltenden Probe von dem Organismus und das Identifizieren der Nucleotidbase oder der Nucleotidbasen, die an jeder von einer oder mehreren spezifischen Positionen in interessierenden Nucleinsäuren vorhanden sind, aufweist. Die Identität jeder derartigen Base wird unter Verwendung eines der Verfahren zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase an einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure, wie oben dargelegt, bestimmt. Die Identität der Nucleotidbasen bestimmt die verschiedenen Allele und bestimmt dadurch den Genotyp des Organismus an einem oder an mehreren bestimmten Genorten.

[0066] Das Kettenterminationsreagens in Kombination mit einem geeigneten Oligonucleotid-Primer und einer DNA-Polymerase mit oder ohne zugehörige 3' zu 5'-Exonucleasefunktion und einer geeigneten Salz- und Cofaktor-Mischung kann unter geeigneten Hybridisierungsbedinungen als ein Kit zum Diagnostizieren oder Typisieren von Nucleinsäuren verwendet werden, wenn geeignete Primer-Trenntechniken verwendet werden. Zur Vereinfachung der Primer-Abtrennung und der Analyse der terminalen Nucleotid-Anfügung verwendet diese Erfindung Oligonucleotide, die auf solche Arten, die Affinitätstrennung sowie Polymerase-Extension erlauben, modifiziert sind. Die 5'-Enden und die inneren Nucleotide synthetischer Oligonucleotide können auf eine Anzahl unterschiedlicher Wege modifiziert werden, um verschiedene Arten der Affinitätstrennung, z. B. Biotinylierung, zu erlauben. Diese Affinitätsreagenzien können mit dem Terminator-Gemisch verwendet werden, um die Analyse eines verlängerten Oligonucleotids (verlängerter Oligonucieotide) auf zwei Arten zu erleichtern:

(1) Wenn eine einzige Affinitätsgruppe an dem Oligonucleotid (den Oligonucleotiden) verwendet wird, kann das Oligonucleotid (die Oligonucleotide) von dem nicht eingebauten Terminatorreagens abgetrennt werden. Dies beseitigt die Notwendigkeit einer physikalischen oder Größen-Trennung.

(2) Wenn mehr als eine Affinitätsgruppe verwendet wird, kann mehr als ein Oligonucleotid von dem Terminatorreagens abgetrennt werden und gleichzeitig analysiert werden. Dies erlaubt die Analyse mehrerer Nucleinsäure-Spezies oder mehr Nucleinsäuresequenzinformation pro Extensionsreaktion.

[0067] Die Affinitätsgruppe(n) braucht (brauchen) nicht auf dem primenden Oligonucleotid zu sein, sondern könnte(n) sich alternativ an der Matrize befinden. So lange der Primer während des Affinitätstrennungsschritts an die Matrize wasserstoffgebunden bleibt, erlaubt dies eine effiziente Trennung des Primers von nicht eingebautem Terminatorreagens. Dies hat auch den zusätzlichen Vorteil, an dem Primer Stellen zur bequemen Anfügung zusätzlicher Baueinheiten freizulassen. Beispielsweise könnte das 5'-Ende des Primers modifiziert werden, indem es an eine geeignete fluoreszierende Gruppe wie Rhodamin gekoppelt wird, was erlaubt, dass die Menge an Primer in dem Primer:Matrize-Komplex nach dem Affinitätstrennschritt leicht quantitativ bestimmt werden kann. Die Mengen an 3'-terminierenden Terminatoren könnten dann zur Gesamtmenge an durch Annealing verbundenem Primer normiert werden.

[0068] Die Oligonucieotid-Primer und die Matrize können irgendeine Länge oder Sequenz haben, können DNA oder RNA oder irgendeine Abwandlung davon sein. Es ist jedoch erforderlich, dass Bedingungen zur Optimierung einer stringenten Hybridisierung der Primer an die interessierenden Zielsequenzen gewählt werden.

[0069] Die Bedingungen für das Auftreten der Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion können teilweise durch die Anwesenheit eines geeigneten Matrizen-abhängigen Enzyms geschaffen werden. Manche der geeigneten Matrizen-abhängigen Enzyme sind DNA-Polymerasen. Die DNA-Polymerase kann von mehreren Arten sein. Die DNA-Polymerase muß jedoch Primer- und Matrizen-abhängig sein. Beispielsweise können E. coli DNA-Polymerase I oder das "Klenow-Fragment" davon, T4 DNA-Polymerase, T7 DNA-Polymerase ("Sequenase"), T. aquaticus DNA-Polymerase, oder eine retrovirale reverse Transcriptase verwendet werden. RNA-Polymerasen wie T3 oder T7 RNA-Polymerase könnten in einigen Protokollen ebenfalls verwendet werden. In Abhängigkeit von der Polymerase müssen unterschiedliche Bedingungen verwendet werden, und für die Hybridisierungs- und Extensions-Reaktionen können unterschiedliche Temperaturbereiche erforderlich sein.

[0070] Die Reagenzien der vorliegenden Erfindung erlauben die Typisierung interessierender Nucleinsäuren durch Erleichterung der Analyse der 3'-terminalen Anfügung von Terminatoren an einen spezifischen Primer oder spezifische Primer unter spezifischen Hybridisierungs- und Polymerasekettenextensions-Bedingungen. Die Verwendung von nur dem Terminator-Gemisch als das Nucleosid-triphosphat-Substrat stellt die Anfügung nur eines Nucleotidrests an das 3'-Ende des Primers in der Polymerasereaktion sicher. Die Verwendung aller vier Terminatoren gleichzeitig sichert Genauigkeit, d. h. die Unterdrückung von Lesefehlern.

[0071] Durch spezifisches Markieren eines oder mehrerer der Terminatoren kann die Sequenz des verlängerten Primers abgeleitet werden. Im Prinzip kann mehr als ein Reaktionsprodukt pro Reaktion analysiert werden wenn mehr als ein Terminator spezifisch markiert wird.

[0072] Durch spezifisches Markieren des Oligonucleotid-Primers (der Oligonucleotid-Primer) oder der Matrize(n) mit einer Baueinheit, die die 3'-Extensionsreaktion nicht beeinträchtigt, aber eine Affinitätstrennung erlaubt, kann das Extensionsprodukt (die Extensionsprodukte) nach der Reaktion von den nicht eingebauten Terminatoren, anderen Bestandteilen der Reagenzien und/oder dem Matrizenstrang abgetrennt werden. Wenn mehr als ein Affinitätsmittel verwendet wird, können mehrere Oligonucleotide pro Extensionsreaktion analysiert werden.

[0073] Im Prinzip erlaubt die Kombination von vier unterschiedlich markierten Terminatoren und vielen Primern oder Matrizen, die mit verschiedenen Gruppen markiert sind, die Typisierung vieler verschiedener Nucleinsäuresequenzen gleichzeitig.

[0074] Die Spezifizität bei dieser diagnostischen Reaktion wird bestimmt durch (1) die Stringenz der Oligonucleotid-Hybridisierung und (2) die Sequenzinformation, die durch die Verlängerung um einen einzigen Rest gewonnen wird.

A. Allgemeine Verfahren

1. Biotinylierung von Oligodeoxynucleotiden

[0075] Oligodeoxynucleotide, die an ihren 5'-Enden mit einer primären Aminogruppe terminiert waren, wurden bei Midland Certified Reagents, Midland, Texas, bestellt. Diese wurden biotinyliert unter Verwendung von Biotin-XX-NHS-ester (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, Kalifornien), einem Derivat von Biotin-N-hydroxysuccinimid. Die verwendeten Reagenzien waren aus dem Clontech-Biotinylierungs-Kit. Typischerweise wurde das Oligonucleotid (9 nanomol) in 100 µl, 0,1 M $NaHCO_3/Na_2CO_3$ (pH 9) gelöst und 25 µl N,N-Dimethylformamid, enthaltend 2,5 mg Biotin-XX-NNS-ester, wurden hinzugefügt. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann über eine 6 ml Sephadex (RTM) G-25-Säule ("DNA-Qualität" – Pharmacia), die mit H_2O äquilibriert war, geführt. DNA enthaltende Eluatfraktionen wurden identifiziert durch Mischen von 4 µl-Teilmengen mit einem gleichen Volumen an Ethidiumbromid (2 µg/ml), und die DNA-induzierte Fluoreszenz wurde mit einem UV-Durchleuchtungsgerät kontrolliert. Unreagierter Ester wurde durch eine UV-Absorption bei 220 nm nachgewiesen. Die DNA enthaltenden Röhrchen wurden gesammelt, in einem Centricon-3 (RTM)-Mikrokonzentrator (Amicon) konzentriert und erneut über Sephadex geführt.

[0076] Die Hemmung der Bindung von [^{3}H]-Biotin an magnetische M-280-Streptavidin-Dynaperlen (Dynabeads (Dynal)) wurde verwendet, um das Ausmaß der Biotinylierung der Oligonucleotide quantitativ zu untersuchen. Eppendorf-Röhrchen und Pipettenspitzen wurden siliconisiert. Eine bekannte Menge (5–10 pmol) an Biotin-markiertem Oligonucleotid in 10 µl 0,1 M NaCl wurde zu Röhrchen hinzugegeben, die 25 µl einer 1:4-Suspension von Perlen in 0,1 M NaCl enthielten. Die Röhrchen wurden eine Stunde lang auf einer Labquake-Schüttelvorrichtung (Labindustries, Inc.) gedreht. Steigende Mengen an [^{3}H]-Biotin (5–35 pmol) in 20 µl 0,1 M NaCl wurden zu den Röhrchen zugegeben, und diese wurden wieder eine Stunde lang gedreht. Die Röhrchen wurden auf einen Dynal MPC-E-Magneten gelegt, um die Perlen von der Suspension zu entfernen, 10 µl Teilmengen des Überstands wurden abgezogen, und die Menge an Radioaktivität in diesen wurde unter Verwendung eines Beckman LS 5000 TD-Flüssigkeits-Scintillationszählers gemessen. Die Zählungen wurden mit jenen von Röhrchen, zu denen kein Oligonucleotid hinzugefügt worden war, verglichen. Alternativ wurde für einige Primer die Biotinylierung kontrolliert durch Größenfraktionierung der Reaktionsprodukte unter Verwendung von analytischer Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Anwesenheit von 8 M Harnstoff.

2. Matrizen-abhängige Primer-Extensions/Terminations-Reaktionen

[0077] Näherungsweise 5 pmol der 5'-biotinylierten Oligodeoxynucleotid-Matrize (siehe oben) wurden mit näherungsweise 3 pmol Primer in 1 × Sequenzierungspuffer (von Sequenase-Kit Version 2,0, US Biochemical Corp.) gemischt 10 µl Endvolumen), das Gemisch wurde bei 65°C 2 Minuten lang inkubiert, dann auf Raumtemperatur abkühlen lassen, um das Annealing von Primer und Matrize zu bewirken. Die Lösung, die das Annealing-Produkt Matrize-Primer enthielt, wurde in zwei 5 µl Portionen aufgeteilt, A und B, wozu das folgende zugegeben wurde: Reaktionen A (zur Normierung der Matrizen-Konzentrationen) – 0,5 µl 100 mM Dithiothreitol jeweils 1 µl von 10 µM dATP, dGTP, ddCTP, 0,5 µl "Mn-Puffer" (von Sequenase-Kit Version 2,0, US Biochemical Corp.), 0,5 µl [^{35}S]-α-thio-dTTP (10 mCi/ml 1180 Ci/mmol) (Dupont-NEN), 1 µl Sequenase (RTM) (Verdünnung 1:8, US Biochemical Corp.); Reaktionen B (zur Matrizen-spezifischen Markierung von 3'-Enden von Primern) – dieselben Zusätze wie bei den Reaktionen A mit der Ausnahme, dass die verwendeten Nucleotide ddCTP, ddGTP, ddTTP, und [^{35}S]-α-thio-ddATP waren.

[0078] Die Reaktionen dauerten 5 Minuten bei 37°C. Kontrollreaktionen unter Weglassung des Primers oder der Sequenase wurden ebenfalls durchgeführt. Teilmengen wurden entfernt und analysiert durch Elektrophorese auf einem 15% Polyacrylamid, 8 M Harnstoff, DNA-Sequenzierungsgel (siehe Maniatis, T., et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Das Gel wurde in 10% Methanol, 10% Essigsäure fixiert, auf Whatman's 3 MM-Papier ausgetrocknet und einem Kodak X-Omat AR-Film ausgesetzt.

[0079] Alternativ wurde zum Zwecke der Analyse der Produkte durch Flüssigkeits-Scintillationszählung die biotinylierte Matrize oder Matrize-Primer vor oder nach der Sequenase-Reaktion an einen Überschuß von M-280-Streptavidin Dynabeads (Dynal) gebunden (hinsichtlich Bindungsbedingungen siehe oben "1. Biotinylierung von Oligodeoxynucleotiden"). Die Perlen wurden dreimal mit 0,1 M NaCl gewaschen, um nicht eingebaute Markierungssubstanz zu entfernen, dann wurde Scintillations-Flüssigkeit zugegeben und die Radioaktivität durch Flüssigkeits-Scintillationszählung gemessen.

3. Erzeugung von Matrizen aus Polymerasekettenreaktions-Produkten

[0080] Polymerasekettenreaktions (polymerase chain reaction PCR)-Reaktionen wurden ausgeführt, wobei der eine oder der andere der die DNA-Zielstrecke flankierenden Amplifikationsprimer wie oben beschrieben biotinyliert war. Diese Primer (2 µmol Endkonzentration) und die Ziel-DNA (bis zu 1 µg) wurden inkubiert mit 2,5 Einheiten Taq-Polymerase (Perkin Elmer/Cetus), 200 µm jeweils von dATP, dCTP, dGTP, und dTTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, und 0,01% Gelatine (Sigma). Die Reaktionsgemische wurden mit Paraffinöl überlagert und 30 Zyklen lang in einem Perkin Elmer/Cetus-Temperaturwechsler inkubiert. Jeder Zyklus bestand aus 1 Minute bei 94°C, 2 Minuten bei 60°C und 3 Minuten bei 72°C. Die Reaktionsprodukte wurden gereinigt durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Ausfällung, dann durch Ethidiumbromid-Färbung nach Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel analysiert. Die Ausbeute an Duplex-PCR-Produkt betrug typischerweise etwa 10 µg.

[0081] Näherungsweise 5 µg dieses PCR-Produkts wurden unter sanfter Bewegung 60 Minuten lang mit 50 µl einer Suspension vorgewaschener M-280 Dynabeads in 0,1 M NaCl inkubiert. Die Perlen mit der gebundenen DNA (näherungsweise 15 pmol) wurden dann 5 Minuten lang bei 25°C mit 0,15 M NaOH inkubiert. Die Perlen wurden einmal mit 0,15 M NaOH gewaschen, um den unbiotinylierten DNA-Strang zu entfernen, dann dreimal mit H_2O gewaschen. Die Perlen wurden erneut in H_2O suspendiert, und der über das Biotin-Streptavidin-Zwischenglied an die Perlen gebundene Strang wurde als eine Matrize für weitere Primer-Extensionsreaktionen verwendet.

B. Beispiele

Beispiel 1

Primer–Oligo 182: $^{5'}$ GCCTTGGCGTTGTAGAA$^{3'}$

Matrizen–Oligos

180 (C)/181(T): $^{3'}$ TCGGGTCGGAACCGCAACATCTT^{C}/TATAGACTA$^{5'}$

[0082] Die Oligonucleotide 180 und 181 wurden mit an ihre 5'-Enden gebundenen primären Aminogruppen synthetisiert. Diese wurden mit Biotin gekoppelt, wie oben beschrieben. Oligonucleotid 182 wurde als ein Primer hybridisiert (einem Annealing unterzogen), und die Extensionsreaktionen "A" und "B" (siehe oben) wurden ausgeführt. Die erwarteten Matrizen-abhängigen 3'-terminalen Verlängerungen des Oligonucleotids 182 waren wie folgt ("*" vor einem Nucleotid bedeutet eine radioaktive Markierung):

Matrize	Reaktion A	Reaktion B
180	–dG–*dT–dA–*dT–ddC	–ddG
181	–dA–*dT–dA–*dT–ddC	–*ddA

[0083] Daher werden in den "A"-Reaktionen beide Matrizen-Oligonucleotide eine radioaktiv markierte Verlängerung des Primers um 5 Nucleotide dirigieren; die Menge an Markierung sollte proportional zur Menge an produktiv geprimter Matrize sein, die in den Reaktionen vorliegt. In den "B"-Reaktionen werden beide Matrizen eine Verlängerung des Primers um ein Nucleotid dirigieren, aber nur für Matrize 181 sollte dies zu einer Markierung des Primers führen. Die "B"-Reaktion ist daher ein Beispiel für Matrizen-dirigierte, Sequenz-spezifische Markierung eines Oligonucleotids über DNA-Polymerase-katalysierte Verlängerung eines produktiven Primer-Matrize-Komplexes.

[0084] Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 15% Polyacrylamid/8 M Harnstoff-Sequenzierungsgel nach Größe fraktioniert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Ergebnisse (**Fig.** 1) zeigen, dass erwartungsgemäß die "A"-Reaktionen eine Markierung und Verlängerung beider Primer ergeben, während die "B"-Reaktion zu einer Markierung führt, die stark einseitig zugunsten von Matrize 181 ist. Feld C in **Fig.** 1 zeigt eine Gelanalyse derselben Reaktionsprodukte wie in Feld B mit der Ausnahme, dass die Reaktionsprodukte

zuerst unter Verwendung von M-280 Straptavidin-Dynabeads gereinigt wurden, wie oben beschrieben.

Beispiel 2

[0085] Das in Beispiel 1 beschriebene Experiment zeigt eine Matrizen-dirigierte Markierung von Oligonucleotid-Primer 182, wobei die Markierung spezifisch ist bezüglich Oligonucleotiden oder anderen Spezies, die auf einem Polyacrylamidgel ähnlich wandern. Um die Matrizen-dirigierte spezifische Markierung von Oligonucleotid 182 im Hinblick auf alle anderen markierten Spezies, unabhängig von der Gelmobilität, allgemeiner zu untersuchen, wurde eine direkte Messung von inkorporierter Radioaktivität durchgeführt. In diesem Experiment wurden beide Reaktionen "A" und "B" durchgeführt, die Reaktionsprodukte wurden unter Verwendung von Dynabeads gereinigt, und die Gesamtradioaktivität in den Teilmengen wurde durch Flüssigkeits-Scintillationszählung gemessen. Diese Vorgehensweise untersucht sowohl den Fehleinbau von Markierungssubstanz in andere Spezies, als auch zusätzlich die Wirksamkeit des Dynabeads-Waschverfahrens im Hinblick auf nicht eingebaute Nucleotide. Als eine praktische Frage wäre es von Interesse, beide Quellen unspezifischer Markierungssubstanz zu minimieren, um ein einfaches, nicht auf Gel basierendes Verfahren zur Untersuchung spezifischer Matrizen-dirigierter Markierung des Primers zu haben. Die Ergebnisse der direkten Zählung der Reaktionsprodukte auf den magnetischen Perlen nach dem Waschen sind wie folgt (alle Ergebnisse ausgedrückt als cpm von ^{35}S):

Reaktion	Matrize 180	Matrize 181
A, vollständig	325.782	441.823
A, keine Polymerase	5.187	5.416
A, kein Primer	4.351	12.386
B, vollständig	5.674	176.291
B, keine Polymerase	2.988	1.419
B, kein Primer	1.889	1.266

[0086] Wie aus diesen Ergebnissen ersichtlich ist, kann eine spezifische Matrizen-dirigierte Markierung des Primers 182 auch mit magnetischen Perlen durch Messen der Gesamtradioaktivität der Reaktionsprodukte nach dem Waschen, um nicht reagierte Nucleotide zu entfernen, bestimmt werden. Der Hintergrund in diesem Experiment aufgrund von unspezifischer Markierungssubstanz von allen anderen Quellen war näherungsweise 3–4% (vergleiche die Matrizen 180 und 181 in der Reaktion "B, vollständig"). Kontrollexperimente ("keine Polymerase" und "kein Primer") zeigten, dass zum Hauptteil der Hintergrund-Markierungssubstanz wahrscheinlich nicht eingebaute Nucleotide, die durch den Wasch-Schritt nicht vollständig entfernt wurden, beitrugen. Die Reaktionen "A, vollständig" zeigten, dass für beide Matrizen produktive Matrize:Primer-Komplexe anwesend waren.

Beispiel 3

[0087] Zwei Amplifikations-Primer, TGL 105 und TGL 106 (**Fig. 2**), wurden verwendet, um eine geklonte Strecke von Rinder-DNA zu amplifizieren, die zwei DNA-Sequenzpolymorphismen enthielt: ein C oder T an Position 114 und ein A oder G an Position 190 (**Fig. 2**). Diese Polymorphismen enthaltenden DNAs wurden molekular geklont und waren auf Plasmiden verfügbar, wie folgt: Plasmid p183, C114 und A190; Plasmid p624, T114 und A190; Plasmid p814, C114 und G190. Vier PCR-Reaktionen mit biotinylierten Primern wurden durchgeführt, um spezifische Stränge dieser Plasmide zur Verwendung als Matrizen zu amplifizieren und zu reinigen:

Primer	Plasmide	Nachweis–Primer
105 biotinyliert 106 unbiotinyliert	p183 und p624	TGL 182
105 unbiotinyliert, 106 biotinyliert	p183 und p814	TGL 166

[0088] Die Duplex-PCR-Produkte wurden an magnetische Mikrokügelchen gebunden, mit NaOH denaturiert, und der biotinylierte Strang wurde wie oben beschrieben gereinigt. Mit biotinyliertem TGL 105 hergestellte Ma-

trizen wurden einer Analyse durch DNA-Sequenzierung mit unbiotinyliertem Primer TGL 106 unterzogen, um die Menge an vorliegender Matrize zu messen. In ähnlicher Weise wurde unter Verwendung von biotinyliertem TGL 106 hergestellte Matrize durch Sequenzierung mit unbiotinyliertem TGL 105 analysiert.

[0089] Näherungsweise gleiche Mengen an Matrize (2 pmol) wurden fünf Minuten lang bei 65°C an die Polymorphismus-Nachweisprimer TGL 182 und TGL 166 (siehe oben und Fig. 2) hybridisiert. Diese Primer bilden mit den Matrizen eine Wasserstoffbindung in einer sequenzspezifischen Weise, so dass ihre 3'-Enden den Nucleotidpositionen 114 bzw. 190 benachbart sind (Fig. 2). An diesen Primer:Matrize-Komplexen wurden Matrizen-dirigierte Primer-Extensionsreaktionen (Reaktion "B"-Bedingungen) in Anwesenheit der vier ddNTPs, von denen eines (ddATP) markiert war, durchgeführt. Die Produkte dieser Extensionsreaktionen wurden durch Elektrophorese auf einem 15% Polyacrylamid/8 M Harnstoff-Gel, gefolgt von Autoradiographie, analysiert (Fig. 3).

Beispiel 4

Primer–Oligo TGL 391: $^{5'}$TGTTTTGCACAAAAGCA$^{3'}$

Primer–Oligo TGL346: $^{5'}$GTTTTGCACAAAAGCAT$^{3'}$

Matrizen–Oligo TGL382: $^{3'}$CACAAAACGTGTTTTCGTAGGA$^{5'}$ –
Biotin: (Streptavidin–Perle)

[0090] Oligonucleotid TGL382 wurde von der Midland Certified Reagent Company, Midland, Texas erworben. Es wurde biotinyliert unter Verwendung von Midland Certified Reagent Company's "Biotin dX"-Reagens (ein von Biotin abgeleitetes Phosphoramdit), das zur Verwendung bei der automatisierten DNA-Synthese in der 5'-terminalen Nucleotidposition geeignet ist. Das biotinylierte Oligonucleotid wurde dann durch Anionenaustausch-NPLC gereinigt. Streptavidin-konjugierte M-280Dynabeads wurden in TNET-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100) gewaschen und erneut in demselben Puffer in einer Konzentration von 7×10^8 Perlen/ml suspendiert. 10–100 pmol biontinyliertes Oligonucleotid TGL382 wurden mit 100 µl der Dynabead-Suspension in TNET 30 Minuten lang bei 20°C inkubiert, um es der Biotin-Baueinheit zu erlauben, an das Streptavidin zu binden. Die Perlen wurden dann dreimal mit 200 µl TNET gewaschen (unter Verwendung eines Magneten, um sie zu immobilisieren) und erneut in 100 µl TNET suspendiert. Für das Annealing wurden 25 µl dieser Suspension der Dynabeads mit dem angefügten Matrizen-Oligonucleotid mit dem Magneten immobilisiert, das TNET abgezogen und 25 µl an 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, die 2 µm der Oligonucleotid-Primer 346 oder 391 enthielten, zugegeben. Die Matrize und jeder Primer wurden dem Annealing unterzogen, indem sie fünf Minuten lang bei 65°C inkubiert wurden, gefolgt von langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur über eine Zeitdauer von 20 Minuten. Die Perlen, welche die gebundenen Matrize-Primer-Komplexe enthielten, wurden zweimal mit 200 µl TNET gewaschen, gefolgt von erneuter Suspension in 25 µl 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl.

[0091] Die folgenden ddNTP-Gemische wurden verwendet:

^{35}S-markierte Dideoxynucleosid-triphosphat-Gemische (markiertes Nucleotid angegeben in der Form von ddN*TP):

ddG–Gemisch:	5 µM ddG*TP	10 µM ddATP	10 µM ddTTP
	10 µM ddCTP		
ddA–Gemisch:	10 µM ddGTP	5 µM ddA*TP	10 µM ddTTP
	10 µM ddCTP		
ddT–Gemisch:	10 µM ddGTP	10 µM ddATP	5 µM ddT*TP
	10 µM ddCTP		
ddC–Gemisch:	10 µM ddGTP	10 µM ddATP	10 µM ddTTP
	5 µM ddC*TP		

[0092] Die ddN*TPs waren jeweils die vier [α-Thio-^{35}S]dideoxynucleosid-triphosphate (erworben von New England Nuclear).

[0093] Für jeden Perlen-gebundenen Matrize-Primer-Komplex wurden vier Extensionsreaktionen ausgeführt, eine Reaktion für jedes der vier ddNTP-Gemische. Die Extensionsreaktionen enthielten die folgenden Bestandteile: 5,0 µl Perlen-Suspension, enthaltend den hybridisierten Matrize-Primer-Komplex, 0,5 µl 100 mM Dithiothreitol, 0,5 µl "Mn^{++}-Lösung") (100 mM $MnCl_2$, 150 mM DL-Isocitrat, pH 7,0; erworben von U.S. Biochemicals, Cleveland, Ohio), 1,0 µl ddG-, ddA-, ddT- oder ddC-Gemisch, 2,0 µl H_2O und 1,0 µl T7-DNA-Polymerase ("Sequenase", Version 2,0, US Biochemicals, 1625 Einheiten/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mg/ml Rinderserumalbumin). Die Reaktionen wurden 15 Minuten lang bei 20°C fortschreiten lassen, dann durch dreimaliges Waschen der magnetisch immobilisierten Perlen mit 500 µl TNET beendet. Die Perlen wurden vor den Nachweis-Untersuchungen erneut in einem Endvolumen von 25 µl TNET suspendiert.

[0094] Der Einbau markierter Dideoxynucleotide durch die Primer-Extensionsreaktion wurde auf zwei verschiedene Arten untersucht: Gelelektrophorese, gefolgt von Autoradiographie, und direkte autoradiographische Analyse markierter DNA.

1. Gel-Elektrophorese, gefolgt von Autoradiographie (nur ^{35}S-markiertes Material). Proben gewaschener, perlengebundener DNA wurden bei 94°C fünf Minuten lang in 10 µl Formamid-Beladungspufter (80% Formamid, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 0,02% Bromphenolblau) erhitzt, um die DNA zu denaturieren und den markierten Primer aus dem Primer:Matrize-Komplex freizusetzen. Die Proben wurden durch Elektrophorese auf 8 oder 12,5% Polyacrylamid/8 M Harnstoff Sequenzierungsgelen (Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid 19:1; 100 mM Tris-HCl, 100 mM Borat, 2 mM EDTA, pH 8,3, fließender Puffer; 60 Watt konstante Leistung) analysiert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder auf Filterpapier ausgetrocknet oder bei –80°C gefroren, um eine Diffusion zu verhindern, mit einer Kunststoff-Abdeckung bedeckt und einem Röntgenfilm ausgesetzt, um die markierte DNA durch Autoradiographie sichtbar zu machen (Fig. 4).
2. Direkte autoradiographische Analyse markierter DNA. Für die Analyse der an die Perlen gebundenen Gesamtradioaktivität wurden 10 µl-Teilmengen der Perlensuspensionen in TNET direkt auf Filterpapier oder Nylonmembranen getupft. Die Filter oder Membranen wurden unter einer Wärmelichtlampe getrocknet, mit einer Kunststoff-Abdeckung bedeckt und einem Röntgenfilm ausgesetzt (Fig. 5).

Beispiel 5

TGL240: $^{5'}$AGATGATGCTTTTGTGCAAAACAC$^{3'}$

TGL239: $^{5'}$TCAATACCTGAGTCCCGACACCCTG$^{3'}$

TGL308: $^{5'}$AGCCTCAGACCGCGTGGTGCCTGGT$^{3'}$

[0095] Oligonucleotid TGL240 wurde mit einer an sein 5'-Ende angefügten primären Aminogruppe synthetisiert und mit Biotin gekoppelt, wie oben beschrieben. TGL240 (biotinyliert) und TGL239 (unbiotinyliert) wurden verwendet, um mittels des Polymerasekettenreaktion-Verfahrens (siehe "A. Allgemeine Verfahren") in Proben genomischer DNA von Säugetieren einen einen bestimmten Genort aufweisenden DNA-Bereich zu amplifizieren. DNAs von zwei verschiedenen Individuen, jeder homozygot für einen bestimmten Satz gekoppelter Sequenzpolymorphismen (das "A"-Allel und das "B"-Allel – siehe Fig. 6), wurden untersucht. Nach der PCR-Reaktion wurden 2–20 pmol Duplex-PCR-DNA mit 100 µl Streptavidin-konjugierten M-280 Dynabeads (7×10^8 Perlen/ml) in TNET-Puffer inkubiert, um den biotinylierten Strang an die Perlen zu binden. Nach der Bindungsbildung wurden die Perlen magnetisch immobilisiert und dreimal mit 200 µl TNET gewaschen, dann erneut in 100 µl TNET suspendiert. Zur Entfernung des nicht biotinylierten Strangs wurden 500 µl 0,15 N NaOH zugegeben und die Suspension 30 Minuten lang bei 20°C inkubiert. Die Perlen wurden dann magnetisch immobilisiert und einmal mit 250 µl 0,15 N NaOH, dreimal mit 500 µl TNET gewaschen und wieder in 100 µl TNET suspendiert.

[0096] Der Nachweisprimer, Oligonucleotid TGL308 (Fig. 6), wurde an die durch PCR-erzeugte, perlengebundene Matrize hybridisiert, wie oben in Beispiel 4 beschrieben. Weitere Wäschen, Extensionsreaktionen und Nachweisuntersuchungen wurden ebenfalls ausgeführt wie in Beispiel 4 beschrieben. Eine Gel-Autoradiographie-Analyse der markierten Primer-Extensionsprodukte ist für die zwei homozygoten Individuen, ESB164 ("AA"-Genotyp) und EA 2014 ("BB"-Genotyp) in Fig. 7 gezeigt. Autoradiographische Analysen der gesamten perlengebundenen Radioaktivität oder der Primer zugeordneten Radioaktivität nach NaOH-Eluierung sind für diese selben Individuen unter Verwendung des Filter-Tüpfelversuchs gezeigt (Fig. 8). Für die Analyse von nur Primer wurden 10 µl 0,4 N NaOH zu 10 µl der Perlensuspension zugegeben. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten wurden die Perlen magnetisch immobilisiert und der Überstand abgezogen und auf eine Nylon-Blottingmembran getupft.

Beispiel 6

[0097] DNA-Proben. Genomische DNA wurde aus kernhaltigen Peripherblutzellen von Menschen oder Pferden, angereichert aus roten Blutzellen durch selektive Lyse, die durch Verdünnen von Blut mit einem dreifachen Volumenüberschuß an ACK-Lysepuffer (0,15 M Ammoniumchlorid, 1 mM; Kaliumbicarbonat, 0,1 mM EDTA) durchgeführt wurde, unter Verwendung des SDS/Proteinase K-Verfahrens isoliert (Maniatis, T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989). Oligonucleotide wurden hergestellt durch Festphasen-Phosphoramidit-Chemie unter Verwendung eines automatisierten DNA-Synthesegeräts Modell 391 von Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA). Im Falle von Primern, die in genetischen Teilchenanalysereaktionen (Genetic Bit Analysis (GBA) reactions) verwendet werden, wurde nach dem Abschluß-Synthesezyklus keine Detritylierung durchgeführt, und das Oligonucleotid wurde in voller Länge unter Verwendung der Oligonucleotid-Reinigungspatrone (Oligonucletid Purification Cartridge (OPC)) von Applied Biosystems, wie vom Hersteller empfohlen, gereinigt. Für die meisten PCR-Reaktionen wurden die Primer direkt durch Austrocknen der Entschützungsreaktion verwendet. Mit 5'-Aminogruppen derivatisierte Oligonucleotide wurden unter Verwendung von Aminolink 2, das von Applied Biosystems erworben wurde, hergestellt und nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet.

[0098] Oligonucleotid-Sequenzen. Die Primer für die erste Amplifikationsrunde von Pferde-Ort JH85 waren Nr. 91:
5' CGTCTGCAGAATCCACTGGCTTCTTGAG 3' und Nr. 92:
5' GCAGGATCCTGGAACTACTCATTTGCCT 3'. Die zweite Amplifikationsrunde des Pferde-Orts wurde unter Verwendung des Satzes von Primern Nr. 239:
5' TCAATACCTGAGTCCCGACACCCTG 3' und Nr. 240:
5' AGGATGATGCTTTTGTGCAAAACAC 3' erreicht. Die Amplifikation von menschlichen HLA-DPA1-Sequenzen (Marsh, S. G. E., Bodmer, J. G. HLA Class II Nucleotide Sequences, 1991. Human Immunol. 31: 207–227) wurde mit den Primern Nr. 467:
5' GCGGACCATGTGTCAACTTAT 3' und Nr. 445:
5' GCCTGAGTGTGGTTGGAACTG 3' erreicht.

[0099] Matrizen-Herstellung. Die Amplifikation genomischer Sequenzen wurde unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt (Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science 239: 487–491). In einem ersten Schritt wurden 100 Nanogramm genomischer DNA in einem Reaktionsgemisch verwendet, das jeden Primer der ersten Runde in einer Konzentration von 2 µM/10 mM Tris, pH 8,3/50 mM KCl/1,5 mM $MgCl_2$/0,1% Gelatine/0,05 Einheiten pro µl Taq-DNA-Polymerase (AmpliTaq, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) enthielt. Die Reaktionen wurden zusammengestellt und bei 94°C 1,5 Minuten lang inkubiert, gefolgt von 30 Zyklen von 94°C/1 Minute, 60°C/2 Minuten, 72°C/3 Minuten. Einzelsträngige DNA wurde in einer zweiten "asymmetrischen" PCR hergestellt, in der die Produkte der ersten Reaktion 1/1000 verdünnt wurden. Einer der Primer wurde bei der Standardkonzentration von 2 µM verwendet, während der andere bei 0,08 µM verwendet wurde. Unter diesen Bedingungen wurden sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Moleküle während der Reaktion synthetisiert.

Festphasen-Immobilisierung von Nucleinsäuren.

[0100] Die Reaktionen wurden in 96-Mulden-Platten (Nunc Nunclon-Platten, Roskilde, Dänemark) durchgeführt. Der GBA-Primer wurde kovalent an die Platte gekoppelt durch Inkubieren von 10 pmol Primer mit einer 5'-Aminogruppe pro Mulde in 50 µl 3 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6, 20 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) über Nacht bei Raumtemperatur. Nach der Kopplung wurde die Platte dreimal mit 10 mM Tris, pH 7,5/150 mM NaCl/0,05% Tween-20 (TNTw) gewaschen.

[0101] Biotinylierte ddNTPs. Biotinylierte ddNTPs wurden gemäß dem U.S. Patent Nr. 5 047 519 synthetisiert.

Hybridisierung, Verlängerung und Nachweis in Mikromulden-Platten.

[0102] Die Hybridisierung einzelsträngiger DNA an kovalent an 96 Mulden-Platten gekoppelte Primer wurde erreicht durch Zugeben eines gleichen Volumens an 3 M NaCl/50 mM EDTA zur zweiten, asymmetrischen PCR-Runde und Inkubieren jeder Mulde mit 20 µl dieses Gemisches bei 55°C für 30 Minuten. Die Platte wurde nachfolgend dreimal mit TNTw gewaschen. Zwanzig (20) µl Polymerase-Extensionsgemisch, enthaltend ddNTPs (jeweils 3 µM von denen eines biotinyliert war/5 mM DTT/7,5 mM Natriumisocitrat/5 mM $MnCl_2$/0,04 Einheiten pro µl modifizierter T7 DNA-Polymerase und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der

Extensionsreaktion wurde die Platte einmal mit TNTw gewaschen. Die Matrizenstränge wurden entfernt durch Inkubieren der Mulden mit 50 µl 0,2 N NaOH für fünf Minuten bei Raumtemperatur, dann Waschen der Mulden mit weiteren 50 µl 0,2 n NaOH. Die Platte wurde dann dreimal mit TNTw gewaschen. Der Einbau von biotinylierten ddNTPs wurde mittels eines Enzymversuchs gemessen. Jede Mulde wurde unter Bewegung 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 20 µl Streptavidin-konjugierter Meerrettichperoxidase (Verdünnung des von BRL, Gaithersburg, MD, erworbenen Produkts 1/1000 in TNTw) inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit TNTw wurden jeder Mulde 100 µl o-Phenylendiamin (OPD, 1 mg/ml in 0,1 M Zitronensäure, pH 4,5) (BRL), das 0,012% H_2O_2 enthielt, zugegeben. Die Menge an gebundenem Enzym wurde durch Photographieren der Platte nach Beendigung der Reaktion oder quantitativ unter Verwendung eines 96-Mulden-Spektrophotometers von Molecular Devices Modell "Vmax" bestimmt.

[0103] Um die allgemeine Gültigkeit des Verfahrens zu demonstrieren, wird die Fähigkeit zur Typisierung von drei verschiedenen Stellen, die an zwei verschiedenen Matrizenmolekülen gelegen sind, gezeigt. In der Mitte von **Fig. 9** bis **Fig. 11** ist der polymorphe Bereich dieser Orte zusammen mit der Sequenz der Primer, die zur Genotypisierung der DNA-Proben verwendet wurden, gezeigt. Der Genotyp der Test-DNA-Proben wurde vorher durch Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese (Pferde-Proben) oder durch allelspezifische Hybridisierung (menschliche Proben) bestimmt.

[0104] Oben und unten in den **Fig. 9** bis **Fig. 11** sind Photographien der nicht radioaktiven Analyse dieser Stellen. Die Analyse des "Plus"-Strangs (der der mRNA für HLA-DPA1 entspricht, aber für den Pferde-Ort JH85 willkürlich gewählt ist) ist an der Oberseite der Figur gezeigt, die Analyse des "Minus"-Strangs ist in der unteren Photographie gezeigt. Bei Verwendung der Aktivität der Meerrettichperoxidase wurden die Genotypisierungs-Daten visuell betrachtet. Weil beide Stränge geeignete Matrizen waren, war es möglich, durch Verwendung von zwei verschiedenen Primern eine Genotypbestätigung zu bekommen. Für den HLA DPA1-Ort wurden zwei Variationsstellen typisiert (**Fig. 9** und **Fig. 10**). Es wurden identische Ergebnisse erhalten. Eine quantitative spektrophotometrische Bestimmung eines getrennten Experiments, das den Pferde-Ort JH85 beinhaltete, ist in **Fig. 12** gezeigt. Das durchschnittliche Verhältnis von Signalen, die mit erwartetem gegenüber unpassendem Baseneinbau erhalten wurden, war 62,2.

C. Ausführungsformen

[0105] Ein Beispiel eines Verfahrens zur Durchführung der vorliegenden Erfindung beinhaltet das Erhalten von Proben von DNA oder RNA von einer passenden Quelle wie Blut, Epithel, Haar oder anderem Gewebe, dann das Amplifizieren in vitro von spezifischen Bereichen der Nucleinsäure unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion, Amplifikation auf Transkriptions-Basis (siehe Kwoh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80; 1173 (1989)), etc.. Die Amplifikation wird erzielt durch Verwendung spezifischer Primer, die den interessierenden Bereich flankieren, wobei einer oder mehrere der Primer dadurch modifiziert sind, dass sie eine angefügte Affinitätsgruppe haben (obwohl bei irgendeiner gegebenen Reaktion nur ein derartiger Primer zugleich modifiziert wird). Eine bevorzugte Modifikation ist die Anfügung von Biotin-Baueinheiten an die 5'-Enden der Primer. Eine Probe (typischerweise 0,5–5 pmol) der amplifizierten DNA wird dann über die angefügte Biotinbaueinheit an dem Amplifikations-Primer an Streptavidin-konjugierte magnetische Mikrokügelchen (z. B. Dynal M-280 "Dynabeads") gebunden. Die DNA wird denaturiert durch Einstellen der die Mikrokügelchen enthaltenden wässerigen Suspension auf einen ausreichend-alkalischen pH, und der über die Biotin-Streptavidin-Verbindung an die Mikrokügelchen gebundene Strang wird durch Waschen unter ähnlich alkalischen Bedingungen von dem komplementären Strang abgetrennt. Um dies zu erzielen werden die Mikrokügelchen zentrifugiert oder durch die Anwendung eines magnetischen Felds immobilisiert. Der an Mikrokügelchen gebundene Strang wird dann bei den verbleibenden Manipulationen als eine Matrize verwendet.

[0106] An den Matrizenstrang, der wie oben beschrieben erzeugt wurde, wird unter Annealing-Bedingungen hoher Stringenz ein spezifisches Primer-Oligonucleotid gebunden, wobei die Sequenz des Primers im Einklang ist mit einer eindeutigen Bindung an eine Stelle auf dem Matrizenstrang, die einem bekannten DNA-Sequenzpolymorphismus unmittelbar benachbart ist. Eine bevorzugte Sequenz und Bindungsart für den Primer stellt sicher, dass der Primer mit der Matrize dergestalt eine Duplex bildet, dass das 3'-terminate Nucleotid des Primers mit dem Matrizen-Nucleotid, das der Stelle des ersten Nucleotids in dem Sequenzpolymorphismus unmittelbar benachbart ist, ein Watson-Crick-Basenpaar bildet, ohne dass die Duplex irgendeine der zu analysierenden polymorphen Sequenzen überlappt. Diese Anordnung bewirkt, dass die über Matrizen-dirigierte, DNA-Polymerase-katalysierte Verlängerung des Primers angefügten Nucleotide durch die polymorphe Nucleotidsequenz in der Matrize zweifelsfrei bestimmt werden.

[0107] Der oben beschriebene Primer:Matrize-Komplex wird unter Bedingungen von Salz, pH und Tempera-

tur, die mit Matrizen-dirigierter DNA-Synthese verträglich sind, mit einer geeigneten DNA-Polymerase und vier verschiedenen kettenterminierenden Nucleotid-Analogen, von denen bekannt ist, dass sie mit den Basen in der Matrize spezifische Basenpaare bilden, in Berührung gebracht. Sehr wahrscheinlich, aber nicht notwendigerweise, basieren die Basen in der Matrize sowie die kettenterminierenden Analoge auf den üblichen Nucleosiden: Adenosin, Cytosin, Guanin oder Inosin, Thymidin oder Uridin. Ein bevorzugter Satz von kettenterminierenden Analogen sind die vier Dideoxynucleosid-triphosphate, ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP, wobei jedes der vier ddNTPs durch Anfügung einer unterschiedlichen fluoreszierenden Indikatorgruppe modifiziert wurde. Diese fluoreszierenden Markierungen hätten die Eigenschaft, spektroskopisch unterscheidbare Emissionsspektren zu haben, und keinesfalls würde die Dideoxynucleosid-triphosphat-Modifizierung das kettenterminierende Analoge für den DNA-Polymerase-katalysierten Einbau an Primer-3'-Enden ungeeignet machen. Das Ergebnis einer DNA-Polymerase-katalysierten Kettenverlängerung in einem derartigen Gemisch mit einem derartigen Primer:Matrize-Komplex ist der quantitative, spezifische und zweifelsfreie Einbau eines fluoreszierenden, kettenterminierenden Analogen an dem 3'-Ende des Primers, wobei das hinzugefügte bestimmte fluoreszierende Nucleotid einzig durch die Sequenz der polymorphen Nucleotide in der Matrize vorgegeben wird.

[0108] Der noch an die magnetischen Mikrokügelchen gebundene, fluoreszierend markierte Primer:Matrize-Komplex wird dann von dem Reaktionsgemisch, das die nicht eingebauten Nucleotide enthält, abgetrennt, beispielsweise durch Waschen der magnetisch immobilisierten Perlen in einem geeigneten Puffer. Außerdem ist es unter manchen Umständen wünschenswert, dann den Primer mit NaOH von dem immobilisierten Matrizenstrang zu eluieren, den eluierten Primer in ein getrenntes Medium oder einen getrennten Behälter zu überführen und nachfolgend die Identität des eingebauten Terminators zu bestimmen. Die Identität der angefügten fluoreszierenden Gruppe wird dann durch Bestrahlen des modifizierten DNA-Strangs mit Licht einer geeigneten Wellenlänge und Intensität, das bevorzugt von einem Laser bereitgestellt wird, und durch spektrophotometrisch Analysieren des erzeugten Emissionsspektrums geprüft. Im allgemeinen werden für ein (diploides) System mit zwei Allelen an irgendeiner gegebenen Stelle in der DNA-Sequenz zehn mögliche kanonische Emissionsspektren erzeugt, die den sechzehn möglichen homozygoten und heterozygoten Paarungen entsprechen. Durch geeignetes Vergleichen der gemessenen Spektren mit dieser Bibliothek kanonischer Spektren ist es möglich, zu identifizieren, welches kettenterminierende Nucleotid (welche kettenterminierenden Nucleotide) an das 3'-Ende des Primers angefügt wurde(n), und dadurch die Art des Sequenzpolymorphismus in der Matrize zu identifizieren. Von Systemen mit multiplen Allelen oder von Allelen, die in einem anderen Verhältnis als 1:1 vorliegen, erzeugte Spektren können ebenfalls entschlüsselt werden durch geeignete mathematische Behandlungen zur Identifizierung und Abschätzung der relativen Verhältnisse jedes beitragenden Nucleotids.

[0109] Alle der obigen Schritte beinhalten Chemie, Manipulationen und Protokolle, die automatisiert wurden oder einer Automatisierung zugänglich sind. Daher sollte der Einsatz der bevorzugten Art zur Durchführung dieser Erfindung beim Betrieb eines geeignet programmierten Roboterarbeitsplatzes zu signifikanten Kosteneinsparungen und Steigerung der Produktivität für praktisch jedes diagnostische Verfahren, das vom Nachweis spezifischer Nucleotidsequenzen oder Sequenzunterschieden in Nucleinsäuren, die von biologischen Proben stammen, abhängt, führen.

[0110] Mehrere Merkmale des oben beschriebenen Verfahrens wurden verbessert und stellen eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar. Insbesondere ist es möglich, eine bequemere feste Phase vorzugeben. Magnetische Mikrokügelchen müssen sorgfältig gehandhabt werden, um sie wirkungsvoll zu waschen und erneut zu suspendieren. Es ist daher schwierig, sich hochvolumige automatisierte Untersuchungen, die diese Perlen verwenden, vorzustellen. Außerdem sind sie tief gefärbt und nicht geeignet für kalorimetrische Untersuchungen oder Fluoreszenz-Untersuchungen.

[0111] Die Methodik der Erfindung wurde angepaßt, um den Gebrauch von Standard-, Polystyrol-, 96-Mulden-Mikroplatten zu erlauben. Diese haben den Vorteil, dass sie in klinischen Laboratorien und Forschungslaboratorien in breitem Umfang verwendet werden. Es gibt eine große Anzahl von Flüssigkeits-Handhabungssystemen, einschließlich automatisierten Systemen, die an dieses Format angepaßt sind. Sie sind geeignet für optische Signalnachweisverfahren, und es gibt automatisierte Plattenlesegeräte für verschiedene Arten des Lichtnachweises.

[0112] Die Matrize kommt immer von der interessierenden Nucleinsäure-Probe. Diese Nucleinsäuren können von einer Probe sein, von der vermutet wird, dass sie ein infektiöses Mittel enthält, einer Probe von einem Individuum, dessen Genotyp zu bestimmen ist, einer Probe von einem Patienten, von dem vermutet wird, dass er Krebs hat, etc.. Wenn der immobilisierte Partner des zu verlängernden Hybrid-Komplexes die Matrize ist, müßte jede Nucleinsäure-Probe in einer solchen Weise behandelt werden, dass eine Immobilisierung möglich gemacht wird. Andererseits ist der Primer für eine gegebene, zu ergründende Nucleinsäure-Position immer

derselbe. Daher wurden Verfahren entworfen, die die Bindung des Primers an die Mikroplatten und die Hybridisierung von einzelsträngigen Matrizenmolekülen an den plattengebundenen Primer erlauben. Dies schafft das zusätzliche Merkmal, in der Lage zu sein, von einzelsträngigen Matrizen Gebrauch zu machen, die auf viele verschiedene Arten erzeugt werden, einschließlich direkter Analyse von RNA.

[0113] Radioaktive Verfahren sind unbequem und erzeugen Abfall, der schwierig zu entsorgen ist. Aus diesem Grund wurden die meisten kommerziellen Biochemie-Nachweissysteme auf nicht-radioaktive Verfahren umgestellt. Durch Verwendung von ddNTPs, die mit Biotin markiert sind, kann das Verfahren der Erfindung nicht-radioaktiv durchgeführt werden, wobei eine Vielfalt von Nachweissystemen einschließlich kolorimetrischer Enzymuntersuchungen verwendet wird.

[0114] Qualitätskontrolle ist ein wichtiges Thema für Tests, die dazu gedacht sind, im klinischen Rahmen verwendet zu werden. Weil das Verfahren der Erfindung die Nucleinsäuresequenz selbst, an doppelsträngigen Molekülen, ergründet, gibt es eine Möglichkeit, durch unabhängiges Ergründen beider Stränge komplementäre genetische Information herzuleiten. Die Anmelder haben gezeigt, dass dieser Weg bei Verwendung genetischer Varianten sowohl vom Pferd als auch vom Menschen durchführbar ist.

[0115] Bei dem vorher beschriebenen Verfahren wurde die Matrize durch PCR unter Verwendung derivatisierter Primer hergestellt, um eine Immobilisierung der Matrize auf der festen Phase zu erlauben. Die Derivatisierung der Matrize ist nicht länger notwendig, wenn der Primer immobilisiert wird. Vielmehr ist es durch Verwendung ungleicher Konzentrationen von PCR-Primern in einer ansonsten standardmäßigen PCR möglich, einen Überschuß des einen einzelsträngigen Moleküls oder des anderen zu erzeugen, in Abhängigkeit davon, welcher Primer im Überschuß vorliegt. Diese dienen als günstige Matrizen für die Hybridisierung an plattengebundene Primermoleküle.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase an einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure, aufweisend:
(a) alternativ:
(i) wenn die interessierende Nucleinsäure doppelsträngig ist, Behandeln einer die Nucleinsäure enthaltenden Probe, um eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen zu erhalten, die eine Matrize aus ungepaarten, sich über die spezifische Position erstreckenden Nucleotidbasen aufweist, oder
(ii) wenn die interessierende Nucleinsäure einzelsträngig ist, Erhalten einer Probe der Nucleinsäure, um als eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen zu dienen, die eine Matrize aus ungepaarten, sich über die spezifische Position erstreckenden Nucleotidbasen aufweist;
(b) Erhalten eines Oligonucleotid-Primers mit einer Nucleotidsequenz, die zur Hybridisierung mit der Matrizen-Nucleinsäure fähig ist, um eine Duplex zu bilden, in der die zu identifizierende Nucleotidbase dem 3'-Ende des Primers unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist;
(c) Immobilisieren des Oligonucleotid-Primers auf einem festen Träger, um es dem immobiliserten Primer zu ermöglichen, mit der Matrizen-Nucleinsäure unter Bildung einer Duplex, in der die zu identifizierende Nucleotidbase dem 3'-Ende des Primers unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, zu hybridisieren;
(d) in Berührung Bringen des immobiliserten Oligonucleotid-Primers unter Hybridisierungsbedingungen mit der Matrizen-Probe mit ungepaarten Basen aus Schritt (a), um auf dem festen Träger eine Duplex zwischen dem immobilisierten Primer und der Matrizen-Nucleinsäure zu bilden, worin die zu identifizierende Nucleotidbase dem 3'-Ende des Primers in der Duplex unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist;
(e) in Berührung Bringen der Duplex aus Schritt (d) mit einer Reagens-Zusammensetzung, die einen wässerigen Träger und ein Gemisch von vier verschiedenen Terminatoren einer Nucleinsäure-Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion aufweist, wobei jeder der Terminatoren zur spezifischen Beendigung der Extensionsreaktion in einer streng von der Identität der ungepaarten Nucleotidbase in der Matrize, die dem 3'-Ende des Primers unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, abhängigen Weise fähig ist, wobei einer der Terminatoren zu der zu identifizierenden Nucleotidbase komplementär ist und mindestens einer der Terminatoren mit einer nachweisbaren Markersubstanz markiert ist, unter Bedingungen, die eine Basenpaarung des in dem Reagens vorhandenen komplementären Terminators mit der zu identifizierenden Nucleotidbase und das Auftreten einer Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion, um den komplementären Terminator am 3'-Ende des Primers unter Bildung eines verlängerten Primers dergestalt einzubauen, dass der Primer durch den komplementären Terminator verlängert wird, erlauben;
(f) Entfernen von nicht in den Primer eingebautem markierten Terminator von dem festen Träger; und
(g) Identifizieren irgendeiner an dem 3'-Ende des immobilisierten verlängerten Primers aus Schritt (e) vorhandenen nachweisbaren Markersubstanz auf dem festen Träger, um die Identität der zu identifizierenden Nucle-

otidbase zu bestimmen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem jeder der vier Terminatoren mit einer nachweismäßig verschiedenen nachweisbaren Markersubstanz markiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der Oligonucleotid-Primer an einem von einer Mehrzahl getrennter Testplätze auf dem festen Träger immobilisiert wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Schritte (c) bis (g) viermal mit demselben Oligonucleotid-Primer aus Schritt (b) und mit derselben Matrizen-Probe mit ungepaarten Basen aus Schritt (a) an vier getrennten Testplätzen auf dem festen Träger wiederholt werden, wobei in Schritt (e) an jedem der vier Testplätze eine entsprechende der vier verschiedenen Reagens-Zusammensetzungen verwendet wird, wobei in jeder der vier Reagens-Zusammensetzungen nur einer der Terminatoren mit einer nachweisbaren Markersubstanz markiert ist, wobei ein unterschiedlicher der vier Terminatoren in jeder der vier verschiedenen Reagens-Zusammensetzungen markiert ist, so dass das Identifizieren einer am 3'-Ende des immobilisierten verlängerten Primers von Schritt (e) vorhandenen nachweisbaren Markersubstanz an einem der vier Testplätze in Schritt (g) die Identität der zu identifizierenden Nucleotidbase bestimmt.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem in dem Reagens von Schritt (e) die Terminatoren ein Nucleotid oder ein Nucleotid-Analog aufweisen.

6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem die Terminatoren ein Dideoxynucleotid oder ein Arabinosid-triphosphat aufweisen.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem die Terminatoren eines oder mehrere der Triphosphate ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP aufweisen.

8. Verfahren zur Typisierung einer Nucleinsäuren enthaltenden Probe, aufweisend das Identifizieren der Nucleotidbase oder der Nucleotidbasen, die an jeder von einer oder von mehreren spezifischen Positionen vorhanden ist (sind), wobei jede derartige Nucleotidbase unter Verwendung eines Verfahrens, wie es in einem der Ansprüche 1 bis 7 beansprucht ist, identifiziert wird, und wobei jede derartige spezifische Position unter Verwendung eines unterschiedlichen Primers bestimmt wird, und bei dem die Identität jeder Nucleotidbase oder der Nucleotidbasen an jeder Position individuell bestimmt wird oder bei dem die Identitäten der Nucleotidbasen an verschiedenen Positionen gleichzeitig bestimmt werden.

9. Verfahren zur Identifizierung verschiedener Allele in einer Nucleinsäuren enthaltenden Probe, aufweisend das Identifizieren der Nucleotidbase oder der Nucleotidbasen, die an jeder von einer oder mehreren spezifischen Positionen vorhanden ist (sind), wobei jede derartige Nucleotidbase nach einem Verfahren, wie es in einem der Ansprüche 1 bis 7 beansprucht ist, identifiziert wird.

10. Verfahren zur Bestimmung des Genotyps eines Organismus an einem oder mehreren bestimmten Genorten, aufweisend:
(a) Erhalten einer genomische DNA enthaltenden Probe von dem Organismus; und
(b) Identifizieren der Nucleotidbase oder der Nucleotidbasen, die an jeder von einer oder mehreren spezifischen Positionen in interessierenden Nucleinsäuren vorhanden ist (sind), wobei eine derartige Base oder jede derartige Base unter Verwendung eines Verfahrens, wie es in einem der Ansprüche 1 bis 7 beansprucht ist, identifiziert wird, und dadurch Identifizieren von verschiedenen Allelen, und dadurch wiederum Bestimmen des Genotyps des Organismus an einem bestimmten Genort oder mehreren bestimmten Genorten.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem vor der Primer-Extensionsreaktion in Schritt (e) die Matrize an ihrem 3'-Ende durch die Hinzufügung eines Terminators zu dem 3'-Ende der Matrize mit einer Kappe versehen wurde, wobei der Terminator zur Beendigung einer Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion fähig ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem die Probe genomische DNA von einem Organismus, wozu eine Pflanze, ein Mikroorganismus, ein Virus, ein Vogel, ein Wirbeltier oder ein wirbelloses Tier, ein Säugetier, ein Mensch, ein Pferd, ein Hund, ein Rind, eine Katze, ein Schwein oder ein Schaf gehören, aufweist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem der Primer zu der bekannten Basensequenz, die

der zu identifizierenden Base unmittelbar benachbart ist, komplementär ist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem der Primer unter Verwendung passender Denaturierungsbedingungen, wozu Wärme, Alkali, Formamid, Harnstoff, Glyoxal, Enzyme oder Kombinationen davon gehören, nach der Primer-Extensionsreaktion in Schritt (c) von der interessierenden Nucleinsäure abgetrennt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die mit nachweisbaren Markersubstanzen markierten Terminatoren mit nachweisbaren Markersubstanzen, die nicht radioaktiv sind, markiert werden.

16. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem der Schritt (g) des Identifizierens irgendeiner nachweisbaren Markersubstanz an dem 3'-Ende des immobilisierten verlängerten Primers durch visuelle oder optische Mittel ausgeführt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, bei dem der feste Träger für ein Nachweisverfahren eines optischen Signals geeignet ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, bei dem der feste Träger für einen optischen Signalnachweis unter Verwendung eines automatischen Plattenlesegeräts geeignet ist.

19. Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer bestimmten Nucleotidsequenz in einer interessierenden Nucleinsäure, aufweisend:
(a) alternativ:
(i) wenn die interessierende Nucleinsäure doppelsträngig ist, Behandeln einer die Nucleinsäure enthaltenden Probe, um eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen zu erhalten, die eine Matrize aus ungepaarten Nucleotidbasen aufweist, oder
(ii) wenn die interessierende Nucleinsäure einzelsträngig ist, Erhalten einer Probe der Nucleinsäure, um als eine Matrizen-Nucleinsäure-Probe mit ungepaarten Basen, die eine Matrize aus ungepaarten Nucleotidbasen aufweist, zu dienen;
(b) Erhalten eines Oligonucleotid-Primers mit einer Nucleotidsequenz, die zur Hybridisierung mit der bestimmten Nucleotidsequenz fähig ist, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, um eine Primer-verlängerbare Duplex zwischen dem Primer und der bestimmten Nucleotidsequenz zu bilden, so dass der hybridisierte Primer an einem 3'-Ende durch eine Nucleinsäure-Matrizen-abhängige Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist;
(c) Immobilisieren des Oligonucleotid-Primers an einem festen Träger, um es zu ermöglichen, dass der immobilisierte Primer mit der Matrizen-Nucleinsäure unter Bildung einer Primer-verlängerbaren Duplex hybridisiert, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, so dass der hybridisierte Primer an dem 3'-Ende durch eine Nucleinsäure-Matrizen-abhängige Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist;
(d) in Berührung Bringen des immobiliserten Oligonucleotid-Primers unter Hybridisierungsbedingungen mit einer Matrizen-Probe mit ungepaarten Basen aus Schritt (a), um auf dem festen Träger eine Primer-verlängerbare Duplex zwischen dem immobilisierten Primer und der Matrizen-Nucleinsäure zu bilden, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, so dass der hybridisierte Primer an dem 3'-Ende durch eine Nucleinsäure-Matrizen-abhängige Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist;
(e) in Berührung Bringen der Primer-verlängerbaren Duplex aus Schritt (d), falls vorhanden, mit einer Reagens-Zusammensetzung, die einen wässerigen Träger und ein Gemisch von vier verschiedenen Terminatoren einer Nucleinsäure-Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion aufweist, wobei mindestens einer der Terminatoren mit einer nachweisbaren Markersubstanz markiert wird, wobei jeder der Terminatoren zur spezifischen Beendigung der Primer-Extensionsreaktion in einer von der Identität einer ungepaarten Nucleotidbase in einer Matrize, die dem 3'-Ende eines Primers, der an die Matrize so hybridisiert ist, dass der hybridisierte Primer an einem 3'-Ende durch die Primer-Extensionsreaktion verlängerbar ist, unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, abhängigen Weise fähig ist, wobei die Primer-verlängerbare Duplex, falls vorhanden, mit der Reagens-Zusammensetzung unter Bedingungen in Berührung gebracht wird, die eine Basenpaarung des in dem Reagens vorhandenen komplementären Terminators mit einer Nucleotidbase in der Matrizen-Nucleinsäure der Duplex, die dem 3'-Ende des hybridisierten Primers der Duplex unmittelbar benachbart und stromab von ihm ist, und das Auftreten der Matrizen-abhängigen Primer-Extensionsreaktion, um den komplementären Terminator an dem 3'-Ende des Primers einzubauen, um einen verlängerten Primer zu bilden, so dass der Primer durch den komplementären Terminator verlängert wird, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure vorhanden ist, wobei kein derartiger verlängerter Primer gebildet wird, wenn die bestimmte Nucleotidsequenz in der Matrizen-Nucleinsäure nicht vorhanden ist, erlauben;

(f) Entfernen von nicht in den Primer eingebautem markiertem Terminator von dem festen Träger; und
(g) Nachweisen der Anwesenheit oder Abwesenheit einer nachweisbaren Markierungssubstanz an dem 3'-Ende des immobilisierten Primers aus Schritt (e) auf dem festen Träger, um die Anwesenheit oder Abwesenheit der bestimmten Nucleotidsequenz in der interessierenden Nucleinsäure zu bestimmen.

20. Verfahren zur Typisierung einer Nucleinsäuren enthaltenden Probe, aufweisend:
(a) Bestimmen der Anwesenheit oder Abwesenheit einer oder mehrerer bestimmter Nucleotidsequenzen, wobei die Anwesenheit oder Abwesenheit jeder derartigen Nucleotidsequenz durch ein Verfahren, wie es in Anspruch 19 beansprucht wird, bestimmt wird; und gewünschtenfalls
(b) Identifizieren der Nucleotidbase oder der Nucleotidbasen, die an jeder von einer oder mehreren spezifischen Positionen vorhanden ist (sind), wobei jede derartige Nucleotidbase unter Verwendung eines Verfahrens, wie es in einem der Ansprüche 1 bis 18 beansprucht wird, identifiziert wird, und wobei jede derartige spezifische Position unter Verwendung eines unterschiedlichen Primers bestimmt wird.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

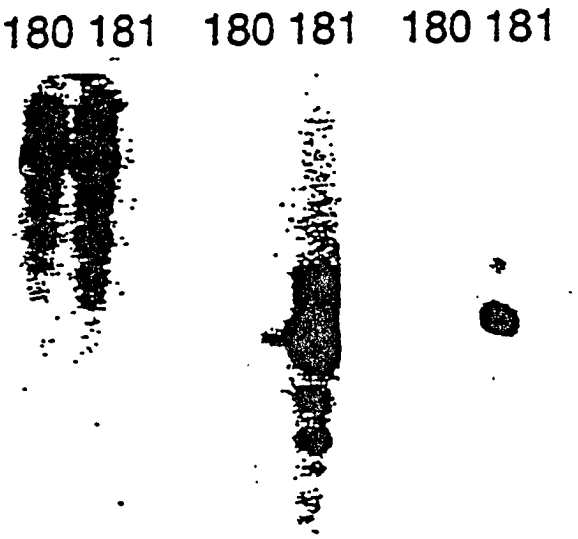


FIG. 1A FIG. 1B FIG. 1C

I. Amplificationsprimer

TGL 105: 5'-TTCTTCTTGCATCTATGTTCG-3'

TGL 106: 5'-TTAAGCACCACCACAGGTCCT-3'

II. Polymorphismus-Nachweisprimer

TGL 182: 5'-GCCTTGGCGTTGTAGAA-3'

TGL 166: 5'-AGAGAAACAATTTCAAG-3'

III. Zielsequenz

5' ...TTTCTTCTTG CATCTATGTT CGTTTTTTCT ATTGCTACAA 40
TGL 105 ----->

ATGCCTATGC ACGGCCTGAC TTCTGCCTAG AGCCTCCATA 80

TACGGGTCCC TGCAAGGCCA GAATTATCAG ATA^{C}/TTTCTAC 120

AACGCCAAGG CTGGGCTCTG CCAGACCTTT GTATATGGTG 160
<----- TGL 182

GCTGCAGAGC TAAGAGAAAC AATTTCAAG^{A}/G GCGCAGAGGA 200
TGL 166 ----->

CTGCATGAGG ACCTGTGGTG GTGCTTAAGG GCCCCGGGAA..3'240
<----- TGL 106

IV. Polymorphismen

Plasmid	Nucleotid 114	Nucleotid 190
p183	C	A
p624	T	A
p814	C	G

FIGUR 2

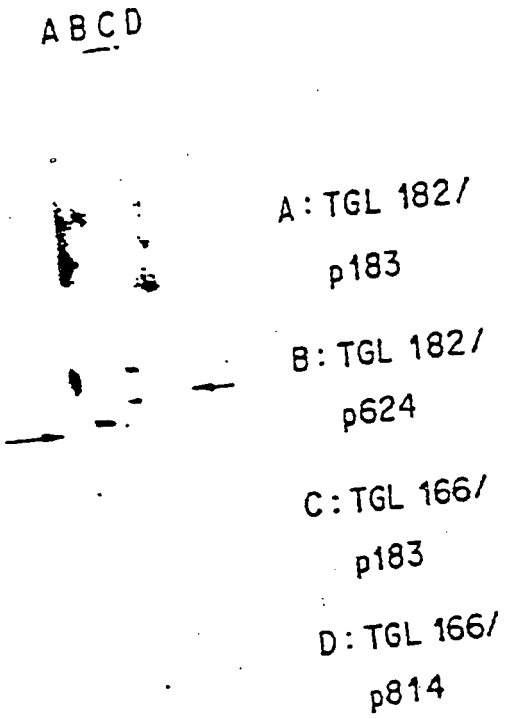


FIG. 3

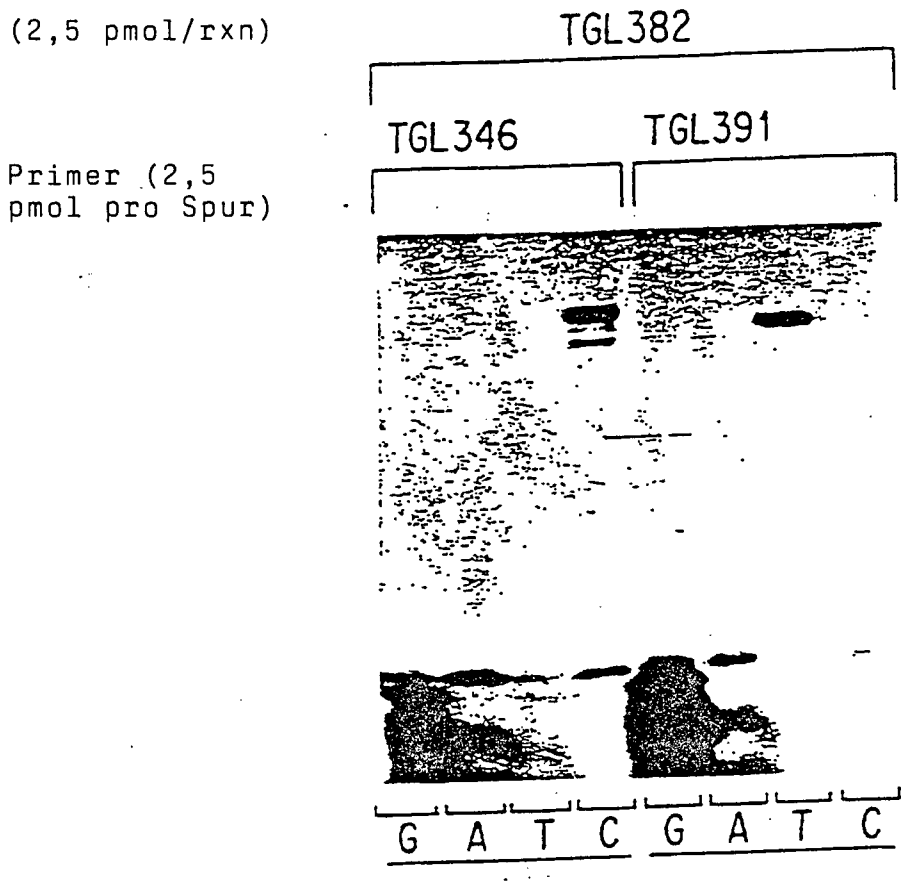

Matrize
(2,5 pmol/rxn)
TGL382
TGL346
TGL391
Primer (2,5 pmol pro Spur)
G A T C G A T C
markiertes ddNTP

FIG. 4

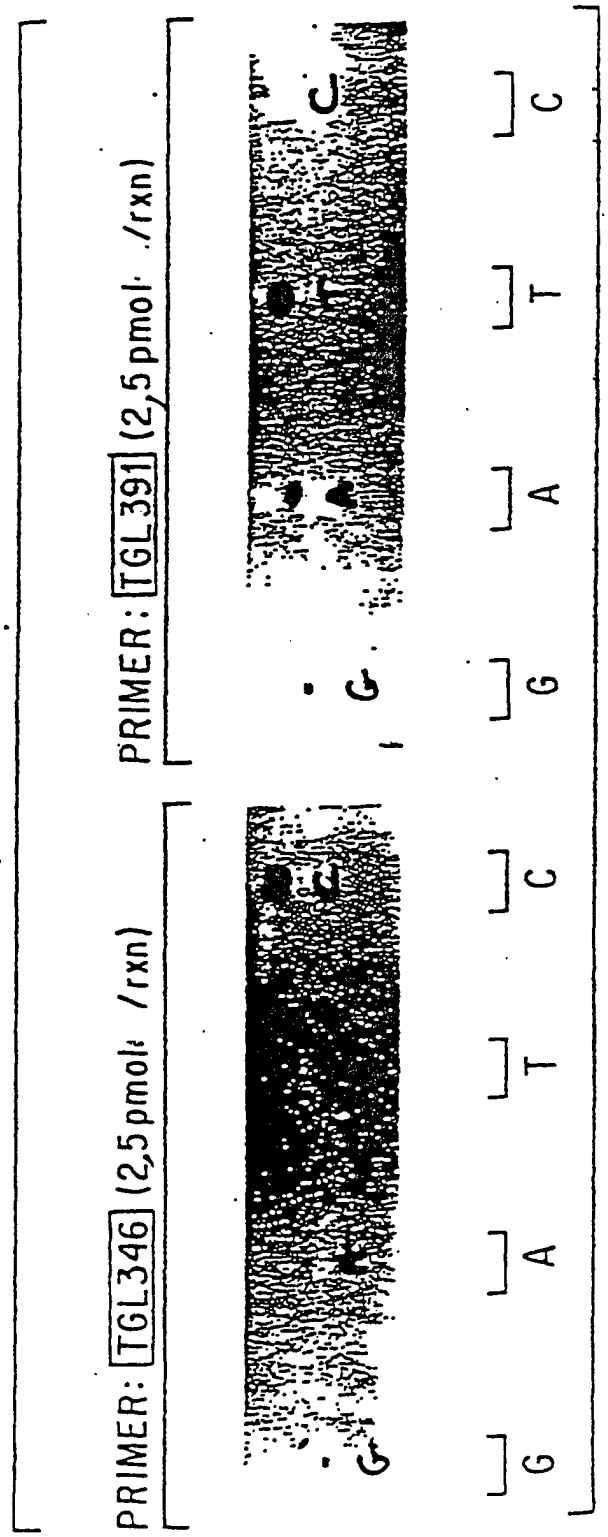
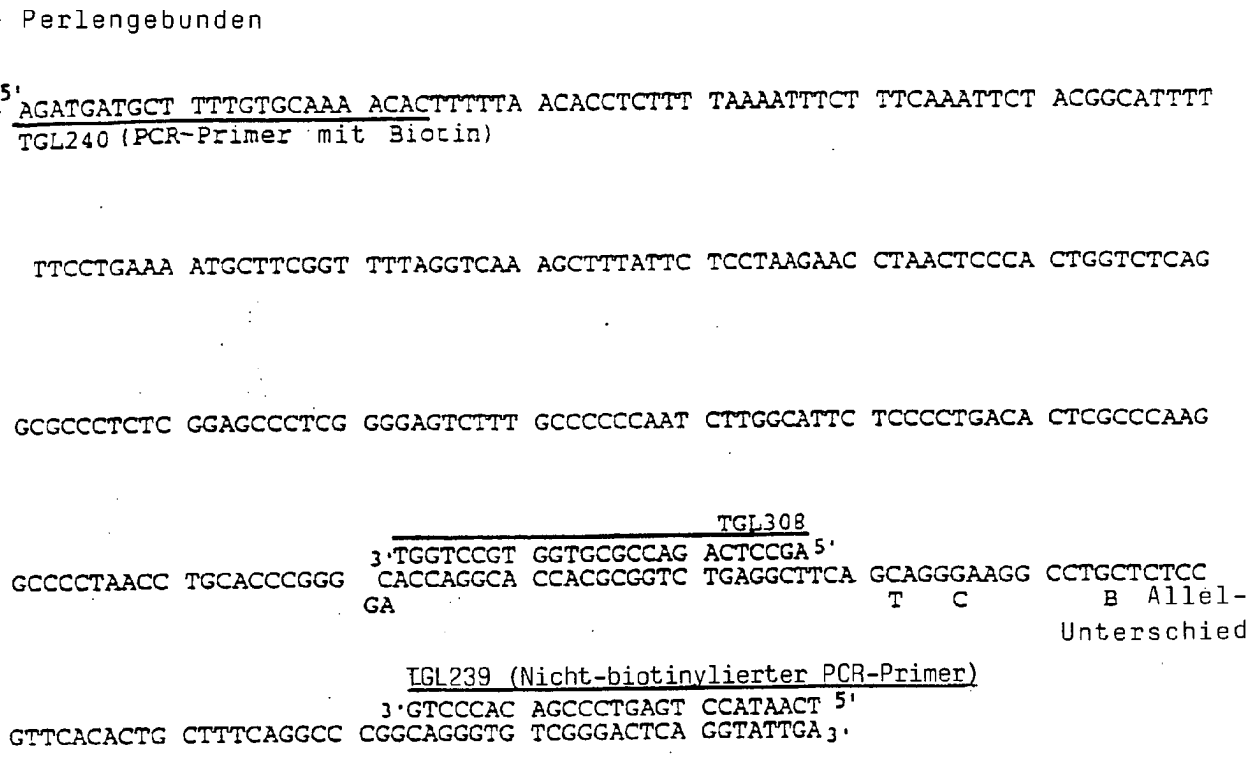

Matrize: TGL382 (2,5 pmol/rxn)
PRIMER: TGL346 (2,5 pmol /rxn)
PRIMER: TGL391 (2,5 pmol /rxn)
G A T C G A T C
markiertes ddNTP

FIG. 5


Perlengebunden
5' AGATGATGCT TTTGTGCAAA ACACTTTTTA ACACCTCTTT TAAAATTTCT TTCAAATTCT ACGGCATTTT
TGL240 (PCR-Primer mit Biotin)
TTCCTGAAA ATGCTTCGGT TTTAGGTCAA AGCTTTATTC TCCTAAGAAC CTAACTCCCA CTGGTCTCAG
GCGCCCTCTC GGAGCCCTCG GGGAGTCTTT GCCCCCCAAT CTTGGCATTC TCCCCTGACA CTCGCCCAAG
TGL308
3'TGGTCCGT GGTGCGCCAG ACTCCGA 5'
GCCCCTAACC TGCACCCGGG CACCAGGCA CCACGCGGTC TGAGGCTTCA GCAGGGAAGG CCTGCTCTCC
GA T C B Allel-
Unterschied
TGL239 (Nicht-biotinylierter PCR-Primer)
3'GTCCCAC AGCCCTGAGT CCATAACT 5'
GTTCACACTG CTTTCAGGCC CGGCAGGGTG TCGGGACTCA GGTATTGA 3'

FIGUR! 6

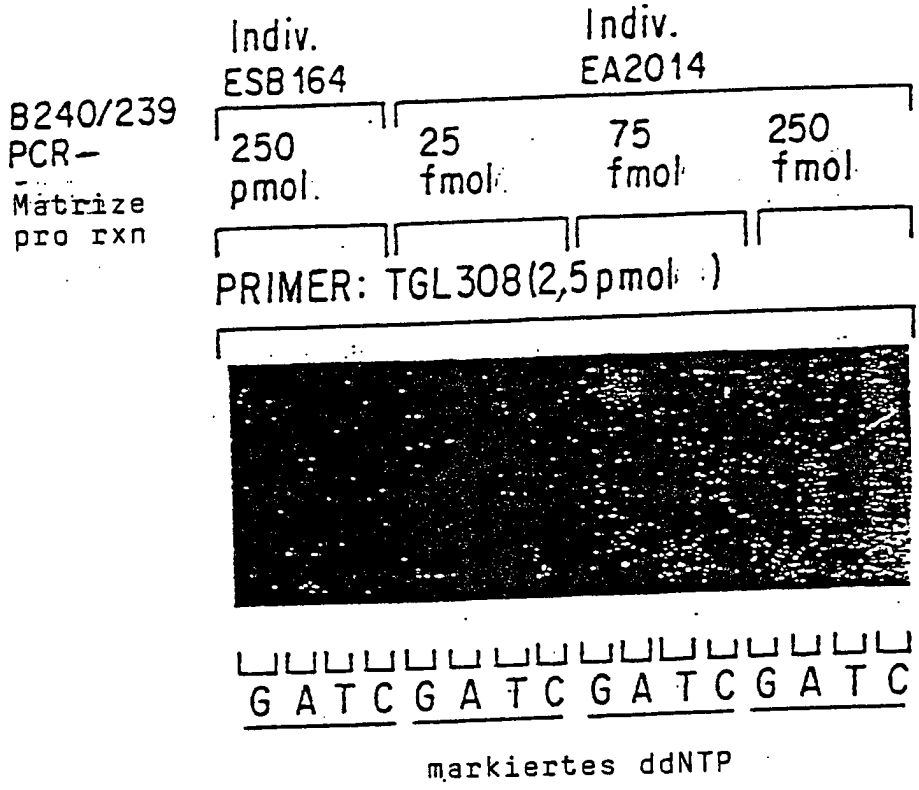

Indiv.
ESB164
Indiv.
EA2014
B240/239
PCR–
Matrize
pro rxn
250
pmol
25
fmol
75
fmol
250
fmol
PRIMER: TGL308 (2,5 pmol)
G A T C G A T C G A T C G A T C
markiertes ddNTP

FIG. 7

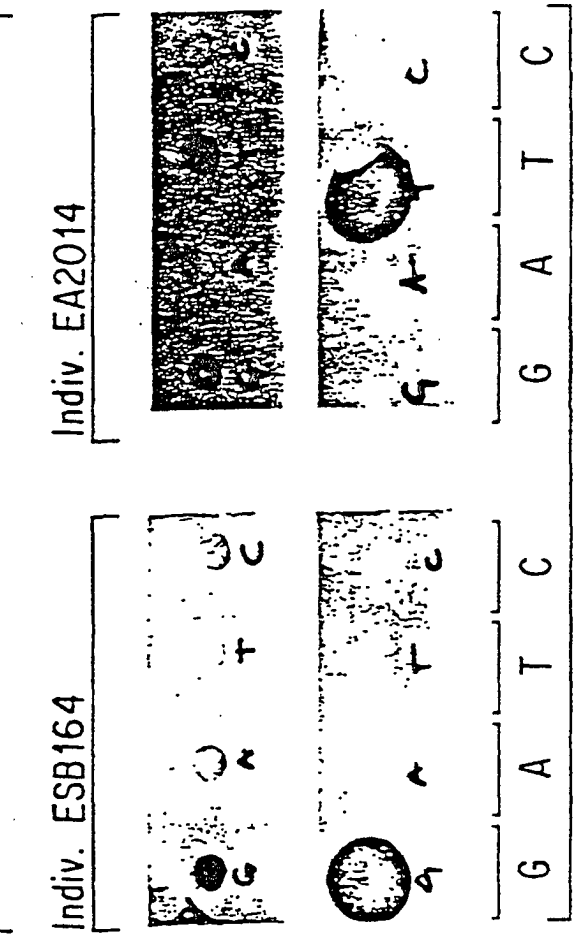

PRIMER: TGL308(2,5 pmol /rxn)
B240/239
PCR-Matrize
(75 fmoles/rxn)
Indiv. ESB164
Indiv. EA2014
Magnetische Perlen
NaOH-Eluat
G A T C
G A T C
markiertes ddNTP

FIG. 8

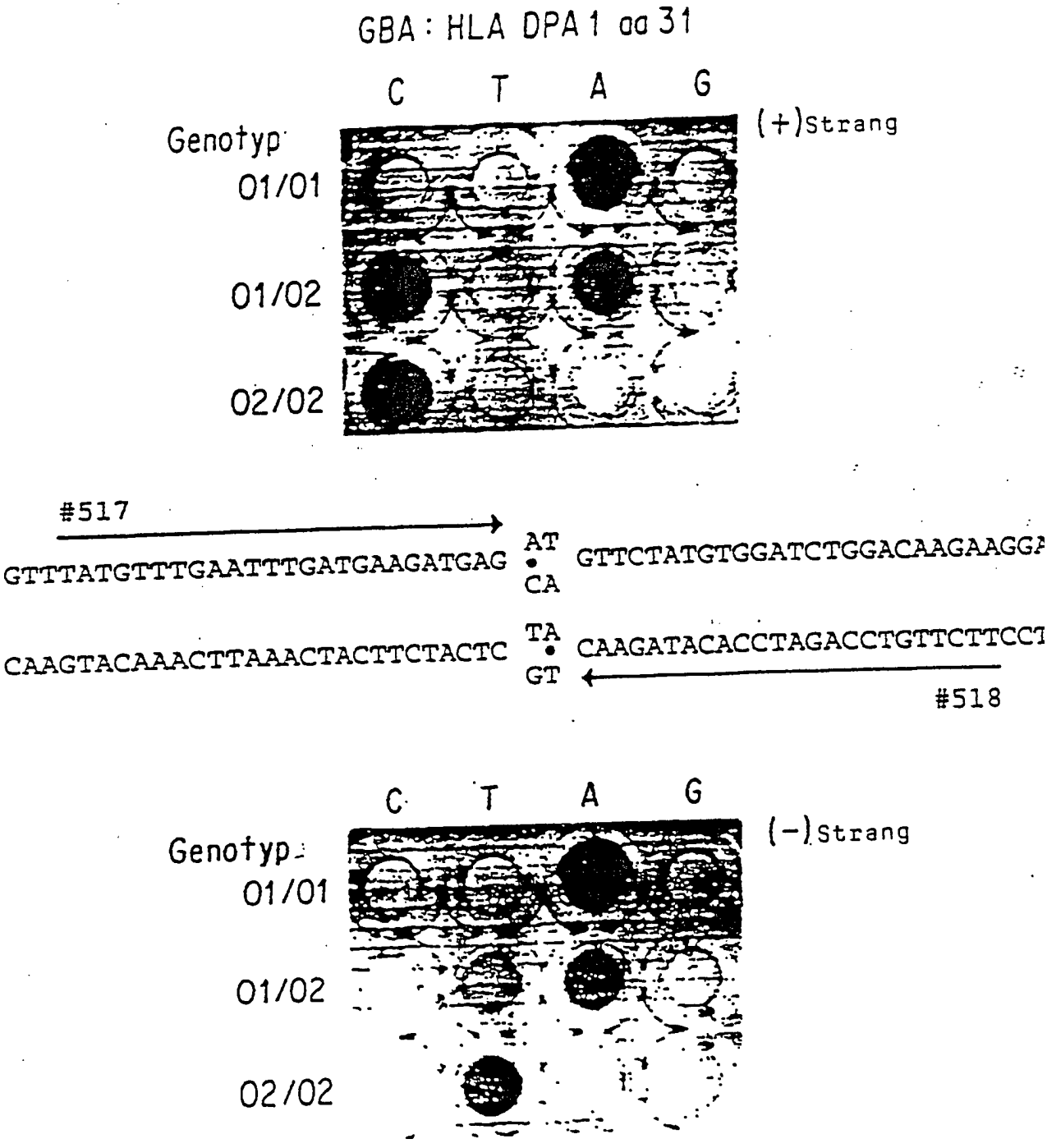

GBA : HLA DPA 1 aa 31
C T A G
Genotyp
01/01
01/02
02/02
(+)Strang
#517
GTTTATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG
AT
CA
GTTCTATGTGGATCTGGACAAGAAGG
CAAGTACAAACTTAAACTACTTCTACTC
TA
GT
CAAGATACACCTAGACCTGTTCTTCC
#518
C T A G
Genotyp
01/01
01/02
02/02
(-)Strang

FIG. 9

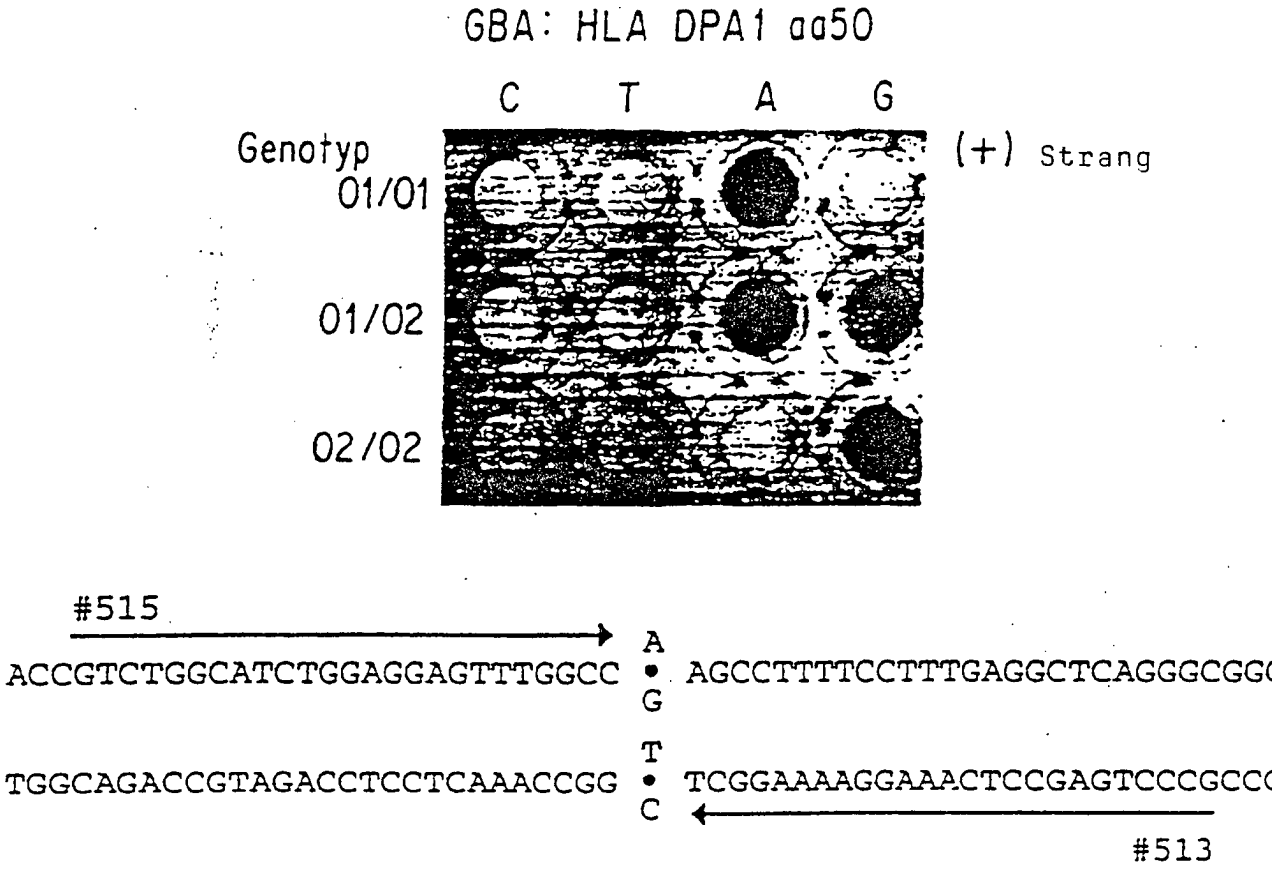

GBA: HLA DPA1 aa50
C T A G
Genotyp
01/01
01/02
02/02
(+) Strang
#515
ACCGTCTGGCATCTGGAGGAGTTTGGCC
A
G
AGCCTTTTCCTTTGAGGCTCAGGGCGG
TGGCAGACCGTAGACCTCCTCAAACCGG
T
C
TCGGAAAAGGAAACTCCGAGTCCCGCC
#513
C T A G
Genotyp
01/01
01/02
02/02
(-) Strang

FIG. 10

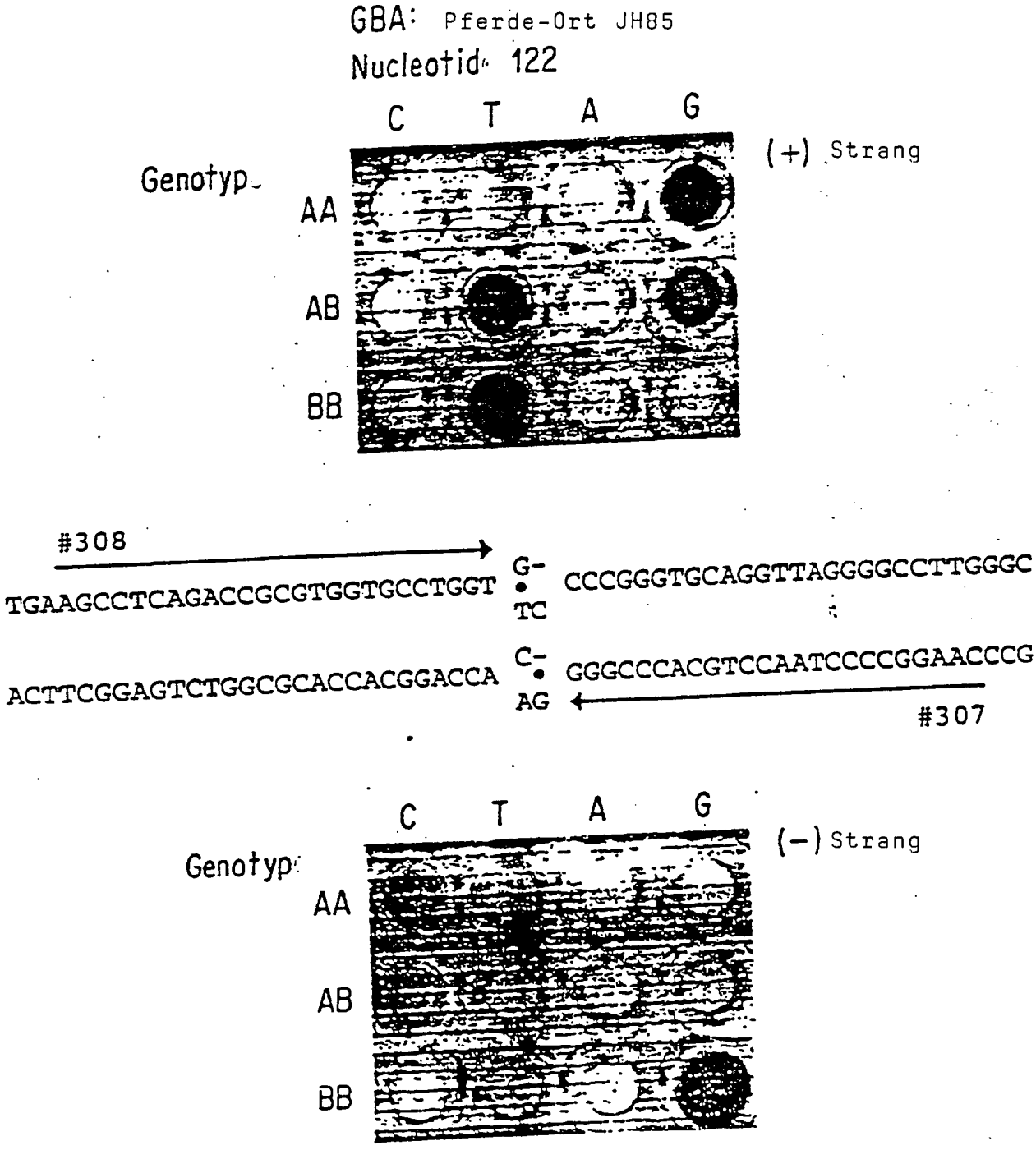
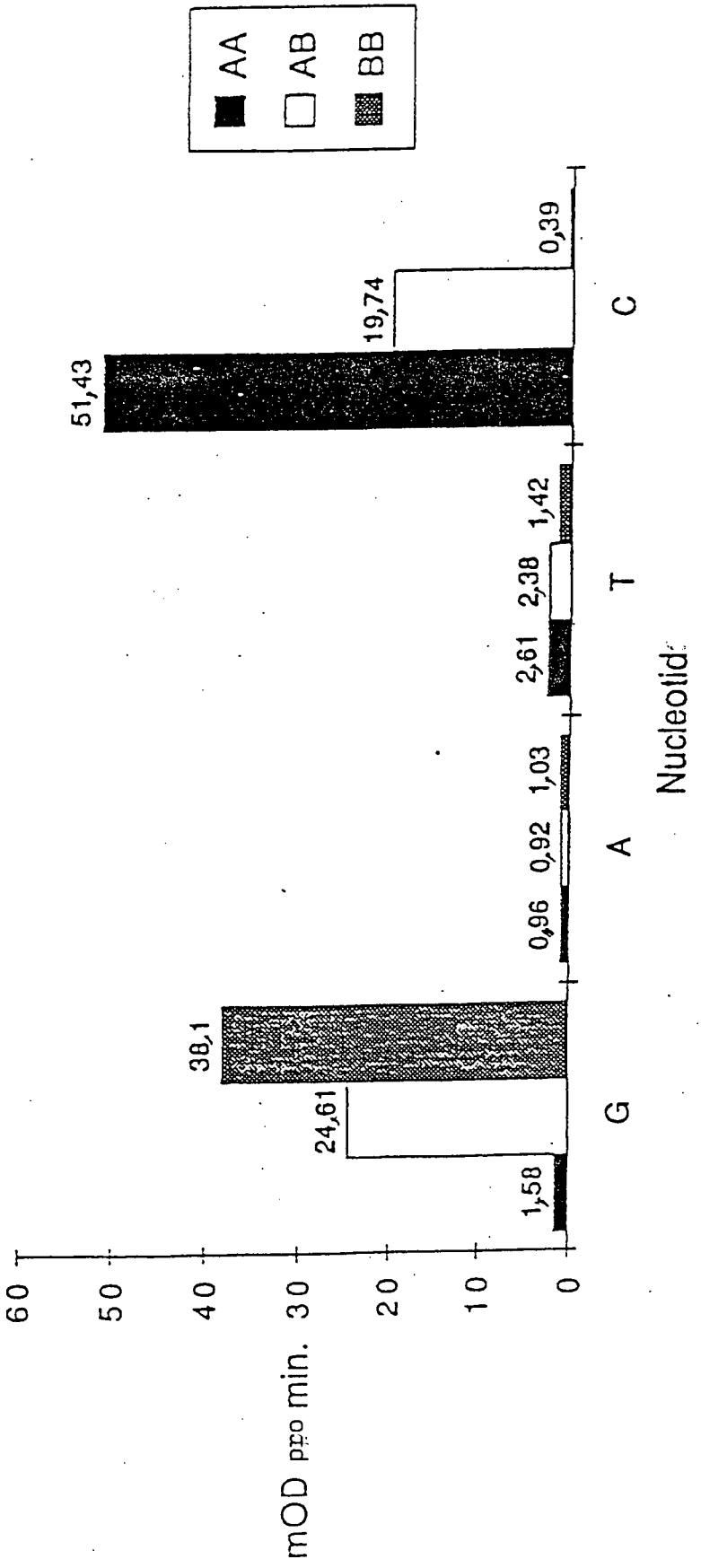

GBA: Pferde-Ort JH85
Nucleotid 122
C T A G
Genotyp
AA
AB
BB
(+) Strang
#308
TGAAGCCTCAGACCGCGTGGTGCCTGGT
G-
TC
CCCGGGTGCAGGTTAGGGGCCTTGGGC
ACTTCGGAGTCTGGCGCACCACGGACCA
C-
AG
GGGCCCACGTCCAATCCCCGGAACCCG
#307
C T A G
Genotyp
AA
AB
BB
(−) Strang

FIG. 11

FIGUR 12


QUANTITATIVE GBA: Pferde-Ort JH85
AA
AB
BB
mOD pro min.
60
50
40
30
20
10
0
51,43
19,74
0,39
1,42
2,38
2,61
1,03
0,92
0,96
38,1
24,61
1,58
G
A
T
C
Nucleotid