



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 36 668 T2** 2007.09.13

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 915 991 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 36 668.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/13391**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 935 208.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/004746**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.07.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.02.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.05.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.09.2007**

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

C12Q 1/70 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

690494 **31.07.1996** **US**

(73) Patentinhaber:

**Hamilton Thorne Biosciences, Inc., Beverly,
Mass., US**

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Pfister & Pfister, 87700
Memmingen**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

Antrag auf Nichtnennung

(54) Bezeichnung: **NUKLEINSAEURE VERVIELFAELTIGUNGSVERFAHREN AUF BASIS DER RAMIFIKATIONS-EXTENSIONS-AMPLIFIZIERUNG (RAM) UND DER IN VITRO TRANSKRIPTION**

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

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

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Offenbarung bezieht sich auf Tests und Kits zur Durchführung der Tests für einen schnellen, automatischen Nachweis von ansteckenden, pathogenen Stoffen und normalen und abnormalen Genen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Eine Anzahl von Technologien wurde in letzter Zeit entwickelt, um der Nachfrage nach einem schnellen und genauen Nachweis für ansteckende Stoffe, wie Viren, Bakterien und Pilze, sowie einem Nachweis für normale und abnormale Gene, nachzukommen. Derartige Technologien, die im Allgemeinen die Amplifizierung und den Nachweis (und die anschließende Messung) von winzigen Mengen von Ziel-Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in einer Testprobe beinhalten, schließen unter anderem die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al., Science 230:1350, 1985; Saiki et al., Science 239:487, 1988; PCR Technology, Henry A. Erlich, ed., Stockton Press, 1989; Patterson et al., Science 260:976, 1993), Ligasekettenreaktion (LCR) (Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189, 1991), Strangverschiebungsamplifizierung (SDA) (Walker et al., Nucl. Acids Res. 20:1691, 1992), Q β Replikaseamplifizierung (Q β RA) (Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11769, 1992; Lomeli et al. Clin. Chem. 35:1826, 1989) und selbstunterhaltende Replikation (3SR) (Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990) ein. Während all diese Technologien wirksame Mittel zum Nachweis und Identifizieren von winzigen Mengen einer Ziel-Nukleinsäure in einer Probe darstellen, leiden sie alle unter verschiedenen Problemen, die verhindern, dass sie allgemein im klinischen Laboreinsatz für die Anwendung bei diagnostischen Routinetechnologien zum Einsatz kommen.

[0003] Eines der schwierigsten Probleme ist die Herstellung einer Ziel-Nukleinsäure, bevor deren Amplifizierung und der Nachweis ausgeführt werden. Dieser Prozess ist aufwendig, was Zeit und Laborkosten betrifft und deshalb im Allgemeinen nicht geeignet für einen klinischen Einsatz, wo schnelle und genaue Ergebnisse gefordert werden. Ein anderes Problem, besonders für PCR und SDA, ist, dass die Bedingungen zur Amplifizierung der Ziel-Nukleinsäure für den anschließenden Nachweis und eine mögliche, quantitative Analyse bei jedem Test variieren, das heißt, dass es keine konstanten Bedingungen gibt, die eine Test-Standardisierung begünstigen würden. Das letztere Problem ist besonders kritisch für die quantitative Analyse der Ziel-Nukleinsäure durch konkurrierende PCR und für den gleichzeitigen Nachweis von mehrfachen Ziel-Nukleinsäuren.

[0004] Umgeht man die zuvor erwähnten Probleme, so würden sich schnelle, standardisierte Tests entwickeln lassen, die die verschiedenen oben erwähnten Technologien einsetzen; das wäre insbesondere für die Ausführung von epidemiologischen Forschungen brauchbar, ebenso wie für einen klinischen Einsatz im Labor zum Nachweis pathogener Mikroorganismen und Viren in Patientenproben. Solche Mikroorganismen verursachen ansteckende Krankheiten, die eine große Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen. Die Entwicklung von standardisierten und automatisierten Analysetechniken und die Kits dafür, die auf einer schnellen und empfindlichen Identifizierung von Ziel-Nukleinsäuren beruhen, zugeschnitten auf einen Stoff für ansteckende Krankheiten, wäre im Vorteil gegenüber Technologien, die auf Immunologie oder dem Nachweis von Kulturen von Bakterien und Viren beruhen.

[0005] Es können Reagenzien entwickelt werden, die auf einen bestimmten Organismus oder ein Spektrum von verwandten Organismen zugeschnitten sind. Diese Reagenzien könnten eingesetzt werden, um direkt mikrobielle Gene, die Resistenz gegen verschiedene Antibiotika übertragen, und um Ansteckungsfaktoren, die zu Krankheiten führen, zu testen. Die Entwicklung von schnellen standardisierten Analysetechniken wird eine Hilfe bei der Auswahl der richtigen Behandlung sein.

[0006] In einigen Fällen mögen Tests mit mittelmäßiger Empfindlichkeit (aber hoher Spezifität) ausreichen, zum Beispiel für Eingangssuchtests. In anderen Fällen ist hohe Empfindlichkeit (ebenso wie Spezifität) gefragt, zum Beispiel kann es beim Nachweis des HIV-Genoms in infiziertem Blut notwendig sein, die viralen Nukleinsäuresequenzen, die in einer Probe zu einem Teil pro 10 bis 100.000 von Human-Genomequivalenten vorhanden sind, zu finden. (Harper et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83:772, 1986).

[0007] Blutverunreinigungen, die unter anderem HIV, HTLV-I, Hepatitis B und Hepatitis C einschließen, stellen eine ernste Gefahr für Transfusions-Patienten dar, und die Entwicklung diagnostischer Routine-Tests, einschließlich der Nukleinsäuren dieser Stoffe für den schnellen und empfindlichen Nachweis solcher Stoffe, wären von großem Nutzen im klinischen Diagnoselabor. Beispielsweise kann das HIV-Genom in einer Blutprobe

unter Verwendung von PCR-Techniken nachgewiesen werden, entweder als RNA-Molekül, das den freien viralen Bestandteil darstellt, oder als DNA-Molekül, das den integrierten Provirus darstellt (Ou et al., Science 239:295, 1988; Murakawa et al., DNA 7:287, 1988).

[0008] Zudem haben epidemiologische Untersuchungen, die klassische Kultur-Technologien verwenden, gezeigt, dass eine im ganzen Körper ausgebreitete Mycobacterium Avium Intrazellulär (MAI)-Infektion eine Komplikation im späten Stadium des erworbenen Immundefizienz Syndroms (AIDS) bei Kindern und Erwachsenen ist. Das genaue Ausmaß des Problems ist allerdings nicht klar, da die gegenwärtigen Kulturmethode zum Nachweis von Mycobakterien mühselig, langsam und von fragwürdiger Empfindlichkeit sind. Daher wäre es wünschenswert und höchst nützlich, eine schnelle, empfindliche und spezifische Technik zum Nachweis von MAI vorzusehen, um ein endgültiges Bild des Einflusses auf HIV-infizierte Individuen und solche mit andern Immunsuppressionen zu bekommen. Solche Studien müssen molekularbiologische Methoden einschließen, die sich auf den Nachweis einer Ziel-Nukleinsäure stützen, die sich routinemäßig als empfindlicher erwiesen haben als Standard-Kultursysteme (Boddinghaus et al., J. Clin. Med 28:1751, 1990).

[0009] Andere Anwendungsgebiete für solche Technologien schließen Nachweis und Charakterisierung von einzelnen Genen mit genetischer Störung bei Individuen und Populationen ein (siehe zum Beispiel Landergren et al., Science 241:1077, 1988, wo eine Verbindungstechnik zum Nachweis einzelner Gendefekte, einschließlich Punktmutationen, veröffentlicht wird). Solche Technologien sollten in der Lage sein, klar einzelne nukleotide Unterschiede (Punktmutationen) zu erkennen, die sich in einer Krankheit äußern können (zum Beispiel Sichelzellenanämie), ebenso wie fehlende oder verdoppelte genetische Sequenzen (zum Beispiel Thalassämie).

[0010] In der WO 9535390 wird ein Verfahren zum Nachweis einer Ziel-Nukleinsäure in einer Probe veröffentlicht, das Folgendes umfasst

- (a) Kontaktieren der Nukleinsäure in der Probe unter Bedingungen, die Hybridisierung der Nukleinsäure zwischen komplementären Sequenzen in Nukleinsäuren mit Oligonukleotidsonden zulässt, wobei die Oligonukleotidsonden weiterhin eine ringbildende Amplifizierungssonde einschließen, die 3'- und 5'-Bereiche aufweist, die komplementär zu anliegenden, aber nicht überlappenden Sequenzen in der Ziel-Nukleinsäure sind, wobei die 3'- und 5'-Bereiche durch einen generischen Bereich getrennt sind, der weder komplementär noch zu einer Nukleotidsequenz in der Ziel-Nukleinsäure hybridisierbar ist, so dass sich ein Komplex bildet, der die Ziel-Nukleinsäure und die ringbildende Sonde einschließt, wobei die ringbildende Sonde mit ihren 3'- und 5'-Enden an anliegende, aber nicht überlappenden Sequenzen in der Ziel-Nukleinsäure gebunden ist;
- (b) Trennen des Komplexes von ungebundenen Reaktionspartnern und Waschen des Komplexes;
- (c) Ligieren der 3'- und 5'-Enden der ringbildenden Sonde mit einem Ligierungsmittel, das die Nukleotidsequenzen verbindet, so dass sich eine ringförmige Amplifizierungssonde bildet;
- (d) Amplifizieren der ringförmigen Amplifizierungssonde durch Kontaktieren des Komplexes mit einem ersten Verlängerungsprimer, der komplementär und zum generischen Teil der ringförmigen Amplifizierungssonde hybridisierbar ist, und einem zweiten Verlängerungsprimer, der im Wesentlichen identisch mit dem generischen Teil der ringförmigen Amplifizierungssonde ist, die nicht mit dem Teil des generischen Bereiches überlappt, an den sich der erste Verlängerungsprimer bindet, dNTPs und eine DNA-Polymerase, die Strangverschiebungsaktivität unter Bedingungen aufweist, bei denen der erste Verlängerungsprimer sich um die ringförmige Sonde für mehrfache Umdrehungen ausdehnt, um eine einsträngige DNA mit wiederholten Einheiten zu bilden, die komplementär zur Sequenz der ringförmigen Sonde sind, wobei sich mehrfache Kopien des zweiten Verlängerungsprimers zu komplementären Bereichen der einsträngigen DNA hybridisieren und durch die DNA-Polymerase ausgedehnt werden, um Ausdehnungsprodukte zu liefern; und
- (e) Nachweis der amplifizierten DNA, wobei ihr Nachweis die Anwesenheit der Ziel-Nukleinsäure in der Probe anzeigt.

[0011] Die oben erwähnten Verfahren sind relativ komplexe Vorgänge, die, wie schon bemerkt, unter Nachteilen leiden, die es schwierig machen, sie im klinischen Diagnoselabor zur Routinediagnose und epidemiologischen Untersuchungen von ansteckenden Krankheiten und genetischen Abnormalitäten einzusetzen. Alle beschriebenen Verfahren beinhalten die Amplifizierung der Ziel-Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll. Die ausgedehnte Zeitdauer und Laborarbeit, die für die Präparation der Ziel-Nukleinsäure notwendig ist, ebenso wie die Variabilität bei den Amplifizierungsvorlagen (zum Beispiel die spezielle Ziel-Nukleinsäure, deren Nachweis gemessen werden soll) und die Bedingungen machen solche Vorgänge ungeeignet für die Standardisierung und Automation, die für einen klinischen Laboreinsatz notwendig ist.

[0012] Die EP 0 359 789 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis einer Ziel-Nukleinsäure in einer Probe, das DNA-Vermehrung wie PCR vermeidet. Ein Primer, der eine Förderersequenz einschließt, wird zu einer Ziel-Nu-

kleinsäure hybridisiert. Ein Teil der Ziel-Nukleinsäure wird durch 3'-5'-Exonuklease entfernt, worauf der entfernte Teil durch eine neue Sequenz unter Verwendung der Fördersequenz des hybridisierten Primers als Vorlage ersetzt wird, was einen Doppelstrangförderer zur Folge hat, so dass die Transkription der Ziel-Nukleinsäure möglich wird.

[0013] Die vorliegende Offenbarung richtet sich auf die Entwicklung von schnellen, empfindlichen Tests, die sich zum Nachweis und Beobachten von pathogenen Organismen eignen, ebenso wie zum Nachweis von Genen in einem Individuum. Darüber hinaus können die Verfahren der vorliegenden Offenbarung zum Einsatz im klinischen Labor einfach standardisiert und automatisiert werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0014] Ein verbessertes Verfahren, das einen schnellen, empfindlichen und standardisierten Nachweis und eine quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren aus pathogenen Mikroorganismen von Proben von Patienten mit ansteckenden Krankheiten erlaubt, ist nun entwickelt worden. Die verbesserten Verfahren erlauben auch einen schnellen und empfindlichen Nachweis und einen quantitativen Nachweis von genetischen Variationen in Nukleinsäuren in Proben von Patienten mit genetischen Krankheiten oder Tumorerkrankungen.

[0015] Das Verfahren bietet einige Vorteile gegenüber den Verfahren aus dem Stand der Technik. Das Verfahren vereinfacht den Isolierungsvorgang der Ziel-Nukleinsäure, der in Mikroröhrchen, Mikrochips oder Mikrotiterplatten, wenn gewünscht, durchgeführt werden kann. Das Verfahren berücksichtigt, dass Isolierung, Amplifizierung und Nachweis von Nukleinsäuresequenzen, die der interessierenden Ziel-Nukleinsäure entsprechen, im gleichen Probenbehälter, beispielsweise Röhrchen oder Mikrotiterplatte, ausgeführt werden. Das Verfahren berücksichtigt auch eine Standardisierung der Bedingungen, da nur eine einzige ringbildende, generische Amplifizierungs-sonde im vorliegenden Verfahren zum Nachweis einer Vielzahl von Zielnukleinsäuren verwendet werden kann, so dass sich eine effiziente, Multiplex-Amplifizierung ergeben kann. Das Verfahren erlaubt den direkten Nachweis von RNA durch Sondenamplifizierung, ohne dass eine DNA-Vorlagenproduktion notwendig ist. Die Amplifizierungs-sonden, die bei dem Verfahren kovalent Ende an Ende verbunden werden, bilden eine benachbarte, verbundene Amplifizierungssequenz. Der Aufbau der amplifizierbaren DNA durch Verbindung erhöht die Spezifität und ermöglicht den Nachweis einer einzigen Mutation in einem Ziel. Diese verbundene Amplifizierungssequenz wird eher als die Ziel-Nukleinsäure amplifiziert, und das berücksichtigt, dass im Wesentlichen die gleichen Amplifizierungsbedingungen für eine Anzahl von verschiedenen ansteckenden Stoffen verwendet werden, und dass daher kontrolliertere und reproduzierbarere Ergebnisse erhalten werden. Zusätzlich können zahlreiche ansteckende Stoffe in einer einzigen Probe nachgewiesen werden, wenn die veröffentlichten Multiplex-Amplifizierungsverfahren eingesetzt werden.

[0016] Zusätzliche Vorteile der vorliegenden Offenbarung schließen die Möglichkeit ein, das Protokoll des veröffentlichten Verfahrens zu automatisieren, was bei der Durchführung von Routinetests wichtig ist, insbesondere im klinischen Labor.

[0017] Eine Ziel-Nukleinsäure wird zu einer ringbildenden Amplifizierungs-sonde hybridisiert. Die Sonde ist so gebaut, dass sie generische Sequenzen (das heißt, nicht spezifisch für die Ziel-Nukleinsäure) und spezifische Sequenzen, die komplementär zu einer nukleotiden Sequenz in der Ziel-Nukleinsäure sind, enthält. Die spezifischen Sequenzen der Sonde sind komplementär zu anliegenden Bereichen der Ziel-Nukleinsäure, und überlappen sich deshalb gegenseitig nicht. Danach werden die 3'- und 5'-Enden der ringbildenden Sonde miteinander verbunden, wobei ein Verbindungsmittel verwendet wird, um eine benachbarte, verbundene Amplifizierungssequenz zu bilden. Das Verbindungsmittel kann ein Enzym sein, zum Beispiel DNA-Ligase oder eine Chemikalie. Nach dem Waschen und dem Entfernen von ungebundenen Reaktionspartnern und anderen Stoffen aus der Probe, wird der Nachweis der Ziel-Nukleinsäure in der ursprünglichen Probe durch den Nachweis der verbundenen Amplifizierungssequenz bestimmt. Die verbundene Amplifizierungssequenz (nicht die Ziel-Nukleinsäure) wird für den Nachweis amplifiziert. Unverbundene Sonden, ebenso wie die Ziel-Nukleinsäure, werden bei dieser Technik nicht amplifiziert. Die Amplifizierungs-sonde ist eine einzige Amplifizierungs-sonde, die mit dem Ziel hybridisiert, so dass ihre 3'- und 5'-Enden nebeneinander liegen. Die Enden werden dann durch DNA-Ligase verbunden, um eine kovalent verbundene, ringförmige Sonde zu erhalten, die durch Amplifizierung identifiziert werden kann.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0018] [Fig. 1](#) ist ein schematisches Diagramm, das verschiedene Komponenten zeigt, die eingesetzt werden, um eine Ziel-Nukleinsäure, zum Beispiel HCV RNA, nachzuweisen, wobei zwei Capture-(Einfang-)/Amplifizie-

nungssonden eingesetzt werden, von denen jede einen gebundenen Biotinanteil enthält, und eine einzige Amplifizierungs-sonde, die nach dem Hybridisieren zur Ziel-Nukleinsäure und der Verbindung der freien Endpunkte einen Ring bildet.

[0019] [Fig. 2](#) ist eine Photographie von DNA, gefärbt mit Ethidiumbromid, das PCR-amplifizierte Sonden darstellt, die verwendet werden, um HCV RNA in einer Probe nachzuweisen. Die Menge an HCV RNA in der Probe wird bestimmt durch Vergleich von Probenbanddichten mit denen von seriellen Standardverdünnungen von HCV-Transkripten.

[0020] [Fig. 3](#) ist eine Photographie von DNA, gefärbt mit Ethidiumbromid, das PCR-amplifizierte Sonden darstellt, die einzeln, in voller Länge verbindungsabhängig und ringbildend sind, die zum Nachweis von HCV RNA in einer Probe eingesetzt werden. Die Menge an HCV RNA in der Probe wird bestimmt durch den Vergleich von Probenbanddichten mit denen von seriellen Standardverdünnungen von HCV-Transkripten.

[0021] [Fig. 4](#) ist ein schematisches Diagramm eines Ausführungsbeispiels von RAM, bei dem ein T3-Promoter einem Ext-Primer 2 beigemischt ist, so dass Amplifizierung der ringförmigen Sonde durch Transkription möglich wird.

[0022] [Fig. 5](#) stellt ein Polyacrylamidgel dar, das die Amplifizierung einer ringförmigen Sonde durch Ausdehnung des Ext-Primer 1 zeigt.

[0023] [Fig. 6](#) ist ein schematisches Diagramm der Amplifizierung einer ringbildenden Sonde durch das Ramifizierungs-Ausdehnungs-Amplifizierungs-Verfahren (RAM).

[0024] [Fig. 7](#) ist ein Diagramm eines RAM-Tests, bei dem eine RNA-Polymerasefördersequenz dem Primer beigemischt ist.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0025] Die vorliegende Offenbarung richtet sich auf eine vereinfachte Probenpräparation und generische Amplifizierungssysteme zum Einsatz bei klinischen Tests, um pathogene Mikroorganismen in einer Testprobe nachzuweisen und zu beobachten, und auch um abnormale Gene in einem Individuum nachzuweisen. Generische Amplifizierungssysteme, die Verbindungs-/Amplifizierungstechniken mit Transkription verbinden, um Nukleinsäuren in einer Probe nachzuweisen und zu messen, sind für den klinischen Einsatz beschrieben. Das vorliegende Verfahren verwendet das Ramifizierungs-Ausdehnungs-Amplifizierungsverfahren (RAM). Die Vorteile des vorliegenden Verfahrens schließen ein (1) die Eignung für klinische Einsätze im Labor, (2) die Möglichkeit, kontrollierte und reproduzierbare (standardisierbare) Ergebnisse zu erhalten, (3) die Möglichkeit, Nukleinsäuren in einer speziellen Probe quantitativ zu bestimmen, (4) die Möglichkeit, gleichzeitig eine Vielzahl von Ziel-Nukleinsäuren in einer Testprobe nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen, (5) die Möglichkeit, empfindlich und effizient Nukleinsäuren in Serumproben und an Ort und Stelle nachzuweisen, und (6) die Möglichkeit, eine einzelne Mutation in einem Ziel nachzuweisen. Darüber hinaus kann das gesamte Protokoll des vorliegenden veröffentlichten Verfahrens leicht automatisiert werden, so dass es für Routinediagnostiktests im klinischen Labor einsetzbar wird.

[0026] Mit dem Einsatz von RAM kann eine isothermische Amplifizierung erreicht werden.

[0027] Das vorliegende Verfahren beinhaltet magnetische Trennung unter Verwendung von paramagnetischen Teilchen, Perlen oder Kugeln, die mit einem Liganden-bindenden Anteil beschichtet sind, der den vorliegenden Liganden erkennt und ihn an eine Oligonukleotidsonde bindet, wie weiter unten beschrieben, um die Ziel-Nukleinsäure (DNA oder RNA) aus einer klinischen Probe zu isolieren und so ihren Nachweis zu ermöglichen.

[0028] Die Sonden können aus nukleosiden Triphosphaten durch bekannte automatisierte oligonukleotide Synthesetechniken synthetisiert werden, zum Beispiel, durch Standardphosphoramidittechnik unter Verwendung eines Nukleinsäuresynthesizers. Solche Synthesizer sind erhältlich beispielsweise von Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA) Wenn die Sonden miteinander verbunden werden sollen, beinhaltet der nächste Schritt bei dem vorliegenden Verfahren, dass der Komplex von Schritt (1) mit einem Verbindungsmittel behandelt wird, das die zwei Sonden verbindet. Das Verbindungsmittel kann ein Enzym sein, zum Beispiel DNA- oder RNA-Ligase, oder ein chemisches Mittel, zum Beispiel Bromcyan oder Carboimid. Das dient dazu, das 5'-Ende mit dem 3'-Ende der ringbildenden Amplifizierungs-sonde zu verbinden, um ein benachbartes, funktionales,

einsträngiges Oligonukleotidmolekül zu bilden, das hier als verbundene Amplifizierungssequenz bezeichnet wird. Alle Amplifizierungs sonden, die nach der Behandlung unverbunden bleiben, werden in den nachfolgenden Schritten des Verfahrens nicht amplifiziert.

[0029] Die Sonden können unter Einsatz eines geeigneten Verbindungsmittels, wie DNA- oder RNA-Ligase verbunden werden. Alternativ dazu kann das Verbindungsmittel eine Chemikalie sein, wie Bromcyan oder ein Carbodiimid (Solokova et al., FEBS Lett. 232:153-155, 1988). Bevorzugte DNA-Ligasen schließen T₄-DNA-Ligase und die thermostabile Taq-DNA-Ligase ein. Der Vorteil beim Einsatz der Taq-DNA-Ligase ist, dass sie bei erhöhten Temperaturen (65–72°C) aktiv ist. Das Verbinden der Oligonukleotidsonden bei solch erhöhten Temperaturen vermindert die unspezifische Verbindung. Vorzugsweise wird der Verbindungsschritt 30–60 Minuten lang bei einer erhöhten Temperatur (etwa 65–72°C) ausgeführt, danach kann jede unverbundene Amplifizierungs sonde, wenn gewünscht, unter Denaturierungsbedingungen entfernt werden.

[0030] Die Denaturierung wird nach dem Verbindungsschritt ausgeführt, indem man TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA) zu der Mischung gibt. Die Temperatur der Mischung wird dann auf etwa 92–95 °C ungefähr 1–5 Minuten lang erhöht, um die hybridisierte Nukleinsäure zu denaturieren. Die Behandlung trennt die Ziel-Nukleinsäure von den hybridisierten, verbundenen Amplifizierungssequenzen.

[0031] Ein weiterer Schritt bei dem Prozess ist der Nachweis der verbundenen Amplifizierungssequenz, der das Vorliegen der Ziel-Nukleinsäure in der ursprünglichen Testprobe anzeigt.

[0032] Ein Amplifizierungssystem wird eingesetzt, um die verbundene Amplifizierungssequenz für den Nachweis zu amplifizieren.

[0033] Die Amplifizierungs sonde ist so aufgebaut, dass komplementäre Bereiche der Sonde, die zu der Ziel-Nukleinsäure hybridisierbar sind, sich an jedem Ende der Sonde befinden (wie beschrieben bei Nilsson et al., 1994, Science 265:2085–2088). Wenn die Sonde mit dem Ziel hybridisiert, werden ihre Endpunkte aneinander anliegend angeordnet, und das Ergebnis ist die Bildung eines geschlossenen, ringförmigen Moleküls nach der Verbindung mit einem Bindemittel wie einem Ligaseenzym. Dieses Ringmolekül kann dann als Vorlage während eines Amplifizierungsschrittes dienen, zum Beispiel beim Einsatz von Primern, wie die in [Fig. 1](#) Dargestellten. Das Ringmolekül wird durch RAM amplifiziert, wie hier weiter unten beschrieben.

[0034] Beispielsweise kann die oben beschriebene Sonde eingesetzt werden um verschiedene Genotypen eines Pathogens, zum Beispiel verschiedene Genotypen von HCV aus Serumproben, nachzuweisen. Spezifische Sonden für Genotypen können entwickelt werden, basierend auf den veröffentlichten HCV-Sequenzen (Stuyver et al., 1993, J. Gen. Virol. 74:1093–1102), so, dass eine Mutation in der Ziel-Nukleinsäure nachweisbar wird, da solch eine Mutation die (1) korrekte Hybridisierung der Sonde zur Ziel-Nukleinsäure und (2) im Folgenden die Verbindung der Sonde zu einem Ringmolekül stören würde. Wegen der Natur der ringbildenden Sonde, können, wie unten diskutiert, unverbundene Sonden unter strengen Waschbedingungen entfernt werden.

[0035] Die einzelne, verbindungsabhängige, ringbildende Sonde von voller Länge, wie sie beim Verfahren eingesetzt wird, bietet größere Effizienz beim Nachweis und der Amplifizierung der Ziel-Nukleinsäuresequenz. Dank der Helix-Natur der Doppelstrangnukleinsäuremoleküle, winden sich ringbildende Sonden um den Ziel-Nukleinsäurestrang. Als Ergebnis des Verbindungsschrittes kann sich die Sonde kovalent an das Zielmolekül durch Verkettung binden. Das Ergebnis ist eine Immobilisierung der Sonde am Zielmolekül, wobei sich ein Hybridmolekül bildet, das im Wesentlichen resistent gegen Waschbedingungen ist. Das Ergebnis ist eine deutliche Verminderung der unspezifischen Signale während des Tests, ein niedrigeres Hintergrundgeräusch und höhere Spezifität des Tests.

[0036] Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung sieht ein Verfahren vor zur Verminderung von eingeschleppter Kontaminierung und Hintergrund bei den Amplifizierungsverfahren, die ringförmige Sonden einsetzen. Die vorliegenden, verbindungsabhängigen Amplifizierungsverfahren, im Gegensatz zu herkömmlichen Amplifizierungsverfahren, schließen Amplifizierung der verbundenen Sonde(n) eher ein als die Ziel-Nukleinsäure. Wenn die verbundene Sonde ein geschlossenes Ringmolekül ist, hat sie keine freien Enden, die für einen Exonuklease-Aufschluß empfänglich wären. Nach der Verbindung der Sonde, das heißt der Ringbildung, sieht die Behandlung des Reaktionsgemisches mit einer Exonuklease einen „Reinigungs“-Schritt vor, und vermindert so Hintergrund- und Einschleppverschmutzung durch Aufschließen unverbundener Sonden oder linearer DNA-Fragmente, aber nicht von geschlossenen Ringmolekülen. Die kovalent gebundenen Ringmoleküle bleiben für nachfolgende Amplifizierung und Nachweis intakt. Beim herkömmlichen PCR birgt

der Einsatz von Exonuklease, um einsträngige Primer oder eingeschleppte DNA-Fragmente zu eliminieren, die Gefahr, dass Ziel-Nukleinsäure auch abgebaut wird. Die vorliegende Erfindung beinhaltet diese Gefahr nicht, da Ziel-Nukleinsäure nicht amplifiziert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist die Exonuklease eine Exonuklease III, Exonuklease VII, Mungbohnen-Nuklease oder Nuklease BAL-31. Exonuklease wird zu der Reaktion nach der Verbindung oder vor der Amplifizierung zugegeben, und, zum Beispiel bei 37°C dreißig Minuten lang, temperiert.

[0037] Weiter wird in Betracht gezogen, Mehrfach-Sonden einzusetzen, die verbunden werden können, um eine einzelne, kovalent geschlossene, ringförmige Sonde zu bilden. Beispielsweise wird eine erste Sonde ausgewählt, um zu einem Bereich des Ziels zu hybridisieren. Eine zweite Sonde wird ausgewählt, so dass deren 3'- und 5'-Endpunkte zu Bereichen des Ziels hybridisieren, die anliegend, aber nicht mit den 5'- und 3'-Endpunkten der ersten Sonde überlappend sind. Zwei Verbindungsvorgänge sind dann notwendig, um eine kovalent geschlossene, ringförmige Sonde zu erhalten. Durch den Einsatz von zwei Ligasen, zum Beispiel einer enzymatischen und einer chemischen Ligase, um die Sonde kovalent zu schließen, kann die Reihenfolge der Verbindungen bestimmt werden. Diese Ausführungsform ist besonders nützlich, um zwei nahe beieinander liegende Mutationen in einem einzigen Ziel zu identifizieren.

[0038] Die ringbildende Sonde kann auch durch das Erzeugen eines großen Polymers amplifiziert und nachgewiesen werden. Das Polymer wird durch die rollende Ringausdehnung des Primers 1 entlang der ringbildenden Sonde und die Verschiebung der nachgeschalteten Sequenz erzeugt. Dieser Schritt erzeugt eine einsträngige DNA, die Mehrfach-Einheiten enthält. Wie hier gezeigt kann sich der Primer 2 an das einsträngige DNA-Polymer binden und gleichzeitig ausdehnen, so dass das Ergebnis eine Verschiebung der nachgeschalteten Primer durch die vorgeschalteten Primer ist.

[0039] Gemäß der vorliegenden Offenbarung, die eine verbindungsabhängige, ringbildende Sonde einsetzt, kann das resultierende ringförmige Molekül auf herkömmliche Weise durch das Verzweigungs(Ramifikations)-Ausdehnungs-Amplifizierungsverfahren (RAM) amplifiziert werden, wie in [Fig. 6](#) dargestellt. Die Amplifizierung der ringbildenden Sonde durch RAM bringt noch weitere Vorteile zu den Verfahren der vorliegenden Erfindung, dadurch, dass eine Amplifizierung der ringbildenden Sonde unter isothermen Bedingungen auf das millionenfache möglich ist. RAM ist in [Fig. 19](#) dargestellt.

[0040] Die einzelne, verbindungsabhängige, ringbildende Sonde von voller Länge, die für RAM nützlich ist, enthält Bereiche an ihren 3'- und 5'-Endpunkten, die sich zu anliegenden, aber nicht benachbarten Bereichen des Zielmoleküls hybridisieren lassen. Die ringbildende Sonde ist so gebaut, dass sie einen 5'-Bereich enthält, der komplementär und hybridisierbar zu einem Teil der Ziel-Nukleinsäure ist, und einen 3'-Bereich, der komplementär und hybridisierbar zu einem Teil der Ziel-Nukleinsäure ist, der an dem Teil des Zieles anliegt, der komplementär zum 5'-Bereich der Sonde ist. Die 5'- und 3'-Bereiche der ringbildenden Sonde können jeder etwa 20 bis etwa 35 Nukleotiden in der Länge aufweisen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die 5'- und 3'-Bereiche der ringbildenden Sonde ungefähr 25 Nukleotide lang. Die ringbildende Sonde enthält weiterhin einen Bereich, der als Bindebereich bezeichnet wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform weist der Bindebereich eine Länge von etwa 30 bis etwa 60 Nukleotiden in der Länge auf. Der Bindebereich ist aus einer generischen Sequenz zusammengesetzt, die weder komplementär noch zur Zielsequenz hybridisierbar ist.

[0041] Die ringbildende Sonde, die sich für eine Amplifizierung mit RAM eignet, wird beim vorliegenden Verfahren mit einer oder mehreren Einfang/Amplifizierungssonden eingesetzt, wie hier weiter oben beschrieben. Wenn die ringbildende Sonde mit der Ziel-Nukleinsäure hybridisiert, kommen ihre 5'- und 3'-Endpunkte nebeneinander zu liegen. Das Ergebnis der Verbindung mit einem Bindestoff ist die Bildung eines geschlossenen, ringförmigen Moleküls.

[0042] Die Amplifizierung des geschlossenen, ringförmigen Moleküls wird bewirkt durch das Beimengen eines ersten Verlängerungsprimers (Ext-Primer 1) zur Reaktion. Der Ext-Primer 1 ist komplementär und hybridisierbar zu einem Teil des Bindbereichs der ringbildenden Sonde, und weist vorzugsweise eine Länge von etwa 15 bis etwa 30 Nukleotiden auf. Der Ext-Primer 1 wird durch ausreichende Konzentrationen von dNTPs und einer DNA-Polymerase ausgedehnt, um den Primer um das geschlossene, ringförmige Molekül auszudehnen. Nach einer Umdrehung des Ringes, das heißt, wenn die DNA-Polymerase den Bindungsort des Ext-Primer 1 erreicht, verschiebt die Polymerase den Primer und seine ausgedehnte Sequenz. So „rollt“ die Polymerase kontinuierlich „über“ die geschlossene, ringförmige Sonde, um eine lange, einsträngige DNA zu produzieren, wie in [Fig. 6](#) gezeigt.

[0043] Die Polymerase, die für die Amplifizierung der ringbildenden Sonde durch RAM einsetzbar ist, kann

jede Polymerase sein, die keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität aufweist, die Strangverschiebungsaktivität aufweist und die zu einer Primerausdehnung von mindestens 1000 Basen fähig ist. Bevorzugte Polymerasen sind (Exo-)Klenow-Fragment der DNA-Polymerase, Thermococcus litoralis-DNA-Polymerase (Vent(exo)DNA-Polymerase, New England Biolabs) und phi29-Polymerase (Blanco et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12198). Thermos aquaticus (Taq)-DNA-Polymerase ist, gemäß der vorliegenden Erfindung, ebenfalls einsetzbar. Im Gegensatz zu Berichten in der Literatur ist gefunden worden, dass, gemäß der vorliegenden Erfindung, die Taq-DNA-Polymerase Strangverschiebungsaktivität aufweist.

[0044] Das Ergebnis der Ausdehnung des Ext-Primer 1 durch die Polymerase ist eine lange, einsträngige DNA von sich wiederholenden Einheiten, die eine Sequenz aufweisen, die komplementär zur Sequenz der ringbildenden Sonde ist. Die einsträngige DNA kann bis zu 10Kb betragen, und zum Beispiel von etwa 20 bis etwa 100 Einheiten beinhalten, wobei jede Einheit in der Länge gleich der Länge der ringbildenden Sonde ist, zum Beispiel etwa 100 Basen. Alternativ zu RAM kann der Nachweis auch bei diesem Schritt ausgeführt werden, wenn das Ziel im Überfluss vorhanden ist oder die einsträngige DNA lang ist. Beispielsweise kann die lange, einsträngige DNA in diesem Stadium durch Sichtbarmachen der erhaltenen Produkte als ein langes Molekül auf einem Polyacrylamidgel nachgewiesen werden.

[0045] Im nächsten Schritt der Amplifizierung durch RAM wird ein zweiter Verlängerungsprimer (Ext-Primer 2) zugefügt. Der Ext-Primer 2 weist vorzugsweise etwa 15 bis etwa 30 Nukleotide in der Länge auf. Der Ext-Primer 2 ist identisch mit einem Teil des Bindebereiches, der den Teil des Bindebereiches nicht überlappt, zu dem der Ext-Primer 1 komplementär ist. So enthält jede sich wiederholende Einheit der langen, einsträngigen DNA eine bindende Stelle, zu dem der Ext-Primer 2 hybridisiert. Mehrfache Kopien des Ext-Primer 2 binden sich so an die lange, einsträngige DNA, wie in [Fig. 6](#) dargestellt, und werden durch die DNA-Polymerase ausgedehnt. Die Produkte der Primerausdehnung verschieben nachgeschaltete Primer mit ihren entsprechenden Ausdehnungsprodukten, um eine Mehrzahl von verschobenen, einsträngigen DNA-Molekülen zu liefern, wie in [Fig. 6](#) gezeigt. Die verschobenen, einzelnen Stränge enthalten Bindungsstellen für den Ext-Primer 1 und dienen so als Vorlage für weitere Ausdehnungsreaktionen des Primers, um das mehrfache Verzweigungs(Ramifikations)-Molekül zu produzieren, das in [Fig. 6](#) dargestellt ist. Die Reaktion endet, wenn die ganze DNA doppelsträngig wird.

[0046] Die durch RAM amplifizierte DNA wird dann durch Verfahren, die aus dem Stand der Technik zum Nachweis von DNA bekannt sind, nachgewiesen. Da RAM eine exponentielle Amplifizierung ergibt, können die erhaltenen großen Mengen an DNA auf herkömmliche Weise nachgewiesen werden, zum Beispiel durch Gelelektrophorese und Sichtbarmachen, zum Beispiel, mit Ethidiumbromid. Da die Produkte durch RAM-Ausdehnung sich in der Größe unterscheiden, je nach der Anzahl der Einheiten, die von der geschlossenen Ring-DNA ausgedehnt werden, erscheinen die RAM-Produkte als ein Schmierer oder eine Leiter, wenn sie der Elektrophorese unterworfen werden. Bei einer anderen Ausführungsform ist die ringbildende Sonde so gebaut, dass sie eine einzige Grenzstelle enthält, und die RAM-Produkte werden mit der entsprechenden Grenz-Endonuklease aufgeschlossen, um eine große Menge eines einheitlich großen Fragments einer Einheitslänge, das heißt, der Länge der ringbildenden Sonde, zu liefern. Das Fragment kann leicht durch Gelelektrophorese als ein einziges Band nachgewiesen werden. Alternativ kann ein Ligand, wie Biotin oder Digoxigenin, während der Primerausdehnung beigemischt werden, und das Liganden-markierte, einsträngige Produkt nachgewiesen werden, wie hier schon oben beschrieben.

[0047] Die RAM-Ausdehnungsprodukte können durch andere Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, wie zum Beispiel ELISA, nachgewiesen werden.

[0048] Der Ext-2-Primer (und so der identische Teil des Bindebereiches der ringbildenden Sonde) ist so gebaut, dass er eine Fördersequenz für eine DNA-abhängige RNA-Polymerase enthält. RNA-Polymerasen und entsprechende Fördersequenzen sind im Stand der Technik bekannt, und beispielsweise von Milligan et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15:8783 veröffentlicht. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist die RNA-Polymerase eine bakteriophage T3, T7 oder SP6 RNA-Polymerase. Zugabe des Ext-Primer 2, der die Fördersequenz, die entsprechende RNA-Polymerase und rNTPs enthält, ermöglicht die Hybridisierung des Ext-Primers 2 zu der wachsenden, einsträngigen DNA, um einen funktionalen Promoter zu bilden, und die Transkription der nachgeschalteten Sequenz in mehrfache Kopien von RNA. Diese Ausführungsform der Erfindung ist in der [Fig. 4](#) dargestellt. Bei dieser Ausführungsform wirken sowohl RAM wie auch Transkription, um eine deutliche Amplifizierung der Sonde zu erreichen. Die RNA kann durch Verfahren, die einem normalen Fachmann bekannt sind, zum Beispiel Polyacrylamidgel-Elektrophorese, radioaktive oder nicht-radioaktive Markierung und Nachweisverfahren (Boehringer Mannheim), oder der Sharp-Nachweistest (Digene, Md.) nachgewiesen werden. Der Nachweis von RNA zeigt das Vorliegen der Ziel-Nukleinsäure an.

[0049] Bei einer anderen Ausführungsform, sind der Ext-Primer 1 und der entsprechende Teil des Bindebereiches der ringförmigen Sonde so gebaut, dass sie eine DNA-abhängige RNA-Polymerasefördersequenz beigemengt haben. Wenn also der Ext-Primer 1 die ringbildende Sonde bindet, bildet sich ein funktionaler Promoter, und die ringbildende Sonde wirkt als Vorlage für RNA-Transkription nach der Zugabe von RNA-Polymerase und rNTPs. Der nachgeschaltete Primer und seine RNA-Sequenz werden durch die RNA-Polymerase verschoben und ein großes RNA-Polymer kann entstehen. Das RNA-Polymer kann, wie hier weiter oben beschrieben, nachgewiesen werden. Alternativ kann die ringförmige Sonde in eine einsträngige DNA durch Zugabe eines Begrenzungsenzyms (Restriktionsenzym) wie EcoR1 gespalten werden. Die Begrenzungsstelle ist im 5'-Ende des Verlängerungsprimers 1 eingeschlossen, wie in [Fig. 7](#) gezeigt.

[0050] Reagenzien zum Einsatz bei der Ausführung der vorliegenden Offenbarung können einzeln vorgesehen werden oder in Form von Kits gepackt werden.

[0051] Reagenzien, die für die Verbindung (zum Beispiel DNA-Ligase) und, möglicherweise, für die Amplifizierung notwendig sind, können eingeschlossen werden. Zusätzliche Reagenzien für den Einsatz beim quantitativen Nachweis der amplifizierten, verbundenen Amplifizierungssequenz können ebenfalls eingeschlossen sein, zum Beispiel Kontrollvorlagen wie ein Oligodeoxyribonukleotid entsprechend nanovarianter RNA. Weiterhin können Kits Reagenzien für den in situ-Nachweis von Ziel-Nukleinsäuresequenzen, zum Beispiel in Gewebeproben, enthalten. Die Kits, die ringförmige Sonden enthalten, können auch Exonuklease zur Verhinderung von Einschleppung enthalten.

[0052] Die Anordnung der Reagenzien innerhalb des Behälters des Kits wird von den speziellen Reagenzien, die enthalten sind, abhängen. Jedes Reagens kann in einen eigenen Behälter verpackt sein, doch auch verschiedene Kombinationen sind möglich.

[0053] Die vorliegende Offenbarung wird durch die folgenden Beispiele erläutert, die den Umfang der Offenbarung nicht beschränken sollen.

BEISPIEL 1

EINSATZ VON VIELFACHEINFANG (CAPTURE)- UND AMPLIFIZIERUNGS-SONDEN ZUM NACHWEIS VON HCV RNA IN EINER PROBE

[0054] Ein Paar von Amplifizierungssonden und zwei Einfang (Capture)/Amplifizierungssonden werden für den Test und den Nachweis von HCV RNA in einer Probe eingesetzt, wodurch sich die Aufnahmeeffizienz des Tests erhöht.

[0055] Die Einfang/Amplifizierungssonden Capture/Amp-Sonde-1 (HCV A) (alle Oligomere, die in diesem Beispiel beschrieben werden, werden mit „(HCV A)“ bezeichnet), die SEQ ID NO. 22 aufweist, und Capture/Amp-Sonde-1 A (HCV A), die SEQ ID NO. 23 aufweist, sind so gebaut und synthetisiert, dass ihre 5'-Endpunkte biotinyliert sind, und der 3'-Bereich der Sonden Sequenzen enthält, die komplementär zu und hybridisierbar mit Sequenzen in der 5'UTR der HCV RNA sind. Die generischen, nukleotiden Sequenzen am 5'-Bereich der Sonden, die nicht zur Ziel-Nukleinsäuresequenz hybridisierbar sind, sind so gebaut und synthetisiert, dass sie zufällige Sequenzen und einen GC-Gehalt von zumindest 60% aufweisen, und so, dass sie minimale sekundäre Struktur, zum Beispiel Haarnadel- oder Umfaltstrukturen, zeigen.

[0056] Die Capture/Amp-Sonde-1 (HCV A), die am 5'-Endpunkt biotinyliert ist, ist ein 45-Nukleotiden-DNA-Oligomer, so dass die Nukleotide 5 bis 45 im 3'-Bereich komplementär zu und hybridisierbar mit Sequenzen in der 5'UTR der Ziel-HCV RNA sind, und dass das Oligomer die folgende Nukleotidensequenz aufweist (auch unten aufgeführt als SEQ ID NO. 22):

5'-AAGAGCGTGA AGACAGTAGT TCCTCACAGG GGAGTGATTC ATGGT-3'

[0057] Die Capture/Amp-Sonde-1A (HCV A), die ebenfalls an ihrem 5'-Endpunkt biotinyliert ist, ist auch ein 45-Nukleotiden-DNA-Oligomer, so dass die Nukleotide 5 bis 45 im 3'-Bereich komplementär zu und hybridisierbar mit Sequenzen in der 5'UTR der HCV RNA sind, die unmittelbar anliegend an dem Bereich der 5'UTR der HCV RNA sind, der mit der Capture/Amp-Sonde-1 (HCV A) hybridisierbar ist, und so, dass das Oligomer die folgende Nukleotidensequenz aufweist (auch unten aufgeführt als SEQ ID NO. 23):

5'-AAGACCCAAC ACTACTCGGC TAGCAGTCTT GCGGGGGCAC GCCCA-3'

[0058] Die beiden Amplifizierungssonden Amp-Sonde-2 (HCV A) und Amp-Sonde-2A (HCV A) enthalten je-

weils eine nukleotide Sequenz, die komplementär zu und hybridisierbar mit der konservierten 5'UTR der HCV RNA ist.

[0059] Die Amp-Sonde-2 (HCV A) ist ein 51 Nukleotidenoligomer, so dass die Nukleotide 1 bis 30 im 5'-Bereich komplementär zu und hybridisierbar mit Sequenzen in der 5'UTR der HCV RNA sind, so dass die Nukleotide 34 bis 51 am 3'-Endpunkt sich binden an und hybridisieren mit dem PCR-Primer-3, und, dass das Oligomer die folgende nukleotide Sequenz aufweist (auch unten aufgeführt als SEQ ID NO. 24):
5'-ACTCACCGGT TCCGCAGACC ACTATGGCTC GTTGTCTGTG TATCTGCTAA C-3'

[0060] Die Amp-Sonde-2A (HCV A) ist ein 69 Nukleotidenoligomer, so dass die Nukleotide 40 bis 69 im 3'-Bereich komplementär zu und hybridisierbar mit Sequenzen in der 5'UTR des HCV RNA-Genoms sind, das direkt benachbart zu dem Teil der HCV RNA-Genoms ist, das zu den Nukleotiden 1–30 der Amp-Sonde-2 (HCV A) hybridisierbar ist, und so, dass die Nukleotiden 1 bis 18 am 5'-Endpunkt sich binden an und hybridisieren mit dem PCR-Primer-4, und so, dass die Nukleotiden 19 bis 36 am 5'-Endpunkt sich binden und hybridisieren mit dem PCR Primer-5, und so, dass das Oligomer die folgende Nukleotidensequenz aufweist (auch unten aufgeführt als SEQ ID NO. 25):
5'-CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGRRTAGG TTAGTGCAGA GGACCCGGTC GTCCTGGCAA TTC-CGGTGT-3'

[0061] Ende-an-Ende-Verbindung der beiden Sonden liefert ein 120 Nukleotidenverbindungsprodukt, die Verbindungsamplifizierungssequenz (HCV A), die als nachweisbare Sequenz für HCV ebenso wie als Vorlage für Amplifizierungsreaktionen dient, und die Sequenz (auch unten aufgeführt als SEQ ID NO. 26) hat:
5'-CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTAGTGCAGA GGACCCGGTC GTCCTGGCAA TTC-CGGTGTGTA CTCACCGGTT CCGCAGACCA CTATGGCTCG TTGTCTGTGT ATCTGCTAAC-3'

[0062] Der Primer-3, der für die erste Serie der PCR-Amplifizierung der verbundenen Amplifizierungssequenz, SEQ ID NO. 26 (HCV A) eingesetzt wird, und der eine Länge von 18 Nukleotiden aufweist, ist komplementär zu der Sequenz, die die Nukleotiden 34 bis 51 am 3'-Endpunkt der Amp-Sonde-2 (HCV A) umfasst, und ist deshalb auch komplementär zu der Sequenz, die die Nukleotiden 103 bis 120 der verbundenen Amplifizierungssequenz, SEQ ID NO. 26 (HCV A) umfasst, und die Sequenz (auch unten aufgeführt als SEQ ID NO. 27) hat:
5'-GTTAGCAGAT ACACAGAC-3'

[0063] Der Primer-4, der für die erste Serie von PCR-Amplifizierung der verbundenen Amplifizierungssequenz (HCV A), SEQ ID NO. 26, eingesetzt wird, und der eine Länge von 18 Nukleotiden aufweist, ist komplementär zu der Sequenz, die die Nukleotiden 1–18 am 5'-Endpunkt der Amp-Sonde-2A (HCV A) umfasst, und ist deshalb auch komplementär zu der Sequenz, die die Nukleotiden 1 bis 18 der verbundenen Amplifizierungssequenz, SEQ ID NO. 26 (HCV A) umfasst, und die Sequenz (auch unten aufgeführt als SEQ ID NO. 28) hat:
5'-CAAGAGCAAC TACACGAA-3'

[0064] Der Primer-5, ein DNA-Oligomer von 18 Nukleotiden, wird für die zweite Serie der PCR-Amplifizierung der verbundenen Amplifizierungssequenz (HCV A), SEQ ID NO. 26 eingesetzt, so, dass der Primer komplementär zu der Sequenz ist, die die Nukleotiden 19–36 der Amp-Sonde-2A (HCV A) umfasst, und deshalb auch zu der Sequenz hybridisierbar ist, die die Nukleotiden 19–36 der verbundenen Amplifizierungssequenz SEQ ID NO. 26 (HCV A) umfasst, und die Sequenz aufweist (auch unten aufgeführt als SEQ ID NO. 29):
5'-TTCTCGATTA GGTTACTG-3'

[0065] Der Test, der die oben erwähnten Sonden und Primer verwendet, wurde eingesetzt, um HCV RNA in 24 menschlichen Serumproben nachzuweisen, die bis zur Verwendung bei -70° aufbewahrt wurden. Für den Test wurden 180 μ l Serumprobe zu konzentriertem Lysepuffer gegeben (hergestellt durch Kondensieren von 250 μ l der Lyselösung, die 5M GnSCN (Guanidiniumisothiocyanat), 0,5% Bovinserumalbumin, 80 mM EDTA, 400 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 0,5 % Nonidet P-40 enthält, so dass die Mischung aus Serum und Lysepuffer eine Endkonzentration von 5M GnSCN aufweisen würde), gut gemischt und 1 Stunde bei 37°C temperiert, um die Ziel-RNA von den HCV-Teilchen zu lösen. 80 μ l der Lysemischung wurden dann in 120 μ l Hybridisierungspuffer übergeführt (0,5 Bovinserumalbumin, 80 mM EDTA, 400 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 Nonidet-P 40) mit 10^{10} Molekülen je Amplifizierungssonde, Amp-Sonde-2 (HCV A) und Amp-Sonde-2A (HCV A)-Oligomere und 10^{11} Moleküle je Capture/Amplifizierungs-sonde, Capture/Amp-Sonde-1 (HCV A) und Capture/Amp-Sonde-1A (HCV A). Die Zugabe des Hybridisierungspuffers vermindert die Konzentration von GnSCN von 5 M auf 2 M, so dass die Hybridisierung eintreten kann. Die Mischung wurde bei 37°C eine Stunde lang temperiert, um verschiedene Sonden mit der Ziel-RNA hybridisieren zu lassen, danach wurden 30 μ l Streptavinbeschichtete,

paramagnetische Perlen (Promega) zur Hybridisierungsmischung zugefügt, vor einer Temperierung bei 37°C 20 Minuten lang, so dass Ligandenbindung eintreten konnte. Als Nächstes wurden die Perlen mit 150 µl 2 M GnSCN gewaschen, um alle freien Sonden, Proteine, äußeren Nukleinsäuren und potentiellen PCR-Inhibitoren aus der Hybridisierungsmischung zu eliminieren; darauf folgte die Entfernung des GnSCN durch zweimaliges Waschen mit 150 µl Ligasepuffer (66 mM Tris-HCl (pH 7, 5) 1 mM DTT; 1mM ATP, 0, 5 Nonidet P-40 und 1 mM MnCl₂). Bei jedem Waschschritt wurde die magnetische Trennung des gebundenen Komplexes vom oben Schwimmenden bewirkt.

[0066] Die Amplifizierungssonden, Amp-Sonde-2 (HCV A) und Amp-Sonde-2A (HCV A), die an die Ziel RNA gebunden sind, wurden dann kovalent verbunden, so dass die verbundene Amplifizierungssequenz (HCV A) entstand, die als Vorlage für die PCR-Amplifizierung eingesetzt wurde. Der Hybridkomplex wurde wieder in 20 µl Ligasepuffer mit 5 Einheiten T₄-DNA-Ligase (Boehringer) suspendiert und eine Stunde lang bei 37°C für die Verbindungsreaktion temperiert. Für die nachfolgende PCR-Reaktion, die im Weiteren als die „erste PCR-Reaktion“ bezeichnet wird, wurden 10 µl der verbundenen Mischung, einschließlich der Perlen, zu 20 µl der PCR-Mischung (0,06 µM je von Primer-3 und Primer-4, 1,5 Einheiten Taq DNA-Polymerase, 0,2 mM je von dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8, 3) 50 mM KCl) zugegeben, und die Mischung bei 95°C 30 Sekunden lang temperiert, bei 55°C 30 Sekunden lang und bei 72°C 1 Minute lang, 35 Zyklen lang. Nach der ersten PCR-Reaktion wurden 5 µl des Produktes zu einer zweiten PCR-Mischung übergeführt (aus den gleichen Bestandteilen, wie die erste PCR-Mischung, ausser dass der Primer-4 durch den Primer-5 ersetzt wurde) um die „zweite PCR-Reaktion“ (eine semi-nested PCR-Näherung, um die Empfindlichkeit des Tests zu erhöhen) unter den gleichen Bedingungen auszuführen, wie die erste PCR-Reaktion. 10 µl der Produkte der zweiten Reaktion wurden der Elektrophorese auf einem 6% Polyacrylamidgel, gefärbt mit Ethidiumbromid und sichtbar gemacht unter ultraviolettem Licht, unterworfen.

[0067] Um die Empfindlichkeit und die Spezifität des Verfahrens festzustellen, wurden 10-fache, serielle Verdünnungen von synthetischer HCV RNA in HCV-negativem Serum, gemäß dem oben beschriebenen Protokoll, getestet, so dass die Konzentration von HCV RNA in einem Bereich von 10 bis 10⁷ Molekülen/Reaktion lag. Nach Verbindung und Amplifizierung wurden die PCR-Produkte durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Die Ergebnisse, die in [Fig. 2](#) dargestellt sind, zeigen deutlich die Spezifität des Verfahrens. In Abwesenheit von HCV RNA gibt es kein Signal, was anzeigt, dass Sonden die Ziel-RNA einfangen müssen, um ein PCR-Produkt zu erzeugen. Nur 100 Moleküle HCV RNA/Probe waren mit dem semi-nested PCR-Verfahren nachweisbar ([Fig. 2](#)), was anzeigt, dass die Empfindlichkeit des Verfahrens zumindest vergleichbar mit der des herkömmlichen RT-PCR ist (Clementi et al., 1993, PCR 2:191–196).

[0068] Weiter waren relative Mengen des PCR-Produkts, dargestellt durch die Bandintensität, wie zu sehen in [Fig. 2](#), proportional zu der Menge an Ziel-RNA (HCV RNA-Transkripte). Deshalb liegt der Test im Quantitativen über mindestens einem Bereich von 10² bis 10⁵ Zielmolekülen.

[0069] Um die gestiegene Effektivität beim Einfangen zu bestimmen, die die zwei Einfangsonden bieten, wurde ³²P-markierte Ziel-HCV RNA auf Einfangen und Zurückhaltung an den paramagnetischen Perlen unter Einsatz einer Capture/Amp-Sonde-1 (HCV A) oder einer Capture/Amp-Sonde-1 A (HCV A) oder beiden getestet. Das Einfangen wurde geschätzt durch die Menge an Radioaktivität, die nach ausgiebigem Waschen mit 2M-GnSCN-Puffer und dem Ligasepuffer an den paramagnetischen Perlen zurückgehalten wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass 25,7 der markierten HCV RNA an den Perlen zurückgehalten wurde, als sie von der Capture/Amp-Sonde-1 (HCV A) allein eingefangen wurden. 35,8 wurden mit der Capture/Amp-Sonde-1 A (HCV A) allein zurückgehalten und 41,5 der Ziel-RNA wurden zurückgehalten, wenn beide Sonden eingesetzt wurden. Deshalb war das Doppelfangverfahren effizienter als der Einsatz einer einzelnen Einfangsonde.

BEISPIEL 2

EINSATZ VON GETRENNTEN CAPTURE/AMPLIFIZIERUNGSSONDEN UND EINER EINZIGEN AMPLIFIZIERBAREN, VERBINDUNGS-ABHÄNGIGEN SONDE ZUM NACHWEIS VON HCV RNA IN EINER PROBE

[0070] Bei dem Verfahren in diesem Beispiel werden die beiden Einfang/Amplifizierungssonden Capture/Amp-Sonde-1 (HCV A) und Capture/Amp-Sonde-1 A (HCV A) eingesetzt, die in dem Vergleichsbeispiel 1 beschrieben sind, und die einzelne Amplifizierungssonde, Amp-Sonde-2 (HCV C) (alle Oligomere, die in diesem Beispiel beschrieben sind, werden mit „(HCV C) bezeichnet), die zur Ziel-Nukleinsäure hybridisiert und nach der Verbindung ihrer freien Endpunkte einen Ring bildet, wie in [Fig. 1](#) gezeigt.

[0071] Die Amp-Sonde-2 (HCV C) ist eine 108 Nukleotidenamplifizierungs-sonde, die auch als eine Amplifizierungssequenz bezeichnet wird, so dass die Nukleotiden 1–26 im 5'-Endpunkt des Oligomer komplementär zu und hybridisierbar mit einer Sequenz im 5'UTR der Ziel-HCV RNA sind (bezeichnet mit (a) in [Fig. 1](#)), und so dass die Nukleotiden 83–108 am 3'-Endpunkt des Oligomers komplementär zu und hybridisierbar mit einer Sequenz im 5'UTR der Ziel-HCV RNA sind (bezeichnet mit (b) in [Fig. 1](#)). Wenn darüber hinaus die Sonde mit der Ziel-HCV RNA hybridisiert, werden die 3'- und 5'-Endpunkte der Sonde direkt aneinander anliegend platziert ([Fig. 1](#)), so dass sich, nach der Verbindung mit einem bindenden Mittel, wie DNA-Ligase, ein geschlossenes Ringmolekül bildet. Die Sequenz der Amp-Sonde-2 (HCV C) ist wie folgt angegeben (auch aufgeführt als SEQ ID NO. 31):

5'-CCTTTTCGCGA CCCAACACTA CTCGGCTGTC TGTGTATCTG CTAACCCAAGA GCAACTACAC GAATTCTCGA TTAGGTTACT GCGCACCTA TCAGGCAGTA CCACAAGG-3'

[0072] Der Primer-3 (SEQ ID NO. 27), der für die erste Serie der PCR-Amplifizierung der verbundenen und ringförmigen Amp-Sonde-2 (HCV C) eingesetzt wird, ist ein 18 Nukleotiden langes Oligomer, das komplementär zu der Sequenz ist, die die Nukleotiden 27 bis 45 der Amp-Sonde-2 (HCV C) umfasst.

[0073] Der Primer-4 (SEQ ID NO. 28), der auch für die erste Serie der PCR-Amplifizierung der verbundenen und ringbildenden Amp-Sonde-2 eingesetzt wird, ist ein 18 Nukleotiden langes Oligomer, das komplementär zu der Sequenz ist, die die Nukleotiden 46 bis 63 der Amp-Sonde-2 (HCV C) umfasst.

[0074] Die Hybridisierung der beiden Einfang/Amplifizierungs-sonden und der Amplifizierungs-sonde zur Ziel-HCV RNA, die Ringbildung der Amplifizierungs-sonde nach der Verbindung ihrer Endpunkte und die Amplifizierung der Sondensequenzen wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, ausgeführt, außer dass die Primer-3 und -4 nur in einem einzigen PCR-Amplifizierungsschritt eingesetzt wurden, der zweite PCR-Schritt weggelassen wurde, und dass die Amp-Sonde-2 (HCV C) (SEQ ID NO. 31) ersetzt wurde durch das Paar der Amplifizierungs-sonden, Amp-Sonde-2 (HCV A) (SEQ ID NO. 24) und Amp-Sonde-2A (HCV A) (SEQ ID NO. 25), die in Beispiel 5 eingesetzt wurden.

[0075] Um die Empfindlichkeit und die Spezifität des Verfahrens festzustellen, wurden 10-fache, serielle Verdünnungen von synthetischer HCV RNA in HCV-negativem Serum gemäß dem Verfahren getestet, um Standard-Konzentrationen von HCV RNA in einem Bereich von 10^3 bis 10^7 Molekülen/Probe zu liefern. Nach der Verbindung und Amplifizierung wurden die PCR-Produkte durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid eingefärbt und unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht.

[0076] Die Ergebnisse ([Fig. 3](#) (-): Kontrolle, keine Probe) zeigen die Spezifität des Verfahrens. Der Test ist in hohem Maße spezifisch; bei Abwesenheit der Ziel-HCV RNA gibt es kein sichtbares Signal, was anzeigt, dass die Sonden die Ziel-RNA einfangen müssen, um ein PCR-Produkt zu erzeugen. Wie in [Fig. 3](#) zu sehen, waren nur 10^4 Moleküle von HCV RNA/Probe deutlich nachweisbar.

[0077] Weiterhin waren relative Mengen des PCR-Produktes, ausgedrückt durch die Bandintensität ([Fig. 3](#)), proportional zur Menge der Ziel-RNA (HCV RNA Transkripte). Deshalb ist der Test deutlich quantitativ, zumindest über einen Bereich von 10^4 bis 10^7 Zielmoleküle.

BEISPIEL 3

PRIMERAUSDEHNUNGSVERSCHIEBUNG AN EINER RINGFÖRMIGEN AMPLIFIZIERUNGSSEQUENZ

[0078] Dieses Beispiel zeigt die Fähigkeit des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase, nachgeschaltete Stränge zu verschieben und ein Polymer zu produzieren.

[0079] Ein synthetisches DNA-Ziel wurde nachgewiesen durch Mischen von 10^{12} Molekülen phosphorylierter, ringbildender Sonde, mit SEQ ID NO. 31, mit 10^{13} Molekülen synthetischer HCV DNA-Ziel in 10 μ l 1X Verbindungspuffer, erhitzen auf 65°C zwei Minuten lang, und 10 Minuten lang abkühlen auf Raumtemperatur. Ein μ l Ligase wurde zu der Mischung gegeben und bei 37°C eine Stunde lang temperiert, gefolgt von der Zugabe von 10^{13} Molekülen eines 32 P-Markierten Ext-Primer mit SEQ ID NO. 27. Die Mischung wurde fünf Minuten lang auf 100°C erhitzt und dann zwanzig Minuten lang auf Raumtemperatur abgekühlt. Vierzig μ l der Klenow-Mischung und dNTPs wurden zur Reaktion hinzugefügt und bei 37°C temperiert. Zehn μ l radioaktive Probe wurden nach 0, 1, 2 und 3 Stunden entnommen und auf einem 8%igen Polyacrylamidgel untersucht. Die Ergebnisse sind in [Fig. 5](#) gezeigt. Die linken Bahnen stellen die Ergebnisse in Abwesenheit von Ligase dar. Die rechten Bahnen stellen die Ausdehnung nach der Verbindung dar. Bänder im Bereich von 105 bis 600 Basen kön-

nen in den rechten Bahnen sichtbar gemacht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Klenow in der Lage ist, sich vom Ext-Primer auszudehnen, den nachgeschalteten Strang zu verschieben und Polymere zu erzeugen.

BEISPIEL 4

NACHWEIS VON EBV FRÜH RNA (EBER-1) IN PAROTIDEN PLEOMORPHEREM ADENOMAS DURCH VERBINDUNGSABHÄNGIGE PCR

[0080] LD-PCR, das eine ringbildende Sonde einsetzt, wurde durchgeführt, um den Epstein-Barr-Virus früh RNA (EBER-1) in gutartigen Speichelmischtumoren (BMT) nachzuweisen. Sechs Proben von BMT und benachbartes Parotisgewebe, und drei Proben normales Parotisgewebe (zwei entfernt von Zysten und eine von einem hyperplastischem Lymphknoten) wurden im Einbettungsmedium für gefrorene Gewebeproben (OCT, Miles, Inc., Elkhart, In.) schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die entsprechenden Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Blöcke von Gewebe wurden erhalten und parallel zum frischen Gewebe untersucht. Das ganze Gewebe wurde auf einem Mikrotom, dessen Klinge mit 10%igem Chlorox zwischen den Vorgängen gereinigt wurde, um Kreuzkontaminierung zu vermeiden, sektioniert. Zwei der drei Schnitte jeder Probe wurden in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. FFPE-Gewebe wurde durch Temperieren bei 60°C 10 Minuten lang mit 1 ml Xylol (Sigma) deparaffiniert, das danach durch zwei Waschungen mit absolutem Ethanol entfernt wurde. Diese Proben wurden durch Platzieren auf einem heißen Block bei 65°C 30 Minuten lang getrocknet. Das deparaffinierte Gewebe wurde durch Temperieren bei 100°C 30 Minuten lang, dann bei 65°C 30 Minuten lang in 250 μl Lysepuffer: 5M Guanidiumthiocyanat (GuSCN) (FLUKA), 0,5% Bovinserumalbumin (Sigma), 80 mM EDTA, 400mM Tris-HCl (pH 7,5) und 0,5%iges Natrium-N-Laurylsarcosin (Sigma), aufgelöst. Das frische, gefrorene Gewebe wurde durch Temperieren bei 37°C 60 Minuten lang im gleichen Lysepuffer aufgelöst. Die aufgelösten Proben wurden bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

[0081] Zwei Einfang/Amplifizierungssonden wurden gebaut, um den Bereich des EBER-1, der eingesetzt wurde um die Ziel-RNA einzufangen, zu flankieren. Die Sequenzen für die Einfangsonde 1 (SEQ ID NO: 40) und die Einfang/Amplifizierungssonde 2 (SEQ ID NO: 41) sind in Tabelle 4 gezeigt. Die ringförmige Amplifizierungssonde (SEQ ID NO: 42) wurde mit 3'- und 5'-Bereichen gebaut, die komplementär zur gewählten Zielsequenz sind (Tabelle 4). Zwischen diese beiden Bereiche ist eine nicht-komplementäre Bindungssequenz eingeschoben. Diese ringförmige Amplifizierungssonde bildet einen Ring um die Zielhybridisierung derart, dass sie zwischen den 5'- und 3'-Enden liegt. Semi-nested PCR wurde ausgeführt unter Einsatz von Primerpaaren, die auf diese Verbindungssequenz gerichtet sind; auch das ist in Tabelle 4 gezeigt.

TABELLE 4

Sequenzen von Einfangsonden, amplifizierbaren, ringförmigen Zielsonden und PCR-Primern

EBER-Cap/Amp-1

5' Biotin-AAGAgctctcctccctagcaaaacctctagggcagcgtaggtcctg-3'
(SEQ ID No. 40)

EBER-Cap/Amp-2

5' Biotin AAGAggatcaaaacatgCGGaccaccagctggTacttgaccgaag-3'
(SEQ ID No. 41)

Ringförmige Amp

PROBE5' tcaccacccgggacttgtaccCGggacTGTCTGTGTATCTGCTAACCAAGAGC

AACTACACGAATTCTCGATTAGGTTACTGCggaagacaaccacagacaccgttcc-3'
(SEQ ID No. 42)

Erste PCR

Primerpaare: GTTAGCAGATACACAGAC (eine Richtung SEQ ID
NO. 27)CAAGAGCAACTACACGAA (Gegenrichtung SEQ ID
NO. 28)

Zweite PCR

Primerpaare: GTTAGCAGATACACAGAC (eine Richtung SEQ ID
NO. 27)TTCTCGATTAGGTTACTG (Gegenrichtung SEQ ID
NO. 29)

(unterer Fall-komplementär zu EBER-1, oberer Fall-generisch gebaut)

[0082] LD-PCR wurde wie folgt durchgeführt. Kurz gesagt, wurden 80 µl der Lysemischung zu 120 µl des Hybridisierungspuffers (0,5% Bovinserumalbumin, 80 mM EDTA, 400 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 0,5% Natrium-N-Lauroylsarcosin (Sigma), das 10¹⁰ Moleküle der phosphorylierten Zielsonde enthielt, und 10¹¹ Molekülen der Einfangsonde 1 und der Einfangsonde 2 zugesetzt. Der Zusatz des Hybridisierungspuffers verminderte die Konzentration an GnSCN von 5M auf 2M, so dass die Hybridisierung eintreten konnte. Die Mischung wurde eine Stunde lang temperiert, so dass sich Hybride bilden konnten, die aus zwei DNA-Einfang/Amplifizierungs-sonden und einer ringförmigen DNA Amplifizierungs-sonde, hybridisiert auf die Ziel-RNA, bestand. Zu dem Gemisch wurden dreißig µl Streptavidin-beschichtete, paramagnetische Perlen (Promega) hinzugefügt und bei 37°C 20 Minuten lang temperiert, so dass sich die Hybride an die Perlenoberfläche binden konnten. Die Perlen wurden zweimal mit 150 µl des Waschpuffers (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5% Nonidet P-40 und 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl) gewaschen, um die nicht-hybridisierten Sonden ebenso wie die möglichen Inhibitoren der PCR (GnSCN, Proteine) und mögliche Quellen der nicht-spezifischen PCR-Produkte (zelluläre Nukleinsäuren) zu entfernen. Während jeder Waschung wurden die Perlen zu der Wand des Teströhrchens gezogen dadurch, dass das Röhrchen auf einem magnetischen Trennungsgestell (Promega) angeordnet war, so dass das oben-schwimmende Material durch Absaugung entfernt werden konnte. Die 3'- und 5'-Enden der ringförmigen Am-

plifizierungs sonden hybridisierten direkt anliegend aneinander an die Ziel-RNA, wo sie kovalent gebunden sind, und deshalb durch Temperierung bei 37°C eine Stunde lang mit 20 µl Ligaselösung (66mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Dithiothreitol, 1mM ATP, 1mM MnCl₂ und 5 Einheiten T4 DNA-Ligase (Boeringer)) einen Ring bilden. Zehn µl der Verbindungsreaktionsmischung, einschließlich der paramagnetischen Perlen, wurden in 20 µl einer PCR-Mischung, die 0,66 µM des PCR-Primer, 0,5 Einheiten Taq DNA-Polymerase, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM dTTP, 1,5 mM MgCl₂ und 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) und 50mM KCl enthielt, übergeführt.

[0083] Die erste PCR-Reaktion wurde bei 94°C 30 Sekunden lang, bei 55°C 30 Sekunden lang und bei 72°C eine Minute lang 35 Zyklen lang in einem GeneAmp-PCR-System 9600 Thermocycler (Perkin Elmer, CT) temperiert. Nach der ersten PCR wurden 5 µl jedes Reaktionsgemisches in 25 µl eines zweiten PCR-Gemisches übergeführt, das die gleichen Bestandteile enthielt, außer dass 0,66 µM des PCR-Primer 1 und 0,66 µl des PCR-Primer 3 für die semi-nested PCR eingesetzt wurden, was den Signalnachweis ohne Benachteiligung für die Amplifizierungsspezifität erhöht. Die Ausdehnung des PCR-Primer entlang der kovalent ringbildenden Sonde bewirkt die Generierung eines großen, Polymers mit vielen Einheiten (rollende Ringpolymerisation). Tatsächlich kann das PCR-Polymerprodukt nicht ohne Aufschluß in monomere Einheiten in das Polyacrylamidgel wandern. Zehn µl der zweiten PCR-Reaktion wurden mit Restriktionsendonuklease EcoRI in Anwesenheit von 50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM MgCl₂, 0,025 Triton X-100 aufgeschlossen und durch Gelelektrophorese durch 6% Polyacrylamidgel analysiert und durch ultraviolette Fluoreszenz nach Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Anwesenheit eines 90 Basepaarbands (zweites PCR-Produkt) und eines 108 Basepaarbands (erste PCR) werden als positives Ergebnis betrachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

TABELLE 5

EBV früh RNA (EBER – 1) nachgewiesen durch LD-PCR

Fall	Parotisgewebe (gefroren)	Pleomorphes Adenom (gefroren)	FFPE
1	positiv	keine	positiv
2	negativ	keine	negativ
3	negativ	keine	ND
4	ND	positiv	negativ
5	positiv	positiv	negativ
6	positiv	positiv	positiv
7	positiv	negativ	negativ
8	positiv	positiv	negativ
9	positiv	negativ	negativ

Anmerkung

Fall 1 und 2 sind aus Parotisgewebe, das aus anderen Gründen als pleomorphem Adenom entnommen wurde. Die Fälle 3–8 enthielten pleomorphes Adenom.

FFPE – Formalin-fixiertes Gewebe, eingebettet in Paraffin. Gefrorenes Gewebe, schockgefroren in flüssigem Stickstoff.

ND – nicht durchgeführt, da kein Gewebe vorhanden.

[0084] Mit einem Wort, EBER-1-Sequenzen wurden in sechs von acht Parotisproben nachgewiesen. Von den sechs untersuchten pleomorphen Adenomen waren vier positiv auf EBER-1. Von den zwei Fällen, bei denen EBER nicht im Tumor nachgewiesen wurde, fanden sich Sequenzen innerhalb des umgebenden Parotisgewebes. Der Nachweis der EBER-1 Sequenzen innerhalb des entsprechenden Formalin-fixierten Gewebe, das in Paraffin eingebettet wurde, war beträchtlich weniger empfindlich – nur zwei von acht Proben waren positiv.

[0085] Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse mit Verbindungs-abhängiger PCR, die eine ringförmige Sonde einsetzt, die Anwesenheit von EBV-verwandten Sequenzen innerhalb der Mehrzahl der untersuchten pleomorphen Adenome. Das vorliegende Verfahren zeigt eine merklich verbesserte Nachweisrate

im Vergleich zu Standard-PCR zum Nachweis von EBV-DNA, wie er von Taira et al. (1992) J. of Otorhinolaryngol Soc. Jap. 95: 860, durchgeführt wurde. Beim vorliegenden Verfahren hybridisiern die 3'- und 5'-Enden einer ringbildenden Sonde zur Zielsequenz, was im Ergebnis eine benachbarte Position ergibt. Die benachbarten Sequenzen werden dann verbunden, was als Ergebnis eine ringbildende, kovalent gebundenen Sonde ergibt, die an die Zielsequenz angedockt wurde und so resistent gegen starkes Auswaschen ist. PCR an der ringförmigen Sonde ergab ein rollendes Ringpolymer, das in monomere Einheiten aufgeschlossen wurde und auf einem Gel sichtbar gemacht wurde. Der Einsatz der Verbindungsabhängigen PCR mit einer ringförmigen Sonde, gefolgt vom Nachweis durch Amplifizierung der Sonde durch das Rollringmodell ergab eine beträchtliche Empfindlichkeit des Zielnachweises in frischem, gefrorenem Gewebe.

AUFLISTUNG DER SEQUENZEN

(1) Allgemeine Information:

- (i) ANMELDER: Zhang, David Y., Brandwein, Margaret, Hsiuh, Terence C. H.
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: NUKLEINSÄURE-AMPLIFIZIERUNGSVERFAHREN: VERZWEIGUNGS-AUSDEHNUNGS AMPLIFIZIERUNGSVERFAHREN (RAM)
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 42
- (iv) BRIEFADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: Brumbaugh, Graves, Donohue & Raymond
 - (B) STRASSE: 30 Rockefeller Plaza
 - (C) STADT: New York
 - (D) STAAT: New York (NY)
 - (E) LAND: USA
 - (F) POSTLEITZAHL: 10112 - 0228
- (v) COMPUTERLESBARE FORM:
 - (A) ART DES MEDIUMS: Floppy Disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
 - (C) VERARBEITUNGSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) GEGENWÄRTIGE ANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSNUMMER:
 - (B) EINREICHDATUM:
 - (C) KLASSIFIZIERUNG:
- (viii) ANWALT/VERTRETERINFORMATION:
 - (A) NAME: Macleod, Janet M.
 - (A) REGISTRIERUNGSNUMMER: 35.263
 - (B) BEZUGS/LAUFZETTELNUMMER: 29545-A-PCT/USA-B
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:
 - (A) TELEFON: 212-408-2597
 - (B) TELEFAX: 212-765-2519

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO. 1:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGE: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...59
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

CCATCTTCCT GCTAATTTTA AGACCTGGTA ACAGGATTTT CCCGGAATT CAAGCTTGG 59

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 92 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGE: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...92
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG
AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CTGTATGTAC TGTTTTTACT GG 92

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 151 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGE: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...151
- (x) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CTGTATGTAC TGTTTTTACT GGCCATCTTC CTGCTAATTT TAAGACCTGG 120

TAACAGGATT TCCCCGGGAA TTCAAGCTTG G 151

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 90 Basenpaare

- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGE: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...90
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG
AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CCTGGTAACA GGATTTC CCC 90

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:5:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGE: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...21
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

CAAGCTTGAA TTCCCGGGGA A 21

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:6:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGE: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...20
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC 20

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:7:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGE: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...54

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

CAGGCTTATC CCGAAGTGCC TGGTAACAGG ATTTCCCCGG GAATTCAAGC TTGG

54

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:8:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 91 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...91
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CCGGTATTAG ACCCAGTTTC C

91

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 145 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...145
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CCGGTATTAG ACCCAGTTTC CCAGGCTTAT CCCGAAGTGC CTGGTAACAG 120

GATTTCCCCG GGAATTCAAG CTTGG

145

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:10:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...56
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

GAAGACATGC ATCCCGTGGT CCTGGTAACA GGATTTCCCC GGAATTCAA
GCTTGG

56

(2) INFORMATION ZU SEQUENZ SEQ ID NO:11:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 90 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...90
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CGCTAAAGCG CTTTCCACCA

90

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 146 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...146
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CGCTAAAGCG CTTTCCACCA GAAGACATGC ATCCCGTGGT CCTGGTAACA 120

GGATTTCCCC GGAATTCAA GCTTGG

146

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:13:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

(B) LAGE: 1...56

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

AAAGACATGC ATCCCGTGGT CCTGGTAACA GGATTTCCCC GGAATTCAA
GCTTGG

56

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 90 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) KENNZEICHEN:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

(B) LAGE: 1...90

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CGCTAAAGCG CTTCCACCT

90

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 146 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNS (genomisch)

(ix) KENNZEICHEN:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

(B) LAGE: 1...146

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG
AGGTGAGAAA

60

ACCCCGTTAT CGCTAAAGCG CTTCCACCT AAAGACATGC ATCCCGTGGT
CCTGGTAACA

120

GGATTTCCCC GGAATTCAA GCTTGG

146

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:16:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...55
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

GCAGACCACT ATGGCTCTCC CTGGTAACAG GATTTCCCCG GGAATTCAAG CTTGG 55

- (2) INFORMATION ZU SEQUENZ SEQ ID NO: 17:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 90 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...90
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG
AGGTGAGAAA

60

ACCCCGTTAT CCGGTGTACT CACCGGTTCC

90

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:18:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 145 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...145

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG 60
AGGTGAGAAA

ACCCCGTTAT CCGGTGTACT CACCGGTTCC GCAGACCACT ATGGCTCTCC 120
TGGTAACAG

GATTTCCCCG GGAATTCAAG CTTG 145

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 47 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) KENNZEICHEN:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

(B) LAGE: 1...47

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:19:

GGTGAAATTG CTGCCATTGT CTGTATGTTG TCTGTGTATC TGCTAAC 47

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 65 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) KENNZEICHEN:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

(B) LAGE: 1...65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:20:

CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTACTIONGCAGC AACAGGCGGC 60
CTTAACTGTA

GTACT 65

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 112 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...112
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:21:

GGTGAAATTG CTGCCATTGT CTGTATGTTG TCTGTGTATC TGCTAACCAA
GAGCAACTAC 60

ACGAATTCTC GATTAGGTTA CTGCAGCAAC AGGCGGCCTT AACTGTAGTA
CT 112

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:22:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...45
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:22:

AAGAGCGTGA AGACAGTAGT TCCTCACAGG GGAGTGATTC ATGGT 45

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:23:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...45
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:23:

AAGACCCAAC ACTACTCGGC TAGCAGTCTT GCGGGGGCAC GCCCA 45

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:24:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 51 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...51
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:24:

ACTCA(CGGT TCCGCAGACC ACTATGGCTC GTTGTCTGTG TATCTGCTAA
C 51

INFORMATION ZU SEQ ID NO:25:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 69 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...69
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:25:

CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTACTGCAGA GGACCCGGTC
GTCCTGGCAA 60

TTCCGGGTGT 69

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:26:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 120 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...120
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:26:

CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTACTGCAGA GGACCCGGTC
GTCCTGGCAA 60

TTCCGGTGTGTA CTCACCGGTT CCGCAGACCA CTATGGCTCG TTGTCTGTGT
ATCTGCFAAC 120

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:27:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure

- (C) STRANG: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...18
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:27:

GTTAGCAGAT ACACAGAC

18

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:28:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...18
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:28:

CAAGAGCAAC TACACGAA

18

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:29:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE : 18 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) Lage: 1...18
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID BO:29:

TTCTCGATTA GGTTACTG

18

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:30:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 100 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
 - (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...100

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:30:

CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTACTIONGAGC GTCCTGGCAA
TTCCGGTGTA 60

CTCACCGGTT CCGCAGACCG TTGTCTGTGT ATCTGCTAAC 100

2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:31:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 108 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (ix) KENNZEICHEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 - (B) LAGE: 1...108
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:31:

CCTTTCGCGA CCCAACACTA CTCGGCTGTC TGTGTATCTG CTAACCAAGA
GCAACTACAC 60

GAATTCTCGA TTAGGTTACT GCGCACCTA TCAGGCAGTA CCACAAGG
108

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:32:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINNIG: NEIN
- (v) FRAGMENTTYP:
- (vi) ORIGINALQUELLE:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:32:

GCGACACTCC ACCATAGAT 19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:33:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

- (iv) GEGENSINNIG:NEIN
- FRAGMENTTYP:
- (v) ORIGIBALQUELLE:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:33:

GCTCATGGTG CACGGTCTA

19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:34:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINNIG: NEIN
- (v) FRAGMENTTYP:
- (vi) ORIGINALQUELLE:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:34:

CTTCTACAAT GAGCTGCGTG TGGCT

25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:35:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINNIG: NEIN
- (v) FRAGMENTTYP:
- (vi) ORIGINALQUELLE:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:35:

CGCTCATTGC CAATGGTGAT GACCT

25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:36:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINNIG: NEIN
- (v) FRAGMENTTYP:
- (vi) ORIGINALQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:36:

CTGTGAGGAA CTACTGTCT

19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:37:

- (i) SEUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINNIG: NEIN
- (v) FRAGMENTTYP:
- (vi) ORIGINALQUELLE:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:37:

ACTCGCAAGC ACCCTATCA

19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:38:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINNIG: NEIN
- (v) FRAGMENTTYP:
- (vi) ORIGINALQUELLE:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:38:

AAGGCCAACC GCGAGAAGAT

20

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:39:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINNIG: NEIN
- (v) FRAGMENTTYP:
- (vi) ORIGINALQUELLE:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:39:

TCACGCACGA TTTCCCGC

18

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:40:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) GEGENSINNIG: NEIN
 - (v) FRAGMENTTYP:
 - (vi) ORIGINALQUELLE:
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:40:

AAGAGTCTCC TCCCTAGCAA AACCTCTAGG GCAGCGTAGG TCCTG 45

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:41:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) GEGENSINNIG: NEIN
 - (v) FRAGMENTTYP:
 - (vi) ORIGINALQUELLE:
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:41:

AAGAGGATCA AAACATGCGG ACCACCAGCT GGTACTTGAC CGAAG 45

- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:42:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 109 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRANG: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) GEGENSINNIG: NEIN
 - (v) FRAGMENTTYP:
 - (vi) ORIGINALQUELLE:
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:42:

TCACCACCCG GGA CTTGTAC CCGGGACTGT CTGTGTATCT GCTAACCAAG
AGCAACTACA 60

CGAATTCTCG ATTAGGTTAC TGCGGGAAGA CAACCACAGA CACCGTTCC 109

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Ziel-Nukleinsäure in einer Probe, das Folgendes umfasst:

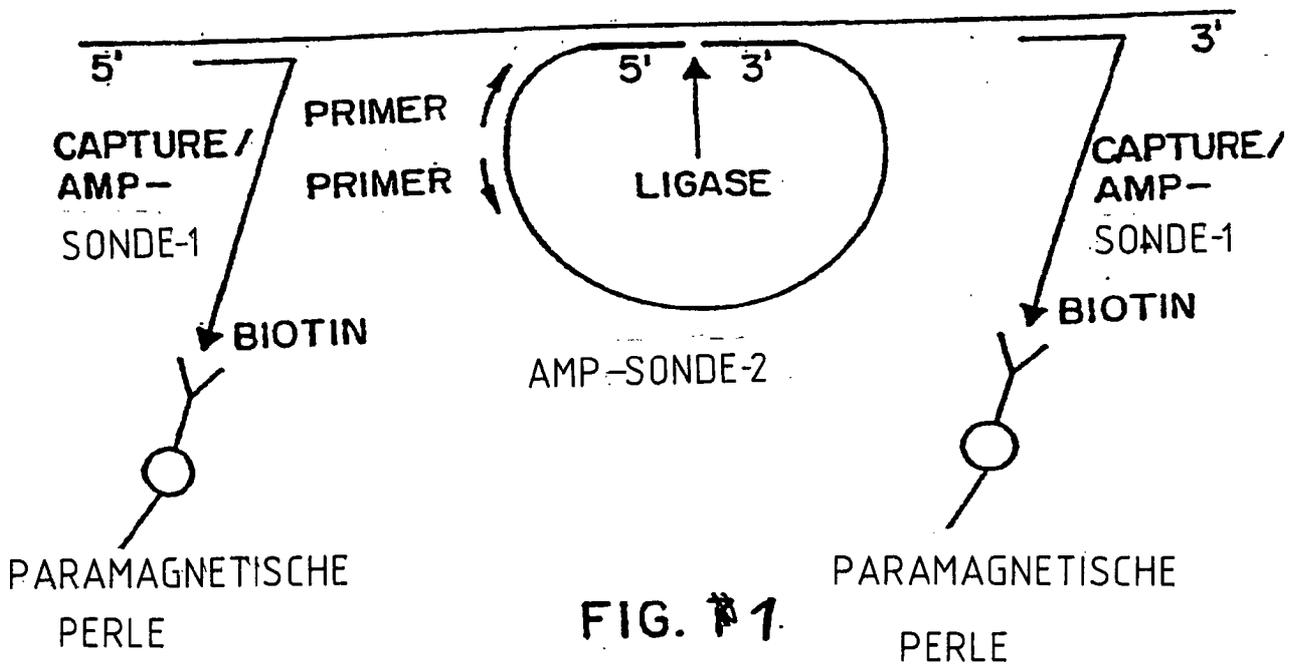
- a) Kontaktieren der Nukleinsäure in der Probe unter Bedingungen, die Hybridisierung der Nukleinsäure zwischen komplementären Sequenzen in Nukleinsäuren mit Oligonukleotidsonden zulässt, wobei die Oligonukleotidsonden weiter eine ringbildende Verstärkungssonde mit 3'- und 5'-Bereichen aufweisen, die komplementär zu anliegenden, aber nicht überlappenden Sequenzen in der Ziel-Nukleinsäure sind, wobei die 3'- und 5'-Bereiche durch einen generischen Bereich getrennt sind, der weder komplementär noch zu einer Nukleotidsequenz in der Ziel-Nukleinsäure hybridisierbar ist, so dass sich ein Komplex bildet, der die Ziel-Nukleinsäure und die ringbildende Sonde umfasst, wobei die ringbildende Sonde an ihren 3'- und 5'-Enden an anliegende, aber nicht überlappende Sequenzen in der Ziel-Nukleinsäure gebunden ist;
- b) Trennen des Komplexes von ungebundenen Reaktionspartnern und Waschen des Komplexes;
- c) Ligieren der 3'- und 5'-Enden der ringbildenden Sonde mit einem Ligierungsmittel, das die Nukleotidsequenzen verbindet, so dass sich eine ringförmige Amplifizierungssonde bildet;
- d) Amplifizieren der ringförmigen Amplifizierungssonde durch Kontaktieren des Komplexes mit einem ersten Verlängerungsprimer, der komplementär und zum generischen Bestandteil der ringförmigen Amplifizierungssonde hybridisierbar ist, und einem zweiten Verlängerungsprimer, der im Wesentlichen identisch mit dem generischen Bestandteil der ringförmigen Amplifizierungssonde ist, die nicht mit dem Teil des generischen Bereiches überlappt, an den sich der erste Verlängerungsprimer bindet, dNTPS, und eine DNA-Polymerase, die Strangversetzungsaktivität aufweist, unter Bedingungen, bei denen der erste Verlängerungsprimer um die ringförmige Sonde während mehrfachen Umdrehungen verlängert wird, um eine einsträngige DNA von wiederholten Einheiten zu bilden, komplementär zur Sequenz der ringförmigen Sonde, wobei sich mehrfache Kopien des zweiten Verlängerungsprimers zu komplementären Bereichen der einsträngigen DNA hybridisieren und durch die DNA-Polymerase verlängert werden, um Verlängerungsprodukte zu liefern; und
- e) Nachweis der amplifizierten Nukleinsäure, wobei ihr Aufspüren die Anwesenheit der Ziel-Nukleinsäure in der Probe anzeigt, **dadurch gekennzeichnet**, dass der zweite Verlängerungsprimer weiter eine Promotorsequenz für eine DNA-abhängige RNA-Polymerase enthält, und Schritt (d) weiter das Hinzufügen einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase und rNTPs umfasst unter Bedingungen, bei denen eine RNA-Kopie der einsträngigen DNA hergestellt wird, und wobei Schritt (e) den Nachweis der RNA umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die DNA-abhängige RNA-Polymerase eine bakteriophage T3 RNA-Polymerase, eine bakteriophage T7 RNA-Polymerase oder eine bakteriophage SP6 RNA-Polymerase ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, das weiter die Schritte umfasst:

- 1) Bereitstellung einer Gewebeprobe aus histologischem Untersuchungsmaterial, das auf die Anwesenheit der Ziel-Nukleinsäure untersucht werden soll; und
- 2) Waschen der Probe; vor dem Schritt (a) des Anspruches 1.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen



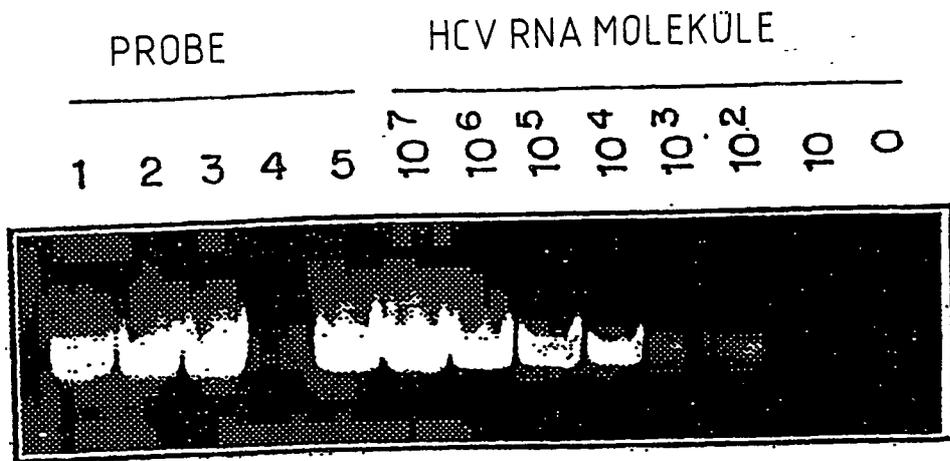


FIG. 2

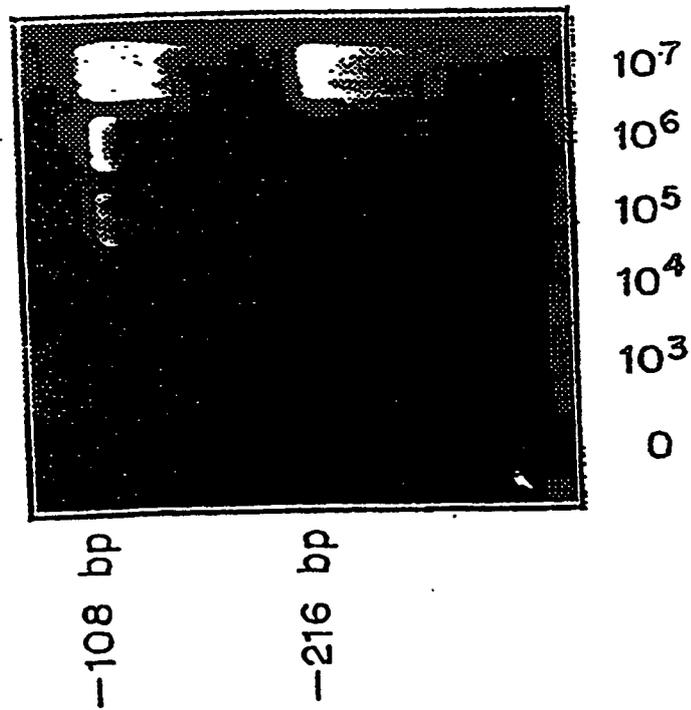


FIG. 3

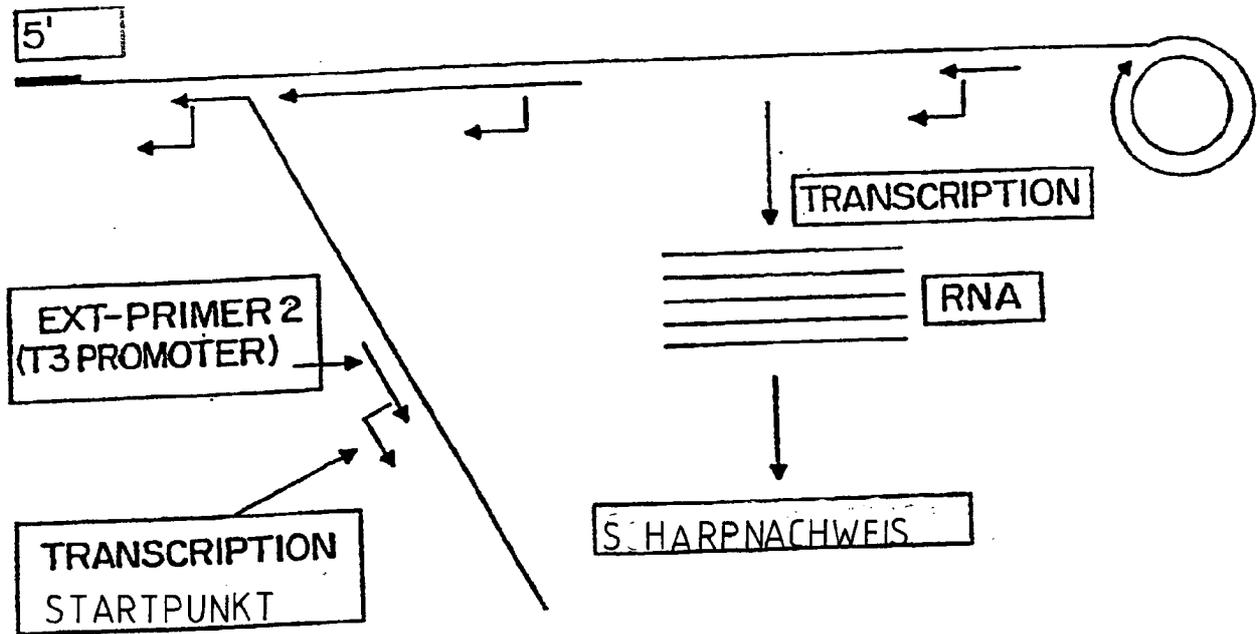


FIG. 14

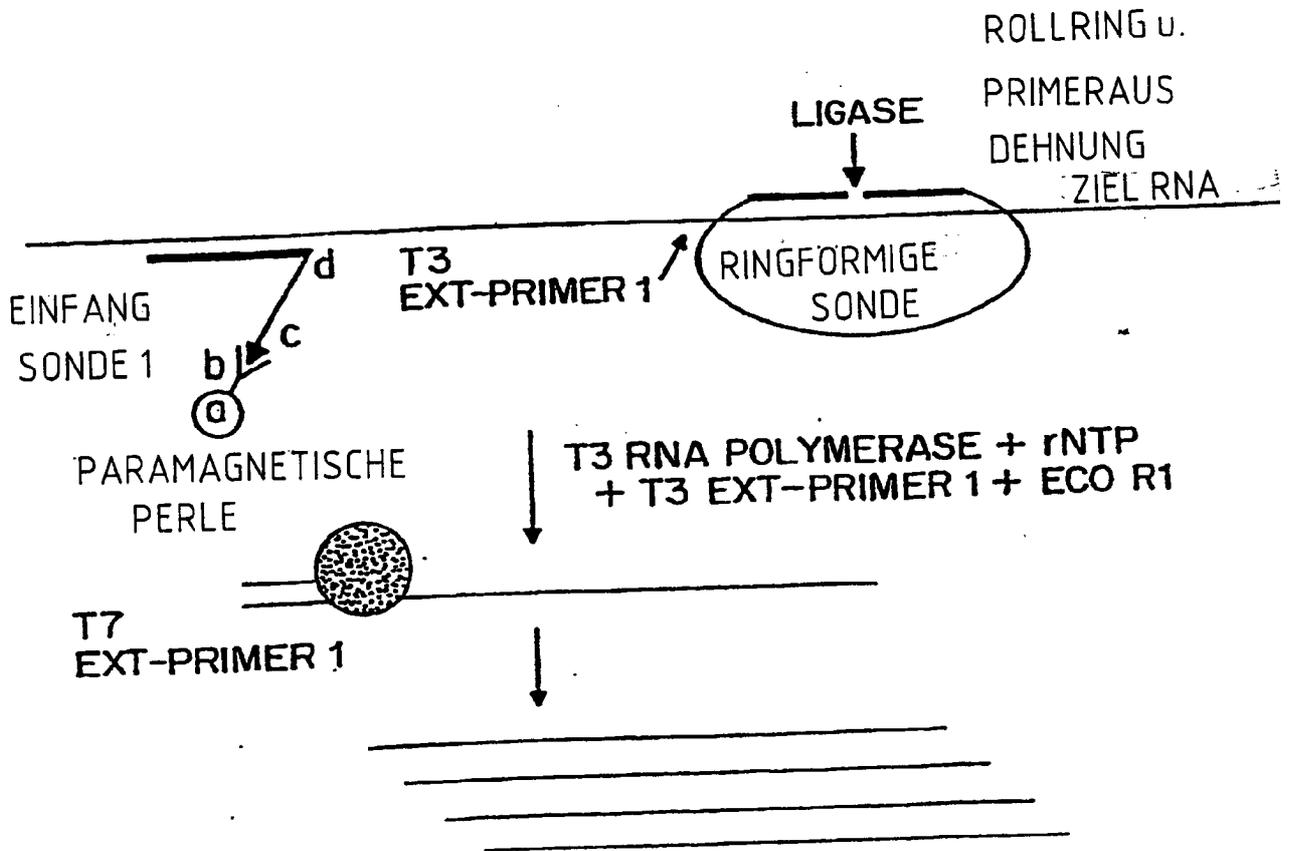


FIG. 17

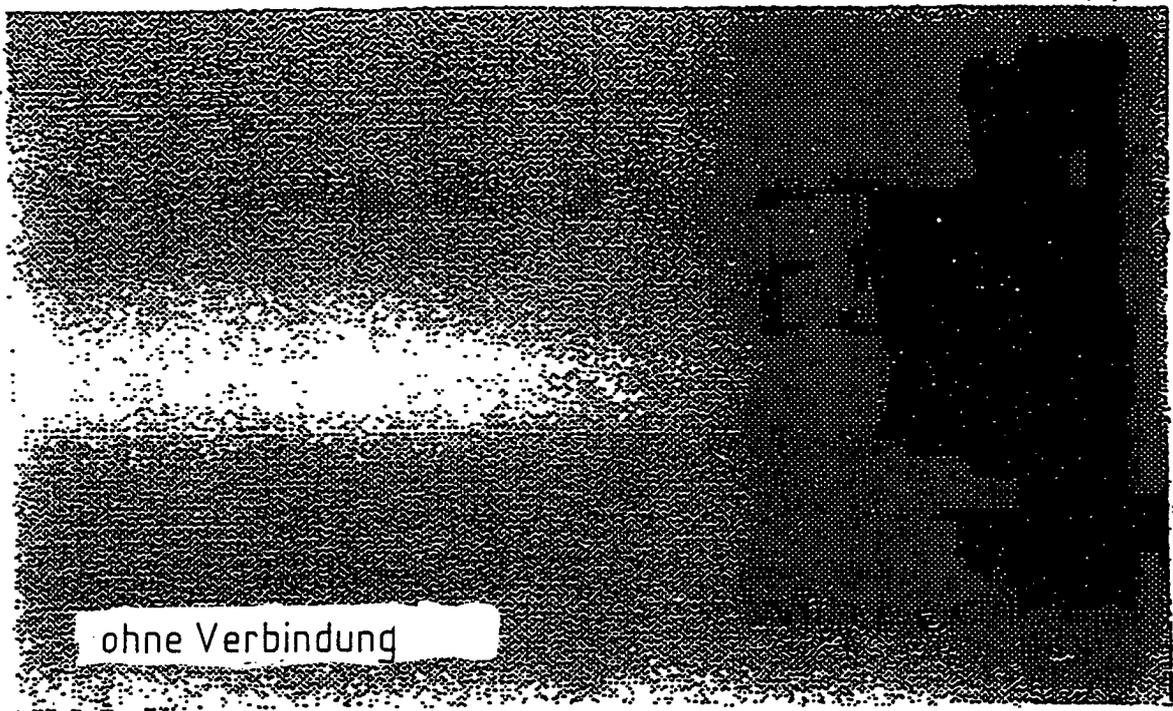


FIG. 5

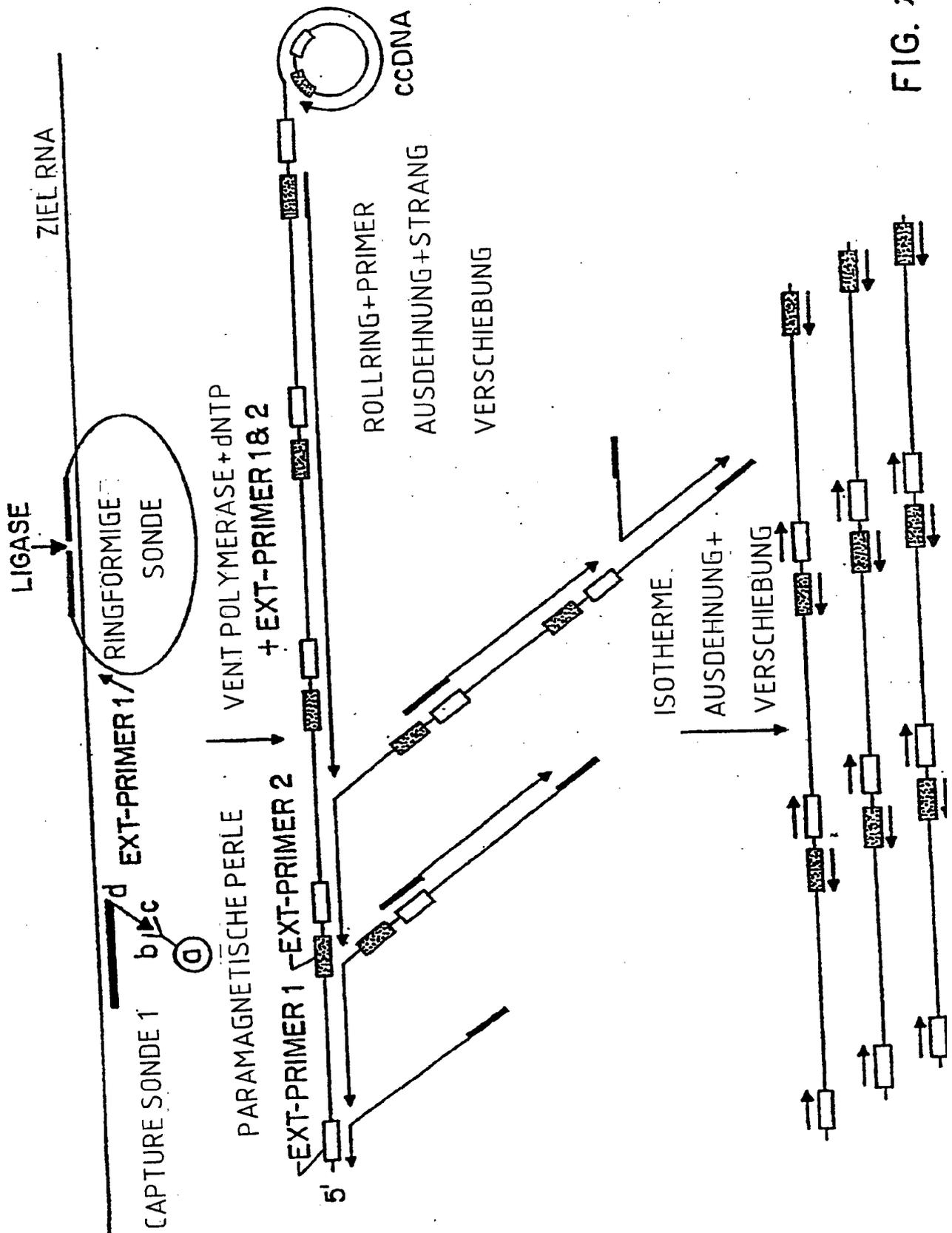


FIG. 1A/6