



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 265 429 A1

4(51) C 12 Q 1/68
G 01 N 33/58

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 Q / 307 420 ?	(22)	30.09.87	(44)	01.03.89
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der Deutschen Demokratischen Republik, Institut für Phytopathologie Aschersleben, Theodor-Roemer-Weg, Aschersleben, 4320, DD
------	---

(72)	Reiss, Ernst, Dr. rer. nat.; Bärwolff, Dieter, Dr. rer. nat.; Leiser, Robert-Mathias, Dr. rer. nat.; Heymann, Stephan, Dr. rer. nat., DD
------	--

(54)	Verfahren zur nichtradioaktiven Markierung von Polynukleotiden
------	--

(55) nicht-radioaktive Markierung, Polynukleotid, Nukleosid, Nukleosidtriphosphat, Formylverbindung, Schutzgruppe, Markergruppe, Hybridisierung, Sonde, Acetal

(57) Es wird ein Verfahren zur nichtradioaktiven Markierung von Polynukleotiden beschrieben. Erfindungsgemäß werden an der Seitenkette halogenierte Nukleoside in die Formylverbindungen oder deren geschützte Derivate überführt, diese durch Phosphorylierung zu den Nukleosidtriphosphaten umgesetzt, die modifizierten Triphosphate enzymatisch in Polynukleotide eingebaut und nachfolgend, gegebenenfalls nach Abspaltung einer Schutzgruppe, mit einer Markergruppe gekoppelt. Die nach diesem Verfahren hergestellten Polynukleotide können in Sondentests zum Nachweis von Polynukleotid-Hybridisierungen verwendet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur nichtradioaktiven Markierung von Polynukleotiden, dadurch gekennzeichnet, daß man an der Seitenkette halogenierte Nukleoside in die Formylverbindungen oder deren geschützte Derivate wie das Hydrogensulfitaddukt, das Cyanhydrin, Thioacetale oder Vollacetale überführt, diese durch Phosphorylierung zu den entsprechenden Nukleotiden und anschließend durch weitere Phosphorylierung zu den Nukleosidtriphosphaten umsetzt, die Triphosphate mit Hilfe von Polymerasen, terminalen Transferasen oder anderen metabolisierenden Enzymen in Polynukleotide einbaut und nachfolgend Markergruppen, gegebenenfalls nach Abspaltung der Schutzgruppen, ankoppelt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d.g., daß man als an der Seitenkette halogenierte Nukleoside 3', 5'-Di-O-acyl-5-dibrommethyl-2'-desoxyuridin oder 2', 3', 5'-Tri-O-acyl-5-dibrommethyluridin verwendet.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, d.g., daß man als geschützte Formylderivate cyclische Vollacetale durch Umsetzung mit Propandiol erhält.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, d.g., daß man cyclische Vollacetale durch Umsetzung mit Glycol oder Brenzkatechin erhält.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, d.g., daß man die Phosphorylierung der geschützten Formylverbindungen zum Nukleotid unter Bedingungen durchführt, die eine saure Abspaltung der Formyl-Schutzgruppen und einen zusätzlichen Schutz der 3'-OH-Gruppe vermeiden.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, d.g., daß man die weitere Phosphorylierung zum Triphosphat unter Bedingungen durchführt, die eine saure Abspaltung der Formyl-Schutzgruppen vermeiden.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymatische Einbau der modifizierten Nukleosidtriphosphate nach Methoden wie z.B. der Nick-Translation, der cDNA-Synthese, der Primerextension, dem gap- oder end-filling unter

Verwendung der entsprechenden Enzyme erfolgt.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, d.g., daß die Markierung des Polynukleotides mit einer Biotinverbindung, Fluoresceinverbindung oder einem anderen Marker mit chromophorer oder fluophorer Gruppe über eine Azomethin-Bindung erfolgt, die gegebenenfalls mit z.B. Natriumborhydrid reduziert wird.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, d.g., daß die Markierung der nach Einbau der modifizierten Nukleosidtriphosphate erhaltenen Polynukleotide mit einem Partner einer immunologischen Reaktion erfolgt.
10. Verfahren nach Anspruch 8, d.g., daß als Partner einer immunologischen Reaktion ein Hapten wie Biotin eingesetzt wird.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, d.g., daß die Bindung des Markers an die modifizierten Strukturelemente im Polynukleosid über einen Spacer erfolgt.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

1. Titel der Erfindung

Verfahren zur nichtradioaktiven Markierung von Polynukleotiden

2. Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur nichtradioaktiven Markierung von Polynukleotiden als molekulare Hybridisierungssonden. Diese finden neben der wissenschaftlichen Anwendung auch in Medizin, Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie zur viralen und bakteriellen Diagnostik zunehmend praktische Nutzung.

3. Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Allgemein im Gebrauch ist die radioaktive Markierung für den Nachweis von Molekularsonden nach deren Hybridisierung mit der gesuchten Polynukleotidsequenz. Dieses Verfahren erfordert aber apparativen Aufwand, es ist teuer, birgt gesundheitliche Risiken und erfordert die Beachtung der relativ kurzen Halbwertzeiten. Dazu sind in der wissenschaftlichen und Patentliteratur zahlreiche Alternativen angeboten worden, die i.a. an einer speziellen Stelle im Polynukleotid und auf einer bestimmten Stufe der Präparation der Sonde eine Markierung mit einer bestimmten Signalsubstanz (Antigen, Hapten, Antikörper, Enzym, Fluorophor, Chemilumineszenzkatalysator u.a.) vornehmen, die entweder direkt oder indirekt nachweisbar ist. Der direkte Nachweis, z.B. über eine Markierung mit einem Fluorophor, erreicht nicht die Empfindlichkeit der indirekten Methoden. Für die indirekte Indikation wird i.a. ein Enzym vorgeschlagen, das durch Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Lichtsignal liefert. Das Enzym kann unmittelbar als Marker an der Sonde gebunden sein. Günstiger für die Nachweisempfindlichkeit aber ist der Aufbau einer serologischen Nachweiskette, ausgehend von dem Partner einer immunologischen Reaktion, der die Sonde markiert, und endend an einem Konjugat, das ein Enzym zur Indikation mittels eines Substrates enthält.

Für die vorliegende Erfindung sind Publikationen relevant,

die eine Markierung an der 5-Position von Pyrimidinbausteinen der Polynukleotidsonden zum Ziel haben. Derartig modifizierte Nukleotidbausteine lassen sich in vivo und in vitro gut in Sonden einbauen, da die chemisch modifizierten Positionen mit den Erkennungsregionen der für den Einbau verantwortlichen Enzyme und mit der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Sonde und Zielsequenz vergleichsweise wenig interferieren. Es gibt zwar auch die Möglichkeit, ein modifiziertes Nukleotid chemisch, z.B. mit einem Syntheseeutomaten, in eine Oligonukleotidsonde einzubauen und dann zu markieren (WO 84/03285, J.L. Ruth), doch der Länge des Oligonukleotides und damit der Stärke der mit ihr angestrebten Hybridisierung sind nach dieser Verfahrensweise Grenzen gesetzt.

Bekannt sind Methoden, die eine chemische Markierung erst an dem unveränderten Polynukleotid vornehmen, wobei vornehmlich Cytosin und Adenin (EP 138357, G.M. Landes), Cytosin (DOS 3431536, H. Graf) oder Guanin (EP 172153, C.W. Adams et al.) chemisch derivatisiert werden. Die dazu verwendeten chemischen Reaktionen lassen erwarten, daß die Intaktheit des Polynukleotides und damit auch dessen Hybridisierung beeinträchtigt werden.

D.C. Ward et al. (EP 63879) beschreiben eine Methode zur Markierung von Nukleotiden an den Basen Thymin, Cytosin und Uracil mit Biotin. Die so markierten Nukleosidtriphosphate werden enzymatisch in die Polynukleotidsonde inkorporiert. Bei der Herstellung der markierten Nukleotide geht man vorzugsweise von UTP oder dUTP aus, an die in C-5 Position über eine metallorganische Zwischenstufe ein Allylamin synthetisiert wird, woran ein aktivierter Biotinylester koppeln kann. Das Syntheseverfahren ist relativ kostspielig und aufwendig. Die enzymatischen Einbauraten der markierten Nukleosidtriphosphate in die Sondensequenz sind nicht sehr hoch bzw. die gewonnenen Polynukleotidketten nicht ausreichend lang. P. Kourilsky et al. (USP 4581333) koppelten über eine Cytochrom C-Brücke z.B. Biotin an das Polynukleotid. In ähnlicher Weise verknüpfte M. Renz (EMBO J. 3 (1983) 817-822) biotinyliertes Histon H1 und das Polynukleotid mit Hilfe von Glutardialdehyd. M. Renz und C. Kurz (Nucleic Acids Res. 12 (1984) 3435-3444) ketteten das

Markerenzym an Polyethylenimin mit Hilfe von p-Benzochinon und die resultierenden Konjugate wurden mit Glutaraldehyd an DNA gebunden. Nach diesen Vorschlägen ergibt sich jeweils ein ungünstig hohes Protein/Polynukleotid-Massenverhältnis, das die Hybridisierung erschwert und damit die Nachweisempfindlichkeit beeinträchtigen kann. Außerdem werden nun die Bedingungen für die Hybridisierung durch die Stabilität der gebundenen Enzyme begrenzt.

D. Engelhardt et al. (EP 97373) beanspruchen die chemische Markierung von Nukleotiden mit einer Signalsubstanz mit dem Ziel, die markierten Nukleotide in ein Polynukleotid einzubauen, sowie den Einbau einer Signalsubstanz über Brückenglieder an nicht modifizierte Polynukleotide. In den Anspruch auf Nukleotide, die mit einer Signalsubstanz markiert sind, werden die Methoden zur Markierung von Nukleotiden nach D.C. Ward (EP 63879) mit aufgenommen. Die Technik, bereits das Nukleotid mit einer Signalsubstanz zu versehen, bringt i.a. aufgrund des Volumenbedarfs von Linker oder Spacer und Signalsubstanz Beeinträchtigungen beim enzymatischen Einbau in ein Polynukleotid mit sich.

Modifizierte Nukleosidtriphosphate, die enzymatisch in ein Polynukleotid inkorporiert werden sollen, müssen neben ihrer späteren Funktion in dem Polynukleotid noch gewisse Voraussetzungen aufweisen, die sie für einen enzymatischen Einbau in das Polynukleotid geeignet machen. So dürfen sie die Erkennungsreaktion der für den Einbau verantwortlichen Enzyme nicht stören und sie sollten gegenüber diesen Enzymen keine andere Reaktivität als die eines Substrates besitzen. Diesem Anspruch werden nur Veränderungen am Nukleotid gerecht, die keine sterischen Hinderungen mit sich bringen, d.h. mit der Modifizierung des Nukleotides sollten möglichst nur kleine Gruppen eingeführt werden. Nukleosidtriphosphate mit raumausfüllenden Gruppen wie Biotin werden in unmittelbarer Nachfolge nur sehr langsam enzymatisch eingebaut. Außerdem darf die Reaktivität dieser neuen Gruppen oder Atome die enzymatische Inkorporation in das Polynukleotid nicht stören bzw. sie muß maskiert (mit Schutzgruppen versehen) vorliegen.

Die Aufgabe der modifizierten Nukleotide im Polynukleotid besteht darin, eine Markierung für das Polynukleotid aufzunehmen. Mit der Markierung erreicht man, daß gesuchte Polynukleotidsequenzen über eine Hybridisierung mit der markierten Polynukleotidsequenz im Falle einer komplementären Basenfolge bestimmbar werden.

4. Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein kostengünstiges und wenig aufwendiges Verfahren zur nichtradioaktiven Markierung von Polynukleotiden zu entwickeln. Die Anwendung der Erfindung für Hybridisierungstests soll den Einsatz radioaktiver Substanzen erübrigen und eine hohe Nachweisempfindlichkeit garantieren.

5. Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Nukleotid so zu modifizieren, daß es sich zum einen leicht enzymatisch in ein Polynukleotid einbauen läßt und zum anderen im Polynukleotid mit verschiedenen Markern zur Umsetzung gebracht werden kann, ohne das andere Bausteine oder Bindungen im Polynukleotid angegriffen werden, um dieses Polynukleotid für einen Nachweis in einer Testprobe zugänglich zu machen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man an der Seitenkette halogenierte Nukleoside in die Formylverbindungen oder in deren geschützte Derivate überführt. Anschließend werden diese zu den entsprechenden Nukleotiden phosphoryliert und durch weitere Phosphorylierung zu den entsprechenden Nukleosidtriphosphaten umgesetzt. Das Triphosphat wird mit Hilfe von Polymerasen oder anderen metabolisierenden Enzymen in Polynukleotide eingebaut und im Anschluß wird eine Markergruppe, ggf. nach Abspaltung der Schutzgruppen eingebaut. Die wichtigsten Verfahrensschritte bei der Herstellung eines markierten Polynukleotides werden durch die Zeichnung verdeutlicht.

Die durch Halogenierung erhaltenen Dihalogenalkyllderivate, vorzugsweise 3',5'-Di-O-acyl-5-dibrommethyl-2'-desoxyuridine, lassen sich mit einer Vielzahl von Verbindungen zu Produkten umsetzen, die erfindungsgemäß noch eine Reaktivität besitzen,

die zum einen nicht so hoch sein darf, daß sie die nachfolgenden Reaktionen einschließlich des enzymatischen Einbaus in ein Polynukleotid stört, zum anderen aber ausreichend ist, zur Bindung eines Markers. So werden die halogenierten Nukleoside nach an sich bekannten Methoden in die entsprechenden Formylverbindungen überführt. Es ist jedoch günstiger, die Formylgruppe zu schützen, z.B. als Acetal, als Hydrogensulfitaddukt, als Cyanhydrin u.a.. Es lassen sich die cyclischen Vollacetale auch direkt aus den Halogenverbindungen durch Umsetzung mit vorzugsweise Propandiol oder Glycol herstellen.

Die derart modifizierten Nukleoside werden unter Beachtung der Stabilität des jeweiligen Nukleosides zum Triphosphat gebracht. So ist es wichtig, bei der Mono- und Triphosphorylierung ein Arbeiten im Sauren zu umgehen.

Der enzymatische Einbau der modifizierten Nukleotide erfolgt nach bekannten Methoden wie der Nick-Translation von DNA unter Verwendung von E. coli DNA-Polymerase, durch Auffüllen zurückgesetzter 3'-Enden, wie sie durch Behandlung mit gewissen Restriktionsenzymen entstehen, durch Verwendung des großen (Klenow)Fragmentes von E.coli Polymerase oder durch die 3'-terminale Addition der modifizierten Nukleotide mit Hilfe der terminalen DNA-Transferase. Das so erhaltene modifizierte Polynukleotid ist der Präkursor für eine breite Vielzahl von markierten Polynukleotiden.

Die Markierung der Polynukleotide erfolgt erfindungsgemäß nach Einbau der modifizierten Nukleotide in Abstimmung mit dem späteren Verwendungszweck der markierten Polynukleotide mit Substanzen, die neben dem Marker selbst eine zur Reaktion mit den modifizierten Orten des Polynukleotides geeignete Gruppe besitzt. Sie erfolgt z.B. mit Biotin, Fluorescein oder einem anderen Marker mit chromophorer oder fluorophorer Gruppe über eine Azomethin-Bindung, die ggf. mit Natriumborhydrid reduziert wird.

In allen Fällen kommt die Reaktion, welche zur Markierung führt, dadurch zustande, daß das Polynukleotid durch den Einbau modifizierter Nukleotide Stellen aufweist, die der Reaktion mit nukleophilen Reagenzien, wie Aminen oder Hydraziden, zugänglich sind, entweder unmittelbar oder erst nach Entfernen der

Schutzgruppe. Dafür ist die 5-Formylgruppe an einer Pyrimidinbase ein Beispiel.

Der Marker ist mit entsprechenden Agenzien qualitativ und quantitativ nachweisbar. Der Marker kann aber auch so beschaffen sein, daß er selbst Signale für einen Nachweis liefern kann. Das trifft zu für chromophore oder fluorophore Gruppen, doch auch für Proteine wie das Ferritin, das im Elektronenmikroskop als elektronendichtes Material erkennbar wird. Gebräuchlicher sind indirekte Nachweise, die von einem Marker ausgehen, welcher mit weiteren Agenzien unter Bildung nachweisbarer Signale reagiert. In diesen Fällen sind die Marker Proteine, die nach Kontakt mit Substraten einen spektroskopischen Nachweis gestatten, oder es sind Partner einer immunologischen oder Rezeptor-Akzeptor Reaktion, die in bekannter Weise bestimmt werden können. Mit einer immunologischen Nachweiskette, wie man sie z.B. von der ELISA-Technik her kennt, kann eine entsprechende Empfindlichkeit des Testes erreicht werden. Solche Markierungen erlauben z.B. den Nachweis ethiologischer Agenzien, die ein Polynukleotid enthalten bzw. deren Aktivität mit dem Auftreten eines Polynukleotides korreliert.

Es ist in vielen Fällen von Vorteil, bei der Aufnahme eines Markers mit den genannten Funktionen in das Polynukleotid auch einen entsprechend dimensionierten Spacer zu berücksichtigen, damit eine gewisse Beweglichkeit und Reaktionsbereitschaft des Markers für die weiteren Nachweisreaktionen gegeben sind. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird diesem Spacer ein gewisser Grad an Hydrophilie mitgegeben, um bei Hybridisierungen unspezifische Wechselwirkungen, z.B. mit dem Träger, zu vermeiden.

Ein bevorzugter Weg dieser Erfindung besteht darin, 3',5'-Di-O-acetylthymine-2'-desoxyribosid zum 3',5'-Di-O-acetyl-5-dibrommethyl-2'-desoxyuridin zu bromieren. Daraus läßt sich hydrolytisch 5-Formyl-2'-desoxyuridin gewinnen, das zwar als Triphosphat auch direkt in ein Polynukleotid inkorporiert werden kann - es ist jedoch günstiger, die Formylgruppe zu schützen, z.B. als Acetal, als Hydrogensulfitaddukt, als Cyanhydrin u.a..

Nach Einbau des geschützten 5-Formyl-2'-desoxyuridintriphosphates läßt sich die Schutzgruppe leicht wieder abspalten, so daß für die Markierungsreaktion eine reaktive Aldehydgruppe zur Verfügung steht. So entsteht aus 3',5'-Di-O-acetyl-5-dibrommethyl-2'-desoxyuridin und 1,3-Propandiol ein cyclisches Vollacetal, das sich phosphorylieren läßt zum 5-(2-(1,3-Dioxanyl)-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat.

Die Vorteile des Verfahrens liegen darin, daß die erfindungsgemäß modifizierten Nukleotide die Erkennungsreaktion der für den Einbau verantwortlichen Enzyme nicht stören und auch gegenüber diesen Enzymen keine andere Reaktivität als die eines Substrates besitzen.

Bei den folgenden Spezifikationen handelt es sich um praktische Beispiele, die die Besonderheiten des vorliegenden Verfahrens illustrieren, aber den Umfang der Erfindung nicht einschränken sollen.

1. Herstellung von 5(2-(1,3-Dioxanyl))-2'-desoxyuridin

1 mMol 3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxythymidin wird in 200 ml Dichloräthan mit 2,2 mMol Brom unter Verwendung einer Lichtquelle bromiert. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels wird der Rückstand in 10 ml absolutem Dioxan aufgenommen und in eine Lösung von 1,1 mMol Propandiol¹³, 2,5 mMol Diisopropyläthylamin und 10 ml absolutem Dioxan bei 20 °C zugetropft. Nach 16 Stunden wird die Lösung einrotiert. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und mit wässriger Bicarbonatlösung extrahiert. Die getrocknete Chloroformlösung wird einrotiert, der Rückstand an Kieselgel 60 chromatographiert (100 g Kieselgel 60 (Merck), 0,06 - 0,2 mm, Essigsäureäthylester mit 0,5 % Triäthylamin als Laufmittel).

Das reine 5(2-(1,3-Dioxanyl))-2'-desoxy-3'5'-O-acetyl-uridin hat einen Schmelzpunkt von 168 - 72 °C und einen Rf-Wert von 0,6 auf DC-Kieselgelplatte (Merck F₂₅₄). Die Entacetylierung wird mit einer 10 %igen Lösung von Triäthylamin in absolutem Methanol bei 20 °C in 24 h oder nach 1 h Rückfluß durchgeführt. Nach dem Einrotieren und Kodestillieren mit Toluol kann der Rückstand für die weitere Phosphorylierung direkt eingesetzt werden.

2. Umsetzung zum 5(2-(1,3-Dioxanyl))-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (DdUTP)

0,5 mMol 5(2-(1,3-Dioxanyl))-2'-desoxyuridin werden zusammen mit 0,6 mMol Cyanäthylphosphat mit 10 ml absolutem Pyridin je 3 mal einrotiert. Zum Rückstand werden 3 mMol Dicyclohexylcarbodiimid und 0,5 mMol Diisopropyläthylamin in 5 ml Pyridin gegeben. Nach ca. 50 h bei 20 ° werden 1,5 ml H₂O zugegeben. 30 Minuten später wird bis zur Trockne im Vakuum einrotiert, dann in 5 ml Wasser aufgenommen, der unlösliche Rest wird mit 2 weiteren kleinen Wasserportionen gewaschen. Die vereinigten Überstände (10 - 15 ml) werden mit ca. 5 ml Triethylamin versetzt, über Nacht geschüttelt, dann einrotiert und schließlich in wenig 0,5 %iger wässriger Triethylamin-Lösung aufgenommen. Die Lösung wird an DEAE-Sephadex A 25 fraktioniert mit Hilfe eines Gradienten (0-0,3 mol) von Triethylammoniumhydrogencarbonat. Nach wiederholtem Abrotieren (mit Ethanol)

der gesammelten mit DC als positiv auf Monophosphat getesteten Fraktionen erhält man das Triethylammoniumsalz des Dioxanyldesoxyuridinmonophosphates. Zur Triphosphorylierung (im wesentlichen nach Hoard u. Ott(1965)) werden 0,4 mMol des 5(2-(1,3-Dioxanyl))-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat-Triethylammoniumsalzes mit 4 ml Dimethylformamid (DMF) und 0,5 mMol Tributylamin versetzt und unter wiederholter Zugabe von DMF mehrmals einrotiert. Schließlich wird in DMF aufgenommen, 2 mMol Carbonyldiimidazol in 4 ml DMF zugegeben und 4 h geschüttelt. Danach werden 3,2 mM Methanol zugegeben. Nach 30 Minuten werden unter starkem Rühren 2 mM Tributylammoniumphosphat in 20 ml DMF zugegeben und die Mischung wird 1 Tag im Exsiccator belassen. Das ausgefallene Imidazoliumpyrophosphat wird mit mehreren DMF-Portionen gewaschen, die vereinigten Überstände werden im Volumenverhältnis 1:1 mit Methanol behandelt und einrotiert. Der Rest wird in 0,5 %iger wäßriger Triethylaminlösung aufgenommen und an DEAE mit einem Gradienten (0-0,5 molar) von Triethylammoniumhydrogencarbonat fraktioniert. Nach Einrotieren der entsprechenden Fraktionen wird noch mehrmals mit Ethanol abrotiert, um das Triethylammoniumhydrogencarbonat zu entfernen. Das erhaltene Triphosphat kann bei -20 °C ohne Abbauerscheinungen gelagert werden. Die UV-Absorption hat bei 265 nm ein Maximum, das sich beim Ansäuern durch Entacetalisierung zum 5-Formyl-dUTP in Richtung 280 nm verschiebt.

3. Herstellung von Biotin-6-amino-n-hexylamid

2 mMol 1,6-Hexamethyldiamin werden in 30 ml H₂O gelöst. Die Lösung wird durch Ansäuern auf einen pH-Wert von 8-9 gebracht, und es werden 0,2 mMol Biotin-N-hydroxysuccinimid als Lösung in 10 ml DMF zugegeben. Man läßt über Nacht bei RT stehen, rotiert dann im Vakuum ein, wäscht mit Ether, nimmt den Rest in wenig Wasser auf und fraktioniert an Kieselgel 60 (5-40 µm, mit Isopropanol/Ammoniak-Lösung (25 %)/ H₂O = 50/10/40, obere Phase), so daß das Produkt frei von Hexamethyldiamin isoliert werden kann. Die Fraktionierung wird vorteilhafterweise unter Anwendung von Überdruck durchgeführt (Flash-Chromatographie, HPLC).

4. Einbau von BdUTP in eine DNA-Hybridisierungssonde mittels DNA-Polymerasen

Zwecks Biotinylierung einer Hybridisierungsprobe wurde ein rekombinantes Plasmid der pUC-Reihe mit einer für spätere Hybridisierungs-

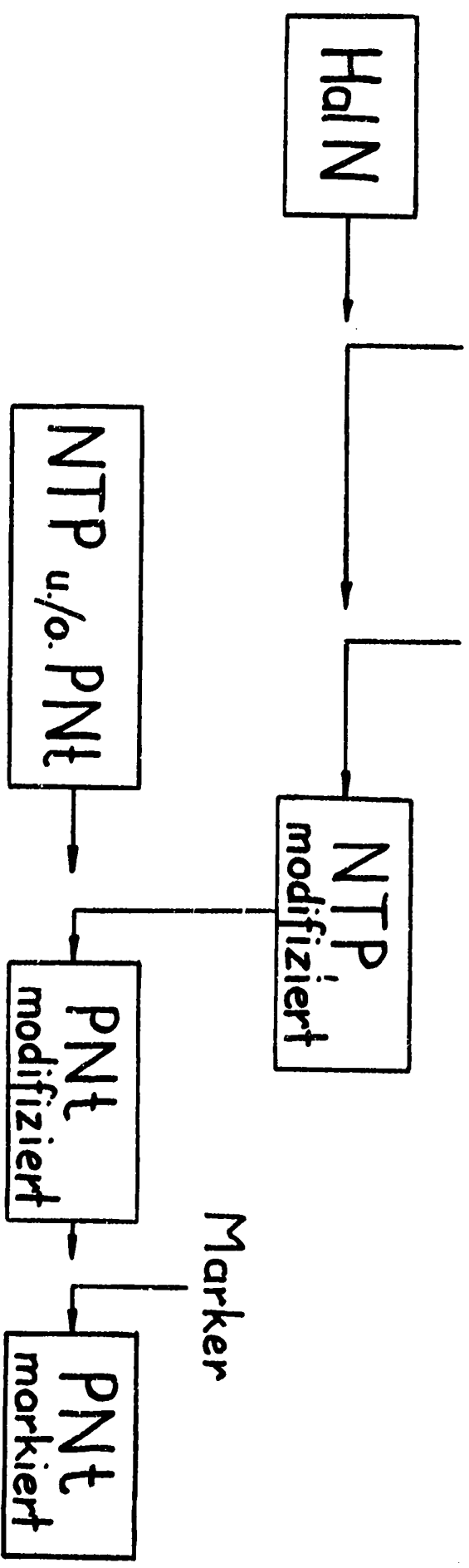
versuche geeigneten Sequenzinsertion verwendet. Der Einbau des DdUTP erfolgte mittels Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I in einem Reaktionsansatz von 20 μ l, bestehend aus 0,5 μ g denaturierter Plasmid-DNA, 10 ng M13-mp8-Sequenzierungsprimer oder alternativ 500 μ g Oligonukleotidprimer mit randomisierter Sequenz, 3 μ g bovinem Serumalbumin, je 40 μ M dATP, dGTP und dCTP, 60 μ M DdUTP, 3 μ M dTTP, 75 mM Hepes-NaOH pH 7,55, 5 mM $MgCl_2$, 3,75 mM 2-Merkaptoethanol und 2,5 Einheiten Enzym. Nach einer einstündigen Reaktion wurde durch EDTA-Zugabe auf 5 mM abgestoppt, 15 n Mol Biotinhydrazid zugegeben und durch Essigsäurezusatz der pH auf 4 bis 4,5 gebracht. Nach einer Reaktionszeit von 14 bis 16 h wurde mit Ammoniumcarbonat neutralisiert und über eine 5 ml-G 50-Säule fraktioniert. Die mit dem Ausschlußvolumen gesammelte hochmolekulare DNA wurde in Hybridisierungsversuchen nach bekannten Verfahren eingesetzt. Die gebundene biotinylierte Sonden-DNA wurde nach mehreren Waschschritten in 0,01 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 0,1 % Tween 20 bzw. 0,25 % Magermilchpulver und kurzzeitigem Backen bei 80 °C für 30 min mit 20 μ g/ml Streptavidin in gleichem Puffer zur Reaktion gebracht. Nach 3-fachem Waschen in Tris-HCl pH 7,5 erfolgte eine 30-minütige Inkubation in einer Lösung von biotinyliertem Protein A einer zuvor als geeignet bestimmten Verdünnung. Nach weiteren Waschungen und nochmaliger Inkubation mit Streptavidin, gefolgt von nochmaligen Waschschritten wurden die Flächenträger in einer geeigneten Verdünnung biotinylierter alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm inkubiert. Der Nachweis gekoppelter alkalischer Phosphatase erfolgte nach weiteren Waschungen unter Einsatz von Brom-chlor-indoxylphosphat und Nitroblau-Tetrazoliumsalz entsprechend allgemein üblicher Vorschriften.

5. Einbau von DdUTP in eine DNA-Hybridisierungssonde mittels terminaler Desoxynucleotidyltransferase

Zwecks Biotinylierung einer Hybridisierungsprobe wurde das im Ausführungsbeispiel 4 genannte rekombinante Plasmid mittels geeigneter Restriktionsendonukleasen, die 3'-überhängende Enden kreieren, geschnitten (in diesem Beispiel mit 5 Einheiten Pst I je μ g Plasmid-DNA). Nach üblichen Deproteinisierungs-, Reinigungs- und Konzentrierungsschritten wurde die linearisierte Plasmid-DNA (1 μ g) in

einem Reaktionsvolumen von 20 µl unter Einsatz terminaler Desoxynucleotidyltransferase mit DdU geschwänzt. Die Reaktion verlief für 30 min bei 37 °C in 40 mM Cacodylatpuffer, pH 6,8 mit 10 mM $MgCl_2$, 0,1 mM $ZnSO_4$, 0,1 mM DdUTP und 4 Einheiten Enzym. Nach Abstoppen der Reaktion wurde das DdU umgesetzt mit Biotin-6-amino-hexylamid, in der Hybridisierung eingesetzt und zur Detektion geführt wie in Ausführungsbeispiel 4 beschrieben.

modifizierender Phosphorylierungs-
Reaktant mittel



HalN = Nukleosid, halogeniert an
einer Alkylseitenkette
NTP = Nukleosidtriphosphat
PNT = Polynukleotid