PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

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

(51) Internationale Patentklassifikation 7 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:
C12Q 1/68	A2	**WO 00/22163**
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07709

(22) Internationales Anmeldedatum: 11. Oktober 1999 (11.10.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 48 297.3 12. Oktober 1998 (12.10.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: ATTO-MOL GMBH MOLEKULARE DIAGNOSTIKA [DE/DE]; Schulweg 6, D–03205 Lipten (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: LEHMANN, Werner [DE/DE]; Schulweg 6, D–03205 Lipten (DE).

(74) Anwälte: ZIEBIG, Marlene, K. usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig, Schützenstrasse 15–17, D–10117 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD AND KIT FOR DIRECTLY DETECTING NUCLEOTIDE SEQUENCES, AMINO ACID SEQUENCES OR ANTIGENS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND KIT ZUM DIREKTEN NACHWEIS VON NUKLEOTIDSEQUENZEN, AMINOSÄURESEQUENZEN ODER ANTIGENEN

(57) Abstract

The invention relates to a method called Restrictase Chain Reaction (RCR) for directly detecting target nucleotide or target amino acid sequences or target antigens by amplification of a nucleotide sequence using DNA polymerase, a restriction enzyme and a matrix DNA, on which an initial primer is bonded and amplified. The invention also relates to a kit containing said matrix DNA and the utilization of said kit in medical diagnosis and trace analysis in legal medicine and for analysis related to the environment, food products and medicaments.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein als *Restrictase Chain Reaction* (RCR) bezeichnetes Verfahren zum direkten Nachweis von Target–Nukleotid– oder Target–Aminosäuresequenzen oder von Target–Antigenen durch Amplifikation einer Nukleotidsequenz mittels einer DNS–Polymerase, eines Restriktionsenzyms und einer Matrix–DNS, an der durch Bindung eines initialen Primers dieser Primer amplifiziert wird. Desweiteren betrifft die Erfindung einen diese Matrix–DNS beinhaltenden Kit und die Verwendung dieses Kits in der medizinischen Diagnostik und kriminalistischen Spurenanalytik sowie für Umwelt–, Lebens– und Arzneimittelanalysen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Verfahren und Kit zum direkten Nachweis von Nukleotidsequenzen, Aminosäuresequenzen oder Antigenen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein, als *Restrictase Chain Reaction* (RCR) bezeichnetes Verfahren und einen Kit zum direkten Nachweis von Target-Nukleotidsequenzen, Target-Aminosäuresequenzen oder von Target-Antigenen durch Amplifikation einer DNS unter Einsatz einer DNS-Polymerase, eines Restriktionsenzyms und einer Matrix-DNS, an der durch Bindung eines initialen Primers dieser Primer amplifiziert wird.
Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung dieses Kits in der medizinischen Diagnostik und kriminalistischen Spurenanalyse sowie für Umwelt-, Lebensmittel- und Arzneimittelanalysen.

Es ist bekannt, daß sich Spuren von DNS durch die Polymerase Chain Reaction (PCR) (US Patente: 4.683.195; 4.683.202) identisch vervielfältigen lassen, um diese in größeren Mengen für spätere Analysen wie Sequenzierungen, Klonierungen etc. aufzubereiten. Die hohe Amplifikationsrate von mehr als 10^9 macht diese

in größeren Mengen für spätere Analysen wie Sequenzierungen, Klonierungen etc. aufzubereiten. Die hohe Amplifikationsrate von mehr als 10^9 macht diese Methode ebenfalls für die medizinische Diagnostik und die kriminalistische Spurenanalytik interessant. So können spezifisch Abschnitte des Genoms von pathogenen Mikroorganismen in Patientenproben vervielfältigt werden, bis diese in ausreichender Konzentration vorliegen, um sie danach mit konventionellen DNS-Nachweisverfahren zu detektieren oder zu quantifizieren. Die PCR läßt sich in vielfältiger Weise mit anderen Verfahren koppeln, wie z.B. einer reversen Transkription von Boten-Ribonukleinsäure (mRNS) zur Bestimmung der Genexpression oder in Kombination mit Immunoassays zum sensitiven Antigennachweis.

Die PCR basiert auf der zyklischen Primerverlängerung zweier Primer (Oligonukleotide), die jeweils am komplementären Strang hybridisieren. Die Entfernung zwischen beiden Primern kann wenige Nukleotide bis ca. 40 kB betragen. Der Zyklus der Amplifikation wird durch eine stufenweise Temperaturführung gesteuert. Folgende Stufen werden nacheinander durchlaufen: Strangdenaturierung (95°C), Primerhybridisierung (50-70°C) und letztlich die Primerverlängerung (74°C), bei der eine Polymerase in Gegenwart von dNTPs an die freien 3´-Enden der Primer einen Zweitstrang synthetisiert, wobei der Erststrang als Matrize dient. Meist sind 30 Zyklen für eine PCR-Reaktion ausreichend (ca. 1h). Jeder Zyklus verdoppelt die Menge der Zielsequenz, was eine

exponentielle Zunahme des Reaktionsproduktes zwischen den Primern bewirkt.

Neben der PCR wurden weitere Amplifikationsmethoden entwickelt, die aber bei weitem nicht die Bedeutung erlangten, wie die PCR. Hier ist zum Einen die Ligase Chain Reaction (LCR) (Barany. F. [1991] PCR Methods and Applications 1: 5-16) zu nennen, bei der durch Kombination einer Polymerasereaktion mit einer Ligasereaktion jeweils an den komplementären DNS-Strängen Primerpaare miteinander verknüpft werden. Über eine stufenweise Temperaturregulation, ähnlich wie bei der PCR, kann dieser Prozeß zyklisch wiederholt werden, wobei die miteinander ligierten Primer eines DNS-Strangs die Targets für die nächste Runde bilden und es somit zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNS-Bereichs kommt. Der Nachteil dieser Methode besteht, ebenso wie bei der PCR, in dem komplizierten Temperaturregime.

Eine weitere Methode zur Amplifikation von Target-DNS ist die Strand Displacement Amplification (SDA) (Walker, G. [1993] PCR Methods and Applications **3**: 1-6). Hierbei werden eine Polymerase- und eine Restriktionsendonukleasereaktion miteinander kombiniert. Bei dieser Methode werden die Eigenschaften einer DNS-Polymerase ohne Exonukleasefunktion (z.B. KlenowExo$^-$) genutzt, einen DNS-Strang vom komplementären Strang während der DNS-Synthese zu verdrängen, bis er schließlich vollständig abgelöst ist. Eine

Restriktionsendonuklease schneidet nun im Bereich des Primers nur den neusynthetisierten Strang, wobei ein neuer Ansatzpunkt für die Polymerase geschaffen wird. Damit kann der Prozeß von neuem mit der Ablösung des vorhandenen Stranges beginnen. Dieser Prozeß läuft bei einer konstanten Temperatur zwischen 37 und 65°C ab und führt zur Vervielfältigung der Analyt-DNS zwischen den vier verschiedenen Primern. Der Nachteil dieser Methode besteht in dem komplexen Reaktionsablauf.

Eine weitere bekannte Methode zur Amplifikation von DNS ist die Primer Digestion Amplification (PDA) (Takarada, Y. [1994] *Nucleic Acids Research* 22(11): 2170-2172). Hierbei werden eine DNS-Polymerase und eine 3´->5´-Exonuklease miteinander kombiniert. Dabei kommt nur ein spezifischer Primer zum Einsatz der aus zwei Bereichen besteht: Eine zum 3´-Ende des Targets komplementäre und eine zum 5´-Ende des Targets homologe Sequenz. Der Primer hybridisiert an das 3´-Ende des Targets und wird verlängert, wobei ein zur Target-Sequenz komplementärer Zweitstrang entsteht. Nach der Verlängerung wird der zum 3´-Ende des Targets komplementäre Bereich des nicht-hybridisierten Primers mittels Exonuklease III abgebaut. Der homologe Bereich ist am 3´-Ende phosphorthioatisiert und somit vor einem Abbau durch Exonuklease geschützt. Der entstehende, nur noch aus dem zum 5´-Ende des Targets homologen Bereich bestehende Primer (verdauter Primer), hybridisiert an das 3´-Ende des neusynthetisierten, zuvor denaturierten Zweitstrangs und wird verlängert. Nach Denaturierung

des entstandenen Produkts kann der verdaute Primer mit beiden Strängen hybridisieren. Anschließend werden die beiden Stränge, und damit die Target-DNS, thermozyklisch amplifiziert. Der Nachteil dieser Methode besteht auch in dem einzuhaltenden thermozyklischen Temperaturregime.

Die Nachteile des genannten Standes der Technik, die auf alle Amplifikationsmethoden zutreffen, bestehen darin, daß Amplifikation und Detektion in verschiedenen Reaktionsansätzen durchgeführt werden, was zeitaufwendig und kostenintensiv ist. Auch machen das komplizierte Temperaturregime der PCR, der LCR und der PDA sowie der komplexe Reaktionsablauf der SDA die Adaption der Verfahren auf Routineanwendungen schwierig.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Nachweis der verschiedensten Biomoleküle zu entwickeln, das im Routinebetrieb anwendbar ist und bei dem alle Verfahrensschritte im gleichen Reaktionsansatz, vorzugsweise in derselben Reaktionskavität einer Mikrotiterplatte, durchführbar sind. In einer bevorzugten Ausführungsform soll das Verfahren isothermisch durchführbar sein.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Das erfindungsgemäße Verfahren zum direkten Nachweis von Target-Nukleotidsequenzen, Target-Aminosäuresequenzen oder Target-Antigenen durch Amplifikation einer Nukleotidsequenz wird unter Verwendung einer DNS-Polymerase

und eines Restriktionsenzyms durchgeführt und besteht darin, daß das Target-Molekül entweder in Lösung gebracht oder über eine Fangnukleotidsequenz oder eine Detektornukleotidsequenz an einer festen Phase immobilisiert wird. Danach wird zur Target-Nukleotidsequenz, die selbst als initialer Primer dient und in Lösung vorliegt, oder zum Target-Molekül, an das eine als initialer Primer dienende Nukleotidsequenz über eine Sonde gekoppelt ist, eine Matrix-DNS zugegeben. Der Begriff Target-Molekül umfaßt im Sinne der Erfindung nachzuweisende Nukleotidsequenzen, Aminosäuresequenzen oder Antigene.

Der Aufbau der Matrix-DNS ist in Abb. 1A und 1B schematisch dargestellt. Die Matrix-DNS weist eine zum 3´-Ende der Target-Nukleotidsequenz, die als intitialer Primer dient, komplementäre Primerhybridisierungssequenz auf oder die Primerhybridisierungssequenz der Matrix-DNS ist vollständig komplementär zum initialen Primer. In 5´-Richtung von der Primerhybridisierungssequenz folgen eine Verlängerungssequenz, eine Restriktionsenzymerkennungssequenz und eine primerkodierende Sequenz. Die primerkodierende Sequenz ist vollständig oder im Wesentlichen homolog zur Primerhybridisierungssequenz. Erfolgt der Nachweis des Target-Moleküls indirekt über die sondenvermittelte Bindung eines Primers, d.h., die Target-Nukleotidsequenz selbst ist nicht initialer Primer, erfolgt nun ein Waschschritt, um nicht an das Target-Molekül gekoppelten initialen Primer aus dem Ansatz zu entfernen. Anschließend werden

DNS-Polymerase ohne Exonukleasefunktion und die vier verschiedenen dNTPs zugegeben. Ausgehend vom freien 3´-Ende des an die Primerhybridisierungssequenz der Matrix-DNS hybridisierten initialen Primers synthetisiert die DNS-Polymerase einen zur Matrix-DNS komplementären Zweitstrang. Durch Zugabe eines Restriktionsenzyms wird entweder durch die Verwendung einer entsprechend modifizierten Matrix-DNS oder eines Nickenzyms (keine modifizierte Matrix-DNS erforderlich) ausschließlich der neusynthetisierte Zweitstrang an der Restriktionsenzymerkennungsstelle geschnitten. Die Matrix-DNS bleibt weitgehend erhalten. Der in 3´-Richtung von der Schnittstelle liegende Bereich des Zweitstranges, der zu dem initialen Primer vollständig oder im Wesentlichen homolog ist (amplifizierter Primer), wird anschließend aus dem Hybridmolekül freigesetzt. Diese Freisetzung erfolgt entweder von allein über die Reaktionstemperatur, da der amplifizierte Primer kürzer ist als der in 5´-Richtung von der Schnittstelle liegende Teil des Zweitstranges. Andernfalls erfolgt die Freisetzung durch die DNS-Polymerase, die an das freie 3´-Ende der Schnittstelle ansetzt und erneut den zur primerkodierenden Sequenz der Matrix-DNS komplementären Bereich synthetisiert, d.h. Primer amplifiziert. Der freigesetzte Primer kann nun ebenfalls an eine noch unbesetzte Matrix-DNS hybridisieren und verlängert werden. Auf diese Weise wird der initiale Primer amplifiziert, wobei sehr hohe Amplifikationsraten erzielt werden können. Anschließend

erfolgt die Detektion des Amplifikats und damit der Nachweis des Target-Moleküls.

Es wird also entweder ein Teil der Target-Nukleotidsequenz selbst, oder ein an das Target-Molekül gekoppelter initialer Primer amplifiziert, wobei die Amplifikation im letzteren Fall - aufgrund des Waschschritts - nur erfolgen kann, wenn zunächst der initiale Primer an das Target-Molekül gekoppelt wurde.

Erfindungsgemäß wird als Target-Nukleotidsequenz eine einzel- oder doppelsträngige DNS oder eine RNS verstanden.

Als Target-Aminosäuresequenzen kommen beispielsweise Enzyme, Peptide, Hormone, Hormonrezeptoren, Allergene, Tumormarker, Zelloberflächenrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, rekombinante Proteine, *in vitro* translatierte Proteine in Frage.

Das Target-Antigen kann auch eine Aminosäuresequenz oder Nukleotidsequenz sein oder ein Polysaccharid, ein Antikörper, ein Virus, ein Bakterium, eine Zelle eines Eukaryonten oder jede andere - auch synthetisch hergestellte - Substanz, die von einem Antikörper erkannt werden kann.

Die feste Phase besteht bevorzugt aus einem Polymer- oder Halbleitermaterial. Besonders bevorzugt wird als feste Phase eine Mikrotiterplatte oder eine poröse

Membran, z.B. bestehend aus Nylon, Nitrozellulose oder PVDF, eingesetzt.

Unter Restriktionsenzym werden im Sinne der Erfindung sowohl Restriktionsendonukleasen, die Doppelstrangbrüche erzeugen, wie z.B. *Eco* RI, *Hin*d III, *Sac* II, *Bso*B I, *Ava* I und *Hae* III, bevorzugt *Bso*B I, *Ava* I und *Hae* III, als auch Einzelstrangbruch erzeugende Nickenzyme, wie z.B. N.*Bst*NB I, N.*Cvi*QX I, N.*Cvi*P II, V.*Bch* I, V.*Eco*Dcm. verstanden. Bevorzugt wird ein Nickenzym eingesetzt. Insbesondere hat sich das Nickenzym N.*Bst*NB I für das erfindungsgemäße Verfahren als gut geeignet erwiesen.

Soll eine Restriktionsendonuklease verwendet werden, die doppelsträngige DNS schneidet, also keinen Nick erzeugt, muß die Restriktionsenzymerkennungsstelle der Matrix-DNS so modifiziert werden, daß sie nicht durch die Restriktionsendonuklease geschnitten werden kann. Die Modifizierung kann zum Beispiel durch Einführung von Methylgruppen erfolgen (Methyl-Matrix-DNS, vgl. Abb. 1A) oder durch Einführung von Phosphorthioaten (PTO-Matrix-DNS, vgl. Abb. 1A).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Amplifikationsreaktion isothermisch, also bei einer konstanten Temperatur im Bereich von 15-75°C, vorzugsweise von 37 bis 55°C, da die bei PCR, LCR und PDA benötigte Denaturierung der zu amplifizierenden DNS entfallen kann. Das bedeutet, es werden keine teuren

Apparaturen zur Kontrolle eines thermischen Temperaturregimes benötigt. Die benötigten Temperaturen können durch Inkubation in relativ einfachen Geräten (z.B. einem Thermomixer oder einem Wärmeschrank) eingestellt werden, die jedem Routinelabor zugänglich sind.

Es ist aber auch möglich, die Reaktion unter Kontrolle eines zyklischen Temperaturregimes, wie bei der PCR, durchzuführen, wenn die jeweils verwendete Restriktase **und** DNS-Polymerase hitzestabil ist (z.B. Vent®(exo⁻) oder Deep Vent®(exo⁻)DNS-Polymerase von New England Biolabs, USA). Die Möglichkeit der isothermischen Durchführung ist jedoch ein entscheidender Vorteil der vorliegenden Erfindung.

Als Matrix-DNS wird erfindungsgemäß eine Sequenz verwendet, deren Primerhybridisierunssequenz vorzugsweise mindestens 10 Nukleotide und deren Verlängerungssequenz bevorzugt 0-20 Nukleotide lang ist. Um ein Selbstprimen der Matrix-DNS zu verhindern, ist deren 3´-OH-Gruppe chemisch modifiziert, z.B. durch eine Aminohexylgruppe, oder deren 3´-terminales Desoxynukleotid ist durch das entsprechende Didesoxynukleotid ersetzt. Als erfindungsgemäß bevorzugte Matrix-DNS können die Sequenzen 1 und 2 dienen:

SEQ ID NO 1:

5´-GTG TGG TGT GGG GTG TG*G ACT* CTG GTT GTT GTG TGG TGT GGG G-3´

SEQ ID NO 2:

5´-GTG TGG TGT GGG *GCC* TTG TTG GTT GGT TGT GTG GTG TGG GG-3´

Sequenz 1 trägt eine Erkennungsstelle für das Nickenzym N.*Bst*NB I (kursiv). In Sequenz 2 ist eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *Hae* III (kursiv) enthalten. Sequenz 2 muß daher erfindungsgemäß vor Verwendung an der Erkennungsstelle chemisch modifiziert werden, wie bereits beschrieben.

Für den Nachweis des EBV (Epstein-Barr-Virus)-Genoms kann die Matrix-DNS für den Fall, daß ein Teil der Target-Nukleotidsequenz selbst als initialer Primer dient, beispielsweise folgende Sequenz (SEQ ID NO 3) aufweisen:

5´-TGC TCA TCG CCA ACC GCT *CCC GAG* TAG TTC CTG CTC ATC GCC AAC CGC TCC CGA-3´

Diese trägt eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonukleasen *Bso*B I und *Ava* I (kursiv). Daher muß auch diese Matrix-DNS vor Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren an der Erkennungsstelle chemisch modifiziert werden.

Als Sonde wird erfindungsgemäß für den Fall des Nachweises einer Target-Nukleotidsequenz eine Nukleotidsequenz verwendet. Entweder das 3´-Ende dieser Sonde entspricht der Sequenz des initialen Primers oder an

die Sonde ist über ein oder mehrere Biomoleküle der initiale Primer gebunden.

Zum Nachweis eines Target-Antigens wird als Sonde ein Antikörper verwendet. An diesen ist kovalent oder über ein oder mehrere Biomoleküle der initiale Primer gekoppelt.

Zum Nachweis einer Target-Aminosäuresequenz wird als Sonde ein spezifisch an die Target-Aminosäuresequenz bindendes Molekül (Ligand) verwendet, an das kovalent oder über ein oder mehrere Biomoleküle der initiale Primer gekoppelt ist. Als Liganden dienen im Sinne der Erfindung z.B. Antikörper, Rezeptoren, Aminosäuresequenzen, Nukleotidsequenzen, Kohlenhydrate, Lipide.

Die Bindung von Target-Molekülen an die Sonde kann im direkten, indirekten oder kompetetiven Verfahren sowie im Sandwich-Verfahren erfolgen.

Als Biomoleküle zum Binden der Sonde an den Primer können beispielsweise Biotin und Avidin oder Streptavidin oder Antikörper oder Haptene und haptenspezifische Antikörper oder Avidin oder Streptavidin verwendet werden.

Soll z.B. die Expression des humanen p53-Gens nachgewiesen werden (vgl. auch Beispiel 3, vgl. Abb. 5), so daß das Target die cDNS dieses Gens ist, so kann als

Sonde folgende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO 4) verwendet werden:

5´-GGC GGG GGT GTG GAA TCA AC-3´

Das 5´-Ende dieser Sonde muß so modifiziert sein, daß eine Kopplung an den initialen Primer direkt oder über ein oder mehrere Biomoleküle möglich ist. Falls notwendig, kann vor Durchführung der Amplifikations-reaktion ein Amplifikatkontaminationssschutz nach dem Fachmann bekannten Methoden durchgeführt werden. Dies gilt auch für alle anderen in dieser Anmeldung genannten Sequenzen und Ausführungsformen der Erfindung.

Der initiale Primer kann einzelsträngig oder mit seinem komplementären Gegenstrang hybridisiert an das Target gekoppelt werden. Letzteres hat den Vorteil, daß der initiale Primer nicht unspezifisch mit der Primerhybri-disierungssequenz der der Detektion dienenden Detektor-nukleotidsequenz hybridisieren kann. Der Aufbau und die Funktion der Detektornukleotidsequenz werden weiter unten in der Beschreibung dargelegt. Für den Fall, daß der Primer mit seinem Gegenstrang gepaart ist, kann die Dehybridisierung des initialen Primers und seines Gegenstrangs auf übliche Art und Weise erfolgen, beispielsweise durch Erhitzen.

Als initialer Primer kommt beim Einsatz von SEQ ID NO 2 als Matrix-DNS beispielsweise folgende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO 5) in Frage:

5´-GTG TGG TGT GGG G-3´

3´-CAC ACC ACA CCC C-5´-Phosphat ← initialer Primer

Für den Einsatz von SEQ ID NO 1 als Matrix-DNS kann als initialer Primer folgende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO 6) in Frage kommen:

3´-CAC ACC ACA CCC C-5´ ← initialer Primer

Biotin-5´-GTG TGG TGT GGG G-3´

Ist das Target eine Nukleotidsequenz, so kann in einer Ausführungsform der Erfindung mit einer Fangnukleotidsequenz gearbeitet werden. Der Einsatz einer solchen Fangnukleotidsequenz ist insbesondere dann notwendig, wenn die Expression eines Gens, d.h. also eine RNS bzw. eine cDNS nachgewiesen werden soll (vgl. auch Beispiel 3). Der 5´-terminale Bereich der Fangnukleotidsequenz ist komplementär zu einem Bereich der Target-Nukleotidsequenz oder der an das Target-Molekül als Sonde gekoppelten Nukleotidsequenz. Dadurch wird die Target-Nukleotidsequenz immobilisiert.

Die Detektion des Amplifikats kann je nach Ausführungsform der Amplifikation in Lösung oder an der festen Phase durchgeführt werden. Wird die Detektion in Lösung durchgeführt, so werden z.B. Ladung, Größe und Hybridisierungseigenschaften des Amplifikats ausgenutzt und übliche Analyseverfahren angewendet. Die Detektion über die Ladung kann u.a. durch Ionenaustauschchroma-

tographie mittels HPLC erfolgen. Bei der Detektion über die Größe wird das Amplifikat elektrophoretisch aufgetrennt oder im MALDI-TOF analysiert. Bei der Detektion des Amplifikats über die Hybridisierungseigenschaften wird z. B. durch die Hybridisierung des Amplifikats an eine in Lösung vorliegende Detektor-Nukleotidsequenz ein Quencher von einem Fluorophor räumlich getrennt, wordurch die Fluoreszenz des Fluorophors meßbar wird.

Die Detektion des Amplifikats an der festen Phase wird mittels einer Detektornukleotidsequenz durchgeführt (s. Abb. 2). Diese wird vor Durchführung der Amplifikation mit ihrem 3´-Ende an der festen Phase immobilisiert. Sie enthält eine Primerhybridisierungssequenz, die zu derjenigen der Matrix-DNS homolog ist. Über diese Primerhybridisierungssequenz erfolgt die Hybridisierung des amplifizierten Primers, der danach durch die DNS-Polymerase in 3´-Richtung verlängert wird.

In einer Ausführungsvariante der Erfindung wird als Detektornukleotidsequenz eine Nukleotidsequenz eingesetzt, die an ihrem 5´-Ende komplementär zu einem Bereich der Target-Nukleotidsequenz oder der an das Target-Molekül als Sonde gekoppelten Nukleotidsequenz ist und somit gleichzeitig als Fangnukleotidsequenz dient. Damit kann auf den Einsatz einer eigenständigen Fangnukleotidsequenz verzichtet werden.

In einer Ausführungsvariante der Erfindung enthält die Detektornukleotidsequenz in 5´-Richtung von der

Primerhybridisierungssequenz mindestens eine Markierungsstelle. Außerdem kann ein Nukleotid der Detektornukleotidsequenz, bevorzugt am 5´-Ende, mit einem Biomolekül verbunden sein, vorzugsweise mit Biotin, über das eine Kopplung mit der Sonde erfolgen kann.

Als Markierungsstelle in der Detektornukleotidsequenz dient bevorzugt ein Nukleotid, wobei prinzipiell jedes der vier dNTPs in Frage kommt, über das bei der Verlängerung des amplifizierten Primers ein markiertes Nukleotid eingebaut wird. Die Markierung kann eine radioaktive Markierung, eine Enzym-, Farbstoff-, Fluoreszenz- oder Haptenmarkierung sein. Besonders bevorzugt ist als Nukleotid der Detektornukleotidsequenz, das als Markierungsstelle dient, mindestens ein Adenosin, über das bei der Gegenstrang-Synthese mittels DNS-Polymerase beispielsweise Digoxigenin-, Fluorescein- oder Biotin-markiertes dUTP eingebaut wird. Über dieses markierte Nukleotid erfolgt dann die Detektion des Amplifikats.

Zum Nachweis des EBV-Genoms (vgl. Beispiel 1) kann die Detektornukleotidsequenz beispielsweise folgende Sequenz (SEQ ID NO 7) aufweisen:

5´-**ACA** CC**A** T**A**C **A**CC TC*T GCT CAT CGC CAA CCG CTC CC*T CTC TCT CTC T-3´

Die Markierungsstellen sind in Fettdruck, die Primerhybridisierungssequenz ist kursiv dargestellt.

Wird als Matrix-DNS SEQ ID NO 2 verwendet (vgl. Beispiel 2), so weist die Detektornukleotidsequenz bevorzugt folgende Sequenz (SEQ ID NO 8) auf:

5´-**A**TG **AAA** TG**A** G**A**G **A**TG *TGT GTG GTG TGG GGT* GTG TGT GTG--3´

Die Markierungsstellen sind in Fettdruck, die Primerhybridisierungssequenz ist kursiv dargestellt. 5´-terminal kann diese Sequenz mit einem Biomolekül verbunden sein, bevorzugt mit Biotin.

In einer zweiten Variante wird als Markierungsstelle der Detektornukleotidsequenz eine Sequenz verwendet, die nach der Gegenstrang-Synthese zusammen mit diesem Strang eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease darstellt, die nach Schneiden durch die entsprechende Restriktionsendonuklease einen 5´- oder 3´-Überhang aufweist. Diese Restriktionsendonuklease kann in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung mit der Restriktionsendonuklease, die gegebenenfalls zum Schneiden des Gegenstrangs der Matrix-DNS verwendet wird, identisch sein.

Bei dieser Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird also zunächst die Detektornukleotidsequenz an der festen Phase immobilisiert, dann mit der Lösung des Target-Moleküls inkubiert und dem Ansatz zusammen mit der DNS-Polymerase und den dNTPs die Restriktionsendonuklease, die die Erkennungssequenz der Detektor-

nukleotidsequenz und der Matrix-DNS erkennt, sowie Ligase und Detektormonomere zugegeben.

Bei den Detektormonomeren handelt es sich um doppelsträngige DNS-Sequenzen mit markierten Nukleotiden und mit 3´- oder 5´-Überhängen, wobei die Überhänge zueinander und zum 5´- oder 3´-Überhang des geschnittenen Detektornukleotidsequenz-Hybrides komplementär sind. Mittels Ligase kommt es dadurch zur Ligation eines Detektormonomers mit dem Detektornukleotidsequenz-Hybrid an dessen geschnittener Schnittstelle. Die Sequenzen der Detektormonomer-Überhänge sind so gewählt, daß es bei der Ligation nicht zur Wiederherstellung der Restriktionsenzymerkennungsstelle kommt (s. Abb. 3). Die Restriktionsendonuklease kann also nach erfolgter Ligation nicht mehr schneiden. Bei der Ligation ist es auch möglich, daß mehrere Detektormonomere hintereinander an das Detektornukleotidsequenz-Hybrid ligieren, da die Detektormonomere auch miteinander ligieren können. Über die markierten Nukleotide der Detketormonomere erfolgt dann die Detektion. Vorher wird ein Waschschritt durchgeführt, um nicht gebundene Detektormonomere aus dem Reaktionsansatz zu entfernen.

Wird als Matrix-DNS SEQ ID NO 1 verwendet(vgl. Beispiel 3) und soll die Detektion mittels Detektormonomere erfolgen, so weist die Detektornukleotidsequenz bevorzugt folgende Sequenz (SEQ ID NO 9) auf:

5´-CAA GAA GCC CAG ACG GAA ACT **GGC CTC GCT GGC** TGA TTG T*GT GTG GTG TGG GG*T TGT TGT TGT -3´

Die Verlängerungssequenz, die in diesem Anwendungsbeispiel auch als Fangnukleotidsequenz dient, ist unterstrichen, die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bgl* I ist in Fettdruck, die Primerhybridisierungssequenz kursiv dargestellt.

Als Detektormonomere kommen für die Erfindung solche in Frage, die mit der Schnittstelle des Detektornukleotidsequenz-Hybrides ligieren können und die Markierungen, z.B. in Form von markierten Nukleotiden besitzen.

Wird als Detektornukleotidsequenz SEQ ID NO 9 verwendet (vgl. Beispiel 3), so weist das Detektormonomer bevorzugt folgende Sequenz (SEQ ID NO 10) auf:

```
   5´-TCC GCC TCA TCT GCT CTT CCC GC-3´
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||
3´-GCG AGG CGG AGT AGA CGA GAA GG-5´
```

Als Markierungen der Detektormonomere kommen dATP, dCTP, dGTP, dTTP oder dUTP, in Frage, wobei die Markierungen der dNTPs radioaktive Substanzen, z.B. ^{32}P oder ^{35}S, fluorogene Substanzen, wie beispielsweise FITC, TAMRA, TET, Texas Red oder Biomoleküle, wie z.B. Digoxogenin oder Biotin sein können.

Die Detektion der markierten Nukleotide kann, je nach Markierung, autoradiographisch, enzymatisch oder fluorometrisch erfolgen. Entsprechend erfolgt die Detektion beispielsweise über ein Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat, Avidin/Sreptavidin-Peroxidase-Konjugat, Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, Avidin/Sreptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, wobei zur Visualisierung Tetramethylbenzidin, Diaminobenzidin, Aminoethylcarbazol oder Chlornaphtol, ferner X-Phosphat oder Tetrazoliumblau verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Kit zur Durchführung des oben beschriebenen Verfahrens. Dieser Kit muß erfindungsgemäß mindestens der Amplifikation des nachzuweisenden Target-Moleküls dienende Matrix-DNS enthalten. Diese ist wie oben beschrieben aufgebaut und umfaßt die vorstehend beschriebenen Ausführungsvarianten.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung beinhaltet der Kit zusätzlich Detektornukleotidsequenz, wie oben beschrieben. Diese ermöglicht die Detektion des Amplifikats an der festen Phase, was z.T. einfacher und schneller geht als die Detektion in der flüssigen Phase unter Ausnutzung von z.B. Ladung, Größe oder Hybridisierungseigenschaften des Amplifikats.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann der Kit zusätzlich zur Matrix-DNS und gegebenenfalls

zur Detektornukleotidsequenz initialen Primer wie oben beschrieben enthalten, der amplifiziert und detektiert wird und damit dem indirekten Nachweis des Target-Moleküls dient.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält der Kit zusätzlich zur Matrix-DNS, zum initialen Primer und gegebenenfalls zur Detektornukleotidsequenz als Sonde dienende Nukleotidsequenz, wie sie vorstehend beschrieben wurde, oder einen als Sonde dienenden Antikörper oder einen als Sonde dienenden Liganden, je nachdem, welches Target-Molekül nachgewiesen werden soll. Sonde und Primer können auch bereits in gekoppelter Form im Kit enthalten sein.

Wenn Sonde und initialer Primer getrennt im Kit vorgelegt werden, kann der Kit zusätzlich zur Matrix-DNS und gegebenenfalls zur Detektornukleotidsequenz der Kopplung der Sonde an den initialen Primer dienende Biomoleküle, vorzugsweise entweder Biotin und Avidin oder Streptavidin oder Antikörper oder Haptene und haptenspezifische Antikörper oder Avidin oder Streptavidin enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann der Kit zusätzlich zur Matrix-DNS, zur Detektornukleotidsequenz und ggf. zum initialen Primer, zur Sonde und zu den Biomolekülen auch bereits die feste Phase beinhalten, die der Immobilisierung der Detektornukleotidsequenz dient. An die feste Phase ist

gegebenenfalls die Detektornukleotidsequenz mit ihrem 3´-Ende gebunden. Ergänzend oder alternativ dazu kann auch die Fangnukleotidsequenz, die der Immobilisierung der Target-Nukleotidsequenz dient, mit ihrem 3´-Ende an die feste Phase gebunden sein, je nachdem, ob der Nachweis mit einer Fangnukleotidsequenz durchgeführt werden soll. Detektornukleotidsequenz und/oder Fangnukleotidsequenz können natürlich auch ungebunden Bestandteile des Kits sein.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann der Kit neben der Matrix-DNS, der Detektornukleotidsequenz und gegebenenfalls dem initialen Primer, der Sonde, den Biomolekülen und der festen Phase zusätzlich Detektormonomere, Ligase und gegebenenfalls Restriktionsendonuklease beinhalten, wenn die Detektornukleotidsequenz eine solche Markierungsstelle enthält, die nach der Synthese des Gegenstrangs zusammen mit diesem eine Erkennungsstelle für die zugegebene Restriktionsendonuklease bildet.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfaßt der Kit auch bereits die DNS-Polymerase(n), die dNTPs, das Restriktionsenzym, das die Erkennungsstelle der Matrix-DNS erkennt, geeignete Enzym-, Reaktions- und Waschpuffer sowie gegebenenfalls das markierte dNTP.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann der Kit die zur Detektion der markierten Nukleotide dienende Reagenzien auch enthalten, also beispielsweise

die Enzyme und Reagenzien zum enzymatischen oder fluorometrischen Nachweis.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Kits in der medizinischen Diagnostik, in der kriminalistischen Spurenanalyse sowie für Umwelt-, Lebens- und Arzneimittelanalysen. So kann der Kit beispielsweise zum Nachweis der Expression eines Gens verwendet werden, wie z.B. in Abb. 5 dargestellt. In der medizinischen Diagnostik bietet sich der Kit insbesondere zur Diagnose viraler und bakterieller Infektionen und von Prionen an, aber auch der Nachweis des Vorhandenseins bestimmter Gene oder von Einzelnukleotidpolymorphismen/Mutationen in bestimmten Genen kann mit dem Kit erbracht werden.

Mit der erfindungsgemäßen Lösung steht damit ein Verfahren zur Verfügung, das im Routinebetrieb hervorragend einsetzbar ist. Die Möglichkeit der isothermischen Reaktionsführung und die Durchführung aller Reaktionsschritte im gleichen Reaktionsansatz stellen eine äußerst vorteilhafte Nachweismethode dar. Das Verfahren benötigt nur einen Primer, der erfindungsgemäß amplifiziert wird, wobei der Primer entweder die nachzuweisende Nukleotidsequenz selbst ist oder an das nachzuweisende Molekül (Nukleotidsequenz, Aminosäuresequenz oder Antigen) gekoppelt wird.

Abbildungen:

Abb. 1:

schematische Darstellung erfindungsgemäßer PTO-Matrix- und Methyl-Matrix-DNS (A) sowie unmodifizierter Matrix-DNS (B)

Abb. 2:

schematische Darstellung erfindungsgemäßer Detektor-nukleotidsequenz mit hybridisiertem Primer und mit verlängertem Primer sowie mit modifiziertem 5´-Terminus zur Bindung eines Target-Moleküls

Abb.3:

schematische Darstellung erfindungsgemäßer Detektor-nukleotidsequenz mit hybridisiertem Primer, mit verlängertem Primer und mit an das Detektornukleo-tidsequenz-Hybrid ligierten Detektormonomeren

Abb. 4:

schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Nachweises einer Target-DNS (A) und eines Antigens (B)

Abb. 5:

schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Expressionsnachweises eines Gens

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:
Nachweis des EBV (Epstein-Barr-Virus)-Genoms in einer Patientenprobe unter Verwendung der erfindungsgemäßen Matrix-DNS SEQ ID NO 3, die phosphorthioatisiert ist und unter Verwendung der erfindungsgemäßen Sequenz SEQ ID NO 7

Der direkte Nachweis des EBV-Genoms (Sequenzausschnitt siehe Ende des Beispiels) erfolgt durch Hybridisierung des 3´-Endes der Target-DNS mit dem 3´-Ende der Matrix-DNS (SEQ ID NO 3), die mit PTO modifiziert ist (Sequenz siehe Ende des Beispiels). Das 3´-Ende der Target-DNS fungiert nach erfolgter Hybridisierung als initialer Primer. Um ein spezifisches 3´-Ende in der Target-DNS zu erhalten, wird vor der Hybridisierung mit der Matrix-DNS ein Restriktionsverdau durchgeführt (s. auch Abb. 4a).

1. Zur Vorbereitung der Reaktionsgefäße werden NucleoLink™-Platten (Nunc) mit der Detektor-nukleotidsequenz (Sequenz siehe Ende des Beispiels) beschichtet: die 3´-phosphorylierte Detektornukleotidsequenz wird in 1-Methylimidazol, pH 7,4 (Sigma) und 1-Ethyl—3-(3-diethylamino-propyl)carbodiimid (Sigma) über Nacht inkubiert. Mehrmaliges Spülen mit NaOH und nachfolgend mit Aqua dest. laut Arbeitsvorschrift der Firma Nunc; Trocknen der NucleoLink™-Streifen und Aufbewahrung
2. Präparation der Gesamt-DNS aus Patientenseren unter Verwendung eines InViSorb®-Kits der Firma InViTek nach Arbeitsvorschriften des Herstellers (Aufbewahrung der DNS bei -20 °C möglich)

3. Zur Vorbereitung des Restriktionsverdaus der Target-DNS und der RCR wird ein Mastermix folgender Zusammensetzung in die Kavitäten der unter „1." präparierten NucleoLink™-Platten pipettiert:

Tris-HCl- Puffer
NaCl
$MgCl_2$
Bsp 1286 I (New England Biolabs [NEB])
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (alle Promega)
dUTP-Digoxigenin (Roche Diagnostics GmbH)
PTO-Matrix-DNS (Oligonukleotidsynthese, MWG Biotech) (Sequenz siehe Ende des Beispiels)

4. Pipettieren von Proben- (enthält Gesamt-DNS aus Patientenproben) bzw. Kontrollösung in die entsprechenden Kavitäten (siehe unten)
5. Verdau der Target-DNS mit Bsp 1286 I und Denaturierung, initiale Hybridisierung der Target-DNS mit der Matrix-DNS
6. Zugabe von BsoB I (NEB) und Klenow-Fragment (3´→5´ exo⁻, NEB)
7. RCR-Reaktion
8. Spülen der Kavitäten mit Waschpuffer
9. Inkubation der Kavitäten mit peroxidasekonjugiertem Ziege—Anti-Digoxigenin-IgG (Roche Diagnostics GmbH)
10. Spülen mit Waschpuffer
11. Inkubation mit Tetramethylbenzidin-Fertiglösung (Sigma)
12. Messung des Farbumschlages bei 655 nm

Folgende Reaktionsansätze mit folgenden DNS-Präparationen sind für Proben und Kontrollen im Rahmen

eines diagnostischen Tests notwendig (Proben- und Kontrollösungen werden zu Mastermix gegeben):

1. DNS
2. humane DNS mit Zusatz von Kopien des EBV-Genoms (Positivkontrolle)
3. humane DNS ohne Zusatz von EBV-Genom (Negatikontrolle)
4. H_2O (Reagenzienkontrolle)

PTO-Matrix-DNS (SEQ ID NO: 3)

```
                                  BsoB I, Ava I
                                <------->
5´-TGC TCA TCG CCA ACC GsCT sCsCsC GAG TAG TTC CTG CTC ATC GCC AAC CGC TCC CGA-3´-Aminohexyl
   <------------------------------> <------><-------------------------->
            primerkodierende Sequenz   Verlängerungs-   Primerhybridisierungssequenz
                                       sequenz
```

($_s$=Phosphorthioatdiesterbindung)

Hybridisierung der Matrix-DNS an EBV-DNS (EBV-cDNS-Sequenz: 140353-140440):

```
5´-ATC GGG CGA CAG GTG CCC AAG CTG GGC AAT GCC CCC GCC GCG
3´-TAG CCC GCT GTC CAC GGG TTC GAC CCG TTA CGG GGG CGG CGC

                          ↓Bsp 1286 I, BsiHKA I
CAG GTC AGC AAC GTG CT | C ATC GCC AAC CGC TCC CAC AAC TCT CTA-3´

GTC CAG TCG TTG C | AC GAG TAG CGG TTG GCG AGG GTG TTG AGA GAT-5´
                    TG CTC ATC GCC AAC CGC TCC C
                   ⌈<--------------------------->⌉
    5´-.....AGT TCC   Primerhybridisierungssequenz der   GA-3´-Aminohexyl
                                Matrix-DNS
```

Detektor-Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 7):

```
5´-ACA CCA TAC ACC TCT GCT CAT CGC CAA CCG CTC CCT CTC TCT CTC T-3´-Phosphat-feste Phase
                     <-------------------------->
    Markierungsstellen      Primerhybridisierungssequenz
```

Die Schmelztemperatur des an der Detektor-Nukleotidsequenz verlängerten Primers beträgt ca. 100 °C.

Beispiel 2: Nachweis von humaner Cholin-Acetyl-Transferase mittels RCR im kompetitiven ELISA unter Verwendung der erfindungsgemäßen Matrix-DNS SEQ ID NO 2, die methyliert ist und unter Verwendung der erfindungsgemäßen Sequenzen SEQ ID NOs 5 und 8

Zum immunologischen Nachweis von humaner Cholin-Acetyl-Transferase wurde ein kompetitiver ELISA unter Verwendung des monoklonalen Anti-Cholin-Acetyl-Transferase-Antikörpers 28C4 und des biotinylierten Peptids 168-189 der Cholin-Acetyl-Transferase (P3) entwickelt (s. auch Abb. 4b). Der initiale Primer liegt während der Immunbindung des DNS-Antikörperkonjugats als doppelsträngige DNS vor. Damit wird die unspezifische Bindung des DNS-Antikörperkonjugats an die Primerhybridisierungssequenz der Detektor-Nukleotidsequenz verhindert.

1. Die Beschichtung von NucleoLink™-Platten (Nunc) mit biotinylierter Detektor-Nukleotidsequenz (Sequenz siehe Ende des Beispiels) erfolgt analog zu Beispiel 1.
2. Inkubation aller Kavitäten der Mikrotestplatte mit Streptavidin in Puffer
3. Spülen mit Waschpuffer
4. Inkubation mit P3-(Peptid 168-189 der Acetyl-Cholin-Transferase)Biotin in Puffer
5. Spülen in Waschpuffer
6. Patientenproben sowie die entsprechenden Kontrollproben werden mit der Primärantikörperlösung (28C4) versetzt und in den Kavitäten der mit Detektornukleotidsequenz und Peptid P3 beschichteten Mikrotestplatte inkubiert
7. Spülen mit Waschpuffer
8. Inkubation des Ziege-Anti-Maus-Antikörper-DNS-Konjugats (Herstellung siehe Ende des Beispiels) in TBS-T unter Zusatz von acetyliertem BSA (NEB), Heparin, Magermilchpulver
9. Spülen mit Waschpuffer

10. Pipettieren von Mastermix folgender Zusammensetzung in die Kavitäten der unter „1.-9." präparierten NucleoLink™-Platte:

    Tris-HCl-Puffer
    NaCl
    $MgCl_2$
    dATP, dCTP, dGTP, dTTP (alle Promega)
    dUTP-Digoxigenin (Roche Diagnostics GmbH)
    Methyl-Matrix-DNS (Oligonukleotidsynthese, MWG Biotech) (Sequenz siehe Ende des Beispiels)

11. Denaturierung des initialen Primers und initiale Hybridisierung
12. Zugabe von Hae III (NEB) und Klenow-Fragment (3´→ 5´ exo⁻, NEB)
13. RCR-Reaktion
14. Spülen der Kavitäten mit Waschpuffer
15. Inkubation der Kavitäten mit peroxidasekonjugiertem Ziege-Anti-Digoxigenin– IgG (Roche Diagnostics GmbH)
16. Spülen mit Waschpuffer
17. Inkubation mit Tetramethylbenzidin-Fertiglösung (Sigma)
18. Messung des Farbumschlags bei 655 nm

Folgende Reaktionsansätze sind für Proben und Kontrollen im Rahmen eines Tests notwendig:

1. Patientenprobe (Serum)
2. Negativkontrolle (humanes Serum ohne Cholin-Acetyl-Transferase)
3. Positivkontrolle (humanes Serum mit Zusatz von P3)

Methyl-Matrix-DNS (SEQ ID NO: 2):

Hae III Verlängerungs-
<----->
5´-GTG TGG TGT GG*G* G_m*CC* TTG TTG GTT GGT TGT GTG GTG TGG GG-3´Aminohexyl

<----------------> <----------------><----------------->
primerkodierende Sequenz sequenz Primerhybridisierungssequenz

($_m$C=5-Methylcytosin)

Detektor-Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 8):

Biotin-5´-ATG AAA TGA GAG ATG T*GT GTG GTG TGG GG*T GTG TGT GTG-3´-Phosphat-feste
<----------------> Phase
Markierungsstellen Primerhybridisierungssequenz

Initialer Primer (SEQ ID NO: 5):

5´-GTG TGG TGT GGG G-3´
3´-CAC ACC ACA CCC C-5´-Phosphat initialer Primer

Herstellung des DNS-Antikörper-Konjugates:

Ziege-Anti-Maus-IgG (Sigma) wird in 10 mM 1-Methylimidazol, (Sigma) unter Zusatz von 10 mM 1-Ethyl-3-(3-demethylaminopropyl)carbodiimid (Sigma) mit 5´-phosphoryliertem Primer (siehe oben) inkubiert. Mittels Anionenaustauschchromatographie werden die Reaktionsprodukte gereinigt.

Beispiel 3: Nachweis der Expression des humanen p53-Gens unter Verwendung der erfindungsgemäßen unmodifizierten Matrix-DNS SEQ ID NO 1 und unter Verwendung der erfindungsgemäßen Sequenzen SEQ ID NOs 4,6,9 und 10

Zum Nachweis der Expression des humanen p53-Gens wird nach Standardverfahren über eine reverse Transkriptasereaktion copy-DNS (cDNS) hergestellt und im RCR-Test eingesetzt. Die cDNS wird über das 5´-Ende der Detektor-DNS (Sequenz siehe Ende des Beispiels), das hier als Fangsonde dient, aus der Probenflüssigkeit an die feste Phase der NucleoLink™-Platten immobilisiert und gleichzeitig mit der Sonde (Sequenz siehe Ende des Beispiels) hybridisiert (s. auch Abb.5).

1. Beschichtung von NucleoLink™-Platten (Nunc) mit Detektor-Nukleotidsequenz (Sequenz siehe Ende des Beispiels) analog zu Beispiel 1
2. Pipettieren der cDNS-Lösung und des Hybridisierungspuffers unter Zusatz von biotinylierter Sonde (Sequenz siehe Ende des Beispiels) in die vorbereiteten Mikrotestplatten
3. Denaturierung der cDNS durch Erhitzen und anschließende Hybridisierung der Target-DNS (p53 458-593) (Sequenz siehe Ende des Beispiels) mit dem 5´-Ende der Detektor-Nukleotidsequenz und mit der biotinylierten Sonde (p53-Sequenz 574-593)
4. Spülen mit Waschpuffer

5. Inkubation mit Streptavidin (Sigma)
6. Spülen mit Waschpuffer
7. Inkubation mit biotinyliertem, doppelsträngigem initialen Primer (Sequenz siehe Ende des Beispiels)
8. Spülen der Kavitäten mit Waschpuffer
9. Pipettieren von Mastermix folgender Zusammensetzung in die unter 1.-8. präparierten Kavitäten und nachfolgend Inkubation:

   Tris-HCl-Puffer
   NaCl
   $MgCl_2$
   dATP, dCTP, dGTP, dTTP (alle Promega)
   Matrix-DNS

10. Denaturierung des initialen Primers und initiale Hybridisierung mit der Matrix-DNS
11. Zugabe von N.BstNB I (NEB) und Bst DNS-Polymerase, Large Fragment (NEB)
12. RCR-Reaktion
13. Spülen der Kavitäten mit Waschpuffer
14. Pipettieren der biotinmarkierten Detektormonomere (Sequenz siehe Ende des Beispiels), Bgl I (NEB) und Ligase (NEB) in Reaktionspuffer in die Kavitäten, Inkubation
15. Spülen der Kavitäten mit Waschpuffer
16. Inkubation der Kavitäten mit Extravidin-POD (Sigma)
17. Spülen der Kavitäten mit Waschpuffer
18. Inkubation mit TMB-Fertiglösung (Sigma)
19. Messung des Farbumschlages bei 655 nm

Folgende Reaktionsansätze sind für Proben und Kontrollen im Rahmen eines Tests notwendig:

1. cDNS-Lösung der Probe
2. Positivkontrolle bekannter p53-cDNS-Konzentration
3. H_2O (Reagenzienkontrolle)

Matrix-DNS (SEQ ID NO: 1):

5´-GTG TGG TGT GGG GTG TG*G ACT C*TG GTT GTT GTG TGG TGT GGG G-3´-Aminohexyl

<---------------> <------><---------> <---------------->

primerkodierende Sequenz N.BstNB I Verlängerungs-sequenz Primerhybridisierungssequenz

initialer Primer (SEQ ID NO: 6):

3´-CAC ACC ACA CCC C-5´ **←Primer**

Biotin-5´-GTG TGG TGT GGG G-3´

Detektor-Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 9):

5´-CAA GAA GCC CAG ACG GAA ACT G**GC CTC GCT GGC** TGA TTG *TGT GTG GTG TGG GG*T TGT TGT TGT -3´-

<-------------------------> <------------> <---------------> Phosphat-feste Phase

Verlängerungssequenz (komplementär zu p53-cDNS 458-477) (=Fangnucleotidsequenz)

Bgl I-Erkennungssequenz

Primerhybridisierungssequenz

Sonde p53 574-593 (SEQ ID NO: 4):

Biotin-5´-GGC GGG GGT GTG GAA TCA AC-3´

Detektormonomer (SEQ ID NO: 10):

```
    5´-TCC GCC TCA  TCT* GCT CTT CCC GC-3´
       ||| ||| |||  |||  ||| ||| ||
3´-GCG AGG CGG AGT* AGA  CGA GAA GG-5´
```

*=biotinyliertes dTMP

p53-cDNS-Sequenz 404-600:

5´- CCT GGC CCC TGT CAT CTT CTG TCC CTT CCC AGA AAA CCT ACC AGG GCA GCT ACG *GTT TCC GTC TGG GCT*

<----------

p53-458-477,
komplementär zur Verlängerungssequenz
der Detektor-Nukleotidsequenz

TCT TGC ATT CTG GGA CAG CCA AGT CTG TGA CTT GCA CGT ACT CCC CTG CCC TCA ACA AGA TGT TTT GCC AAC

----->

TGG CCA AGA CCT GCC CTG TGC AGC TGT GG*G TTG ATT CCA CAC CCC CGC C*CG GCA CC-3´

<------------------------>

komplementär zur Sonde p53 574-593

Patentansprüche

1. Verfahren zum direkten Nachweis von Target-Nukleotidsequenzen, Target-Aminosäuresequenzen oder Target-Antigenen durch Amplifikation einer DNS unter Verwendung einer DNS-Polymerase und eines Restriktionsenzyms,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Target-Molekül in Lösung gebracht wird oder über eine Fangnukleotidsequenz oder eine Detektornukleotidsequenz an einer festen Phase immobilisiert wird, zur Target-Nukleotidsequenz, die selbst als initialer Primer dient, oder zum Target-Molekül, an das eine Nukleotidsequenz, die als initialer Primer dient, über eine Sonde gekoppelt ist, eine Matrix-DNS zugegeben wird, die eine zum initialen Primer komplementäre Primerhybridisierungssequenz aufweist sowie in 5´-Richtung eine Verlängerungssequenz, eine Restriktionsenzymerkennungssequenz und eine primerkodierende Sequenz besitzt, wobei die primerkodierende Sequenz vollständig oder im Wesentlichen homolog zur Primerhybridisierungssequenz ist, danach eine DNS-Polymerase und dNTPs zur Synthese eines zur Matrix-DNS komplementären Zweitstranges und ein Restriktionsenzym zugegeben werden und anschließend durch die Detektion des Amplifikats in Lösung oder mittels Detektornukleotidsequenz an der festen Phase der Nachweis des Targets erfolgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß

die Amplifikation des initialen Primers isothermisch erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Restriktionsenzym entweder eine Restriktionsendonuklease oder ein Nickenzym verwendet wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß für den Fall der Verwendung einer Restriktionsendonuklease als Restriktionsenzym, die Restriktionsenzymerkennungsstelle der Matrix-DNS chemisch so modifiziert ist, daß sie nicht oder nur in geringem Maße durch die Restriktionsendonuklease geschnitten wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß als Matrix-DNS eine Sequenz verwendet wird, deren 3´-Terminus chemisch modifiziert ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß als DNS-Polymerase eine solche verwendet wird, die Strangverdrängung ermöglicht, vorzugsweise eine DNS-Polymerase ohne Exonukleasefunktion.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß

für den Nachweis von Target-Nukleotidsequenzen das 3´-Ende der Target-Nukleotidsequenz selbst als initialer Primer dient oder als Sonde eine Nukleotidsequenz eingesetzt wird, deren 3´-Ende der Sequenz des initialen Primers entspricht oder an die gegebenenfalls über ein oder mehrere Biomoleküle der initiale Primer gebunden ist, zum Nachweis von einem Target-Antigen als Sonde ein antigenspezifischer Antikörper eingesetzt wird, an den kovalent oder über ein oder mehrere Biomoleküle der initiale Primer gekoppelt ist oder zum Nachweis einer Target-Aminosäuresequenz als Sonde ein Ligand eingesetzt wird, an dem kovalent oder über ein oder mehrere Biomoleküle der initiale Primer gekoppelt ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß als Biomoleküle entweder Biotin und Avidin oder Streptavidin oder Haptene und haptenspezifische Antikörper oder Avidin oder Streptavidin eingesetzt werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß als Fangnukleotidsequenz eine Sequenz verwendet wird, die mit ihrem 3´-Ende an die feste Phase gebunden ist und an ihrem 5´-Ende komplementär zu einem Bereich der Target-Nukleotidsequenz oder der an das Target-Molekül als Sonde gekoppelten Nukleotidsequenz ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion des Amplifikats in Lösung durchgeführt wird, indem Ladung, Größe oder Hybridisierungseigenschaften des Amplifikats ausgenutzt werden.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion des Amplifikats an der festen Phase mit einer Detektornukleotidsequenz durchgeführt wird, die mit ihrem 3´-Ende an der festen Phase immobilisiert ist und eine Primerhybridisierungssequenz enthält, die homolog ist zu der Primerhybridisierungssequenz der Matrix-DNS und eine Markierungsstelle enthält, über die die Detektion erfolgt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Detektornukleotidsequenz eine solche verwendet wird, die 5´-terminal mit einem Biomolekül verbunden ist, über das das Target-Molekül an die Detektornukleotidsequenz koppelt.

13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Detektor-Nukleotidsequenz eine Nukleotidsequenz eingesetzt wird, die an ihrem 5´-Ende komplementär zu einem Bereich der Target-

Nukleotidsequenz oder der an das Target-Molekül als Sonde gekoppelten Nukleotidsequenz ist und gleichzeitig als Fangnukleotidsequenz dient.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, daß als Detektornukleotidseuqenz eine solche verwendet wird, die ein Nukleotid aufweist, über das bei der Synthese des Gegenstranges der Einbau eines markierten Nukleotides erfolgt und über diese Markierung die Detektion durchgeführt wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, daß als Detektornukleotidsequenz eine solche verwendet wird, die als Markierungsstelle eine Sequenz aufweist, die nach der Gegenstrang-Synthese eine Erkennungssequenz für eine Restriktions-endonuklease darstellt und dem Ansatz dieses Restriktionsenzym, Ligase und Detektormonomere zugegeben werden, wobei die Detektormonomere DNS-Sequenzen mit markierten Nukleotiden und mit 3´- oder 5`-Überhängen darstellen und die Überhänge zueinander und zum 5´- oder 3´-Überhang des geschnittenen Detektor-Nukleotidsequenz-Hybrides komplementär sind und die Detektion des Amplifikats über die markierten Nukleotide der Detektormonomere durchgeführt wird.

16. Kit zur Durchführung des Verfahrens gemäß der Ansprüche 1-15,

dadurch gekennzeichnet, daß
der Kit mindestens der Amplifikation der nachzuweisenden Target-Nukleotidsequenz oder des nachzuweisenden Target-Moleküls dienende Matrix-DNS enthält.

17. Kit nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet, daß
der Kit zusätzlich initialen Primer und/oder Sonde sowie gegebenenfalls ein oder mehrere Biomoleküle zur Kopplung der Sonde an den initialen Primer enthält, wobei initialer Pimer und Sonde, gegebenenfalls über ein oder mehrere Biomoleküle, gekoppelt in dem Kit enthalten sein können oder der initiale Primer und die Sonde sowie gegebenenfalls das Biomolekül oder die Biomoleküle einzeln in dem Kit enthalten sein können.

18. Kit nach Anspruch 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet, daß
in dem Kit zusätzlich Detektornukleotidsequenz enthalten ist, wobei die Detektornukleotidsequenz entweder an einer festen Phase immobilisiert vorliegt oder feste Phase und Detektornukleotidsequenz getrennt in dem Kit enthalten sind.

19. Kit nach einem der Ansprüche 16-18,
dadurch gekennzeichnet, daß
der Kit zusätzlich eine Fangnukleotidsequenz enthält, wobei die Fangnuklectidsequenz entweder an der festen Phase immobilisiert vorliegen kann

oder feste Phase und Fangnukleotidsequenz getrennt in dem Kit enthalten sind.

20. Kit nach einem der Ansprüche 16-19, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Kit zusätzlich Detektormonomere, die markierte Nukleotide enthalten, und Ligase sowie gegebenenfalls ein Restriktionsenzym, das die Erkennungssequenz des Detektornukleotidsequenz-Zweitstrang-Hybrids erkennt, enthalten sind.

21. Kit nach einem der Ansprüche 16-20, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Kit zusätzlich DNS-Polymerase und/oder dNTPs, wobei eines der dNTPs markiert sein kann und/oder ein Restriktionsenzym zum Schneiden der Matrix-DNS und/oder geeignete Enzym- und Reaktionspuffer enthalten sind.

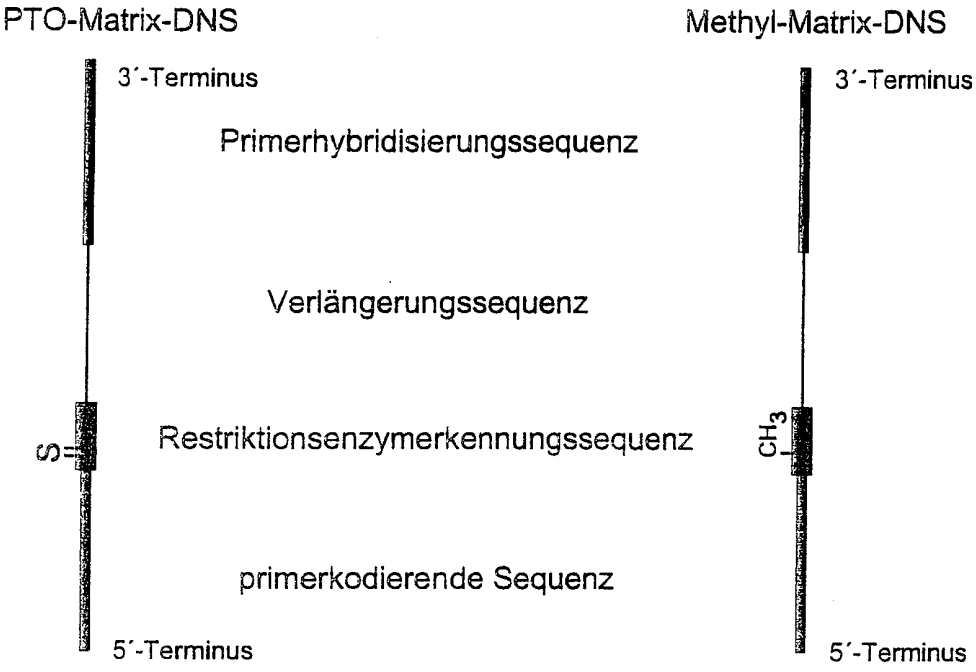
22. Kit nach einem der Ansprüche 16-21, dadurch gekennzeichnet, daß der Kit zusätzlich der Detektion der markierten Nukleotide dienende Reagenzien enthält.

23. Verwendung des Kits nach einem der Ansprüche 16-22 in der medizinischen Diagnostik und kriminologischen Spurenanalytik sowie für Umwelt-, Lebens- und Arzneimittelanalysen.

24. Verwendung des Kits nach Anspruch 23 zum Nachweis der Expression eines Gens.

25. Verwendung des Kits nach Anspruch 23 zur Diagnose von Infektionen.

A


PTO-Matrix-DNS
Methyl-Matrix-DNS
3´-Terminus
3´-Terminus
Primerhybridisierungssequenz
Verlängerungssequenz
S=
Restriktionsenzymerkennungssequenz
CH3
primerkodierende Sequenz
5´-Terminus
5´-Terminus

B

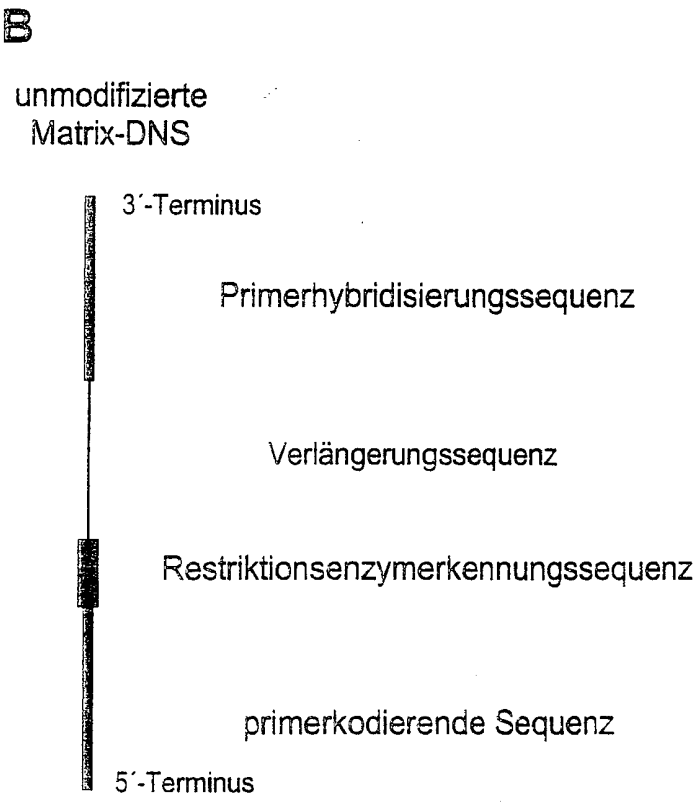

unmodifizierte Matrix-DNS
3´-Terminus
Primerhybridisierungssequenz
Verlängerungssequenz
Restriktionsenzymerkennungssequenz
primerkodierende Sequenz
5´-Terminus

Abb. 1

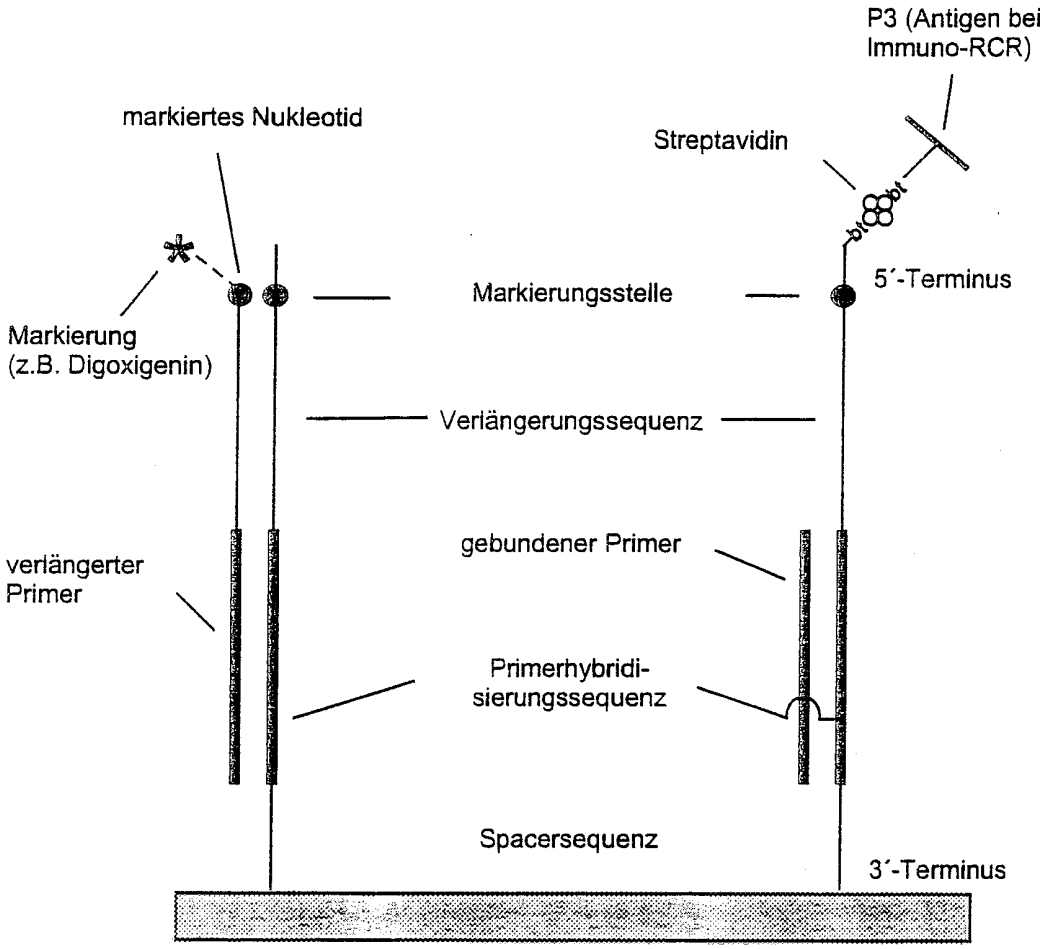

P3 (Antigen bei Immuno-RCR)
markiertes Nukleotid
Streptavidin
Markierungsstelle
5´-Terminus
Markierung (z.B. Digoxigenin)
Verlängerungssequenz
gebundener Primer
verlängerter Primer
Primerhybridi-sierungssequenz
Spacersequenz
3´-Terminus

Abb. 2

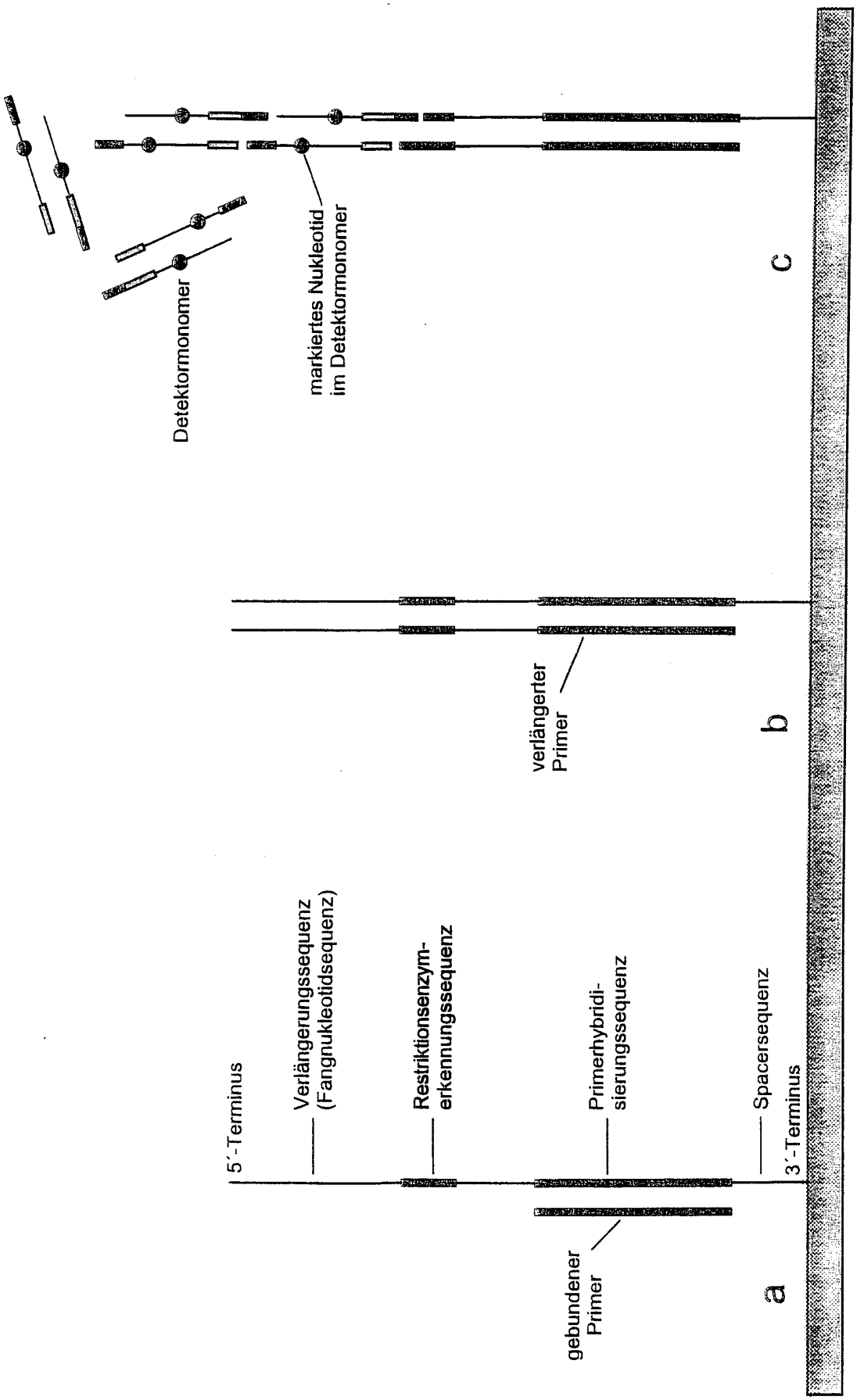

Detektormonomer
markiertes Nukleotid im Detektormonomer
c
verlängerter Primer
b
5´-Terminus
Verlängerungssequenz (Fangnukleotidsequenz)
Restriktionsenzym-erkennungssequenz
Primerhybridi-sierungssequenz
Spacersequenz
3´-Terminus
gebundener Primer
a

Abb. 3

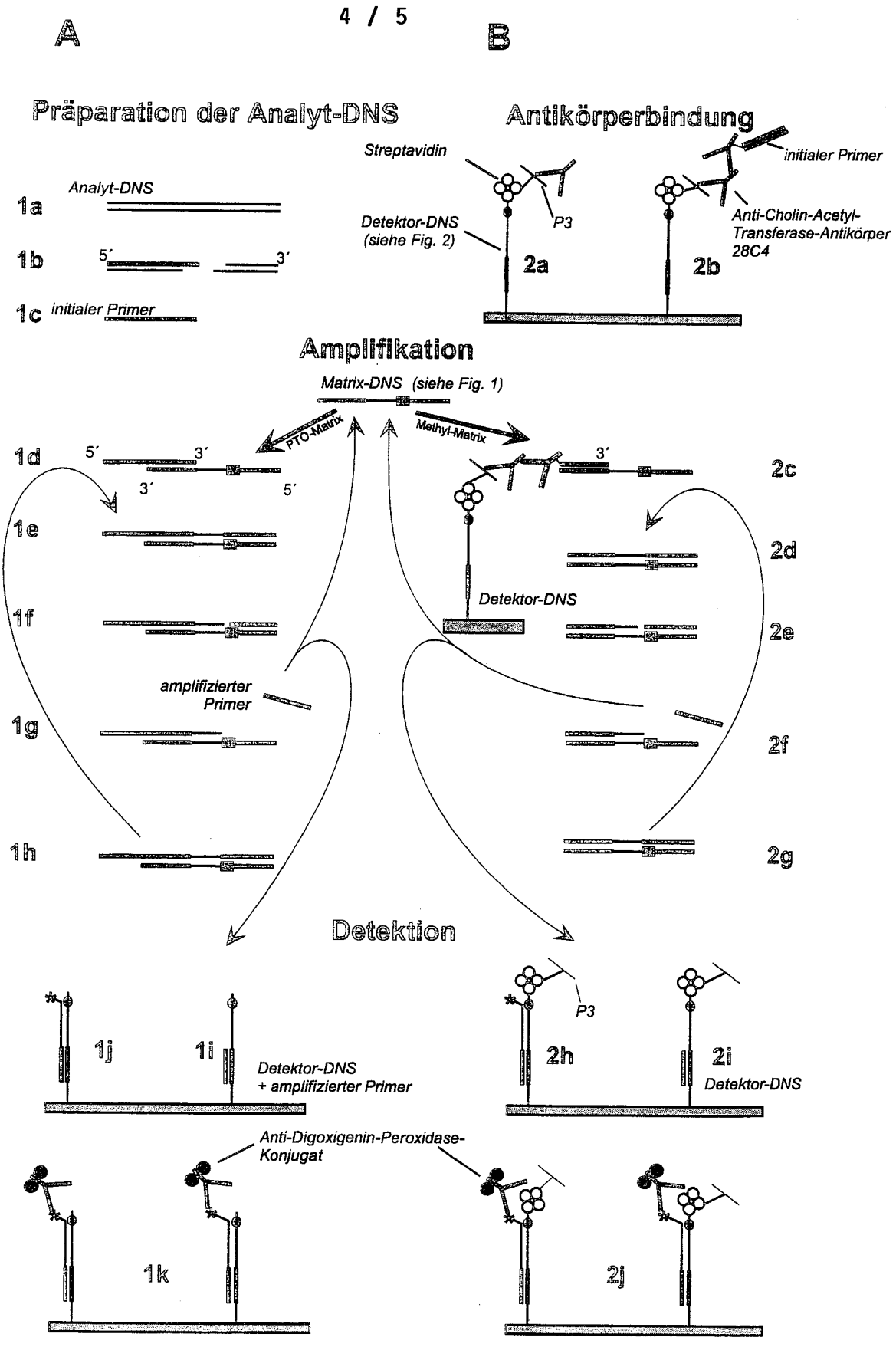

A
B
Präparation der Analyt-DNS
Antikörperbindung
Analyt-DNS
1a
1b
5´
3´
1c
initialer Primer
Streptavidin
initialer Primer
Detektor-DNS
(siehe Fig. 2)
P3
Anti-Cholin-Acetyl-
Transferase-Antikörper
28C4
2a
2b
Amplifikation
Matrix-DNS (siehe Fig. 1)
PTO-Matrix
Methyl-Matrix
1d
2c
1e
2d
Detektor-DNS
1f
2e
amplifizierter
Primer
1g
2f
1h
2g
Detektion
1j
1i
Detektor-DNS
+ amplifizierter Primer
P3
2h
2i
Detektor-DNS
Anti-Digoxigenin-Peroxidase-
Konjugat
1k
2j

Abb. 4

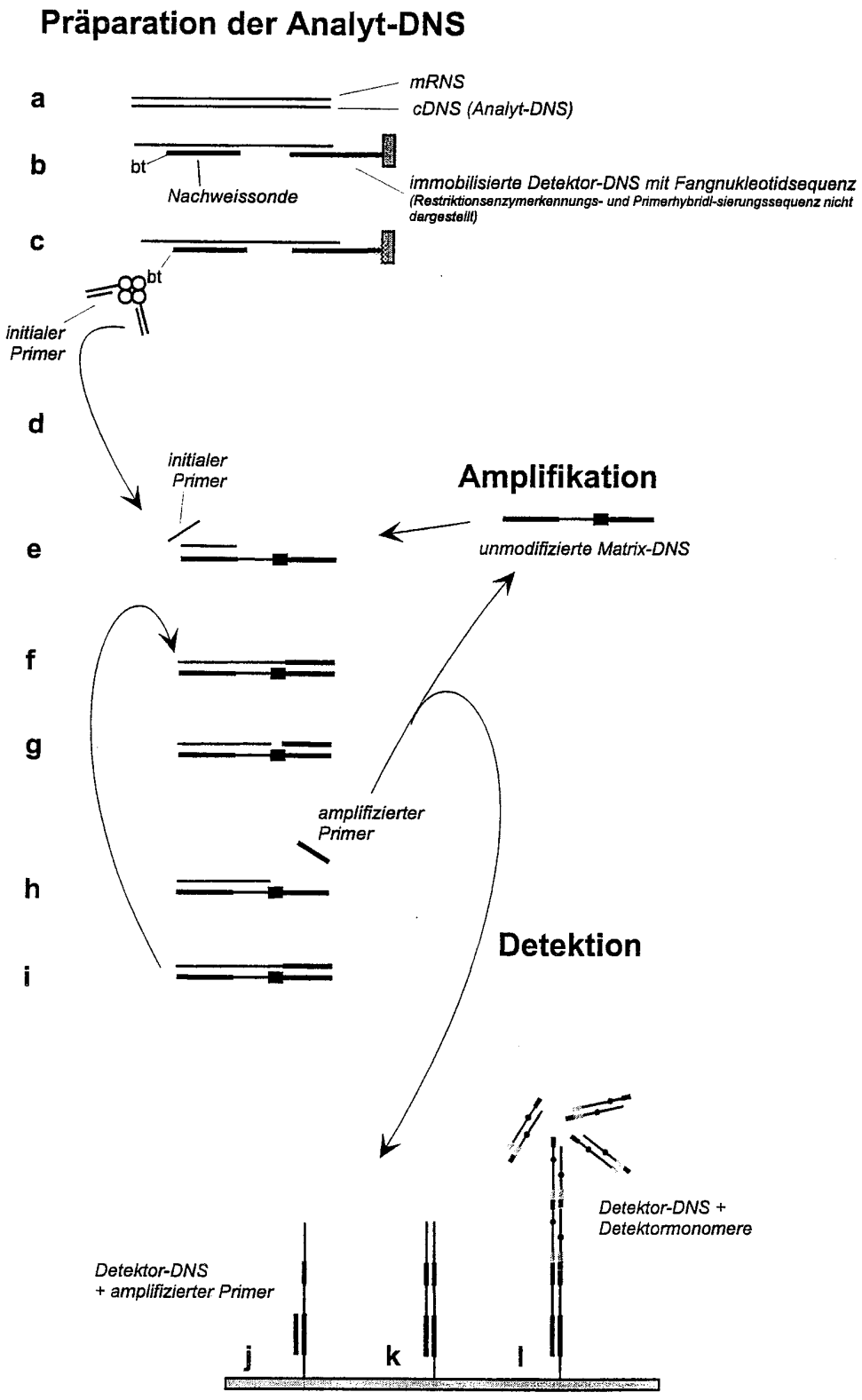

Präparation der Analyt-DNS
a
mRNS
cDNS (Analyt-DNS)
b
bt
Nachweissonde
immobilisierte Detektor-DNS mit Fangnukleotidsequenz
(Restriktionsenzymerkennungs- und Primerhybridi-sierungssequenz nicht dargestellt)
c
bt
initialer Primer
d
initialer Primer
Amplifikation
e
unmodifizierte Matrix-DNS
f
g
amplifizierter Primer
h
i
Detektion
Detektor-DNS + Detektormonomere
Detektor-DNS + amplifizierter Primer
j
k
l

Abb. 5

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: Attomol GmbH - Molekulare Diagnostika
(B) STRASSE: Schulweg 6
(C) ORT: Lipten
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 03205

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:
Verfahren und Kit zum direkten Nachweis von Nukleotidsequenzen, Aminosaeuresequenzen oder

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: DE 198 48 297.3
(B) ANMELDETAG: 12-OCT-1998

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 43 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GTGTGGTGTG GGGTGTGGAC TCTGGTTGTT GTGTGGTGTG GGG 43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 41 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GTGTGGTGTG GGGCCTTGTT GGTTGGTTGT GTGGTGTGGG G 41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 54 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TGCTCATCGC CAACCGCTCC CGAGTAGTTC CTGCTCATCG CCAACCGCTC CCGA 54

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKšLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GGCGGGGGTG TGGAATCAAC 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 13 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CCCCACACCA CAC 13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 13 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CCCCACACCA CAC 13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 46 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ACACCATACA CCTCTGCTCA TCGCCAACCG CTCCCTCTCT CTCTCT 46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 39 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATGAAATGAG AGATGTGTGT GGTGTGGGGT GTGTGTGTG 39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) L□NGE: 63 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CAAGAAGCCC AGACGGAAAC TGGCCTCGCT GGCTGATTGT GTGTGGTGTG GGGTTGTTGT 60
TGT 63

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

TCCGCCTCAT CTGCTCTTCC CGC 23