

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Oktober 2006 (19.10.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/108205 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
Nicht klassifiziert

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT2006/000148

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. April 2006 (13.04.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 640/2005 15. April 2005 (15.04.2005) AT

FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: SCHLEDERER, Thomas [AT/AT]; Dragonerweg 21, A-1220 Wien (AT).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

(74) Anwalt: SONN & PARTNER PATENTANWÄLTE;
Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,

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

(54) Title: METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACID FRAGMENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DETEKTION VON NUKLEINSÄUREFRAGMENTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting a nucleic acid amplification of at least one nucleic acid fragment using an internal control. The detection of the amplified fragment takes place in a wave length.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion einer Nukleinsäureamplifikation mindestens eines Nukleinsäurefragments unter Verwendung einer internen Kontrolle, wobei die Detektion des amplifizierten Fragments bei einer Wellenlänge erfolgt.



WO 2006/108205 A2

Verfahren zur Detektion von Nukleinsäurefragmenten

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur internen Kontrolle von Nukleinsäureamplifikationen.

Die interne Kontrolle einer Nukleinsäureamplifikation, insbesondere einer Polymerasekettenreaktion (PCR) beziehungsweise Echtzeit-PCR, stellt eine störungsfreie PCR-Amplifikation sicher. Interne Kontrollen werden zum Aufzeigen etwaiger PCR-Inhibitionen eingesetzt, dienen dazu den erfolgreichen Ablauf der Amplifikation aufzuzeigen und falsch negative Ergebnisse z.B. aufgrund von Inhibitoren zu vermeiden. Derartige Inhibitoren können einerseits durch mangelhafte Aufreinigung der Probe, zum Beispiel Restbestand Ethanol, Proteinrestpartikel, andererseits durch mangelhafte Handhabung, z.B. Handschuhpuder oder Baum-Pollen, in das Reaktionsgefäß gelangen.

In der Echtzeit-PCR beispielsweise wird sowohl das Amplifikationsprodukt als auch die interne Kontrolle bei zumindest zwei verschiedenen Wellenlängen detektiert. Für Gentypisierung wird dabei z.B. eine TaqMan Sonde 5'-FAM-N_x-TAMRA-3' und eine Kontrollsonde 5'-TET-N_x-TAMRA-3' markiert. Zusätzlich dient oft auch noch zum rechnerischen Ausgleich von Volumsschwankungen ein passiver Farbstoff, wie z.B. der Farbstoff ROX. Daraus ist ersichtlich, dass sehr schnell viele Mess-Wellenlängen eines Real-Time Cyclers genutzt werden. Zudem sind viele Real-Time Cycler am Markt, die überhaupt nur bei einer Detektions-Wellenlänge messen, zumeist bei FAM/SybrGreen I (530 nm). Um die amplifizierten Nukleinsäurefragmente, die mit SybrGreen I detektiert werden, näher zu charakterisieren, wird eine Schmelzkurve des Reaktionsansatzes aufgenommen (siehe z.B. Siraj AK, Clinical Cancer Research 8:3832-3840 (2002)). Die Analyse der Schmelzkurve nach der PCR stellt dabei eigentlich keine Real-Time Analyse dar, sondern ist eine Post-PCR-Methode, wie eine Agarose-Gel- oder Hybridisierungsanalyse, da es zur Überlagerung der einzelnen Produktbildungen während der Amplifikation kommt.

Am Markt ist eine Vielzahl von Analysegeräten für qualitative und quantitative PCR erhältlich, von denen die wichtigsten die ABI Prism 7000er Serie, der Light Cycler von Roche, der iCycler von BioRad und der Corbett Rotor-Gene sind. Die Instrumente können die Fluoreszenzintensität je nach Ausstattung entweder nur bei einer Wellenlänge messen, dies ist meist der FAM/Sybr-

Green-Kanal (530nm), oder auch in sechs Kanälen quantifizieren. Diese Geräte erlauben somit die Messung mehrerer mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierter Nukleinsäuren (z.B. Amplifikationsprodukten von zu analysierenden Proben und internen Kontrollen). Um die hohen Anschaffungskosten solcher Geräte und um die hohen Kosten der Reagentien, die bei einem Verfahren, welches auf einem derartigen Gerät durchgeführt wird (verschiedene Fluorophore), zu reduzieren, wäre ein alternatives und kostengünstigeres Verfahren wünschenswert, welches erlaubt eine Probe gemeinsam mit einer internen Kontrolle mit Hilfe einer Nukleinsäureamplifikationstechnik zu analysieren, bei der nur ein Fluorophor eingesetzt wird. Dadurch wäre es möglich Geräte einzusetzen, die in der Lage sind nur bei einer Emissionswellenlänge zu messen.

In Rosenstrauss et al. (J Clin Microbiol. 36(1) (1998): 191-7) wird die Verwendung von internen Kontrollen bei PCR-Verfahren geoffenbart. Dabei werden die amplifizierten Nukleinsäuremoleküle der internen Kontrolle mittels Target-spezifischen Oligonukleotiden an magnetische Mikropartikel gebunden und mittels „avidin-horseradish peroxidase“ detektiert, wobei das Target und die interne Kontrolle in zwei getrennten Isolier- und Detektionsschritten, d.h. mit einer Target- und einer internen Kontroll-spezifischen an den Partikeln gebundenen Oligonukleotiden, bestimmt wurden. Somit werden im Zuge dieses Verfahrens, die amplifizierten Produkte nach Abschluss der Amplifikationsreaktion markiert und detektiert.

Die Publikation von Garcia de Viedma D. et al. (J Clin Microbiol 37(3) (1999):724-8) betrifft ein Verfahren zur Detektion von JC-Polyomavirus (JCV), bei dem eine nicht-kompetitive bzw. eine kompetitive interne Kontrolle eingesetzt werden kann. Die nicht-kompetitive interne Kontrolle, die ein β -Laktamase-Konstrukt aus E.coli darstellt, wird zur Detektionsreaktion von JCV in einer Probe ko-amplifiziert. Das Amplifikationsprodukt der internen Kontrolle wird nicht während der Amplifikation selbst unter Aufnahme einer Amplifikationskurve sondern in einer Endpunkt-Detektion detektiert.

In Englund S. et al. (Vet Microbiol. 81(3) (2001): 257-71) wird die Detektion von Mycobakterium avium subspec. paratuberculosis in einer Gewebeprobe mittels einer nested PCR beschrieben, wobei die Insertionssequenz IS900 von Mycobakterium paratubercu-

losis amplifiziert wird.

Kehle J. et al. (45. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft 28. September bis 1. Oktober 2004) beschreiben ein Verfahren zum automatischen Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* in Tankmilch.

Somit ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine interne Kontrolle zur Verwendung in Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäurefragmenten zur Verfügung zu stellen, die es ermöglicht einfach und schnell die Amplifikation eines Nukleinsäurefragments aus einer Probe festzustellen.

Ferner ist es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit welchem es ermöglicht wird Inhibitionseffekte im Zuge einer Nukleinsäureamplifikation zu detektieren.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Detektion und/oder quantitativen Bestimmung mindestens eines Nukleinsäurefragments einer Nukleinsäureamplifikation umfassend die Schritte:

a) Bereitstellen einer Probe gegebenenfalls umfassend mindestens eine erste Nukleinsäure,

b) Inkontaktbringen der Probe mit einer bestimmten Menge eines ersten für die erste Nukleinsäure spezifischen Primerpaars,

c) Zugabe einer bestimmten Menge mindestens einer zweiten Nukleinsäure als interne Kontrolle und mindestens eines zweiten für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaars zur Probe,

d) Amplifizieren des Gemisches aus c) über eine Anzahl von Nukleinsäureamplifikations-Zyklen, bei der mindestens ein amplifiziertes Nukleinsäurefragment der mindestens einen ersten und/oder der mindestens einen zweiten Nukleinsäure mit einem oder mehreren fluoreszierenden Farbstoffen markiert wird,

e) Aufnehmen einer Amplifikationskurve durch Messen der Fluoreszenzintensitäten der Nukleinsäureamplifikations-Zyklen bei einer Wellenlänge und Korrelieren der Fluoreszenzintensitäten gegen die Anzahl der Nukleinsäureamplifikations-Zyklen

f) Bestimmen eines Schwellenwertzyklus und/oder eines Fluoreszenzmaximalwertes der Amplifikationskurve und/oder einer Effizienz der Amplifikation,

g) Vergleichen des Schwellenwertzyklus und/oder des Fluoreszenzmaximalwertes und/oder der Effizienz aus f) mit dem

Schwellenwertzyklus und/oder dem Fluoreszenzmaximalwert und/oder der Effizienz einer Amplifikation mit der bestimmten Menge des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar, wobei die Nukleinsäureamplifikation des mindestens einen Nukleinsäurefragments der ersten Nukleinsäure der Probe detektiert wird, wenn der Schwellenwertzyklus der Amplifikation des Gemisches aus c) mindestens 10% über oder unter dem Schwellenwertzyklus der Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar ist und/oder der Fluoreszenzmaximalwert der Amplifikation des Gemisches aus c) mindestens 10% über dem Fluoreszenzmaximalwert der Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar ist und/oder die Effizienz der Amplifikation des Gemisches aus c) mindestens 0,1 Punkte über der Effizienz der Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann für jegliche Art von Probe verwendet werden, sofern in dieser Probe eine Nukleinsäure vorhanden ist, die mit Hilfe eines spezifischen Primerpaares amplifiziert werden kann. Selbstverständlich können auch unbekannte Proben analysiert werden, um festzustellen, ob eine bestimmte Nukleinsäure in dieser Probe vorhanden ist. Ferner eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren nicht nur zur Detektion eines Nukleinsäurefragments sondern auch zur quantitativen Bestimmung dieses Fragments beispielsweise anhand des Schwellenwertzyklus.

Zur Probe, welche gegebenenfalls eine erste Nukleinsäure umfasst (bei unbekannten Proben ist die Abwesenheit einer derartigen Nukleinsäure nicht ausgeschlossen), wird im Zuge des Verfahrens mindestens eine zweite Nukleinsäure und für diese zweite Nukleinsäure spezifische Primer dazugegeben. Diese zweite Nukleinsäure dient als interne Kontrolle, um festzustellen, ob die Nukleinsäureamplifikation unter den gegebenen Reaktionsbedingungen an und für sich funktioniert, womit falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden können, wenn die Amplifikation eines Fragments der internen Kontrolle festgestellt werden kann. Um die amplifizierten Nukleinsäurefragmente z.B. mit Hilfe eines Fluorometers zu detektieren, werden die Fragmente im Zuge der Amplifikation mit einem Fluorophor markiert. Die gemessene Fluor-

reszenz nimmt dabei idealerweise im selben Ausmass zu wie die Menge an Amplifikationsprodukt in der Reaktionsmischung. Die dadurch erhaltenen Fluoreszenzwerte können gegen die Anzahl der Amplifikationszyklen korreliert werden, wodurch sich eine Amplifikationskurve ergibt. Mit Hilfe einer Amplifikationskurve kann der Schwellenwertzyklus, der Fluoreszenzmaximalwert und die Effizienz der Nukleinsäureamplifikation nach dem Fachmann bekannten Verfahren bestimmt werden. Diese Parameter können zur Charakterisierung der Amplifikation und zur Bestimmung der Menge an vorhandener erster Nukleinsäure in der Probe herangezogen werden. Durch Vergleich der Amplifikationskurve und den daraus ermittelten Parametern einer Amplifikation einer ersten (aus der Probe stammenden) und einer zweiten (interne Kontrolle) Nukleinsäure mit einer Amplifikationskurve einer Amplifikation der zweiten Nukleinsäure kann die Amplifikation der ersten Nukleinsäure festgestellt werden, sofern beide Amplifikationsreaktionen unter denselben Bedingungen durchgeführt wurden. Denn wenn der Schwellenwert der Amplifikation der ersten und der zweiten Nukleinsäure mindestens 10%, vorzugsweise mindestens 20%, insbesondere mindestens 30%, über oder unter dem Schwellenwert der Amplifikation der internen Kontrolle und/oder wenn der Fluoreszenzmaximalwert der Amplifikation der ersten und der zweiten Nukleinsäure mindestens 10%, vorzugsweise mindestens 20%, insbesondere mindestens 30%, über dem Fluoreszenzmaximalwert der Amplifikation der internen Kontrolle und/oder wenn die Effizienz der Amplifikation der ersten und der zweiten Nukleinsäure mindestens 0,1 Punkte, vorzugsweise mindestens 0,2 Punkte, insbesondere mindestens 0,3 Punkte, über der Effizienz der Amplifikation der internen Kontrolle liegt, dann wurde mindestens ein zweites Nukleinsäurefragment während der Reaktion amplifiziert. Die Menge der internen Kontrolle und der entsprechenden Primer wird in der Regel so gewählt, dass sich der Schwellenwert, der Fluoreszenzmaximalwert und/oder die Effizienz der Amplifikation der internen Kontrolle signifikant von den Werten einer Amplifikation der ersten Nukleinsäure unterscheidet. Hierzu wird die Primerkonzentration einer PCR, welche imstande ist sehr kleine Kopienzahlen an Targetsequenzen zu amplifizieren, auf die Hälfte und ein Viertel der optimalen Konzentration verdünnt und jeweils der Schwellenwert bestimmt. Als optimale Primerkonzentration kann jene Menge angesehen werden,

bei der die Amplifizierung von weniger als 5 Kopien möglich ist, und der Schwellenwertzyklus bei dieser Kopienanzahl mindestens 5 Zyklen vor dem Erscheinen von Primerdimeren oder anderen Nebenprodukten liegt. Die Reduktion der Primerkonzentration führt zu dramatischer Effizienzreduktion. Danach wird die Konzentration der zweiten Nukleinsäure insofern reduziert, um den gewünschten Schwellwert zu erreichen. Erfindungsgemäß hat sich gezeigt, dass sich die Amplifikationskurve einer internen Kontrolle und somit auch die daraus ableitbaren Parameter durch die Amplifikation einer weiteren Nukleinsäure derart ändert, dass bereits eine geringe Abweichung derselben auf die Amplifikation eines weiteren Nukleinsäurefragments schließen lässt. Die Amplifikationskurve der internen Kontrolle kann durch die alleinige Amplifikation derselben bestimmt werden.

„Bereitstellen einer Probe“ bezieht sich erfindungsgemäß auf alle Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, Proben, die eine zu bestimmende Nukleinsäure oder ein zu bestimmendes Nukleinsäurefragment umfassen oder potentiell umfassen, zu isolieren und gegebenenfalls aufzubereiten. Verfahren zur Isolierung sind beispielsweise DNA-Extraktion aus einer Probe, Anreicherung von zu bestimmenden Mikroorganismen aus einer Probe und dergleichen. Selbstverständlich können die Proben direkt in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden (z.B. Sambrook, J., and Russell, D.W., (2001) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, New York).

Gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein für eine Nukleinsäure „spezifisches Primerpaar“ ein Primerpaar (umfassend zumindest einen Vorwärtsprimer und zumindest einen Rückwärtsprimer), welches an dem genannten Nukleinsäuremolekül unter Nukleinsäureamplifikationsbedingungen (z.B. PCR-Bedingungen) „spezifisch“ zu binden vermag und damit die Größe des zu amplifizierenden Nukleinsäurefragments definiert. Eine spezifische Bindung kann zustande kommen, wenn die Primer des Primerpaars mit der Nukleinsäure eine Identität (d.h. Übereinstimmung der Nukleinsäure-Sequenz des Vorwärtsprimers und der revers-komplementären Nukleinsäure-Sequenz des Rückwärtsprimers mit der zu amplifizierenden Nukleinsäure bei Überlagerung der Nukleinsäure mit den Primern, wobei einzelne Nukleotide der Primer (z.B. 20%) durch Universalbasen, wie z.B. Inosin, ersetzt werden können) von zumindest 70%, vorzugsweise von zumindest 80%, insbesondere

von zumindest 90%, aufweist.

Der „Fluoreszenzmaximalwert“ ist erfindungsgemäß der höchste über dem Schwellenwert liegende Fluoreszenzwert, der im Zuge einer Nukleinsäureamplifikation bei einer Wellenlänge gemessen wird. Da sich im Zuge einer Amplifikationsreaktion nach der exponentiellen Phase in der Regel ein Plateau bildet, kann auch ein Mittelwert der Fluoreszenzwerte in diesem Plateau als Fluoreszenzmaximalwert definiert werden. Unter „monochrom“ bzw. „bei einer Wellenlänge“ messen wird erfindungsgemäß das Werteset, welches von einem Gerät unabhängig von der Art der Anregung in einem Kanal ausgegeben wird definiert. Z.B. hat der Light Cycler von Roche (ähnlich dem Idaho Cycler) eine einzige Anregungs-LED bei einer Wellenlänge und drei Messkanäle bei drei verschiedenen Wellenlängen, die als FAM, LC640 und LC705 bezeichnet werden. Unter „monochrom messen“ wird somit die Auswertung der Daten eines einzigen Kanals (d.h. einer einzigen Wellenlänge), zum Beispiel FAM unter Einbezug möglicher Korrekturtabellen, welche die Messung in dem jeweiligen Kanal verbessern, verstanden.

Der „Schwellenwertzyklus“ (C_T , „threshold cycle“) drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird und kann zur Quantifizierung einer Nukleinsäureamplifikation verwendet werden. Am Anfang einer Amplifikationsreaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Fluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten Amplifikations-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an Nukleinsäureamplifikationsprodukt, sondern auf der Kinetik der Amplifikationsreaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den C_T -Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der Amplifikationsreaktion keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität der Polymerase oder Inhibition der Reaktion durch das Auftreten bestimmter Produkte, gibt. Parallel dazu können in jedem Amplifikations-Lauf bekannte Templatemengen amplifiziert werden, sodass man vergleichen kann, welche Templatemenge man bei welchem C_T -Wert erhält. Daraus lässt sich eine Standardamplifikationskurve erstellen, anhand derer

man aus einem bestimmten C_T -Wert auf eine Nukleinsäurekonzentration in der Probe schließen kann.

Es ist in Fachkreisen hinreichend bekannt, dass das Purin-Pyrimidin-Verhältnis der einzelnen Basen der Primer, der Grad der Homologie bzw. Identität der Primer zur Zielsequenz, die Annealingtemperatur, die Länge der Primer und des zu amplifizierenden Nukleinsäurefragments wichtige Determinanten der Funktionalität einer Nukleinsäureamplifikation sind. All diese Faktoren haben Einfluss auf die „Effizienz“ einer Nukleinsäureamplifikation, welche als Maß für eine optimale Nukleinsäureamplifikation herangezogen werden kann. Die Effizienz (E) kann zwischen 1,00, d.h. keine weitere Amplifikation neuer Nukleinsäureamplifikationsprodukte, und 2,00 liegen, was einer Verdoppelung der Nukleinsäureamplifikationsprodukte bedeutet. Es lässt sich z.B. in einer real-time PCR bestimmen, wobei diese Effizienz mit unterschiedlichen Methoden ermittelt werden kann (siehe u.a. Pfaffl, MW (2004) BIOSpektrum 1/04:92-95; Ramakers, C. et al. (2003) Neurosci. Lett. 339: 62-66, Liu, W., and Saint, D.A. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 294: 347-353). Dabei wird häufig eine Standardamplifikationskurve erstellt, für welche eine Verdünnungsreihe (z.B. 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, etc.) der eingesetzten zu amplifizierenden Nukleinsäure-Menge analysiert wird, um somit die Amplifikationsrate bei unterschiedlichen Nukleinsäure-Konzentrationen zu vergleichen. Die Effizienz E der Reaktion lässt sich dann aus der Steigung der Amplifikationskurve („slope“) nach $E=10^{-1/\text{slope}}$ berechnen. Eine optimale Effizienz ergibt sich, wenn die Anzahl der Nukleinsäureamplifikationsprodukte in jedem Zyklus verdoppelt wird. Tatsächlich beträgt die Effizienz einer Nukleinsäureamplifikation in der exponentiellen Phase unter optimierten Reaktionsbedingungen im Bereich von 1,7 bis 1,9, wobei es dennoch zu Schwankungen im Bereich von ca. 1,5 bis 2,0 und darüber kommen kann.

Die Effizienz wie auch der Schwellenwertzyklus einer Nukleinsäureamplifikation sind durch die Änderung bestimmter Parameter, wie z.B. Primerkonzentration, DNA-Menge, Primerlänge, Änderung einer oder mehrerer Basen am 3'-Ende eines Primers (ohne die Spezifität des Primers zu verlieren), Länge des Amplifizierungsprodukts, Zwei-Stufen PCR mit Primer für isotherme PCR, steuerbar (siehe z.B. Kubista M et al. (2001) Genomics and Proteomics Technologies. Proceedings of SPIE, Vol. 4264, pp. 53-

58).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird als "Markieren" jener Vorgang bezeichnet, bei dem eine Nukleinsäure, die beispielsweise durch eine Nukleinsäureamplifikation hergestellt wurde, direkt (z.B. mit einem interkalierenden Farbstoff wie Sybr Green) oder indirekt (z.B. über eine Nukleinsäuresonde, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt ist) mit einem Farbstoff, vorzugsweise einem Fluoreszenzfarbstoff, versehen wird. "Labeln" bezieht sich hingegen erfindungsgemäß auf den Vorgang der Bindung eines Farbstoffs, vorzugsweise eines Fluoreszenzfarbstoffs, an eine Sonde, insbesondere an eine Nukleinsäuresonde, die spezifisch an eine weitere Nukleinsäure bindet, um diese schließlich "indirekt" zu "markieren". Die mit dem Farbstoff versehene Sonde wird als "Label" bezeichnet. Daher werden gemäß der vorliegenden Erfindung unter "Markieren" all jene Vorgänge bezeichnet, bei denen eine (amplifizierte) Nukleinsäure mit einem Farbstoff bzw. mit einem (spezifischen) "Label" versehen wird.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion einer Inhibition einer Nukleinsäureamplifikation mindestens eines Nukleinsäurefragments umfassend die Schritte a) bis g) wie oben angeführt, wobei die Inhibition der Nukleinsäureamplifikation detektiert wird, wenn der Fluoreszenzmaximalwert der Amplifikation des Gemisches aus c) mindestens 10% unter dem Fluoreszenzmaximalwert einer Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar ist und/oder die Effizienz der Amplifikation des Gemisches aus c) mindestens 0,1 Punkte unter der Effizienz einer Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar ist.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es weiters möglich die Inhibition einer Nukleinsäureamplifikationsreaktion durch die Zugabe einer internen Kontrolle zu bestimmen. Dabei kann die Amplifikationskurve aus Schritt e) im Wesentlichen (bezüglich Effizienz, Schwellenwertzyklus und/oder Fluoreszenzmaximalwert) mit der Amplifikationskurve der zweiten Nukleinsäure übereinstimmen, wodurch keine Amplifikation des Nukleinsäurefragments der ersten Nukleinsäure detektiert wird, was darauf hindeuten könnte, dass in der Probe keine erste Nukleinsäure und in der Probe und im Reaktionsgemisch c) keine Inhibitoren vor-

handen sind. Ferner kann die Amplifikationskurve aus Schritt e) im Wesentlichen mit der Amplifikationskurve der ersten Nukleinsäure übereinstimmen, wodurch ebenfalls keine Inhibitoren im Reaktionsgefäß vorhanden sein können. Sollte es nicht möglich sein eine Amplifikationskurve aufzunehmen wird die Reaktion im Wesentlichen zu 100% inhibiert, wobei jedoch anhand der Amplifikationskurve (z.B. reduzierter Fluoreszenzmaximalwert, verschobener Schwellenwertzyklus, reduzierte Effizienz im Vergleich zu einer nicht-inhibierten Amplifikationskurve) auch beispielsweise eine 50%ige Inhibition festgestellt werden kann.

Vorzugsweise wird zumindest eine Schmelztemperatur des mindestens einen Nukleinsäurefragments durch das Aufnehmen einer Schmelzkurve nach der Nukleinsäureamplifikation bestimmt.

Um die bei der Amplifikation amplifizierte Nukleinsäurefragmente näher zu charakterisieren, kann das Reaktionsgemisch nach der Amplifikation einer Schmelzkurven-Analyse unterzogen werden. Bei diesem Verfahrensschritt wird, sofern die Fluoreszenzmarkierung durch die Erhöhung der Temperatur über den Schmelzpunkt der doppelsträngigen DNA-Fragmente reversibel ist (z.B. bei der Verwendung von DNA-interkalierenden Substanzen), die Änderung der Fluoreszenz gegen die Temperatur korreliert. Somit wird es am Ende der Amplifikationsreaktion ermöglicht die amplifizierte Nukleinsäurefragmente durch Vergleich mit bekannten Schmelzkurven (jene des amplifizierten Nukleinsäurefragments der ersten Nukleinsäure mit jenem amplifizierten Nukleinsäurefragment der zweiten Nukleinsäure) zu identifizieren und beispielsweise feststellen, ob beide Reaktionen vonstatten gegangen sind um Primer-Dimere oder andere unspezifische Produkte zu unterscheiden. Die amplifizierte Nukleinsäurefragmente weisen vorzugsweise eine Schmelztemperatur auf, die sich im Wesentlichen um mindestens 1°C, vorzugsweise um mindestens 2°C, noch bevorzugter um mindestens 4°C, insbesondere um mindestens 6°C, unterscheiden.

Die Nukleinsäure ist vorzugsweise DNA und/oder RNA, insbesondere mRNA. Erfindungsgemäß können alle bekannten Arten von Nukleinsäuren eingesetzt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäureamplifikationstechnik eine Polymerasekettenreaktionstechnik (PCR-Technik), wobei diese ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Echtzeit PCR, verschachtelter PCR („nested PCR“), inverser

PCR, reverser Transkriptase PCR (RT-PCR), asymmetrischer PCR und Kombinationen davon, ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in einer Vielzahl von Polymeraskettenreaktionstechniken eingesetzt werden. Voraussetzung ist jedoch, dass eine Fluoreszenz im Wesentlichen bei jedem Zyklus gemessen und daraus eine Amplifikationskurve abgeleitet werden kann. Insbesondere Echtzeit Polymerasekettenreaktion ("Real Time Polymerase Chain Reaction", real time PCR) eignet sich besonders gut, da die qualitative und quantitative Analyse sehr schnell und ohne Gel-Analysen und Hybridisierungstests zum Nachweis der Produkte vonstatten geht. Ferner kombiniert die Echtzeit PCR die DNA Amplifizierung mit der Detektion der Produkte in einem Reaktionsgefäß. Eine derartige Amplifikation einer Nukleinsäure setzt das Kontaminationsrisiko drastisch herab, weil das Reaktionsgefäß nach der Kettenreaktion nicht mehr geöffnet werden muss.

Vorzugsweise wird die PCR als asymmetrische PCR durchgeführt. Bei der asymmetrischen PCR wird einer der in der PCR eingesetzten Primer im Überschuss zugesetzt. Unter diesen Reaktionsbedingungen kommt es zu einer selektiven Amplifikation eines Stranges. Befindet sich der forward Primer im Überschuss wird der Strang und nicht der Gegenstrang vermehrt amplifiziert. Diese Vorgehensweise ist vor allem dann von Vorteil, wenn das PCR-Produkt nach der Amplifikation für Hybridisierungen (z.B. Hybridisierung an einer festen Phase) verwendet werden soll. Durch das Vorhandensein von Einzelsträngen ist ein Denaturieren des PCR-Produkts vor der Hybridisierung nicht mehr notwendig.

Die Echtzeit PCR ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus TaqMan PCR, Sybr Green PCR, molekularer Beakon PCR, LightUp PCR, HybProbe PCR und Kombinationen davon.

Erfindungsgemäß können verschiedene Echtzeit PCR Techniken bzw. Methoden angewendet werden, wobei Echtzeit PCR mit TaqMan, LightUp, HybProbe und molekularen Beakon Sonden und mit Sybr Green bevorzugt sind. Vor allem durch die Kombination der verschiedenen PCR Techniken (z.B. Sybr Green Markierung mit TaqMan Markierung) wird es ermöglicht die Anzahl der zu detektierenden bzw. quantitativ zu bestimmenden amplifizierten Nukleinsäurefragmente in einer Probe zu erhöhen.

Vorzugsweise wird das mindestens eine amplifizierte Nukleinsäurefragment mit einer Nukleinsäure-interkalierenden Sub-

stanz, z.B. Sybr Green 1 oder Ethidiumbromid, mit mindestens einer Farbstoff-markierten Nukleinsäure-Sonde, z.B. mit einer TaqMan-Sonde oder mit einem molekularen Beacon ("molecular beacon"), markiert.

Grundsätzlich sind die Detektionsarten in Nukleinsäureamplifikationstechniken, insbesondere in der Real Time PCR (siehe z.B. Bustin SA., J Mol Endocrinol. (2000) 25:169-193), entweder spezifisch, das heißt Primer Dimere oder unspezifische Produkte werden nicht detektiert, oder unspezifisch, jegliche doppelsträngige DNA wird nachgewiesen (selektiver Nachweis). Zur selektiven Detektion von Nukleinsäuren, insbesondere von doppelsträngiger DNA, werden in der Molekularbiologie vorwiegend interkalierende Farbstoffe verwendet, die in der Lage sind sich in die Nukleinsäuren einzulagern. Derartige Farbstoffe sind beispielsweise Ethidiumbromid und das weniger toxische Sybr Green (siehe z.B. Wittwer CT et al. (1997) Biotechniques 22:176-81; Ponchel F et al. (2003) BMC Biotechnology 3:18) oder aber auch Thiazol Orange (TO), Oxazol Gelb (YO). Diese Farbstoffe, insbesondere Sybr Green, werden nicht nur zur Nukleinsäurefärbung in Gelen, wie z.B. Agarosegelen, verwendet, sondern auch im Zuge von Nukleinsäureamplifikationstechniken, wie Echtzeit-PCR. Die Emission von fluoreszierendem Licht, wenn diese Farbstoffe in doppelsträngiger DNA interkaliert sind, erlaubt es im Rahmen einer Echtzeit-PCR die Bildung von Amplifikationsprodukten direkt nach deren Erzeugung mittels eines Fluorometers zu detektieren. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA in der Probe. Da diese Methode DNA zu detektieren selektiv und nicht spezifisch ist (d.h. es kann DNA nicht aufgrund dessen Nukleinsäuresequenz spezifisch detektiert werden), ist es möglich das Produkt nach dem Ende der PCR-Amplifikation mittels Schmelzkurven näher zu charakterisieren und nicht-spezifische Amplifikationsprodukte, welche in der Regel einen anderen Schmelzpunkt als das Hauptprodukt aufweisen, zu identifizieren. Daher sind interkalierende Farbstoffe sehr gut geeignet, die Amplifikation von Nukleinsäurefragmenten direkt zu verfolgen, wobei allerdings zu beachten ist, dass die Schmelzpunkte je nach Analyse-Lauf um $\pm 1^{\circ}\text{C}$ variieren können. Interkalierende Farbstoffe, insbesondere Sybr Green 1, werden für Singleplex Reaktionen eingesetzt, wobei bei Kopplung mit einer Schmelzpunkt-Analyse kann es auch in Multi-

plex Reaktionen verwendet werden (siehe z.B. Siraj AK, Clinical Cancer Research 8:3832-3840 (2002)).

Um die Bildung eines spezifischen Amplifikationsproduktes zu detektieren, werden Sequenz-spezifische Sonden verwendet. Dies können einerseits TaqMan Sonden, Light-up Sonden, Hybridisierungssonden oder molekulare Beakons sein. TaqMan Sonden (siehe z.B. Heid CA et al. (1996) Genome Res. 6:986-94) beispielsweise zeichnen sich dadurch aus, dass die am Amplifikationsprodukt spezifisch bindende Sonde mit einem Reporter-Farbstoff (Fluorophor) und einem Quencher an dem 5'- und 3'-Ende versehen ist. Aufgrund der 5'-3' Nukleaseaktivität der Taq (Thermus aquaticus) DNA Polymerase wird der Quencher aus der unmittelbaren Nähe des Reporter-Farbstoffs entfernt und die Fluoreszenz des Farbstoffs nimmt proportional zur Menge des Amplikons zu. Ein in der Praxis häufig verwendetes Reporter-Farbstoff-Quencher-System ist beispielsweise FAM (6-carboxyfluorescein) und TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamin). FAM wird dabei vom Instrument angeregt und überträgt die Energie (FRET = Fluorescence Energy Transfer) auf TAMRA, dessen Fluoreszenz auch gemessen wird, wobei an der Detektionswellenlänge von TAMRA der Hintergrund von FAM sehr klein ist. Neben Fluorophoren als Quencher werden heute auch sogenannte Dunkel-Quencher benutzt, welche nicht fluoresceinieren, dabei wird nur die Aufhebung der Löschung von zum Beispiel FAM gemessen. Beispiele derartiger Farbstoffe sind neben FAM TET, HEX und JOE, Beispiele von weiteren Quenchern neben TAMRA sind DABCYL und DABSYL. Als Quencher können erfindungsgemäß auch Metallpartikel, insbesondere Goldpartikel (z.B. Fan C. et al. Proc Natl Acad Sci USA (2003) 100:6297-301), verwendet werden.

Tabelle 1: Auswahl von fluoreszierenden Farbstoffen, die bei der TaqMan PCR eingesetzt werden (R = Reporter, Q = Quencher, P = Passiver Referenzfarbstoff)

	Farbstoff (chemische Bezeichnung)	Typ	Anregung [nm]	Emission [nm]
FAM	6-Carboxy-Fluorescein	R	488	518
TET	Tetrachloro-6-carboxy-fluorescein	R	488	538
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein	R	488	554
HEX	Hexachloro-6-carboxy-fluorescein	R	488	556
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	P	488	602
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin	Q	488	582

Auch die Detektion von Amplifizierungsprodukten mittels Hybridisierungssonden beruht auf dem FRET ("fluorescence resonance energy transfer") Prinzip. Dabei wird eine erste Sonde mit einem Donor-Fluorochrom (z.B. Fluorescein) am 3'-Ende und eine zweite Sonde mit einem Akzeptor-Farbstoff (z.B. Cy5, LC Red 640) am 5'-Ende markiert. Beide Sonden sind so ausgewählt, dass diese am Amplikon derart hybridisieren, dass die modifizierten Enden der Sonden am Amplikon nur durch eine einzige Base am selben DNA-Strang getrennt sind. In dieser Position regt die vom Donor abgegebene Energie den Akzeptor-Farbstoff der zweiten Sonde an, wobei letzterer schließlich Fluoreszenz bei einer längeren Wellenlänge emittiert. Das Verhältnis zwischen Donor-Fluoreszenz und Akzeptor-Fluoreszenz nimmt im Laufe einer Nukleinsäureamplifikation zu und ist proportional zur amplifizierten DNA-Menge.

Ferner können zur spezifischen Detektion von Amplifizierungsprodukten sog. molekulare Beacons ("molecular beacons") verwendet werden (siehe z.B. Abravaya K et al. (2003) Clin Chem Lab Med. 41:468-74). Molekulare Beacons sind Hybridisierungssonden, die einen Stamm ("stem") und eine Schleife ("loop") aufweisen und an einem Ende mit einem Fluoreszenz-Farbstoff und am anderen Ende mit einem Quencher modifiziert sind. Der Schleifen-Abschnitt der Sonde ist komplementär mit dem Template und die beiden Endabschnitte sind zueinander komplementär, so dass sich eine Haarnadel-artige Struktur ausbildet. Wenn die Sonde nicht

am Template hybridisiert vorliegt befinden sich Fluorophor und Quencher in unmittelbarer Nähe, wodurch die Fluoreszenz im Wesentlichen zur Gänze unterdrückt wird. Sobald die Sonde auf das Template unter optimierten Bedingungen hybridisiert, wird der Fluoreszenz-unterdrückende Effekt des Quenchers aufgehoben. Aufgrund der hohen Thermostabilität der gebildeten Haarnadel-Struktur, weisen molekulare Beacons eine hohe Hybridisierungsspezifität auf, wodurch es ferner ermöglicht wird Unterschiede in der Nukleotid-Sequenz bis auf ein Nukleotid festzustellen (Eignung zur Mutationsanalyse und zur Detektion von einzelnen Nukleotid Polymorphismen ("single nucleotide polymorphism", SNP)).

Erfindungsgemäß eignen sich auch HybProbe Sonden zur Ausführung der vorliegenden Erfindung (siehe z.B. Harder TC et al. J. Clin. Microbiol. (2001) 39: 4413-4419). Weiters sind im erfindungsgemäßen Verfahren auch Light-up Sonden geeignet, wie diese beispielsweise in Kubista M et al. (Genomics and Proteomics Technologies. Proceedings of SPIE (2001), Vol. 4264, pp. 53-58), Svanvik N et al. (Anal Biochem (2000) 287:179-182) und Isacsson J et al. (Mol Cell Probes (2000) 14:321-328) beschrieben sind.

Vorzugsweise ist die Polymerasekettenreaktionstechnik eine 2-Stufen Polymerasekettenreaktionstechnik.

Eine 2-Stufen Polymerasekettenreaktionstechnik zeichnet sich dadurch aus, dass die Annealing- und die Elongationstemperatur ident sind. Daher benötigen derartige PCR-Techniken lediglich zwei Temperaturstufen um die Amplifikation eines Nukleinsäurefragments zu katalysieren (eine Denaturierungstemperatur, z.B. 94°C, und eine Annealing-/Elongationstemperatur). Voraussetzung zur Durchführung einer 2-Stufen PCR ist, dass die verwendete Polymerase bei der Annealingtemperatur ausreichende Amplifikationseffizienz aufweist.

Die Detektion mehrerer amplifizierter Nukleinsäurefragmente wird idealerweise mit Hilfe von Sequenz-spezifischen Sonden durchgeführt. Derartige Sonden sind beispielsweise TaqMan-Sonden, welche vorzugsweise 6-Carboxy-Fluorescein, Tetrachloro-6-carboxy-fluorescein, 2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein oder Hexachloro-6-carboxy-fluorescein als Farbstoff und 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin als Quencher aufweisen können.

Vorzugsweise weist die Amplifikation des zweiten Nukleinsäure-

refragments eine geringere Effizienz als die Amplifikation des ersten Nukleinsäurefragments auf.

Die Effizienz einer Nukleinsäureamplifikation hat direkte Auswirkungen auf den Schwellenwertzyklus: je niedriger die Effizienz desto größer der Schwellenwertzyklus. Um die Amplifikation der ersten und der zweiten Nukleinsäure von der Amplifikation der zweiten Nukleinsäure zu unterscheiden, weist die Amplifikation der zweiten Nukleinsäure eine geringere Effizienz auf.

Die Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments weist vorzugsweise eine Effizienz von maximal 1,8, vorzugsweise von maximal 1,4, noch bevorzugter von maximal 1,3, insbesondere von maximal 1,1, auf.

Vorzugsweise weist die Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments einen Schwellenwertzyklus von mindestens 30, besonders bevorzugt von mindestens 40, insbesondere von mindestens 50, auf.

Um die Amplifikationskurven mindestens zweier Nukleinsäureamplifikationen zu unterscheiden, ist es notwendig, dass sich die Kurven zumindest in einem Merkmal unterscheiden. Zu diesen Merkmalen zählen vor allem der eingangs erwähnte Schwellenwertzyklus, der Fluoreszenzmaximalwert und die Effizienz. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens hat sich vor allem die Unterscheidung der Kurven anhand des Schwellenwertzyklus als besonders geeignet erwiesen. Der Schwellenwertzyklus ist von mehreren Faktoren, wie z.B. der Primerkonzentration (siehe z.B. Kubista M et al. (2001) Genomics and Proteomics Technologies. Proceedings of SPIE, Vol. 4264, pp. 53-58), abhängig, wobei eine geringe Primerkonzentration zu einem höheren Schwellenwertzyklus führt als eine hohe Konzentration. Da eine Nukleinsäureamplifikation in der Regel auf einen Schwellenwertzyklus von ca. 25 bis 45 hinoptimiert wird, würde sich ein höherer Schwellenwertzyklus von z.B. 45 besonders gut eignen, um festzustellen, ob die Amplifikation der ersten Nukleinsäureamplifikation funktionierte oder nicht funktionierte. Würde beispielsweise die Amplifikationskurve einer Probe einen Schwellenwertzyklus aufweisen, der jenem der Amplifikation der zweiten Nukleinsäure entspricht, weist dies darauf hin, dass in der Probe eventuell keine erste Nukleinsäure vorhanden war. Ferner kann der Schwellenwertzyklus auch zur Konzentrationsbestimmung der ersten in der Probe befindlichen Nukleinsäure herange-

zogen werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die Menge des ersten Primerpaars im Gemisch c) 0,05 bis 2 μM , vorzugsweise 0,075 bis 1,5 μM , insbesondere 0,1 bis 1 μM .

Diese Konzentrationen des ersten Primerpaars haben sich als besonders gut in dem erfindungsgemäßen Verfahren erwiesen.

Die Menge des zweiten Primerpaars beträgt gemäß einer bevorzugten Ausführungsform weniger als 90%, vorzugsweise weniger als 70%, besonders bevorzugt weniger als 50%, insbesondere weniger als 30%, 20%, 15%, 10% oder 7.5%, der Menge des ersten Primerpaars.

Die in einer Nukleinsäureamplifikation eingesetzte Menge an Primer beeinflusst die Effizienz einer Amplifikationsreaktion, wobei sich die Effizienz der Reaktion sowohl bei zu geringen als auch bei zu hohen Mengen an Primer reduziert. Um die optimale Primerkonzentration im Reaktionsgemisch zu bestimmen, kann eine Standardreihe mit verschiedenen Konzentrationen an Primern amplifiziert werden, wobei für jede Primerkonzentration die Effizienz der Nukleinsäureamplifikation z.B. anhand einer Amplifikationskurve bestimmt wird. Dabei hat sich ergeben, dass vor allem eine geringere Menge an dem Primerpaar, welches für die zweite Nukleinsäure (als interne Kontrolle) spezifisch ist, im Vergleich zu dem für die erste Nukleinsäure spezifischen Primerpaar zu einem überraschend guten Ergebnis führt.

Um die Effizienz und den Schwellenwertzyklus der Amplifikation der zweiten Nukleinsäure zu reduzieren bzw. zu erhöhen, kann die Menge an eingesetzter zweiter Nukleinsäure sehr gering sein. Vorzugsweise beträgt die Menge der mindestens einen zweiten Nukleinsäure zwischen 10 und 10^6 Molekülen, vorzugsweise zwischen 100 und 100000 Molekülen, insbesondere zwischen 1000 und 10000 Molekülen. Aufgrund der geringen Menge an Template benötigt die Amplifikation mehr Zyklen, um den Schwellenwert der Fluoreszenz zu erreichen und in die exponentielle Phase der Amplifikation einzutreten.

Besonders vorteilhaft hat sich erfindungsgemäß der Einsatz einer Chlamydia Nukleinsäure als zweite Nukleinsäure bzw. interne Kontrolle erwiesen.

Erfindungsgemäß kann jedoch jede Nukleinsäure als interne Kontrolle eingesetzt werden, vorausgesetzt dass entsprechend spezifische Primer zur Amplifikation eines Fragments daraus be-

kannt sind bzw. bestimmt werden können.

Vorzugsweise weist der vorwärts gerichtete Primer die Nukleinsäuresequenz 5'-ACCAAGAAATAAAAATGCGCTTCCCAAAT-3' auf.

Der rückwärts gerichtete Primer weist gemäß einer bevorzugten Ausführungsform die Nukleinsäuresequenz 5'-CAGCTGCTGTAATCAC-CCAGTCGATAAATG-3' auf.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann jegliche Probe umfassend eine Nukleinsäure, welche ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Viren, tierischen und pflanzlichen Organismen, Bakterien, vorzugsweise Mykobakterien, insbesondere Mycobacterium paratuberculosis, Listerien, Salmonellen, Campylobacter, und Kombinationen davon sind, untersucht werden.

Vorzugsweise umfasst die Probe mindestens eine erste Nukleinsäure aus Mycobacterium paratuberculosis, welche mit einem vorwärts gerichteten Primer mit der Nukleinsäuresequenz 5'-CCGC-TAATTGAGAGATGCGATTGG-3' und mit einem rückwärts gerichteten Primer mit der Nukleinsäuresequenz 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAACCG-3' amplifiziert wird.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das einer Nukleinsäureamplifikation unterworfenen Gemisch aus Schritt c) oder die gegebenenfalls amplifizierten Nukleinsäurefragmente aus Schritt d) mit einer Hybridisierungsmethode detektiert.

Der Nachweis eines amplifizierten Nukleinsäurefragments kann erfindungsgemäß auch durch Hybridisierungsmethoden erbracht werden. Bei derartigen Methoden wird ein amplifiziertes Fragment über die sequenzspezifische Anlagerung von komplementären, markierten (z.B. nichtradioaktiv (siehe beispielsweise Kessler C. (ed.) Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules. Springer Verlag Heidelberg (1992)) oder radioaktiv) Nukleinsäure-Sonden erfolgen. Die zu analysierenden Nukleinsäuren werden dabei vorzugsweise auf einen festen Träger immobilisiert und unter stringenten Bedingungen mit den entsprechenden Sonden in Kontakt gebracht. Eine ausführliche Anleitung bezüglich Hybridisierung von Nukleinsäuren kann beispielsweise in Tijssen "Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes", "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (ed. Elsevier N.Y.; 1993) und "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubet, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York; 1997) gefunden werden. Ein Überblick über Methoden und Verfahren zum Nachweis von Nukle-

insäuren mittels Hybridisierungstechniken kann in Lottspeich F et al. gefunden werden (Lottspeich F. und Zorbas H, "Bioanalytik" Seite 635-671, Spektrum Verlag; 1998).

Die vorliegende Erfindung wird weiters durch die folgenden Figuren und das folgende Beispiel näher erläutert, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt einen Plot einer Echtzeit-PCR-Analyse von *M. paratuberculosis* (positiv-Kontrolle, A01) und mehreren internen Kontrollen (Chlamydia-DNA: B01, C01, D01, E01, F01, G01), wobei die Fluoreszenzwerte (FAM-490) gegen die Anzahl der PCR-Zyklen korreliert wurden.

Fig. 2 zeigt eine Schmelzkurve zur Feststellung, ob das amplifizierte Produkt dem zu amplifizierenden Produkt entspricht, wobei die Fluoreszenzwerte (FAM-490) gegen die Temperatur geplottet wurde.

Beispiele:

I. Herstellung von Ferromagnetischen Beads zur Isolierung von *M. paratuberculosis*

0,8 ml Ferromagnetische Beads (ChemiCell, SIMAG-MP/TCL) Suspension werden am Magneten (MagnetOn 4T, Aureon Biosystems, #M010104) abgeschieden, in 1ml MES resuspendiert, am Magneten der Überstand abgenommen und mit 25mg Carbodiimid (Sigma, #E7750) in 1ml MES-Puffer 15 Minuten am Rotamix (RM1 bei 15rpm) aktiviert. Die Beads werden mit 1ml MOPS-Puffer gewaschen und mit 900µl Antikörper in MOPS-Puffer (QED Bioscience, 18101-18104) 2 Stunden am RM1 gedreht. Danach werden 4ml StabilZyme AP (Surmodics, SA01-100) zugesetzt und über Nacht am RM1 gedreht. Durch Abscheiden der Beads am Magneten, Resuspendieren und erneutes Abscheiden werden die Beads 2x mit 1ml TPBS und 1x mit 1ml StabilZyme gewaschen. Zuletzt werden die Beads in 20 ml StabilZyme aufgenommen (Endkonzentration von 10mg Beads/ml) und im Kühlschrank gelagert.

II. Herstellung von PCR-Grade *M. paratuberculosis* DNA

1ml einer Suspension von *M. paratuberculosis* in Rohmilch (Andiatec, Stuttgart) wird mit 10µl der Bead-Suspension versetzt und 30 Minuten unter zeitweiligem Schütteln inkubiert. Danach werden die Beads am Magneten abgeschieden und 4 mal mit CT-Waschlösung durch jeweiliges Abscheiden am Magneten gewaschen. Der Bead-Bakterien-Komplex wird in 50µl dest. Wasser resuspendiert, 10 min. bei 95°C erhitzt, danach die Beads am Magneten

abgeschieden und der Überstand in ein frisches Röhrchen übertragen.

III. Real-Time PCR mit SybrGreen und DNA Lösung und interner Kontrolle

1µl eine Verdünnungsreihe der aus Punkt 2 isolierten DNA-Lösung wurde mit 4pmol/20µl MP139U24: 5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3' und 4pmol/20µl mit dem Primer MP219L24: 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAACCG-3' in 1x SybrGreen Supermix von Bio-Rad am iCycler mit 20µl Gesamtvolumen amplifiziert und real-time analysiert. In allen Proben war zudem 1µl einer 10⁻⁶ Verdünnung des Amplikons einer Chlamydia PCR auf dem Chlamydia trachomatis cryptic plasmid pLGV440 (NCBI-Zugangsnummer X06707) sowie die Primer C4235U29 5'-ACCAAGAAATAAAAATGCGCTTCCCAAAT-3' und C4283L30 5'-CAGCTGCTGTAATCACCCAGTCGATAAATG-3' bei einer Konzentration von 1pmol/20µl.

Um die Robustheit zu demonstrieren, wurde zudem zu den Proben Hering Sperm DNA zugesetzt.

PCR-Parameter:

1 x	3 min	95°C
70 x	1 sek	95°C
	30 sek	70°C (Reduktion der Temperatur um 1°C in Wiederholung 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70)
1 x	-	25°C

Ergebnisse (Schwellenwertzyklus - „threshold cycle“):

Schwellenwertzyklus	Ohne DNA Zusatz	Mit 200ng Hering Sperm DNA
Negativ-Kontrolle	48,4	55,0
10 ⁻¹⁰ Verdünnung	34,4	40,8
10 ⁻⁹ Verdünnung	31,9	35,8
10 ⁻⁸ Verdünnung	28,5	32,2
10 ⁻⁷ Verdünnung	25,5	29,2

Die anschließende Schmelzkurve ergab eine Schmelztemperatur

von 79°C für das Produkt der Internen Kontrolle und 86°C für das Produkt der *M. paratuberculosis* PCR.

IV. Screening von Rohmilchproben auf *M. paratuberculosis* mit SybrGreen und interner Kontrolle

2ml Rohmilch wird mit 20µl der Bead-Suspension versetzt und 120 Minuten unter Drehen der Tubes inkubiert. Danach werden die Beads am Magneten abgeschieden und 4 mal mit CT-Waschlösung durch jeweiliges Abscheiden am Magneten gewaschen. Der Bead-Bakterien-Komplex wird in 20µl dest. Wasser resuspendiert, 20 min. auf 95°C erhitzt, danach die Beads am Magneten abgeschieden und der Überstand in ein frisches Röhrchen übertragen.

10µl der isolierten Lösung wurde mit 10pmol/50µl MP139U24: 5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3' und 10pmol/50µl mit dem Primer MP219L24: 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAACCG-3' in 1x SybrGreen Supermix von BioRad am iCycler mit 50µl Gesamtvolumen amplifiziert und real-time analysiert. In allen Proben war zudem 1µl einer 10⁻⁶ Verdünnung des Amplikons einer Chlamydia PCR sowie die Primer C4235U29 5'-ACCAAGAAATAAAAATGCGCTTCCCAAAT-3' und C4283L30 5'-CAGCTGCTGTAATCACCCAGTCGATAAATG-3' bei einer Konzentration von 2,5pmol/50µl. Als positiv Kontrolle wurde *M. paratuberculosis* DNA in Wasser verwendet.

PCR-Parameter:

1 x	3 min	95°C
60 x	1 sek	95°C
	30 sek	70°C (Reduktion der Temperatur um 1 °C in Wiederholung 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56)
1 x	-	25°C

Ergebnisse (Schwellenwertzyklus - „threshold cycle“):

Well	Ct	
A01	36	Probe umfassend <i>M. paratuberculosis</i>
B01	53,9	interne Kontrolle
C01	48	interne Kontrolle
D01	47,9	interne Kontrolle

Well	Ct	
E01	46,9	interne Kontrolle
F01	48	interne Kontrolle
G01	47,9	interne Kontrolle
Positive Control	26,7	Positiv-Kontrolle

Es ist zu beachten, dass die einzelnen Ansätze eindeutige Resultate lieferten. In den Proben wurde Amplifikationsprodukt der internen Kontrolle nach Cycle 45 und das positive Amplifikationsprodukt vor dem Cycle 45 gebildet. Zudem kann die interne Kontrolle vom anderen Produkt über die Signalthöhe bei vollständiger Reaktion oder den Anstieg, das heißt die Effizienz, unterschieden werden. Dies wurde dadurch erreicht, dass die Primer in stark unterschiedlichen Konzentrationen angeboten wurden und dadurch die Effizienz der einzelnen Amplifikationen variierte, was zu unterschiedlichen Schwellenwertzyklen führt. Die effizienzreduzierte interne Kontrolle ist äußerst anfällig auf Inhibitoren und stellt daher eine sehr gute interne Kontrolle dar.

Zusätzlich wurde eine Schmelzkurve erstellt, wobei bei den negativen Proben die interne Kontrolle mit einem Schmelzpunkt von 78,5°C nachgewiesen, die Positiv-Kontrolle und eine Probe zeigten das Produkt der *M. paratuberculosis* PCR, welches bei 85,5°C schmolz.

V.Asymetrische Real-Time PCR mit SybrGreen, interner Kontrolle und Hybridisierungs-Read-out

1µl einer Verdünnungsreihe der aus Beispiel II isolierten DNA-Lösung wurde mit 4pmol/20µl MP139U24: 5'-CCGCTAATTGAGAGATGC-GATTGG-3' sowie 2pmol/20µl 5'-Fluorescein-CCGCTAATTGAGAGATGC-GATTGG-3' und 4pmol/20µl mit dem Primer MP219L24: 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAACCG-3' in 1x SybrGreen Supermix von Bio-Rad am iCycler mit 20µl Gesamtvolumen amplifiziert und real-time analysiert. In allen Proben war zudem 1µl einer 10⁻⁷ Verdünnung des Amplikons einer Chlamydia PCR auf dem Chlamydia trachomatis cryptic plasmid pLGV440 (NCBI-Zugangsnummer X06707) sowie die Primer C4235U29 5'-ACCAAGAAATAAAAATGCGCTTCCCAAAT-3' und C4283L30 5'-CAGCTGCTGTAATCACCCAGTCGATAAATG-3' bei einer Konzentration von 1pmol/20µl und der Fluoresceinierte Primer 5'-Fluorescein-AC-CAAGAAATAAAAATGCGCTTCCCAAAT-3' bei einer Konzentration von

0,5pmol/20µL.

Dieses Beispiel wurde gewählt, um die umfassende Nutzbarkeit des Verfahrens aufzuzeigen, weil Fluorescein im Sybr-Green Kanal die Messung stören sollte, andere Labels können noch vorteilhafter sein, wenn es um eine Markierung für anschließenden Hybridisierungsassay geht. Dadurch kann der selbe Assay in Echtzeit Ablesung und Hybridisierungstest verwendet werden. Dies ist dann sinnvoll wenn ein Anwender noch kein Real-time Gerät besitzt. Dann wird der selbe Assay mit Hybridisierung ausgelesen und bei Anschaffung eines real time cyclers braucht nicht neu validiert zu werden, weil der Hybridisierungstest und der real time read out die gleiche Sensitivität haben.

PCR-Parameter:

1 x	3 min	95°C
70 x	1 sek	95°C
	30 sek	70°C (Reduktion der Temperatur um 1 °C in Weiderholung 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70)
1 x	-	25°C

Hybridisierungstest: A: Herstellung der Festphase

Streptavidin von Boehringer Mannheim, wird in PBS auf eine Konzentration von 2µg/mL verdünnt und die Näpfchen von Weißen MaxiSorp Microplatten (Nunc, Art-N°437-591) werden über Nacht bei 4°C mit 100µL beschichtet. Die Platte wird ausgeklopft, mit TPBS gewaschen und mit 100µL/Well einer Lösung von 3pmol/100µL biotinyliertem capture oligonucleotide (Biotin-TCATTGTCCAGATCA für M. Paratuberculosis und Biotin-AGCATACTTTGATGCAT für die interne Kontrolle) in TPBS gebunden, gewaschen, getrocknet und eingeschweißt.

B: Hybridisierung ohne Denaturierung

50µL TPBS und 5µL Amplicon werden 15 min bei Raumtemperatur und Drehen bei 500 rpm inkubiert, 4 x mit TPBS gewaschen, 15 min mit 50µL anti-FAM-HRP bei 500 rpm inkubiert, 4 x mit TPBS gewaschen, 15 min mit KPL TMB im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und mit 50µL 1 N H₂SO₄ gestoppt. Messung der optischen Dichte bei 450-620nm.

Ergebnisse:

	Schwellenwertzyklus	OD (450-620nm)	
		M. paratuberculosis	Chlamydia trachomatis
Negativ-Kontrolle	46,5	0,007	0,602
10 ⁻¹⁰ Verdünnung	36,3	0.695	0,128
10 ⁻⁹ Verdünnung	33,1	0,752	0,041
10 ⁻⁸ Verdünnung	32,7	0,776	0,041
10 ⁻⁷ Verdünnung	25,6	0.963	0,004
Hybridisierungskontrolle		0,006	0,008

VI. Diskussion:

Eine hochsensitive und hochspezifische PCR zum Nachweis von M. paratuberculosis DNA wurde entwickelt und gezeigt, dass auch nach 80 Cycles keine Primerdimere auftreten. Die Spezifität wurde weiters mit diesen Primern in einer Touch-Down-PCR erhöht. Um die Auswertung der Real-Time PCR bei nur einer Messwellenlänge eines Real Time Cyclers zu ermöglichen, wurde eine interne Kontrolle einbezogen, die in der Effizienz durch niedrige Konzentration der Primer herabgesetzt ist und dadurch erst bei hoher Zyklenzahl der Schwellenwert erreicht und vom eigentlichen Produkt über die Effizienz und gegebenenfalls über die Signalthöhe bei negativen Proben anzeigt, dass die Amplifizierung nicht inhibiert war. Um mehrere Produkte gut quantifizieren zu können, kann bei Messungen mit SybrGreen I die Konzentration des Farbstoffs variiert bzw. erhöht werden.

Dieses Konzept der Effizienz-Abwandlung durch unterschiedliche Primerkonzentrationen und monochrome Detektion eignet sich auch besonders gut für Gen-Analysen, weil zum Beispiel bei Punktmutationen wie Faktor V Leiden im heterozygoten Fall wild typ und mutation typ in gleicher Menge am Genom vorhanden sind, damit die Targetkonzentration gleich ist, und über die Effizienz unterschieden werden können.

Eine Übersicht zur Effizienzberechnung, anhand mathematischer Algorithmen innerhalb einer einzelnen experimentellen

Probe findet sich in M.W. Pfaffl ("Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung", Biospektrum, 1/04, 10. Jahrgang). Darin wird auch aufgezeigt was ein Fachmann unter Signalthöhe versteht - die Fluoreszenzdifferenz zwischen Hintergrundfluoreszenz welche anhand einer Regression angepasst wird, wobei bereits ein Produkt darin enthalten sein kann, und Plateauphase, welche auch über eine Regression angepasst werden kann.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können auch mehr als zwei Amplikons zu bestimmt werden, sofern die Primerkonzentrationen sachgemäß eingestellt werden. In diesem Beispiel verschiebt sich der Schwellenwertzyklus um rund 3 Zyklen bei Verdünnung der Primer auf die Hälfte und um rund 10 Zyklen bei Verdünnung auf ein Viertel. In vielen Fällen sollte hierzu die Konzentration von Sybr Green I angepasst werden denn so ferne genügend Farbstoff zur Verfügung steht, können die Produkte auch über die Signalthöhe unterschieden werden.

Bei Verwendung spezifischer Sonden, wie TaqMan oder Molekular Beacons und Geräten, die bei mehreren Wellenlängen messen, erhöht sich die Zahl der zu bestimmenden Produkte drastisch durch Anwendung dieses Konzepts.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Detektion mindestens eines Nukleinsäurefragments einer Nukleinsäureamplifikation umfassend die Schritte:

a) Bereitstellen einer Probe gegebenenfalls umfassend mindestens eine erste Nukleinsäure,

b) Inkontaktbringen der Probe mit einer bestimmten Menge eines ersten für die erste Nukleinsäure spezifischen Primerpaars,

c) Zugabe einer bestimmten Menge mindestens einer zweiten Nukleinsäure als interne Kontrolle und eines zweiten für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaars zur Probe,

d) Amplifizieren des Gemisches aus c) über eine Anzahl von Nukleinsäureamplifikations-Zyklen, bei der mindestens ein amplifiziertes Nukleinsäurefragment der mindestens einen ersten und/oder der mindestens einen zweiten Nukleinsäure mit einem oder mehreren fluoreszierenden Farbstoffen markiert wird,

e) Aufnehmen einer Amplifikationskurve durch Messen der Fluoreszenzintensitäten der Nukleinsäureamplifikations-Zyklen bei einer Wellenlänge und Korrelieren der Fluoreszenzintensitäten gegen die Anzahl der Nukleinsäureamplifikations-Zyklen,

f) Bestimmen eines Schwellenwertzyklus und/oder eines Fluoreszenzmaximalwertes der Amplifikationskurve und/oder einer Effizienz der Amplifikation,

g) Vergleichen des Schwellenwertzyklus und/oder des Fluoreszenzmaximalwertes und/oder der Effizienz aus f) mit dem Schwellenwertzyklus und/oder dem Fluoreszenzmaximalwert und/oder der Effizienz einer Amplifikation mit der bestimmten Menge des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar,

wobei die Nukleinsäureamplifikation des mindestens einen Nukleinsäurefragments der ersten Nukleinsäure der Probe detektiert wird, wenn der Schwellenwertzyklus der Amplifikation des Gemisches aus c) mindestens 10% über oder unter dem Schwellenwertzyklus der Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar ist und/oder der Fluoreszenzmaximalwert der Amplifikation des Gemisches aus c) mindestens 10% über dem Fluoreszenzmaximalwert der Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar ist und/oder die

Effizienz der Amplifikation des Gemisches aus c) mindestens 0,1 Punkte über der Effizienz der Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar ist.

2. Verfahren zur Detektion einer Inhibition einer Nukleinsäureamplifikation mindestens eines Nukleinsäurefragments umfassend die Schritte a) bis g) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Inhibition der Nukleinsäureamplifikation detektiert wird, wenn der Fluoreszenzmaximalwert der Amplifikation des Gemisches aus c) mindestens 10% unter dem Fluoreszenzmaximalwert einer Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar ist und/oder die Effizienz der Amplifikation des Gemisches aus c) mindestens 0,1 Punkte unter der Effizienz einer Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments mit dem für die zweite Nukleinsäure spezifischen Primerpaar ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Schmelztemperatur des mindestens einen Nukleinsäurefragments durch das Aufnehmen einer Schmelzkurve nach der Nukleinsäureamplifikation bestimmt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure DNA und/oder RNA, insbesondere mRNA, ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäureamplifikationstechnik eine Polymerasekettenreaktionstechnik ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerasekettenreaktionstechnik (PCR-Technik), ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Echtzeit PCR, verschachtelte PCR („nested PCR“), inverser PCR, reverse Transkriptase PCR (RT-PCR), asymmetrische PCR und Kombinationen davon, ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Echtzeit PCR ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus TaqMan PCR, Sybr Green PCR, molekularer Beakon PCR, LightUp PCR, HybProbe

PCR und Kombinationen davon, ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerasekettenreaktionstechnik eine 2-Stufen Polymerasekettenreaktionstechnik ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments eine geringere Effizienz als die Amplifikation des ersten Nukleinsäurefragments aufweist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation des zweiten Nukleinsäurefragments eine Effizienz von maximal 1,8, vorzugsweise von maximal 1,4, noch bevorzugter von maximal 1,3, insbesondere von maximal 1,1, aufweist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge des ersten Primerpaars 0,05 bis 2 μM , vorzugsweise 0,075 bis 1,5 μM , insbesondere 0,1 bis 1 μM , beträgt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge des zweiten Primerpaars weniger als 90%, vorzugsweise weniger als 70%, besonders bevorzugt weniger als 50%, insbesondere weniger als 30%, der Menge des ersten Primerpaars beträgt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine amplifizierte Nukleinsäurefragment mit einer Nukleinsäure-interkalierenden Substanz, insbesondere Sybr Green 1 oder Ethidiumbromid, mit mindestens einer Farbstoff-markierten Nukleinsäure-Sonde, mit einer TaqMan-Sonde oder mit einem molekularen Beakon ("molecular beacon") markiert wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge der mindestens einen zweiten Nukleinsäure zwischen 10 und 10^6 Molekülen, vorzugsweise zwischen 100 und 100000 Molekülen, insbesondere zwischen 1000 und 10000 Mole-

külen, beträgt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine zweite Nukleinsäure eine Chlamydia Nukleinsäure ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass der vorwärts gerichtete Primer die Nukleinsäuresequenz 5'-ACCAAGAAA-TAAAAATGCGCTTCCCAAAT-3' aufweist.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass der rückwärts gerichtete Primer die Nukleinsäuresequenz 5'-CAGCTGCTGTAATCACCCAGTCGATAAATG-3', aufweist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine erste Nukleinsäure von einem Mikroorganismus stammt, der ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Viren, tierischen und pflanzlichen Organismen, Bakterien, vorzugsweise Mykobakterien, insbesondere Mycobacterium paratuberculosis, Listerien, Salmonellen, Campylobacter, und Kombinationen davon ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mindestens eine erste Nukleinsäure aus Mycobacterium paratuberculosis umfasst oder möglicherweise umfasst.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der vorwärts gerichtete Primer eine Nukleinsäuresequenz 5'-CCGC-TAATTGAGAGATGCGATTGG-3' aufweist.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass der rückwärts gerichtete Primer eine Nukleinsäuresequenz 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAACCG-3' aufweist.

22. Verfahren nach einen der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass das einer Nukleinsäureamplifikation unterworfenene Gemisch aus Schritt c) oder die gegebenenfalls amplifizierte Nukleinsäurefragmente aus Schritt d) mit einer Hybridisierungsmethode detektiert werden.

1/2

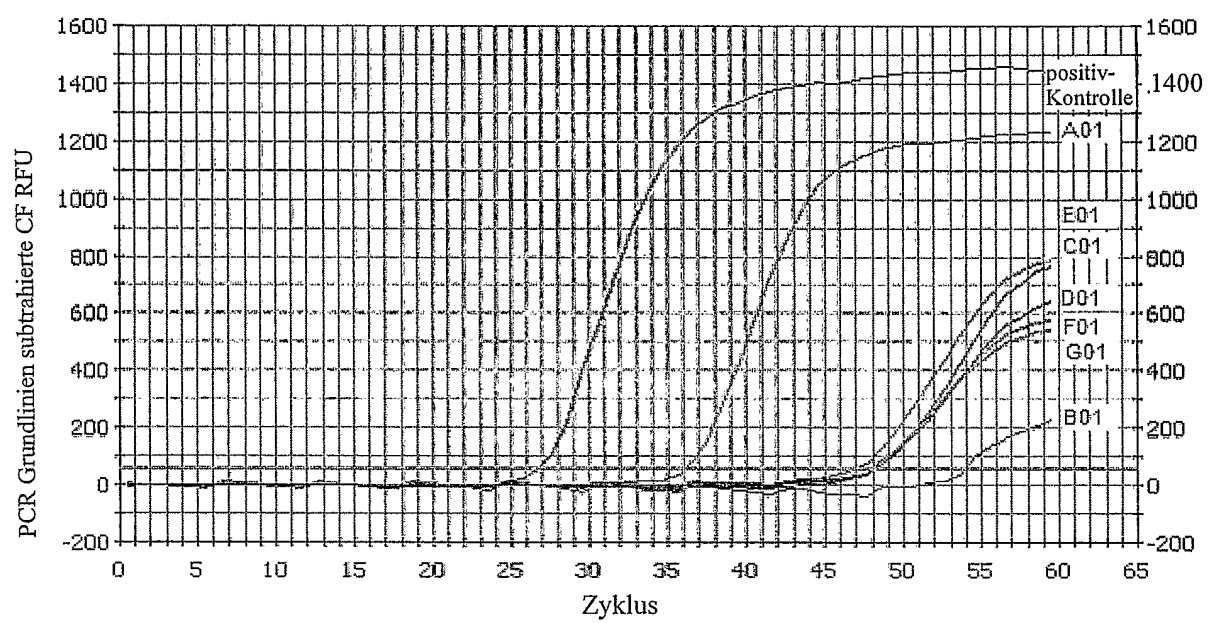


Fig. 1

2/2

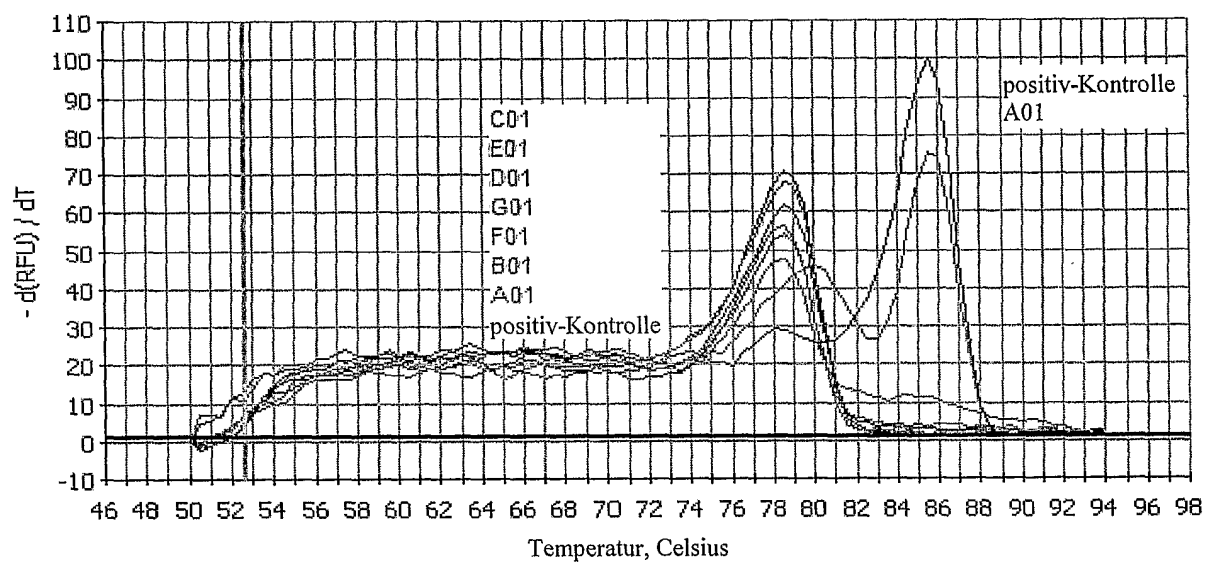


Fig. 2