



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 30 765 T2** 2006.11.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 147 230 B1**

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

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 30 765.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/29253**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 965 197.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/043544**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.12.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **05.04.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.11.2006**

(30) Unionspriorität:
233413 19.01.1999 US

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

(73) Patentinhaber:
**Aventis Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, N.J.,
US**

(72) Erfinder:
**KURN, Nurith, Palo Alto, CA 94306, US; LIU, Ping,
Yen, Cupertino, CA 95014, US; LISHANSKI, Alla,
San Jose, CA 95126, US; TAYLOR, Marc, Mountain
View, CA 94040, US**

(74) Vertreter:
**PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 80339
München**

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUR KONTROLLIERTEN VERLÄNGERUNG EINES OLIGONUKLEOTIDS**

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

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Signifikante Morbidität und Mortalität sind mit Infektionskrankheiten verbunden. Für eine bessere Krankheits-Überwachung und -Behandlung sind schnellere und genauere Diagnoseverfahren erforderlich. Molekulare Verfahren, die DNA-Sonden, Nukleinsäure-Hybridisierungen und in vitro-Amplifikationstechniken verwenden, sind vielversprechende Verfahren, die gegenüber konventionellen Verfahren, die für Patientendiagnosen verwendet werden, Vorteile bieten.

[0002] Es wurde ein Verfahren für die enzymatische Amplifikation von spezifischen DNA-Segmenten beschrieben, das als Polymerasekettenreaktions(PCR)-Verfahren bekannt ist. Dieses in vitro-Amplifikationsverfahren basiert auf wiederholten Cyclen der Denaturierung, des Oligonukleotidprimer-Annealing und der Primerverlängerung (primer extension) durch thermophile Polymerase, was zu einer exponentiellen Erhöhung an Kopien der Region, die von den Primern flankiert wird, führt. Die verschiedenen PCR-Primer, die sich an entgegengesetzte Stränge der DNA anlagern, werden so positioniert, dass das Polymerase-katalysierte Verlängerungsprodukt eines Primers als Matrizenstrang für den anderen dienen kann, was zu der Akkumulierung eines getrennten Fragments führt, dessen Länge durch den Abstand zwischen den 5'-Enden der Oligonukleotidprimer definiert ist.

[0003] Es wurde auch ein anderes Verfahren zur Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen beschrieben. Dieses Verfahren wird als Einzelprimeramplifikation bezeichnet. Das Verfahren sorgt für die Amplifikation einer Zielsequenz, die eine "stem-loop"- oder umgekehrte Repeat-Struktur hat, in der die Zielsequenz von relativ kurzen komplementären Sequenzen flankiert wird. Verschiedene Verfahren zur Schaffung einer solchen Zielsequenz in Relation zum Vorliegen eines Polynukleotidanalyten, der zu detektieren ist, wurden ebenfalls beschrieben.

[0004] Die oben beschriebenen Amplifikationsverfahren verlangen, dass Proben, von denen erwartet wird, dass sie eine spezifische Nukleotidsequenz haben, bei etwa 95°C erwärmt werden und dann wiederholt zwischen ein oder zwei niedrigeren Temperaturen und etwa 95°C thermisch cycliert werden. Die höheren Temperaturen denaturieren Doppelhelices und die niedrigeren Temperaturen erlauben eine Hybridisierung des Primers und Kettenverlängerung.

[0005] Die obigen Verfahren sind extrem wirksame Techniken für eine Hochempfindlichkeitsdetektion von Ziel-DNA-Molekülen, die in sehr geringen Mengen vorhanden sind. Die Korrelation zwischen der Anzahl von ursprünglichen Ziel-DNA-Molekülen und der Anzahl spezifisch amplifizierter Produkte wird durch eine Reihe von Variablen beeinflusst. Geringere Variationen bei Puffer- oder Temperaturbedingungen können Reaktion-zu-Reaktion-Amplifikationseffizienzen sehr stark beeinflussen. Außerdem können klinische Proben von DNA-Zielen inhibitorische Faktoren enthalten, die eine enzymatische Amplifikation unterdrücken können. Zusätzlich können solche klinischen Proben auch irrelevante DNA enthalten, die im Vergleich zu den Ziel-DNA-Molekülen in sehr großen Mengen vorliegen kann.

[0006] Die obigen Amplifikationsverfahren leiden an einer Störung, die durch statistische partielle Hybridisierung von Primern, die bei einer solchen Amplifikation verwendet werden, an irrelevante DNA, d.h. DNA, die nicht Ziel-DNA ist, und an die die Primer nicht-spezifisch oder nicht selektiv binden, verursacht werden. Ein Wettbewerb zwischen Ziel-DNA und irrelevanter DNA um das Enzym und den Primer wird so erzeugt. Als Resultat wird die Effizienz der Amplifikation der Ziel-DNA-Moleküle verringert. Dies führt am besten zu Schwierigkeiten bei der Unterscheidung amplifizierter Ziel-DNA von amplifizierter irrelevanter DNA. Die Amplifikation von irrelevanter DNA zu einem substantiellen Grad kann eine spezifische Amplifikation von Ziel-DNA stören, wodurch eine Detektion der Ziel-DNA vollständig verhindert wird.

[0007] Ein Ansatz für dieses Problem besteht darin, eine Kettenverlängerung von bei niedriger Temperatur nicht-spezifisch hybridisierten Primern durch Erwärmen des Reaktionsgemisches auf 95°C vor Zugabe eines kritischen Reagenses, z.B. ein Polymeraseenzym oder Magnesium, das erforderlich ist, um die Polymerase zu aktivieren, zu vermeiden. Dies kann durch Verwendung einer Wachsschicht, um die verschiedenen Reaktionskomponenten zu trennen, bis eine hohe Temperatur erreicht ist, erreicht werden. Alternativ kann ein inhibierender Antikörper gegen die Polymerase bei niedriger Temperatur zugesetzt werden. Der Antikörper denaturiert bei erhöhter Temperatur und lässt das Enzym reaktiviert werden. Ein anderer Ansatz involviert die Verwendung von AmpliTaq-Gold-Enzym als Polymerase in PCR-Reaktionen. Ein anderes Verfahren, das eine Kettenverlängerung eines Oligonukleotidprimers involviert, ist ein Verfahren zur Deletion von Unterschieden in

Nukleinsäuren. Kurz ausgedrückt, das Branch-Migrations-Verfahren detektiert eine Differenz zwischen zwei verwandten Nukleinsäuresequenzen. In diesem Verfahren wird, wenn es eine Differenz zwischen den zwei verwandten Nukleinsäuresequenzen gibt, ein stabiler Komplex aus vier Molekülen gebildet, der beide Nukleinsäuresequenzen in doppelsträngiger Form umfasst. Üblicherweise umfasst der Komplex eine Holliday-Junction. Beide Mitglieder wenigstens eines Paares von nicht-komplementären Strängen innerhalb des Komplexes haben Markierungen. Die Assoziation der Markierungen als Teil des Komplexes wird als Hinweis für das Vorliegen des Unterschieds zwischen den zwei verwandten Sequenzen bestimmt. Das Verfahren kann zum Detektieren des Vorliegens einer Mutation in einer Zielnukleinsäuresequenz verwendet werden.

[0008] In dem obigen Verfahren zur Detektion von Unterschieden zwischen zwei verwandten DNA-Sequenzen kann ein nicht-spezifisches Priming ein Problem zur Mutationsdetektion durch Inhibierung von DNA-Branch-Migration sein. Alle Amplifikationsprodukte bauen die "Schwanz"-Sequenzen der Schwanz-tragenden Primer ein und sind daher fähig, an der Bildung von viersträngigen DNA-Komplexen mit beiden spezifischen PCR-Produkten und mit jedem anderen teilzunehmen. Da die Sequenzen auf beiden Seiten der Junction vollständig verschieden voneinander sind, unterliegen solche Komplexe niemals einer Strangtrennung durch Branch-Migration und erzeugen somit ein nicht-spezifisches Signal. Ein Ansatz zur Linderung dieses Problems besteht in der Verwendung eines Zwei-Stufen-PCR-Verfahrens oder verschachtelter PCR. Es ist allerdings in hohem Maße wünschenswert, das obige Verfahren unter Verwendung einer einzelnen PCR-Reaktion mit genau einem Primersatz durchzuführen.

[0009] Ein Verfahren zur Vermeidung der obigen Probleme, das kostengünstig und regulierbarer ist als die oben genannten Ansätze, ist erwünscht.

2. Beschreibung des Standes der Technik

[0010] US-Patent Nr. 5,338,671 (Scalice et al.) diskutiert die DNA-Amplifikation mit thermostabiler DNA-Polymerase und Polymerase-inhibierendem Antikörper.

[0011] Zusammensetzungen und Verfahren zur Inhibierung einer Dimerisierung von Primern während der Lagerung von Polymerasekettenreaktionsreagenzien ist im US-Patent Nr. 5,565,339 (Bloch et al.) (Bloch I) offenbart.

[0012] Eine Verwendung von Fett oder Wachs in der Polymerasekettenreaktion wird im US-Patent Nr. 5,411,876 diskutiert (Bloch et al.) (Bloch II).

[0013] Das US-Patent Nr. 5,599,660 (Ramanujam et al.) offenbart ein Verfahren und eine Präparation zur sequenziellen Abgabe von in Wachs eingebetteten, inaktivierten biologischen und chemischen Reagenzien.

[0014] Ein Verfahren zum verringerten nicht-spezifischen Priming bei der DNA-Amplifikation ist im US-Patent Nr. 5,348,853 (Wang et al.) offenbart.

[0015] TagStart Antibody™, der in der Heißstart-PCR verwendet wird, die durch einen neutralisierenden monoklonalen Antikörper, der gegen Taq-DNA-Polymerasen gerichtet ist, ermöglicht wird, wird von Kellogg et al., BioTechniques (1994) 16(6): 1134–1137 beschrieben.

[0016] Eine Co-Amplifikation von Zielnukleinsäure unter Verwendung eines Volumenausschlussagenses in der Reaktionszusammensetzung und ein Testkit und eine Testvorrichtung, die dafür einsetzbar ist, sind im US-Patent Nr. 5,705,366 (Backus) diskutiert.

[0017] Eine hitzevermittelte Aktivierung von Affinitäts-immobilisierter Taq DNA-Polymerase wird in Nilsson et al., in BioTechniques (1997) 22(4):744–751 beschrieben.

[0018] Oligonukleotidinhibitoren von Taq-Polymerase erleichtern eine Detektion von Targets mit niedriger Kopienzahl durch PCR und werden in Dang et al., J. Mol. Biol. (1996) 264:268–278 diskutiert.

[0019] Ein einfaches Verfahren zur Verstärkung der PCR-Spezifität ist von Weighardt et al., PCR Methods and Applications (1993) 3:77–80 beschrieben.

[0020] Eine vereinfachte Heißstart-PCR unter Verwendung AmpliTaq-Gold-Enzym wird in Birch et al., Nature (1996) 381:445–446 beschrieben.

[0021] Ein Heißstartverfahren unter Verwendung von Wachspierlen ist in Chou et al., *Nucleic Acids Research* (1992) 20:1717–1723 diskutiert.

[0022] W.B. Barnes diskutiert eine PCR-Amplifikation von bis zu 35-kb-DNA mit hoher Genauigkeit und hoher Ausbeute aus λ -Bakteriophagenmatrizen in *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1994) 91:2216–2220.

[0023] Die PCT-Anmeldung WO 96/03526 A1 (Niveleau) diskutiert ein Nukleinsäureamplikationsverfahren unter Verwendung eines modifizierten Nukleosids und die Detektion des Amplifikationsproduktes unter Verwendung von Antikörpern.

[0024] Backman et al. offenbart ein Verfahren und Kits zum Amplifizieren von Zielnukleinsäuren, die sowohl auf Polymerase- als auch auf Ligase-Kettenreaktionen anwendbar sind, im US-Patent Nr. 5,792,607.

[0025] Ein Verfahren zum Amplifizieren, Detektieren und/oder Klonieren von Nukleinsäuresequenzen ist im US-Patent Nr. 4,683,195 offenbart.

[0026] Das US-Patent Nr. 5,508,178 (Rose et al.) beschreibt eine Nukleinsäureamplifikation unter Verwendung eines einzelnen Polynukleotidprimers.

[0027] Eine Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen unter Verwendung von Oligonukleotiden statistischer Sequenz als Primer ist im US-Patent Nr. 5,043,272 (Hartley) beschrieben.

[0028] Nickel et al., *J. Biol. Chem.* (1992) 267:848–854 beschreibt Wechselwirkungen von Azidothymidintriphosphat mit zellulären DNA-Polymerasen und mit DNA-Primase.

[0029] EP 0 439 182 (Beckman et al.) diskutiert Verfahren zum Amplifizieren von Zielnukleinsäuren, die sowohl auf Polymerase- als auch auf Ligase-Kettenreaktionen anwendbar sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0030] In ihrem breitesten Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zum selektiven Verlängern eines Oligonukleotidprimers entlang einer spezifischen Zielpolynukleotidsequenz in einem Gemisch von Polynukleotiden. Es wird eine Kombination bereitgestellt, die das Gemisch, einen Oligonukleotidprimer, der eine Modifikation hat, und eine Bindungssubstanz für die Modifikation umfasst, wobei die Bindungssubstanz an das Oligonukleotid bindet und die Verlängerung des Oligonukleotids entlang der Zielpolynukleotidsequenz verhindert. Die Temperatur der Kombination wird sequenziell oder cyclisch auf Level eingestellt, die ausreichen, um die Bindungssubstanz irreversibel zu denaturieren und die Verlängerung des Oligonukleotidprimers entlang der spezifischen Zielpolynukleotidsequenz erlauben.

[0031] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Kontrollieren der Verlängerung eines Oligonukleotids entlang eines Matrizenpolynukleotids. Eine Kombination wird in einem Medium bereitgestellt. Die Kombination umfasst (i) ein Matrizenpolynukleotid, (ii) ein Oligonukleotid, von dem wenigstens ein Teil an einen Teil des Matrizenpolynukleotids hybridisiert, wobei das Oligonukleotid eine modifizierte Gruppierung umfasst, (iii) alle Reagenzien, die zum Verlängern des Oligonukleotids entlang des Matrizenpolynukleotids erforderlich sind, und (iv) eine Bindungssubstanz für die modifizierte Gruppierung. Die Bindungssubstanz ist fähig, an die modifizierte Gruppierung zu binden und zu verhindern, dass sich das Oligonukleotid entlang des Matrizenpolynukleotids verlängert. Die Kombination wird Bedingungen zur irreversiblen Freisetzung der Bindungssubstanz vom Oligonukleotid und zur Ermöglichung der Verlängerung des Oligonukleotids entlang des Matrizenpolynukleotids unterworfen.

[0032] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Amplifizieren einer Zielpolynukleotidsequenz. Es wird eine Kombination bereitgestellt, umfassend (i) ein Medium, von dem angenommen wird, dass es die Zielpolynukleotidsequenz enthält, (ii) alle Reagenzien, die zur Durchführung einer Amplifikation der Zielpolynukleotidsequenz erforderlich sind, wobei die Reagenzien eine Nukleotidpolymerase, Nukleosidtriphosphate und wenigstens einen Oligonukleotidprimer, der entlang der Zielpolynukleotidsequenz verlängerbar ist, umfassen. Der Oligonukleotidprimer umfasst eine modifizierte Gruppierung. Eine Bindungssubstanz für die modifizierte Gruppierung ist in der Kombination enthalten. Die Bindungssubstanz ist fähig, an die modifizierte Gruppierung zu binden und den Primer daran zu hindern, dass er sich entlang der Zielsequenz verlängert. Die Kombination wird Bedingungen zur Amplifizierung der Zielpolynukleotidsequenz unterworfen. Unter solchen Bedingungen wird die Bindungssubstanz während des Temperaturcyclings irreversibel von dem Pri-

mer freigesetzt, wodurch zugelassen wird, dass der Primer mit der Zielpolynukleotidsequenz bindet und sich entlang dieser verlängert.

[0033] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Amplifizieren einer Polynukleotidsequenz eines Zielpolynukleotids ("Zielsequenz"). Ein erster Oligonukleotidprimer ("erster Primer") wird an das 3'-Ende der Zielsequenz hybridisiert. Der erste Primer wird in Gegenwart einer Polymerase und von Nukleotidtriphosphaten entlang wenigstens der Zielsequenz verlängert, um einen verlängerten ersten Primer zu produzieren. Der erste Primer ist fähig, an (1) den verlängerten ersten Primer oder (2) einen verlängerten zweiten Oligonukleotidprimer ("zweiter Primer") zu hybridisieren. Der verlängerte zweite Primer resultiert aus der Verlängerung eines zweiten Primers, der fähig ist, an ein Polynukleotid zu hybridisieren oder sich entlang dieses zu verlängern, das komplementär zu der Zielsequenz ist (komplementäres Polynukleotid). Der verlängerte erste Primer wird von der Zielsequenz dissoziiert. Der erste oder der zweite Primer wird an das 3'-Ende des verlängerten ersten Primers hybridisiert und der erste oder der zweite Primer wird entlang des verlängerten ersten Primers verlängert. Der verlängerte erste Primer oder der verlängerte zweite Primer wird von dem verlängerten ersten Primer dissoziiert. Der erste Primer wird an das 3'-Ende des verlängerten ersten oder des verlängerten zweiten Primers hybridisiert. Die Hybridisierungsschritte, die den ersten und/oder den zweiten Primer mit den verlängerten Primern beinhalten, werden durch wiederholtes Temperaturcycling wiederholt. Der Primer umfasst ein modifiziertes Nukleotid in dem Teil, das an das Zielpolynukleotid bindet. Ein Antikörper für das modifizierte Nukleotid ist in der Kombination enthalten. Ein Antikörper ist fähig, an das modifizierte Nukleotid zu binden und zu verhindern, dass der Primer sich entlang der Zielsequenz verlängert. Der Antikörper wird irreversibel während des Temperaturcyclings vom Primer freigesetzt, wodurch es ermöglicht wird, dass der Primer mit der Zielpolynukleotidsequenz bindet und entlang dieser verlängert wird.

[0034] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Detektieren einer Zielsequenz eines Zielpolynukleotids ("Zielsequenz"). Die Zielsequenz wird einem Verfahren ähnlich dem oben beschriebenen unterworfen. Der verlängerte erste Primer und/oder der verlängerte zweite Primer werden detektiert. Der Primer umfasst ein modifiziertes Nukleotid in dem Teil, der an das Zielpolynukleotid bindet. Ein Antikörper für das modifizierte Nukleotid ist in der Kombination enthalten. Der Antikörper ist fähig, an das modifizierte Nukleotid zu binden und den Primer daran zu hindern, entlang der Zielsequenz verlängert zu werden. Der Antikörper wird irreversibel während des Temperaturcyclings vom Primer freigesetzt, wodurch es ermöglicht wird, dass der Primer mit der Zielpolynukleotidsequenz bindet und entlang dieser verlängert wird.

[0035] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend in verpackter Kombination (a) ein Oligonukleotid, von dem wenigstens ein Teil an einen Teil eines Matrizenpolynukleotids hybridisiert, wobei das Oligonukleotid eine modifizierte Gruppierung umfasst, (b) Reagenzien zur Verlängerung des Oligonukleotids entlang des Matrizenpolynukleotids und (c) einen Antikörper für die modifizierte Gruppierung. Der Antikörper ist fähig, an die modifizierte Gruppierung zu binden und zu verhindern, dass das Oligonukleotid sich entlang des Matrizenpolynukleotids verlängert.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0036] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung, die eine Ausführungsform gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt.

[0037] [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung, die eine alternative Ausführungsform gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt.

[0038] [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung, die eine alternative Ausführungsform gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt.

Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen

[0039] In der vorliegenden Erfindung wird eine vorzeitige Hybridisierung und Verlängerung eines Oligonukleotidprimers durch spezifische Bindung des Oligonukleotidprimers durch eine thermisch labile Bindungssubstanz, z.B. ein Protein, verhindert. Der Oligonukleotidprimer enthält üblicherweise, aber nicht notwendigerweise, eine modifizierte Gruppierung in dem Teil des Oligonukleotidprimers, der an ein Matrizen-Polynukleotid bindet. Die Bindungssubstanz ist für die modifizierte Gruppierung spezifisch und bindet an den Oligonukleotidprimer, der ein Eingreifen der Polymerase und eine vorzeitige Aktivierung des Oligonukleotidprimers und/oder eine nachfolgende Verlängerung verhindert. Eine Aktivierung des Primers und eine Verlängerung des hybridisierten Primers werden durch Bindung der Bindungssubstanz, die thermisch labil ist, blockiert. Eine Erhöhung der

Temperatur des Reaktionsmediums inaktiviert die Bindungssubstanz. Die Inaktivierung der Bindungssubstanz resultiert in einer Dissoziation des Komplexes der Bindungssubstanz und des Oligonukleotidprimers, einer Freisetzung des Oligonukleotidprimers, einer Bildung eines spezifischen Primer-Matrizenpolynukleotid-Hybrids, einer Aktivierung des 3'-Terminus des Oligonukleotidprimers und einer Verlängerung des Primers entlang des Matrizenpolynukleotids.

[0040] Die vorliegende Erfindung ermöglicht eine Kombination aller Reagenzien, die zur Amplifikation erforderlich sind, in einem Reaktionsgemisch vor Einsetzen des Amplifikationsprozesses. Eine Analyse der Amplifikationsprodukte zum Zwecke der Detektion, Sequenzanalyse und dergleichen, werden durch die Verfahren der Erfindung stark vereinfacht. Da die Bindungssubstanz bei der erhöhten Temperatur irreversibel inaktiv gemacht wird, stört sie in der späteren Analyse der Amplifikationsreaktion nicht. Dementsprechend resultiert sie in einer Eliminierung eines nicht-spezifischen Primings bei niedrigen Temperaturen, was hauptsächlich zur Produktion einer nicht-spezifischen Amplifikation beiträgt. Die vorliegende Erfindung ist im allgemeinen von der verwendeten Polymerase unabhängig; in einigen Fällen, wie sie unten erläutert werden, kann allerdings eine Exonuklease notwendig sein.

[0041] Die vorliegende Erfindung bietet Vorteile gegenüber der Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an einzelsträngige DNA bindet. Eine Bildung einer einzelsträngigen Spezies der Proben-DNA während der Probenpräparation ist üblich. Dies kann zu einem Wettbewerb um die Bindung DNA-Antikörper führen, was in einer vorzeitigen Freisetzung des aktiven Primers resultiert, der zu einer nicht-spezifischen Primerverlängerung fähig ist. Ein anderer Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass es lediglich notwendig ist, eine modifizierte Gruppierung im Oligonukleotidprimer zu haben. Die modifizierte Gruppierung kann in dem Teil des Oligonukleotidprimers sein, der an den entsprechenden Teil des Matrizenpolynukleotids bindet, oder die modifizierte Gruppe kann am 3'-Terminus, dem 3'-Ende oder dem 5'-Ende sein. Das vorliegende Verfahren sorgt für ein Zusammenfügen von Amplifikationsreaktionsgemischen bei niedriger Temperatur, vereinfacht somit das Amplifikationsverfahren.

[0042] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann allein verwendet werden, um die obigen Vorteile zu erreichen. Allerdings liegt es im Aufgabenbereich der Erfindung, das erfindungsgemäße Verfahren in Verbindung mit anderen "Heißstart"-Verfahren durchzuführen. Das vorliegende Erfindung kann z.B. zusammen mit Wachspen verwendet werden.

[0043] In der vorliegenden Erfindung wird eine Amplifikation einer Zielpolynukleotidsequenz unter Verwendung eines Oligonukleotids, das eine Bindungsgruppierung hat, und einer Bindungssubstanz, die spezifisch an eine solche Gruppierung bindet, durchgeführt. Die Bildung eines Komplexes zwischen der Bindungssubstanz und dem Oligonukleotidprimer resultiert in einer Inhibierung der Fähigkeit des Oligonukleotidprimers, sich entlang des Matrizenpolynukleotids zu verlängern. Wenn alle Amplifikationsreagenzien in der Probe vermischt sind, wird eine Verlängerung des Primers entlang eines Matrizenpolynukleotids, das im Gemisch vorliegt, wegen des Vorliegens des Komplexes zwischen der Bindungssubstanz und dem Oligonukleotidprimer inhibiert. Wenn die Temperatur ansteigt, dissoziiert die Bindungssubstanz aus dem Komplex mit dem Primer. Der Oligonukleotidprimer (wenn er vorher nicht gebunden war) kann dann an die Matrizenpolynukleotidsequenz binden und eine Kettenverlängerung durchmachen. Die Hintergrundprodukte, die aus Amplifikation von irrelevanter DNA resultieren, sind stark verringert, da eine Kettenverlängerung nur bei einer erhöhten Temperatur, wo eine Bindung relativ selektiv ist, stattfindet.

[0044] Das Reaktionsmedium wird kontrollierten Bedingungen unterworfen, unter denen die Bindungssubstanz aus dem Komplex mit dem Oligonukleotidprimer dissoziiert, wodurch der Oligonukleotidprimer in kontrollierter Weise zur Verlängerung entlang der Polynukleotidmatrize freigesetzt wird.

[0045] Die vorliegende Erfindung findet auf eine Reihe von Verfahren Anwendung, in denen eine Kettenverlängerung eines Oligonukleotids entlang eines Matrizenpolynukleotids erfolgt. Ein solches Verfahren ist die Amplifikation einer Zielpolynukleotidsequenz, z.B. eine Amplifikation, die unter Verwendung eines thermischen Cyclings durchgeführt wird. Die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahren eliminiert die Verwendung von verschachtelten Primern oder anderen Mitteln, die früher erforderlich waren, um einen ausreichend niedrigen Hintergrund für ein Amplifikationsverfahren bereitzustellen, um ein aussagekräftiges Resultat bereitzustellen.

[0046] Bevor mit der Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung fortgefahren wird, wird eine Reihe von Ausdrücken definiert.

[0047] Kettenverlängerung eines Oligonukleotids – Verlängerung eines Oligonukleotids entlang einer Polynu-

kleotidmatrize (Kette von Nukleotiden), um ein Kettenverlängerungsprodukt zu produzieren, das das Komplement der Polynukleotidmatrize ist. Das Polynukleotid ist eine Matrize, da der Oligonukleotidprimer mit wenigstens einem Teil des Polynukleotids hybridisierbar ist und entlang eines solchen Teils verlängert werden kann. In einer Primerverlängerungsreaktion hybridisiert im allgemeinen ein Primer an wenigstens eine Matrizensequenz innerhalb eines Polynukleotids und wird entlang dieser (entlang dieser Ketten) verlängert. Die verlängerten Primer sind "Kettenverlängerungsprodukte". Reagenzien zur Durchführung einer Kettenverlängerung eines Oligonukleotidprimers entlang einer Polynukleotidmatrize umfassen eine Nukleotidpolymerase und Nukleosidtriphosphate. Kettenverlängerungsverfahren werden in Verfahren, z.B. Amplifikation von Polynukleotiden, Bildung von cDNA, komplementär zu mRNA, zur Klonierung eines gegebenen Gens oder eines Fragments davon usw., verwendet.

[0048] Im Kontext einer Amplifikation beinhaltet eine Kettenverlängerung üblicherweise ein Temperaturcycling, d.h. Erhöhung der Temperatur des Reaktionsgemisches, um zu bewirken, dass hybridisierte Polynukleotidsequenzen denaturieren, Abkühlen des Reaktionsgemisches, um eine Bindung eines Oligonukleotidprimers an seine entsprechende Zielpolynukleotidsequenz zu ermöglichen, und anschließende Verlängerung entlang der Zielpolynukleotidsequenz, und Wiederholung des obigen. Allerdings können Zielpolynukleotide ohne Thermocycling amplifiziert werden.

[0049] Ein wichtiges Verfahren, das eine Kettenverlängerung eines Oligonukleotidprimers ausnützt, ist das für die Amplifikation von Nukleinsäuren oder Polynukleotiden, z.B. eine Zielpolynukleotidsequenz. Solche Verfahren führen im allgemeinen zur Bildung einer Kopie oder mehrerer Kopien einer Nukleinsäure oder eines Polynukleotidmoleküls oder zur Bildung einer Kopie oder mehrerer Kopien des Komplements einer Nukleinsäure oder eines Polynukleotidmoleküls, üblicherweise einer Zielpolynukleotidsequenz, die in einem Medium vorliegt.

[0050] Ein solches Verfahren für die enzymatische Amplifikation von spezifischen doppelsträngigen Sequenzen von DNA ist als die Polymerasekettenreaktion (PCR), wie sie oben beschrieben wurde, bekannt. Dieses in vitro-Amplifikationsverfahren basiert auf wiederholten Zyklen der Denaturierung, des Annealing wenigstens zwei verschiedener Oligonukleotidprimer, und Primerverlängerung, d.h. "Kettenverlängerung" solcher Primer, durch thermophile, Matrizen-abhängige Polynukleotidpolymerase, was zu einer exponentiellen Zunahme der Kopien, d.h. "Kettenverlängerungsprodukte der obigen Primer", der Zielpolynukleotidsequenz, die von den Primern flankiert wird, führt. Die zwei verschiedenen PCR-Primer, die an entgegengesetzte Stränge der DNA anlagern, sind so positioniert, dass das Polymerase-katalysierte Verlängerungsprodukt eines Primers als Matrizenstrang für den anderen dienen kann, was zu der Akkumulierung eines getrennten doppelsträngigen Fragments führt, dessen Länge durch den Abstand zwischen den 5'-Enden der Oligonukleotidprimer definiert ist.

[0051] Ein anderes Verfahren zur Amplifikation wird oben genannt und involviert eine Amplifikation eines einzelsträngigen Polynukleotids unter Verwendung eines einzelnen Polynukleotidprimers. Das einzelsträngige Polynukleotid, das zu amplifizieren ist, enthält zwei nicht-zusammenhängende Sequenzen, die zueinander komplementär sind und somit fähig sind, zusammen unter Bildung einer "stem-loop"-Struktur zu hybridisieren. Dieses einzelsträngige Polynukleotid kann bereits Teil einer Zielpolynukleotidsequenz sein oder kann als Resultat des Vorliegens einer Zielpolynukleotidsequenz geschaffen werden.

[0052] Ein anderes Verfahren, das eine Kettenverlängerung eines Oligonukleotidprimers beinhaltet, ist ein Verfahren für die Detektion von Unterschieden bei den Nukleinsäuren. In dem Verfahren wird allgemein ein Medium, von dem erwartet wird, dass es zwei verwandte Nukleinsäuresequenzen enthält, behandelt, um zwei partielle Doppelhelices bereitzustellen, von denen jede vollständig übereinstimmende Doppelhelices mit an einem Ende nicht-komplementären Endteilen umfasst. Die partiellen Doppelhelices sind dahingehend verwandt, dass, außer für den Unterschied, einer der Stränge, S1, einer der partiellen Doppelhelices komplementär zu einem der Stränge, S1', des anderen der partiellen Doppelhelices ist, und der andere der Stränge, S2, der einen der partiellen Doppelhelices komplementär zu dem anderen der Stränge, S2', des anderen der partiellen Doppelhelices ist. Das Medium wird Bedingungen unterworfen, die die Bindung von S1 an S1' bzw. S2 und S2' ermöglichen. Wenn es einen Unterschied zwischen den verwandten Nukleinsäuresequenzen gibt, wird ein stabiler Komplex gebildet, der die Stränge S1, S1', S2 und S2' umfasst. Es wird eine Bestimmung durchgeführt, ob der stabile Komplex gebildet ist, dessen Vorliegen ein Hinweis für das Vorliegen eines Unterschieds zwischen den verwandten Nukleinsäuresequenzen ist.

[0053] Modifizierte Gruppierung – eine Gruppierung, die eine Modifikation umfasst, welche die Gruppierung von einer anderen unterscheidet, die eine solche Modifikation nicht umfasst.

[0054] Nukleotid – eine Base-Zucker-Phosphat-Kombination, d.h. z.B. die monomere Einheit von Nukleinsäurepolymeren, d.h. DNA oder RNA.

[0055] Natürliches Nukleotid – ein Nukleotid, das im allgemeinen in der Natur gefunden wird; solche natürlichen Nukleotide umfassen Basen, wie Adenin, Uridin, Cytidin, Thymin, Guanidin usw.

[0056] Nicht-natürliches Nukleotid – ist die Einheit in einem modifizierten Oligonukleotid, die sich durch eine Modifikation von einem natürlichen Nukleotid unterscheidet. Die Natur des nicht-natürlichen Nukleotids zu Zwecken der vorliegenden Erfindung ist unten bei der Definition von modifiziertem Oligonukleotid detaillierter beschrieben. Das nicht-natürliche Nukleotid, kann, wenn es nicht durch eine Bindungssubstanz gebunden ist, zu einem gewissen Grad die Fähigkeit des modifizierten Oligonukleotids, an ein Matrizenpolynukleotid zu hybridisieren und entlang diesem verlängert zu werden, stören oder kann sie nicht stören. Bei dem Ereignis, dass das nicht-natürliche Nukleotid eine solche Fähigkeit stört, sollte das nicht-natürliche Nukleotid distal vom 3'-Ende des Primers sein oder sollte vor einer Verlängerung aus dem Primer entfernt werden. Ein Beispiel für ein solches nicht-natürliches Nukleotid ist Etheno-dA.

[0057] Nukleotid – ist eine Base-Zucker-Kombination oder ein Nukleotid, dem eine Phosphatgruppierung fehlt.

[0058] Eine Zielsequenz eines Zielpolynukleotids – eine zu identifizierende Sequenz von Nukleotiden, die üblicherweise innerhalb eines Teils (Zielpolynukleotid) vorliegt oder das Ganze eines Polynukleotidanalyten ist, dessen Identität zu einem Ausmaß bekannt ist, das ausreicht, um die Herstellung verschiedener Primer und anderer Moleküle, die zur Durchführung einer Amplifikation der Zielsequenz, die innerhalb des Zielpolynukleotids enthalten ist, zu ermöglichen. Bei einer Primerverlängerungsamplifikation hybridisieren Primer im allgemeinen an wenigstens die Zielsequenz innerhalb des Zielpolynukleotids und werden entlang dieser verlängert (kettenverlängert) und entsprechend wirkt die Zielsequenz als Matrize. Die verlängerten Primer sind Ketten-"Verlängerungsprodukte". Die Zielsequenz liegt üblicherweise zwischen zwei definierten Sequenzen, muss aber nicht. Im allgemeinen hybridisieren die Primer mit den definierten Sequenzen oder mit wenigstens einem Teil eines solchen Zielpolynukleotids, üblicherweise wenigstens ein 10-Nukleotid-Segment am 3'-Ende davon und vorzugsweise ein wenigstens 15-, häufig ein 20- bis 50-Nukleotidsegment davon. Die Zielsequenz enthält üblicherweise etwa 30 bis 5.000 oder mehr Nukleotide, vorzugsweise 50 bis 1.000 Nukleotide. Das Zielpolynukleotid ist im allgemeinen eine Fraktion eines größeren Moleküls oder es kann im wesentlichen das ganze Molekül (Polynukleotidanalyt) sein. Die Mindestzahl an Nukleotiden in der Zielpolynukleotidsequenz ist so ausgewählt, dass das Vorliegen von Zielpolynukleotid in einer Probe ein spezifischer Indikator für das Vorliegen eines Polynukleotid-Analyten in einer Probe ist. Ganz grob ausgedrückt, die Sequenzlänge ist üblicherweise größer als etwa $1,6 \log L$ -Nukleotide, worin L die Zahl der Basenpaare im Genom der biologischen Quelle der Probe ist. Die maximale Zahl an Nukleotiden im Zielpolynukleotid wird normalerweise durch die Länge des Polynukleotidanalyten und seine Tendenz, durch Scherung oder andere Verfahren während der Isolierung und Verfahren, die zur Präparierung der Probe zum Assay und die Detektionseffizienz und/oder Amplifikation der Sequenz notwendig sind, gebrochen zu werden, gesteuert.

[0059] Oligonukleotid – ein einzelsträngiges Polynukleotid, üblicherweise ein synthetisches Polynukleotid. Das Oligonukleotid (die Oligonukleotide) bestehen üblicherweise aus einer Sequenz mit etwa 5 bis etwa 150 oder mehr Nukleotiden, vorzugsweise etwa 10 bis etwa 100 Nukleotiden, bevorzugter etwa 15 bis etwa 50 Nukleotiden in der Länge. Zur Herstellung von Oligonukleotiden können verschiedene gut bekannte Techniken verwendet werden. Solche Sequenzen können durch biologische Synthese oder durch chemische Synthese erhalten werden. Für kurze Sequenzen (bis zu etwa 100 Nukleotide) ist eine chemische Synthese im Vergleich zu einer biologischen Synthese häufig wirtschaftlicher. Für längere Sequenzen können Standardreplikationsverfahren, die in der Molekularbiologie verwendet werden, eingesetzt werden, z.B. die Verwendung von M13 für einzelsträngige DNA, wie es von J. Messing, *Methods Enzymol.* (1983) 101: 20–78 beschrieben wird.

[0060] Zusätzlich zu Standard-Klonierungstechniken können enzymatische in vitro-Verfahren wie z.B. Polymerase-katalysierte Reaktionen, verwendet werden. Zur Herstellung von RNA können T7-RNA-Polymerase und eine geeignete DNA-Matrize verwendet werden. Für DNA sind Polymerasekettenreaktion (PCR) und Einzelprimeramplifikation zweckdienlich.

[0061] Andere chemische Verfahren zur Polynukleotid- oder Oligonukleotidsynthese umfassen Phosphotriester- und Phosphodiester-Verfahren (Narang et al., *Meth. Enzymol.* (1979) 68:90) und Synthesen auf einem Träger (Beaucage et al., *Tetrahedron Letters.* (1981) 22:1859–1862) wie auch die Phosphoramidattechnik (M.H. Caruthers et al., *Methods in Enzymology* (1988) 154: 287–314 (1988) sowie andere, die in "Synthesis and Ap-

plications of DNA and RNA", S.A. Narang, Herausgeber, Academic Press, New York, 1987, und den darin enthaltenen Referenzen beschrieben sind.

[0062] Ende eines Oligonukleotids – wie der Ausdruck hier verwendet wird, bezieht er sich auf Nukleotide, einschließlich des terminalen Nukleotids, entweder an dem entgegengesetzten 3'- oder 5'-Ende eines Oligonukleotids.

[0063] Terminus eines Oligonukleotids – dieser Ausdruck bezieht sich, so wie er hier verwendet wird, auf das terminale Nukleotid, entweder am 3'- oder 5'-Ende eines Oligonukleotids.

[0064] Oligonukleotidprimer – ein Oligonukleotid, das üblicherweise in einer Kettenverlängerung an einer Polynukleotidmatrize verwendet wird, wie z.B. bei einer Amplifikation einer Nukleinsäure. Der Oligonukleotidprimer ist üblicherweise ein synthetisches Desoxynukleotid, das einzelsträngig ist, eine Sequenz an seinem 3'-Ende enthält, die fähig ist, mit einer definierten Sequenz eines Zielpolynukleotids zu hybridisieren.

[0065] Normalerweise hat ein Oligonukleotidprimer und insbesondere sein 3'-Ende vorzugsweise wenigstens 70 %, bevorzugter wenigstens 90 %, am bevorzugtesten 100 %, Komplementarität zu der definierten Sequenz. Die Anzahl von Nukleotiden in der hybridisierbaren Sequenz eines Oligonukleotidprimers, der an eine Zielpolynukleotidsequenz hybridisiert, sollte so sein, dass Stringenzbedingungen, die zum Hybridisieren des Oligonukleotidprimers verwendet werden, eine übermäßige statistische nicht-spezifische Hybridisierung verhindern werden. Die Zahl an Nukleotiden im Oligonukleotidprimer wird dieselbe wie in der definierten Sequenz eines Zielpolynukleotids sein, an das er bindet, nämlich wenigstens 12 Nukleotide, vorzugsweise wenigstens etwa 15 Nukleotide und im allgemeinen etwa 12 bis etwa 50 Nukleotide, vorzugsweise etwa 15 bis etwa 30 Nukleotide.

[0066] Modifiziertes Oligonukleotid – ein Oligonukleotid, das eine Modifikation hat; ein Oligonukleotid, das ein oder mehrere (i) natürliche Nukleotide, die sich von den vier allgemein anerkannten Nukleotiden unterscheiden und daher im Vergleich zu solchen Nukleotiden modifiziert sind, (ii) nicht-natürliche Nukleotide mit einer chemischen Modifikation (modifiziertes Nukleotid) (manchmal hierin als "Nukleotidanalogen" bezeichnet) im Vergleich zu einem Oligonukleotid, das ein unmodifiziertes Nukleotid hat, besitzt. Wenn das natürliche oder nicht-natürliche Nukleotid, das die Modifikation umfasst, durch die Bindungssubstanz gebunden ist, ist der Oligonukleotidprimer unfähig, entlang des Polynukleotids, an das er hybridieren könnte, verlängert zu werden. Folglich erfolgt keine Kettenverlängerung in einem wesentlichen Grad, wenn nicht und bis der Komplex zwischen der Bindungssubstanz und dem Oligonukleotidprimer dissoziiert ist und die Bindungssubstanz irreversibel denaturiert ist.

[0067] Die modifizierten Nukleotide für das modifizierte Oligonukleotid werden so ausgewählt, dass sie für eine ausreichende Bindung an die Bindungssubstanz sorgen, so dass das Oligonukleotid nicht fähig ist, zu einem wesentlichen Grad entlang eines Matrizenpolynukleotids verlängert zu werden. Die Bindungssubstanz sollte eine Bindungsaffinität für das modifizierte Nukleotid von wenigstens etwa 10^{-8} , üblicherweise etwa 10^{-9} bis etwa 10^{-11} haben.

[0068] Das modifizierte Oligonukleotid hat wenigstens ein modifiziertes Nukleotid, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 3 modifizierte Nukleotide, vorzugsweise in fortlaufender Folge. Das modifizierte Nukleotid kann in dem Teil des Oligonukleotidprimers sein, der an den entsprechenden Teil des Matrizenpolynukleotids bindet, oder das modifizierte Nukleotid kann am 3'-Terminus, dem 3'-Ende oder dem 5'-Ende sein. Wenn das modifizierte Nukleotid in dem Teil des Oligonukleotids ist, der an ein Zielpolynukleotid bindet, sollte das modifizierte Nukleotid nicht in der Lage sein, die Hybridisierung des Oligonukleotids an ein Zielpolynukleotid zu stören. Wenn das modifizierte Nukleotid eine solche Hybridisierung stört, wird es im allgemeinen vor einer Verlängerungsreaktion aus dem Oligonukleotid entfernt. In einigen Ausführungsformen ist das modifizierte Nukleotid wenigstens 1 bis 20 Nukleotide, üblicher etwa 1 bis 2 Nukleotide vom 3'-Terminus. Wie allerdings genauer im Folgenden erläutert wird, kann das modifizierte Nukleotid in der Nähe des 3'-Terminus oder am 3'-Terminus des Oligonukleotids lokalisiert sein und in dem Fall, dass ein solches modifiziertes Nukleotid mit der Hybridisierung des Oligonukleotids mit dem Zielpolynukleotid stört, wird dem Reaktionsgemisch ein Enzym zugesetzt, um das modifizierte Nukleotid vor einer Hybridisierung vom Oligonukleotid abzuspalten.

[0069] Eine beliebige Modifikation, die die Zwecke der vorliegenden Erfindung erfüllt, kann eingesetzt werden. Die Modifikation sollte eine sein, für welche eine Bindungssubstanz hergestellt oder erhalten werden kann. Die Modifikation muss eine Bindung der Bindungssubstanz an das modifizierte Oligonukleotid zulassen.

[0070] In einer Ausführungsform ist das modifizierte Nukleotid ein natürliches Nukleotid, das eine 3'-Hydroxylgruppe hat, die z.B. durch Bildung eines Esters, Amids, Sulfats oder Glycosids modifiziert worden ist und somit nicht kettenverlängerbar ist. Vorzugsweise ist ein derartiges modifiziertes Nukleotid hitze- oder lichtlabil und demnach ist das modifizierte Nukleotid entfernbar, wenn die Temperatur des Reaktionsmediums erhöht wird oder das Medium bestrahlt wird, je nach Fall. In einem anderen Ansatz kann ein solches modifiziertes Nukleotid enzymatisch entfernt werden. Andere Verfahren zur Entfernung eines solchen modifizierten Nukleotids werden dem Fachmann in Anbetracht der obigen Offenbarung einfallen. Wenn die Modifikation z.B. ein Ester ist, kann eine Entfernung gemäß der vorliegenden Erfindung durch ein Enzym erreicht werden, das eine thermisch stabile Esterase ist. Wenn alternativ ein Glycosid der 3'-Hydroxylgruppe verwendet wird, wird die glycosidische Spaltung durch eine thermisch stabile Glycosidase gespalten. Beispielsweise kann eine β -Galactosylgruppe an das 3'-Ende eines modifizierten Oligonukleotids gebunden sein, und im Reaktionsmedium kann eine thermisch stabile β -Galactosidase verwendet werden.

[0071] In einer anderen Ausführungsform ist die Modifikation so ausgewählt, dass das modifizierte Nukleotid oder die modifizierten Nukleotide durch ein Enzym, das 3'-Exonuklease-Aktivität hat, entfernt wird/werden, wenn das modifizierte Oligonukleotid nicht durch die Bindungssubstanz oder an ein Matrizenpolynukleotid gebunden ist. Ein Faktor bei der Selektion der modifizierten Nukleotide in diesem Ansatz ist die Spezifität der in einer Amplifikation verwendeten Polymerase. In diesem besonderen Ansatz ist das modifizierte Oligonukleotid üblicherweise eines, das ein modifiziertes Nukleotid oder mehrere modifizierte Nukleotide an seinem 3'-Ende hat. Anschließend an eine Dissoziation des Komplexes aus der Bindungssubstanz und dem modifizierten Oligonukleotid wird das letztgenannte einem Abbau durch Erhitzen mit einem Enzym, das 3'-Exonukleaseaktivität hat, unterworfen. Phosphorothioate können verwendet werden, um einen Teil des modifizierten Oligonukleotids gegenüber einem Abbau hinter der Phosphorothioatgruppe resistent zu machen.

[0072] Chemische Modifikationen eines natürlichen Nukleotids unter Herstellung eines unnatürlichen oder modifizierten Nukleotids werden hierin unten beispielhaft und ohne Beschränkung beschrieben. Ethenoadenosin hat eine Ethylenbrücke zwischen der 6-Aminogruppe und dem Ringstickstoff in Position 1, die eine mögliche Wasserstoffbindung blockiert. Weitere Modifikationen umfassen Alkylierung am 6-Sauerstoff von Guanin, dem 4-Sauerstoff von Thymin, den Ringstickstoffen in der 5-Position der Purine oder den 3-Positionen der Pyrimidine oder die Entfernung der 2-Aminogruppe von Guanin oder der 4-Aminogruppe von Cytosin. Andere heterocyclische Gruppen als Purine und Pyrimidine können ebenfalls verwendet werden. Diesbezüglich ist es vorteilhaft, Derivate zu verwenden, die in einer Form verkauft werden, die für eine Festzustandssynthese des modifizierten Oligonukleotids zweckdienlich ist, üblicherweise als Phosphorimidate. Andere Heterocylen umfassen z.B. Triazin, unsubstituiertes Pyrimidin, Pyridine, Deazapurine, Pyridopyrrole und dergleichen. Die besondere Struktur des modifizierten Nukleotids ist nicht kritisch, solange das Enzym es entfernen kann, wenn es nicht hybridisiert ist, und solange es keine Kettenverlängerung unterstützt.

[0073] Eine andere geeignete Modifikation gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein natürliches Nukleotid, das durch Einbau einer definierten Gruppierung in das natürliche Nukleotid modifiziert ist. Eine solche definierte Gruppierung ist ein kleines organisches Molekül. Typische Beispiele für solche kleinen Moleküle, die besondere Anwendung in der vorliegenden Erfindung finden, umfassen, lediglich zur Erläuterung und nicht zur Beschränkung, Fluorescein, Digitoxin, Biotin und dergleichen. Solche modifizierten Oligonukleotide können durch Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, hergestellt werden. Siehe z.B. "PCR Primer, A Laboratory Manual" herausgegeben von C.W. Duekster, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995).

[0074] Ein anderes Beispiel für eine geeignete Modifikation, die zur Erläuterung und nicht zur Beschränkung angeführt wird, ist ein Nukleotid, das an der Ribose modifiziert ist. Ribonukleotide sind Kandidaten, da Oligonukleotide, die in Ribonukleotiden enden, durch die meisten Polymerasen nicht verlängert werden können. Wenn Ribonukleotide verwendet werden, muss ein Enzym enthalten sein, das das Ribonukleotid aus dem modifizierten Oligonukleotid entfernen kann, wenn das modifizierte Oligonukleotid nicht an einen komplementären Strang hybridisiert ist, und dass das Ribonukleotid nicht einfach entfernen kann, wenn der Primer hybridisiert ist. Andere Beispiele für eine Modifikation der Ribose umfassen 3'-Desoxyderivate, einschließlich denen, in denen das 3'-Hydroxy durch eine andere Funktionalität als Wasserstoff ersetzt ist, z.B. durch eine Azidgruppe.

[0075] Viele modifizierte Nukleotide und Oligonukleotide, die solche modifizierten Nukleotide enthalten, sind im Handel verfügbar oder in der Literatur bekannt. Ethenodesoxy-A, O-6-Methyldesoxy-G und O-4-Methyldesoxy-T sind im Handel von Oligos Etc., Wilsonville, Oregon, erhältlich. Keine Wasserstoffbindenden Nukleoside werden von Moran et al. in *Nucleic Acids Research* (1996) 24(11): 2044-2052 diskutiert und umfassen 4-Methylindol- β -nukleosid, α -Naphthalinnukleosid, α -Pyrennukleosid und dergleichen. N3-(β -D-Ribofuranosid)-Derivate, z.B. 4-Amino-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon, und Oligonukleotide, die solche modifi-

zierten Nukleotide umfassen, sind von Charcruk et al., in *Helv. Chim. Acta* (1987) 70(3):717–725 offenbart. Huang et al. diskutieren Arabinosylcytosin-5'-triphosphat und andere modifizierte Nukleoside in *Cancer Res.* (1991) 51:6110–6117. Solomon et al. offenbaren C-verknüpfte Desoxyriboside von 2-Hydroxypyridin und 2-Hydroxychinolin in *Tetrahedron Letters* (1991) 32(28):3297–3300; siehe auch Solomon et al., *J. Org. Chem.* (1993) 58:2232–2243. Andere modifizierte Nukleoside und modifizierte Oligonukleotide können synthetisiert werden, indem gut bekannte Synthesetechniken verwendet werden.

[0076] Die chemische Modifikation kann in das zu modifizierte Oligonukleotid durch verschiedene gut bekannte Techniken, wie sie oben für die Herstellung von Oligonukleotiden allgemein beschrieben wurden, eingeführt werden. Es kann entweder eine biologische Synthese oder eine chemische Synthese verwendet werden. In einem Ansatz können Phosphotriester- und Phosphodiesterverfahren verwendet werden (Narang et al., supra) und eine Synthese an einem Träger (Beaucage et al., supra, wie auch Phosphoramidattechnik, M.H. Caruthers et al., supra, und andere, die in "Synthesis and Applications of DNA and RNA", S.A. Narang, Herausgeber, Academic Press, New York, 1987, und die darin enthaltenen Referenzen). Für eine Festphasen-DNA-Synthese, die die Phosphoramidattechnik verwendet, ist Glas mit kontrollierten Poren, das ein modifiziertes Nukleotid an der Oberfläche gebunden hat, verfügbar. Entsprechend kann sowohl eine automatisierte als auch eine manuelle Synthese durchgeführt werden. Modifizierte Oligonukleotide, die mehr als ein modifiziertes Nukleotid enthalten, können in ähnlicher Weise durch Addieren eines modifizierten Nukleotids, das ein 3'-Hydroxyl hat, an das ein anderes modifiziertes Nukleotid addiert werden kann, und Wiederholen dieses Prozesses hergestellt werden.

[0077] Zusätzlich zu Standard-Klonierungstechniken können enzymatische in vitro-Verfahren, z.B. Polymerase-katalysierte Reaktionen, verwendet werden. Zur Herstellung von RNA können T7-RNA-Polymerase und eine geeignete DNA-Matrize verwendet werden. Für DNA sind eine Polymerasekettenreaktion (PCR) und eine Einzelprimeramplifikation zweckdienlich.

[0078] In einem anderen Ansatz kann die 3'-Hydroxylgruppe eines natürlichen Nukleotids derivatisiert werden, indem ein einzelnes modifiziertes Nukleotid in Lösungsphase addiert wird.

[0079] Einige der oben zitierten Literaturstellen, die modifizierte Nukleotide offenbaren, die in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, beschreiben auch Synthesen von Oligonukleotiden, die die modifizierten Nukleotide enthalten. Siehe z.B. Solomon et al., *J. Org. Chem.* (1993) 58:2232–2243 und Charczuk et al., in *Helv. Chim. Acta* (1987) 70(3):717–725.

[0080] Bindungssubstanz – im Kontext der vorliegenden Erfindung ist eine Bindungssubstanz eine Substanz, die fähig ist, spezifisch an das modifizierte Oligonukleotid, insbesondere an das modifizierte Nukleotid (die modifizierten Nukleotide) des modifizierten Oligonukleotids zu binden. Die Bindungssubstanz ist normalerweise ein Protein, üblicherweise ein Antikörper, ein spezifisches Bindungsprotein, ein spezifischer Rezeptor oder dergleichen. Die Bindungssubstanz sollte fähig sein, auf der Basis von Temperatur aus dem Komplex mit dem modifizierten Oligonukleotid dissoziiert zu werden. Üblicherweise wird die Bindungssubstanz irreversibel aus einem solchen Komplex bei erhöhter Temperatur, d.h. einer Temperatur, bei der die Bindungssubstanz eine thermische Denaturierung durchmacht, dissoziiert.

[0081] Vorzugsweise dissoziierte Bindungssubstanz aus einem Komplex mit einem modifizierten Oligonukleotid bei einer Temperatur von etwa 45°C bis etwa 90°C, bevorzugter etwa 45°C bis etwa 60°C. Vorzugsweise ist die Temperatur ausreichend, um die Bindungssubstanz zu denaturieren.

[0082] Antikörper – ein Immunglobulin, das spezifisch an eine besondere räumliche und polare Organisation eines anderen Moleküls bindet und dadurch als komplementär damit definiert ist. Der Antikörper kann monoklonal oder polyklonal sein und kann durch Techniken, die auf dem Fachgebiet gut bekannt sind, z.B. Immunisierung eines Wirts und Sammeln von Seren (polyklonal) oder durch Herstellung kontinuierlicher Hybridzelllinien und Sammeln des sezernierten Proteins (monoklonal) oder durch Klonieren und Exprimieren von Nukleotidsequenzen oder mutagenisierten Versionen davon, die wenigstens für die Aminosäuresequenzen, die für die spezifische Bindung von natürlichen Antikörpern erforderlich sind, codieren, hergestellt werden. Antikörper können ein vollständiges Immunglobulin oder ein Fragment davon umfassen, wobei diese Immunglobuline die verschiedenen Klassen und Isotypen, z.B. IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3, IgM usw., beinhalten. Fragmente davon können Fab, Fv und F(ab')₂, Fab' und dergleichen und Einzelkettenanaloge davon umfassen. Außerdem können Aggregate, Polymere und Konjugate von Immunoglobulinen oder ihren Fragmenten verwendet werden, wo es geeignet ist, solange die Bindungsaffinität für ein besonderes Molekül aufrechterhalten wird.

[0083] Bei der Herstellung eines monoklonalen Antikörpers wird im allgemeinen ein Immunogen in eine Maus injiziert und nach einem ausreichenden Zeitraum wird die Maus getötet und Milzzellen werden erhalten. Die Milzzellchromosomen, die für gewünschte Immunglobuline codieren, werden durch Fusionieren der Milzzellen mit Myelomzellen oder mit Lymphomzellen, im allgemeinen in Gegenwart von Polyethylenglykol, immortalisiert. Die resultierenden Zellen, die die fusionierten Hybridome enthalten, werden in einem selektiven Medium, z.B. HAT-Medium, wachsen gelassen und die überlebenden Zellen werden in solchem Medium unter Verwendung limitierender Verdünnungsbedingungen wachsen gelassen. Die Zellen werden in einem geeigneten Behälter, z.B. Mikrotiter-Vertiefungen, wachsen gelassen und der Überstand wird auf monoklonale Antikörper, die die gewünschte Spezifität haben, durchgemustert.

[0084] Es existieren verschiedene Techniken zur Erhöhung der Ausbeuten an monoklonalen Antikörpern, z.B. Injektion der Hybridomzellen in eine peritoneale Höhle eines Säugerwirts, welcher die Zellen annimmt, und Ernten der Aszitesflüssigkeit. Wenn eine unzureichende Menge des monoklonalen Antikörpers in der Aszitesflüssigkeit gesammelt wird, wird der Antikörper aus dem Blut des Wirts gesammelt. Zur Isolierung und Reinigung der monoklonalen Antikörper gibt es verschiedene konventionelle Wege, um so die monoklonalen Antikörper von anderen Proteinen und anderen Kontaminanten zu befreien (siehe Kohler und Milstein, supra).

[0085] Phosphorothioat – ein Nukleotidmonophosphat, in dem ein Sauerstoff wenigstens eines Phosphats durch Schwefel ersetzt wurde. Ein Sauerstoff von 1 bis 5 Phosphaten kann durch Schwefel ersetzt sein, bevorzugter ist der Sauerstoff von 1 bis 2 Phosphaten ersetzt. Diese schwefelhaltigen modifizierten Oligonukleotide können nach bekannten Techniken hergestellt werden. Siehe z.B. WO 90/08838, WO 89/11486, US-Patent Nr. 4,910,300, EP 0 318 245.

[0086] Nukleosidtriphosphate – Nukleoside, die einen 5'-Triphosphat-Substituenten haben. Die Nukleoside sind Pentosezuckerderivate von Stickstoffbasen, die sich entweder von Purin oder Pyrimidin ableiten, kovalent an das 1'-Kohlenstoffatom des Pentosezuckers, der üblicherweise eine Desoxyribose oder eine Ribose ist, gebunden. Die Purinbasen umfassen Adenin (A), Guanin (G), Inosin und Derivate und Analoga davon. Die Pyrimidinbasen umfassen Cytosin (C), Thymin (T), Uracil (U) und Derivate und Analoga davon. Nukleosidtriphosphate umfassen Desoxyribonukleosidtriphosphate, z.B. dATP, dCTP, dGTP und dTTP, und Ribonukleosidtriphosphate, z.B. rATP, rCTP, rGTP und rUTP. Der Ausdruck "Nukleosidtriphosphate" umfasst auch Derivate und Analoga davon, wobei Beispiele dafür solche Derivate sind, die in ähnlicher Weise wie die nicht-derivatisierten Nukleosidtriphosphate erkannt und polymerisiert werden. Beispiele für solche Derivate oder Analoga sind, nur zur Erläuterung und nicht zur Beschränkung, solche, die mit einer Reportergruppe modifiziert sind, biotinyliert, Amin-modifiziert, radioaktiv markiert, alkyliert und dergleichen sind und auch Phosphorothioat, Phosphit, Ringatom-modifizierte Derivate und dergleichen umfassen. Die Reportergruppe kann eine fluoreszierende Gruppe, z.B. Fluorescein, eine chemilumineszente Gruppe, z.B. Luminol, ein Terbiumchelatlagerer, z.B. N-(Hydroxyethyl)ethylendiamintetraessigsäure, sein, die fähig ist, durch verzögerte Fluoreszenz und dergleichen detektiert zu werden. Der Ausdruck "Nukleosidtriphosphat" beinhaltet die Derivate und Analoga davon.

[0087] Nukleotidpolymerase – ein Katalysator, üblicherweise ein Proteinenzym, zur Bildung einer Verlängerung eines Oligonukleotids entlang einer DNA-Matrize, wobei die Verlängerung komplementär zur Matrize ist. Die Nukleotidpolymerase ist eine Matrize, die von Polynukleotidpolymerase abhängt und Nukleosidtriphosphate als Baublöcke zum Verlängern des 3'-Endes eines Oligonukleotids verwendet, um eine Sequenzkomplementarität mit dem einzelsträngigen Teil des Polynukleotids bereitzustellen, an das das Oligonukleotid unter Bildung einer Doppelhelix hybridisiert wird.

[0088] Die in der vorliegenden Erfindung einsetzbaren Nukleotidpolymerasen müssen unter den im vorliegenden Verfahren verwendeten Bedingungen stabil sein und sind üblicherweise thermisch stabile Nukleotidpolymerasen. Solche Enzyme können aus einer beliebigen Quelle, z.B. Zellen, Bakterien, wie z.B. E.coli, Pflanzen, Tieren, Virus, thermophilen Bakterien und so weiter stammen, wobei die Polymerase chemisch oder durch Gentechnik modifiziert sein kann, um für thermische Stabilität und/oder erhöhte Aktivität zu sorgen.

[0089] Üblicherweise sind die Katalysatoren Enzyme, z.B. DNA-Polymerasen. Solche Enzyme umfassen Pfu-DNA-Polymerase (native und rekombinante) von Stratagene, La Jolla, CA; Ultima-DNA-Polymerase von Perkin Elmer, Foster City, CA; r-Bst-DNA-Polymerase von Epicentre Technologies, Madison, WI; VENT-DNA-Polymerase von New England Biolabs, Beverly, MA; Tli-DNA-Polymerase von Promega Corp., Madison, WI, und Pwo-DNA-Polymerase von Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, und dergleichen. Siehe auch solche Enzyme, die in "PCR Primer", supra, auf den Seiten 4–5 ausgeführt sind, welche Tth-DNA-Polymerase, Tfi-DNA-Polymerase, Tbr-DNA-Polymerase, Hot Tub-DNA-Polymerase und dergleichen umfassen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Kombinationen aus zwei oder mehr der obigen Enzyme ent-

halten, z.B. eine Kombination von Taq und Pfu (100:1) usw.

[0090] 3'-zu-5'-Exonuklease – zu Zwecken der vorliegenden Erfindung wird ein Enzym als eine 3'-zu-5'-Exonuklease angesehen oder mit 3'-zu-5'-Exonukleaseaktivität angesehen, wenn es unter den Bedingungen der hierin betrachteten Reaktionen die Entfernung oder Abspaltung von Nukleotiden vom 3'-Ende eines modifizierten Oligonukleotids aus katalysiert, wenn ein solches modifiziertes Oligonukleotid nicht an eine Ziel-Polynukleotidsequenz hybridisiert ist, und das auch als Nukleotidpolymerase wirken kann (im zuletzt genannten Sinn kann es als Polymerase angesehen werden, die eine 3'-zu-5'-Exonuklease umfasst). Das Enzym spaltet Nukleotide des Nukleotidprimers wenigstens bis zu den modifizierten Nukleotiden und einschließlich der modifizierten Nukleotide. An einem solchen Punkt ist das abgebaute modifizierte Oligonukleotid an seinem 3'-Terminus verlängerbar und kann als Oligonukleotidprimer wirken, wenn es an die Ziel-Polynukleotidsequenz hybridisiert ist. Einige der Nukleotidpolymerasen, die oben genannt wurden, haben auch 3'-zu-5'-Exonukleaseaktivität.

[0091] Polynukleotidanalyt – eine Verbindung oder Zusammensetzung, die in einem Assay zu messen ist; ein polymeres Nukleotid, welches in intaktem natürlichem Zustand etwa 20 bis 500.000 oder mehr Nukleotide haben kann, und in einem isolierten Zustand etwa 30 bis 50.000 oder mehr Nukleotide, üblicherweise etwa 100 bis 20.000 Nukleotide, häufiger 500 bis 10.000 Nukleotide haben kann. Es ist somit offensichtlich, dass eine Isolierung des Analyten aus dem natürlichen Zustand oft in einer Fragmentierung resultiert. Die Polynukleotidanalysen umfassen Nukleinsäuren aus einer beliebigen Quelle in gereinigter oder ungereinigter Form, einschließlich DNA (dsDNA und ssDNA), cDNA und andere synthetische DNA-Formen, und RNA, einschließlich t-RNA, m-RNA, r-RNA, mitochondriale DNA und RNA, Chloroplasten-DNA und -RNA, DNA-RNA-Hybride oder Gemische davon, Gene, Chromosome, Plasmide, die Genome von biologischem Material, z.B. Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, Hefen, Viren, Viroide, Schimmel, Pilze, Pflanzen, Tiere, Menschen und Fragmente davon und dergleichen. Der Polynukleotidanalyt kann nur eine geringere Fraktion eines komplexen Gemisches, wie z.B. einer biologischen Probe sein. Der Analyt kann aus verschiedenen biologischen Materialien durch Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, erhalten werden. Einige Beispiele für solche biologischen Materialien sind zur Erläuterung und nicht zur Beschränkung im US-Patent Nr. 5,508,178 (Rose et al.) offenbart.

[0092] Vollständig oder partiell sequenziell – wenn Reagenzien, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, anders als zusammen (gleichzeitig) kombiniert werden, kann eines oder mehrere mit einem anderen oder mehreren der restlichen Reagenzien unter Bildung einer Subkombination kombiniert werden. Jede Subkombination kann dann einem oder mehreren Schritten des erfindungsgemäßen Verfahrens unterworfen werden. So kann jede der Subkombinationen unter Bedingungen inkubiert werden, um eines oder mehrere der gewünschten Resultate zu erreichen.

[0093] Hybridisierung (Hybridisieren) – im Kontext von Nukleotidsequenzen werden diese Ausdrücke hier austauschbar verwendet. Die Fähigkeit von zwei Nukleotidsequenzen, miteinander zu hybridisieren, basiert auf dem Komplementaritätsgrad der zwei Nukleotidsequenzen, der wiederum auf der Fraktion von passenden komplementären Nukleotidpaaren basiert. Je mehr Nukleotide in einer gegebenen Sequenz komplementär zu denen einer anderen Sequenz sind, desto stringenter können die Bedingungen zur Hybridisierung sein und um so spezifischer wird die Bindung der zwei Sequenzen sein. Eine erhöhte Stringenz wird durch Erhöhen der Temperatur, Erhöhen des Verhältnisses von Co-Lösungsmitteln, Senken der Salzkonzentration und dergleichen erreicht.

[0094] Homolog oder im wesentlichen identisch – im allgemeinen sind zwei Polynukleotidsequenzen, die identisch sind oder an dieselbe Polynukleotidsequenz hybridisieren können, homolog. Die zwei Sequenzen sind homolog oder im wesentlichen identisch, wenn die Sequenzen jeweils mindestens 90 %, vorzugsweise 100 % derselben oder analogen Basensequenz haben, wobei Thymin (T) und Uracil (U) als gleich angesehen werden. Demnach werden die Ribonukleotide A, U, C und G als zu den Desoxynukleotiden dA, dT, dC bzw. dG angenommen. Homologe Sequenzen können beide DNA sein oder eine kann DNA und die andere RNA sein.

[0095] Komplementär – zwei Sequenzen sind komplementär, wenn die Sequenz von einer an die Sequenz der anderen in antiparallelem Sinn binden kann, wobei das 3'-Ende der jeweiligen Sequenz an das 5'-Ende der anderen Sequenz bindet und jedes A, T(U), G und C einer Sequenz dann mit T(U), A, C und G der anderen Sequenz ausgerichtet wird.

[0096] Kopie einer Sequenz – eine Sequenz, die eine direkte identische Kopie einer einzelsträngigen Polynu-

kleotidsequenz ist, wie sie von einer Sequenz, die zu der Sequenz eines solchen einzelsträngigen Polynukleotids komplementär ist, unterschieden wird.

[0097] Mitglied eines spezifischen Bindungspaares ("sbp-Mitglied") – eines von zwei verschiedenen Molekülen, die einen Bereich an der Oberfläche oder in einem Hohlraum haben, der spezifisch an eine bestimmte räumliche und polare Organisation des anderen Moleküls bindet und dadurch als komplementär definiert ist. Die Mitglieder des spezifischen Bindungspaares werden als Ligand und Rezeptor (Antiligand) bezeichnet. Diese können Glieder eines immunologischen Paares, z.B. Antigen-Antikörper, sein oder können Operator-Repressor, Nuklease-Nukleotid, Biotin-Streptavidin, Hormone-Hormonrezeptoren, Nukleinsäure-Doppelhelices, IgG-Protein A, DNA-DNA, DNA-RNA und dergleichen sein.

[0098] Ligand – eine beliebige Verbindung, für welche natürlicherweise ein Rezeptor existiert oder hergestellt werden kann.

[0099] Rezeptor ("Antiligand") – eine beliebige Verbindung oder Zusammensetzung, die fähig ist, eine bestimmte räumliche und polare Organisation eines Moleküls, z.B. eine Epitopen- oder Determinanten-Stelle, zu erkennen. Typische Rezeptoren umfassen natürlich vorkommende Rezeptoren, z.B. Thyroxinbindendes Globulin, Antikörper, Enzyme, Fab-Fragmente, Lectine, Nukleinsäuren, Repressoren, Schutzenzyme, Protein A, Komplementkomponente C1q, DNA-bindende Proteine oder Liganden und dergleichen.

[0100] Kleines organisches Molekül – eine Verbindung mit einem Molekulargewicht von weniger als 1500, vorzugsweise 100 bis 1000, bevorzugter 300 bis 600, z.B. Biotin, Fluorescein, Rhodamin und andere Farbstoffe, Tetracyclin und andere Protein-bindende Moleküle und Haptene usw. Das kleine organische Molekül kann ein Mittel zur Bindung einer Nukleotidsequenz an eine Markierung oder einen Träger bereitstellen.

[0101] Träger oder Oberfläche – ein poröses oder nicht-poröses, in Wasser unlösliches Material. Der Träger kann hydrophil sein oder fähig sein, hydrophil gemacht zu werden, und umfasst anorganische Pulver, z.B. Siliciumdioxid, Magnesiumsulfat und Aluminiumoxid; natürliche Polymermaterialien, insbesondere Cellulosematerialien und Materialien, die von Cellulose abgeleitet sind, z.B. faserhaltige Papiere, z.B. Filterpapier, chromatographisches Papier usw.; synthetische oder modifizierte natürlich vorkommende Polymere, z.B. Nitrocellulose, Celluloseacetat, Polyvinylchlorid, Polyacrylamid, vernetztes Dextran, Agarose, Polyacrylat, Polyethylen, Polypropylen, Poly(4-methylbuten), Polystyrol, Polymethacrylat, Polyethylenterephthalat, Nylon, Polyvinylbutyrat usw.; die entweder als solche oder in Verbindung mit anderen Materialien verwendet werden, Glas, das als Bioglas, verfügbar ist, Keramik, Metall und dergleichen. Natürliche oder synthetische Systeme wie z.B. Liposome, Phospholipidvehikel und Zellen können ebenfalls verwendet werden.

[0102] Bindung von sbp-Gliedern an einen Träger oder eine Oberfläche kann durch gut bekannte Techniken, die allgemein in der Literatur verfügbar sind, erreicht werden. Siehe z.B. "Immobilized Enzymes", ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978) und Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970). Die Oberfläche kann eine beliebige aus einer Reihe von Formen haben, z.B. Streifen, Stab, Partikel, einschließlich Perle, und dergleichen.

[0103] Markierungs- oder Reportergruppe oder Reportermolekül – ein Glied des Signal-produzierenden Systems. Üblicherweise ist die Markierungs- oder Reportergruppe oder das Markierungs- oder Reportermolekül an eine Polynukleotidsonde oder einen Oligonukleotidprimer konjugiert oder wird daran gebunden und ist fähig, direkt detektiert zu werden oder ist durch eine spezifische Bindungsreaktion, welche ein detektierbares Signal produziert, detektierbar. Markierungen umfassen einen Polynukleotidprimer oder eine spezifische Polynukleotidsequenz, die eine Matrize zur Amplifikation oder Ligation bereitstellen kann, oder die als Ligand wirken kann, z.B. für ein Repressorprotein. Vorzugsweise wird ein Oligonukleotidprimer eine Markierung haben oder im Stande sein, eine Markierung zu haben. Im allgemeinen kann eine beliebige Markierung, die detektierbar ist, verwendet werden. Die Markierung kann isotopisch oder nicht-isotopisch sein, ist üblicherweise nicht isotopisch, und kann ein Katalysator sein, z.B. ein Enzym, ein Polynukleotid, das für einen Katalysator codiert, ein Promotor, Farbstoff, fluoreszierendes Molekül, eine chemilumineszierende Substanz, ein Co-Enzym, ein Enzymsubstrat, eine radioaktive Gruppe, ein kleines organisches Molekül, eine amplifizierbare Polynukleotidsequenz, ein Partikel, wie z.B. ein Latex- oder Kohlepartikel, Metallsol, Kristallit, Liposom, eine Zelle usw., der/die/das mit einem Farbstoff, einem Katalysator oder einer anderen detektierbaren Gruppe und dergleichen weiter markiert sein kann oder nicht. Die Markierung ist ein Glied ein Signal-produzierenden Systems und kann entweder allein oder zusammen mit anderen Gliedern des Signal-produzierenden Systems ein detektierbares Signal erzeugen. Die Markierung kann direkt an eine Nukleotidsequenz gebunden sein oder kann an sie gebunden werden, indem sie an ein sbp-Mitglied gebunden wird, das komplementär zu einem sbp-Mitglied ist,

das an eine Nukleotidsequenz gebunden ist.

[0104] Signal-produzierendes System – das Signal-produzierende System kann eine Komponente oder mehrere Komponenten haben, wobei wenigstens eine Komponente die Markierungs- oder Reportergruppe ist. Das Signal-produzierende System erzeugt ein Signal, das zum Vorliegen oder zur Menge einer Zielpolynukleotidsequenz oder eines Polynukleotidanalyten in einer Probe in Verbindung steht. Das Signal-produzierende System beinhaltet alle Reagenzien, die zur Erzeugung eines messbaren Systems erforderlich sind. Wenn die Markierung nicht an eine Nukleotidsequenz konjugiert ist, ist die Markierung normalerweise an ein sbp-Mitglied gebunden, das komplementär zu einem sbp-Mitglied ist, das an eine Nukleotidsequenz gebunden ist oder Teil einer Nukleotidsequenz ist. Andere Komponenten des Signal-produzierenden Systems können in einer Entwicklerlösung enthalten sein und können Substrate, Enhancer, Aktivatoren, chemilumineszente Verbindungen, Co-Faktoren, Inhibitoren, Fängerverbindungen, Metallionen, spezifische Bindungssubstanzen, die zur Bindung von Signal-erzeugenden Substanzen erforderlich sind, und dergleichen umfassen. Andere Komponenten des Signal-produzierenden Systems können Co-Enzyme, Substanzen, die mit Enzymprodukten reagieren, andere Enzyme und Katalysatoren sein. Das Signal-produzierende System stellt ein Signal bereit, das durch externe Mittel, durch Verwendung elektromagnetischer Strahlung, wünschenswerterweise durch visuelle Untersuchung, detektierbar ist. Das Signal-produzierende System wird vollständiger im US-Patent Nr. 5,508,178 (Rose et al.) beschrieben.

[0105] Hilfsmaterialien – in den Verfahren und Assays, die gemäß der vorliegenden Erfindung durchgeführt werden, werden häufig verschiedene Hilfsmaterialien verwendet werden. Zum Beispiel werden im Assaymedium normalerweise Puffer vorliegen, ebenso wie Stabilisatoren für das Assaymedium und die Assaykomponenten. Zusätzlich zu diesen Additiven können häufig Proteine, z.B. Albumine, organische Lösungsmittel, wie z.B. Formamid, quaternäre Ammoniumsalze, Polykationen, z.B. Dextransulfat, oberflächenaktive Mittel, insbesondere nicht-ionische oberflächenaktive Mittel, Bindungsenhancer, z.B. Polyalkylenglykole, oder dergleichen enthalten sein.

[0106] Wie oben erwähnt wurde, sorgt die vorliegende Erfindung in ihrem breitesten Aspekt für eine selektive Verlängerung eines Oligonukleotidprimers entlang einer Zielpolynukleotidsequenz in einem Gemisch von Polynukleotiden. Eine besondere Anwendung des Verfahrens ist die Amplifikation von Nukleinsäuren, wobei ein modifiziertes Oligonukleotid verwendet wird, das einen Teil hat, der die Modifikation umfasst und an die Nukleinsäure hybridisierbar ist. Die Modifikation kann durch eine Bindungssubstanz gebunden sein, um das modifizierte Oligonukleotid unfähig zu machen, durch die bei einer Amplifikation verwendete Polymerase verlängert zu werden.

[0107] In dem Verfahren wird ein Oligonukleotidprimer kontrollierbar und selektiv entlang einer Zielpolynukleotidsequenz in einem Gemisch von Polynukleotiden verlängert. Das Gemisch wird in Kombination mit einem modifizierten Oligonukleotid, das ein nicht natürliches Nukleotid umfasst, und mit einer Bindungssubstanz, die für das nicht natürliche Nukleotid spezifisch ist, bereitgestellt. Eine kontrollierte Freisetzung des modifizierten Oligonukleotidprimers wird erreicht, indem die Temperatur des Gemisches auf einen Level eingestellt wird, der ausreicht, um die Bindungssubstanz irreversibel aus dem Komplex mit dem modifizierten Oligonukleotidprimer freizusetzen. Der Oligonukleotidprimer wird in situ freigesetzt und der Oligonukleotidprimer bindet selektiv an die Zielpolynukleotidsequenz und wird entlang dieser verlängert. Eine Bindung des Oligonukleotidprimers an irrelevante Polynukleotide wird im wesentlichen verringert. Dementsprechend wird eine Verlängerung des Oligonukleotidprimers entlang beliebiger anderer Polynukleotide als der Zielpolynukleotidsequenz im Reaktionsgemisch, die üblicherweise bei Temperatur unter der, die zur Freisetzung des Primers aus dem Komplex benötigt wird, auftritt, vermieden.

[0108] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist in [Fig. 1](#) gezeigt. In dieser Ausführungsform wird eine Amplifikation einer Zielpolynukleotidsequenz (target polynucleotide sequence (TPS)) durch PCR-Amplifikation als Beispiel und nicht als Beschränkung gewählt. TPS wird in einem geeigneten gepufferten wässrigen Medium mit modifiziertem Oligonukleotid- OP1 und Oligonukleotidprimer OP2 kombiniert, die fähig sind, an einen oder den anderen Strang der doppelsträngigen TPS zu hybridisieren. OP1 enthält modifiziertes Nukleotid MN1. In dem Reaktionsgemisch ist auch eine proteinartige Bindungssubstanz (BS), z.B. ein Antikörper für MN1, enthalten. BS bindet an MN1 und verhindert, dass MO1 entlang TPS verlängert wird. Dementsprechend kann OP1, wenn es durch BS gebunden ist, nicht entlang TPS verlängert werden, noch kann es entlang irrelevanter DNA verlängert werden, an das es hybridisieren könnten. Im Medium enthalten sind auch Nukleosidtriphosphate (NTPs) und eine Nukleotidpolymerase NP. Die Temperatur des Mediums ist relativ niedrig, sie ist z.B. 20°C bis 45°C. Die Bindungssubstanz BS wird von OP1 dissoziiert und denaturiert, wenn die Temperatur des Reaktionsmediums erhöht wird. Wenn die Temperatur erhöht wird (bezeichnet durch Δ) werden folglich

Komplexe von BS mit OP1 dissoziiert und BS wird denaturiert, wobei freie Oligonukleotidprimer OP1 und denaturierte Bindungssubstanz DBS erhalten werden. Wenn die Temperatur auf etwa 50°C bis 80°C während des nächsten Zyklus und in Gegenwart der Nukleosidtriphosphate und Nukleotidpolymerase gesenkt wird, hybridisiert OP1 an den Strang von TPS und wird entlang des Strangs von TPS verlängert, an welche er selektiv hybridisiert, um verlängerten OP1 (EOP1) zu bilden. Bei der erhöhten Temperatur ist eine Bindung von Nukleotidsequenz an eine andere selektiver, so dass OP1, der in relativ niedriger Konzentration vorliegt, selektiv ein TPS bindet und die Menge, die an irrelevante DNA gebunden werden kann, sehr deutlich reduziert ist. Als Resultat sind Hintergrundprodukte stark vermindert. OP2 wird ebenfalls entlang des Strangs von TPS, an den er hybridisiert, um verlängerten OP2 (EOP2) zu bilden, verlängert. Thermisches Cycling resultiert in der Produktion von mehreren Kopien von TPS. Eine Kontrolle der Temperatur resultiert somit in einer bevorzugten Verlängerung von OP1 entlang TPS durch die kontrollierte Denaturierung des Komplexes zwischen BS und OP1.

[0109] Um den Effekt zu verstärken, der in PCR durch Anwendung der vorliegenden Erfindung erreicht wird, ist OP2 modifiziert und enthält modifiziertes Nukleotid MN2.

[0110] Was [Fig. 2](#) angeht, so wird TPS in einem geeigneten gepufferten wässrigen Medium mit zwei verschiedenen Oligonukleotidprimern, modifiziertem Oligonukleotidprimer OP1 und modifiziertem Oligonukleotidprimer OP2, die jeweils fähig sind, an einen der Stränge der doppelsträngigen TPS zu hybridisieren, kombiniert. Im Reaktionsmedium ist zusammen mit Bindungssubstanz BS1 Bindungssubstanz BS2 enthalten. Die Bindungssubstanzen können gleich oder unterschiedlich sein, was davon abhängt, ob das modifizierte Nukleotid in OP1 dasselbe wie das modifizierte Nukleotid in OP2 ist oder davon verschieden ist. BS1 bindet MN1 und verhindert, dass OP1 entlang TPS verlängert wird, und BS2 bindet an MN2 und verhindert, dass OP2 entlang TPS verlängert wird. Folglich kann OP1, wenn er an BS1 gebunden ist, nicht entlang TPS, noch entlang einer irrelevanten DNA, an die er hybridisieren könnte, nicht verlängert werden. Entsprechend kann OP2, wenn er durch BS2 gebunden ist, weder entlang TPS, noch entlang einer beliebigen irrelevanten DNA, an die er hybridisieren könnte, verlängert werden. In dem Medium sind auch Nukleosidtriphosphate (NTPs) und eine Nukleotidpolymerase NP enthalten. Die Temperatur des Mediums ist relativ niedrig, ist z.B. etwa 20°C bis 45°C. Die Bindungssubstanzen BS1 und BS2 werden von OP1 bzw. OP2 dissoziiert und werden denaturiert, wenn die Temperatur des Reaktionsmediums erhöht wird. Wenn die Temperatur erhöht wird (gekennzeichnet durch Δ) werden entsprechend Komplexe von BS1 mit OP1 und von BS2 mit OP2 dissoziiert und BS1 und BS2 werden denaturiert, wodurch freie Oligonukleotidprimer, OP1 und OP2, und denaturierte Bindungssubstanzen, DBS1 und DBS2, erhalten werden. Wenn die Temperatur etwa 50°C bis 80°C während des nächsten Zyklus und in Gegenwart der Nukleosidtriphosphate und Nukleotidpolymerase gesenkt wird, wird OP1 entlang des Strangs von TPS, an die er hybridisiert, verlängert, wodurch verlängerter OP1 (EOP1) produziert wird, und auch OP2 wird entlang dem Strang von TPS, an die er hybridisiert wird, verlängert, wodurch verlängerter OP2 (EOP2) produziert wird. Wie oben in der Ausführungsform von [Fig. 1](#) führt ein fortgesetztes thermisches Cycling zur Produktion von multiplen Kopien von TPS.

[0111] In der Anwendung der vorliegenden Erfindung auf eine PCR-Amplifikation von Nukleinsäuren wird das Reaktionsmedium im allgemeinen zwischen zwei bis drei Temperaturen cyclisiert. Das Hauptprinzip in der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass eine Verlängerung des Oligonukleotidprimers an der Zielpolynukleotidsequenz nur bei erhöhter Temperatur erfolgt, wenn die Bindung relativ selektiv ist. Auf diese Weise wird eine Verlängerung des Oligonukleotidprimers entlang irrelevanter Polynukleotidsequenzen minimiert.

[0112] Dementsprechend wird die Temperatur des Reaktionsgemisches auf einen Level eingestellt, der ausreichend ist, um die Bindungssubstanz aus dem modifizierten Oligonukleotidprimer zu dissoziieren. Im allgemeinen wird die Temperatur auf etwa 40°C bis etwa 100°C, vorzugsweise 50°C bis etwa 90°C erhöht. Die Zeit für diesen Dissoziierungsschritt ist üblicherweise etwa 2 bis etwa 300 Sekunden, noch üblicher etwa 30 bis etwa 240 Sekunden. Bei der Durchführung der Verfahren wird nach diesem Schritt das Medium zwischen zwei und drei Temperaturen cyclisiert. Die Temperaturen für die Verfahren liegen im allgemeinen im Bereich von etwa 10°C bis etwa 105°C, üblicher von etwa 40°C bis etwa 99°C, vorzugsweise von 50°C bis etwa 98°C. Die genauen Temperaturen können in Abhängigkeit von den Salzkonzentrationen, dem pH, den verwendeten Lösungsmitteln, der Länge und der Zusammensetzung der Zielpolynukleotidsequenz und dem Primer variiert werden. Es liegt im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass der Dissoziierungsschritt Teil eines Anfangszyklus in der Amplifikationsreaktion ist.

[0113] Relativ niedrige Temperaturen von etwa 30 bis etwa 75°C können für die Verlängerungsschritte verwendet werden, während eine Denaturierung und Hybridisierung bei Temperaturen von etwa 50 bis etwa 105°C durchgeführt werden können. Wie oben erwähnt wurde, hat das Reaktionsmedium zu Beginn eine Temperatur von etwa 20°C bis 45°C, vorzugsweise von etwa 25°C bis etwa 35°C. Für die Hybridisierungs- oder

Annealingschritte werden relativ niedrige Temperaturen von etwa 50°C bis etwa 80°C, vorzugsweise 50°C bis etwa 70°C, angewendet, während eine Denaturierung bei einer Temperatur von etwa 80°C bis etwa 100°C, vorzugsweise 90°C bis etwa 95°C durchgeführt wird und eine Verlängerung bei einer Temperatur von etwa 70°C bis etwa 80°C, üblicherweise etwa 72°C bis etwa 74°C durchgeführt wird.

[0114] Die Amplifikation wird für eine Zeit durchgeführt, die ausreicht, um eine gewünschte Kopienzahl zu erreichen. Im allgemeinen beträgt der Zeitraum zur Durchführung des Verfahrens etwa 10 s bis etwa 10 min pro Zyklus, und es kann eine beliebige Anzahl von Zyklen von 1 bis zu einer Höhe von etwa 60 oder mehr, üblicherweise 10 bis etwa 50, häufig etwa 20 bis etwa 45 eingesetzt werden. Aus Gründen der Zweckdienlichkeit ist es üblicherweise erwünscht, den Zeitraum und die Anzahl der Zyklen zu minimieren. Im allgemeinen kann der Zeitraum für einen gegebenen Amplifikationsgrad minimiert werden, z.B. indem Konzentrationen an Nukleosidtriphosphat ausgewählt werden, die ausreichen, um die Nukleotidpolymerase zu saturieren, indem die Konzentrationen an Polynukleotidpolymerase und Polynukleotidprimer erhöht werden und indem ein Reaktionsbehälter verwendet wird, der für eine rasche thermische Äquilibration sorgt. Im allgemeinen liegt der Zeitraum zur Durchführung der Amplifikation in dem Verfahren der Erfindung im Bereich von etwa 5 bis etwa 200 min. Aus Zweckdienlichkeitsgründen wird es üblicherweise wünschenswert sein, den Zeitraum zu minimieren.

[0115] Bei der Durchführung der Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung, einschließlich Amplifikation, wird ein wässriges Medium verwendet. Es können auch andere polare Co-Lösungsmittel verwendet werden, und zwar üblicherweise oxygenierte organische Lösungsmittel mit 1 bis 6, üblicherweise 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, einschließlich Alkohole, Ether und dergleichen. Üblicherweise liegen diese Co-Lösungsmittel, wenn sie verwendet werden, in einer Menge von weniger als etwa 70 Gew.-%, üblicherweise in einer Menge von weniger als etwa 30 Gew.-% vor.

[0116] Der pH für das Medium liegt üblicherweise im Bereich von etwa 4,5 bis etwa 9,5, noch üblicher im Bereich von etwa 5,5 bis etwa 8,5 und vorzugsweise im Bereich von etwa 6 bis etwa 8. Der pH und die Temperatur werden je nach Fall ausgewählt und variiert, um so entweder gleichzeitig oder sequenziell eine Dissoziation der Bindungssubstanz und des modifizierten Oligonukleotidprimers und beliebiger interner hybridisierter Sequenzen, eine Hybridisierung von Oligonukleotidprimer mit der Zielpolynukleotidsequenz, einen Abbau des 3'-Endes des Oligonukleotidprimers, der an die Zielpolynukleotidsequenz hybridisiert ist, eine Verlängerung des Primers (der Primer) und eine Dissoziation des verlängerten Primers (der verlängerten Primer) zu bewirken. In einigen Fällen wird ein Kompromiss der Optimierung der Geschwindigkeit, Effizienz und Spezifität dieser Schritte gemacht, und zwar in Abhängigkeit davon, ob es gewünscht wird, die obigen Schritte sequenziell oder gleichzeitig durchzuführen. Es können verschiedene Puffer verwendet werden, um den gewünschten pH zu erreichen und den pH während der Bestimmung aufrecht zu halten. Typische Puffer umfassen Borat-, Phosphat-, Carbonat-, Tris-, Barbitalpuffer und dergleichen. Der bestimmte Puffer, der verwendet wird, ist für diese Erfindung nicht kritisch, allerdings kann in einzelnen Verfahren ein Puffer gegenüber einem anderen bevorzugt sein.

[0117] Die Konzentration der Nukleotidpolymerase wird so gewählt, dass sie ausreicht, um eine Kettenverlängerung zu erreichen. Die Konzentration der Polymerase wird üblicherweise empirisch bestimmt. Vorzugsweise wird eine Konzentration verwendet, die ausreichend ist, so dass eine weitere Erhöhung bei der Konzentration die Zeit für die Amplifikation nicht um das Fünffache, vorzugsweise das Zweifache, verringert. Der primäre limitierende Faktor ist im allgemeinen der Preis des Reagenses.

[0118] Gemäß einem Aspekt der Erfindung kann ein Enzym, das 3'-zu-5'-Exonukleaseaktivität hat, notwendig sein, wie es oben erläutert wurde. In diesem Fall sollte die Konzentration eines solchen Enzyms ausreichen, um den erforderlichen Abbaulevel des Oligonukleotidprimers, der das modifizierte Nukleotid (die modifizierten Nukleotide) enthält, zu realisieren, aber keinen vorzeitigen Abbau des Primers zu erreichen. Die Konzentration ist üblicherweise etwa 0,1 bis 10 Einheiten pro 100 µl Reaktionsvolumen, vorzugsweise 1 bis etwa 5 Einheiten pro 100 µl Reaktionsvolumen.

[0119] Die Menge der Zielpolynukleotidsequenz, die zu kopieren ist, kann so niedrig wie ein oder zwei Moleküle in einer Probe sein, kann aber im allgemeinen von etwa 10 bis etwa 10^{10} , üblicher von etwa 10 bis 10^8 Moleküle in einer Probe variieren, ist vorzugsweise wenigstens 10^{-21} M in der Probe und kann 10^{-10} bis etwa 10^{-19} M, noch üblicher 10^{-14} bis etwa 10^{-19} M sein.

[0120] Die Menge des modifizierten Oligonukleotids wird durch die Menge an Oligonukleotidprimer, die für die besondere Amplifikation oder andere Reaktion, auf die die vorliegende Erfindung angewendet wird, notwendig ist, gelenkt werden. Die Menge an Oligonukleotidprimer wird wenigstens so groß sein wie die gewünschte Ko-

pienzahl und wird üblicherweise etwa 1×10^{-10} bis etwa 1×10^{-6} mol pro Probe sein, wobei die Probe etwa 1 bis etwa 1.000 μl ist. Üblicherweise wird der Primer (werden die Primer) mit wenigstens etwa 0,1 μM , vorzugsweise etwa 0,5 μM , vorliegen. Vorzugsweise ist die Konzentration des Oligonukleotidprimers (der Oligonukleotidprimer) im wesentlichen gegenüber der Konzentration der Zielpolynukleotidsequenz im Überschuss, vorzugsweise wenigstens etwa 1×10^{14} mal größer als die Konzentration der Zielpolynukleotidsequenz.

[0121] Die Menge der Bindungssubstanz wird durch die Menge des modifizierten Oligonukleotidprimers gesteuert. Im allgemeinen liegt die Bindungssubstanz in wenigstens einer äquivalenten Menge bezüglich der Menge der modifizierten Oligonukleotidprimer vor und kann im Vergleich zur Menge des modifizierten Oligonukleotidprimers im Überschuss vorliegen, so dass im wesentlichen der gesamte modifizierte Oligonukleotidprimer durch die Bindungssubstanz gebunden ist. Die Menge an Bindungssubstanz ist vorzugsweise wenigstens 1 bis 2 mal größer als die Konzentration des modifizierten Oligonukleotidprimers.

[0122] Die Konzentration der Desoxynukleosidtriphosphate im Medium kann in großem Umfang variieren; vorzugsweise sind die Reagenzien in einer Überschussmenge vorhanden. Die Desoxynukleosidtriphosphate liegen üblicherweise mit etwa 10^{-6} bis etwa 10^{-2} M, vorzugsweise etwa 10^{-5} bis 10^{-3} M vor.

[0123] Die Reihenfolge des Kombinierens der verschiedenen Reagenzien unter Bildung der Kombination kann variieren. Im allgemeinen wird das Zielpolynukleotid aus einer Probe erhalten, die ein solches Polynukleotid oder einen Polynukleotidanalyten, der behandelt wurde, um ein solches Polynukleotid zu erhalten, enthält. Im allgemeinen werden die Oligonukleotidprimer mit Desoxynukleotidtriphosphaten und Verbindungssubstanz kombiniert. Als Nächstes wird Nukleotidpolymerase zugesetzt, gefolgt vom Zielpolynukleotid. Allerdings kann ein gleichzeitiger Zusatz aller oben genannten wie auch eine schrittweise Zugabe oder sequenzielle Zugabe angewendet werden.

[0124] Die Konzentration und die Reihenfolge des Zusatzes von Reagenzien und die Bedingungen für das Verfahren werden im allgemeinen von dem Wunsch, die Kopienzahl des verlängerten Primers (der verlängerten Primer) und die Rate, mit der solche Kopien gebildet werden, sowie die Replikationsgenauigkeit bestimmt. Im allgemeinen ist es wünschenswert, die Kopienzahl des verlängerten Primers um wenigstens einen Faktor von etwa 10^2 , vorzugsweise einen Faktor von etwa 10^4 , bevorzugter von etwa 10^6 oder mehr zu erhöhen.

[0125] Bei Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, wie es auf die Detektion eines Polynukleotidanalyten angewendet wird, können Betrachtungen bezüglich Medium, pH, Temperatur und Zeiten wie oben beschrieben sein.

[0126] Obgleich die Konzentrationen der verschiedenen Reagenzien im allgemeinen durch den Konzentrationsbereich von Interesse des Polynukleotidanalyten bestimmt werden, wird die Endkonzentration von vielen der Reagenzien normalerweise empirisch bestimmt, um die Empfindlichkeit des Assays über den Bereich von Interesse zu optimieren. Die Konzentration der anderen Reagenzien in einem Assay wird im allgemeinen nach den selben Prinzipien, wie sie oben angegeben wurden, bestimmt. Die primäre Betrachtung ist die, dass eine ausreichende Kopienzahl des verlängerten Primers (der verlängerten Primer) für die Polynukleotidanalytensequenz produziert wird, so dass solche Kopien in einfacher Weise detektiert werden können und eine genaue Bestimmung der Zielpolynukleotidsequenz liefern.

[0127] Die Kopien des verlängerten Primers (der verlängerten Primer) können auf zahlreichen Wegen detektiert werden. In dem vorliegenden Verfahren beispielsweise können Moleküle des Oligonukleotidprimers mit einem Reportermolekül, z.B. einem Liganden, einem kleinen organischen Molekül, einer Polynukleotidsequenz, einem Protein, Träger, einem Glied eines Operator-Repressor-Paars, einem Interkalationsfarbstoff und dergleichen markiert werden. Es kann ein beliebiges Standardverfahren zur spezifischen Detektion von Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Es kann eine Gelelektrophorese zum Detektieren einer Kettenverlängerung verwendet werden.

[0128] Ein Verfahren zum Detektieren von Nukleinsäure besteht in der Verwendung von Nukleinsäuresonden. Ein Verfahren unter Verwendung von Sonden ist im US-Patent Nr. 4,868,104 beschrieben, dessen Offenbarung hier durch Referenz aufgenommen gilt.

[0129] Andere Assayformate und Detektionsformate sind im US-Patent Nr. 5,508,178 und im US-Patent Nr. 5,439,998 offenbart.

[0130] Beispiele für besondere Markierungen oder Reportermoleküle und ihre Detektion können im US-Pa-

tent Nr. 5,439,998 gefunden werden.

[0131] Eine Detektion des Signals wird von der Natur des verwendeten Signal-produzierenden Systems abhängen. Wenn die Markierungs- oder Reportergruppe ein Enzym ist, werden zusätzliche Glieder des Signal-produzierenden Systems Enzymsubstrate usw. beinhalten. Das Produkt der Enzymreaktion ist vorzugsweise ein lumineszentes Produkt oder ein fluoreszenter oder nicht-fluoreszenter Farbstoff, von denen jeder spektral fotometrisch detektiert werden kann, oder ein Produkt, das durch andere spektrometrische oder elektrometrische Mittel detektiert werden kann. Wenn die Markierung ein fluoreszentes Molekül ist, kann das Medium bestrahlt werden und die Fluoreszenz bestimmt werden. Wenn die Markierung eine radioaktive Gruppe ist, kann das Medium gezählt werden, um die radioaktive Zählung zu bestimmen.

[0132] Das erfindungsgemäße Verfahren findet Anwendung, wenn die Zielpolynukleotidsequenz DNA oder RNA ist.

[0133] Nach einem Aspekt der Erfindung wird ein oder mehrere der Reagenzien, z.B. ein modifiziertes Oligonukleotid und/oder ein Oligonukleotidprimer mit einer Markierung (Reportermolekül) markiert. Das Reportermolekül kann z.B. eine detektierbare Gruppe oder ein Bindemittel, z.B. Biotin, sein, oder kann eine andere Nukleotidsequenz als die Sequenz, die mit den Zielsequenzen hybridisiert, sein. Der verlängerte Primer (die verlängerten Primer) kann (können) mit Hilfe eines Reportermoleküls, das kovalent an eine Sonde gebunden ist, detektiert werden. Die Sonde hat eine Nukleotidsequenz, die zu einem Teil der Zielnukleotidsequenz, die anders als jene Sequenzen, an die die Primer binden, ist, homolog oder komplementär.

[0134] Die vorliegende Erfindung findet auch Anwendung auf eine Amplifikation unter Verwendung eines einzelnen Oligonukleotidprimers, wie er im US-Patent Nr. 5,508,178 beschrieben wird, ebenso auf Amplifikationsverfahren auf Transkriptionsbasis (z.B. NASBA) oder Transkriptionsvermittelte Amplifikation (TMA).

[0135] Die vorliegende Erfindung findet auch Anwendung auf ein Verfahren zum Detektieren von Differenzen in verwandten Nukleinsäuresequenzen. Das Verfahren involviert eine Kettenverlängerung von Oligonukleotidprimern. Kurz ausgedrückt, eine Kombination von Reagenzien wird in dem selben Reaktionsmedium gebildet und einer PCR unterworfen. Die Kombination umfasst (i) eine Probe, die eine Zielnukleinsäuresequenz enthält, von der erwartet wird, dass sie eine Mutation hat, (ii) eine Referenznukleinsäure, die getrennt zugegeben werden kann, wenn nicht bekannt ist, dass sie in der Probe vorliegt und die der Zielnukleinsäure entspricht, welcher die Mutation fehlt, die eine Wildtyp-Nukleinsäure sein kann, (iii) eine Nukleotidpolymerase, (iv) Nukleosidtriphosphate und (v) drei Oligonukleotidprimer, wobei einer der Primer mit verschiedenen Markierungen markiert sein kann. Wie oben erwähnt wurde, kann das Medium die Referenznukleinsäuresequenz wie auch die Zielnukleinsäuresequenz enthalten. Alternativ können eine PCR-Reaktion für jede der oben genannten, nämlich für die Zielnukleinsäuresequenz und die Referenznukleinsäuresequenz, getrennt laufen gelassen werden. Somit würde bei der obigen Kombination von Reagenzien ein PCR-Reaktionsgemisch eine oder die andere der Zielnukleinsäuresequenz oder der Referenznukleinsäuresequenz enthalten. Anschließend an die PCR-Reaktionen für die einzelnen Sequenzen werden die Reaktionsgemische kombiniert. In der PCR wird das Medium mehreren Temperaturzyklen des Erhitzens und des Abkühlens unterworfen, um gleichzeitig alle Amplifikationsreaktionen durchzuführen. In dieser Ausführungsform umfasst jeder Zyklus vorzugsweise Erwärmen des Mediums bei etwa 90°C bis etwa 100°C für etwa 2 Sekunden bis etwa 3 Minuten, Abkühlen des Mediums auf etwa 60°C bis etwa 70°C für einen Zeitraum von etwa 5 Sekunden bis etwa 3 Minuten und Erhitzen des Mediums bei etwa 70°C bis etwa 75°C für einen Zeitraum von etwa 10 Sekunden bis etwa 3 Minuten, obgleich in Abhängigkeit von den Längen der Primersequenzen auch andere Temperaturen erforderlich sein können. Das Reaktionsmedium aus obigem oder den kombinierten PCR-Reaktionsgemischen, wenn die PCR-Reaktionen getrennt laufen gelassen werden, werden einem Erhitzen für einen Zeitraum unterworfen, der ausreicht, um doppelsträngige Moleküle zu denaturieren, vorzugsweise bei etwa 90°C bis etwa 99°C für etwa 10 Sekunden bis etwa 2 Minuten, und auf 40°C bis etwa 80°C, vorzugsweise etwa 60°C bis etwa 70°C, abgekühlt und für mindestens 1 Minute, vorzugsweise für 20 Minuten bis 2 Stunden, bei dieser Temperatur gehalten.

[0136] Nach Abkühlen des Mediums (siehe [Fig. 3](#)) werden alle möglichen partiellen und vollständigen Duplices gebildet, die aus 1) Einzelsträngen, die beliebige Kombination von Referenz- oder Mutantensequenzen und 5'-enden, A2 und B2, haben, und 2) Einzelsträngen, die eine beliebige Kombination von Referenz- oder Mutantensequenzen und 5'-Enden, A1 oder B1 haben, wobei die Stränge außerdem entweder mit L1 oder L2, wenn L1 und L2 unterschiedlich sind, markiert sein können. Unter den partiellen Duplices, die gebildet werden, sind die Schwanz-tragenden, partiellen Duplices A' und B', die unter Bildung von Komplex C aneinander binden können, die nicht in Duplices D und E dissoziieren, wenn eine Mutation vorliegt. Eine Bestimmung des Vorliegens eines solchen Komplexes wird dann durchgeführt, um das Vorliegen einer Mutation in der Zielnukleinsäu-

resequenz festzustellen.

[0137] Unter Bezugnahme auf [Fig. 3](#) werden die obigen Reaktionen, die gleichzeitig auftreten, schrittweise beschrieben. In dieser Ausführungsform werden bei Anwendung der vorliegenden Erfindung drei modifizierte Oligonukleotide verwendet und werden als OP4, OP5 bzw. OP6 bezeichnet. In der in [Fig. 3](#) gezeigten Ausführungsform werden zur Erläuterung und nicht zur Beschränkung zwei Sätze an modifizierten Oligonukleotid OP5 verwendet, wobei ein Satz mit L1 markiert wird, und der andere Satz mit L2 markiert wird. Eine Schwanz-tragende Ziel-Partial-Doppelhelix A' wird auf der Zielnukleinsäure Doppelhelix A, die eine Mutation M hat, produziert und eine Schwanz-tragende Referenz-Partial-Doppelhelix B' wird aus der Referenz-Nukleinsäure-Doppelhelix B produziert.

[0138] In der Ausführungsform von [Fig. 4](#) werden Zielnukleinsäure A und Referenznukleinsäure B in einem geeigneten gepufferten wässrigen Medium mit den modifizierten Oligonukleotiden OP4, OP5-L1 und OP5-L2 und OP6 kombiniert. Gemäß der vorliegenden Erfindung enthält OP4 modifiziertes Nukleotid MN4 und OP5-L1 enthält modifiziertes Nukleotid MN5. Entsprechend enthält OP6 modifiziertes Nukleotid MN6 und OP5-L2 enthält modifiziertes Nukleotid MN5. Das Reaktionsmedium enthält auch Bindungssubstanzen BS4, BS5 und BS6 für die entsprechenden modifizierten Nukleotide MN4, MN5 und MN6. Die Bindungssubstanzen können die gleichen oder unterschiedliche sein, was davon abhängt, ob MN4, MN5 und MN6 gleich oder unterschiedlich sind. BS4 bindet an MN4 und verhindert, dass OP4 entlang A verlängert wird, und BS5 bindet an MN5 und verhindert, dass OP5-L1 entlang A verlängert wird. Folglich kann OP, wenn es durch BS4 gebunden ist, nicht entlang A, noch entlang einer irrelevanten DNA, an die es hybridisieren könnte, verlängert werden. Entsprechend kann OP5-L1, wenn es durch BS5 gebunden ist, nicht entlang A, noch entlang einer irrelevanten DNA, an die es hybridisieren könnte, verlängert werden. BS6 bindet an MN6 und verhindert, dass OP6 entlang B verlängert wird, und BS5 bindet an MN5 und verhindert, dass OP5-L2 entlang B verlängert wird. Entsprechend kann OP4, wenn es durch BS4 gebunden ist, nicht entlang B, noch entlang beliebiger irrelevanter DNA, an das es hybridisieren könnte, verlängert werden. Entsprechend kann OP5-L2, wenn es durch BS5 gebunden ist, nicht entlang B, noch entlang irrelevanter DNA, an das es hybridisieren könnte, verlängert werden. In dem Medium enthalten sind auch Nukleosidtriphosphate (NTPs) und eine Nukleotidpolymerase, NP. Die Temperatur des Mediums ist relativ niedrig, z.B. etwa 20°C bis 45°C. Die Bindungssubstanzen BS4, BS5 und BS6 werden von OP4, OP5-L1, OP5-L2 bzw. OP6 dissoziiert und denaturiert, wenn die Temperatur des Reaktionsmediums erhöht wird. Dementsprechend werden, wenn die Temperatur erhöht wird (bezeichnet als Δ) Komplexe von BS4 mit OP4, von BS5 mit OP5-L1 und OP5-L2 und von BS6 mit OP6 dissoziiert und BS4, BS5 und BS6 werden denaturiert, wodurch freie Oligonukleotidprimer OP4, OP5-L1, OP5-L2 und OP6 und denaturierte Bindungssubstanzen DBS4, DBS5 und DBS6 erhalten werden.

[0139] Wenn die Temperatur auf etwa 50°C bis etwa 80°C gesenkt wird, binden OP4, OP5 und OP6 an die entsprechenden Bindungsstellen an A und B. In Gegenwart der Nukleosidtriphosphate und von Nukleotidpolymerase werden OP4, OP5 und OP6 entlang der jeweiligen Stränge von A oder B, an welche jedes hybridisiert ist, verlängert. Bei der erhöhten Temperatur ist eine Bindung von Nukleotidsequenzen an eine andere selektiver, so dass OP4, OP5 und OP6, die in relativ niedriger Konzentration vorliegen, selektiv an ihre jeweiligen Stränge von A und B binden, so dass der Level, bei dem OP4, OP5 und OP6 an irrelevante DNA binden können, wesentlich reduziert ist. Somit sind gemäß der vorliegenden Erfindung Hintergrundprodukte stark verringert.

[0140] Wie in [Fig. 3](#) gezeigt ist, wird A durch die Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der Primer OP4 und OP5 amplifiziert, wodurch ein Amplicon AA produziert wird. Primer OP5 enthält eine Markierung, L1, und Primer OP4 besteht aus einem 3'-Endteil Pa, das mit der Zielsequenz hybridisieren kann, und dem 5'-Endteil B1, der mit der Zielsequenz hybridisieren kann. Die Amplifikation wird in Gegenwart einer Nukleotidpolymerase und in Gegenwart von Nukleosidtriphosphaten unter Verwendung eines Temperaturcyclings durchgeführt. Amplicon AA hat zwei Stränge, einen markierten Strang, der vom Primer OP5 abgeleitet ist, und einen unmarkierten Strang, der von Primer OP4 abgeleitet ist. Der unmarkierte Strang hat einen 5'-Endteil B1 von Primer OP4, und der markierte Strang hat einen entsprechenden 3'-Endteil A2, der das Komplement von B1 ist. Wiederum unter Bezugnahme auf [Fig. 3](#) erfolgt eine Kettenverlängerung von Primer OP6 entlang des markierten Strang von Amplicon AA, wobei eine Schwanz-tragende Ziel-Partial-Doppelhelix A' gebildet wird.

[0141] Primer OP6 besteht aus einem 3'-Endteil Pa, das identisch mit Pa von Primer OP4 ist und das an den markierten Strang von AA bindet. OP6 hat einen 5'-Endteil A1, der nicht komplementär zu Amplicon AA ist. In der Ausführungsform von [Fig. 3](#) ist der wichtige Strang der komplementäre Strang des markierten Strangs und nicht seine Kopie. Der komplementäre unmarkierte Strang der Schwanz-tragenden Ziel-Partial-Doppelhelix A' hat einen 5'-Endteil A1, der nicht komplementär zu dem 3'-Endteil A2 des markierten Strangs von A' ist.

[0142] Wie oben erwähnt wurde, kann diese PCR-Amplifikation getrennt durchgeführt werden, wie es bei der PCR-Amplifikation der Referenznukleinsäuresequenz B der Fall ist. Alternativ können die PCR-Amplifikationen in Gegenwart von beiden, der Zielnukleinsäuresequenz A und der Referenznukleinsäuresequenz B, durchgeführt werden.

[0143] Was [Fig. 3](#) angeht, so besteht Referenznukleinsäuresequenz B aus einer Sequenz, die abgesehen von der Mutation M identisch zu A ist. Primer OP enthält Markierung L2, die von L1 verschieden ist. Amplicon BB hat zwei Stränge, einen markierten Strang, der von der Verlängerung von Primer OP5-L2 stammt, und einen unmarkierten Strang, der von der Verlängerung von Primer OP6 stammt. Der unmarkierte Strang hat den Endteil A1 von Primer OP6 und der markierte Strang hat den entsprechenden Endteil B2, der das Komplement von A1 ist.

[0144] Eine Kettenverlängerung von Primer OP4 entlang des markierten Strang von Amplicon BB produziert die Schwanz-tragende Referenz-Partial-Doppelhelix B'. Wie oben erwähnt wurde, besteht Primer OP4 aus dem Teil Pa, das an den markierten Strang von BB bindet, und Teil B1, der nicht an Amplicon BB bindet. Das Verlängerungsprodukt von Primer OP4 hat einen 5'-Endteil B1, der nicht komplementär zu dem Endteil B2 des markierten Strang von B' ist. Wie zu erkennen ist, sind A' und B' dahingehend miteinander verwandt, dass jeder ihrer markierten Stränge außer der Mutation M zu dem unmarkierten Strang des anderen komplementär ist.

[0145] Die Stränge der Partial-Doppelhelices A' und B' binden unter den unter den Reaktionsbedingungen, z.B. eine Temperatur von etwa 30°C bis etwa 75°C, vorzugsweise etwa 60°C bis etwa 70°C, für wenigstens etwa 1 min, vorzugsweise etwa 15 bis etwa 120 min, und machen eine Branch-Migration durch, wodurch Komplex C gebildet wird. Oligonukleotidschwanz A1 von A' hybridisiert an den entsprechenden Oligonukleotidschwanz B2 von B' und entsprechend hybridisiert Oligonukleotidschwanz A2 von A' an Oligonukleotidschwanz B1 von B'.

[0146] Branch-Migration innerhalb des Komplexes C setzt sich unter den obigen Temperaturbedingungen unter Auftrennung des Komplexes in Doppelhelices D und E, es sei denn, eine Mutation M ist vorhanden, fort, wonach Branch-Migration und Strangdissoziierung inhibiert sind. Komplex C wird dann detektiert, wobei sein Vorliegen in direkter Beziehung zu dem Vorhandensein von Mutation M steht.

[0147] In der in [Fig. 3](#) gezeigten Ausführungsform sind Markierungen L1 und L2 in die Partial-Doppelhelices eingebaut, die Komplex C umfassen, und liefern ein Mittel zur Detektion von Komplex C. Dies ist beispielhaft und stellt keine Beschränkung dar und es können andere zweckdienliche Verfahren zum Detektieren von Komplex C angewendet werden, z.B. die Verwendung eines Rezeptors für den Komplex. In diesem Ansatz ist nur eine Markierung, L1 oder L2, erforderlich, welche ein sbp-Mitglied oder ein Reportermolekül umfasst. Ein Rezeptor für das sbp-Mitglied und ein Rezeptor, der durch ein anderes Merkmal als L1 oder L2 an Komplex C binden kann, kann an Komplex C binden und ein Mittel zur Detektion liefern.

[0148] Die Bedingungen zur Durchführung der Detektion von Unterschieden in Nukleinsäuren, wobei die vorliegende Erfindung verwendet wird, sind ähnlich denen für die Amplifikation, die oben beschrieben wurden. Im allgemeinen wird das Medium auf eine Temperatur von etwa 90°C bis etwa 100°C für einen Zeitraum von etwa 2 bis etwa 500 Sekunden erwärmt und dann auf etwa 20°C bis etwa 80°C für einen Zeitraum von etwa 5 bis etwa 2000 Sekunden abgekühlt, worauf sich ein Erwärmen auf etwa 40°C bis etwa 80°C für einen Zeitraum von etwa 5 bis etwa 2000 Sekunden anschließt. Vorzugsweise wird das Medium einem Erwärmen auf etwa 90°C bis etwa 100°C für einen Zeitraum von etwa 10 Sekunden bis etwa 3 Minuten, Abkühlen auf etwa 50°C bis etwa 65°C für einen Zeitraum von etwa 10 Sekunden bis etwa 2 Minuten und Erwärmen auf etwa 70°C bis 80°C für einen Zeitraum von etwa 30 Sekunden bis etwa 5 Minuten unterworfen.

[0149] Zweckdienlicherweise können vorher festgesetzte Mengen an Reagenzien, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, in einem Kit in verpackter Kombination bereitgestellt werden. Ein Kit kann eine verpackte Kombination eines oder mehrerer modifizierter Oligonukleotidprimer, einer oder mehrerer Bindungssubstanzen für die modifizierten Oligonukleotidprimer, Nukleotidtriphosphate und eine Nukleotidpolymerase umfassen. In einer Ausführungsform ist das Nukleotidanalogon ein natürliches Nukleotid mit einer chemischen Modifikation. In dem Fall, dass eine Nukleotidpolymerase in dem Kit enthalten ist und die Nukleotidpolymerase keine 3'-zu-5'-Exonukleaseaktivität hat, umfasst der Kit außerdem ein Enzym, dass 3'-zu-5'-Exonukleaseaktivität hat, allerdings nur, wenn es von Bedeutung ist, eines oder mehrere modifizierte Nukleotide am 3'-Ende des modifizierten Oligonukleotidprimers zu entfernen.

[0150] Ein Kit zur Amplifikation einer Zielpolynukleotidsequenz umfasst die obigen Gegenstände und zur

Durchführung einer PCR umfasst er zwei Oligonukleotidprimer, die beide modifiziert sind. Die Oligonukleotidprimer sind dahingehend verwandt, dass ein Produkt der Verlängerung eines entlang der Zielsequenz als Matrize für die Verlängerung des anderen dient.

[0151] Bei der Analyse nach einem Polynukleotidanalyten in einer Probe kann ein Kit, der in erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbar ist, in verpackter Kombination mit anderen oben genannten Reagenzien Reagenzien zur Bildung einer Zielpolynukleotidsequenz aus einem Polynukleotidanalyten umfassen. Darüber hinaus kann ein Oligonukleotidprimer markiert sein oder kann mit Gruppen versehen sein, die die Sequenz markiert oder an einen Träger gebunden machen. Der Kit kann außerdem eine markierte Polynukleotidsonde enthalten, die zur Bindung an eine amplifizierte Zielpolynukleotidsequenz fähig ist. Der Kit kann außerdem Mitglieder eines Signal-produzierenden Systems und auch verschiedene gepufferte Medien enthalten, von denen einige eines oder mehrere der obigen Reagenzien enthalten können.

[0152] Die relativen Mengen der verschiedenen Reagenzien in den Kits können in großem Umfang verändert werden, um für Konzentrationen der Reagenzien zu sorgen, die die Reaktionen optimieren, die während des erfindungsgemäßen Verfahrens ablaufen müssen, und um die Empfindlichkeit des Assays weiter wesentlich zu optimieren.

[0153] Unter geeigneten Umständen kann eines oder können mehrere der Reagenzien im Kit als trockenes Pulver, üblicherweise lyophilisiert, bereitgestellt werden, die Exzipienzien enthalten, die bei Auflösung eine Reagenslösung bereitstellen werden, die die geeigneten Konzentration zur Durchführung eines Verfahrens oder eines Assays gemäß der vorliegenden Erfindung haben. Jedes Reagens kann in getrennten Behältern verpackt sein oder einige Reagenzien können in einem Behälter kombiniert sein, der Zulassung bezüglich Kreuzreaktivität und Lagerungszeit entspricht. Der Kit kann außerdem eine schriftliche Beschreibung eines Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung, wie es oben beschrieben wurde, enthalten.

BEISPIELE

[0154] Die Erfindung wird durch die folgenden erläuternden Beispiele weiter erläutert. Temperaturen sind in Grad Celsius (°C) und Teile und Prozente sind Gewichtsteile bzw. Gewichtsprozente, wenn nichts anderes angegeben ist.

[0155] Hierin werden die folgenden Definitionen und Abkürzungen verwendet:

Tris-HCl	– Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl (eine 1 M-Stammlösung) von BioWhittaker, Walkersville, MD.
DTT	– 1,4-Dithiothreitol von Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.
HPLC	– Hochleistungsflüssigchromatographie
DPP	– 4,7-Diphenylphenanthrolin von Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI
BSA	– Rinderserumalbumin von Sigma Chemical Company, St. Louis, MO
ELISA	– Enzym-gekoppelte Immunadsorptionsbestimmung, wie in "Enzyme-Immunoassay", Edward T. Maggio, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1980) beschrieben.
bp	– Basenpaare
wt (WT)	– Wildtyp
ddc	– Didesoxycytidin
g	– Gramm
mmol	– Millimol
nmol	– Nanomol
mM	– millimolar
nM	– nanomolar
DMF	– Dimethylformamid
THF	– Tetrahydrofuran
LSIMS	– Flüssigmatrix-Sekundärionenmassenspektrometrie
NMR	– kernmagnetische Resonanzspektrometrie
TMSiCl	– Tetramethylsilylchlorid
EDAC	– 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid
MES	– 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
SPDP	– N-Succinimidyl-3-(2-pyridylthio)-propionat
Sulfo-SMCC	– Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
TCEP	– Triscarboxyethylphosphin

Sav	– Streptavidin
dd	– doppeldestilliert
MOPS	– 3(N-Morpholino)propansulfonsäure
SATA	– N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat
EDTA	– Ethylendiamintetraessigsäure
R.B.	– Rundboden
RLE	– relative Lichteinheiten

Herstellung von Reagenzien bzw. Präparierung von Reagenzien

Perlen:

[0156] Acc-Ab_{Dig}-Akzeptorperlen, gekoppelt (MAD) an anti-Dig-Antikörper (mit 377 Antikörpermolekülen pro Perle) wurden wie folgt hergestellt:

Hydroxypropylaminodextran (1NH₂/7 Glucose) wurde hergestellt, indem Dextran T-500 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) (50 g) in 150 ml H₂O in einem 3-Halsrundkolben, ausgestattet mit mechanischem Rührer und Tropftrichter, gelöst wurde. Zu der obigen Lösung wurden 18,8 g Zn(BF₄)₂ gegeben und die Temperatur wurde mit einem Heißwasserbad auf 87°C gebracht. Epichlorhydrin (350 ml) wurde tropfenweise unter Rühren im Verlauf von etwa 30 Minuten zugegeben, während die Temperatur bei 87–88°C gehalten wurde. Das Gemisch wurde für 4 h gerührt, während die Temperatur zwischen 80°C und 95°C gehalten wurde, dann wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt. Chlordextranprodukt wurde präzipitiert, indem langsam in 3 l Methanol unter kräftigem Rühren gegossen wurde, durch Filtration gewonnen und über Nacht in einem Vakuumofen getrocknet wurde.

[0157] Das Chlordextranprodukt wurde in 200 ml Wasser aufgelöst und zu 2 l konzentriertem wässrigen Ammoniak (36 %) gegeben. Diese Lösung wurde für 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt, dann an einem Rotationsverdampfer auf etwa 190 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde in zwei gleiche Chargen aufgeteilt und jede Charge wurde durch langsames Eingießen in 2 l schnell rührendes Methanol präzipitiert. Das Endprodukt wurde durch Filtration gewonnen und unter Vakuum getrocknet.

[0158] Das oben hergestellte Hydroxypropylaminodextran (1NH₂/7 Glucose) wurde in 50 mM MOPS, pH 7,2, mit 12,5 mg/ml gelöst. Die Lösung wurde für 8 h bei Raumtemperatur gerührt, unter Kühlung gelagert und für 45 min bei 15.000 U/min in einer Sorvall RC-5B-Zentrifuge unmittelbar vor Verwendung zentrifugiert, um Spuren von Feststoffmaterial zu entfernen. Zu 10 ml dieser Lösung wurden 23,1 mg Sulfo-SMCC in 1 ml Wasser gegeben. Dieses Gemisch wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und ohne weitere Reinigung verwendet.

[0159] C-28-Thioxen wurde wie folgt hergestellt:

Zu einer Lösung von 4-Bromanilin (30 g, 174 mmol) in trockenem DMF (200 ml) wurde 1-Bromtetradecan (89,3 ml, 366 mmol) und N,N-Diisopropylethylamin (62,2 ml, 357 mmol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 16 h unter Argon auf 90°C erhitzt, bevor sie auf Raumtemperatur gekühlt wurde. Zu dieser Reaktionslösung wurden erneut 1-Bromtetradecan 845 ml, 184 mmol) und N,N-Diisopropylethylamin (31 ml, 178 mmol) gegeben und das Reaktionsgemisch wurde weitere 15 h auf 90°C erwärmt. Nach Abkühlung wurde die Reaktionslösung im Vakuum konzentriert und der Rückstand wurde mit CH₂Cl₂ (400 ml) verdünnt. Die CH₂Cl₂-Lösung wurde mit wässrigem 1 N NaOH (2x), H₂O und Kochsalzlösung gewaschen, wurde über Na₂SO₄ getrocknet und wurde im Vakuum konzentriert, wobei ein dunkelbraunes Öl (etwa 110 g) erhalten wurde. Präparative Säulenchromatographie an Silikagel mittels Waters 500 Prep LC-System unter Elution mit Hexan lieferte ein gelbes Öl, das hauptsächlich das Produkt (4-Brom-N,N-di-(C₁₄H₂₉)anilin) zusammen mit einer Nebenkomponente, 1-Bromtetradecan, enthielt. Die zuletzt genannte Verbindung wurde durch Vakuumdestillation (Siedepunkt 105–110°C, 0,6 mm) aus dem Gemisch entfernt, wobei 50,2 g (51 %) des Produktes als braunes Öl zurückblieben. Zu einem Gemisch aus Magnesiumspänen (9,60 g, 395 mmol) in trockenem THF (30 ml) unter Argon wurde tropfenweise eine Lösung des obigen substituierten Anilinprodukts (44,7 g, 79 mmol) in THF (250 ml) gegeben. Um die Bildung des Grignard-Reagens zu initiieren, wurden wenige Iodkristalle zugesetzt. Als das Reaktionsgemisch warm wurde und zu refluxieren begann, wurde die Zugaberate so reguliert, dass ein leichter Rückfluss aufrecht erhalten wurde. Nachdem die Zugabe beendet war, wurde das Gemisch für eine weitere Stunde unter Rückfluss erhitzt. Die gekühlte überstehende Lösung wurde über eine Kanüle in einen Zugabetrichter transferiert und tropfenweise (über 2,5 h) zu einer Lösung von Phenylglyoxal (11,7 g, 87 mmol) in THF (300 ml) bei –30°C unter Argon gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde allmählich im Verlauf von 1 h auf 0°C erwärmt und für weitere 30 Minuten gerührt. Das resultierende Gemisch wurde in ein Gemisch aus Eiswasser (800 ml) und Ethylacetat (250 ml) gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit H₂O (2x), dann mit

Kochsalzlösung gewaschen und wurden über MgSO_4 getrocknet. Eine Verdampfung des Lösungsmittels ergab 48,8 g des Rohproduktes als dunkelgrüne ölige Flüssigkeit. Flash-Säulenchromatographie dieser Flüssigkeit (Gradientenelution mit Hexan, 1,5:98,5, 3:97, 5:95 Ethylacetat:Hexan) lieferte 24,7 g (50 %) des Benzoinproduktes (MS ($\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{NO}_2$): $[\text{M}-\text{H}]^+$ 618, 6, $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) entsprach dem erwarteten Benzoinprodukt. Zu einer Lösung des Benzoinproduktes von oben (24,7 g, 40 mmol) in trockenem Toluol (500 ml) wurden der Reihe nach 2-Mercaptoethanol (25 g, 320 mmol) und TMSCl (100 ml, 788 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 23 h unter Argon unter Rückfluss erhitzt, bevor sie auf Raumtemperatur gekühlt wurde. Dazu wurde zusätzliches TMSCl (50 ml, 394 mmol) gegeben und die Reaktionslösung wurde für weitere 3 h unter Rückfluss gehalten. Die resultierende Lösung wurde gekühlt, mit kaltem wässrigem 2,5 N NaOH basisch gemacht und mit CH_2Cl_2 (3x) extrahiert. Die kombinierten organischen Schichten wurden mit gesättigter wässriger NaHCO_3 (2x) und Kochsalzlösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum konzentriert, wodurch eine braune ölige Flüssigkeit erhalten wurde. Präparative Säulenchromatographie an Silikagel unter Verwendung eines Waters 500 Prep LC-Systems (Gradientenelution mit Hexan, 1:99, 2:98, Ethylacetat:Hexan) lieferte 15,5 g (60 %) des C-28-Thioxen als orange-gelbes Öl (MS ($\text{C}_{44}\text{H}_{71}\text{NOS}$): $[\text{M}-\text{H}]^+$ 661, 6, $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) entsprach dem erwarteten C-28-Thioxenprodukt 2-(4-(N,N-Di-($\text{C}_{14}\text{H}_{29}$)anilino) -3-phenylthioxen.

Carboxyl-Chemiluminescer (Akzeptor)-Perlen (TAR-Perlen):

[0160] Die folgende Farbstoffzusammensetzung wurde verwendet: 20 C-28-Thioxen (hergestellt wie oben beschrieben), 1,6 1 chlor-9,10-bis(phenylethynyl)anthracen (1-Cl-BPEA) (von Aldrich Chemical Company) und 2,7 % Rubren (von Aldrich Chemical Company). Die Partikel waren Latexpartikel (Seradyn Particle Technology, Indianapolis, IN). Die Farbstoffzusammensetzung (240–250 mM C-28-Thioxen, 8–16 mM 1-Cl-BPEA und 20–30 mM Rubren) wurde in einer Art, ähnlich der im US-Patent 5,340,716, erteilt am 23. August 1994, (das '716-Patent) in Spalte 48, Zeilen 24–45 beschriebenen, in die Latexpelken eingearbeitet. Der Färbeprozess involvierte den Zusatz der Latexpelken (10 % Feststoffe) in ein Gemisch aus Ethylenglykol (65,4 %), 2-Ethoxyethanol (32,2 %) und 0,1 N NaOH (2,3 %). Die Perlen wurden vermischt und für 40 min bei 95°C unter kontinuierlichem Rühren erhitzt. Während die Perlen erhitzt wurden, wurden drei Chemilumineszenz-Farbstoffe in 2-Ethoxyethanol durch Erwärmen auf 95°C für 30 Minuten bei kontinuierlichem Rühren gelöst. Am Ende beider Inkubationen wurde die Farbstofflösung in die Perlensuspension gegossen, und das resultierende Gemisch wurde für weitere 20 Minuten unter kontinuierlichem Rühren inkubiert. Nach der 20-minütigen Inkubation wurden die Perlen aus dem Ölbad entfernt und auf 40°C + 10°C abkühlen gelassen. Die Perlen wurden dann durch ein Polyester mit einer Maschenweite von 43 μm geführt und gewaschen. Die gefärbten Partikel wurden unter Verwendung eines Microgon (Microgon Inc., Laguna Hills, CA) gewaschen. Die Perlen wurden zuerst mit einem Lösungsmittelgemisch gewaschen, das aus Ethylenglykol und 2-Ethoxyethanol (70 %/30 %) bestand. Die Perlen wurden mit 500 ml Lösungsmittelgemisch/g Perlen gewaschen. Darauf folgte ein Waschen mit 10%igem wässrigem Ethanol (pH 10–11). Das Waschvolumen wurde 400 ml/g Perlen. Die Perlen wurden dann gesammelt und auf % Feststoffe, Farbstoffgehalt, Partikelgröße, Signal- und Hintergrundunterzeugung getestet.

[0161] Carboxyl-Akzeptorperlen, die oben hergestellt worden waren, (99 mg in 4,5 ml Wasser) wurden langsam unter Vortexbehandlung zu 5,5 ml MAD-Aminodextran von oben gegeben, gefolgt von 1 ml 200 mg/ml NHS in 50 mM MES, pH 6, 1 ml 200 mg/ml EDAC in Wasser und 450 μl 1 M HCl , End-pH 6. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert, dann mit 200 mg Bernsteinsäureanhydrid in 0,5 ml DMSO für 30 Minuten bei Raumtemperatur umgesetzt. Frisch geöffnetes Surfact-Amps-Tween-20 (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois) wurde zugesetzt und die Perlen wurden 30 min bei 15.000 U/min in einer Sorvall RC-5B-Zentrifuge zentrifugiert, durch Zentrifugation mit drei 10 ml-Portionen von 50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 0,1 % Surfact-Amps-Tween-20 (Pierce Chemical Company), pH 7,2, gewaschen und in 3 ml desselben resuspendiert.

[0162] Monoklonaler Anti-Digoxin-Ab (hergestellt wie oben beschrieben) wurde durch ABx-Harz (Baker Chemical Company, Phillipsburg, NJ) gereinigt und wurde in 0,15 M NaCl , 5 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4, dialysiert. Der Anti-Digoxin-Ab wurde thioliert, indem 622 μl (4,28 mg) mit 10,2 μl SATA (1,25 mg/ml in Ethanol, 2 Äq.) vermischt wurden, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde und kalt gegen 2 \times 2 l 150 mM NaCl , 10 mM Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, pH 7, dialysiert wurde. Der thioacetylierte Antikörper wurde durch Zusatz von 62,2 μl Hydroxylamin (1 M H_2NOH , 50 mM MOPS, 25 mM EDTA, pH 7) deacetyliert, mit Argon durchperlt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Produkt wurde auf eine Pharmacia PD-10-Säule (G-25) aufgetragen und mit 50 mM MOPS, 50 mM EDTA, pH 7,2, mit Argon durchperlt, eluiert. Nach 2,5 ml Vorlauf wurden drei 1 ml-Fractionen gesammelt und kombiniert. Die Isolierung von Antikörper war 3,66 mg oder 86 %, durch A_{280} . Surfact-Amps-Tween-20 (10 %) wurde unter Erhalt einer Endkonzentration von 0,2 % zugegeben.

[0163] Ein 1,4 ml-Aliquot des obigen thiolierten Antikörpers (1,71 mg Antikörper) wurde unverzüglich zu 300

µl (10 mg) maleimidierten Perlen, die oben hergestellt worden waren, plus ausreichend 10%iges Tween-20, um eine Endkonzentration des Gemisches auf 0,2 % zu bringen, gegeben. Das Röhrchen wurde mit Argon gespült und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Zu dem Obigen wurden 3,4 µl 1 M HSCH₂COOH in Wasser gegeben. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 6,8 µl ICH₂COOH (1 M in Wasser) zugesetzt. Nach 30 Minuten wurden 3,5 ml 0,17 M Glycin, 0,1 M NaCl, 0,1 % (V/V) Tween-20, 10 mg/ml BSA, pH 9,2, zugesetzt und die Perlen wurden zentrifugiert (30 min bei 15.000 U/min), für 3 h in 5 ml desselben Puffers inkubiert, zentrifugiert, durch Zentrifugation mit drei 5 ml-Portionen Puffer C gewaschen, in 5 ml Puffer C resuspendiert und unter Kühlung gelagert. Die Größe der Perlen, bestimmt in Puffer C, war 301+/-56 nm. Die Bindungskapazität wurde mit ¹²⁵I-Digoxin bestimmt und entsprach 377 Antikörpermolekülen pro Perle.

[0164] Siliciumtetra-t-butylphthalocyanin wurde wie folgt hergestellt:

Natriummetall, frisch geschnitten (5,0 g, 208 mmol) wurde zu 300 ml wasserfreiem Ether in einem 2 Liter-Dreihals-Kolben, der mit einem Magnetrührer, einem Rückflusskühler, einem Trocknungsrohr und einem Gaseinleitungsrohr ausgestattet war, gegeben. Nachdem das Natrium vollständig gelöst war, wurde 4-t-Butyl-1,2-dicyanobenzol 838,64 g, 210 mmol von TCI Chemicals, Portland, OR) unter Verwendung eines Trichters zugegeben. Das Gemisch wurde klar und die Temperatur wurde auf etwa 50°C erhöht. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein kontinuierlicher Strom wasserfreien Ammoniakgases durch das Gaseinleitungsrohr in das Reaktionsgemisch für 1 Stunde eingeleitet. Das Reaktionsgemisch wurde dann unter Rückfluss für 4 h erhitzt, während der Strom aus Ammoniakgas anhält. Im Verlauf der Reaktion begann ein Feststoff auszufallen. Die resultierende Suspension wurde zur Trockene eingeeengt (Hausvakuum) und der Rückstand wurde in Wasser (400 ml) suspendiert und filtriert. Der Feststoff wurde getrocknet (60°C, Hausvakuum, P₂O₅). Die Ausbeute des Produktes (1,3-Diiminoisindolin, 42,2 g) war fast quantitativ. Dieses Material wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt eingesetzt. In einen 1 l-Dreihals-Kolben, ausgestattet mit einem Kühler und einem Trocknungsrohr, wurde das obige Produkt (18 g, 89 mmol) und Chinolin (200 ml, Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO) gegeben. Siliciumtetrachlorid (11 ml, 95 mmol, Aldrich Chemical Company) wurde mit einer Spritze zu der gerührten Lösung über einen Zeitraum von 10 Minuten gegeben. Nachdem die Zugabe beendet war, wurde das Reaktionsgemisch in einem Ölbad für 1 h auf 180–185°C erhitzt. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und konzentrierte HCl wurde sorgfältig zugesetzt, um das Reaktionsgemisch anzusäuern (pH 5–6). Das dunkelbraune Reaktionsgemisch wurde abgekühlt und filtriert. Der Feststoff wurde mit 100 ml Wasser gewaschen und getrocknet (Hausvakuum, 60°C, P₂O₅). Das Feststoffmaterial wurde in einen 1-Liter-Rundkolben gegeben und unter Rühren wurde konzentrierte Schwefelsäure (500 ml) zugesetzt. Das Gemisch wurde für 4 h bei 60°C gerührt und dann sorgfältig mit zerkleinertem Eis (2.000 g) verdünnt. Das resultierende Gemisch wurde filtriert, und der Feststoff wurde mit 100 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Der dunkelblaue Feststoff wurde in einen 1 l-Rundkolben transferiert, konzentrierter Ammoniak (500 ml) wurde zugesetzt und das Gemisch wurde für 2 h unter Rückfluss erhitzt und gerührt, wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Der Feststoff wurde mit 50 ml Wasser gewaschen und unter Vakuum (Hausvakuum, 60°C, P₂O₅) getrocknet, wobei 12 g des Produktes Silicium-tetra-t-butylphthalocyanin als dunkelblauer Feststoff erhalten wurden. 3-Picolin 812 g, von Aldrich Chemical Company), Tri-n-butylamin (wasserfrei, 40 ml) und Tri-n-hexylchlorosilan (11,5 g) wurden zu 12 g des obigen Produktes in einem 1 l-Dreihals-Kolben, ausgestattet mit einem Magnetrührer und einem Rückflusskühler, gegeben. Das Gemisch wurde unter Rückfluss für 1,5 h erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Picolin wurde unter Hochvakuum (Ölpumpe bei etwa 1 mm Hg) zur Trockene abdestilliert. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgelöst und unter Verwendung einer Silikagelsäule (Hexan) gereinigt, wobei 10 g reines Produkt Di-(tri-n-hexylsilyl)siliciumtetra-t-butyl-phthalocyanin als dunkelblauer Feststoff erhalten wurden. (MS: [M-H]⁺ 1364,2, Absorptionsspektren: Methanol: 674 nm (ε 180.000); Toluol: 678 nm, ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ: -2,4 (m, 12H), -1,3 (m, 12H), 0,2–0,9 (m, 54H), 1,8 (s, 36H), 8,3 (d, 4H) und 9,6 (m, 8H) entsprach dem obigen erwarteten Produkt.

[0165] Sens-Sav – Sensibilisatorperlen, gekoppelt an Streptavidin (2300 Sav/Perle).

[0166] Die Sensibilisatorperlen wurden hergestellt, indem 600 ml Carboxylat-modifizierte Perlen (Seradyn) in einen Dreihals-Rundkolben, ausgestattet mit einem mechanischen Rührer, einem Glasstopfen mit einem darin befestigten Thermometer in einem Hals und einem Trichter in dem entgegengesetzten Hals, gegeben wurden. Der Kolben wurde dann in ein Ölbad eingetaucht, das bei 95 +/- 1°C gehalten wurde. Die Perlen wurden durch den Trichter im Hals in den Kolben gegeben und der Perlenbehälter wurde mit 830 ml Ethoxyethanol, 1700 ml Ethylenglykol und 60 ml 0,1 N NaOH gespült, und die Spülflüssigkeit wurde durch den Trichter in den Kolben gegeben. Der Trichter wurde durch ein 24–40-Kautschukseptum ersetzt. Die Perlen wurden mit 765 U/m bei einer Temperatur von 94 +/- 1°C für 40 min gerührt.

[0167] Silizium-tetra-t-butylphthalocyanin (10,0 g) wurde in 300 ml Benzylalkohol bei 60 +/- 5°C gelöst und

85 ml wurden durch das Septum mit Hilfe einer Spritze, die auf 120 \pm 10°C erhitzt war, mit einer Rate von 3 ml/min in den obigen Rundkolben gegeben. Die restlichen 85 ml der Phthalocyaninlösung wurden dann wie oben beschrieben zugesetzt. Die Spritze und der Kolben, die ursprünglich das Phthalocyanin enthielten, wurden mit 40 ml Benzylalkohol gespült und diese in den Rundkolben transferiert. Nach 15 min wurden 900 ml entionisiertes Wasser und 75 ml 0,1 N NaOH tropfenweise über 40 min zugegeben. Die Temperatur des Öl-bads wurde langsam auf 40 \pm 10°C fallen gelassen und das Rühren wurde dann unterbrochen. Die Perlen wurden dann durch ein Polyesterfilter mit 43 μ m filtriert und einer Microgon-Tantentionalflussfiltrationsapparatur (Microgon Inc., Laguna Hills, CA) unterworfen, wobei Ethanol:Wasser, 100:0 bis 10:90, verwendet wurde, dann wurde durch ein Polyesterfilter mit 43 μ m filtriert.

[0168] Sulfo-SMCC (11,55 mg) wurde in 0,5 ml destilliertem Wasser gelöst. Langsam während 10 Sekunden wurde die obige Lösung zu 5 ml einer rührenden Aminodextran (Molecular Probes, Eugene, Oregon)-Lösung (12,5 mg/ml in 50 mM MOPS, pH 7,2) gegeben. Das Gemisch wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

[0169] Zu der rührenden Lösung oben wurden 5 ml 20 mg/ml 8100 mg) der oben hergestellten Sensibilisatorperlen in destilliertem Wasser gegeben. Dann wurde 1 ml 200 mg/ml NHS (frisch hergestellt in 50 mM MES, pH eingestellt auf 6,0 mit 6 N NaOH) zugegeben. 200 mg EDAC wurden in 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst und diese Lösung wurde langsam unter Rühren zu den Sensibilisatorperlen gegeben. Der pH wurde durch Zusatz von 450 μ l 1 N HCl auf 6,0 eingestellt, und das Gemisch wurde über Nacht im Dunklen inkubiert. Eine Lösung von 100 mg Bernsteinsäure in 0,5 ml DMSO wurde zu den Sensibilisatorperlen gegeben und das Gemisch wurde für 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Zu diesem Gemisch wurden 0,13 ml 10%iges Tween-20 gegeben, um die Endkonzentration an Tween-20 auf 0,1 % zu bringen. Die Perlen wurden für 45 min bei 15.000 U/min wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Perlen wurden in 10 ml Puffer (50 mM MOPS, 50 mM EDTA und 0,1 % Tween-20, pH 7,2) resuspendiert. Das Gemisch wurde zum Dispergieren der Perlen mit Ultraschall behandelt. Die Perlen wurden für 30 min wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Perlen wurden resuspendiert. Dieses Verfahren wurde insgesamt 3x wiederholt. Dann wurden die Perlen in 2,5 ml desselben Puffers zu 40 mg/ml resuspendiert, mit Argon gesättigt und Tween-20 wurde zu einer Konzentration von 0,1 zugesetzt. Die Perlen wurden bei 4°C gelagert.

[0170] Streptavidin wurde unter Verwendung von 25 mg Streptavidin für 100 mg Perlen an die obigen Perlen gebunden. 25 mg Streptavidin (50 mg Aaston-Feststoff von Aaston, Wellesley, MA) wurden in 1 ml 1 mM EDTA, pH 7,5, gelöst, und es wurden 77 μ l 2,5 mg/ml SATA in Ethanol zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Deacetylierungslösung wurde hergestellt, enthaltend 1 M Hydroxylamin-HCl, 50 mM Na₂PO₄, 25 mM EDTA, pH 7,0. 0,1 ml dieser Deacetylierungslösung wurde zu der obigen Lösung gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das resultierende thiolierte Streptavidin wurde an einer Pharmacia-PD10-Säule gereinigt und mit einem Säulenpuffer, der 50 mM MOPS, 50 mM EDTA, pH 7,2, enthielt, gewaschen. Das Volumen der Probe wurde durch Zusatz von 1,5 ml des obigen Säulenpuffers auf 2,5 ml gebracht. Die Probe wurde auf die Säule aufgeladen und mit 3,5 ml des Säulenpuffers eluiert. Das thiolierte Streptavidin wurde durch Zugabe von 1,5 ml 50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 0,1% Tween-20, pH 7,2, auf 5 ml verdünnt. 5 ml der thiolierten Streptavidinlösung wurden zu 5 ml der Sensibilisatorperlen unter Argon gegeben und gut vermischt. Die Perlen wurden für 1 min mit Argon überdeckt, das Röhrchen wurde versiegelt und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert.

[0171] Zu den obigen Perlen wurden 7,5 ml 50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 0,1 % Tween-20, pH 7,2, gegeben, um die Perlen auf 1 mg/ml zu bringen. Die verbleibenden Maleimide wurden durch Zusatz von Mercaptoessigsäure in einer Endkonzentration von 2 mM gekappt. Das Gemisch wurde im Dunklen für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die restlichen Thiole wurden durch Zusatz von Iodessigsäure in einer Endkonzentration von 10 mM gekappt und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 30 min im Dunklen inkubiert. Die Perlen wurden für 30 min mit 15.000 U/min wie oben insgesamt 3x zentrifugiert.

Beispiel 1

Detektion einer polymorphen Stelle in Exon-11 des humanen BRCA1-Gens:

[0172] Die Amplifikation einer 450 bp langen Sequenz von Exon-11 des BRCA1-Gens wurde in zwei Schritten durchgeführt. Die erste PCR-Amplifikation wurde unter Verwendung von zwei Schwanztragenden 5'-Primern durchgeführt. Die Primer bestanden aus einem 3'-Teil, der komplementär zu der Zielsequenz ist, und einem 5'-Teil (unten unterstrichen), der aus einer Sequenz besteht, die mit der Zielsequenz nicht verwandt ist. Die zwei Primer wurden am 3'-Ende durch Einsetzen eines Fluorescein-modifizierten dT für das natürliche Nukle-

otid modifiziert, wie es dargestellt ist. Die Primer waren von Oligos, Etc.

[0173] Nach der anfänglichen PCR-Amplifikation wurde eine zweite Amplifikation mit anderen Primern durchgeführt. Die Vorwärts-Primer bestanden aus einer Sequenz, die komplementär zu der Sequenz des 5'-Schwanzes des Vorwärts-Primers der ersten Runde war, und waren 5'-markiert, entweder mit Biotin oder Digoxigenin (Dig). Die Rückwärts-Primer bestanden aus einer 3'-Sequenz, die komplementär zum 5'-Schwanz des Rückwärts-Primers der ersten PCR war, und einem 5'-Schwanz, der aus einer Sequenz bestand, die zu dem Zielgen oder den PCR-Primern der ersten Runde nicht komplementär war. Die 5'-Schwänze der zwei Rückwärts-Primer waren nicht miteinander verwandt und wurden für die Bildung von Amplifikationsprodukt entwickelt, welche zur Bildung von viersträngigen DNA-Strukturen fähig sind, welche für die Detektion von Sequenzalteration verwendet werden.

[0174] Die Sequenzen der Primer waren wie folgt:

Erster PCR-Vorwärts-Primer:

5'-GTTTTCCCAGYCACGACGAGGCTTTAAGTATCCATNG-3' (SEQ ID NO:1)

Erster PCR-Rückwärts-Primer:

5'-AGGAAACAGCTATGACCATCAAAACCTAGACCTCCTTNG-3' (SEQ ID NO:2)

[0175] Der unterstrichene Teil in den obigen Sequenzen stellt die "Schwanz"-Sequenzen dar; Der nicht unterstrichene Teil ist zur Ziel-DNA komplementär; das N bezeichnet C6-dT-Fluorescein.

Zweiter PCR-Vorwärts-Primer:

5'-biotin-GTTTTCCCAGTCACGACG-3' (SEQ ID NO:3)

5'-DIG.-GTTTTCCCAGTCACGACG-3' (SEQ ID NO:4)

Zweiter PCR-Rückwärts-Primer:

5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGAGGAAACAGCTATGACCAT-3' (SEQ ID NO:5)

5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTAGGAAACAGCTATGACCAT-3' (SEQ ID NO:6)

[0176] Der unterstrichene Teil in jeder der obigen Sequenzen stellt die "Schwanz"-Sequenzen dar; der nicht unterstrichene Teil ist zum Amplifikationsprodukt der ersten PCR-Reaktion komplementär.

[0177] Die PCR-Amplifikation mit heißem Start unter Verwendung von PCR-Wachssperlen wurde wie folgt aufgebaut: Aliquots von 25 µl eines Partial-Reaktionsgemisches, enthaltend 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mg/ml BSA, 0,25 mM von jedem dNTP und 0,5 µM jedes der Primer, wurde in PCR-Röhrchen gegeben, die eine PCR-Perle (von Perkin-Elmer; Kat.# N-808-0150) enthielten. Die Röhrchen wurden bei 85°C für 2 min inkubiert, um das Wachs zu schmelzen, und auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Wachssperre zu bilden. In jedes Röhrchen wurden 20 µl eines zweiten Reaktionsgemisches, enthaltend 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, und in jedes Röhrchen wurden 5 Einheiten Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene; Kat.# 600159-81) oder Taq-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) gegeben. 5 µl-Probe, die eine Zielnukleinsäure enthalten kann, wurde in die Röhrchen gegeben, und die Reaktionsröhrchen wurden einem thermischen Cycling unterzogen (Trio-Thermoblock, Biometra Inc., Tampa, FL, Kat.# 050090005).

[0178] Reaktionen, die unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens durchgeführt wurden, waren wie folgt aufgebaut:

5 µl Probe wurde zu einem Reaktionsgemisch gegeben, das Folgendes enthielt: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mg/ml BSA, 0,25 mM jedes dNTP, 0,5 µM jedes Primers, 2,5 Einheiten Pfu-Polymerase oder Taq-DNA-Polymerase mit oder ohne 12,5 µM monoklonaler Anti-Fluorescein-Antikörper (hergestellt durch bekannte Verfahren ähnlich dem oben beschriebenen für Anti-Digoxin-Antikörper).

[0179] Die Reaktionsgemische (Gesamtvolumen 25 µl) wurden einem thermischen Cycling wie oben unterzogen. Das Thermocycling für die erste PCR-Amplifikationsreaktion war wie folgt: 4 min bei 94°C; 35 Zyklen aus 30 s bei 94°C, 1 min bei 64°C und 1 min bei 72°C.

[0180] Für die zweite Amplifikationsreaktion wurde ein Aliquot des Reaktionsgemisches der ersten Amplifikationsreaktion verwendet. Das Thermocycling für die zweite PCR-Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt: 4 min bei 94°C, gefolgt von 20 Zyklen mit 30 s bei 94°C, 1 min bei 64°C und 1 min bei 72°C.

[0181] Zwei genomische DNA-Proben (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT) wurden in der Analyse verwendet: Genomische DNA, gereinigt aus Zellen, die für die polymorphe Zelle heterozygot sind, und Zellen, die homozygot sind. Das Verfahren wurde in diesem Beispiel ohne den Zusatz von Referenz-DNA-Amplifikationspro-

dukt durchgeführt, da die DNA-Proben von diploiden Zellen waren und das Ziel der Analyse war, Homozygotie oder Heterozygotie der getesteten Sequenzen zu untersuchen.

[0182] Nach der Amplifikation wurden 2 µl Testamplifikationsreaktionsgemisch mit 4 µl Puffer vermischt. Das Gemisch wurde den folgenden Inkubationsbedingungen unterworfen: 2 min bei 95°C zur Denaturierung der Amplifikationsprodukte, gefolgt von 30 min Inkubation bei 65°C zum Annealing, Bildung der viersträngigen DNA-Strukturen und Branch-Migration. 50 µl eines Partikelgemisches (2,5 µg Sensibilisatorpartikel mit immobilisiertem Streptavidin und 1,25 µg Chemiluminescer-Partikel mit immobilisierten Anti-Digoxin-Antikörper) wurden in jedes Reaktionsröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden in ein Lesegerät zum Lesen des Signals überführt, für 30 min bei 37°C inkubiert und das Signal wurde gelesen (drei Zyklen mit 1 s Beleuchtung und 1 s Lesen). Die Resultate sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

TABELLE 1

Amplifikationsprodukte, erzeugt mit Pfu-DNA-Polymerase:

DNA-Probe	Signalablesung (RLE)		
	mit Wachs- perlen ¹	mit Anti- körper ²	ohne Anti- körper ³
Heterozygot	591296	872780	1630000
Homozygot	60692	69318	868996
keine	7618	10084	16840

¹ bekanntes Verfahren

² Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung

³ Kontrolle

TABELLE 2

Amplifikationsprodukte, erzeugt mit Taq-DNA-Polymerase:

DNA-Probe	Signalablesung (RLE)		
	mit Wachs- perlen ¹	mit Anti- körper ²	ohne Anti- körper ³
Heterozygot	89626	134662	346000
Homozygot	22602	18958	273350
keine	5758	7238	14022

¹ bekanntes Verfahren

² Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung

³ Kontrolle

[0183] Die obigen Resultate beweisen, dass eine Antikörper (Anti-Fluorescein-Antikörper in diesem Beispiel)-Bindung an die Primer vor Amplifikation zu einer deutlichen Verringerung der nicht-spezifischen Amplifikation, entweder zielabhängig oder zielunabhängig, führt. Die Beispiele beweisen außerdem, dass das erfindungsgemäße Verfahren nicht auf eine besondere thermostabile DNA-Polymerase limitiert ist.

Beispiel 2

Exon-10 des humanen zystischen Fibrose-Gens

[0184] Acht Proben humaner genomischer DNA (vier Wildtyp-Homozygote und vier Heterozygote mit einem Wildtypallel und einem Allel, das eine 3-bp-Deletion, $\Delta F508$ trägt) wurden unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert, um ein Produkt mit einer Länge von 220 bp zu bilden. Die genomischen DNA-Proben waren von Mayo Foundation (Rochester, MN).

Die Vorwärts-Primer-Sequenz:

3'-CTCAGTTTTCTGGATTATGCCNNA-3' (SEQ ID NO:7)

worin N = Etheno-dA

[0185] Ein äquimolares Gemisch (jeweils 125 nM) des 5'-biotinylierten und 5'-Digoxigenin-markierten Vorwärts-Primers wurde bei der PCR eingesetzt.

Die Sequenz des ersten Rückwärts-Primers:

5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGCTAACCGATTGAATATGGAGCCNNG-3' (SEQ ID NO:8)

Die Sequenz des zweiten Rückwärts-Primers:

5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTCTAACCGATTGAATATGGAGCCNNG-3' (SEQ ID NO:9)

[0186] Im Obigen sind die "Schwanz"-Sequenzen unterstrichen; N = Etheno-dA.

[0187] In der PCR wurde ein äquimolares Gemisch (jeweils 125 nM) der zwei Rückwärts-Primer verwendet. Die 20 μ l-PCR-Reaktionsgemische enthielten 200 μ M jedes dNTP, 10 ng genomische DNA und 1 E Pfu-DNA-Polymerase. Der Puffer enthielt 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$ und 200 μ g/ml BSA (Puffer A). Bei Raumtemperatur wurden zwei Sätze an PCR-Reaktionen durchgeführt. Einer der Sätze enthielt den monoklonalen Anti-Etheno-Antikörper (von Dr. P. Lorenz, Deutschland) mit 250 nM. Pfu-Polymerase war die letzte Komponente, die den Reaktionsgemischen zugesetzt wurde. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur für 30 min vorinkubiert, bevor das Thermocycling gestartet wurde.

[0188] Insgesamt 40 Zyklen wurden im Biometra-Trio-Thermocycler durchgeführt, bestehend aus einem Denaturierungsschritt von 30 s bei 94°C, einem Reannealing-Schritt mit 1 min bei 64°C und einem Verlängerungsschritt bei 72°C mit 1 min, dem ein Denaturieren von genomischer DNA bei 95°C vorausgeht. Unmittelbar nach PCR-Amplifikation wurden die gesamten Reaktionen einer Branch-Migration unterworfen. Das Branch-Migrations-Protokoll bestand aus einem Denaturierungsschritt von 2 min bei 94°C, gefolgt von einem Reannealing/Strang austausch-Schritt bei 65°C für 30 min.

[0189] Ein 2 μ l-Aliquot jeder Branch-Migrations-Reaktion wurde mit 50 μ l Puffer A, der 2,5 μ l (5 μ g) Sensibilisator-Streptavidin-Perlen und 1,25 μ l (2,5 μ g) Chemiluminescer-Anti-Dig-Antikörper-Perlen enthielt, kombiniert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Signal wurde dann unter Verwendung eines Signalesegeräts gelesen. Die Resultate sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

TABELLE 3

Probe	Signalablesung (RLE)	
	kein Anti-Etheno-Antikörper ¹	mit Anti-Etheno-Antikörper ²
wt/wt	9626	7896
wt/wt	7240	8588
wt/wt	7984	7496
wt/wt	7972	7116
ΔF508/wt	262268	374424
ΔF508/wt	258164	374000
ΔF508/wt	100208	385916
ΔF508/wt	169350	384366

¹ Kontrolle² Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung

[0190] Das Vorliegen des Anti-Etheno-Antikörpers resultierte in höheren und gleichmäßigeren positiven Signalen. Dieser Effekt ist vermutlich auf der Abnahme in der Menge nicht-spezifischer PCR-Produkte, die normalerweise mit dem gewünschten Applikon um Enzym und Primer im Wettbewerb stehen.

Beispiel 3

Exon-11 des humanen zystischen Fibrosegens

[0191] Sechzehn Proben der humanen genomischen DNA (sechs (6) Wildtyp-Homozygote, acht (8) Heterozygote mit einem Wildtyp-Allel und einem Allel, das G542X-, G551D-, R553X- oder R560T-Punktmutation trägt, und zwei Doppelmутanten) wurden amplifiziert, wobei die folgenden Primer verwendet wurden, um ein Produkt mit einer Länge von 333 bp zu bilden. Die genomischen DNA-Proben waren von Mayo Foundation (Rochester, MN).

Die Vorwärts-Primer-Sequenz:

5'-GCCTTTCAAATTCAGATTGAGCNNA-3' (SEQ ID NO:10) worin N = Etheno-dA

[0192] Ein äquimolares Gemisch (je 125 nM) des 5'-biotinylierten und 5'-Digoxigenin-markierten Vorwärts-Primers wurden in einer PCR eingesetzt.

Die Sequenz des ersten Rückwärts-Primers:

5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGGACATTTACAGCAAATGCTTGCNNA-3' (SEQ ID NO:11)

Die Sequenz des zweiten Rückwärts-Primers:

5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTGACATTTACAGCAAATGCTTGCNNA-3' (SEQ ID NO:9)

[0193] In dem Obigen sind die "Schwanz"-Sequenzen unterstrichen, und N = Etheno-dA.

[0194] Alle experimentellen Bedingungen waren genau die gleichen wie in Beispiel 2 für Exon-10 beschrieben. Die Resultate sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

TABELLE 4

Probe	Signalablesung (RLE)	
	kein Anti-Etheno-Antikörper ¹	mit Anti-Etheno-Antikörper ²
wt/wt	6430	4130
wt/wt	5208	4380
wt/wt	6436	4656
wt/wt	7282	4486
wt/wt	7258	5488
wt/wt	8406	5442
G542X/wt	37588	85638
G542X/wt	60706	101896
G551D/wt	23340	85816
G551D/wt	31388	153038
R553X/wt	13660	81996
R553X/wt	20978	99774
R560T/wt	30374	129776
R560T/wt	42100	128442
G551D/R553X	38908	151542
G551D/R553X	35964	166728

¹ Kontrolle² Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung

[0195] Wenn der Anti-Etheno-Antikörper vorliegt, wurde erneut eine deutliche Zunahme beim Signal für die Heterozygoten beobachtet. Das Hintergrundsignal für die Wildtypproben war etwa niedriger.

Beispiel 4

Vergleich von modifizierten Vorwärts- und Rückwärts-Primern mit modifiziertem Vorwärts-Primer und unmodifiziertem Rückwärts-Primer

[0196] Die folgenden zwei Experimente bewiesen, dass die Vorzüge der vorliegenden Erfindung erzielt werden, wenn alle Branch-Migrationsprimer modifiziert wurden und fähig sind, an den entsprechenden Antikörper, der verwendet wurde, zu binden. Im folgenden Beispiel wurden beide, Vorwärts- und Rückwärts-"Branch-Migration"-PCR-Primer modifiziert und somit fähig, den Antikörper zu binden. Eine Verbesserung bei der Priming-Spezifität wurde erzielt.

[0197] Die experimentellen Bedingungen für die Amplifikation von Exon-10 des humanen zystischen Fibrosegens waren genau dieselben, wie die oben in Beispiel 2 beschriebenen. Sieben genomische DNA-Proben umfassten drei (3) Wildtyp-Homozygote, drei (3) $\Delta F508$ und eine $\Delta I507$ Heterozygote (beide Mutationen sind 3-bp-Deletionen). Der monoklonale Antikörper-Etheno-Antikörper war in allen Reaktionsgemischen vorhanden.

[0198] Tabelle 5 fasst das Experiment zusammen, in dem zwei Sätze an PCR-Primer verglichen wurden: In

einem der Sätze (linke Spalte) waren beide, Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 3'-Etheno-modifiziert, wie es in Beispiel 2 gezeigt ist, und in einem anderen Satz (rechte Spalte) waren die nur markierten Vorwärts-Primer 3'-Etheno-modifiziert und die Schwanz-tragenden Rückwärts-Primer waren nicht modifiziert (kein NNA an ihren 3'-Enden).

TABELLE 5

Probe	Signalablesung (RLE)	
	Vorwärts-Primer: 3'-Etheno Rückwärts-Primer: 3'-Etheno	Vorwärts-Primer: 3'-Etheno Rückwärts-Primer: kein 3'-Etheno
wt/wt	3494	29464
wt/wt	4488	91644
wt/wt	3944	69822
$\Delta F508$ /wt	679646	1030254
$\Delta F508$ /wt	625680	971278
$\Delta F508$ /wt	617978	1043210
$\Delta F507$ /wt	579500	998724

[0199] Das obige Experiment beweist, dass das erfindungsgemäße Verfahren bessere Resultate mit der Verwendung von modifizierten Vorwärts- und Rückwärts-Primern im Vergleich zur Verwendung eines modifizierten Vorwärts-Primers und eines unmodifizierten Rückwärts-Primers erzielt.

Beispiel 5

Erfindungsgemäßes Verfahren im Vergleich zu bekannten Verfahren

[0200] Die Verwendung eines Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung in Verbindung mit einem anderen Verfahren wurde unter Verwendung des Etheno-modifizierten Primersets EX11-f2e/r1e in Gegenwart oder in Abwesenheit eines monoklonalen Anti-Ethenoadenin-Antikörpers (MAb), beide Male ohne Wachspierlen, durchgeführt. Zusätzlich wurden zwei andere Kontrollen durchgeführt, bei denen das entsprechende Nicht-Etheno-Primerset Ex11-f2/r1, entweder ohne Heißstartverfahren oder mit Wachspierlen verwendet wurde. Das f2/r1-Primerset flankiert 173 Basen der CFTR-Exon-11-Sequenz, was in einem Amplicon resultiert, das 217 Basen aus Exon-11 und 20 Basen aus den Rückwärts-Primer-Schwänzen mit insgesamt 237 bp enthält.

[0201] Die verwendeten Ex11-f2e/r1e-Primer waren wie folgt:

Vorwärts-Primer (Etheno-modifiziert):

5'-biotin-TAGAAGGAAGATGTGCCTTTCANNA (SEQ ID NO:12)

5'-igoxigenin-TAGAAGGAAGATGTGCCTTTCANNA (SEQ ID NO:13)

worin N = Etheno-dA

Rückwärts-Primer (Etheno-modifiziert):

5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTGACATTTACAGCAAATGCTTGCNNA-3' (SEQ ID NO:9)

5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGGACATTTACAGCAAATGCTTGCNNA-3' (SEQ ID NO:11)

worin N = Etheno-dA

[0202] Nicht-Etheno-Primer waren dieselben, außer dass ihnen NNA-3'-Enden fehlten.

[0203] Ein WT & eine (gemischte) Heterozygote (R553D/ $\Delta F508$) wurden dreifach analysiert, wobei jede der fünf Bedingungen verwendet wurde (d.h. Nicht-Etheno/kein Wachs, Etheno/kein Wachs und Etheno/Mab-Heißstart, Nicht-Etheno/Wachs & Etheno/Wachs). Außerdem waren in jedem Reaktionssatz ein Wasserblindwert und eine heterozygote positive Kontrolle (G551D/WT) enthalten.

Herstellung von Reagenzien:

10X Puffer D:	100 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei RT
1X dNTP-Gemisch:	500 mM KCl, 40 mM MgCl ₂ , 2 mg/ml BSA
1X Primer-Sätze:	2,5 mM jeweils ATP, CTP, GTP & TTP in ddH ₂ O
	6,25 µM Vorwärts-Primer-Gemisch
	6,25 µM Rückwärts-Primer-Gemisch in ddH ₂ O
Ziel-DNA:	10 ng/µl in 1X-TE-Puffer,
	1X-TE-Puffer = 10 mM Tris-HCl, pH 7,4,
	1 mM Na ₂ EDTA

Reaktionsprotokoll

[0204] Nachfolgend unten ist eine Tabellarisierung der Reagensvolumina zur Herstellung der Kontrollmischungs-(NM = kein Heißstart)- und der MAb-Mischungs (MM = zugesetzter MAb)-Lösungen für zwei Streifen an Reaktionsröhrchen (8 Röhrchen/Streifen) angegeben. Die Pfu-DNA-Polymerase wurde zuletzt zugesetzt. Das Wasser, Puffer, Nukleotide und Primer wurden mit oder ohne MAb* vermischt und bei RT für 10 min inkubiert. Während dieser Inkubation wurden auch die Boden(BL)- und die oberen (TL, ohne Pfu-Polymerase)-Schichten für die Wachsperlenmischung (WM = Wachs Gem Hot-Start) hergestellt. Als die Inkubation beendet war, wurde Pfu-Polymerase zu jeder Mischung (d.h. NM, MM & TL von WM) unmittelbar vor Verteilung auf jedes geeignete Streifenröhrchen zugesetzt.

[0205] *MAb & Primer im Volumenverhältnis 1:1 (d.h. 8,4 pmol MAb/20 µl-Röhrchen, ~ 0,42 µM MAb) resultierte in einem 1:2-Verhältnis von Antikörperkombinationsstellen mit Primertermini, die Ethenoadenin-Dimere enthielten. Das heißt, ein Volumenäquivalent MAb entsprach einer 50%-Titration aller Ethenoadenin-enthaltenen Primer.

Schicht	Reagens	Volumen	Bemerkungen
<u>keine Heißstart-Mischung</u>			
(NM)	ddH ₂ O	112,6 µl	
(2 Sets)	10X Puffer D	16,8 µl	
	1X ΣdNTP's	13,44 µl	
	ΣPrimer	6,72 µl	Exon-11-Set D (f2/r1)
	oder Exon-11-Set D-Etheno (f2e/r1e)		
	Pfu-DNA-Polymerase	1,68 µl	
		151,2 µl	(18 µl pro Röhrchen) + 2 µl DNA
oder			
<u>MAB-Heißstart-Mischung</u>			
(MM)	ddH ₂ O	105,8 µl	
(1 Set)	10X Puffer D	16,8 µl	
	1X ΣdNTP's	13,44 µl	
	ΣPrimer	6,72 µl	Exon-11-Set D-Etheno (f2e/r1e)
	Anti-Etheno-Mab	6,72 µl	12,5 µM MAB
Nach Inkubation für 10 min bei RT wurde folgendes zugesetzt:			
	Pfu-DNA-Polymerase	1,68 µl	
		151,2 µl	(18 µl pro Röhrchen + 2 µl DNA)
oder			
<u>Wachs-Perlen-Heißstart-Mischung (Bodenschicht)</u>			
(WM-BL)	ddH ₂ O	106,92 µl	BioWhittaker (#16-001Y)
(2 Sets)	10X Puffer D	16,2 µl	
	1X ΣdNTP's	25,92 µl	Pharmacia (#27-2035-02)
	ΣPrimer	12,96 µl	Exon 11-Set D (f2/r1)
	oder Exon-11-Set De (f2e/r1e)		
		129,6 µl	(18 µl BL pro Röhrchen)
	Wachsschicht:		Perkin-Elmer Ampliwax PCR Gems
<u>Wachs-Perlen-Heißstart-Mischung (obere Schicht)</u>			
(WM-TL)	ddH ₂ O	110,16 µl	
(2 Sets)	10X Puffer D	16,2 µl	
	Pfu-DNA-Polymerase	3,24 µl	
		180,0 µl	(14,4 µl TL pro Röhrch.) + 3,6 µl DNA

[0206] Aliquots aus 18 µl WM-BL wurden in jedes Röhrchen von einem der drei Streifen gegeben. Eine Wachsperte wurde in jedes Röhrchen dieses Streifens transferiert. Die Streifen wurden versiegelt und in einen Thermocycler gelegt. Die Wachsperte wurden durch Inkubation bei 85°C für 2 Minuten geschmolzen und die Wachsbarrriere wurde durch anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur gebildet. 14,4 µl WM-TL wurden in jedes entsprechende Röhrchen im WM-Streifen gegeben. Test-DNA-Probe (für Details siehe unten), 3,6 µl, wurde in die Röhrchen dieses Streifens gegeben und zum Vermischen leicht gerührt.

[0207] Test-DNA-Probe, 2 µl (für Details siehe unten), wurde in ein Röhrchen jedes Streifens gegeben. Ein Aliquot von 18 µl NM oder MM wurde in jedes Röhrchen dieser zwei Streifen (vermeide Blasen) gegeben, wobei zum Mischen leicht gerührt wurde.

DNA-Testproben:

Röhrchen	DNA	Genotyp	Kommentare	erwartetes
#	ID #			Resultat
1.	C1./IMR91	WT/WT	WT	-
2.	C1./IMR91	WT/WT	WT	-
3.	C1./IMR91	WT/WT	WT	-
4.	Blindwert	H ₂ O AL 100797	Neg.Kontrolle	-
5.	C4./07552	R553X/ΔF508	Ex10&11 Mutante	+
6.	C4./07552	R553X/ΔF508	Ex10&11 Mutante	+
7.	C4./07552	R553X/ΔF508	Ex10&11 Mutante	+
8.	C3./08338	G551D/WT	Ex11 Mutante	+

[0208] Ein anderes Verfahren wurde in einem Biometra-Trio-Thermocycler unter Verwendung der folgenden Sequenz durchgeführt: 4 min bei 95°C, dann 40 Zyklen mit 30 s bei 94°C, 1 min bei 64°C und 1 min bei 72°C; dann 2 min bei 95°C, um die amplifizierten Produkte zu denaturieren, gefolgt von 30 min bei 65°C, um ein Wiederanlagern, eine Bildung der viersträngigen Strukturen und eine Branch-Migration zu erlauben.

[0209] Ein 2 µl-Aliquot jeder Branch-Migrationsreaktion wurde mit 50 µl Puffer A (siehe Beispiel 2), enthaltend 2,33 µg Sensibilisator-Sav-Perlen und 1,16 µg Chemiluminescer-Anti-Dig-Antikörper-Perlen, und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Signal wurde dann unter Verwendung eines Signallesegeräts gelesen (3 Zyklen mit 1 s Beleuchtung mit 1 s Ablesen).

[0210] Die zystischen Fibrose-Exon-11-Resultate sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

TABELLE 6

Röhrchen	DNA	Genotyp	Signal-	erwartetes	beobachtetes
#	ID #		zählungen	Resultat	Resultat
			(RLE)		
Nicht-Etheno/kein Wachs					
1.	C1./IMR91	WT/WT	63026	-	FP
2.	C1./IMR91	WT/WT	34164	-	FP
3.	C1./IMR91	WT/WT	38302	-	FP
4.	Blind	H ₂ O AL 100797	9214	-	-
5.	C4./07552	R553X/ΔF508	65254	+	+
6.	C4./07552	R553X/ΔF508	75200	+	+
7.	C4./07552	R553X/ΔF508	97054	+	+
8.	C3./08338	G551D/WT	72384	+	+
Etheno/kein Wachs					
1.	C1./IMR91	WT/WT	5850	-	-
2.	C1./IMR91	WT/WT	6774	-	-
3.	C1./IMR91	WT/WT	6068	-	-
4.	Blind	H ₂ O AL 100797	8404	-	-
5.	C4./07552	R553X/ΔF508	108688	+	+
6.	C4./07552	R553X/ΔF508	88624	+	+
7.	C4./07552	R553X/ΔF508	95486	+	+

DE 699 30 765 T2 2006.11.23

8.	C3./08338	G551D/WT	102846	+	+
Etheno/MAB					
1.	C1./IMR91	WT/WT	4968	-	-
2.	C1./IMR91	WT/WT	5138	-	-
3.	C1./IMR91	WT/WT	5340	-	-
4.	Blind	H ₂ O AL	7682	-	-
		100797			
5.	C4./07552	R553X/ Δ F508	338170	+	++
6.	C4./07552	R553X/ Δ F508	317508	+	++
7.	C4./07552	R553X/ Δ F508	321056	+	++
8.	C3./08338	G551D/WT	289190	+	++

Nicht-
Etheno/
Wachs

1.	C1./IMR91	WT/WT	13588	-	-/HB
2.	C1./IMR91	WT/WT	20320	-	-/HB
3.	C1./IMR91	WT/WT	13012	-	-/HB
4.	Blind	H ₂ O AL	10014	-	-/HB
		100797			
5.	C4./07552	R553X/ Δ F508	170658	+	+
6.	C4./07552	R553X/ Δ F508	167804	+	+
7.	C4./07552	R553X/ Δ F508	192894	+	+
8.	C3./08338	G551D/WT	172868	+	+

Etheno/
Wachs

1.	C1./IMR91	WT/WT	5094	-	-
2.	C1./IMR91	WT/WT	7754	-	-
3.	C1./IMR91	WT/WT	5078	-	-
4.	Blind	H ₂ O AL	6104	-	-
		100797			
5.	C4./07552	R553X/ Δ F508	340588	+	++
6.	C4./07552	R553X/ Δ F508	350484	+	++
7.	C4./07552	R553X/ Δ F508	400650	+	++
8.	C3./08338	G551D/WT	356344	+	++

Abkürzungen:

- negativ
+ positiv
FP falsch positiv
FN falsch negativ
HB hoher Hintergrund

TABELLE 7

Tabelle zur Durchschnittswerte für die Dreifachprobenresultate, die oben in Tabelle 6 gezeigt sind:

Reaktion ID	Hintergrund- Signal (RLE)	positives Signal (RLE)	Signal/Hintergrund- Verhältnis (Wert ohne Einheit)
Nicht-Etheno/kein Wachs	45164 ± 15607	79169 ± 16267	1,75 ± 0,70
Etheno/kein Wachs	6231 ± 483	97599 ± 10198	15,66 ± 2,04
Etheno/MAb	5149 ± 186	325578 ± 11048	63,24 ± 3,14
Nicht- Etheno/Wachs	15640 ± 4063	177119 ± 13736	11,32 ± 3,07
Etheno/Wachs	5975 ± 1540	363907 ± 32203	60,90 ± 16,60

Schlussfolgerungen

[0211] Wenn kein Heißstartverfahren verwendet wurde, gab es keine signifikante Unterscheidung zwischen Wildtyp- und positiven Proben ($S/B = 1,8 \pm 0,7$). Die Verwendung entweder von Ethenomodifizierten Primern oder Wachspierlen allein resultierte in moderaten Leveln der Unterscheidung ($S/B = 15,7 \pm 2,0$ bzw. $11,3 \pm 3,1$), und zwar infolge sowohl eines signifikanten Abfalls bei den negativen Proben-Hintergrundleveln als auch der geringen Zunahmen bei den positiven Probensignalen. Die Kombination von Etheno-modifizierten Primern entweder mit Wachspierlen oder mit monoklonalem Antikörper lieferte weitere signifikante Erhöhungen bei den positiven Probensignalen, was 1 zu ziemlich respektablen S/B -Verhältnissen führte ($60,9 \pm 16,6$ oder $63,2 \pm 3,1$). Die Verwendung von Ethenomodifizierten Primern mit MAb lieferte sowohl das höchste S/B -Verhältnis als auch die niedrigste CV (5,0 % im Vergleich zu 13 bis 40 % für die restlichen vier Verfahren).

[0212] Insgesamt führte eine Verwendung von Anti-Etheno-dA-monoklonalem Antikörper zu einem niedrigen Hintergrund, zu hohen positiven Probensignalen und einem hohen S/B -Verhältnis mit geringem Fehler, die wenigstens so gut waren wie die, die mit Etheno-modifizierten Primern mit Wachspierlen in Abwesenheit von monoklonalem Antikörper beobachtet wurden. Außerdem erwies sich eine Verwendung von Etheno-modifizierten Primern mit monoklonalem Antikörper als ein bequemerer Verfahren des Heißstarts als die Verwendung von Wachspierlen, und zwar bezüglich verringerter Arbeit, geringerem notwendigem Reaktionsvolumen und der Leichtigkeit der Amplicon-Gewinnung.

[0213] Ein Teil der vorliegenden Offenbarung enthält Material, das einem Schutz durch Urheberrecht unterliegen kann. Der Besitzer der Urheberrechte hat keine Einwände gegen eine Reproduktion des Patentdokuments oder der Patentoffenbarung, wie sie in der Akte des US-Patent- und Markenamts vorliegt, durch Fax oder Aufzeichnungen, aber ansonsten besteht er auf seinen Urheberrechten.

<110> Dade Behring Inc.

<120> Verfahren zur Kontrolle der Verlängerung eines Oligonukleotids

<130> BEH-7414 PCT

<140> PCT/US99/29253

<141> 1999-12-10

<150> 09/233,413

<151> 1999-01-19

<160> 13

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)...(37)

<223> primer_bind

<400> 1

gttttcccg tcacgacgag gctttaagta tccatng

37

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)...(39)

<223> primer_bind

<400> 2

aggaaacagc tatgaccatc aaaacctaga cctccttng

39

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

```

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(18)
<223> primer_bind

<400> 3
gttttccag tcacgacg                                     18

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(18)
<223> primer_bind

<400> 4
gttttccag tcacgacg                                     18

<210> 5
<211> 39
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(39)
<223> primer_bind

<400> 5
accatgctcg agattacgag aggaaacagc tatgaccat           39

<210> 6
<211> 39
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(39)
<223> primer_bind

<400> 6
gattcctaggc ctacagtatt aggaaacagc tatgaccat           39

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

```

```

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(25)
<223> primer_bind

<400> 7
ctcagttttc ctggattatg ccnna                25

<210> 8
<211> 45
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(45)
<223> primer_bind

<400> 8
accatgctcg agattacgag ctaaccgatt gaatatggag ccnng        45

<210> 9
<211> 45
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(45)
<223> primer_bind

<400> 9
gatcctaggc ctcacgtatt ctaaccgatt gaatatggag ccnng        45

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(25)
<223> primer_bind

<400> 10
gcctttcaaa ttcagattga gcnna                25

<210> 11
<211> 45
<212> DNA

```



```

<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(45)
<223> primer_bind

<400> 11
accatgctcg agattacgag gacatttaca gcaaatgctt gcnaa
45

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(25)
<223> primer_bind

<400> 12
tagaaggaag atgtgccttt canna
25

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)...(25)
<223> primer_bind

<400> 13
tagaaggaag atgtgccttt canna
25

```

Patentansprüche

1. Verfahren zum selektiven Verlängern eines Oligonukleotidprimers entlang einer Zielpolynukleotidsequenz in einem Gemisch von Polynukleotiden, wobei das Verfahren umfasst:

- (a) Bereitstellen in Kombination das genannte Gemisch, einen Oligonukleotidprimer, der eine Modifikation hat, und eine Bindungssubstanz für die Modifikation, wobei die Bindungssubstanz an das Oligonukleotid bindet und die Verlängerung des Oligonukleotids entlang der Zielpolynukleotidsequenz verhindert;
- (b) Einstellen der Temperatur der Kombination auf einen Level, der ausreicht, um die Bindungssubstanz irreversibel zu denaturieren und die Verlängerung des Oligonukleotidprimers entlang der spezifischen Zielpolynukleotidsequenz zuzulassen.

2. Verfahren zum Kontrollieren der Verlängerung eines Oligonukleotids entlang eines Matrizenpolynukleotids nach Anspruch 1, wobei der Oligonukleotidprimer ein Oligonukleotid ist und wobei die Zielpolynukleotidsequenz ein Matrizenpolynukleotid ist, wobei das Verfahren umfasst:

- (a) Bereitstellen in Kombination in einem Medium (i) ein Matrizenpolynukleotid, (ii) ein Oligonukleotid, von dem wenigstens ein Teil an einen Teil des Matrizenpolynukleotids hybridisiert, wobei das Oligonukleotid eine modifizierte Gruppierung umfasst, (iii) alle Reagenzien, die zum Verlängern des Oligonukleotids entlang des Matrizenpolynukleotids erforderlich sind, und (iv) eine Bindungssubstanz für die modifizierte Gruppierung, wobei die Bindungssubstanz fähig ist, an die modifizierte Gruppierung zu binden und zu verhindern, dass sich das Oligonukleotid entlang des Matrizenpolynukleotids verlängert, und
- (b) Erhöhen der Temperatur der Kombination, um die Bindungssubstanz irreversibel von dem Oligonukleotid zu dissoziieren, und Ermöglichen, dass sich das Oligonukleotid entlang des Matrizenpolynukleotids verlängert.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die modifizierte Gruppierung ein modifiziertes Nukleotid ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das modifizierte Nukleotid ein unnatürliches Nukleotid ist oder eine Gruppe umfasst, die unnatürlich ist.

5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Matrizenpolynukleotid DNA oder RNA ist.

6. Verfahren nach Anspruch 2, das Teil eines Amplifikationsverfahrens ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus Polymerasekettenreaktion, Einzelprimeramplifikation oder Nukleinsäureamplifikation auf Transkriptionsbasis ausgewählt ist.

8. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Bindungssubstanz ein Protein ist.

9. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Bindungssubstanz ein Antikörper ist.

10. Verfahren zur Amplifizierung einer Zielpolynukleotidsequenz, das umfasst:

(a) Bereitstellen in Kombination (i) ein Medium, von dem angenommen wird, dass es die Zielpolynukleotidsequenz enthält, (ii) alle Reagenzien, die zur Durchführung einer Amplifikation der Zielpolynukleotidsequenz erforderlich sind, wobei die Reagenzien eine Nukleotidpolymerase, Nukleosidtriphosphate und wenigstens einen Primer, der entlang der Zielpolynukleotidsequenz verlängerbar ist, umfassen, und
(b) Unterwerfen der Kombination Bedingungen zur Amplifizierung der Zielpolynukleotidsequenz, wobei der Primer eine modifizierte Gruppierung umfasst und wobei eine Bindungssubstanz für die modifizierte Gruppierung in der Kombination enthalten ist, wobei die Bindungssubstanz fähig ist, an die modifizierte Gruppierung zu binden und zu verhindern, dass sich das Oligonukleotid entlang der Zielpolynukleotidsequenz verlängert, und wobei die Bindungssubstanz durch eine Erhöhung der Temperatur während des Temperatur-Cycling irreversibel von dem Primer freigesetzt wird, wodurch zugelassen wird, dass der Primer mit der Zielpolynukleotidsequenz bindet und sich entlang dieser verlängert.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die modifizierte Gruppierung ein modifiziertes Nukleotid ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das modifizierte Nukleotid ein unnatürliches Nukleotid ist oder eine Gruppe umfasst, die unnatürlich ist.

13. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Zielpolynukleotid DNA oder RNA ist.

14. Verfahren nach Anspruch 10, wobei nur ein Primer verwendet wird und die Zielsequenz an ihrem 5'-Ende wenigstens eine 10-Basensequenz enthält, die mit einer Sequenz am 3'-Ende der Zielsequenz, an die der Primer hybridisiert, hybridisierbar ist.

15. Verfahren nach Anspruch 10, wobei erster und zweiter Primer verwendet werden und der verlängerte erste Primer eine Matrize für den zweiten Primer ist und der verlängerte zweite Primer eine Matrize für den ersten Primer ist.

16. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Bindungssubstanz ein Protein ist.

17. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Bindungssubstanz ein Antikörper ist.

18. Verfahren zum Amplifizieren einer Polynukleotidsequenz eines Zielpolynukleotids ("Zielsequenz") nach einem der Ansprüche 10 bis 17, wobei das Verfahren umfasst:

(a) Hybridisieren an das 3'-Ende der Zielsequenz einen ersten Oligonukleotidprimer ("erster Primer"),
(b) Verlängern in Gegenwart einer Polymerase und von Nukleotidtriphosphaten den ersten Primer entlang wenigstens der Zielsequenz, um einen verlängerten ersten Primer zu produzieren, wobei der erste Primer fähig ist, an (1) den verlängerten ersten Primer oder (2) einen verlängerten zweiten Oligonukleotidprimer ("zweiter Primer") zu hybridisieren und an diesem entlang verlängert zu werden, wobei der verlängerte zweite Primer aus der Verlängerung eines zweiten Primers resultiert, der fähig ist, an ein Polynukleotid, das komplementär zu der Zielsequenz ist (komplementäres Polynukleotid), zu hybridisieren und sich entlang dieses zu verlängern,
(c) Dissoziieren des verlängerten ersten Primers von der Zielsequenz,
(d) Hybridisieren des ersten oder zweiten Primers an das 3'-Ende des verlängerten ersten Primers,
(e) Verlängern des ersten oder zweiten Primers entlang des verlängerten ersten Primers,
(f) Dissoziieren des verlängerten ersten Primers oder des verlängerten zweiten Primers vom verlängerten ersten Primer,
(g) Hybridisieren des ersten Primers an das 3'-Ende des verlängerten ersten oder verlängerten zweiten Primers und
(h) Wiederholen der Schritte (e)–(g) durch wiederholtes Temperatur-Cycling,

wobei wenigstens einer von dem ersten Primer und dem zweiten Primer ein modifiziertes Nukleotid im Teil davon, das an das Zielpolynukleotid bindet, umfasst und wobei ein Antikörper für das modifizierte Nukleotid in der Kombination enthalten ist, der Antikörper fähig ist, an das modifizierte Nukleotid zu binden und zu verhindern, dass wenigstens einer der Primer entlang der Zielsequenz verlängert wird, und wobei der Antikörper von wenigstens einem der Primer durch Temperaturerhöhung während des Temperatur-Cycling irreversibel freigesetzt wird, wodurch ermöglicht wird, dass wenigstens einer der Primer mit der Zielpolynukleotidsequenz bindet und entlang dieser verlängert wird.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei der erste und der zweite Primer unterschiedlich sind und der verlängerte erste Primer eine Matrize für den zweiten Primer ist und der verlängerte zweite Primer eine Matrize für den ersten Primer ist.

20. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das modifizierte Nukleotid am 3'-Endteil des Oligonukleotidprimers ist.

21. Verfahren zum Detektieren einer Zielsequenz eines Zielpolynukleotids ("Zielsequenz"), wobei das Verfahren umfasst:

(a) Amplifizieren der Zielsequenz durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20 und

(b) Detektieren des verlängerten ersten Primers und/oder des verlängerten zweiten Primers,

wobei wenigstens einer von dem ersten Primer und dem zweiten Primer ein modifiziertes Nukleotid in dem Teil davon, das an das Zielnukleotid bindet, umfasst, und wobei ein Antikörper für das modifizierte Nukleotid in der Kombination enthalten ist, wobei der Antikörper fähig ist, an das modifizierte Nukleotid zu binden und wenigstens einen der Primer daran zu hindern, entlang dieser Zielsequenz verlängert zu werden, und wobei der Antikörper von wenigstens einem der Primer durch Temperaturerhöhung während des Temperatur-Cycling irreversibel freigesetzt wird, wodurch es möglich wird, dass wenigstens einer der Primer mit der Zielpolynukleotidsequenz bindet und entlang dieser verlängert wird.

22. Verfahren nach Anspruch 24, wobei die Wiederholung der Schritte (v)–(vii) durch wiederholtes Temperatur-Cycling erreicht wird.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

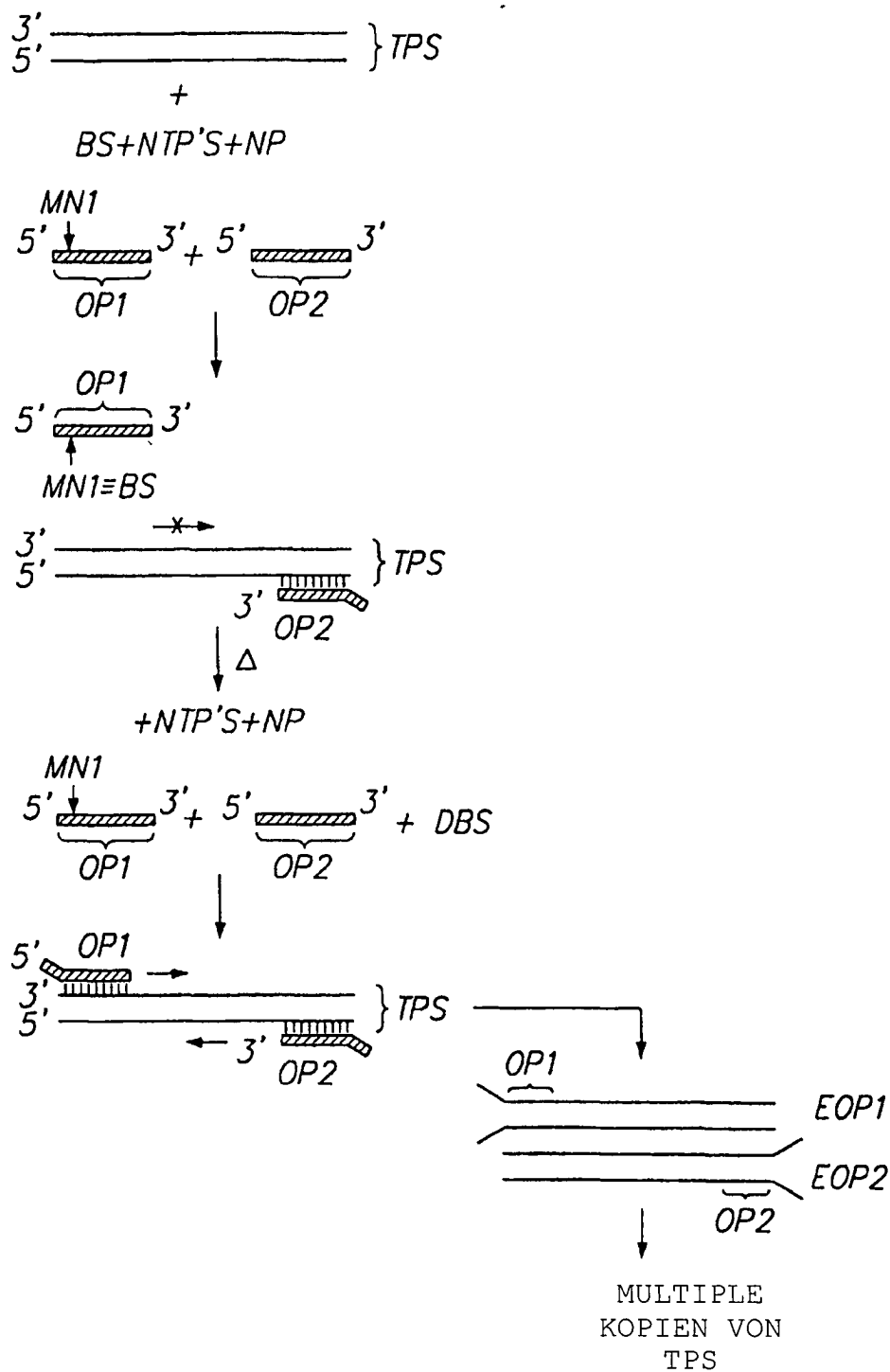


FIG. 1

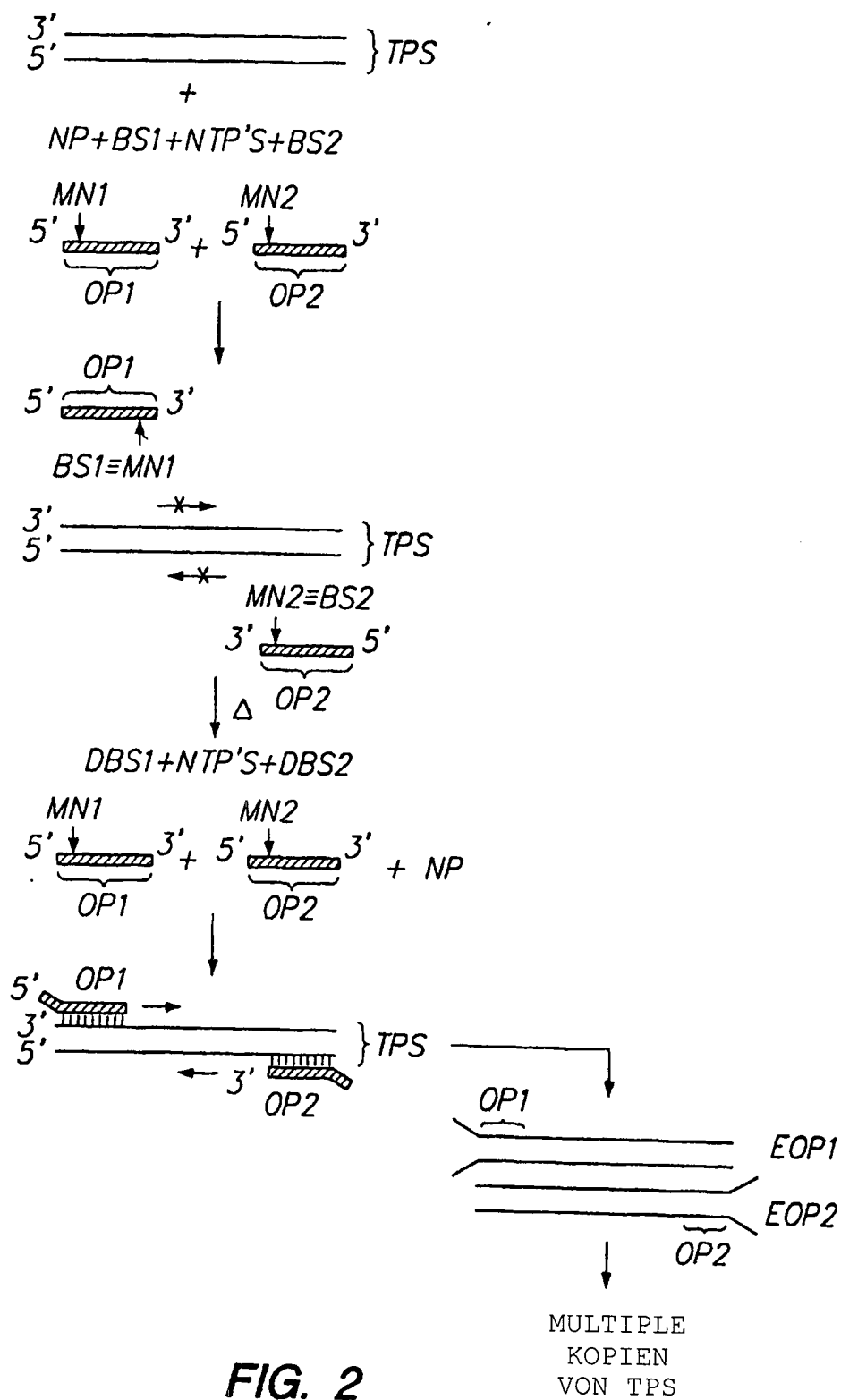


FIG. 2

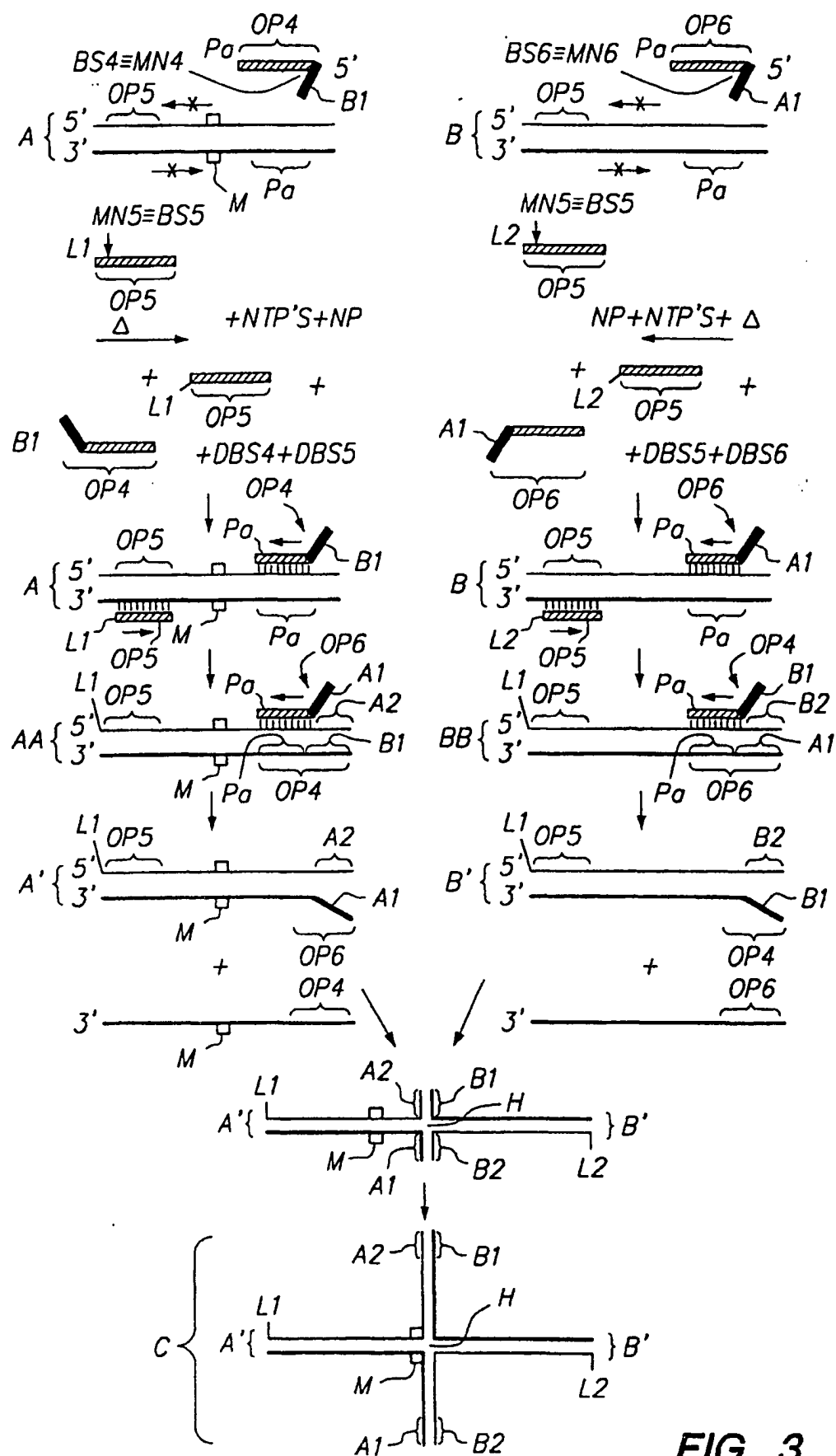


FIG. 3