

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Mai 2001 (25.05.2001)

PCT

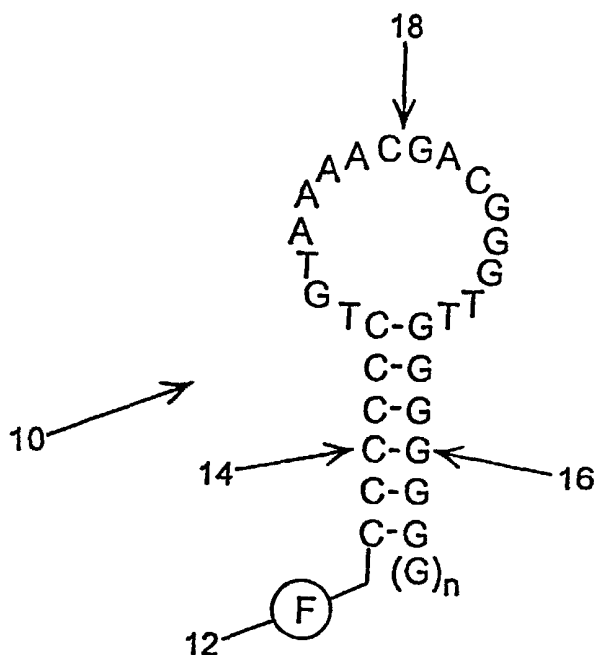
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/36668 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): ATTO-TEC GMBH [DE/DE]; Schanzenweg 50, D-57076 Siegen (DE).
C07H 21/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03635
- (22) Internationales Anmeldedatum: 16. November 1999 (16.11.1999)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SAUER, Markus [DE/DE]; Hedwig-Jochmus-Strasse 12, D-69124 Heidelberg (DE). WOLFRUM, Jürgen [DE/DE]; Südring 2, D-37124 Rosdorf-Obernjesa (DE).
- (74) Anwalt: KÖLLNER, Malte; Schwanthaler Strasse 178, D-80339 München (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: COLOUR LABELLED OLIGONUCLEOTIDE FOR LABELLING A NUCLEIC ACID MOLECULE

(54) Bezeichnung: FARBSTOFFMARKIERTES OLIGONUKLEOTID ZUM MARKIEREN EINES NUKLEINSÄUREMOLEKÜLS



(57) Abstract: The invention relates to an oligonucleotide (10) which serves as nucleic acid probe and consists of a loop section (18) that is provided with a loop sequence being complementary to a target sequence of the nucleic acid molecule. Said oligonucleotide also consists of stem sections (14, 16) that are arranged on both ends of the loop section and can hybridise with each other for closing the oligonucleotide (10) in such a way that said oligonucleotide forms a loop. Only one of the stem sections (14) is labelled with a fluorescence colour (12). The remaining stem section (16) contains guanosine (6). Guanosine quenches the fluorescence of the colour (12) by means of a photo-induced transfer of electrons provided that colour (12) and guanosine (6) are present in sufficient spatial proximity. This is the case when stem sections (14, 16) hybridise with each other and close the oligonucleotide (10) to form a loop. When the loop section (18) hybridises with the target sequence section of the nucleic acid molecule, however, the oligonucleotide (10) that is folded to form a loop opens and the distance between colour (12) and guanosine (6) increases. Quenching of fluorescence is thus prevented. The oligonucleotide can be detected by the fluorescence thereof. The strength of fluorescence is a specific measure for the presence of nucleic acid molecules having the target sequence.

(57) Zusammenfassung: Das Oligonukleotid (10) dient als Nukleinsäuresonde. Es besteht aus einem Schleifenabschnitt (18), der eine zu einer Zielsequenz des Nukleinsäuremoleküls komplementäre Schleifensequenz aufweist, sowie aus an beiden Enden des Schleifenabschnitts angeordneten Stielabschnitten (14, 16), die miteinander hybridisieren können, um das Oligonukleotid (10) zu einer Schleife zu schliessen. Nur einer der Stielabschnitte (14) ist mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (12) markiert. Der andere Stielabschnitt (16) enthält Guanosen (6). Guanosen löscht die Fluoreszenz des Farbstoffs (12) durch photoinduzierten Elektronentransfer, sofern Farbstoff (12) und Guanosen (6) sich in hinreichender räumlicher Nähe befinden. Dies ist gegeben, wenn die Stielabschnitte (14, 16) miteinander hybridisieren.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 01/36668 A1



(81) **Bestimmungsstaaten** (*national*): CN, JP, US.

(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

und das Oligonukleotid (10) zu einer Schleife schliessen. Hybridisiert dagegen der Schleifenabschnitt (18) mit dem Zielsequenz-Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls, so öffnet sich das zur Schleife gefaltete Oligonukleotid (10) und der Abstand zwischen Farbstoff (12) und Guanosin (6) vergrößert sich. Eine Fluoreszenzlöschung wird dadurch verhindert. Das Oligonukleotid kann dann durch seine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Stärke der Fluoreszenz ist ein spezifisches Mass für das Vorhandensein von Nukleinsäuremolekülen mit der Zielsequenz.

**Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid zum Markieren
eines Nukleinsäuremoleküls**

Die Erfindung bezieht sich auf ein farbstoffmarkiertes
5 Oligonukleotid zum Markieren eines einen Zielsequenz-Ab-
schnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls, wobei das farb-
stoffmarkierte Oligonukleotid folgende Komponenten aufweist:
einen Schleifenabschnitt, der eine zur Zielsequenz im we-
sentlichen komplementäre Schleifensequenz aufweist; einen an
10 einem Ende des Schleifenabschnitts angeordneten ersten
Stielabschnitt mit mindestens drei Nukleosiden; einen am an-
deren Ende des Schleifenabschnitts angeordneten zweiten
Stielabschnitt mit mindestens drei Nukleosiden, wobei die
beiden Stielabschnitte intramolekular hybridisieren können;
15 und einen Fluorophor, der an einer Position des ersten
Stielabschnitts gebunden ist.

Die Erfindung bezieht sich ferner auf die Verwendung
des farbstoffmarkierten Oligonukleotids zum Markieren eines
einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremole-
20 küls in einer Lösung und auf zwei Verfahren zum Nachweisen
eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäure-
moleküls in einer Lösung.

Die eingangs genannten farbstoffmarkierten Oligonukleo-
tide werden häufig "Nukleinsäuresonden" genannt. Sie spielen
25 eine zentrale Rolle bei der schnellen und empfindlichen De-
tektion spezifischer, bekannter Nukleinsäuremoleküle (DNA
oder RNA) in biologischen Proben in der Molekularbiologie
und Biotechnologie. Zu speziellen Anwendungen gehören unter
anderem die medizinische Früherkennung einer bakteriellen
30 oder viralen Infektion, die Forensik, der Einsatz in der
DNA/RNA-Amplifizierung durch PCR oder durch andere Techni-
ken, in der Frühdiagnose eines genetischen Fehlers sowie bei
der Diskriminierung zwischen ähnlichen Organismen und Alle-
len.

Es sind verschiedene Verfahren zur Erkennung und Mengenbestimmung von Nukleinsäuren bekannt. Das weit verbreitete Southern-Blotting-Verfahren zeichnet sich durch zeitraubende Arbeitsschritte und eine schlechte Empfindlichkeit aus.

Ein neueres, elegantes Verfahren zum Nachweisen eines spezifischen Nukleinsäuremoleküls verwendet die sogenannten "Molecular Beacons" (Tyagi et al. 1996, Nature Biotechnology 14, 303-308; Kostrikis et al. 1998, Science 279, 1228-1229).

Molecular Beacons sind farbstoffmarkierte Oligonukleotide, die die eingangs genannte Stiel-Schleifen-Struktur haben. An den beiden freien Enden der Stielabschnitte (dem 3'- und dem 5'-Ende) ist jeweils ein Fluorophor gekoppelt. Der eine Fluorophor dient als Fluoreszenz-Farbstoff und der andere als Quencher-Farbstoff, der die Fluoreszenz des Fluoreszenz-Farbstoffs bei hinreichender räumlicher Nähe durch Foerster-Energietransfer löscht.

Die Sequenzen der Stielabschnitte an beiden Enden der Molecular Beacons sind derart gewählt, daß dann, wenn sich der Molecular Beacon faltet, die Stielabschnitte ausschließlich aneinander, nicht aber mit anderen Abschnitten des Oligonukleotids hybridisieren. Im Zustand der hybridisierten Stielabschnitte ist der Abstand zwischen dem Fluoreszenz-Farbstoff und dem Quencher-Farbstoff hinreichend klein, so daß der Fluoreszenz-Farbstoff auch bei geeigneter Anregung mit Licht nicht fluoresziert.

Der Schleifenabschnitt weist eine Sequenz auf, die zur Sequenz des Zielsequenz-Abschnitts komplementär ist. Befinden sich die Molecular Beacons und die Zielsequenz aufweisende DNA/RNA-Moleküle gemeinsam in einer Lösung, so können die Schleifenabschnitte und die Zielsequenz-Abschnitte hybridisieren. Die Sequenzen und Längen der Stiel- und Schleifenabschnitte sind derart gewählt, daß sich der Molecular Beacon unter Lösung der Hybridisierung der beiden Stielabschnitte entfaltet. Infolge der Entfaltung wird der räumliche Abstand zwischen dem Fluoreszenz-Farbstoff und dem

Quencher-Farbstoff stark vergrößert. Der Fluoreszenz-Farbstoff kann dann zur Fluoreszenz angeregt werden.

Beobachtet man kontinuierlich die Fluoreszenz-Intensität des Fluoreszenz-Farbstoffs, so kann ein Anstieg festgestellt werden, wenn die Molecular Beacons die Zielsequenz-Abschnitte der Nukleinsäuremoleküle aufspüren und an diesen hybridisieren. Auf diese Weise können die Nukleinsäuremoleküle quantitativ nachgewiesen werden.

Der Nachteil dieser Art von Molecular Beacons liegt in ihrer relativ aufwendigen Synthese, da das Oligonukleotid sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende spezifisch mit dem Fluoreszenz- bzw. dem Quencher-Farbstoff markiert werden muß.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den Nachweis eines Nukleinsäuremoleküls mit Hilfe eines farbstoffmarkierten Oligonukleotids zu verbessern.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein farbstoffmarkiertes Oligonukleotid mit den Merkmalen des Anspruchs 1, durch die Verwendung des farbstoffmarkierten Oligonukleotids gemäß Anspruch 10 sowie durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 11 bzw. 12 gelöst.

Die Erfindung geht von der Erkenntnis aus, daß die Fluoreszenz verschiedener Fluorophore durch Nukleoside über einen photoinduzierten Elektronentransfer gelöscht werden kann (Sauer et al. 1995, J. Fluoresc. 5, 247 - 261; Seidel et al. 1996, J. Phys. Chem. 100, 5541 - 5553). Die Effizienz der Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer hängt stark vom Abstand zwischen dem Fluorophor und dem Nukleosid ab, d.h. nur bei einem geringen Abstand zwischen Fluorophor und dem geeigneten Nukleosid (in einem Einzel- oder Doppelstrang) tritt eine spürbare Fluoreszenzlöschung auf. Es wurde festgestellt, das beispielsweise ein Guanosin, das mehr als 4 Basen von der Kopplungsstelle des Fluorophors entfernt ist, keinen merklichen Einfluß auf die Fluoreszenzfähigkeit des Fluorophors hat, sofern der Fluorophor nur über einen sehr kurzen Spacer an das zugehörige Nukleosid gebunden ist. Dies gilt sowohl für ein Guanosin im

Strang des Fluorophors als auch für solche im gegenüberliegenden Strang.

Bei dem erfindungsgemäßen farbstoffmarkierten Oligonukleotid weist der zweite Stielabschnitt mindestens ein Quencher-Nukleosid auf, welches die Fluoreszenz des Fluorophors bei hinreichender räumlicher Nähe zwischen Fluorophor und Quencher-Nukleosid durch photoinduzierten Elektronentransfer löscht. Die Sequenz des ersten Stielabschnitts und die Position des Fluorophors sind derart gewählt, daß im hybridisierten Zustand der beiden Stielabschnitte eine für eine Fluoreszenzlöschung hinreichende räumliche Nähe zwischen dem Fluorophor und dem Quencher-Nukleosid vorliegt, und daß bei Hybridisierung des Schleifenabschnitts mit dem Zielsequenz-Abschnitt und Auflösung der Hybridisierung der Stielabschnitte keine Fluoreszenzlöschung des Fluorophors auftritt.

Ein solches farbstoffmarkiertes Oligonukleotid (bzw. eine solche Nukleinsäuresonde) hat eine Reihe von Vorteilen. Es wird nur ein einziger Fluorophor benötigt. Dadurch vereinfacht sich die Synthese. Da der Mechanismus der Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer genau verstanden ist, kann auch eine gezielte Optimierung der Fluoreszenzlöschung vorgenommen werden.

Für eine effiziente Löschung müssen Nukleosid und Fluorophor aufeinander abgestimmt sein. Von den natürlich vorkommenden Nukleosiden hat Guanosin die stärkste löschende Wirkung auf Rhodamin-Farbstoffe. Die Löscheffizienz kann dadurch erhöht werden, daß 7-Deaza-Guanosin als Quencher-Nukleosid verwendet wird. In beiden Fällen bietet es sich an, daß alle weiteren Nukleoside des zweiten Stielabschnitts Guanosine sind. Entsprechend können als Nukleoside des ersten Stielabschnitts Cytidine gewählt werden.

Die Sequenz des ersten Stielabschnitts kann derart gewählt werden, daß der erste Stielabschnitt nicht mit einem an den Zielsequenz-Abschnitt angrenzenden Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls hybridisieren kann. Andernfalls könnte

der Fluorophor des ersten Stielabschnitts in die Nähe eines als Quencher wirkenden Guanosins geraten.

Als weiteres Quencher-Nukleosid kann 7-Deaza-Adenosin verwendet werden. Durch Einsatz von 7-Deaza-Adenosin als
5 Quencher wird der Löscheffekt auf den Fluorophor im Vergleich zum unmodifizierten Guanosin drastisch gesteigert. Wenn 7-Deaza-Adenosin als Quencher-Nukleosid eingesetzt wird, wird das Fluorophor vorteilhafterweise an Thymidin (im Falle von DNA-Molekülen) oder an Uridin (im Falle von RNA-
10 Molekülen) gekoppelt. Diese Nukleoside gehen bei einer Hybridisierung der beiden Stielabschnitte eine Basenpaarung mit dem 7-Deaza-Adenosin ein.

Verwendet man 7-Deaza-Adenosin als Quencher-Nukleosid am zweiten Stielabschnitt und koppelt den Fluorophor an Thy-
15 midin oder Uridin, so liegt bei einer Hybridisierung des ersten Stielabschnitts mit einem Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls dem Fluorophor im Doppelstrang ein natürliches, unmodifiziertes Adenosin gegenüber. Dieses läßt die Fluoreszenz des Fluorophors im wesentlichen unbeeinflußt. Daher
20 kann eine Hybridisierung des ersten Stielabschnitts mit einem an den Zielsequenz-Abschnitt angrenzenden Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls zugelassen werden, sofern die Sequenzen des ersten Stielabschnitts und des Zielsequenz-Abschnitts derart gewählt werden, daß sich kein Guanosin in der Nähe
25 des Fluorophors befindet. Durch die Hybridisierung des ersten Stielabschnitts an einem Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls befindet sich das Fluorophor in einer wohldefinierten Umgebung. Unkontrollierbare Hybridisierungen mit anderen Nukleinsäuremolekülen in der Lösung werden dadurch vermie-
30 den.

Guanosin, 7-Deaza-Guanosin und 7-Deaza-Adenosin können auch gemischt im zweiten Stielabschnitt verwendet werden.

Eine besonders einfache Synthese des farbstoffmarkierten Oligonukleotids kann dann erreicht werden, wenn der er-
35 ste Stielabschnitt am 5'-Ende des Schleifenabschnitts ange-

ordnet ist und der Fluorophor terminal am endständigen Nukleosid gekoppelt ist.

Eine weitere vorteilhafte Möglichkeit eröffnet sich, wenn der erste Stielabschnitt am 3'-Ende des Schleifenabschnitts angeordnet ist, der Fluorophor terminal am endständigen Nukleosid des ersten Stielabschnitts gekoppelt ist und das 5'-Ende des zweiten Stielabschnitts für eine Immobilisierung funktionalisiert ist. Auf diese Weise können die Nukleinsäuresonden z.B. auf einem DNA-Chip immobilisiert werden. Letzterer kann eine Hybridisierung durch ein Fluoreszenzsignal anzeigen.

Das 5'-Ende des zweiten Stielabschnitts kann mit einem Acrylamid-Molekül funktionalisiert werden. Eine solcherart funktionalisierte Nukleinsäuresonde kann bei der Herstellung eines Polyacrylamidgels durch Copolymerisation immobilisiert werden. Dies kann an einer bestimmten Position in einem Plattengel oder einer Kapillare erfolgen. Eine zu untersuchende Probe, die Nukleinsäuremoleküle mit den unterschiedlichsten Sequenzen enthalten kann, wird dann unter nicht-denaturierenden Bedingungen im Gel aufgetrennt. Das Vorhandensein eines den Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls zeigt sich durch ein entsprechendes Signal an der Position der immobilisierten Nukleinsäuresonde in Gel. Anschließend kann das den Zielsequenz-Abschnitt aufweisende Nukleinsäuremolekül z.B. durch Ausschneiden aus dem Plattengel gezielt isoliert werden.

Der Schleifenabschnitt muß lang genug sein, um bei Hybridisierung mit dem Zielsequenz-Abschnitt die Hybridisierung der beiden Stielabschnitte aufzulösen. Er muß andererseits aber nur genau so lang sein, daß eine eindeutige Identifizierung des Zielsequenz-Abschnitts gegeben ist. Vorteilhafterweise umfaßt daher der Schleifenabschnitt 8 bis 50 Nukleoside.

Die beiden Stielabschnitte müssen mindestens so lang sein, daß eine zuverlässige Hybridisierung auftreten kann. Andererseits sollte die Hybridisierung der beiden Stielab-

schnitte jedoch im Falle der Hybridisierung des Schleifenabschnitts mit dem Zielsequenz-Abschnitt aufgelöst werden. Die Stärke der Hybridisierung läßt sich durch die Länge der beiden Stielabschnitte beeinflussen. Vorteilhafterweise umfaßt
5 daher der erste Stielabschnitt 3 bis 8 Nukleoside und der zweite Stielabschnitt mindestens so viele Nukleoside wie der erste Stielabschnitt.

Als Fluorophore eignen sich prinzipiell alle bekannten Farbstoffmoleküle, speziell aber Rhodamin- und Phenoxazin-
10 Farbstoffe. Letztere sind gut koppelbar und photostabil. Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von Rhodamin- oder Phenoxazin-Farbstoffen besteht darin, daß als Anregungslichtquelle für eine Fluoreszenzdetektion kleine und billige Diodenlaser eingesetzt werden können.

15 Das erfindungsgemäße farbstoffmarkierte Oligonukleotid kann vorteilhaft zum Markieren eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung verwendet werden, wobei das farbstoffmarkierte Oligonukleotid mit dem Nukleinsäuremolekül hybridisiert.

20 Das erfindungsgemäße farbstoffmarkierte Oligonukleotid ist außerdem besonders zum Nachweis eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung geeignet. Dazu wird das Nukleinsäuremolekül mit einem erfindungsgemäßen farbstoffmarkierten Oligonukleotid markiert.

25 Zur Stabilisierung des Doppelstrangs aus Sonde und Nukleinsäuremolekül und zur Verbesserung der Löscheffizienz zwischen Quencher und Fluorophor wird nach der Hybridisierung und vor der Aufnahme eines Nachweissignals der pH-Wert der Lösung auf Werte zwischen 2 und 4 eingestellt. Um zu vermeiden, daß sich Intensitätsschwankungen, beispielsweise aufgrund von Inhomogenitäten der Lösung, auf die Meßergebnisse auswirken, kann die Fluoreszenz des Fluorophors derart ange-
30 regt und detektiert werden, daß dessen Fluoreszenzabklingverhalten erfaßt wird.

35 Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen gekennzeichnet.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, die in den Figuren schematisch dargestellt sind. Gleiche Bezugsziffern in den einzelnen Figuren bezeichnen dabei gleiche Elemente. Im einzelnen zeigen:

Fig. 1 ein farbstoffmarkiertes Oligonukleotid, bei dem die Stielabschnitte aneinander hybridisiert sind;

Fig. 2 das farbstoffmarkierte Oligonukleotid gemäß Fig. 1, wobei der Schleifenabschnitt an einem Nukleinsäuremolekül hybridisiert ist;

Fig. 3 ein zweites Ausführungsbeispiel eines farbstoffmarkierten Oligonukleotids, bei dem die Stielabschnitte aneinander hybridisiert sind;

Fig. 4 das farbstoffmarkierte Oligonukleotid gemäß Fig. 3, wobei der Schleifenabschnitt an einem Nukleinsäuremolekül hybridisiert ist; und

Fig. 5 ein drittes Ausführungsbeispiel eines farbstoffmarkierten Oligonukleotids, bei dem die Stielabschnitte aneinander hybridisiert sind;

Fig. 6 das farbstoffmarkierte Oligonukleotid gemäß Fig. 5, wobei der Schleifenabschnitt an einem Nukleinsäuremolekül hybridisiert ist; und

Fig. 7 eine schematische Darstellung der möglichen Zustandsänderungen beim photoinduzierten Elektronentransfer.

In den Figuren bezeichnen die Buchstaben A, C, G und T die Nukleoside Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymidin.

Im folgenden sei der photoinduzierte Elektronentransfer anhand von Fig. 7 kurz erläutert. Dargestellt ist die Fluoreszenzlöschung eines angeregten Farbstoff-Moleküls F^* durch eine Nukleosid N. Die schwarzen Kreise repräsentieren Elektronen. Es sind jeweils das HOMO (highest occupied molecular orbital) und das LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) eingezeichnet. Das HOMO ist das energetisch höchste, im

elektronischen Grundzustand besetzte Molekülorbital. Das LUMO ist das energetisch niedrigste, im elektronischen Grundzustand unbesetzte Molekülorbital; es ist i.d.R. das Molekülorbital, das im ersten angeregten Zustand besetzt wird.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten der Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer. Im in Fig. 7 links dargestellten Fall wirkt das Nukleosid N als Elektronenspender (Donor). Nach Anregung des Fluorophors F* geht ein Elektron vom doppelt besetzten HOMO des Nukleosids zum nun einfach besetzten HOMO des Fluorophors F* über (1). Es kommt zu einer Reduktion des angeregten Fluorophors F* durch das Nukleosid N. Das Elektron im LUMO des Fluorophors kann anschließend zum nun einfach besetzten HOMO des Nukleosids N übergehen (2). Dieser Fall tritt zwischen Guanosin und Rhodamin-Molekülen auf.

Im in Fig. 7 rechts dargestellten Fall wirkt das Nukleosid N als Elektronenakzeptor (Akzeptor). Aus dem einfach besetzten LUMO des angeregten Fluorophors F* geht das dort befindliche Elektron zum unbesetzten LUMO des Nukleosids N über (3). Es kommt zu einer Oxidation des angeregten Fluorophors F* durch das Nukleosid N. Das Elektron im LUMO des Nukleosids kann anschließend zum HOMO des Fluorophors zurückkehren (4).

In beiden Fällen kann das Elektron nach dem Elektronentransfer nicht mehr aus dem LUMO des angeregten Fluorophors F* durch Aussenden eines Photons in das HOMO zurückkehren. Der erste angeregte Zustand wurde strahlungslos deaktiviert. Die Fluoreszenz ist gelöscht.

Fig. 1 zeigt ein Oligonukleotid 10, an dessen einem Ende ein Fluorophor 12 gekoppelt ist. Das Oligonukleotid 10 besteht aus einem ersten Stielabschnitt 14, einem zweiten Stielabschnitt 16 und einem Schleifenabschnitt 18. Die Sequenz des ersten Stielabschnitts 14 besteht aus 6 Nukleosiden, die alle Cytidine sind. Die Sequenz des zweiten Stielabschnitts 16 besteht aus mindestens 6 Guanosinen.

Dadurch können der erste Stielabschnitt 14 und der zweite Stielabschnitt 16 aneinander hybridisieren und das Oligonukleotid 10 in eine Stiel-Schleifen-Struktur falten. Die genaue Länge des zweiten Stielabschnitts ist unerheblich, 5 sofern er mindestens so viele Nukleoside aufweist, wie der erste Stielabschnitt.

Im folgenden wird auf Fig. 2 Bezug genommen. Die Sequenz des Schleifenabschnitts 18 ist derart gewählt, daß das Oligonukleotid 10 als Sonde für ein spezifisches Nukleinsäuremolekül 20 dienen kann. In der Regel ist die Schleifensequenz komplementär zur Sequenz eines Zielabschnitts des Nukleinsäuremoleküls 20. Werden das Oligonukleotid 10 und das Nukleinsäuremolekül 20 zusammen in eine Lösung gegeben, so hybridisiert der Schleifenabschnitt 18 am Zielsequenz-Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls 20. Dadurch löst sich die 15 Hybridisierung zwischen den beiden Stielabschnitten 14, 16. Infolgedessen vergrößert sich der Abstand zwischen dem Fluorophor 12 und den Guanosinen des zweiten Stielabschnitts 16. Letztere wirken nicht mehr fluoreszenzlöschend auf den Fluorophor 12, dessen Fluoreszenz somit beobachtet werden kann. Ein Anstieg der Fluoreszenz des Fluorophors 12 erlaubt daher qualitative und quantitative Aussagen über das Vorliegen des Nukleinsäuremoleküls 20. 20

Der Zielsequenz-Abschnitt auf dem Nukleinsäuremolekül 20 wird bei diesem Ausführungsbeispiel derart gewählt, daß der erste Stielabschnitt 14 bei Hybridisierung des Schleifenabschnitts 18 nicht mit dem Nukleinsäuremolekül 20 hybridisiert. Dadurch wird die Nähe zu irgendwelchen Guanosinen auf diesem Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls 20 prinzipiell 30 vermieden. In Fig. 2 erkennt man jedoch, daß der zweite Stielabschnitt 16 beispielsweise teilweise auf dem Nukleinsäuremolekül hybridisieren kann.

Im folgenden wird auf Fig. 3 Bezug genommen. Fig. 3 zeigt ein zweites Ausführungsbeispiel eines farbstoffmarkierten Oligonukleotids 10, das im wesentlichen mit dem Oligonukleotid gemäß Fig. 1 übereinstimmt. Das Oligonukleotid 35

gemäß Fig. 3 weist jedoch im ersten Stielabschnitt 14 als
fünftes Nukleosid - gezählt vom Ende her - ein Thymidin auf.
Der zweite Stielabschnitt weist als neuntes Nukleosid -
ebenfalls vom Ende her gezählt - ein Adenosin auf. Im hybri-
5 disierten Doppelstrang kommt es zwischen dem Adenosin und
dem Thymidin zur Basenpaarung. Die Cytidine und Guanosine
können dann nicht gegeneinander versetzt hybridisieren.
Dadurch ist gewährleistet, daß an einem Ende ein Guanosin-
Überstand resultiert, der die Löschung des Fluorophors
10 begünstigt.

Fig. 4 zeigt das Oligonukleotid 10 gemäß Fig. 3 an
einem Nukleinsäuremolekül 20 hybridisiert, das einen Ziel-
sequenz-Abschnitt aufweist, dessen Sequenz komplementär zur
Schleifensequenz ist.

15 Im folgenden wird auf Fig. 5 Bezug genommen. Fig. 5
zeigt ein zweites Ausführungsbeispiel eines farbstoffmar-
kierten Oligonukleotids 22 mit einem ersten Stielabschnitt
24 und einem zweiten Stielabschnitt 26. Der zweite Stielab-
schnitt 26 weist genau 6 Nukleoside auf, von denen das end-
20 ständige Nukleosid ein modifiziertes Adenosin ist, genauer
gesagt 7-Deaza-Adenosin. Dies ist in den Fig. 5 und 6 mit A'
bezeichnet. Entsprechend befindet sich an der im hybridi-
sierten Zustand der beiden Stielabschnitte 24, 26 dem 7-
Deaza-Adenosin gegenüberliegenden Stelle des ersten Stielab-
25 schnitts 24 ein Thymidin. An das Thymidin ist der Fluorophor
12 gekoppelt.

Fig. 6 zeigt das Nukleinsäuremolekül 20 gemäß Fig. 2,
an welches das als Sonde dienende farbstoffmarkierte Oligo-
nukleotid 22 gemäß Fig. 5 hybridisiert ist. Die Fig. 2 und 6
30 unterscheiden sich nur dahingehend, daß die Stielabschnitte
14, 16 bzw. 24, 26 unterschiedliche Sequenzen aufweisen. Der
erste Stielabschnitt 24 hat in den Fig. 5 und 6 eine Se-
quenz, die eine Hybridisierung des ersten Stielabschnitts 24
mit einem an den Zielsequenz-Abschnitt angrenzenden Ab-
35 schnitt des Nukleinsäuremoleküls 20 ermöglicht.

Der Zielsequenz-Abschnitt und die zugehörige Sequenz des Oligonukleotids 22 können in der folgenden Weise bestimmt werden:

5 a) Auf dem Nukleinsäuremolekül 20 wird ein Adenosin gesucht, bei dem sich unter den jeweils 4, links und rechts benachbarten Nukleosiden weder Cytidin noch Guanosin befindet.

10 b) In Verlängerung dieses Adenosins z.B. in 5'-Richtung des Nukleinsäuremoleküls 20 um mindestens 9 Nukleoside wird eine Sequenz gesucht, die das Nukleinsäuremolekül 20 eindeutig kennzeichnet.

15 c) Die Oligonukleotidsequenz 22 wird zu dieser Sequenz komplementär gebildet. Dabei bilden die ersten 3 bis 6 Nukleoside am 5'-Ende der Oligonukleotidsequenz die erste Stielsequenz 24.

d) Die zweite Stielsequenz 26 wird auf die folgende Weise gewonnen: Es wird geprüft, ob es am 3'-Ende der Oligonukleotidsequenz

20 da) 3 bis 6 intramolekular ausschließlich zur ersten Stielsequenz komplementäre Nukleoside gibt, und ob

db) das 3'-terminale Nukleosid Adenosin ist.

Ist dies der Fall, so bilden diese 6 Nukleoside die zweite Stielsequenz 26.

25 Ist dies nicht der Fall, so wird die Oligonukleotidsequenz um 3 bis 6 Nukleoside derart verlängert, daß sich 3 bis 6 intramolekular ausschließlich zur ersten Stielsequenz komplementäre Nukleoside mit 3'-terminalem Adenosin ergeben. (Sollte dies nicht möglich sein, da sich z.B. die Sequenz des ersten Stielabschnitts innerhalb der Zielsequenz wiederholt, muß ein anderes Adenosin gemäß Schritt a) gesucht werden.)

Das 3'-terminale Adenosin wird bei der Synthese des Oligonukleotids durch 7-Deaza-Adenosin ersetzt.

35 (Die minimale Zahl von 9 Nukleosiden in Schritt b) ergibt sich aus der minimalen Länge der Oligonukleotidsequenz bestehend aus 3 Nukleosiden für die beiden Stielsequenzen

24, 26 und mindestens 4 Nukleosiden für den Faltungsabschnitt des Oligonukleotids.)

Man sieht an diesem Beispiel, daß sich die Schleifen- und Stielabschnitte auch überlappen können, und daß das
5 farbstoffmarkierte Oligonukleotid 22 auch vollständig auf dem Nukleinsäuremolekül 20 hybridisieren kann.

Prinzipiell kann der Farbstoff sowohl an das 3'-Ende als auch an das 5'-Ende des Oligonukleotids gekoppelt werden. Hierzu stehen die folgenden Möglichkeiten zur Verfügung:
10 gung:

(a) bekannte Modifikation eines Endes des Oligonukleotids mit einer Aminfunktion, z.B. durch einen C6-Aminolinker, und anschließende Ankopplung des Farbstoffs an das modifizierte Ende über eine aktivierte Carboxylfunktion.

15 (b) synthetischer Einbau eines aminomodifizierten Nukleotids beim Aufbau des Oligonukleotids, z.B. in einem Synthesizer, und anschließende Ankopplung des Farbstoffs an das aminomodifizierte Nukleotid über eine aktivierte Carboxylfunktion.

20 (c) synthetischer Einbau des Farbstoffs als Phosphoramidit während der Oligonukleotid-Synthese.

Zur Optimierung der Löscheffizienz muß einerseits der durch die Hybridisierung gebildete Doppelstrang möglichst stabil sein. Dies wird in bekannter Weise durch Einstellen
25 geeigneter Salzkonzentrationen erreicht. Andererseits kann aber auch der pH-Wert einen drastischen Einfluß auf die Löscheffizienz haben, etwa bei Verwendung eines Rhodamin-Farbstoffs, der eine freie Carboxylgruppe trägt, z.B. Tetramethylrhodamin. Durch die Protonierung der freien Carboxyl-
30 funktion im sauren Medium wird die Abstoßung zwischen dem Farbstoff und den Phosphatgruppen der Nukleotide verringert. Letzteres führt zu einem geringeren Abstand zwischen Farbstoff und Nukleotiden bzw. Nukleosiden und damit zu einer stärkeren Fluoreszenzlöschung. Bei Verwendung geeigneter
35 Farbstoffe wird daher der pH-Wert vor Aufnahme eines Nachweissignals auf ca. 3 eingestellt.

Zum Nachweis des Nukleinsäuremoleküls wird die Fluoreszenz des Fluorophors vorzugsweise mit zeitkorreliertem Einzelphotonenzählen nachgewiesen (D.V. O'Connor und D. Phillips, "Time-correlated single photon counting", Academic Press, London, 1984). Neben der besonders hohen Empfindlichkeit bietet diese spektroskopische Technik den Vorteil, daß mit ihrer Hilfe das Fluoreszenzabklingverhalten des Fluorophors 12 beobachtet werden kann. Dieses hat sich als verlässlicheres Kriterium zum Nachweis der Fluoreszenz des Fluorophors 12 und damit des Nukleinsäuremoleküls 20 erwiesen als eine einfache Intensitätsmessung. Intensitätsschwankungen, beispielsweise aufgrund von Inhomogenitäten der Lösung, wirken sich dadurch nicht auf die Meßergebnisse aus.

Im Rahmen der Erfindung sind zahlreiche Abwandlungen und Weiterbildungen der beschriebenen Ausführungsbeispiele verwirklicht. So muß beispielsweise der Fluorophor 12 nicht unmittelbar an demjenigen Nukleosid gekoppelt sein, das dem Quencher-Nukleosid im hybridisierten Zustand gegenüberliegt. Der Abstand zum erstgenannten Nukleosid muß nur hinreichend klein sein, um eine brauchbare Fluoreszenzlöschung durch das Quencher-Nukleosid hervorzurufen. Auch müssen der Schleifenabschnitt 18 und die Stielabschnitte 14, 16, 24, 26 nicht unmittelbar aneinander grenzen. Sie können durch weitere, kurze Sequenzabschnitte voneinander getrennt sein. Die Sequenz des Zielabschnitts und damit die komplementäre Sequenz des Schleifenabschnitts 18 sind prinzipiell beliebig. Außerdem kann das Nukleinsäuremolekül 20 ausschließlich aus dem Zielsequenz-Abschnitt bestehen.

Patentansprüche

1. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid zum Markieren
eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäure-
5 moleküls, wobei das farbstoffmarkierte Oligonukleotid folgende Komponenten aufweist:

- einen Schleifenabschnitt, der eine zur Zielsequenz im wesentlichen komplementäre Schleifensequenz aufweist;

10 - einen an einem Ende des Schleifenabschnitts angeordneten ersten Stielabschnitt mit mindestens drei Nukleosiden;

- einen am anderen Ende des Schleifenabschnitts angeordneten zweiten Stielabschnitt mit mindestens drei Nukleosiden, wobei die beiden Stielabschnitte aneinander hybridisieren können; und

15 - einen Fluorophor, der an einer Position des ersten Stielabschnitts gebunden ist;

dadurch gekennzeichnet,

20 daß der zweite Stielabschnitt mindestens ein Quencher-Nukleosid aufweist, welches die Fluoreszenz des Fluorophors bei hinreichender räumlicher Nähe zwischen Fluorophor und Quencher-Nukleosid durch photoinduzierten Elektronentransfer löscht;

wobei die Sequenz des ersten Stielabschnitts und die Position des Fluorophors derart gewählt sind,

25 daß im hybridisierten Zustand der beiden Stielabschnitte eine für eine Fluoreszenzlöschung hinreichende räumliche Nähe zwischen dem Fluorophor und dem Quencher-Nukleosid vorliegt, und

30 daß bei Hybridisierung des Schleifenabschnitts mit dem Zielsequenz-Abschnitt und Auflösung der Hybridisierung der Stielabschnitte keine Fluoreszenzlöschung des Fluorophors auftritt.

2. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach Anspruch 1,
35 dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Quencher-Nukleo-

sid Guanosin oder 7-Deaza-Guanosin oder 7-Deaza-Adenosin ist.

3. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach Anspruch 1
5 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Stielabschnitt
derart gewählt ist, daß bei Hybridisierung des Schleifen-
abschnitts mit dem Zielsequenz-Abschnitt des Nukleinsäure-
moleküls auch der erste Stielabschnitt mit einem Abschnitt
des Nukleinsäuremoleküls hybridisiert.

10 4. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach einem der
Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,
daß der erste Stielabschnitt am 5'-Ende des Schleifen-
abschnitts angeordnet ist; und
15 daß der Fluorophor terminal am endständigen Nukleosid
des ersten Stielabschnitts gekoppelt ist.

5. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach einem der
Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,
20 daß der erste Stielabschnitt am 3'-Ende des Schleifen-
abschnitts angeordnet ist;
daß der Fluorophor terminal am endständigen Nukleosid
des ersten Stielabschnitts gekoppelt ist; und
daß das 5'-Ende des zweiten Stielabschnitts für eine
25 Immobilisierung funktionalisiert ist.

6. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet, daß das 5'-Ende des zweiten Stiel-
abschnitts mit einem Acrylamid-Molekül funktionalisiert ist.

30 7. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach einem der
Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Schlei-
fenabschnitt 8 bis 50 Nukleoside umfaßt.

8. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Stielabschnitt maximal 8 Nukleoside umfaßt.

5 9. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Fluorophor ein Rhodamin- oder Phenoxazin-Farbstoffmolekül aufweist.

10 10. Verwendung des farbstoffmarkierten Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zum Markieren eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung, wobei das farbstoffmarkierte Oligonukleotid mit dem Nukleinsäuremolekül hybridisiert.

15 11. Verfahren zum Nachweisen eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung, wobei zum Markieren des Nukleinsäuremoleküls das Verfahren nach Anspruch 10 ausgeführt wird; und
20 wobei nach der Hybridisierung und vor der Aufnahme eines Nachweissignals der pH-Wert der Lösung auf Werte zwischen 2 und 4 eingestellt wird.

12. Verfahren zum Nachweisen eines einen Zielsequenz-
25 Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung, wobei zum Markieren des Nukleinsäuremoleküls das Verfahren nach Anspruch 10 ausgeführt wird; und
 wobei danach die Fluoreszenz des Fluorophors derart angeregt und detektiert wird, daß dessen Fluoreszenzabkling-
30 verhalten erfaßt wird.

1/4

Fig. 1

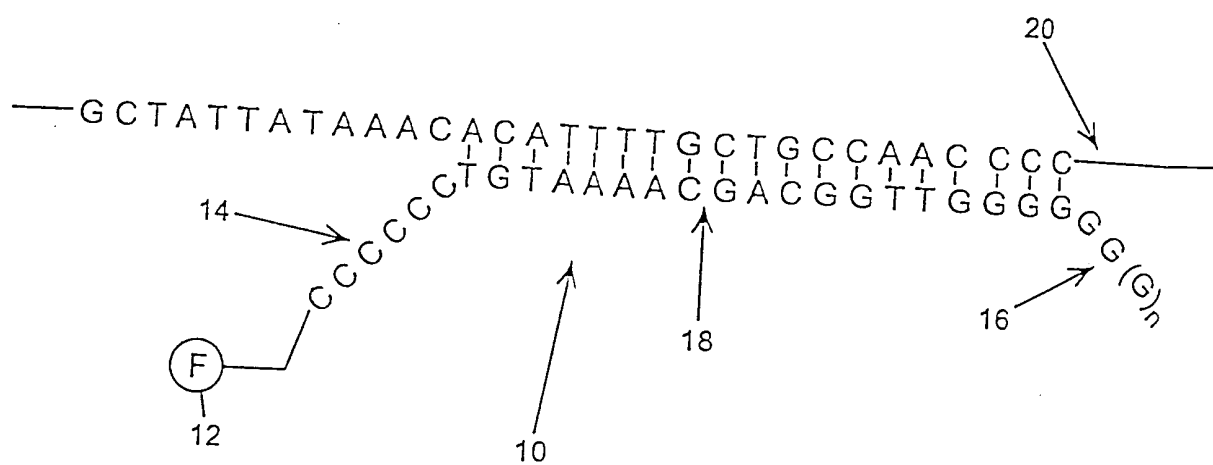
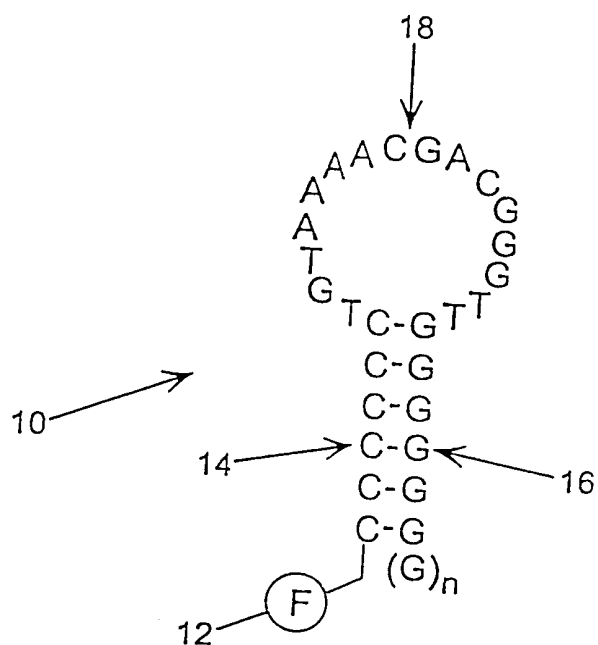


Fig. 2

2/4

Fig. 3

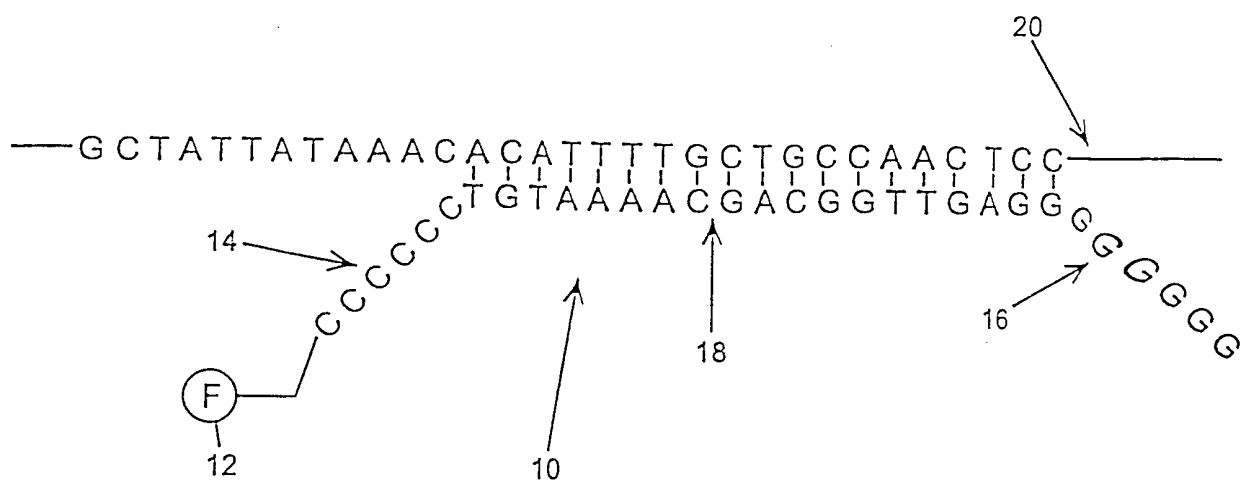
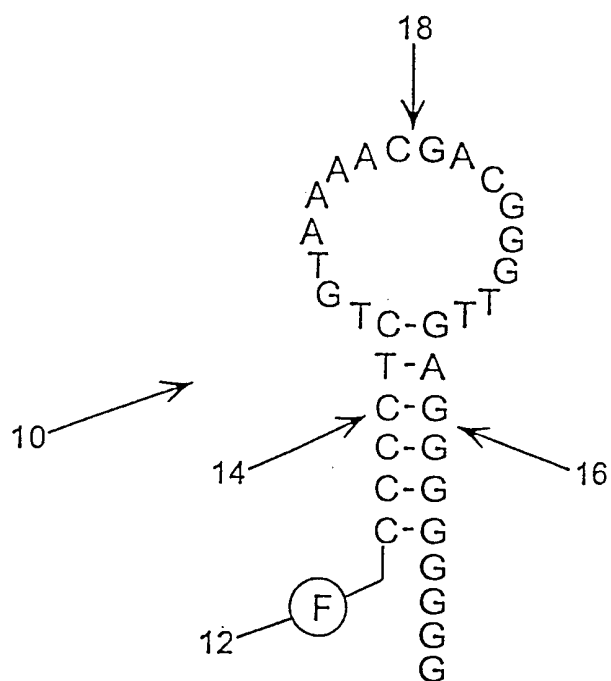


Fig. 4

3/4

Fig. 5

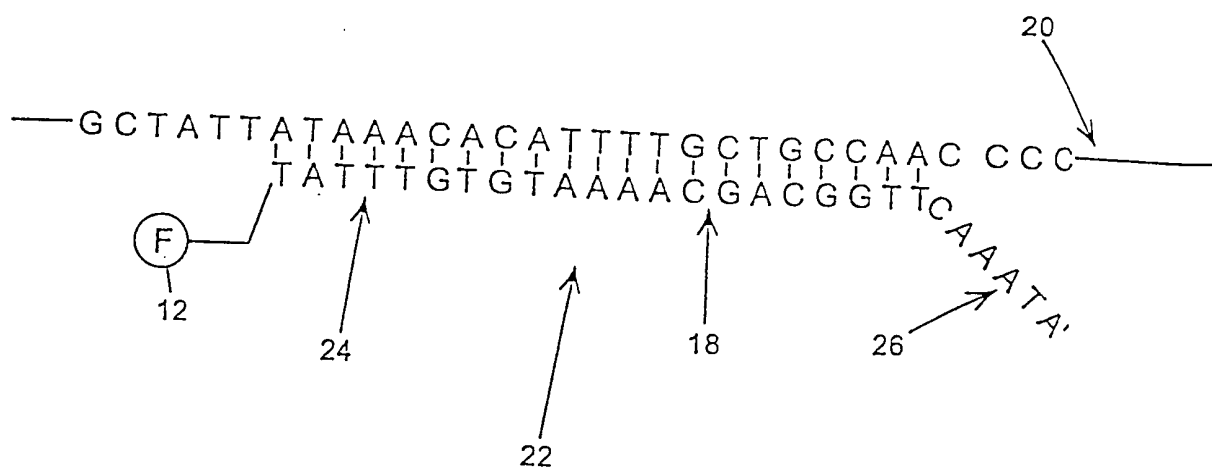
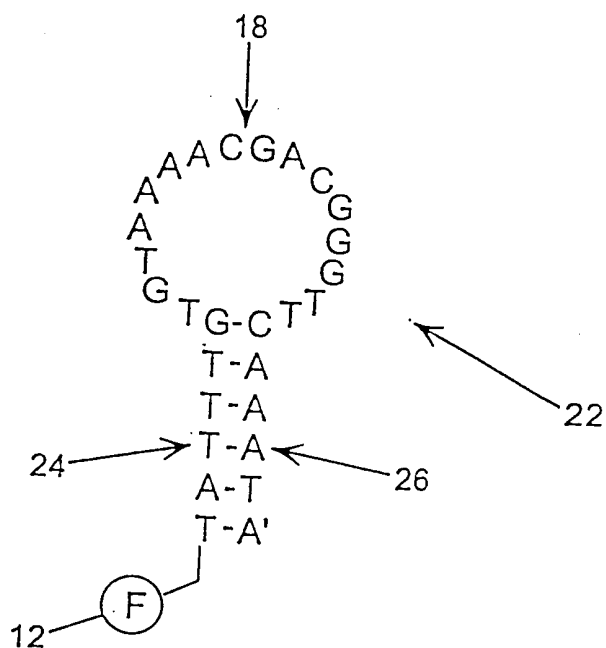
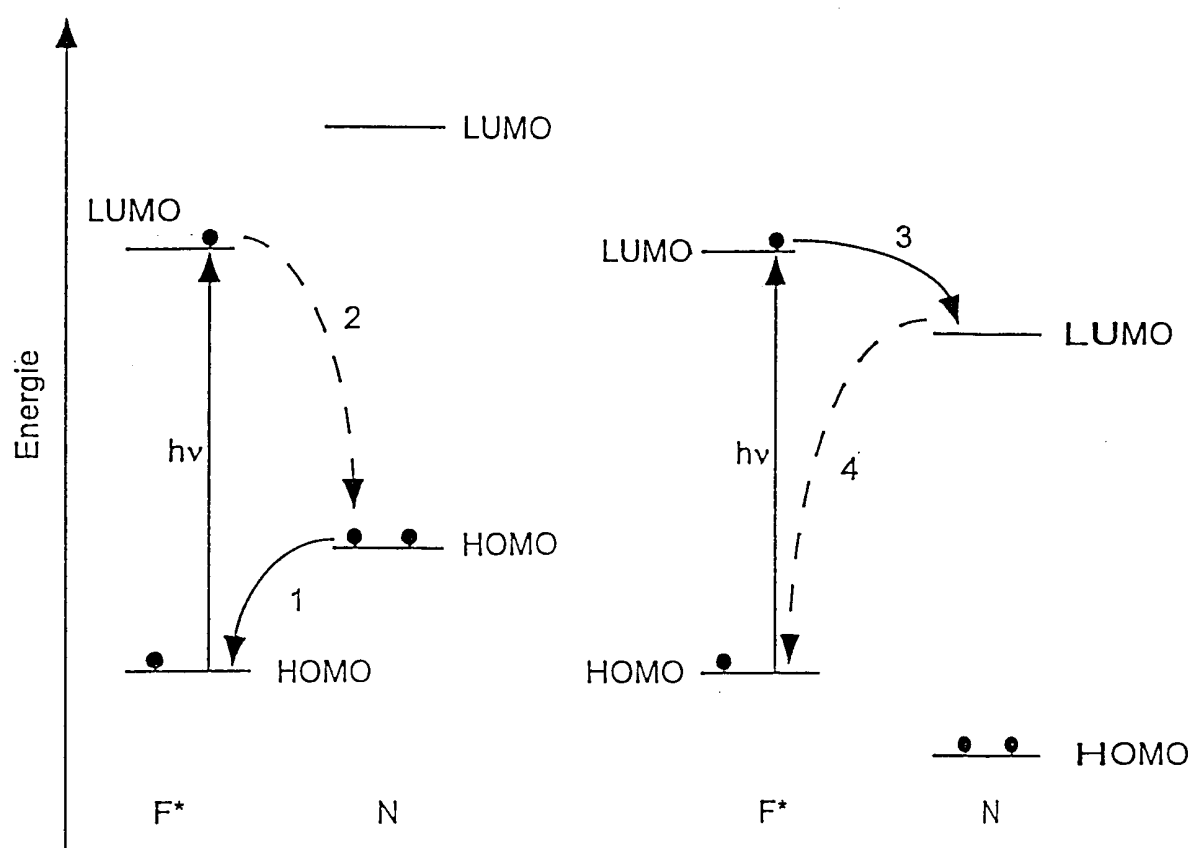


Fig. 6

4/4

Fig. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/DE 99/03635

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 C07H21/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

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

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

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SEIDEL C: "Nucleoside-specific quenching of fluorescent dyes. Nucleobase one-electron potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY, vol. 100, pages 5541-53, XP000925372 page 5549, right-hand column, paragraph 5 -page 5551 --- -/--	1-12

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

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 2000

Date of mailing of the international search report

01/08/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Patent Application No

PCT/DE 99/03635

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAUER M ET AL: "Dynamics of the electron transfer reaction between an oxazine dye and DNA oligonucleotides monitored on the single-molecule level " CHEMICAL PHYSICS LETTERS, vol. 284, no. (3,4), 1998, pages 153-63, XP000925373 page 153, right-hand column, paragraph 1 -page 154 page 162, left-hand column, paragraph 3 ----	1-12
Y	WO 98 10096 A (KRAMER FRED R ;TYAGI SANJAY (US); PUBLIC HEALTH RESEARCH INST OF () 12 March 1998 (1998-03-12) the whole document ----	1-12
Y	EP 0 745 690 A (PUBLIC HEALTH RESEARCH INST OF) 4 December 1996 (1996-12-04) page 11, column 19, paragraph 3 -page 13, column 24, paragraph 3 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/DE 99/03635

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9810096 A	12-03-1998	AU 2735797 A	26-03-1998
		AU 713667 B	09-12-1999
		AU 2922497 A	07-11-1997
		CA 2252048 A	23-10-1997
		EP 0892808 A	27-01-1999
		WO 9739008 A	23-10-1997
EP 0745690 A	04-12-1996	US 5925517 A	20-07-1999
		AU 702598 B	25-02-1999
		AU 5232496 A	21-11-1996
		CA 2176266 A	13-11-1996
		JP 9107996 A	28-04-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/DE 99/03635

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68 C07H21/00

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

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

EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	SEIDEL C: "Nucleoside-specific quenching of fluorescent dyes. Nucleobase one-electron potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY, Bd. 100, Seiten 5541-53, XP000925372 Seite 5549, rechte Spalte, Absatz 5 -Seite 5551 --- -/--	1-12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Juli 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Osborne, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 99/03635

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	SAUER M ET AL: "Dynamics of the electron transfer reaction between an oxazine dye and DNA oligonucleotides monitored on the single-molecule level " CHEMICAL PHYSICS LETTERS, Bd. 284, Nr. (3,4), 1998, Seiten 153-63, XP000925373 Seite 153, rechte Spalte, Absatz 1 -Seite 154 Seite 162, linke Spalte, Absatz 3 ----	1-12
Y	WO 98 10096 A (KRAMER FRED R ;TYAGI SANJAY (US); PUBLIC HEALTH RESEARCH INST OF () 12. März 1998 (1998-03-12) das ganze Dokument ----	1-12
Y	EP 0 745 690 A (PUBLIC HEALTH RESEARCH INST OF) 4. Dezember 1996 (1996-12-04) Seite 11, Spalte 19, Absatz 3 -Seite 13, Spalte 24, Absatz 3 -----	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03635

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9810096 A	12-03-1998	AU 2735797 A	26-03-1998
		AU 713667 B	09-12-1999
		AU 2922497 A	07-11-1997
		CA 2252048 A	23-10-1997
		EP 0892808 A	27-01-1999
		WO 9739008 A	23-10-1997
EP 0745690 A	04-12-1996	US 5925517 A	20-07-1999
		AU 702598 B	25-02-1999
		AU 5232496 A	21-11-1996
		CA 2176266 A	13-11-1996
		JP 9107996 A	28-04-1997