



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 691 33 329 T3** 2009.07.09

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 919 565 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **691 33 329.7**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 119 974.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **06.08.1991**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.06.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **15.10.2003**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **12.11.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.07.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07H 21/00** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

**Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert**

(30) Unionspriorität:

**563758**                      **06.08.1990**                      **US**

(73) Patentinhaber:

**F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, NL, SE**

(72) Erfinder:

**Gelfand, David H., Oakland, Calif., US; Holland, Pamela M., Oakland, Calif., US; Saiki, Randall K., Alameda, Calif., US; Watson, Robert M., Berkeley, Calif., US**

(54) Bezeichnung: **Markierte Oligonukleotide**

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**

**[0001]** Diese Erfindung betrifft die in den Ansprüchen charakterisierten markierten Oligonucleotide. Somit betrifft sie allgemein das Gebiet der Nucleinsäurechemie. Genauer gesagt können diese Oligonucleotide durch die 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität einer Nucleinsäurepolymerase in einem hybridisierten Duplexmolekül abgebaut werden, das aus dem markierten Oligonucleotid und einer Ziel-Oligonucleotidesequenz aufgebaut ist, und nachweisbare, markierte Fragmente bilden.

**[0002]** Mikrobiologische Techniken aus der Forschung werden routinemäßig bei diagnostischen Tests angewendet. Zum Beispiel offenbart das US-Patent Nr. 4,358,535 ein Verfahren zum Nachweis von Pathogenen mittels Aufbringung einer Probe (z. B. Blut, Zellen, Speichel, usw.) auf einem Filter (z. B. Nitrocellulose), Lyse der Zellen und Fixierung der DNA durch chemische Denaturierung und Erhitzen. Dann werden markierte DNA-Sonden zugegeben, und die Hybridisierung mit der fixierten Proben-DNA wird zugelassen, wobei die Hybridisierung die Anwesenheit der DNA des Pathogens anzeigt. Die Proben-DNA kann in diesem Fall durch Züchten der Zellen oder Organismen an der Stelle auf dem Filter amplifiziert werden.

**[0003]** Eine deutliche Verbesserung bei der DNA-Amplifikation, das Polymerase-Kettenreaktions(PCR)-Verfahren, wird in den US-Patenten Nr. 4,683,202; 4,683,195; 4,800,159 und 4,965,188 offenbart. In seiner einfachsten Form ist die PCR ein in vitro-Verfahren zur enzymatischen Synthese von spezifischen DNA-Sequenzen unter Verwendung von zwei Oligonucleotidprimern, die an gegenläufige Stränge binden und den Bereich von Interesse in der Ziel-DNA flankieren. Eine wiederholte Serie von Reaktionsschritten, die die Denaturierung der Matrize, die Anlagerung der Primer und die Verlängerung der angelagerten Primer durch DNA-Polymerase umfassen, resultiert in einer exponentiellen Akkumulation eines spezifischen Fragments, dessen Enden durch die 5'-Enden der Primer bestimmt sind. PCR ist in der Lage, eine selektive Anreicherung einer spezifischen DNA-Sequenz um den Faktor  $10^9$  zu produzieren. Das PCR-Verfahren ist auch beschrieben in Saiki et al., 1985, Science 230: 1350.

**[0004]** Nachweisverfahren, die bei Standard-PCR-Techniken im Allgemeinen angewendet werden, verwenden eine markierte Sonde mit der amplifizierten DNA in einem Hybridisierungstest. Zum Beispiel offenbaren die EP-Veröffentlichung Nr. 237,362 und die PCT-Veröffentlichung Nr. 89/11548 Testverfahren, bei denen die PCR-amplifizierte DNA zunächst an einen Filter fixiert wird und dann eine spezifische Oligonucleotidsonde zur Hybridisierung zugegeben wird. Vorzugsweise ist die Sonde markiert, z. B. mit  $^{32}\text{P}$ , Biotin, Meerrettich-Peroxidase (HRP), usw., um den Nachweis der Hybridisierung zu erlauben. Das Umgekehrte wird auch vorgeschlagen, das heißt, stattdessen wird die Sonde an die Membran gebunden und die PCR-amplifizierte Proben-DNA wird zugegeben.

**[0005]** Die Patente/Patentanmeldungen US-A-4876395, EP-A-0 252 683, EP-A-0 334 694 und US-A-4780405 beschreiben markierte Nucleinsäuren, die zu einer Ziel-Nucleinsäure komplementär sind und die an ihrem 3'-Ende blockiert sind. Keine dieser Referenzen jedoch beschreiben Oligonucleotide, die zwei Markierungen enthalten, wobei die Markierungen durch eine für eine Nuclease empfindliche Spaltstelle voneinander getrennt sind.

**[0006]** Andere Nachweisverfahren umfassen die Verwendung von Fragmentlängen-Polymorphismus (PCR-FLP), Hybridisierung an Allel-spezifische Oligonucleotid(ASO)-Sonden (Sails et al., 1986, Nature 324: 163) oder direkte Sequenzierung mittels des Didesoxy-Verfahrens unter Verwendung von amplifizierter DNA statt clonierter DNA. Die Standard-PCR-Technik arbeitet im Wesentlichen durch Replikation einer DNA-Sequenz, die zwischen zwei Primern liegt, und stellt als Hauptprodukt der Reaktion eine DNA-Sequenz spezieller Länge zur Verfügung, die mit dem Primer am 5'-Ende jedes Strangs endet. Somit resultieren Insertionen und Deletionen zwischen den Primern in Produktsequenzen verschiedener Längen, die durch Größenaufftrennung mittels PCR-FLP nachgewiesen werden können. In einem Beispiel einer ASO-Hybridisierung wird die amplifizierte DNA in einer Reihe von „Dotblots“ an einen Nylon-Filter fixiert (z. B. durch UV-Bestrahlung) und kann dann mit einer Oligonucleotidsonde, die mit HRP markiert ist, unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Nach Waschen werden Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid zugegeben: HRP katalysiert die Oxidation von TMB durch Wasserstoffperoxid zu einem löslichen, blauen Farbstoff, der ausgefällt werden kann, was die hybridisierte Sonde anzeigt.

**[0007]** Während die PCR-Technik, wie sie gegenwärtig praktiziert wird, ein äußerst leistungsfähiges Verfahren zur Amplifizierung von Nucleinsäuresequenzen ist, erfordert der Nachweis des amplifizierten Materials eine zusätzliche Manipulation und eine anschließende Bearbeitung des PCR-Produkts, um zu bestimmen, ob Ziel-DNA anwesend ist. Es wäre wünschenswert, die Zahl an anschließenden Bearbeitungsschritten, die ge-

genwärtig zum Nachweis des amplifizierten Materials erforderlich sind, herabzusetzen. Ein „homogenes“ Nachweisverfahren, das heißt, eines, das ein Signal erzeugt, während die Zielsequenz amplifiziert wird, und das minimale Bearbeitung nach der Amplifizierung erfordert, wäre ideal.

**[0008]** Ebenfalls offenbart ist ein Verfahren zum Nachweis einer Ziel-Nucleinsäuresequenz in einer Probe, wobei besagtes Verfahren umfasst:

- (a) Inkontaktbringen einer einzelsträngige Nucleinsäuren umfassenden Probe mit einem Oligonucleotid, das eine Sequenz enthält, die komplementär ist zu einem Bereich der Ziel-Nucleinsäure, und einem markierten Oligonucleotid, das eine Sequenz enthält, die komplementär ist zu einem zweiten Bereich des gleichen Ziel-Nucleinsäurestranges, aber nicht die Nucleinsäuresequenz einschließt, die durch das erste Oligonucleotid definiert ist, um unter Hybridisierungsbedingungen ein Gemisch von Duplexmolekülen zu erzeugen, wobei die Duplexmoleküle die Ziel-Nucleinsäure, angelagert an das erste Oligonucleotid und an das markierte Oligonucleotid, umfassen, so dass das 3'-Ende des ersten Oligonucleotids an das 5'-Ende des markierten Oligonucleotids angrenzt;
- (b) Beibehalten des Gemisches aus Schritt (a) mit einer matrizenabhängigen Nucleinsäurepolymerase, die eine 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität aufweist, unter Bedingungen, die ausreichen, um der 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität der Polymerase das Schneiden des angelagerten markierten Oligonucleotids und die Freisetzung von markierten Fragmenten zu erlauben; und
- (c) Nachweisen und/oder Messen der Freisetzung der markierten Fragmente.

**[0009]** Dieses Verfahren ist insbesondere geeignet zur Analyse von Nucleinsäure, die mittels PCR amplifiziert wurde. Dieses Verfahren ist eine Verbesserung gegenüber bekannten PCR-Nachweisverfahren, denn es erlaubt sowohl die Amplifizierung eines Ziels und die Freisetzung einer Markierung zur Durchführung eines Nachweises in einem Reaktionssystem ohne die Notwendigkeit vieler Bearbeitungsschritte des amplifizierten Produkts. Deshalb wird in einer anderen Ausführungsform ein Amplifikationsverfahren mittels Polymerase-Kettenreaktion zur gleichzeitigen Amplifikation und zum gleichzeitigen Nachweis einer Ziel-Nucleinsäuresequenz in einer Probe bereitgestellt. Dieses Verfahren umfasst:

- (a) Bereitstellen mindestens eines markierten Oligonucleotids, das eine Sequenz enthält, die komplementär ist zu einem Bereich der Zielnucleinsäure, für einen die Probe enthaltenden PCR-Test, wobei das markierte Oligonucleotid sich innerhalb der durch die Oligonucleotidprimer von Schritt (b) gebundenen Ziel-Nucleinsäuresequenz anlagert;
- (b) Bereitstellen eines Satzes von Oligonucleotidprimern, wobei ein erster Primer eine Sequenz enthält, die komplementär zu einem Bereich in einem Strang der Ziel-Nucleinsäuresequenz ist und die Synthese eines komplementären DNA-Strangs in Gang setzt, und ein zweiter Primer eine Sequenz enthält, die komplementär zu einem Bereich in einem zweiten Strang der Ziel-Nucleinsäuresequenz ist und die Synthese eines komplementären DNA-Strangs in Gang setzt; und wobei jeder Oligonucleotidprimer so ausgewählt ist, dass er sich an seine komplementäre Matrize stromaufwärts von jedem markierten Oligonucleotid anlagert, das an den gleichen Nucleinsäurestrang angelagert ist;
- (c) Amplifizieren der Ziel-Nucleinsäuresequenz unter Einsatz einer Nucleinsäurepolymerase mit 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität als ein matrizenabhängiges Polymerisationsmittel unter Bedingungen, die die PCR-Zyklussschritte (i) Anlagerung von Primern und markiertem Oligonucleotid an eine Matrizen-Nucleinsäuresequenz, die in einer Zielsequenz enthalten ist, und (ii) Verlängern der Primer erlauben, wobei die Nucleinsäurepolymerase ein Primerverlängerungsprodukt synthetisiert, während die 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität der Nucleinsäurepolymerase gleichzeitig markierte Fragmente von den angelagerten Duplexmolekülen freisetzt, die markiertes Oligonucleotid und seine komplementäre Matrizen-Nucleinsäuresequenz umfassen, wobei nachweisbare, markierte Fragmente erzeugt werden; und
- (d) Nachweisen und/oder Messen der Freisetzung von markierten Fragmenten, um die Anwesenheit oder Abwesenheit der Zielsequenz in der Probe zu bestimmen.

**[0010]** [Fig. 1](#) ist ein Autoradiogramm einer DEAE-Cellulose-Dünnschichtchromatographie(DC)-Platte, die die Freisetzung der markierten Fragmente aus der gespaltenen Sonde illustriert.

**[0011]** [Fig. 2](#) ist ein Autoradiogramm einer DEAE-Cellulose-DC-Platte, die die Thermostabilität der markierten Sonde zeigt.

**[0012]** [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) sind Autoradiogramme von DEAE-Cellulose-DC-Platten, die zeigen, dass die Menge an markiertem, freigesetztem Sondenfragment mit der Zunahme der PCR-Zykluszahl und der Anfangskonzentration der Matrizen-DNA korreliert.

**[0013]** [Fig. 4](#) zeigt die polymerisationsunabhängige 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase in

dem Autoradiogramm unter Verwendung einer Serie von Primern, die null bis 20 Nucleotide stromaufwärts der Sonde anlagern.

[0014] [Fig. 5](#) ist ein Autoradiogramm, das die Freisetzung der markierten Sondenfragmente bei wachsender Inkubationstemperatur und -zeit zeigt, wobei die Zusammensetzung des 5'-Endes der Sonde GC-reich ist.

[0015] [Fig. 6](#) ist ein Autoradiogramm, das die Freisetzung der markierten Sondenfragmente bei wachsender Inkubationstemperatur und -zeit zeigt, wobei die Zusammensetzung des 5'-Endes der Sonde AT-reich ist.

[0016] [Fig. 7](#) zeigt die Analyse mittels 5% Acrylamid-Gelelektrophorese eines HIV-Produkts von 142 Basenpaaren, das in der Anwesenheit oder Abwesenheit der markierten Sonde amplifiziert wurde.

[0017] [Fig. 8](#) ist eine Montage aus zwei Autoradiogrammen einer DC-Analyse von Aliquots eines PCR-Amplifizierungsprodukts, die zeigt, dass eine Freisetzung der Radiomarkierung eintritt, die mengenmäßig anwächst, wenn sowohl die Start-Matrize zunimmt als auch die Thermozyklen sich verlängern.

[0018] [Fig. 9](#) ist ein Schema für die Reaktion, bei der ein NHS-aktives Esterderivat von Biotin an das 3'-Amin einer Oligonucleotidsonde angefügt wird.

[0019] [Fig. 10](#) ist ein Schema für die Reaktion, bei der ein Biotinhydrazid verwendet wird, um eine Oligonucleotidsonde zu markieren, die ein 3'-Ribonucleotid hat.

[0020] [Fig. 11](#) ist ein Schema für die Markierung einer Oligonucleotidsonde mit Biotin unter Verwendung eines Biotin-Phosphoramidits.

[0021] [Fig. 12](#) zeigt ein Reagens zur Markierung von Oligonucleotidsonden mit Biotin.

[0022] [Fig. 13](#) zeigt eine Oligonucleotidsonde, die mit Rhodamin-X-590 und Kristallviolett markiert ist.

[0023] [Fig. 14](#) zeigt ein Schema für eine Reaktion, um ein aktives Acylazid von Kristallviolett zu bilden.

[0024] [Fig. 15](#) zeigt ein Schema für eine Reaktion, um ein Amin an ein Thymidin zur Verwendung zur Konjugation einer Markierung mit einer Oligonucleotidsonde anzufügen.

[0025] [Fig. 16](#) zeigt typische Ergebnisse und das Verhältnis von Signal zur eingesetzten Zahl an Zielmolekülen für das vorliegende Verfahren unter Verwendung von Bakerbond™ PEI Festphasen-Extraktionsmittel.

[0026] Wie hier verwendet bezieht sich eine „Probe“ auf jede Substanz, die eine Nucleinsäure enthält oder vermutlich enthält, und umfasst eine Probe von Gewebe oder Flüssigkeit, die von einem Individuum oder Individuen isoliert ist, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, zum Beispiel Haut, Plasma, Serum, Rückenmarksflüssigkeit, Lymphe, Synovialflüssigkeit, Urin, Tränen, Blutzellen, Organe, Tumore, und auch auf Proben von Bestandteilen von in vitro-Zellkulturen (einschließlich, aber nicht beschränkt auf konditioniertes Medium vom Wachstum von Zellen in einem Zellkulturmedium, rekombinante Zellen und Zellbestandteile).

[0027] Wie hier verwendet bezieht sich der Ausdruck „Nucleinsäure“, „Polynucleotid“ und „Oligonucleotid“ auf Primer, Sonden und Oligomerfragmente, die nachgewiesen werden sollen, Oligomerkontrollen und nicht markierte, blockierende Oligomere, und allgemein auf Polydesoxyribonucleotide (die 2-Desoxy-D-Ribose enthalten), Polyribonucleotide (die D-Ribose enthalten) und auf jede andere Art von Polynucleotid, das ein N-Glycosid einer Purin- oder Pyrimidinbase oder modifizierte Purin- oder Pyrimidinbasen ist. Es gibt keine vorsätzliche Längenunterscheidung zwischen den Begriffen „Nucleinsäure“, „Polynucleotid“ und „Oligonucleotid“, und diese Begriffe werden austauschbar verwendet. Diese Begriffe beziehen sich nur auf die Primärstruktur des Moleküls. Deshalb umfassen diese Begriffe doppel- und einzelsträngige DNA ebenso wie doppel- und einzelsträngige RNA. Das Oligonucleotid umfasst eine Sequenz von ungefähr mindestens 6 Nucleotiden, vorzugsweise mindestens etwa 10–12 Nucleotiden, und noch mehr bevorzugt mindestens etwa 15–20 Nucleotiden, die einem Bereich der bezeichneten Nucleotidsequenz entspricht. „Entsprechend“ bedeutet identisch mit oder komplementär zu der bezeichneten Sequenz.

[0028] Das Oligonucleotid ist nicht notwendigerweise physikalisch abgeleitet von irgendeiner existierenden oder natürlichen Sequenz, sondern kann in jeder Weise gewonnen werden, einschließlich chemischer Synthese, DNA-Replikation, reverse Transkription oder eine Kombination davon. Die Begriffe „Oligonucleotid“ oder

„Nucleinsäure“ bedeuten ein Polynucleotid von genomischer DNA oder RNA, cDNA, halbsynthetischem oder synthetischem Ursprung, das wegen seiner Herkunft oder wegen einer Manipulation: (1) nicht mit dem gesamten oder einem Teil des Polynucleotids assoziiert ist, mit dem es in der Natur assoziiert ist; und/oder (2) mit einem anderen Polynucleotid als in der Natur verknüpft ist; und (3) in der Natur nicht gefunden wird.

**[0029]** Da Mononucleotide bei der Bildung von Oligonucleotiden so zur Reaktion gebracht werden, dass das 5'-Phosphat eines Mononucleotid-Pentoserings mit dem 3'-Sauerstoff seines Nachbarn in einer Richtung mittels einer Phosphodiesterbindung verknüpft wird, wird ein Ende eines Oligonucleotids als das „5'-Ende“ bezeichnet, wenn sein 5'-Phosphat nicht mit dem 3'-Sauerstoff eines Mononucleotid-Pentoserings verknüpft ist, und als das „3'-Ende“, wenn sein 3'-Sauerstoff nicht mit dem 5'-Phosphat eines folgenden Mononucleotid-Pentoserings verknüpft ist. Wie hier verwendet, kann man auch von einer Nucleinsäuresequenz, selbst wenn im Innern eines größeren Oligonucleotids, sagen, dass sie 5'- und 3'-Enden hat.

**[0030]** Wenn zwei verschiedene, nicht überlappende Oligonucleotide an verschiedene Bereiche der selben linearen, komplementären Nucleinsäuresequenz anlagern und das 3'-Ende des einen Oligonucleotids zum 5'-Ende des anderen gerichtet ist, kann das erstere als das „Stromaufwärts“-Oligonucleotid und das letztere als das „Stromabwärts“-Oligonucleotid bezeichnet werden.

**[0031]** Der Begriff „Primer“ kann mehr als einen Primer betreffen und betrifft ein Oligonucleotid, entweder natürlich vorkommend, wie in einem gereinigten Restriktionsverdau, oder synthetisch hergestellt, welches in der Lage ist, als Ausgangspunkt der Synthese entlang eines Komplementärstrangs zu fungieren, wenn es unter Bedingungen gestellt wird, bei denen die Synthese eines Primerverlängerungsprodukts, das komplementär ist zu dem Nucleinsäurestrang, katalysiert wird. Solche Bedingungen umfassen die Anwesenheit von vier verschiedenen Desoxyribonucleosid-Triphosphaten und eines die Polymerisation induzierenden Agens, wie DNA-Polymerase oder reverse Transkriptase, in einem geeigneten Puffer („Puffer“ beinhaltet Bestandteile, die Kofaktoren sind, oder die den pH-Wert, die Ionenstärke, usw. beeinflussen) und bei geeigneter Temperatur. Der Primer ist für eine maximale Effizienz bei der Amplifizierung vorzugsweise einzelsträngig.

**[0032]** Das Komplementär einer Nucleinsäuresequenz, wie hier verwendet, betrifft ein Oligonucleotid, das, wenn es mit der Nucleinsäuresequenz so ausgerichtet ist, dass das 5'-Ende einer Sequenz gepaart ist mit dem 3'-Ende der anderen, in der „antiparallelen Assoziation“ ist. Gewisse Basen, die üblicherweise nicht in natürlichen Nucleinsäuren vorkommen, können von den Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung umfasst werden, zum Beispiel Inosin und 7-Deazaguanin. Die Komplementarität muss nicht perfekt sein; stabile Duplexmoleküle können falsch gepaarte Basenpaare oder nicht gepaarte Basen enthalten. Die Fachleute in der Nucleinsäuretechnologie können die Duplexmolekülstabilität empirisch bestimmen unter Berücksichtigung einer Zahl von Variablen, zum Beispiel die Länge des Oligonucleotids, die Basenzusammensetzung und die Sequenz des Oligonucleotids, die Ionenstärke und das Vorkommen falsch gepaarter Basenpaare.

**[0033]** Die Stabilität eines Nucleinsäureduplexmoleküls wird durch die Schmelztemperatur oder „ $T_M$ “ gemessen. Die  $T_M$  eines speziellen Nucleinsäureduplexmoleküls unter spezifischen Bedingungen ist die Temperatur, bei der die Hälfte der Basenpaare dissoziiert ist.

**[0034]** Wie hier verwendet betrifft der Begriff „Zielsequenz“ oder „Zielnucleinsäuresequenz“ den Bereich des Oligonucleotids, der entweder amplifiziert oder nachgewiesen werden soll, oder beides. Die Zielsequenz sitzt zwischen den beiden Primersequenzen, die für die Amplifikation verwendet werden.

**[0035]** Wie hier verwendet betrifft der Begriff „Sonde“ ein markiertes Oligonucleotid, das mit einer Sequenz in der Zielnucleinsäure eine Duplexstruktur aufgrund der Komplementarität zumindest einer Sequenz in der Sonde mit einer Sequenz in dem Zielbereich bildet. Die Sonde enthält vorzugsweise keine Sequenzkomplementarität mit (einer) Sequenz(en), die verwendet wird/werden, um die Polymerase-Kettenreaktion in Gang zu setzen. Generell wird das 3'-Ende der Sonde „blockiert“ sein, um den Einbau der Sonde in das Primerverlängerungsprodukt zu verhindern. Die „Blockierung“ kann erreicht werden durch Verwendung von nicht komplementären Basen oder durch Anfügen einer chemischen Gruppe, wie Biotin oder eine Phosphatgruppe, an das 3'-Hydroxyl des letzten Nucleotids, was in Abhängigkeit von der gewählten Gruppe, einem doppelten Zweck dienen kann, indem sie auch als Markierung für einen anschließenden Nachweis oder zum Einfangen der an die Markierung gebundenen Nucleinsäure fungiert. Die Blockierung kann auch erreicht werden durch die Entfernung des 3'-OH oder durch Verwendung eines Nucleotids ohne das 3'-OH, wie ein Didesoxynucleotid.

**[0036]** Wie hier verwendet betrifft der Begriff „Markierung“ jedes Atom oder Molekül, das zur Erzeugung eines nachweisbaren (vorzugsweise quantifizierbaren) Signals verwendet werden kann und das an eine Nucleinsäu-

re oder ein Protein gebunden werden kann. Markierungen können mittels Fluoreszenz, Radioaktivität, Kolorimetrie, Gravimetrie, Röntgenbeugung oder -absorption, Magnetismus, enzymatischer Aktivität und dergleichen nachweisbare Signale erzeugen.

**[0037]** Wie hier verwendet betrifft „5' → 3'-Nucleaseaktivität“ oder „5' zu 3'-Nucleaseaktivität“ die Aktivität einer Matrizen-spezifischen Nucleinsäurepolymerase, die entweder die 5' → 3'-Exonucleaseaktivität umfasst, die üblicherweise mit einigen DNA-Polymerasen assoziiert ist, wobei vom 5'-Ende eines Oligonucleotids in sequentieller Weise Nucleotide entfernt werden (d. h. E. coli DNA-Polymerase I besitzt diese Aktivität, während das Klenow-Fragment sie nicht besitzt), oder eine 5' → 3'-Endonucleaseaktivität, wobei die Spaltungen mehr als eine Phosphodiesterbindung (Nucleotid) vom 5'-Ende entfernt stattfinden, oder beides.

**[0038]** Wie hier verwendet betrifft der Begriff „benachbart“ die Positionierung des Primers in Bezug auf die Sonde auf seinem komplementären Strang der Matrizen-nucleinsäure. Der Primer und die Sonde können durch 1 bis etwa 20 Nucleotide voneinander entfernt sein, mehr bevorzugt etwa 1 bis 10 Nucleotide, oder können direkt aneinander stoßen, wie es bei einem Nachweis unter Verwendung eines polymerisationsunabhängigen Verfahrens wünschenswert sein kann. In einer anderen Ausführungsform kann die Nachbarschaft bei Verwendung in einem polymerisationsabhängigen Verfahren, wenn das vorliegende Verfahren bei den hier offenbarten PCR-Amplifikations- und Nachweisverfahren verwendet wird, an beliebiger Stelle innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz, an beliebiger Stelle stromabwärts von einem Primer sein, sodass die Primerverlängerung die Polymerase so positioniert, dass eine Spaltung der Sonde auftritt.

**[0039]** Wie hier verwendet betrifft der Begriff „thermostabile Nucleinsäurepolymerase“ ein Enzym, das gegenüber Hitze im Vergleich zum Beispiel mit Nucleotidpolymerasen von E. coli relativ stabil ist und das die Polymerisation von Nucleosidtriphosphaten katalysiert. Generell wird das Enzym die Synthese am 3'-Ende des an die Zielsequenz angelagerten Primers starten und wird in die 5'-Richtung an der Matrize entlang fortfahren, und, wenn es eine 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität hat, eine dazwischenliegende, angelagerte Sonde hydrolysieren und dabei sowohl markierte als auch nicht markierte Fragmente freisetzen, bis die Synthese beendet ist. Ein beispielhaftes thermostabiles Enzym, das von *Thermus aquaticus* (Taq) isoliert ist, ist beschrieben im US-Patent Nr. 4,889,818, und ein Verfahren zur Verwendung in der konventionellen PCR ist beschrieben in Saiki et al., 1988, *Science* 239: 487.

**[0040]** Taq-DNA-Polymerase hat eine von der DNA-Synthese abhängige, Strang-verdrängende 5' → 3'-Exonucleaseaktivität (siehe Gelfand, „Taq-DNA-Polymerase“ in *PCR Technology: Principles and Applications for DNA-Amplification*, Erlich, Hrsg., Stockton Press, N. Y. (1989), Kapitel 2). In Lösung findet wenig Abbau von markierten Oligonucleotiden statt, sofern er überhaupt stattfindet.

**[0041]** Die Durchführung der vorliegenden Erfindung wird, außer anders angezeigt, herkömmliche Verfahren der Molekularbiologie, der Mikrobiologie und der rekombinanten DNA-Technik verwenden, die zum Stand der Technik gehören. Solche Verfahren sind in der Literatur vollständig erklärt. Siehe, z. B. Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Zweite Ausgabe (1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, Hrsg., (1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins, Hrsg., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal, 1984), und eine Serie, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.). Alle hier erwähnten Patente, Patentanmeldungen und Veröffentlichungen sowohl vorstehend als auch nachstehend, werden hiermit durch Bezugnahme eingeschlossen.

**[0042]** Die verschiedenen Aspekte der Erfindung basieren auf einer speziellen Eigenschaft von Nucleinsäurepolymerasen. Nucleinsäurepolymerasen können verschiedene Aktivitäten besitzen, unter ihnen eine 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität, womit die Nucleinsäurepolymerase von einem Oligonucleotid, das an ein größeres, komplementäres Polynucleotid angelagert ist, Mononucleotide oder kleine Oligonucleotide abspalten kann. Damit die Abspaltung effizient verläuft, muss auch ein stromaufwärts gelegenes Oligonucleotid an dasselbe größere Polynucleotid angelagert sein.

**[0043]** Das 3'-Ende dieses stromaufwärts gelegenen Oligonucleotids stellt die anfängliche Bindungsstelle für die Nucleinsäurepolymerase bereit. Sobald die gebundene Polymerase das 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligonucleotids erreicht, kann die Polymerase davon Mononucleotide oder kleine Oligonucleotide abspalten. Die beiden Oligonucleotide können so geplant werden, dass sie sehr nahe an die komplementäre Ziel-nucleinsäure anlagern, sodass die Bindung der Nucleinsäurepolymerase an das 3'-Ende des stromaufwärts gelegenen Oligonucleotids sie automatisch mit dem 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligonucleotids in Kontakt bringt. Dieses Verfahren wird „polymerisationsunabhängige Spaltung“ genannt, da die Polymerisation nicht erforderlich ist, um die Nucleinsäurepolymerase in die Position zu bringen, in der sie die Spaltung vor-

nehmen kann.

**[0044]** Wenn die beiden Oligonucleotide in einer anderen Ausführungsform an weiter voneinander entfernte Bereiche der Matrizen-Zielnucleinsäure anlagern, muss Polymerisation erfolgen, bevor die Nucleinsäurepolymerase mit dem 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligonucleotids in Kontakt kommt. Bei fortschreitender Polymerisation, spaltet die Polymerase kontinuierlich Mononucleotide oder kleine Oligonucleotide vom 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligonucleotids ab. Diese Abspaltung geht weiter, bis der Rest des stromabwärts gelegenen Oligonucleotids in dem Maße destabilisiert worden ist, dass er von dem Matrizenmolekül dissoziiert. Dieses Verfahren wird „polymerisationsabhängige Spaltung“ genannt.

**[0045]** In der vorliegenden Erfindung sind zwei Markierungen an das stromabwärts gelegene Oligonucleotid gebunden. Sie sind durch eine Nuclease-empfindliche Spaltstelle getrennt. Außerdem handelt es sich um ein Paar interaktiver Signal-erzeugender Markierungen, die wirksam auf dem Oligonucleotid positioniert sind, um die Erzeugung eines nachweisbaren Signals zu quenchen. Daher können die abgespaltenen Mononucleotide oder kleinen Oligonucleotide, die durch die 5' → 3'-Nucleaseaktivität der Polymerase abgespalten werden, nachgewiesen werden.

**[0046]** Anschließend kann jede von mehreren Strategien angewendet werden, um die nicht gespaltenen, markierten Oligonucleotide von ihren gespaltenen Fragmenten zu unterscheiden. Auf diese Weise erlaubt die vorliegende Erfindung die Identifizierung der Nucleinsäureproben, die Sequenzen enthalten, die zu den stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Oligonucleotiden komplementär sind.

**[0047]** Die vorliegende Erfindung nutzt die 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität der Polymerase, wenn sie in Verbindung mit PCR verwendet wird. Dies unterscheidet sie von zuvor beschriebenen PCR-Amplifikationen, wobei die amplifizierten Ziel-Oligonucleotide nach der PCR zum Beispiel durch Hybridisierung mit einer Sonde nachgewiesen werden, die unter stringenten bis mäßig stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen ein stabiles Duplexmolekül mit der Zielsequenz bilden. Im Gegensatz zu diesen bekannten Nachweisverfahren, die nach den PCR-Amplifikationen verwendet werden, erlaubt die vorliegende Erfindung den Nachweis von Ziel-Nucleinsäuresequenzen während der Amplifikation dieser Ziel-Nucleinsäure. In der vorliegenden Erfindung wird zu Beginn der PCR ein markiertes Oligonucleotid gleichzeitig mit dem Primer zugegeben, und das Signal, das durch die Hydrolyse des/der markierten Nucleotids/Nucleotide gebildet wird, stellt ein Mittel zum Nachweis der Zielsequenz während seiner Amplifikation bereit.

**[0048]** Die Oligonucleotide der Erfindung sind jedoch kompatibel mit anderen Amplifikationssystemen, wie dem Transkription-Amplifikation-System, bei dem einer der PCR-Primer einen Promotor codiert, der verwendet wird, um RNA-Kopien der Zielsequenz herzustellen. In ähnlicher Weise kann die vorliegende Erfindung in einem sich selbst tragenden Sequenz-Replikationssystem (3SR) verwendet werden, bei dem eine Vielzahl von Enzymen verwendet wird, um RNA-Transkripte herzustellen, die dann verwendet werden, um DNA-Kopien zu machen, alles bei einer einzigen Temperatur. Durch Einbau einer Polymerase mit 5' → 3'-Exonucleaseaktivität in ein Ligase-Kettenreaktions(LCR)-System, zusammen mit geeigneten Oligonucleotiden, kann die vorliegende Erfindung auch zum Nachweis von LCR-Produkten verwendet werden.

**[0049]** Natürlich können die Oligonucleotide der vorliegenden Erfindung bei Systemen angewendet werden, die keine Amplifikation umfassen. In der Tat ist es für die Oligonucleotide der vorliegenden Erfindung nicht einmal erforderlich, dass Polymerisation erfolgt. Ein Vorteil des von der Polymerisation unabhängigen Verfahrens liegt in der Beseitigung der Notwendigkeit der Amplifikation der Zielsequenz. In Abwesenheit von Primerverlängerung ist die Zielnucleinsäure im Wesentlichen einzelsträngig. Unter der Voraussetzung, dass der Primer und das markierte Oligonucleotid benachbart an die Zielnucleinsäure gebunden sind, können aufeinanderfolgende Runden von Oligonucleotidanlagerung und Spaltung von markierten Fragmenten erfolgen. Somit kann eine ausreichende Menge von markierten Fragmenten erzeugt werden, was den Nachweis in der Abwesenheit von Polymerisation möglich macht. Das Signal, das während der PCR-Amplifikation erzeugt wird, könnte durch diese polymerisationsunabhängige Aktivität erhöht werden, was die Fachleute schätzen würden.

**[0050]** Bei jedem hier beschriebenen Verfahren wird eine Probe bereitgestellt, von der man annimmt, dass sie die spezielle Oligonucleotidsequenz von Interesse enthält, die „Zielnucleinsäure“. Die Zielnucleinsäure, die in der Probe enthalten ist, kann, falls erforderlich, erst in cDNA revers transkribiert und dann unter Verwendung eines beliebigen geeigneten Denaturierungsverfahrens denaturiert werden, einschließlich physikalischer, chemischer oder enzymatischer Mittel, die dem Fachmann bekannt sind. Ein bevorzugtes physikalisches Mittel zur Strangtrennung ist das Erhitzen der Nucleinsäure, bis sie vollständig (> 99%) denaturiert ist. Die typische Hitzedenaturierung umfasst Temperaturen, die sich im Bereich von etwa 80°C bis etwa 105°C bewegen, für Zeit-

spannen, die von wenigen Sekunden bis Minuten reichen. Als eine Alternative zur Denaturierung kann die Zielnucleinsäure in der Probe als einzelsträngige Form vorliegen, wie zum Beispiel einzelsträngige RNA- oder DNA-Viren.

**[0051]** Die denaturierten Nucleinsäurestränge werden dann mit vorab ausgewählten Oligonucleotidprimern und markiertem Oligonucleotid (hier auch als „Sonde“ bezeichnet) unter Hybridisierungsbedingungen inkubiert, Bedingungen, die die Bindung der Primer und der Sonden an die einzelsträngigen Nucleinsäuren erlauben. Wie im Stand der Technik bekannt, werden die Primer so ausgewählt, dass ihre relativen Positionen entlang der Duplexsequenz so sind, dass das Verlängerungsprodukt, das von einem Primer synthetisiert wird, als Matrize für die Verlängerung des anderen Primers dient, um eine Replikationskette definierter Länge zu ergeben, wenn das Verlängerungsprodukt von seiner Matrize (Komplement) getrennt wird.

**[0052]** Da die komplementären Stränge länger sind als sowohl Sonden als auch Primer, haben die Stränge mehr Kontaktpunkte und deshalb eine größere Chance, sich gegenseitig innerhalb eines gegebenen Zeitraums zu finden. Ein hoher molarer Überschuss an Sonde plus Primer hilft dabei, das Gleichgewicht mehr in Richtung der Anlagerung von Primer und Sonde zu verschieben als in Richtung einer Wiederzusammenlagerung der Matrize.

**[0053]** Der Primer muss lang genug sein, um die Synthese des Verlängerungsprodukts in der Gegenwart des Polymerisationsmittels in Gang zu setzen. Die genaue Länge und Zusammensetzung des Primers wird von vielen Faktoren abhängen, einschließlich Temperatur der Anlagerungsreaktion, Quelle und Zusammensetzung des Primers, Nähe der Anlagerungsstelle der Sonde zur Anlagerungsstelle des Primers und das Konzentrationsverhältnis Primer:Sonde. Zum Beispiel enthält der Oligonucleotidprimer in Abhängigkeit von der Komplexität der Zielsequenz typischerweise etwa 15–30 Nucleotide, obwohl ein Primer mehr oder weniger Nucleotide enthalten kann. Die Primer müssen ausreichend komplementär sein, um an ihre jeweiligen Stränge selektiv anzulagern und stabile Duplexmoleküle zu bilden.

**[0054]** Die hier verwendeten Primer werden so ausgewählt, dass sie im Wesentlichen komplementär zu den verschiedenen Strängen jeder spezifischen Sequenz sind, die amplifiziert werden soll. Die Primer müssen nicht die exakte Sequenz der Matrize widerspiegeln, aber müssen ausreichend komplementär sein, um selektiv mit ihren jeweiligen Strängen zu hybridisieren. Nicht komplementäre Basen oder längere Sequenzen können in den Primer eingestreut sein oder an den Enden der Primer gelegen sein, unter der Voraussetzung, dass der Primer ausreichend Komplementarität mit einem Matrizenstrang behält, um damit ein stabiles Duplexmolekül zu bilden. Die nicht komplementären Nucleotidsequenzen der Primer können Restriktionsenzymstellen enthalten.

**[0055]** Bei der Ausführung der Erfindung muss die markierte Oligonucleotidsonde erst an die komplementäre Nucleinsäure angelagert werden, bevor die Nucleinsäurepolymerase auf den Duplexbereich trifft und damit der 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität die Spaltung und Freisetzung der markierten Oligonucleotidfragmente erlaubt.

**[0056]** Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass das markierte Oligonucleotid an die komplementäre Nucleinsäure angelagert ist, bevor die Primerverlängerungs-Polymerisation den Duplexbereich erreicht oder bevor sich die Polymerase beim polymerisationunabhängigen Verfahren an das stromaufwärts liegende Oligonucleotid anlagert, können eine Reihe von Verfahren angewendet werden. Beim polymerisationabhängigen Verfahren kann man die Sonde so positionieren, dass das 5'-Ende der Sonde relativ weit vom 3'-Ende des Primers entfernt ist, um damit der Sonde mehr Zeit zur Anlagerung zu geben, bevor die Primerverlängerung die Bindungsstelle der Sonde blockiert. Kurze Primermoleküle erfordern im Allgemeinen niedrigere Temperaturen zur Bildung ausreichend stabiler Hybridkomplexe mit der Zielnucleinsäure. Deshalb können die markierten Oligonucleotide so geplant werden, dass sie länger sind als der Primer, sodass sich das markierte Oligonucleotid vorzugsweise bei höheren Temperaturen an das Ziel anlagert als der Primer.

**[0057]** Man kann auch Primer und markierte Oligonucleotide verwenden, die verschiedene thermische Stabilität haben. Zum Beispiel kann die Nucleotidzusammensetzung der markierten Oligonucleotide so ausgewählt werden, dass sie einen höheren G/C-Gehalt und folglich eine höhere thermische Stabilität haben als der Primer. In ähnlicher Weise kann man modifizierte Nucleotide in die Sonde einbauen, wobei die modifizierten Nucleotide Basenanaloga enthalten, die stabilere Basenpaare bilden als die Basen, die typischerweise in natürlich vorkommenden Nucleinsäuren anwesend sind.

**[0058]** Modifikationen der Sonde, die die Bindung der Sonde vor der Bindung der Primer erleichtern, um die Effizienz des vorliegenden Tests zu maximieren, umfassen den Einbau positiv geladener oder neutraler Phos-

phodiesterbindungen in die Sonde, um die Abstoßung der polyanionischen Rückgrate der Sonde und des Ziels zu vermindern (siehe Letsinger et al., 1988, J. Amer. Chem. Soc. 110: 4470); den Einbau von alkylierten oder halogenierten Basen, wie 5-Bromuridin, in die Sonde, um die Basenstapelung zu erhöhen; den Einbau von Ribonucleotiden in die Sonde, um das Sonde:Ziel-Duplexmolekül in eine „A“-Struktur zu zwingen, die erhöhte Basenstapelung hat; und den Austausch einiger oder aller Adenosine in der Sonde durch 2,6-Diaminopurin (Aminoadenosin). Bei der Herstellung solcher modifizierter Sonden der Erfindung sollte man erkennen, dass der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Duplexbildung die „Nucleation“, – die Bildung eines einzigen Basenpaars – ist, und deshalb kann die Änderung der biophysikalischen Charakteristik eines Teils der Sonde, zum Beispiel nur des 3'- oder 5'-Endbereichs, ausreichen, um das gewünschte Ergebnis zu erreichen. Da zusätzlich der 3'-Endbereich der Sonde (die terminalen 8 bis 12 3'-Nucleotide) nach dem Exonucleaseabbau des 5'-Endes durch die Polymerase dissoziiert, können Veränderungen des 3'-Endes ohne Bedenken vorgenommen werden, dass die Aktivität der Polymerase/Nuclease beeinträchtigt wird.

**[0059]** Die Thermozyklus-Parameter können ebenfalls variiert werden, um die verschiedene thermische Stabilität der markierten Oligonucleotide und Primer auszunutzen. Zum Beispiel kann nach dem Denaturierungsschritt im Thermozyklus eine intermediäre Temperatur eingeführt werden, die die Bindung der markierten Oligonucleotide zulässt, aber nicht die Bindung der Primer, und dann wird die Temperatur weiter abgesenkt, um das Anlagern der Primer und die Verlängerung zu erlauben. Man sollte jedoch beachten, dass die Abspaltung der Sonde für geeignete Ergebnisse nur in späteren Zyklen des PCR-Verfahrens auftreten darf. Daher könnte man die Reaktionsbedingungen so festlegen, dass, obwohl die Primer anfänglich bevorzugt an die Sonden binden, die Primerkonzentration durch die Primerverlängerung reduziert wird, sodass in späteren Zyklen die Sonden bevorzugt an Primer binden.

**[0060]** Um die Bindung des markierten Oligonucleotids vor dem Primer zu begünstigen, kann auch ein hoher molarer Überschuss an markiertem Oligonucleotid im Vergleich zum Primer verwendet werden. In dieser Ausführungsform bewegen sich die Konzentrationen an markiertem Oligonucleotid typischerweise in dem Bereich, der etwa 2- bis 20-fach höher als die entsprechende Primerkonzentration ist, welche üblicherweise  $0,5 - 5 \times 10^{-7}$  M ist. Die Fachleute erkennen, dass die Oligonucleotidkonzentration, -länge und die -Basenzusammensetzung alles wichtige Faktoren sind, die die  $T_m$  jedes einzelnen Oligonucleotids in dem Reaktionsgemisch beeinflussen. Jeder dieser Faktoren kann manipuliert werden, um eine thermodynamische Lage zu schaffen, die die Anlagerung der Sonde gegenüber der Anlagerung des Primers begünstigt.

**[0061]** Die Oligonucleotid-Primer und die markierten Oligonucleotide können mittels jedes beliebigen geeigneten Verfahrens hergestellt werden. Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotiden von spezifischer Sequenz sind im Stand der Technik bekannt und umfassen zum Beispiel Clonierung und Restriktion geeigneter Sequenzen und direkte chemische Synthese. Chemische Syntheseverfahren sind zum Beispiel das Phosphotriesterverfahren, beschrieben von Narang et al., 1979, *Methods in Enzymology* 68: 90, das Phosphodiesterverfahren, offenbart von Brown et al., 1979, *Methods in Enzymology* 68: 109, das Diethylphosphoramidatverfahren, offenbart in Beaucage et al., 1981, *Tetrahedron Letters* 22: 1859, und das Festphasenverfahren, offenbart im US-Patent Nr. 4,458,066.

**[0062]** Die Zusammensetzung des markierten Oligonucleotids kann geplant werden, um die Nucleaseaktivität gegenüber der Strangverdrängung (Mono- und Dinucleotidfragmente gegenüber Oligonucleotiden) durch Auswahl von Sequenzen, die GC-reich sind oder die aufeinanderfolgende A's und T's vermeiden und durch Wahl der Position der Markierung in der Sonde zu begünstigen. In der Anwesenheit von AT-reichen Sequenzen im komplementären 5'-Bereich der Sonde erfolgt die Spaltung nach ungefähr dem vierten, fünften oder sechsten Nucleotid. In einem GC-reichen 5'-Bereich der komplementären Sonde jedoch erfolgt die Spaltung im Allgemeinen nach dem ersten oder zweiten Nucleotid. In einer anderen Ausführungsform kann der Einbau von modifizierten Phosphodiesterbindungen (z. B. Phosphorothioat oder Methylphosphonate) in die markierte Sonde während der chemischen Synthese (Noble et al., 1984, *Nucl. Acids Res.* 12: 3387–3403; Iyer et al., 1990, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 1253–1254) verwendet werden, um die Spaltung an einer ausgewählten Stelle zu verhindern. In Abhängigkeit von der Länge der Sonde, der Zusammensetzung des komplementären 5'-Bereichs der Sonde und der Lage der Markierung kann man Sonden planen, um vorzugsweise die Bildung kurzer oder langer markierter Sondenfragmente zur Verwendung in der Durchführung der vorliegenden Erfindung zu begünstigen.

**[0063]** Das Oligonucleotid wird markiert, wie nachstehend beschrieben, durch Einbau von Gruppen, die durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische oder chemische Mittel nachweisbar sind. Das Verfahren der Bindung oder Konjugation der Markierung an die Oligonucleotidsonde hängt natürlich von der Art der verwendeten Markierungen und von der Lage der Markierung auf der Sonde ab.

**[0064]** Eine Vielzahl von Markierungen, die zur Verwendung bei der Erfindung geeignet wären, ebenso wie Verfahren für ihren Einbau in die Sonde, sind im Stand der Technik bekannt und umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Enzyme (z. B. alkalische Phosphatase und Meerrettich-Peroxidase) und Enzymsubstrate, radioaktive Atome, fluoreszierende Farbstoffe, Chromophore, chemilumineszierende Markierungen, elektrochemilumineszierende Markierungen, wie Origen<sup>TM</sup> (Igen), Liganden, die spezifische Bindungspartner haben, oder andere beliebige Markierungen, die miteinander Wechselwirken können, um ein Signal zu verstärken, ändern oder abzuschwächen. Wenn die PCR unter Verwendung eines Thermozyklus-Instruments durchgeführt wird, muss die Markierung natürlich in der Lage sein, die im Thermozyklus erforderlichen Temperaturen in diesem automatisierten Verfahren zu überleben.

**[0065]** Unter den radioaktiven Atomen wird <sup>32</sup>P bevorzugt. Verfahren zum Einbau von <sup>32</sup>P in Nucleinsäuren sind im Stand der Technik bekannt und umfassen zum Beispiel die 5'-Markierung mit einer Kinase oder die zufällige Insertion mittels der Nick-Translation. Enzyme werden typischerweise mittels ihrer Aktivität nachgewiesen. „Spezifischer Bindungspartner“ betrifft ein Protein, das in der Lage ist, mit hoher Spezifität an ein Ligandenmolekül zu binden, wie zum Beispiel im Falle eines Antigens und des zugehörigen monoclonalen Antikörpers. Andere spezifische Bindungspartner umfassen Biotin und Avidin oder Streptavidin, IgG und Protein A, und die zahlreichen Rezeptor-Liganden-Paare, die im Stand der Technik bekannt sind. Die vorstehende Beschreibung soll die verschiedenen Markierungen nicht in verschiedene Klassen kategorisieren, da dieselbe Markierung in verschiedener Weise verwendet werden kann. Zum Beispiel kann <sup>125</sup>I als radioaktive Markierung oder als Elektronendichte-Reagens dienen. HRP kann als Enzym oder als Antigen für einen monoclonalen Antikörper dienen. Darüber hinaus kann man für erwünschte Effekte verschiedene Markierungen kombinieren. Zum Beispiel könnte man eine Sonde mit Biotin markieren und die Anwesenheit der Sonde mit Avidin, das mit <sup>125</sup>I markiert ist oder mit einem monoclonalen Anti-Biotin-Antikörper, der mit HRP markiert ist, nachweisen. Andere Veränderungen und Möglichkeiten sind für den Durchschnittsfachmann offensichtlich und werden innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung als Äquivalente betrachtet.

**[0066]** Fluorophore zur Verwendung als Markierungen bei der Herstellung von markierten Sonden der Erfindung umfassen Rhodamin und seine Derivate, wie Texasrot, Fluorescein und seine Derivate, wie 5-Brommethyl-Fluorescein, Lucifergelb, IAEDANS, 7-Me<sub>2</sub>N-Coumarin-4-Acetat, 7-OH-4-CH<sub>3</sub>-Coumarin-3-Acetat, 7-NH<sub>2</sub>-4-CH<sub>3</sub>-Coumarin-3-Acetat (AMCA), Monobrombiman, Pyrentrisulfonate, wie Kaskadenblau, und Monobromtrimethylammoniumbiman. Generell werden Fluorophore mit einer weiten Stokes-Verschiebung bevorzugt, um die Verwendung von Fluorimetern mit Filtern statt eines Monochromators zuzulassen und die Effizienz des Nachweises zu erhöhen.

**[0067]** Die Markierungen sind zwei interaktive Markierungen auf einem einzelnen Oligonucleotid, wobei man bedenken muss, dass man einen geeigneten Abstand der Markierungen auf dem Oligonucleotid einhält, um die Trennung der Markierungen während der Oligonucleotidhydrolyse zuzulassen. Rhodamin und Kristallviolett sind bevorzugte interaktive Markierungen.

**[0068]** In einer anderen Ausführungsform kann der Nachweis der hydrolysierten, markierten Sonde unter Verwendung von zum Beispiel der Fluoreszenzpolarisation erfolgen, einem Verfahren, das zwischen großen und kleinen Molekülen unterscheiden kann und auf dem molekularen Taumeln basiert. Große Moleküle (z. B. intakte markierte Sonde) taumeln („tumble“) in Lösung viel langsamer als kleine Moleküle. Nach Bindung einer fluoreszierenden Gruppe an das Molekül von Interesse (z. B. das 5'-Ende der markierten Sonde) kann die fluoreszierende Gruppe auf dem molekularen Taumeln basierend gemessen (und unterschieden) werden, und so kann zwischen intakter und abgebauter Sonde unterschieden werden. Der Nachweis kann direkt während der PCR gemessen oder nach der PCR durchgeführt werden.

**[0069]** In noch einer anderen Ausführungsform werden zwei markierte Oligonucleotide verwendet, jedes komplementär zu getrennten Bereichen auf verschiedenen Strängen eines doppelsträngigen Zielbereichs, aber nicht zu dem anderen Oligonucleotid, sodass sich ein Oligonucleotid stromabwärts von jedem Primer anlagert. Zum Beispiel kann die Anwesenheit von zwei Sonden potentiell die Intensität des Signals verdoppeln, die von einer einzigen Markierung erzeugt wird und kann weiterhin dazu dienen, das Wiederausammenlagern des Produktstrangs zu verhindern, was häufig während der PCR-Amplifikation vorkommt. Die Sonden werden so ausgewählt, dass die Sonden an Positionen binden, die benachbart (stromabwärts) zu den Positionen sind, an die die Primer binden.

**[0070]** Man kann auch mehrere Sonden verwenden, um andere Vorteile zu erhalten. Man könnte zum Beispiel auf jede Zahl von Pathogenen in einer Probe einfach dadurch testen, dass man so viele Sonden wie gewünscht in das Reaktionsgemisch gibt; jede Sonde könnte eine unterschiedliche Markierung tragen, um den

Nachweis zu erleichtern.

**[0071]** Man kann auch eine Allel-spezifische oder Art-spezifische (d. h. spezifisch für die verschiedenen Arten von *Borrelia*, die Ursache der Lyme-Krankheit) Unterscheidung unter Verwendung von mehreren Sonden erreichen, zum Beispiel unter Verwendung von Sonden, die verschiedene  $T_m$  haben, und bei Durchführung der Anlagerungs-/Spaltungsreaktion bei einer Temperatur, die nur für ein Sonden/Allelduplexmolekül spezifisch ist. Zum Beispiel kann man ein Primerpaar auswählen, das sowohl HTLV I als auch HTLV II amplifiziert, und zwei Sonden verwenden, von denen jede einmalig und spezifisch für entweder HTLV I oder HTLV II markiert ist. Man kann auch eine Allel-spezifische Unterscheidung durch Verwendung einer einzigen Sonde und Untersuchung der erzeugten Spaltprodukte erreichen. In dieser Ausführungsform wird die Sonde so geplant, dass sie zumindest im 5'-Endbereich genau zu einem Allel, aber nicht zu dem/den anderen Allel/en komplementär ist. In Bezug auf das andere Allel/die anderen Allele wird die Sonde im 5'-Endbereich der Sonde Fehlpaarungen aufweisen, sodass ein Spaltprodukt erzeugt wird, das im Vergleich zu dem Spaltprodukt, das erzeugt wird, wenn die Sonde an das exakt komplementäre Allel hybridisiert, unterschiedlich ist.

**[0072]** Außer durch die Auswahl der Sequenz der Sonde können auch durch die Auswahl der Markierung(en) der Sonde wichtige Vorteile erzielt werden. Die Markierungen können mittels einer Vielzahl von Verfahren direkt oder indirekt an das Oligonucleotid gebunden werden. In Abhängigkeit vom genauen Typ der verwendeten Markierung kann die Markierung am 5'- oder 3'-Ende der Sonde lokalisiert sein, intern in der Sonde lokalisiert sein oder mittels Abstandshalter verschiedener Größen und Zusammensetzungen gebunden sein, um Signalwechselwirkungen zu erleichtern. Unter Verwendung kommerziell erhältlicher Phosphoramidit-Reagenzien kann man Oligomere herstellen, die funktionelle Gruppen (z. B. Thiole oder primäre Amine) an entweder dem 5'- oder 3'-Ende über ein geeignetes geschütztes Phosphoramidit enthalten, und man kann sie unter Verwendung von Protokollen markieren, die zum Beispiel in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., Hrsg. Academic Press, Inc., 1990) beschrieben sind.

**[0073]** Verfahren zur Einführung von Oligonucleotid funktionalisierenden Reagenzien zur Einführung von einer oder mehrerer Sulfhydryl-, Amino- oder Hydroxylgruppen in die Oligonucleotidsondensequenz, typischerweise am 5'-Ende, werden im US-Patent Nr. 4,914,210 beschrieben. Eine 5'-Phosphatgruppe kann unter Verwendung einer Polynucleotid-Kinase und Gamma-<sup>32</sup>P-ATP als ein Radioisotop eingeführt werden, um eine Reportergruppe zu ergeben. Biotin kann an das 5'-Ende durch Reaktion eines Aminothymidinrests oder eines 6-Aminohexylrests, der während der Synthese eingeführt wurde, mit einem N-Hydroxysuccinimidester von Biotin angefügt werden. Markierungen am 3'-Ende können terminale Polynucleotid-Transferasen zum Anfügen der gewünschten Gruppe verwenden, wie zum Beispiel Cordycepin-<sup>35</sup>S-dATP und biotinyliertes dUTP.

**[0074]** Oligonucleotidderivate sind ebenfalls verfügbare Markierungen. Zum Beispiel sind Etheno-dA und Etheno-A bekannt als fluoreszierende Adeninnucleotide, die in eine Oligonucleotidsonde eingebaut werden können. In ähnlicher Weise ist Etheno-dC oder 2-Aminopurin-Desoxyribosid ein anderes Analog, das bei der Sondensynthese verwendet werden könnte. Die Sonden, die solche Nucleotidderivate enthalten, können durch die 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität hydrolysiert werden, um, während die DNA-Polymerase während der PCR einen Primer verlängert, viel stärker fluoreszierende Mononucleotide freizusetzen.

**[0075]** Die matrizenabhängige Verlängerung des/der Oligonucleotidprimer(s) wird mittels eines polymerisierenden Mittels in der Gegenwart von geeigneten Mengen der vier Desoxyribonucleosid-Triphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) oder von Analoga, wie vorstehend diskutiert, in einem Reaktionsmedium katalysiert, das die geeigneten Salze, Metallkationen und pH-Puffersysteme enthält. Geeignete polymerisierende Mittel sind Enzyme, von denen bekannt ist, dass sie die Primer- und matrizenabhängige DNA-Synthese katalysieren und 5'- zu 3'-Nucleaseaktivität besitzen. Bekannte DNA-Polymerasen umfassen zum Beispiel *E. coli*-DNA-Polymerase I, *Thermus thermophilus*(Tth)-DNA-Polymerase, *Bacillus stearothermophilus*-DNA-Polymerase, *Thermococcus litoralis*-DNA-Polymerase und *Thermus aquaticus*(Taq)-DNA-Polymerase. Die Reaktionsbedingungen zur Katalyse der DNA-Synthese mit diesen DNA-Polymerasen sind im Stand der Technik wohl bekannt. Um bei der vorliegenden Erfindung von Nutzen zu sein, muss das polymerisierende Mittel die Oligonucleotide effizient spalten und markierte Fragmente freisetzen, sodass direkt oder indirekt ein Signal erzeugt wird.

**[0076]** Die Produkte der Synthese sind Duplexmoleküle, die aus dem Matrizenstrang und dem Primerverlängerungsstrang bestehen und die Zielsequenz einschließen. Nebenprodukte dieser Synthese sind markierte Oligonucleotidfragmente, die aus einem Gemisch von Mono-, Di- und größeren Nucleotidfragmenten bestehen. Wiederholte Zyklen von Denaturierung, Anlagerung von markiertem Oligonucleotid und Primer und Primerverlängerung und Spaltung des markierten Oligonucleotids resultieren in einer exponentiellen Anhäufung

des Zielbereichs, der durch die Primer definiert ist, und der exponentiellen Bildung von markierten Fragmenten. Eine ausreichende Anzahl an Zyklen wird durchgeführt, um eine nachweisbare Markierungsart zu erreichen, die um mehrere Größenordnungen größer sein kann als das Hintergrundsignal, obwohl bei der allgemeinen Praxis solch hohe Verhältnisse von Signalen zum Hintergrund möglicherweise nicht zu erreichen bzw. erwünscht sind.

**[0077]** In einem bevorzugten Verfahren wird der PCR-Prozess als automatisierter Prozess durchgeführt, der ein thermostabiles Enzym verwendet. Bei diesem Prozess durchläuft das Reaktionsgemisch zyklisch einen Denaturierungsschritt, einen Anlagerungsschritt von Sonde und Primer und einen Syntheseschritt, wobei Spaltung und Verdrängung sich simultan mit der Primer-abhängigen Matrizenverlängerung ereignen. Ein DNA-Thermocycler, wie das kommerziell erhältliche Gerät von Perkin-Elmer Cetus Instruments, das speziell für die Verwendung mit einem thermostabilen Enzym entwickelt ist, kann verwendet werden.

**[0078]** Temperaturstabile Polymerasen werden bei diesem automatisierten Verfahren bevorzugt, da der bevorzugte Weg der Denaturierung der doppelsträngigen Verlängerungsprodukte das Aussetzen gegen hohe Temperaturen (etwa 95°C) während des PCR-Zyklus ist. Zum Beispiel offenbart das US-Patent Nr. 4,889,818 ein repräsentatives thermostabiles Enzym, das aus *Thermus aquaticus* isoliert ist. Zusätzliche repräsentative temperaturstabile Polymerasen umfassen z. B. Polymerasen, die aus thermostabilen Bakterien, wie *Thermus flavus*, *Thermus ruber*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* (der ein etwas niedrigeres Temperaturoptimum hat als die anderen aufgelisteten), *Thermus lacteus*, *Thermus rubens*, *Thermotoga maritima*, *Thermococcus litoralis* und *Methanothermus fervidus* extrahiert sind.

**[0079]** Der Nachweis oder die Verifikation der markierten Oligonucleotidfragmente kann mittels einer Vielzahl von Verfahren durchgeführt werden und kann vom Ursprung der verwendeten Markierung oder Markierungen abhängig sein. Eine bequeme Ausführungsform ist die Anwendung der Größenanalyse auf die Reaktionsprodukte, einschließlich der gespaltenen markierten Fragmente. Verfahren zur Bestimmung der Größe der markierten Nucleinsäurefragmente sind im Stand der Technik bekannt und umfassen zum Beispiel Gelelektrophorese, Sedimentation in Gradienten, Gelausschlusschromatographie und Homochromatographie.

**[0080]** Während oder nach der Amplifikation kann die Abtrennung der markierten Fragmente von dem PCR-Gemisch zum Beispiel mittels Inkontaktbringen des PCR-Gemischs mit einem Festphasen-Extraktionsmittel (SPE) durchgeführt werden. Zum Beispiel können Materialien, die die Fähigkeit haben, aufgrund ihrer Größe, Ladung oder ihrer Wechselwirkung mit den Oligonucleotidbasen Oligonucleotide zu binden, zu dem PCR-Gemisch zugegeben werden, unter Bedingungen, bei denen markierte, ungespaltene Oligonucleotide gebunden werden und kurze, markierte Fragmente nicht gebunden werden. Solche SPE-Materialien umfassen Ionenaustauscherharze oder -kügelchen, wie die kommerziell erhältlichen Bindungspartikel Nensorb (DuPont Chemical Co.), Nucleogen (The Nest Group), PEI, BakerBond™ PEI, Amicon PAE 1,000, Selectacel™ PEI, Boronat-SPE mit einer 3'-Ribose-Sonde, SPE, das Sequenzen enthält, die zum 3'-Ende der Sonde komplementär sind, und Hydroxylapatit. In einer speziellen Ausführungsform, wenn ein zweifach markiertes Oligonucleotid als Signalmittel verwendet wird, das eine 3'-Biotin-Markierung umfasst, die von einer 5'-Markierung durch eine für Nuclease empfindliche Spaltstelle getrennt ist, kann das mittels PCR amplifizierte Gemisch mit Materialien in Kontakt gebracht werden, die spezifische Bindungspartner, wie Avidin oder Streptavidin enthalten, oder einen Antikörper oder einen monoklonalen Antikörper gegen Biotin. Solche Materialien können Kügelchen und Partikel umfassen, die mit spezifischen Bindungspartnern beschichtet sind, und können auch magnetische Partikel umfassen.

**[0081]** Nach dem Schritt, in dem das PCR-Gemisch mit einem SPE in Kontakt gebracht worden ist, kann das SPE-Material durch Filtration, Sedimentation oder magnetische Anziehung entfernt werden, wodurch man die markierten Fragmente frei von nicht gespaltenen markierten Oligonucleotiden lässt, sodass sie für den Nachweis verfügbar sind.

**[0082]** Reagenzien, die bei den offenbarten Verfahren verwendet werden, können in diagnostische Kits verpackt werden. Diagnostische Kits umfassen die markierten Oligonucleotide und die Primer in getrennten Behältnissen. Falls das Oligonucleotid nicht markiert ist, können die spezifischen Markierungsreagenzien ebenfalls im Kit enthalten sein. Der Kit kann auch andere, geeignet verpackte Reagenzien und Materialien, die zur Amplifikation erforderlich sind, zum Beispiel Puffer, dNTPs und/oder Polymerisationsmittel, und zur Nachweisanalyse zum Beispiel Enzyme und Festphasenextraktionsmittel ebenso wie Anweisungen zur Durchführung des Tests enthalten.

**[0083]** Die nachstehend aufgeführten Beispiele sind zur Erläuterung der verschiedenen Verfahren und Mittel

der Erfindung gedacht.

### Beispiel 1

#### Freisetzung der PCR-Sonden-Markierung

**[0084]** Es wurde eine PCR-Amplifikation durchgeführt, die das mit  $^{32}\text{P}$  markierte 5'-Ende einer komplementären Sonde freisetzte, wenn das spezifisch beabsichtigte Produkt synthetisiert wurde.

#### A. Markierung der Sonde mit Gamma $^{32}\text{P}$ -ATP und Polynucleotidkinase

**[0085]** Zehn pmol von jeder Sonde (BW31, BW33, BW35, Sequenzen werden nachfolgend zur Verfügung gestellt) wurden einzeln mit 15 Einheiten T4-Polynucleotidkinase (New England Biolabs) und 15,3 pmol Gamma- $^{32}\text{P}$ -ATP (New England Nuclear, 3000 Ci/mmol) in 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen, das 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM Spermidin und 0,1 mM EDTA enthält für 60 Minuten bei 37°C gemischt. Das gesamte Volumen wurde dann mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert, wie von Sambrook et al., Molecular Cloning, Zweite Ausgabe (1989) beschrieben. Die Sonden wurden in 100  $\mu\text{l}$  TE-Puffer resuspendiert und über eine Sephadex G-50 Spin-Dialyse-Säule laufen gelassen, um nicht eingebautes Gamma- $^{32}\text{P}$ -ATP zu entfernen, wie von Sambrook et al., vorstehend gelehrt. Die TCA-Präzipitation der Reaktionsprodukte ergab die folgenden spezifischen Aktivitäten:

BW31:	$1,98 \times 10^6$ CpM/pmol
BW33:	$2,54 \times 10^6$ CpM/pmol
BW35:	$1,77 \times 10^6$ CpM/pmol

**[0086]** Die Endkonzentration aller drei Sonden war 0,10 pmol/ $\mu\text{l}$ .

#### B. Amplifikation

**[0087]** Der amplifizierte Bereich war ein 350 Basenpaar-Produkt vom Bacteriophagen M13mp10w, das von den Primern BW36 und BW42 erzeugt wurde. Der Bereich jeder nummerierten Primersequenz, die hier bezeichnet ist, folgt der Verwendung der Standard M13-Nucleotidsequenz.

SEQ ID NO:1      BW36= 5' 5241-5268 3'  
5'-CCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGC-3'

SEQ ID NO:2      BW42= 5' 5591-5562 3'  
5'-GAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGC-3'

**[0088]** Drei verschiedene Sonden wurden verwendet; jede enthielt über 30 Basen die exakt komplementäre Sequenz zu M13mp10w, war aber unterschiedlich in der Länge des nicht komplementären 5'-Schwanzbereichs. Sonden wurden so synthetisiert, dass sie 3'- $\text{PO}_4$  hatten anstelle eines 3'-OH, um die Verlängerung mittels der Taq-Polymerase zu blockieren.

SEQ ID NO:3      BW31= 5' 5541-5512 3'  
5'-\*CGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCCGCGCX-3'

SEQ ID NO:4      BW33= 5' 5541-5512 3'  
5'-\*gatCGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCCGCGCGCX-3'

SEQ ID NO:5      BW35= 5' 5541-5512 3'  
5'-\*cgtcaccgatCGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCCGCGCX-3'

- X = 3'-Phosphat  
 a, t, g, c = zum Matrizenstrang nicht komplementäre Basen  
 \* = Gamma-<sup>32</sup>P-ATP-Markierung

**[0089]** Zur Amplifikation des 350 bp-Fragments wurden 10<sup>-3</sup> pmol der M13mp10w-Zielsequenz zu 50 µl Reaktionsvolumen zugegeben, das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol von jedem der Primer BW36 und BW42, 200 µM von jedem der vier Desoxyribonucleosid-Triphosphate, 1,25 Einheiten Taq-DNA-Polymerase und entweder 1, 10 oder 20 pmol der isotopisch verdünnten Sonden BW31, BW33 oder BW35 enthielt. Die Menge an radiomarkierter Sonde wurde pro Reaktion konstant bei 0,4 pmol gehalten und mit nicht radioaktiver Sonde auf 1, 10 oder 20 pmol verdünnt. Die Taq-Polymerase wurde mit 4 µl pro Reaktion bei 0,3125 U/µl zugegeben und verdünnt in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% NP40, 0,5% Tween 20 und 500 µg/ml Gelatine.

**[0090]** Ein Stamm-Reaktionsgemisch wurde hergestellt, das geeignete Mengen an Reaktionspuffer, Nucleosid-Triphosphaten, beiden Primern und Enzym enthielt. Von diesem Stamm-Gemisch wurden Aliquots entnommen, und zu ihnen wurden Matrize und verschiedene Konzentrationen von jeder Sonde zugegeben. Kontrollreaktionen bestanden darin, dass alle Reaktionskomponenten außer der Matrize und alle Reaktionskomponenten außer der Sonde zugegeben wurden. Jedes Reaktionsgemisch wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet, um das Verdampfen zu verhindern, für 45 Sekunden mikrozentrifugiert und dann in einen Thermo-Cycler gebracht. Die Reaktionsgemische wurden dem folgenden Amplifikationsschema unterworfen:

15 Zyklen:	96°C Denaturierung, 1 Min. 60°C Anlagerung/Verlängerung, 1,5 Min.
Ein Zyklus:	96°C Denaturierung, 1 Min. 60°C Anlagerung/Verlängerung, 5,5 Min.

**[0091]** Nach den Zyklen wurde das Mineralöl mit 50 µl Chloroform extrahiert, die Gemische wurden bei 4°C gelagert, und die folgenden Tests wurden durchgeführt.

### C. Analyse

**[0092]** Für die Acrylamid-Gelanalyse wurden 4 µl von jeder Amplifikationsreaktion mit 3 µl 5 × Gel-Beladungs-Mix (0,125% Bromphenolblau, 12,5% Ficoll 400 in H<sub>2</sub>O) gemischt und auf ein 4% Acrylamid-Gel (10 ml 10 × TBE-Puffer, 1 ml 10% Ammoniumpersulfat, 10 ml 40% Bis-Acrylamid 19:1, 50 µl TEMED und 79 ml H<sub>2</sub>O) in 1 × TBE-Puffer (0,089 M Tris, 0,089 M Borsäure und 2 mM EDTA) aufgetragen und 90 Minuten mit 200 Volt der Elektrophorese unterworfen. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid wurde die DNA mittels UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht.

**[0093]** Die Ergebnisse zeigten, dass die Anwesenheit von jeder der drei Sonden bei den verschiedenen Konzentrationen keine Auswirkung auf die Menge des gebildeten Amplifikationsprodukts hatte. Probespuren, die keine Sonde enthielten, zeigten getrennte Banden hoher Intensität von 350 Basenpaaren, die der erwünschten Sequenz entsprachen. Alle Spuren, die Sonde enthielten, zeigten dieselben, ebenso wie wenige schwache Banden bei leicht höherem Molekulargewicht. Kontrollspuren ohne zugegebene Matrize zeigte keinerlei Banden bei 350 Basen, nur Banden niedriger Intensität, die die Primer bei 30–40 Basen darstellten.

**[0094]** Nach der Photographie wurde das Gel auf Whatman-Papier übertragen, mit Saran Wrap bedeckt und autoradiographiert. Eine Übernachtexposition zeigte, dass 90–95% der Radiomarkierung nahe dem unteren Ende des Gels waren, wo die Sonde oder teilweise abgebaute Sonde laufen würde.

**[0095]** Für die Analyse im denaturierenden Gel wurden 2 µl von jeder Amplifikationsreaktion mit 2 µl Formamid-Ladepuffer (0,2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, 10 mg Bromphenolblau, 10 mg Xylolecyanol und 10 ml Formamid) gemischt, dann für 3–5 Minuten auf 96°C erhitzt und auf Eis gestellt. Die Proben wurden auf ein 6,2% denaturierendes Gradienten-Polyacrylamidgel (7 M Harnstoff mit sowohl einem Saccharose- als auch einem Puffergradienten) aufgetragen, entsprechend den Vorschriften von Sambrook et al., vorstehend. Das Gel wurde 90 Minuten mit 2000 Volt, 45 W, der Elektrophorese unterworfen, dann auf Whatman-Papier übertragen und autoradiographiert.

**[0096]** Die Ergebnisse von dem denaturierenden Gel zeigten, dass etwa 50% von jeder Sonde abgebaut waren zu kleineren markierten Fragmenten. Ungefähr 50%–60% der Impulse liegen im Bereich von 30–40 Basen, was der nicht abgebauten Sonde entspricht. Eine sehr schwache Bande ist für alle Amplifikationsreaktionen

bei 300 Basen sichtbar, was nahe legt, dass ein sehr kleiner Prozentsatz der Sonden eine 3'-PO<sub>4</sub>-Gruppe verloren oder nie besessen hat und verlängert worden ist. Der Rest der Impulse ist im Bereich von null bis 15 Basen. Die Auflösung auf solch einem Gel zeigt nicht die exakte Größe der Produkte, die mittels Homochromatographie-Analyse besser bestimmt werden kann.

**[0097]** Für die Homochromatographie-Analyse wurde 1 µl von jeder Probe im 1,2 cm-Abstand auf eine Polygram CEL 300 DEAE-Cellulosedünnschichtplatte von 20 × 20 cm aufgebracht, auf die vorher 5 µl gescherte Heringssamen-DNA (150 µg/ml) aufgebracht worden war, und trocknen gelassen. Nachdem die Probe trocken war, wurde die Platte in eine Wanne mit destilliertem H<sub>2</sub>O gebracht und das Wasser konnte gerade bis über die Probenauftragungsfläche laufen. Die Platte wurde dann in einem 70°C-Ofen in einen Glasentwicklungstank gebracht, der gefilterten Homo-Mix III (Jay et al., 1979, Nuc. Acid. Res. 1(3): 331–353) enthielt, eine Lösung von teilweise hydrolysiertes RNA, die 7 M Harnstoff enthält. Der Homo-Mix konnte mittels Kapillarwirkung bis zum oberen Ende der Platte laufen, zu welcher Zeit die Platte herausgenommen wurde, trocknen gelassen wurde, mit Saran Wrap bedeckt und dann autoradiographiert wurde.

**[0098]** Eine Übernachtexposition der Homochromatographieplatte zeigte auch, dass etwa 40% der Sonden zu kleineren Fragmenten abgebaut waren. Diese Fragmente waren sehr spezifisch in der Größe in Abhängigkeit von der Länge des nicht komplementären 5'-Schwanzes jeder Sonde. [Fig. 1](#) zeigt eine Autoradiographie der DC-Platte. Die Sonde BW31 (Spuren 1–3), die vollständig komplementär zu der M13mp10w-Matrize war, erzeugte markierte Fragmente, die vorwiegend eine bis zwei Basen lang waren. Die Sonde BW33 (Spuren 4–6), die im 5'-Bereich einen nicht komplementären Bereich von 3 Basen enthielt, setzte Produkte frei, die vorwiegend vier bis sechs Basen lang waren. BW35 (Spuren 7–9) hatte im 5'-Bereich einen nicht komplementären Schwanz von 10 Basen und setzte Produkte frei, die vorwiegend 12 bis 13 Basen lang waren. Spuren 10–12 sind Kontrollreaktionen, die entweder BW31, BW33 oder BW35 und alle PCR-Komponenten außer der Matrize nach 15 Zyklen enthielten. Während der DNA-Synthese ersetzte das Enzym die ersten ein oder zwei betroffenen Basenpaare und schnitt dann an dieser Stelle, was eine Endonuclease-ähnliche Aktivität anzeigte. Die Ergebnisse zeigen spezifische Sonden-Freisetzung in Übereinstimmung mit der Produktanhäufung bei der PCR.

## Beispiel 2

### Spezifität der Freisetzung von Sondenmarkierung

**[0099]** Die Spezifität der Freisetzung von markierter Sonde wurde mittels Durchführung einer PCR-Amplifikation unter Verwendung von DNA vom Bakteriophagen Lambda und Primern und einer Reihe von nicht komplementären Sonden nach Behandlung mit Kinase untersucht.

**[0100]** Der zu amplifizierende Bereich war ein Bereich von 500 Nucleotiden auf der DNA vom Bakteriophagen Lambda vom GeneAmp<sup>®</sup> DNA Amplifikation Reagent-Kit (Perkin-Elmer Cetus), flankiert von den Primern PCR01 und PCR02, ebenfalls vom GeneAmp<sup>®</sup> DNA-Kit.

SEQ ID NR:6      PCR01 = 5' 7131-7155 3'  
5'-GATGAGTTCGTGTCCGTACAACCTGG-3'

SEQ ID NR:7      PCR02 = 5' 7630-7606 3'  
5'-GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC-3'

**[0101]** Aliquots der selben drei markierten Sonden BW31, BW33 und BW35, die in Beispiel 1 identifiziert sind, wurden verwendet, von denen alle vollständig nicht komplementär zu der Zielsequenz waren.

**[0102]** Für die Amplifikation des 500 Basenpaarbereichs wurden 0,5 ng der Ziel-Lambda-DNA-Sequenz (Kontrollmatrize, Fabrikations-# 3269, 1 µg/ml, 1:10 verdünnt in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA und 10 mM NaCl als Stammlösung) zu 50 µl Reaktionsvolumen zugegeben, das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM von jedem der Primer PCR01 (Fabrikations-# 3355) und PCR02 (Fabrikations-# 3268), 200 µM von jedem der vier Desoxynucleosid-Triphosphate, 1,25 Einheiten Taq-DNA-Polymerase und entweder 2, 10 oder 20 pmol der isotopisch verdünnten Sonden BW31, BW33 oder BW35 enthielt. Die Menge an radioaktiv markierter Sonde wurde pro Reaktion konstant bei 0,4 pmol gehalten und mit nicht radioaktiver Sonde auf 1, 10 oder 20 pmol verdünnt. Die Taq-DNA-Polymerase wurde mit 4 µl pro Reaktion bei 0,3125 Einheiten/µl zugegeben und verdünnt in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% NP40, 0,5% Tween 20 und

500 µg/ml Gelatine.

**[0103]** Der Stamm-Reaktionsmix wurde wie vorstehend gelehrt hergestellt, gleichzeitig mit den Kontrollreaktionen minus Sonde oder minus Enzym. Die Reaktionsgemische wurden gemäß den Zyklus-Bedingungen von Beispiel 1B amplifiziert und dann wie folgt analysiert. Für die Acrylamid-Gelanalyse wurden 4 µl von jeder Amplifikationsreaktion, gemischt mit 3 µl 5 × Lademix, auf ein 4% Acrylamidgel in 1 × TBE-Puffer aufgetragen und 90 Minuten mit 200 Volt der Elektrophorese unterworfen. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid wurde die DNA mittels UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht.

**[0104]** Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von jeder Sonde bei jeder Konzentration keine Auswirkung hat auf die Menge des gebildeten Amplifikationsprodukts. Probenkontrollspuren, die keine Sonde enthielten, und alle Spuren, die eine Sonde enthielten, zeigten eine getrennte Bande hoher Intensität von 500 Basenpaaren, die der erwünschten Sequenz entsprachen. Kontrollspuren ohne zugegebenes Enzym zeigten keinerlei Produkt, sondern nur Banden niedriger Intensität, die die Primer und Sonden von etwa 30–40 Nucleotiden darstellten.

**[0105]** Die in [Fig. 2](#) bereitgestellte Homochromatographie-Analyse zeigt eine Übernachtexposition der Platte, bei der kein Abbau der Sonden beobachtet wurde. Alle Impulse waren am Ursprungspunkt lokalisiert und zeigten keine Freisetzung von markierten Fragmenten. Spuren 1–3 sind Reaktionen, die die Sonde BW31 enthalten; Spuren 4–6 umfassen die Sonde BW33; Spuren 7–9 umfassen die Sonde BW35; und Spuren 10–12 sind Kontrollreaktionen ohne Matrize. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Sonde nicht abgebaut wird, außer sie ist spezifisch an das Ziel gebunden, und dass sie in der Lage ist, den PCR-Zyklus-Bedingungen zu widerstehen.

**[0106]** In der denaturierenden Gelanalyse wurden 2 µl von jeder Amplifikationsreaktion gemischt mit 2 µl Formamid-Ladepuffer (beschrieben in Beispiel 1) und bei 96°C für 3–5 Minuten auf einen Heizblock gestellt. Unmittelbar danach wurden die Proben auf Eis gestellt und auf ein denaturierendes 6,2% Gradienten-Acrylamidgel geladen und für 90 Minuten mit 2.000 Volt der Elektrophorese unterworfen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman-Papier übertragen, mit Saran Wrap bedeckt und autoradiographiert.

**[0107]** Eine Übernachtexposition zeigte alle Impulse im Bereich von 30–40 Basenpaaren, entsprechend der Größe der Sonden. Erneut war kein Sondenabbau ersichtlich, was weiterhin bestätigte, dass die Sonde spezifisch an die Matrize gebunden sein muss, bevor ein Abbau stattfinden kann.

### Beispiel 3

#### Spezifität der Freisetzung von Sondenmarkierung in Gegenwart von genomischer DNA

**[0108]** In diesem Beispiel wurde die Spezifität der Freisetzung von Sondenmarkierung mittels der Durchführung einer PCR-Amplifikation in Gegenwart von abgebauter oder nicht abgebauter menschlicher genomischer DNA untersucht.

**[0109]** Nach Behandlung mit Kinase hatte die BW33-Sonde, die in diesem Experiment verwendet wurde, eine spezifische Aktivität von  $5,28 \times 10^6$  CpM/pmol, die mittels TCA-Präzipitation nach der Kinase-Reaktion bestimmt wurde. Der amplifizierte Bereich war der 350 Basenpaar-Bereich von M13mp10w, flankiert von den Primern BW36 und BW42. Die Sequenzen und Lagen der Primer sind in Beispiel 1 aufgelistet. Menschliche genomische DNA war von der Zelllinie HL60 und wurde nicht abgebaut oder durch Scheren in einer French Presse zu einer Durchschnittsgröße von 800 Basenpaaren abgebaut verwendet.

**[0110]** Jede 50 µl-Amplifikationsreaktion bestand aus  $10^2$  oder  $10^{-3}$  pmol M13mp10w-Zielsequenz, 1 µg entweder abgebauter oder nicht abgebauter genomischer HL60-DNA, die zugegeben war zu einem Gemisch, das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol von jedem der Primer BW36 und BW 42, 200 µM von jedem der vier Desoxyribonucleosid-Triphosphate, 1,25 Einheiten Taq-DNA-Polymerase und 10 pmol der isotopisch verdünnten Sonde BW33 enthielt.

**[0111]** Ein Stamm-Reaktionsmix wurde hergestellt, der geeignete Mengen an Reaktionspuffer, Nucleosid-Triphosphaten, Primern, Sonde und Enzym enthält. Aliquots wurde hergestellt und zu ihnen wurde M13mp10w-Matrize und/oder genomische DNA zugegeben. Kontrollreaktionen umfassten alle Reaktionskomponenten außer M13mp10w-Ziel-DNA oder alle Reaktionskomponenten außer genomischer DNA.

**[0112]** Jedes Reaktionsgemisch wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet, mikrozentrifugiert, und in einen

Thermo-Cycler gebracht. Die Reaktionsgemische wurden dem folgenden Amplifikationschema unterworfen:

Für 10,15 oder 20 Zyklen:	96°C Denaturierung, 1 Min. 60°C Anlagerung/Verlängerung, 1,5 Min.
Letzter Zyklus:	96°C Denaturierung, 1 Min. 60°C Anlagerung/Verlängerung, 5,5 Min.

**[0113]** Nach den Zyklen wurde das Mineralöl mit 50 µl Chloroform extrahiert, und die Proben wurden bei 4°C gelagert. Danach wurden die Proben mittels 4% Acrylamid-Gelelektrophorese und Homochromatographie-Analyse analysiert.

**[0114]** Für die Acrylamid-Gelanalyse wurden 4 µl von jedem Reaktionsgemisch mit 3 µl 5 × Gel-Beladungs-Mix gemischt, auf ein 4% Acrylamid-Gel in 1 × TBE-Puffer aufgetragen und 90 Minuten bei 220 Volt der Elektrophorese unterworfen. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid wurde die DNA mittels UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht.

**[0115]** In den Spuren, die den Kontrollproben entsprechen, die keine M13mp10w-Ziel-DNA enthielten, waren keine sichtbaren Produktbanden, was die Abwesenheit jeglicher Überkreuz-Verunreinigung mit M13mp10w anzeigte. Alle folgenden Spuren zeigten eine Bande bei 350 Basen, die der erwarteten Sequenz entspricht. Die Intensität der Bande war höher, wenn  $10^{-2}$  pmol M13mp10w Ziel-DNA statt  $10^{-3}$  pmol in der Abwesenheit oder Anwesenheit von genomischer DNA (abgebaut oder nicht abgebaut) anwesend waren. Die Intensität der Produktbande erhöhte sich mit steigender Zahl an Amplifikations-Zyklen. Zwanzig Zyklen produzierten eine Bande mit der doppelten Intensität der nach zehn Zyklen beobachteten, und 15 Zyklen erzeugten eine Bande mit dazwischenliegender Intensität. Die Menge an vorhandenem PCR-Produkt variierte mit der Menge an Ausgangs-Zielmatrize und der Zahl an Zyklen, und die Anwesenheit von 1 µg menschlicher genomischer DNA, ob abgebaut oder nicht abgebaut, zeigte keinerlei Effekt auf diese Produktbildung.

**[0116]** In der Homochromatographie-Analyse wurde 1 µl von jedem Reaktionsgemisch auf eine DEAE-Dünnschichtplatte aufgebracht und bei 70°C in eine Entwicklungskammer gebracht, die Homo-Mix III enthielt. Nach 90 Minuten wurde die Platte entfernt, trocknen gelassen, mit Saran Wrap bedeckt und autoradiographiert. Eine Übernachtexposition wird in **Fig. 3** gezeigt; in **Fig. 3A** zeigen die Spuren 1 bis 6 PCR-Reaktionszyklen in der Abwesenheit von M13mp10w-Matrizen-DNA, die abwechselnd abgebaute und nicht abgebaute HL60-DNA bei 10, 15 und 20 Zyklen enthielt; und die Spuren 7–12 sind Kontrollreaktionen in zweifacher Beladung, die M13mp10w-Matrizen-DNA ohne menschliche genomische DNA bei 10, 15 und 20 Zyklen enthielten. In **Fig. 3B** werden Reaktionen amplifiziert mit steigender Zyklenzahl in 5er Schritten, beginnend mit 10 Zyklen. Die M13mp10w-Matrizen-DNA-Konzentration bei den Reaktionen, die in den Spuren 1, 2, 5, 6, 9 und 10 gezeigt werden, ist  $10^{-2}$  pmol, während sie in den Spuren 3, 4, 7, 8, 11 und 12  $10^{-3}$  pmol ist. Die Reaktionen, die in den Spuren 1 bis 11 mit ungerader Zahl gezeigt werden, enthalten abgebaute menschliche genomische DNA, und die geraden Zahlen enthalten nicht abgebaute menschliche genomische DNA. Markierte Sondenfragmente wurden als zwei gut definierte Flecken gesehen, die mit einer Länge von etwa 4 und 5 Basen auf der Dünnschichtplatte wanderten. Wenn sich die Konzentration an Startmatrize und/oder die Zyklenzahl erhöhte, erhöhte sich auch die Menge an freigesetzten, markierten Sondenfragmenten. Die Anwesenheit oder Abwesenheit abgebauter oder nicht abgebauter menschlicher genomischer DNA störte oder erhöhte die Sonden-Hybridisierung und den Sonden-Abbau nicht.

**[0117]** Die Ergebnisse zeigen, dass erhöhte Mengen von freigesetzten, kleinen Sondenfragmenten in Übereinstimmung und gleichzeitig mit der Anhäufung von spezifischem Produkt im Verlauf eines PCR-Tests auftreten. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von entweder großen Mengen menschlicher genomischer DNA hoher Komplexität oder einer hohen Zahl von zufälligen DNA-„Enden“ hat keine Auswirkung auf die spezifische Produktanhäufung oder das Ausmaß der Sondenfreisetzung. Letztlich führt die Anwesenheit von großen Mengen menschlicher genomischer DNA hoher Komplexität nicht zu irgendeiner nachweisbaren Freisetzung von Sonden in der Abwesenheit einer spezifischen Produktanhäufung.

#### Beispiel 4

##### PCR mit 3'-markierten Sonden

**[0118]** Eine PCR-Amplifikation wurde durchgeführt, die eine hybridisierte, 3'-radiomarkierte Sonde in kleineren Fragmenten freisetzte, wenn die Sonde an die Matrize angelagert war. Die Sequenzen der Sonden waren wie folgt:

SEQ ID NO:8 DG46 = 5'5541-5512-3'  
5'-CGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGC-3'

SEQ ID NO:9 BW32 = 5'5541-5512-3'  
5'-gatCGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGC-3'

SEQ ID NO:10 BW34 = 5'5541-5512-3'  
5'-cgtcaccgatCGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGC-3'

#### A. Markierung der Sonden mit <sup>32</sup>P-Cordycepin und terminaler Transferase

**[0119]** Fünf pmol von jeder Sonde (DG46, BW32 und BW34) wurden einzeln mit 17,4 Einheiten terminaler Transferase (Stratagene) und 10 pmol [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-Cordycepin (Cordycepin: 3'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat, New England Nuclear, 5000 Ci/mmol, verdünnt 3 × mit ddATP [Pharmacia]) in einem 17,5  $\mu$ l-Reaktionsvolumen, das 100 mM Kaliumcacodylat, 25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM CoCl<sub>2</sub> und 0,2 mM Dithiothreitol enthielt, für 60 Minuten bei 37°C gemischt. Das gesamte Volumen wurde dann mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die Sonden wurden in 50  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert und über eine Sephadex G-50 Spindialysesäule laufen gelassen gemäß der Vorschrift von Sambrook et al., Molecular Cloning, vorstehend. Die Endkonzentration an Sonden war 0,1 pmol/ $\mu$ l. Die TCA-Präzipitation der Reaktionsprodukte ergab die folgenden spezifischen Aktivitäten:

DG46:	$2,13 \times 10^6$ CpM/pmol
BW32:	$1,78 \times 10^6$ CpM/pmol
BW34:	$5,02 \times 10^6$ CpM/pmol

**[0120]** Der Vergleich der Analyse mit denaturierendem Gradientengel der 3'-radiomarkierten Sonden mit den 5'-Kinase-behandelten Sonden BW31, BW33 und BW35 zeigt, dass die 3'-radiomarkierten Sonden in ähnlicher Weise laufen wie die 5'-radiomarkierten Sonden.

**[0121]** Wieder war der amplifizierte Bereich der 350 Basen-Bereich von M13mp10w, der durch die Primer BW36 und BW42 definiert wird. Die Sequenzen und Lagen der Primer sind in Beispiel 1 aufgelistet. Jedes Amplifikationsgemisch wurde hergestellt durch Zugabe von  $10^{-3}$  pmol der M13mp10w-Ziel-DNA zu 50  $\mu$ l Reaktionsvolumen, das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol von jedem der Primer BW36 und BW 42, 200  $\mu$ M von jedem der vier Desoxyribonucleosidtriphosphate, 1,25 Einheiten Taq-DNA-Polymerase und entweder 2, 10 oder 20 pmol der isotopisch verdünnten Sonde DG46, BW32 oder BW34 enthielt.

**[0122]** Ein Stamm-Reaktionsmix wurde hergestellt, der die geeigneten Mengen an Reaktionspuffer, Nucleosidtriphosphaten, Matrize und Enzym enthielt. Aliquots wurden hergestellt und zu ihnen wurden die geeigneten Mengen an Primer und Sonden zugegeben. Die Kontrollreaktionen umfassten alle Reaktionskomponenten außer Primer, und alle Reaktionskomponenten außer einer Sonde.

**[0123]** Die Reaktionsgemische wurden mit 50  $\mu$ l Mineralöl überschichtet, mikrozentrifugiert und in einen Thermo-Cycler gebracht. Das Amplifikationsschema war wie folgt:

15 Zyklen:	96°C Denaturierung, 1 Min. 60°C Anlagerung/Verlängerung, 1,5 Min.
Letzter Zyklus:	96°C Denaturierung, 1 Min. 60°C Anlagerung/Verlängerung, 5,5 Min.

**[0124]** Nach den Zyklen wurde das Mineralöl mit 50  $\mu$ l Chloroform extrahiert, und die Proben wurden bei 4°C gelagert.

**[0125]** Die Proben wurden analysiert mittels eines 4% Acrylamidgels, eines denaturierenden 8% Gradienten-Acrylamidgels und Homochromatographie. Für alle drei Analysen war die Handhabung der Reaktionsgemische wie vorstehend beschrieben.

**[0126]** In der 4% Acrylamidgel-Analyse war in allen Reaktionsgemischen außer in den Kontrollreaktionen mi-

nus Primer eine scharfe Bande sichtbar, die dem gewünschten Produkt von 350 Basen entsprach. In allen Reaktionsgemischen, die sowohl Primer als auch Sonde enthielten, war eine zweite Bande bei etwa 300 Basen sichtbar. Diese zweite Bande wurde mit steigender Sondenkonzentration intensiver und entsprach vermutlich der Sonde, die entweder nicht effizient 3'-radiomarkiert war oder die die 3'-Markierung verloren hatte, was die Verlängerung der Sonde und die Erzeugung eines Produkts zuließ.

**[0127]** Eine Übernachtexposition des denaturierenden 8% Gradienten-Acrylamidgels zeigte eine Verteilung der Produkte, die von Sonden voller Größe bis zu weniger als 15 Basen bei allen drei Sonden, die mitgelaufen waren, reichte. Wie zu erwarten, baute die 5'-3'-Nucleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase die Sonde bis zu einem Punkt ab, wo die abgebaute Sonde von der Matrize dissoziierte.

**[0128]** Die weite Größenverteilung der Produkte veranschaulichte die kontinuierlich wechselnden Konzentrationen der Reaktanden und die Temperaturveränderungen während der PCR-Zyklen. Solche Variationen würden zu Veränderungen in den Anlagerungskinetiken von Sonde und Enzym führen, was dazu führt, dass die Sonde in einer Vielzahl von Größen zu verschiedenen Zeiten bei dem routinemäßigen Zyklusablauf dissoziiert.

**[0129]** Die Homochromatographieplatte zeigte, dass das kleinste Produkt bei allen untersuchten Sonden etwa 10 bis 12 Basen lang war. Da alle drei Sonden eine identische Sequenz außer am 5'-Schwanzbereich hatten, zeigt dieses Ergebnis, dass für diese spezifische Sondensequenz bei einer Anlagerungs-/Verlängerungstemperatur von 60°C die Sonde bis auf etwa 10 Basen abgebaut wurde und dann von der Matrize dissoziierte.

#### Beispiel 5

Von der Polymerisation unabhängige 5'-3'-Nucleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase

**[0130]** Die Taq-DNA-Polymerase war in der Lage, das <sup>32</sup>P-markierte 5'-Ende einer hybridisierten Sonde freizusetzen, wenn sie mittels eines stromaufwärts gelegenen Primers in der Nähe dieser Sonde positioniert war. Eine Reihe von Primern wurde geplant, die zwischen null und 20 Basen stromaufwärts von der hybridisierten Sonde BW33 nach der Kinasereaktion lagen. Diese Primer sind nachstehend gezeigt.

BW37 SEQ ID NO:11	Delta-0 5'5571-5542 3' 5'-GCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCA-3'
BW38 SEQ ID NO:12	Delta-1 5'5572-5543 3' 5'-GGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTC-3'
BW39 SEQ ID NO:13	Delta-2 5'5573-5544 3' 5'-GGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGT-3'
BW40 SEQ ID NO:14	Delta-5 5'5576-5547 3' 5'-AGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGC-3'
BW41 SEQ ID NO:15	Delta-10 5'5581-5552 3' 5'-AAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGT-3'
BW42 SEQ ID NO:16	Delta-20 5'5591-5562 3' 5'-GAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGC-3'

**[0131]** Etwa 0,5 pmol der Sonde BW33 und 0,5 pmol von jedem der Primer wurden an 0,5 pmol M13mp10w in 10,5 µl Reaktionsvolumen, das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, und 3 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt, angelagert. Kontrollreaktionsgemische enthielten entweder 20 µM oder 200 µM von jedem der vier Desoxynucleosidtriphosphate. Ein zusätzlicher Primer, DG47, der 530 Basen stromaufwärts von der Sonde liegt, wurde verwen-

det.

DG47 SEQ ID NO:17 Delta-530 5'6041-6012 3'  
5'-CGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCG-3'

**[0132]** Reaktionsgemische wurden für 1 Minute auf 98°C erhitzt und bei 60°C 30 Minuten angelagert. Die Röhrchen wurden dann mikrozentrifugiert und bei 70°C in ein Wasserbad gestellt. Nach ausreichender Zeit für die Einstellung der Temperatur der Reaktionsgemische wurden 10, 5, 2,5, 1,25 oder 0,3125 Einheiten Taq-DNA-Polymerase zugegeben, und 4 µl-Aliquots wurden nach 2, 5 und 10 Minuten entnommen. Das Enzym wurde durch Zugabe von 4 µl 10 mM EDTA zu jedem Aliquot und Stehenlassen bei 4°C inaktiviert. Die Reaktionsgemische wurden mittels Homochromatographieanalyse untersucht.

**[0133]** Bei der Homochromatographieanalyse wurde 1 µl von jeder Probe auf DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten aufgebracht und in eine Entwicklungskammer gebracht, die Homo-Mix III bei 70°C enthielt. Den Homo-Mix ließ man zum oberen Ende jeder Platte laufen; zu diesem Zeitpunkt wurden die Platten herausgenommen, getrocknet, mit Saran Wrap bedeckt und autoradiographiert. [Fig. 4](#) zeigt die Ergebnisse dieses Experiments.

**[0134]** In [Fig. 4](#) enthalten die Spuren 1 bis 3 radiomarkierte Oligonucleotide als Molekulargrößenmarker mit 6, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 Nucleotiden. Die Spuren 4–10 zeigen die Reaktionen für die Primer BW37, BW38, BW39, BW40, BW41, BW42 beziehungsweise DG47 in Abwesenheit von dNTPs. Die Spuren 11–24 zeigen die Kontrollreaktionen für alle Primer in Anwesenheit von 20 mM oder 200 mM dNTP.

**[0135]** In Abwesenheit von dNTPs erzeugte die Taq-DNA-Polymerase markierte Sondenfragmente unter Verwendung aller Primer, wobei beträchtlich weniger Markierung freigesetzt wurde, wenn sich der Abstand Primer-Sonde vergrößerte. Dieser Effekt wurde bei allen untersuchten Enzymkonzentration (0,3125 U bis 10 U/Reaktion) und zu allen Zeitpunkten gesehen. Die Größen der freigesetzten Fragmente waren gleich, etwa zwei und drei Basen lang; die Hauptart variierte jedoch in Abhängigkeit vom zugegebenen Primer. Die Hauptart, die durch die Primer Delta null und Delta zwei freigesetzt wurde, war eine Base kleiner als die von den Primern Delta eins, fünf, 10 und 20 freigesetzte. Die Nucleaseaktivität war polymerisationsunabhängig und abhängig vom Abstand.

**[0136]** In Gegenwart von Nucleosidtriphosphaten waren die Größen der freigesetzten markierten Sondenfragmente und der relative Anteil von jedem für alle untersuchten Primer identisch. Auch die Größen der Produkte waren ein bis zwei Basen größer, wenn dNTPs anwesend waren. Es kann sein, dass das Enzym, während es die Polymerisierung durchführte, es einen „fliegenden Start“ hatte und beim Auftreffen auf die hybridisierte Sonde gleichzeitig ein bis zwei Basen verdrängte und dann schnitt und damit ein größeres Fragment erzeugte.

**[0137]** Es gab keinen nachweisbaren Unterschied bei der Menge von freigesetztem Produkt, wenn die dNTPs jeweils zu 20 µM oder 200 µM vorhanden waren, und keine wesentlichen Unterschiede aufgrund von Verlängerungszeiten oder Enzymkonzentrationen in der Gegenwart von dNTPs waren ersichtlich.

#### Beispiel 6

Beispiel, um die Beschaffenheit des freigesetzten Produkts, basierend auf der Sondensequenz am 5'-Ende, zu veranschaulichen

**[0138]** Der Effekt starker oder schwacher Basenpaarung am komplementären 5'-Bereich einer Sonde auf die Größe des freigesetzten Produkts wurde untersucht. Die zwei Sonden BW50 und BW51 wurden so geplant, dass sie entweder eine GC-reichen oder AT-reichen komplementären 5'-Bereich hatten. BW50 und BW51 wurden mit der Sonde BW33 verglichen, die in Beispiel V verwendet wurde.

SEQ ID NO:18 BW50 = 5'5521-5496 3'  
5'-tatCCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACA-3'

SEQ ID NO:19 BW51 = 5'5511-5481 3'  
5'-gcaTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGG-3'

a, t, g, c = Basen, die zum Matrizenstrang nicht komplementär sind

**[0139]** BW50, BW51 und BW33 wurden mit  $^{32}\text{P}$ -ATP unter Verwendung von Polynucleotidkinase markiert und hatten die folgenden spezifischen Aktivitäten:

BW50:	$1,70 \times 10^6$ CpM/pmol
BW51:	$2,22 \times 10^6$ CpM/pmol
BW33:	$1,44 \times 10^6$ CpM/pmol

**[0140]** Die Endkonzentration aller drei Sonden war 0,10 pmol/μl.

**[0141]** 0,5 pmol von entweder der Sonde BW50, BW51 oder BW33 und 0,5 pmol von Primer BW41 wurden einzeln an 0,5 pmol von M13mp10w in 10,5 μl Reaktionsvolumen angelagert, das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 μM von jedem der vier Desoxynucleosidtriphosphate enthielt. Kontrollproben enthielten alle Reaktionskomponenten außer der Matrize. Für den Anlagerungsschritt wurden die Reaktionsgemische für 1 Minute auf 98°C erhitzt und dann für 30 Minuten bei 60°C angelagert. Die Röhrchen wurden dann mikrozentrifugiert und bei 50°C, 60°C oder 70°C in ein Wasserbad gestellt. Nach ausreichender Zeit für die Einstellung der Temperatur der Reaktionsgemische wurden 0,3125 Einheiten an Taq DNA-Polymerase zugegeben. Vier μl-Aliquots wurden nach 1, 2 und 5 Minuten entnommen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 4 μl 10 mM EDTA zu jedem Aliquot und Stehenlassen bei 4°C inaktiviert. Die Proben wurden mittels HPLC analysiert, und die Ergebnisse werden in den [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) gezeigt.

**[0142]** [Fig. 5](#) zeigt die Reaktionen, die die GC-reiche Sonde BW50 enthalten. Die Spuren 1 bis 3 enthalten Oligonucleotide als Molekulargrößenmarker mit 6, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 Nucleotiden. Die Spuren 4–6 zeigen Verlängerungsreaktionen, die bei 50°C für 1, 2 und 5 Minuten durchgeführt wurden. Die Spuren 7–9 zeigen Verlängerungsreaktionen, die bei 60°C für 1, 2 und 5 Minuten durchgeführt wurden. Die Spuren 10–12 zeigen Reaktionen, die bei 70°C für 1, 2 und 5 Minuten durchgeführt wurden. Die Spuren 13–15 sind Kontrollreaktionen, die alle Komponenten außer der Matrize enthalten, inkubiert bei 70°C für 1, 2 und 5 Minuten.

**[0143]** [Fig. 6](#) zeigt die Reaktionen, die die AT-reiche Sonde BW51 enthalten. Wie in [Fig. 5](#) sind die Spuren 1 bis 3 Oligonucleotide als Molekulargrößenmarker mit 6, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 Nucleotiden. Die Spuren 4–6 sind Verlängerungsreaktionen, die bei 50°C für 1, 2 und 5 Minuten durchgeführt wurden. Die Spuren 7–9 sind Reaktionen, die bei 60°C für 1, 2 und 5 Minuten durchgeführt wurden. Die Spuren 10–12 sind Reaktionen, die bei 70°C für 1, 2 und 5 Minuten durchgeführt wurden. Die Spuren 13–15 sind Kontrollreaktionen, die alle Komponenten außer der Matrize enthalten, inkubiert bei 70°C für 1, 2 und 5 Minuten.

**[0144]** Die Ergebnisse zeigen, dass die Natur der Sondenmarkierungsfreisetzung abhängig war von der Temperatur und der Basenzusammensetzung am 5'-Ende. Die stabilere GC-reiche Sonde BW50 zeigte bei 50°C eine geringe Freisetzung der Markierung ([Fig. 5](#), Spuren 4–6) und zunehmend mehr bei 60°C ([Fig. 5](#), Spuren 7–9) und 70°C ([Fig. 5](#), Spuren 10–12). Die hauptsächlich freigesetzten Produkte waren 3–5 Basen lang. BW51, das am 5'-Ende AT-reich war, zeigte bei 50°C ([Fig. 6](#), Spuren 4–6) das gleiche Ausmaß an Freisetzung von Markierung, wie sie bei den höheren Temperaturen beobachtet wurde. Zusätzlich bildete die AT-reiche Sonde größere Produkte als die GC-reiche Sonde. Die Basenzusammensetzung der AT-reichen Sonde mag Gelegenheit geben zu einer größeren „Atmungs“-Kapazität und daher eine stärkere Sondenverdrängung vor dem Schneiden bei niedrigeren Temperaturen als die GC-reiche Sonde zulassen.

#### Beispiel 7

#### HIV-Einfang-Test

**[0145]** Das Folgende ist ein Beispiel für die Verwendung einer zweifach markierten Sonde, die Biotin enthält, in einer PCR, um die Anwesenheit einer Zielsequenz nachzuweisen. Zwei Oligonucleotide, BW73 und BW74, jedes komplementär zu einem Bereich des HIV-Genoms, wurden mit einem an das 3'-Ende des Oligonucleotids gebundenen Biotinmolekül synthetisiert. Das 5'-Ende jedes Oligonucleotids wurde zusätzlich mit  $^{32}\text{P}$  unter Verwendung von Polynucleotidkinase und Gamma- $^{32}\text{P}$ -ATP markiert. Die beiden Oligonucleotide PH7 und PH8 sind ebenfalls komplementär zum HIV-Genom, flankieren den Bereich, der eine Homologie zu den beiden Sondenoligonucleotiden enthält und können als PCR-Primer dienen, wobei sie ein Produkt von 142 Basen definieren. Die Sequenzen dieser Oligonucleotide werden nachstehend gezeigt.

SEQ ID NO:20 BW73 = <sup>32</sup>P-GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT-Y

SEQ ID NO:21 BW74 = <sup>32</sup>P-gtgGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT-Y

SEQ ID NO:22 PH7 = AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT

SEQ ID NO:23 PH8 = TGCTATGTCAGTTCCCCTTGGTTCTCT

**[0146]** In den Sequenzen steht „Y“ für Biotin, und kleingeschriebene Buchstaben stehen für Basen, die zum Matrizenstrang nicht komplementär sind.

**[0147]** Eine Reihe von 50 µl Polymerasekettenreaktionen wurden konstruiert, die entweder BW73 oder BW74, jeweils doppelt markiert, als Sondenoligonucleotide mit 2 nM enthielten. Zusätzlich wurde die HIV-Matrize in der Form eines Plasmidclons mit entweder 10<sup>2</sup> oder 10<sup>3</sup> Kopien pro Reaktion zugegeben, und die Primeroligonucleotide PH7 und PH8 wurden mit jeweils 0,4 µM zugegeben. Taq-Polymerase wurde mit 1,25 U pro Reaktion und dNTPs mit jeweils 200 µM zugegeben. Jede Reaktion wurde mit 50 µl Öl überschichtet, kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, um sämtliche Flüssigkeit am Boden des Röhrchens zu sammeln, und die Thermozyklen wurden bei 95°C und 60°C für 30, 35 oder 40 Zyklen mit 60 Sekunden Dauer bei jeder Temperatur durchgeführt. Am Ende der Thermozyklen wurde jede Reaktion mit 50 µl CHCl<sub>3</sub> extrahiert und die flüssige Phase gesammelt.

**[0148]** Jede Reaktion wurde auf Amplifikation durch Auftragen von 3 µl auf ein 5% Acrylamid-Elektrophoresegele untersucht und auf das erwartete 142-Basenpaarprodukt überprüft. Zusätzlich wurde 1 µl von jeder Reaktion mittels DC-Homochromatographie auf DEAE-Celluloseplatten untersucht. Letztlich wurde jede Reaktion weiterhin durch Inkontaktbringen des restlichen Volumens mit 25 µl einer Suspension von 10 mg/ml Streptavidin-markierten, superparamagnetischen DYNABEADS M-280-Polystyrol-Kügelchen untersucht. Nach der Reaktion mit den Kügelchen wurde das Gemisch durch Filtration durch einen Costar Spin X-Zentrifugenfilter getrennt, das Filtrat gesammelt und die Anwesenheit von freigesetzter Radiomarkierung bestimmt.

**[0149]** Fig. 7 enthält Bilder von den zwei verwendeten Gelen und zeigt, dass das 142-Basenpaarprodukt bei allen Reaktionen mit und ohne Sonde auftritt, und in der Menge ansteigt, wenn sowohl die Startmatrize von 10<sup>2</sup> auf 10<sup>3</sup> Kopien erhöht wurde als auch die Thermozyklen von 30 auf 35 und 40 Zyklen weitergeführt wurden.

**[0150]** Fig. 8 ist eine Zusammensetzung aus zwei Autoradiogrammen der DC-Analyse von Aliquots der PCRs, die zeigen, dass eine Freisetzung von Radiomarkierung in steigenden Mengen sowohl bei zunehmender Startmatrize als auch längerem Thermozyklus auftritt. In der ersten DC von PCRs mit BW73 enthalten die Spuren 1 und 3 radiomarkierte Oligonucleotide von 2 und 3 Basen Länge als Größenstandards. Die Spuren 4, 5 und 6 enthalten Proben von PCRs mit 10<sup>2</sup> Startkopien an Matrize und die Spuren 7, 8 und 9 mit 10<sup>3</sup> Startkopien. Bei den Proben in den Spuren 4 und 7 wurden 30 Thermozyklen durchgeführt; 35 Thermozyklen in den Spuren 5 und 8; und in den Spuren 6 und 9 wurden 40 Thermozyklen durchgeführt. In der zweiten DC von PCRs mit BW74 sind die Spuren 1 und 2 das radiomarkierte Dimer und Trimer; die Spuren 4, 5 und 6 enthalten Proben von PCRs mit 10<sup>2</sup> Startkopien an Matrize, die 30, 35 beziehungsweise 40 Thermozyklen unterworfen wurden und die Spuren 7, 8 und 9 enthaltenen Proben von PCRs mit 10<sup>3</sup> Startkopien an Matrize, die 30, 35 beziehungsweise 40 Thermozyklen unterworfen wurden. Die Größe der freigesetzten Markierung ist kleiner mit BW73, das keine nicht-komplementären 5'-Basen hat, und größer mit BW74, das 5' eine nicht-komplementäre Verlängerung von drei Basen hat.

**[0151]** Jedes Chromatogramm wurde zusätzlich mittels zweidimensionaler Radioisotopen-Bildgebung unter Verwendung eines Ambis-Zählers analysiert. Die Ergebnisse der Ambis-Zählung und der Kügelchen-Einfangzählung werden in Tabelle 1 gezeigt. Die gute Übereinstimmung bei den beiden Messverfahren der Freisetzung von Sonde zeigt die Praktikabilität der Verwendung von markierten biotinylierten Sonden und avidinylierten Kügelchen in der PCR zur Bestimmung der Produktbildung.

Tabelle 1

	Zahl an Zyklen	freigesetzte Markierung	
		Ambis	Einfang
BW73	30	6,9	10,8
10 <sup>2</sup> Kopien	35	29,0	32,7
	40	47,2	47,2
10 <sup>3</sup> Kopien	30	11,8	16,8
	35	35,6	39,3
	40	53,4	52,5
BW74	30	8,3	7,9
10 <sup>2</sup> Kopien	35	20,7	25,2
	40	43,2	48,3
10 <sup>3</sup> Kopien	30	15,7	14,7
	35	32	37,7
	40	46	47,9

Beispiel 8

## Sondenmarkierung und Methode mit Festphasenextraktionsmitteln

**[0152]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird nach der Spaltung der Sonde, aber vor der Bestimmung der Menge der gespaltenen Sonde ein Trennschritt eingeführt, um die Produkte der gespaltenen Sonde von der nicht gespaltenen Sonde abzutrennen. Zwei alternative Trennverfahren werden bevorzugt: (1) die Verwendung von avidinylierten oder streptavidinylierten magnetischen Partikeln zur Bindung von Sonden, die am 3'-Ende mit Biotin und am 5'-Ende mit einem Fluorophor markiert sind; die magnetischen Partikel binden sowohl die nicht gesplattene Sonde als auch das 3'-Fragment, das das Produkt der Spaltung der Sonde ist; und (2) die Verwendung von magnetischen Ionenaustauscherpartikeln, die Oligonucleotide binden, aber nicht Mono- oder Dinucleotide, die typischerweise am 5'-Ende mit einem Fluorophor oder <sup>32</sup>P markiert sind. Verschiedene Aspekte dieser alternativen Strategien werden nachstehend diskutiert.

## A. Avidinylierte magnetische Partikel

**[0153]** Das Trennsystem, das 3'-biotinylierte Sonden und magnetische avidinylierte (oder streptavidinylierte) Kügelchen umfasst, wird vorzugsweise mit Kügelchen wie Dynabeads™ von Dynal durchgeführt; diese Kügelchen haben eine Bindungskapazität für Biotin von etwa 100 pmol pro 50 µl Kügelchen. Die nicht spezifische Adsorption wird durch vorherige Behandlung der Kügelchen mit Denhardt's Lösung und Träger-DNA minimiert.

**[0154]** Die Sonde für die Streptavidin-Biotin-Trennverfahren erfordert eine Biotingruppe am 3'-Ende und ein Fluorophor am 5'-Ende. Das 3'-Biotin fungiert sowohl als Ligand für die Trennung mittels streptavidinylierter (oder avidinylierter) Kügelchen und als ein Block, um die Verlängerung der Sonde während der Amplifikation zu verhindern. Die Modifikationen nach der Synthese können durch Verlängerung jedes Endes der Sonde mit einem anderen Nucleophil vereinfacht werden; zum Beispiel kann man an das 3'-Ende ein Amin zur Anfügung von Biotin und an das 5'-Ende ein blockiertes Thiol für die spätere Anfügung des Fluorophors anfügen. Die 3'-biotinylierten Sonden können auf unterschiedliche Weisen hergestellt werden, von denen nachstehend einige beschrieben werden.

**[0155]** Ein NHS-aktives Esterderivat von Biotin kann mittels des in [Fig. 9](#) gezeigten Reaktionsmechanismus an das 3'-Amin der Sonde angefügt werden. Die resultierende Bindung schafft eine sekundäre Hydroxylgruppe in Gamma-Stellung zu der Amid-Carbonylgruppe, was während der wiederholten Thermozyklen einer normalen PCR zu einer Instabilität führen kann. Zum Beispiel können Thermozyklen von 40 Zyklen dazu führen, dass sogar 6% der anfänglich zugegebenen Sonde nicht magnetische, avidinylierte Partikel binden. Wenn die Bindung zwischen der Sonde und dem gebundenen Biotin als Ergebnis der Thermozyklen zusammenbricht, kann die Sonde nicht mehr von den Spaltprodukten getrennt werden und trägt zum Hintergrund bei. Obwohl man dazu beitragen kann, dieses Problem zu überwinden, indem man mehr als ein Biotin an die Sonde bindet, kön-

nen mehrere alternative Verfahren zur Bindung von Biotin an ein Oligonucleotid stabilere Produkte ergeben.

**[0156]** Man kann Biotin-Hydrazid mit Aldehyden zur Reaktion bringen, die von einer 3'-Ribose an der Sonde gebildet wurden, um biotinylierte Oligonucleotide zu erhalten. Für diese Strategie enthält das 3'-Nucleotid der Sonde einen Ribose-Zucker anstelle eines Desoxyribose-Zuckers. Während der Synthese wird die 3'-Ribose mit entweder ihrem 2'- oder ihrem 3'-OH an den festen Träger gebunden. Nach der Synthese wird das fertiggestellte Oligonucleotid von dem festen Träger freigesetzt, und die benachbarten Diolgruppen der Ribose werden mittels Natriumperjodat ( $\text{NaIO}_4$ ) zu Aldehyden oxidiert, die dann mit dem Biotin-Hydrazid zur Reaktion gebracht werden, wie in [Fig. 10](#) gezeigt, und das Produkt wird mittels Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) reduziert. Die resultierende biotinylierte Sonde bindet jedoch nicht effizient an die avidinylierten magnetischen Partikel. Die Verwendung von langkettigem Biotin-Hydrazid, einer auch in [Fig. 10](#) gezeigten Verbindung, kann dieses Problem lösen.

**[0157]** Man kann das Biotin während der Synthese der Sonde an die Sonde unter Verwendung eines löslichen Biotin-Phosphoramidits binden, wie in [Fig. 11](#) gezeigt. Die Synthese beginnt mit der Bindung einer Base an kontrolliert poröses Glas (CPG – controlled porous glass), die letztlich freigesetzt wird. Ein Phosphoramidit wird angefügt, welches bei der Ammoniumhydroxid-Schutzgruppenabspaltung von dem synthetischen Oligonucleotid die Bildung eines 3'-Phosphats erlaubt. Dann wird das Biotin-Phosphoramidit angefügt, und das synthetisierte Oligonucleotid ist so, wie in [Fig. 11](#) – die auch das Endprodukt darstellt – gezeigt. Dieses Verfahren der Bindung erlaubt die Verwendung von Oligonucleotiden, die am 5'-Ende ein Amin haben, für die Bindung eines Fluorophors. Die Verwendung eines 3'-Amins für die Bindung von Biotin beschränkt die Chemie der Bindung eines Fluorophors auf 5'-Thiolgruppen. Die Verwendung von Biotin-Phosphoramiditen, bei denen einer der Biotin-Stickstoffe blockiert ist, kann die Synthese der Biotin-markierten Sonde verbessern.

**[0158]** Man kann auch ein kommerzielles Reagens verwenden, das aus Biotin besteht, das direkt an poröses Glas gebunden ist; das Reagens ist das Startsubstrat für die Synthese der Sonde und wird in [Fig. 12](#) gezeigt. Dieses Verfahren der Bindung erlaubt die Verwendung von Oligonucleotiden mit einem Amin am 5'-Ende für die Bindung des Fluorophors. Die Verwendung eines 3'-Amins für die Bindung von Biotin beschränkt die Chemie der Bindung eines Fluorophors auf 5'-Thiolgruppen. Enzymatische Verfahren für die Bindung von modifizierten Nucleotiden an das 5'-Ende von Oligonucleotiden stehen auch zur Verfügung, sind aber in ihrer generellen Anwendbarkeit und Durchführbarkeit begrenzt.

## B. Magnetische Ionenaustauschermatrizen

**[0159]** Man kann kommerziell erhältliche Polyethylenimin(PEI)-Matrizen(auf der Basis von Cellulose-, Silica- und Polyol-Polymer)-Partikel verwenden, um gespaltene von nicht gespaltener Sonde zu trennen. Zum Beispiel sind Hydrophase PEI, Selectacel™ PEI, Bakerbond™ PEI und Amicon PAE 300, 1000 und 1000L kommerziell erhältliche PEI-Matrizen, die eine Trennung von nicht gespaltener Sonde von gespaltenen Sondenprodukten ergeben.

**[0160]** Kommerziell erhältliche magnetische Partikel mit aktivierter Cellulose, wie Cortex MagaCell™-Partikel, können mit PEIs von verschiedener Länge, wie PEI600, PEI1800 und PEI10000, und mit verschiedenen molaren Verhältnissen von PEI pro Gramm Matrix derivatisiert werden. Jedoch binden alle Größen von Oligonucleotiden und Cumarin-markierten Oligonucleotiden an magnetische Cellulose- und Agarose-Kügelchen, ob sie mit PEI derivatisiert worden sind oder nicht (die Spezifität, die man mit Oligonucleotiden auf kommerziell erhältlichen PEI-Matrizen sieht, geht verloren, wenn man die Oligonucleotide mit Cumarin markiert). Die Zugabe von hohen Konzentrationen an Salz (2,0 M NaCl) oder N-Methyl-Pyrrolidon (10–20%) erhöht zum Teil die Spezifität, und andere gleichzeitig verwendete Lösungsmittel wie SDS, Brij 35, Guanidin und Harnstoff, können ebenfalls verwendet werden, um die Spezifität der Bindung zu erhöhen. 8 M Harnstoff jedoch führt zu einem effektiven Blockieren der nicht spezifischen Bindung von Cumarin-markierten Di- und Trinucleotiden an sowohl Bakerbond™ PEI als auch magnetische PEI-derivatisierte Cortex™-Partikel, obwohl die Verwendung von N-substituierten Harnstoffen stärker bevorzugt sein kann.

**[0161]** Wie vorstehend festgehalten, verkauft Cortex Biochem eine Vielzahl von aktivierten, Cellulose-beschichteten, magnetischen Partikeln, die an PEI gebunden werden können. Die geeignetste von diesen ist die durch Perjodat aktivierte Matrix. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll zur Bindung von Aminen an die durch Perjodat aktivierte Matrix hat jedoch mehrere Probleme: die Reaktion eines Amins mit einem Aldehyd resultiert in Iminen, die labil sind und hydrolysiert werden können oder mit Aminen weiterreagieren können; während des Schrittes des Blockierens der restlichen Aldehydgruppen durch die Zugabe eines Überschusses an Ethanolamin kann PEI durch Ethanolamin ersetzt werden, wodurch PEI von der Matrix verdrängt wird; wäh-

rend der Konjugationsreaktion unter basischen Bedingungen kann die Aldol-Kondensation zur Reaktion unter den Aldehydgruppen führen, woraus eine Aggregation der Partikel resultiert; und die Reaktion von Aldehyden unter basischen Bedingungen kann in freien Radikalen resultieren, die Cellulose angreifen können und an einer Vielzahl von Reaktionen teilnehmen können.

**[0162]** Um das Imin zu stabilisieren, kann ein Reduktionsschritt (mit  $\text{NaBH}_4$  und  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) eingebaut werden; dieser Schritt kann jedoch in einer Produktion von Gas resultieren, in einer Abnahme der Masse der Partikel und in einer Partikel-Agglutination. Diese unerwünschten Effekte können aus der Produktion von freien Radikalen resultieren. Die Komplikationen, die aus der Konjugation mit aktivem Aldehyd resultieren, können durch die Verwendung der Epoxid-Chemie vermieden werden. Die resultierenden Beta-Hydroxyamine sind stabil und erfordern keine Reduktion. Da zusätzlich Sauerstoff an der Bildung von freien Radikalen beteiligt sein kann, sollte die Entfernung von Sauerstoff aus dem System die Bildung von freien Radikalen minimieren, insbesondere während des Reduktionsschritts. In einer Synthese von PEI-derivatisierten, Cellulose-beschichteten, magnetischen Partikeln wurde der Blockierungsschritt mit Ethanolamin eliminiert und das Gemisch über Nacht mit Helium vor und während Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid gespült. In der endgültigen Herstellung war wenig Aggregation.

**[0163]** Magnetische Partikel aus Polyacrolein können sowohl mit PEI600 als auch mit Ethylendiamin derivatisiert werden, und die nicht spezifische Bindung von Cumarin-markierten Di- und Trinucleotiden kann durch hohe Konzentrationen an NMP inhibiert werden. Die Verwendung von länger-kettigen PEI-Polymeren kann die nicht spezifische Wechselwirkung des Gerüsts mit kleinen, Cumarin-markierten Oligonucleotiden maskieren.

**[0164]** Ein wichtiger Faktor bei der Auswahl einer magnetischen Matrix zur Verwendung bei dem vorliegenden Verfahren ist die Menge an Hintergrundfluoreszenz, die von der Matrix beigetragen wird. Eine Strategie zur Minimierung dieser Hintergrundfluoreszenz ist die Auswahl eines Fluorophors mit Anregungs- und Emissionsmaxima, die nur minimal mit den Spektren der Hintergrundfluoreszenz von Puffer, Matrix und klinischen Proben überlappen. Zusätzlich kann der fluoreszierende Hintergrund auch aus der Anwesenheit von Verunreinigungen in der Matrix resultieren, die durch intensive Vorbehandlung vor der Bindung entfernt werden könnten.

### C. Chemie der Bindung des Fluorophors an die Sonde

**[0165]** Wie vorstehend festgehalten ist die bevorzugte Markierung für die Sonde, unabhängig von der Trennungsstrategie, ein Fluorophor. Es scheint eine Wechselwirkung zwischen der Oligonucleotidsonde und dem gebundenen Fluorophor zu geben. Diese Wechselwirkung kann verantwortlich sein für das belegte Quenching, das beobachtet wird, wenn Fluorophore an Oligonucleotide gebunden worden sind. Man sollte Fluorophore auswählen, die minimal mit DNA Wechselwirken, wenn sie an das 5'-Ende der Nucleinsäure gebunden sind.

**[0166]** Drei bevorzugte Fluorophore sind 7-Diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcumarin (CPM), 6-(Brommethyl)-fluorescein (BMF), Lucifergelb-jodacetamid (LYIA) und 5-(und 6-)Carboxy-X-rhodamin-succinimidyl-ester, wobei CPM wegen mehrerer Eigenschaften bevorzugt wird: großer Extinktionskoeffizient, große Quantenausbeute, geringe Ausbleichung und große Stokes-Verschiebung. Das Fluorophor kann durch eine Thiolgruppe gebunden werden, das an die 5'-Phosphatgruppe der Sonde gebunden ist, aber im Falle von CPM ergibt dieses Verfahren ein Arylmaleimid, das unter den Bedingungen des Thermozyklus instabil sein kann.

**[0167]** Eine Anzahl von kommerziellen Instrumenten sind für die Analyse von fluoreszierend markiertem Material verfügbar. Zum Beispiel kann das ABI-Gene-Analyzengerät verwendet werden, um attomolare Mengen von DNA zu analysieren, die mit Fluorophoren, wie ROX (6-Carboxy-X-rhodamin), Rhodamin-NHS, TAMRA (5/6-Carboxytetramethylrhodamin-NHS) und FAM (5'-Carboxyfluorescein-NHS), markiert sind. Diese Verbindungen sind durch eine Amidbindung über ein 5'-Alkylamin auf der Sonde an die Sonde gebunden. Andere nützliche Fluorophore umfassen CNHS (7-Amino-4-methylcumarin-3-essigsäure, Succinimidylester), das ebenfalls über eine Amidbindung gebunden werden kann.

**[0168]** Beim Markierungsverfahren können Modifikationen erforderlich sein, um die effiziente Bindung eines vorgegebenen Fluorophors an eine spezielle Oligonucleotidsonde zu erreichen. Zum Beispiel war die anfängliche Reaktion zwischen einer Sonde mit einem Amin am 5'-Ende und 7-Diethylaminocumarin-3-carboxylat-NHS-Ester sehr ineffizient. Die Sonde, die am 3'-Ende phosphoryliert worden war, um eine Verlängerung der Sonde während der Amplifikation zu verhindern, hatte eine signifikante Sekundärstruktur, von denen eine Konformation das 5'-Amin in ausreichende Nähe zum 3'-Phosphat brachte, um eine Salzbrücke zu bilden. Diese Struktur kann verhindert haben, dass das 5'-Amin für die Reaktion mit dem NHS-Ester zur Verfügung stand,

was die niedrige Ausbeute an Produkt verursachte. Die Zugabe von 25% N-methylpyrrolidon (NMP) verbesserte die Effizienz der Reaktion beträchtlich.

**[0169]** Man kann auch sowohl ein Fluorophor als auch ein Quencher-Mittel verwenden, um die Sonde zu markieren. Wenn die Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenz des Fluorophors durch den Quencher gequencht. Während des vorliegenden Verfahrens wird die Sonde zwischen dem Fluorophor und dem Quencher gespalten, was die volle Expression der Fluoreszenz des Fluorophors zulässt. Das Quenchen umfasst die Übertragung von Energie zwischen dem Fluorophor und dem Quencher; das Emissionsspektrum des Fluorophors und das Absorptionsspektrum des Quenchers müssen überlappen. Eine bevorzugte Kombination für diesen Aspekt der Erfindung ist das Fluorophor Rhodamin 590 und der Quencher Kristallviolett.

**[0170]** Eine solche Sonde ist in [Fig. 13](#) gezeigt. Die Synthese dieses Konstrukts erfordert die Bindung eines Rhodaminderivats durch eine 5'-Thiolgruppe und die Bindung des Kristallvioletts durch ein Amin, das sich von einem Thymidin zwei Basen weiter erstreckt. Die Trennung dieser beiden Gruppen durch zwei Phosphodies-terbindungen erhöht die Chance einer Spaltung zwischen diesen durch die DNA-Polymerase.

**[0171]** Anfängliche Versuche, das Kristallviolett durch eine Reaktion zwischen einem Lacton und einem Amin zu binden, waren nicht erfolgreich. Das Kristallviolett wurde modifiziert, um ein aktives Acylazid zu bilden, gezeigt in [Fig. 14](#). Diese Form von Kristallviolett wurde mit Amin-modifizierter DNA zur Reaktion gebracht, und das gewünschte Produkt wurde mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt.

**[0172]** Versuche, die Rhodamin-X-maleimid-Gruppe mit der 5'-Thiolgruppe zur Reaktion zu bringen, waren nicht erfolgreich. Dies war auch der Fall, wenn das Rhodamin-X-maleimid vor der Zugabe von Kristallviolett zur Reaktion gebracht wurde. Der Grund mag sein, dass die entblockierte 5'-Thiolgruppe mit der Acrylamid-Doppelbindung in dem Thymidin-Abstands-Arm reagiert (siehe [Fig. 13](#)). Ein alternatives Verfahren für die Anfügung eines Amins an das Thymidin ist in [Fig. 15](#) gezeigt.

**[0173]** Dieses Beispiel stellt eine allgemeine Anleitung für die Bindung eines Biotin an das 3'-Ende einer Oligonucleotidsonde und eines Fluorophors an das 5'-Ende einer Oligonucleotidsonde bereit. Die Fachleute werden erkennen, dass eine Reihe von Verfahren für solche Bindungen im Stand der Technik bekannt sind und dass die vorliegende Erfindung nicht eingeschränkt ist auf die speziellen Verfahren, die ausgewählt wurden, um die Sonde zu markieren.

#### Beispiel 9

##### Protokoll für die durch AmpliWax™ vermittelte PCR mit UNG und dUTP

**[0174]** Das PCR-Verfahren kann in Bezug auf die Spezifität seiner Amplifikation durch Verfahren und Reagenzien verbessert werden, die vollständiger beschrieben sind in der PCT-Patentanmeldung Seriennr. 91/01039, angemeldet am 15. Februar 1991; US-Patentanmeldung Seriennr. 481,501, angemeldet am 16. Februar 1991; PCT-Patentanmeldung Seriennr. PCT/US 91/05210, angemeldet am 23. Juli 1991; US-Patentanmeldung Seriennr. 609,157, angemeldet am 2. November 1990; und US-Patentanmeldung Seriennr. 557,517, angemeldet am 24. Juli 1990. Die Offenbarung dieser Patentanmeldungen wird durch Bezugnahme hier mit eingeschlossen, und die folgenden Protokolle demonstrieren, wie diese verbesserten PCR-Verfahren in Verbindung mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, um überlegene Resultate zu erhalten. Alle Reagenzien sind bei Perkin-Elmer Cetus Instruments (PECI, Norwalk, CT) erhältlich.

**[0175]** Dieses Protokoll umfasst im Wesentlichen drei Komponenten: MicroAmp™-Röhrchen, die dNTPs, Primer, Magnesium und Tris enthalten und mit Wachs abgedeckt sind; Premix B, zu dem AmpliTaq®-DNA-Polymerase und UNG (und der deshalb Enzyme Mixture genannt wird) zugesetzt werden; und Premix C, zu dem die Testprobe und die Sonde zugesetzt werden. Enzyme Mixture und die Testprobe mit Sonde werden hergestellt und auf die Wachsschicht aufgetragen. Die Röhrchen werden dann in ein TC9600-Thermal-Cycler gebracht und dem Thermozyklus unterworfen. Das nachstehende Protokoll geht von einer 50 µl Reaktion aus, mit Testproben von nicht mehr als 27 µl, und das Ziel ist HIV.

**[0176]** Die Reagenzien werden vorzugsweise wie folgt bereitgestellt. MicroAmp™-Röhrchen, die 12,5 µl Premix A und ein 12 mg AmpliWax™-PCR-Pellet pro Röhrchen enthalten, werden hergestellt. Premix A enthält 1 µM Primer SK145 und 1 µM Primer SK431 (keiner der Primer ist biotinyliert), 800 µM dATP, 800 µM dGTP, 800 µM dCTP, 800 µM dUTP, 15 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM Tris-HCl, pH 8,3. Das AmpliWax™-Pellet besteht aus Paraffin, das bei 55°C schmilzt (Aldrich Chemical Co.), und enthält 0,15% Tween 65, und das Wachspellet und die

Premix A-Bodenschicht werden in einem DNA-freien Raum zusammengefügt. Das Wachspellet wird dann geschmolzen, um oberhalb eine Dampfbarriere zu bilden. Diese Barriere wird unversehrt bleiben, wenn die Röhrchen bei 4 bis 25°C aufbewahrt werden, und die PCR-Reagenzien unterhalb der Barriere sind bei 4°C für Monate lagerungsstabil. Es gibt keine Mischung des zugefügten Materials oberhalb der Barriere, bis das Wachs während der anfänglichen Stufen der Thermozyklen geschmolzen wird. Kontrollröhrchen sind identisch, enthalten aber keinen Primer.

**[0177]** Premix B-Puffer enthält 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, und 50 mM KCl und wird verwendet zur Verdünnung der Enzyme AmpliTaq®-DNA-Polymerase und UNG. Etwa 2,6 µl Premix B-Puffer werden pro Reaktion verwendet.

**[0178]** Premix C-Puffer wird als 10 × Konzentrat hergestellt, das 105 mM Tris-HCl, pH 8,3, und 715 mM KCl enthält und wird zu der Test-DNA-Probe zugegeben, sodass die endgültigen Tris- und KCl-Konzentrationen in der Endlösung 10 mM beziehungsweise 50 mM sind. Die Sonde wird auch in dieser Schicht, ebenso wie gegebenenfalls Träger-DNA zugegeben. Wenn Plasmid-Kontrollen mitlaufen, wird etwa 1 µg an menschlicher Placenta-DNA (1 µg/µl in 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA und 10 mM NaCl, geschert, mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol ausgefällt) normalerweise als Träger-DNA pro Reaktion zugegeben. Etwa 3,3 µl der 10 × Stammlösung von Premix C werden pro Reaktion zugegeben.

**[0179]** Die Sonde wird als 5 µM Stammlösung hergestellt und als LG101C bezeichnet. Die Sonde LG101C hat ein 3'-Phosphat, um eine Verlängerung der Sonde zu verhindern, und ein 7-Diethylaminocumarin-3-carboxylat, das durch eine Amidbindung gebunden an eine aliphatische 5'-Amino-Gruppe an dem Oligonucleotidat. Die Nucleotidsequenz der Sonde ist nachstehend gezeigt:

SEQ ID NO: 24 LG101C: 5'-GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT

**[0180]** Diese Sonde sollte bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt werden.

**[0181]** AmpliTaq®-DNA-Polymerase wird von PECL als Stammlösung mit einer Konzentration von 5 U/µl geliefert, und UNG wird von demselben Lieferanten als Stammlösung mit einer Konzentration von 1 U/µl geliefert. Man kann auch Plasmid-Eichproben laufen lassen, und zu diesem Zweck ist die Herstellung von Stammverdünnungen (Kopien/ml) von 300, 1.000, 3.000, 10.000, 30.000, 10.0000 und 100.0000 mit der GeneAmp™ Positive Control DNA hilfreich. Diese DNA besteht aus dem HIVZ6-Genom, das umgeordnet ist, um den pol-Bereich zu unterbrechen und die Infektivität zu blockieren, und ist in das Plasmid pBR322 inseriert.

**[0182]** Jeder endgültige Reaktionsansatz wird aus 12,5 µl Premix A; 2,6 µl Premix B; 3,3 µl Premix C; 2 µl der Sonde LG101C; 27 µl Testprobe; 0,4 µl AmpliTaq®-DNA-Polymerase; und 2 µl UNG bestehen, was ein Endvolumen von 49,8 µl ergibt. Dieses Gemisch enthält 250 nM von jedem Primer; 200 µM von jedem dNTP; 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 200 nM Sonde; 2 Einheiten UNG; und 2 Einheiten Polymerase.

**[0183]** Um die Reaktion durchzuführen, stellt man zuerst Enzyme Mixture in einem DNA-freien Abzug oder Raum her, indem man pro Reaktion 2,6 µl Premix B-Puffer, 0,4 µl AmpliTaq®-DNA-Polymerase und 2 µl UNG mischt. Für jeweils 16 Reaktionen, die man durchführen will, sollte man ausreichend Enzyme Mixture für 18 Reaktionen herstellen, um ausreichend Material sicherzustellen. Enzyme Mixture wird dann zu jedem MicroAmp™-Röhrchen, das mit Wachs abgedeckten Premix A über dem Wachs enthält, in einem DNA-freien Abzug oder Raum zugegeben. Eine einzige Probennehmerspitze kann für alle Transfers ausreichen, und 5 µl Enzyme Mixture werden zu jedem Röhrchen zugegeben.

**[0184]** Im Bereich der Probenherstellung wird Sample Mixture (Probengemisch) pro Reaktion hergestellt, indem 3,3 µl 10 × Premix C-Puffer, 27 µl Probe (für Quantifizierungskontrollen werden 10 µl Stammlösung und 17 µl Wasser zugegeben) und 2 µl Sonde (gegebenenfalls wird Träger-DNA mit der Probe gemischt) gemischt werden. Dann wird, unter Verwendung einer separaten Pipettenspitze für jeden Transfer, 32,3 µl Sample Mixture zu jedem Röhrchen zugegeben; das ungleiche Volumen zwischen dem Enzyme Mixture und dem Sample Mixture gewährleistet vollständige Mischung. Man sollte auch zwei Kontrollröhrchen ansetzen, bei denen die Primer fehlen, um als Maß für die Spaltung der Sonde durch die Thermozyklen zu dienen. Diese Kontrolle enthält typischerweise 1.000 Kopien an Kontrollmatrize. Zusätzlich sollte man eine Verdünnungsserie des Plasmid ansetzen, um den Test zu kalibrieren. Diese Kalibrierung ist typischerweise im Bereich von 3 bis 10.000 Kopien an HIV-Ziel pro Probe. Nachdem die vorstehenden Schritte abgeschlossen sind, werden die Röhrchen verschlossen und in der Schale des TC9600 zusammengestellt.

**[0185]** Das Profil der Thermozyklen ist wie folgt: ein Zyklus bei 50°C für 2 Minuten; 5 Zyklen bei 95°C für 10 Sekunden, 55°C für 10 Sekunden und 72°C für 10 Sekunden; und 35 Zyklen bei 90°C für 10 Sekunden, 60°C für 10 Sekunden und 72°C für 10 Sekunden. Wenn die Thermozyklen beendet sind, werden die Röhrchen aus dem TC9600 entfernt und gegebenenfalls bei -20°C aufbewahrt. Ein längeres Einwirken von mehr als 70°C auf die Röhrchen wird nicht empfohlen, und die alkalische Denaturierung sollte nicht angewendet werden.

**[0186]** Eine Anzahl von Kontrollen ist von Nutzen, einschließlich einer Kontrolle ohne Matrize, um die Verunreinigung des Reaktionsgemischs, ebenso wie die Amplifikation von unspezifischen Produkten, die in einer Spaltung der Sonde resultieren können und unspezifische Signale ergeben, zu bestimmen; eine Kontrolle ohne Primer, um ein Maß für die Spaltung der Sonde bereitzustellen, die nicht mit der Amplifikation zusammenhängt und die zum Untergrund beitragen könnte (man könnte auch einige klinische Proben in den Test mit einbauen, um die Anwesenheit von Komponenten zu entdecken, die in einer Spaltung der Sonde resultieren); und Quantifizierungskontrollen.

**[0187]** Um die PCR-Produkte von unterhalb der Wachsschicht zu entfernen, die sich nach der Amplifikation gemäß des vorstehenden Protokolls bilden wird, kann man die Probe mittels Durchstechen der Mitte des Wachsschicht mit einer Pipettenspitze entfernen, indem man die Spitze langsam mit sanftem Druck voranführt, um das Risiko zu minimieren, dass Reaktionsgemisch bis oberhalb der Spitze vordringt und das Labor verunreinigt. Sichern des Probennehmers mit einem Finger der Hand, die das Reaktionsröhrchen hält, erhöht die Kontrolle beträchtlich. Feine Propennehmer (zum Beladen von Gelen) durchdringen das Wachs besonders gut. Eine Schneidebewegung statt einer Stechbewegung erleichtert das Durchdringen ebenfalls und hilft bei der Sicherstellung, dass die Spitze nicht von dem Wachs verstopft wird. Wenn die Spitze ein Stück Wachs aufnimmt, kann das Wachs normalerweise durch leichtes Reiben am restlichen Wachs wieder entfernt werden.

**[0188]** Man kann die Reaktionsröhrchen auch einfrieren (z. B. in Trockeneis/Ethanol oder über Nacht in einer Tiefkühltruhe), auftauen und sie kurz in einer Mikrofuge (Winkelrotor) zentrifugieren. Die Wachsschicht wird stark durchbrochen sein, was die Einführung des Probennehmers ohne das Risiko der Verstopfung erlaubt. Wachsbruchstücke können von der Probennehmerspitze gegen die Innenwand des Röhrchens abgewischt werden. Dieses Verfahren ist besonders praktisch bei Verdrängungsprobennehmern, die oftmals so dicke Spitzen haben, dass das direkte Durchdringen der Wachsschicht schwierig ist. Jedes der vorstehenden Verfahren sollte Wachs in der entfernten Probe so vollständig ausschließen, dass eine Chloroformextraktion nicht erforderlich ist.

**[0189]** Obwohl die vorstehende Erfindung zum Zweck der Illustration detailliert beschrieben wurde, ist es offensichtlich, dass Abänderungen und Modifikationen innerhalb des Bereichs der beigefügten Ansprüche durch den Durchschnittsfachmann durchgeführt werden können.

#### Beispiel 10

##### Festphasenextraktion mit Bakerbond™-PEI

**[0190]** Dieses Beispiel stellt ein Protokoll zur Probenherstellung eines PCR-Gemisches bereit, bei dem die Amplifikation in Gegenwart einer Fluoreszenz-markierten Sonde (einem Cumarinderivat) entsprechend dem Verfahren der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurde.

**[0191]** Die Herstellung gewisser Stammreagenzien erleichtert die Durchführung dieses Protokolls. Ein solches Reagens sind Eppendorf-Röhrchen, die 50 mg vorgewaschene Bakerbond™ PEI-Matrix enthalten. Bakerbond PEI kann von J. T. Baker (Produkt-Nr. 7264-00) erhalten werden; es handelt sich um 40 µm Partikel mit 275 Ångstrom Porengröße auf Silica-Basis. Die Matrix wird hergestellt zuerst durch zunächst Waschen mit Wasser; dann mit Ethanol; dann mit Wasser; und dann mit einem Gemisch von 10 mM Tris, pH 8,3, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl und 8 M Harnstoff; und dann Äquilibrieren in 10 mM Tris, pH 8,3, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl und 8 M Harnstoff. Nach der Aufteilung werden 15 µl Wasser zu jedem Röhrchen zugegeben, um die Matrix hydratisiert zu halten. Die Röhrchen sollten bei 4°C aufbewahrt werden.

**[0192]** Auch Bindungspuffer kann als Stammlösung hergestellt werden, und die Zusammensetzung ist 10 mM Tris, pH 8, 500 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA und 8 M Harnstoff. Der Bindungspuffer sollte bei 4°C aufbewahrt werden, obwohl Harnstoff bei dieser Temperatur ausfallen kann. Der Bindungspuffer kann kurz vor der Verwendung erwärmt werden, um den Harnstoff zu resuspendieren.

**[0193]** Eine gewisse Ausrüstung ist bei der Durchführung dieses Protokolls von Nutzen. Während der Bin-

dingungsschritte sollten die Röhrchen durchmischelt werden, um die Matrix in Suspension zu halten, und ein Vortex Genie 2-Mixgerät (erhältlich bei Fischer Scientific, Kat. Nr. 12-812, mit dem 60 Mikroröhrchen-Halter, Kat. Nr. 12-812-B) ist für diesen Zweck von Nutzen. Zusätzlich sind eine Eppendorf-Microfuge, ein Hitachi Model 2000-Spectrofluorometer und Microfluorimeter-Quarzküvetten mit 2 mm innerer Weite und 2,5 mm Weglänge (erhältlich bei Starna Cells, Inc., Nr. 18F Q 10 mm 5) ebenfalls von Nutzen bei der Durchführung dieses Protokolls.

**[0194]** Geeignete Kontrollen sollten ebenfalls durchgeführt werden, und die Bindungsschritte erfordern drei Kontrollen. Die Kontrolle für die Hintergrundfluoreszenz umfasst die Herstellung einer Probe, die alle Komponenten der PCR-Amplifikation außer der Sonde enthält. Die Kontrollprobe sollte identisch wie die aktuellen Testproben behandelt werden, indem 20 µl zu der Matrix zugegeben werden und die im Überstand vorhandene Fluoreszenz gemessen wird. Diese Kontrolle stellt einen Weg bereit, um die in der Matrix, dem Bindungspuffer und in jeder Komponente des PCR-Amplifikationsgemisches vorhandene Hintergrundfluoreszenz zu messen und außerdem eine Messung der Menge an Fluoreszenz, die in klinischen Proben vorhanden ist.

**[0195]** Die zweite Kontrolle stellt eine Messung für ungewollten Sondenabbau und für die Bindungsreaktion bereit und besteht aus einem Schein-PCR-Amplifikationsgemisch, das alle Komponenten einschließlich der Sonde enthält, aber nicht den Thermozyklen unterworfen wird. Die Kontrollprobe sollte identisch wie die aktuellen Testproben behandelt werden, indem 20 µl zu der Matrix zugegeben werden und die im Überstand vorhandene Fluoreszenz gemessen wird. Diese Kontrolle ermöglicht die Messung eines vorliegenden Abbaus der Sonde bei Lagerung ebenso wie die Messung der Effizienz der Bindungsreaktion. Wenn kein Abbau auftritt und wenn die Bindungsreaktion vollständig ist, sollte die Fluoreszenz des Überstands nach der Bindung an Bakerbond<sup>HM</sup> PEI ähnlich der des Hintergrunds sein, die in der ersten Kontrolle gemessen wurde.

**[0196]** Die dritte Kontrolle stellt die Messung der einzusetzenden Menge an Sonde bereit. Die für die zweite Kontrolle hergestellte Probe kann für diese Messung verwendet werden. In diesem Fall werden jedoch 20 µl zu einem Röhrchen zugegeben, das 290 µl Bindungspuffer ohne Matrix enthält. Diese Kontrolle kann verwendet werden, um die einzusetzenden Menge an Sonde zu bestimmen.

**[0197]** Um das Protokoll zu beginnen, bestimmt man zuerst die Zahl der benötigten Bindungsröhrchen; diese Zahl ist die Summe von Testproben und Kontrollen. Die Kontrollen sind eine Kontrolle ohne Matrize, eine Kontrolle ohne Primer, Kalibrierungskontrollen und die erste und zweite vorstehend diskutierte Kontrolle. Kontrollen können dreifach gemacht werden. Zu jedem Röhrchen werden 235 µl Bindungspuffer zugegeben.

**[0198]** Man bereitet auch ein Röhrchen zur Messung des Einsatzes vor, indem man in ein leeres Eppendorf-Röhrchen gibt: 290 µl Bindungspuffer, was äquivalent ist zum Volumen in den Röhrchen mit der Matrix (235 µl Bindungspuffer, 15 µl Wasser und 40 µl, die von der Matrix beigetragen werden). Die Bestimmung der Einsatzmenge kann dreifach gemacht werden.

**[0199]** Zu den Röhrchen, die Matrix enthalten (die Testproben und erste und zweite Kontrollen), fügt man 20 µl Probe hinzu. Zu den Röhrchen, die Puffer enthalten (die dritte Kontrolle) fügt man 20 µl Schein-PCR-Amplifikationsgemisch hinzu. Die Röhrchen werden dann auf einem Vortex Genie 2-Mixgerät mit einer Einstellung von 4 für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Röhrchen werden dann in einer Eppendorf Microfuge (16000 × g) 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die oberen 200 µl des Überstands werden von jedem Röhrchen entfernt, ohne den Niederschlag oder die Matrix aufzuwirbeln, die an der Wand des Röhrchens vorhanden sind, und in ein sauberes Eppendorf-Röhrchen gegeben.

**[0200]** Die Fluoreszenz des Überstands wird auf einem Hitachi Model 2000 in den vorstehend angegebenen Küvetten gemessen. Für Sonden, die mit 7-Diethylamino-3-(4'-maleimidophenyl)-4-methyl-Cumarin markiert sind, ist die Einstellung des Spectrofluorometers wie folgt: PM-Spannung ist 700 V; die Anregungswellenlänge ist 432 nm; die Emissionswellenlänge ist 480 nm; die Anregungsspaltbreite ist 10 nm; die Emissionsspaltbreite ist 20 nm. Man sollte die Aussetzung der Sonde gegenüber dem Anregungslicht minimieren; wenn die Sonde für längere Zeiträume in dem Spectrofluorometer verbleiben soll, sollte der Verschluss geschlossen werden.

**[0201]** Die Zahl an pmolen an gespaltener Sonde ist am besten geeignet, um die Menge an Signal einzuschätzen. Um die Menge an Signal einzuschätzen, bestimmt man dann zuerst das Einsatzsignal der dritten Kontrolle durch die folgende Berechnung:

(Fluoreszenz-Signal der dritten Kontrolle - Fluoreszenz-Signal der ersten Kontrolle) x (310/20)

10 pmole

**[0202]** In dieser Formel korrigiert die Subtraktion jede Hintergrundfluoreszenz in der Testprobe; 310/20 ist der Verdünnungsfaktor; und 10 pmol ist die Menge an Sonde, die den PCR-Amplifikationen zugegeben wurde.

**[0203]** Die Menge an Signal der Testprobe wird durch die folgende Formel berechnet:

$$\frac{\text{Fluoreszenz-Signal der Testprobe} - \text{Fluoreszenz-Signal der ersten Kontrolle)} \times 310/20}{\text{Einsatzsignal}}$$

**[0204]** Das vorstehende Protokoll kann entsprechend dem für die Markierung der Sonde speziell verwendeten Fluorophor modifiziert werden und ist lediglich illustrativ für die Erfindung.

**[0205]** [Fig. 16](#) zeigt typische Ergebnisse und ein typisches Verhältnis von Signal zu Zahl an eingesetztem Ziel für das vorliegende Verfahren mit Bakerbond™ PEI-Festphasenextraktionsmittel.

## SEQUENZPROTOKOLL

- (1) ALLGEMEINE INFORMATION:
- (i) ANMELDER:
    - (A) NAME: F.HOFFMANN-La ROCHE AG
    - (B) STRASSE: Grenzacherstraße 124
    - (C) STADT: Basel
    - (D) KANTON: BS
    - (E) LAND: Schweiz
    - (F) POSTLEITZAHL: CH-4070
    - (G) TELEFON: 061 – 688 25 11
    - (H) TELEFAX: 061 – 688 13 95
    - (I) TELEX: 962292/965542 hir ch
  - (ii) TITEL DER ERFINDUNG : Markierte Oligonucleotide
  - (iii) ZAHL AN SEQUENZEN: 24
  - (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:
    - (A) MEDIUMTYP: Floppy Disc
    - (B) COMPUTER:
    - (C) BETRIEBSSYSTEM:
    - (D) SOFTWARE:
  - (v) DATEN DER VORHERGEHENDEN ANMELDUNG:
    - (A) ANMELDUNGSNUMMER: 563,758
    - (B) ANMELEDEDATUM: 6. August 1990
- (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:1:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:
    - (A) LÄNGE: 28 Basen
    - (B) TYP: Nucleinsäure
    - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

CCGATAGTTT GAGTTCTTCT ACTCAGGC

28

- (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:2:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:
    - (A) LÄNGE: 30 Basen
    - (B) TYP: Nucleinsäure
    - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

GAAGAAAGCG AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC

30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 31 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

CGCTGCGCGT AACCAACACA CCCGCCGCGC X

31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 37 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

GATCGCTGCG CGTAACCACC ACACCCGCCG CCGCGCX

37

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 41 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

CGTCACCGAT CGCTGCGCGT AACCAACACA CCCGCCGCGC X

41

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:6:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:
  - (A) LÄNGE: 25 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

GATGAGTTCG TGTCCGTACA ACTGG

25

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:
  - (A) LÄNGE: 25 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

GGTTATCGAA ATCAGCCACA GCGCC

25

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:8:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:
  - (A) LÄNGE: 30 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

CGCTGCGCGT AACCACCACA CCCGCCGCGC

30

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:9:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:
  - (A) LÄNGE: 33 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

GATCGCTGCG CGTAACCACC ACACCCGCCG CGC

33

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 40 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

CGTCACCGAT CGCTGCGCGT AACCACCACA CCCGCCGCGC

40

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 30 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA

30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 30 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG TG TAGCGGTC

30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 30 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA GTGTAGCGGT 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:14:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:  
(A) LÄNGE: 30 Basen  
(B) TYP: Nucleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

AGCGGGCGCT AGGGCGCTGG CAAGTGTAGC 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:15:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:  
(A) LÄNGE: 30 Basen  
(B) TYP: Nucleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:16:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:  
(A) LÄNGE: 30 Basen  
(B) TYP: Nucleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

GAAGAAAGCG AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC 30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:17:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:
  - (A) LÄNGE: 30 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG

30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:18:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:
  - (A) LÄNGE: 29 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

TATCCCGCCG CGCTTAATGC GCCGCTACA

29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:19:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:
  - (A) LÄNGE: 34 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:19:

GCATTAATGC GCCGCTACAG GCGCGTACT ATGG

34

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:20:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:
  - (A) LÄNGE: 33 Basen
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:20:

GAGACCATCA ATGAGGAAGC TGCAGAATGG GAT

33

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 36 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:21:

GTGGAGACCA TCAATGAGGA AGCTGCAGAA TGGGAT

36

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 30 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:22:

AGTGGGGGGA CATCAAGCAG CCATGCAAAT

30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 27 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:23:

TGCTATGTCA GTTCCCCTTG GTTCTCT

27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIK:

- (A) LÄNGE: 33 Basen
- (B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:24:

GAGACCATCA ATGAGGAAGC TGCAGAATGG GAT

33

### Patentansprüche

1. Markiertes Oligonucleotid, welches eine Sequenz enthält, die komplementär zu einem Bereich einer Zielnucleinsäuresequenz ist, wobei das markierte Oligonucleotid mindestens 12 Nucleotide aufweist und am 3'-Ende blockiert ist, um den Einbau des markierten Oligonucleotids in ein Primerverlängerungsprodukt zu verhindern, wobei das Oligonucleotid zwei Markierungen umfasst, wobei die Markierungen durch eine für eine Nuclease geeignete Spaltstelle getrennt sind und wobei die beiden Markierungen ein Paar interaktiver signalerzeugender Markierungen sind, welche so wirksam an dem Oligonucleotid lokalisiert sind, dass sie die Erzeugung eines nachweisbaren Signals quenchen.

2. Oligonucleotid nach Anspruch 1, wobei das Blockieren durch Hinzufügen einer chemischen Einheit an die 3'-Hydroxylgruppe des letzten Nucleotids erreicht wird.

3. Oligonucleotid nach Anspruch 2, wobei die chemische Einheit nicht auch als eine Markierung für den nachfolgenden Nachweis dient.

4. Oligonucleotid nach Anspruch 1, wobei das Blockieren durch Entfernen der 3'-OH-Gruppe des letzten Nucleotids oder durch Verwenden eines Nucleotids, bei welchem die 3'-OH-Gruppe fehlt, erreicht wird.

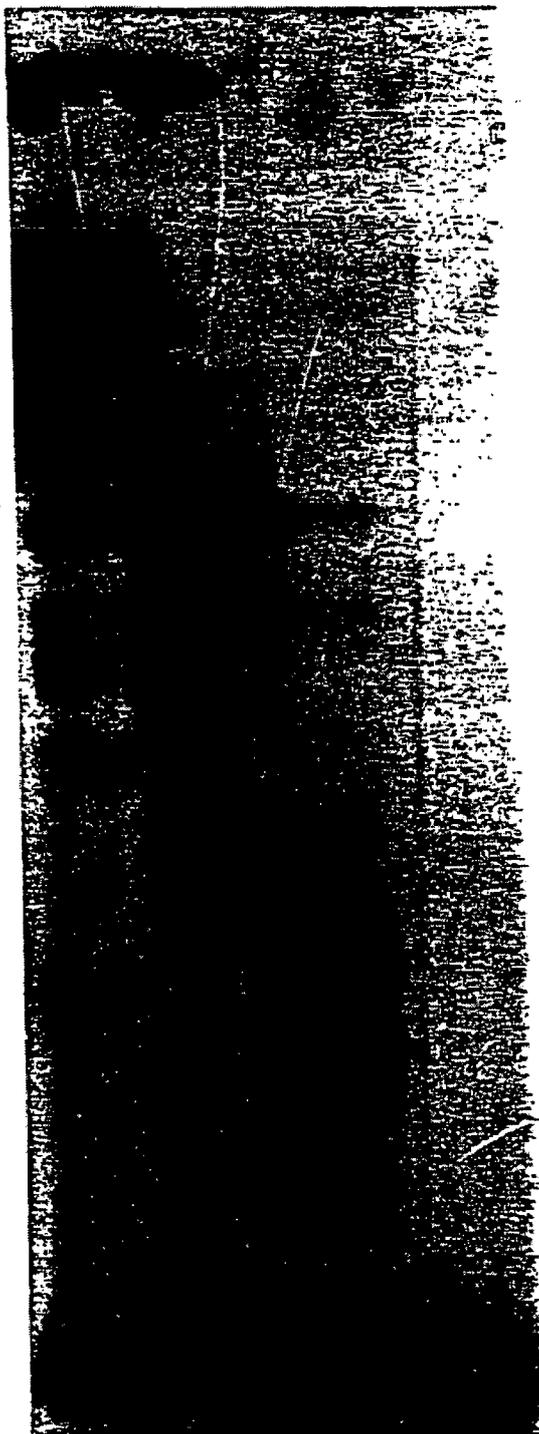
5. Oligonucleotid nach Anspruch 1, wobei die Markierung aus Fluoreszenzfarbstoffen ausgewählt ist.

6. Oligonucleotid nach Anspruch 1, wobei eine der Markierungen ein Fluorophor und die andere ein Quencher ist.

7. Oligonucleotid nach Anspruch 6, wobei das Fluorophor Rhodamin oder ein Derivat davon enthält.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

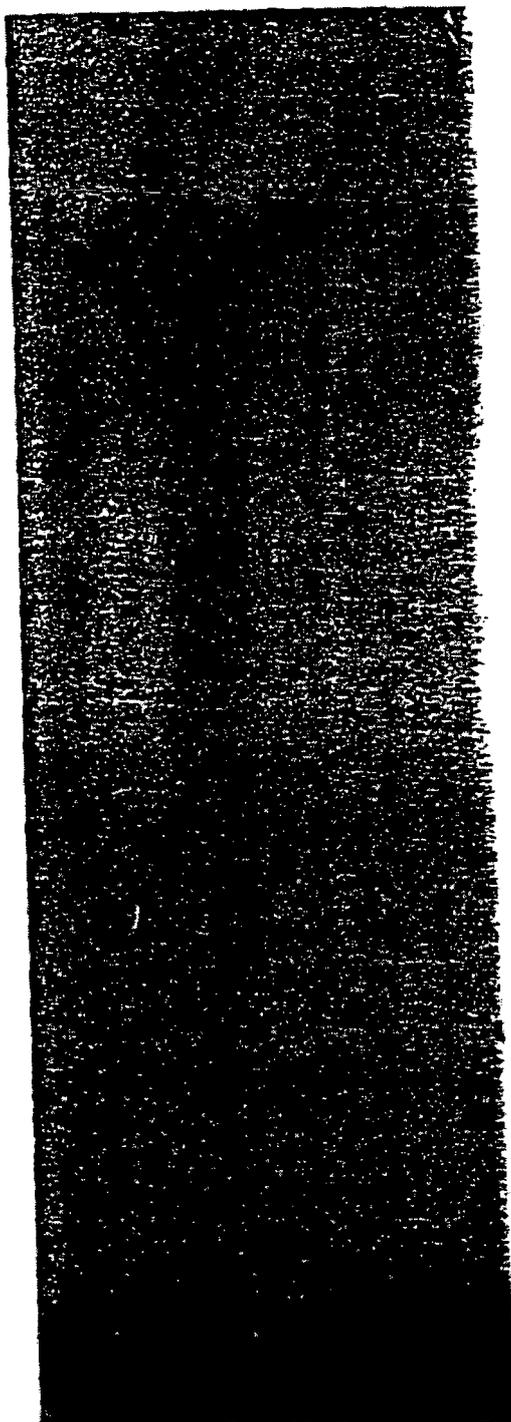
Anhängende Zeichnungen



SPUR

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

FIG. 1



SPUR

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

**FIG. 2**

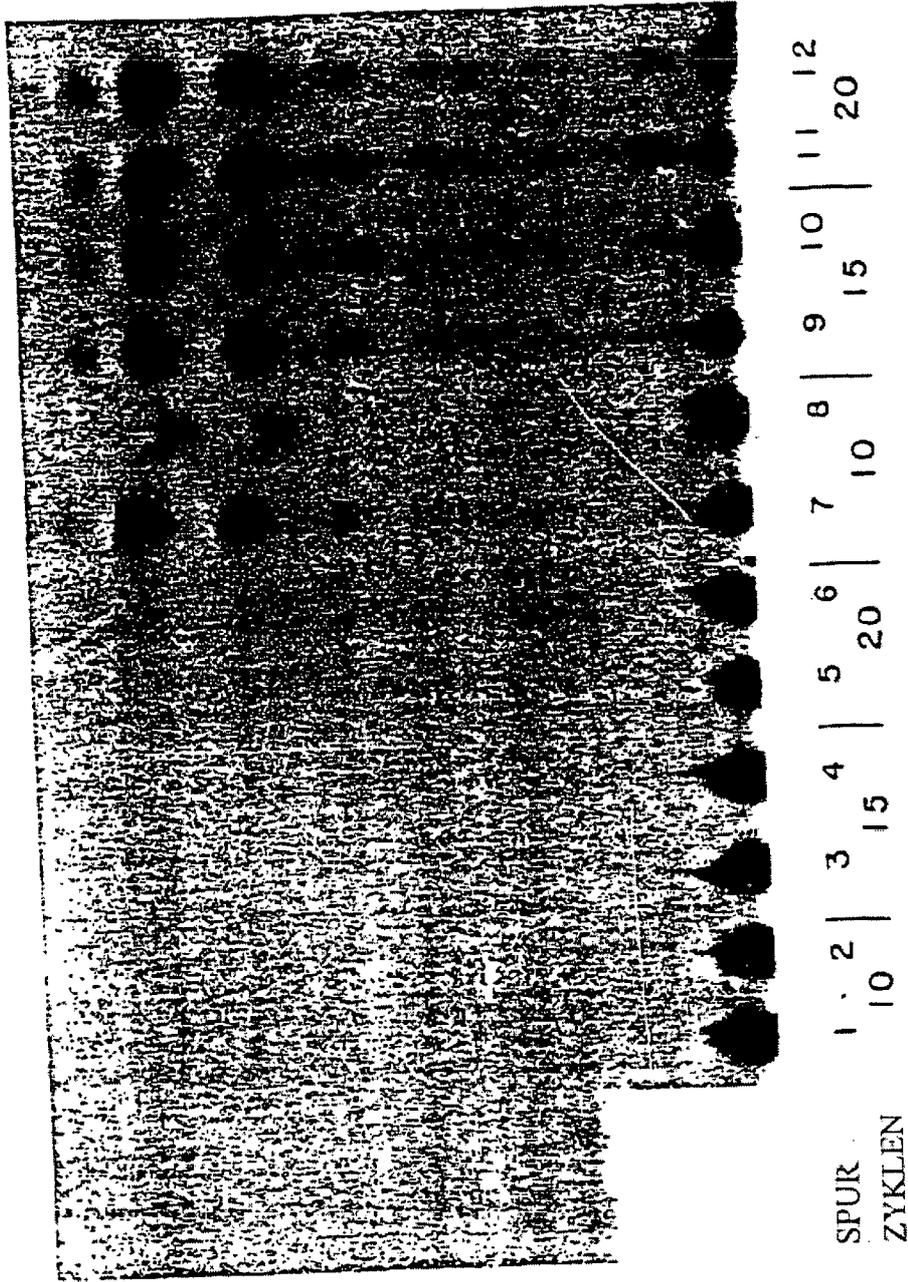
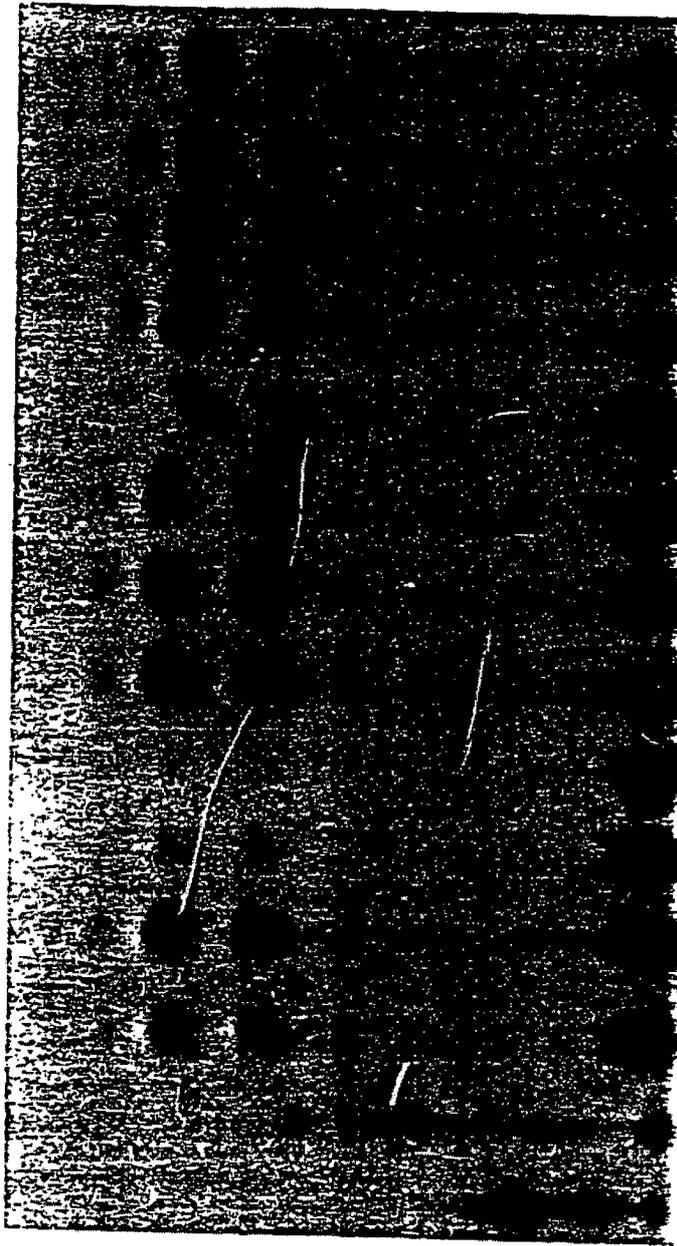


FIG. 3A



SPUR  
ZYKLEN

2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	10			15						20

FIG. 3B

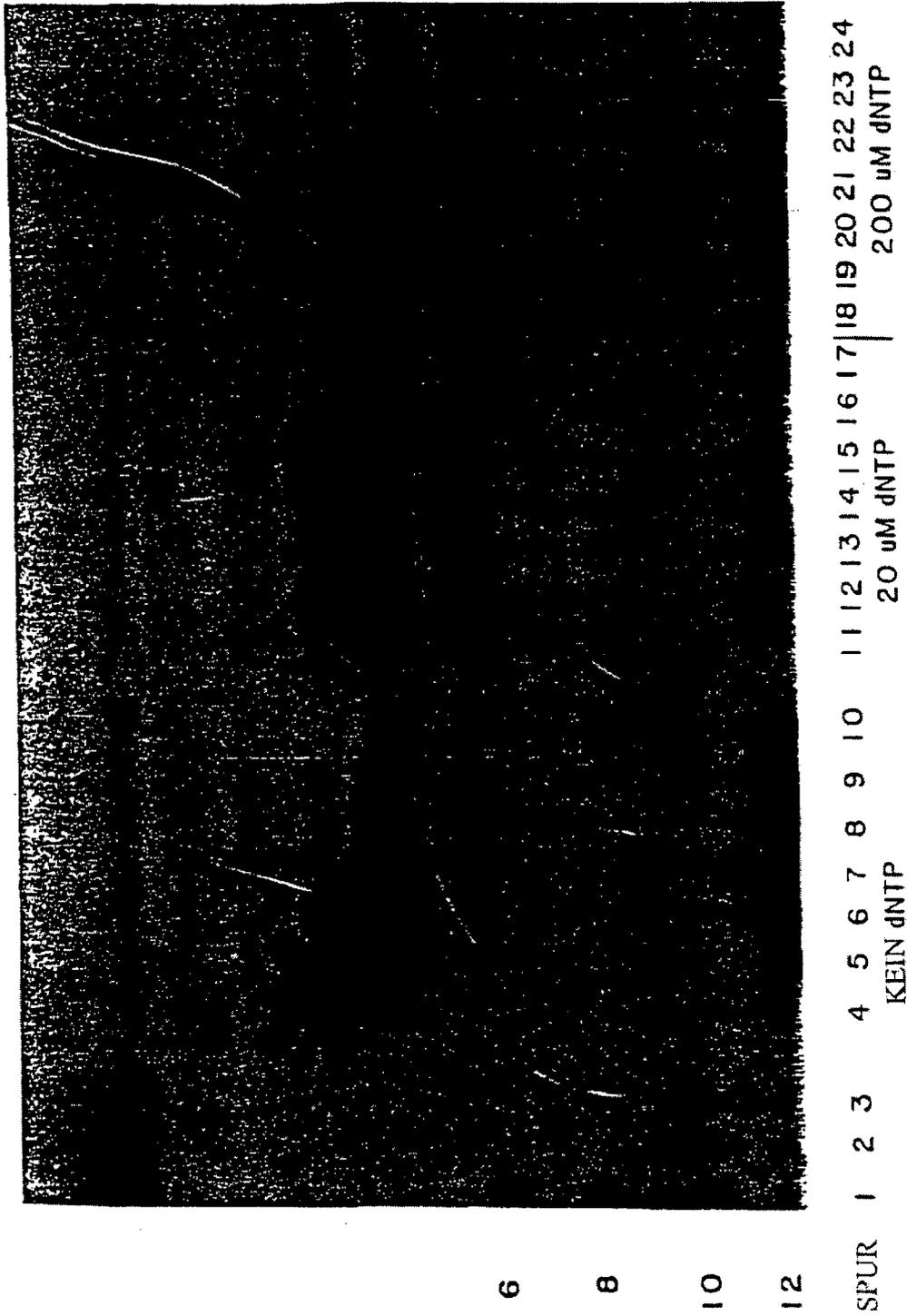
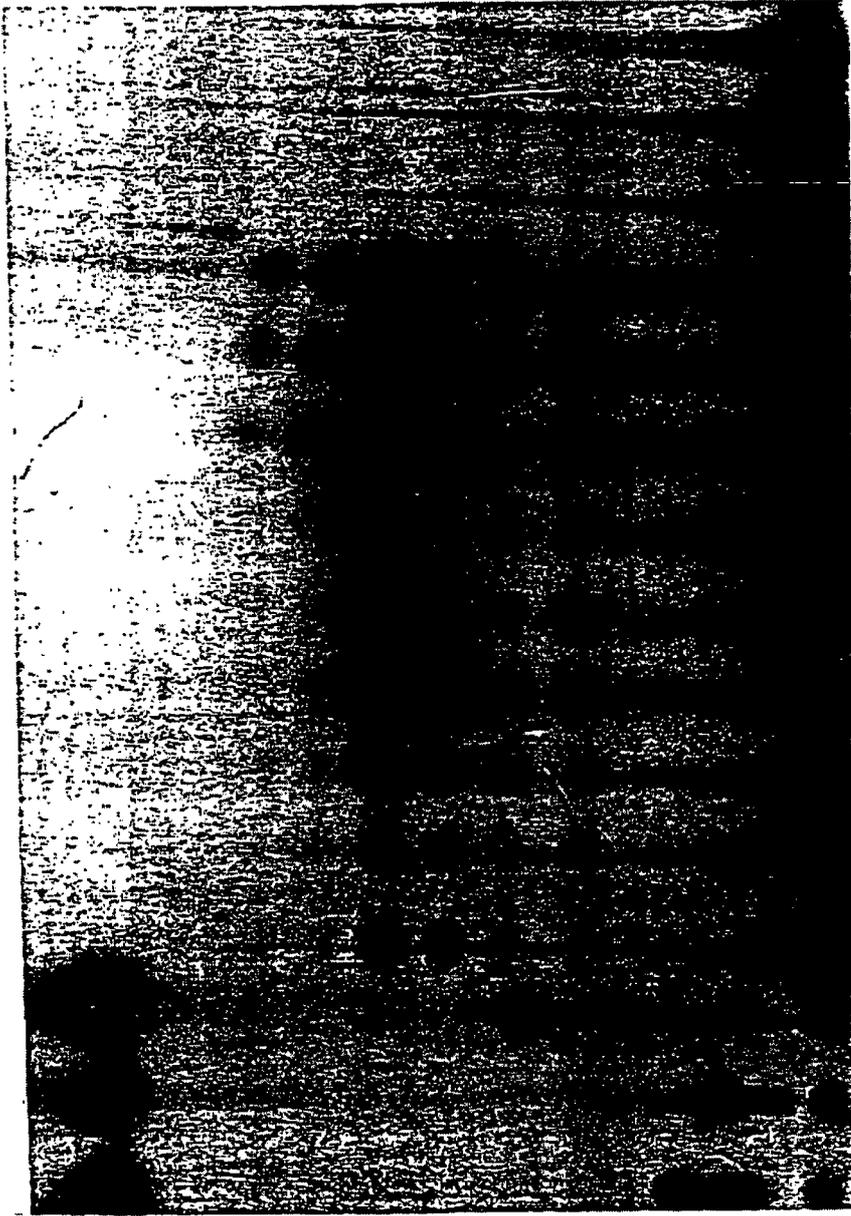


FIG. 4

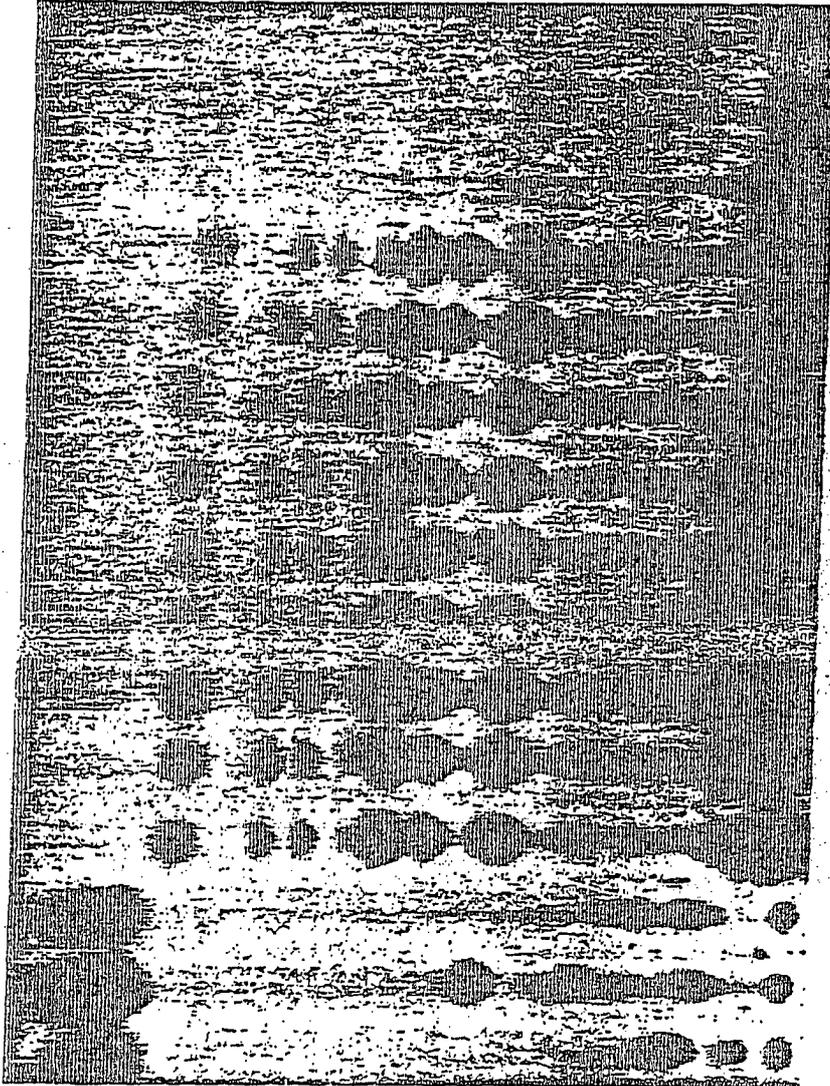


6  
8  
9  
10  
12  
13

SPUR	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
TEMP.				50C			60C			70C			70C	
MINUTEN			1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5

KEINE MATRIZE

FIG. 5

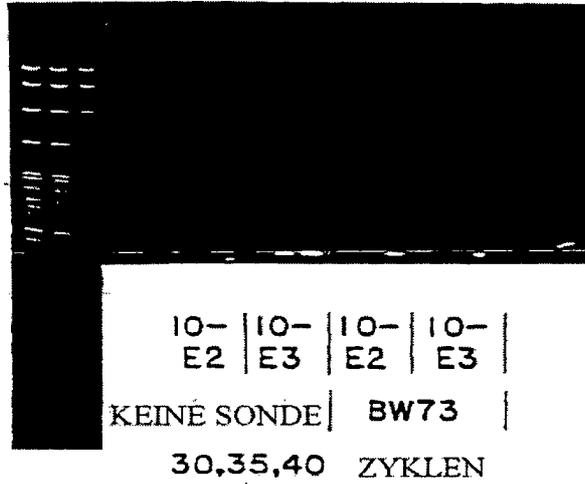


6  
8  
9  
10  
12

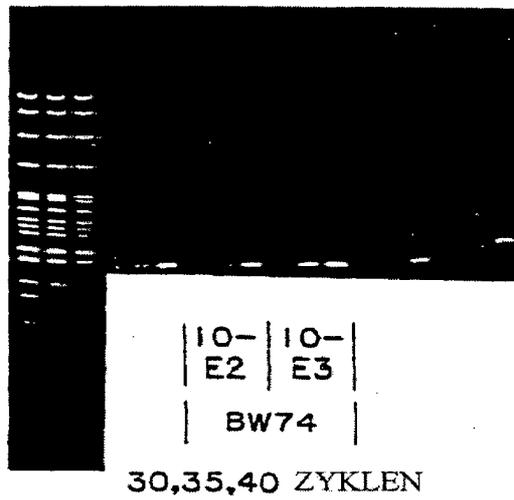
SPUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
TEMP.					50C			60C			70C			70C	
MINUTEN				1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5

KEINE MATRIZE

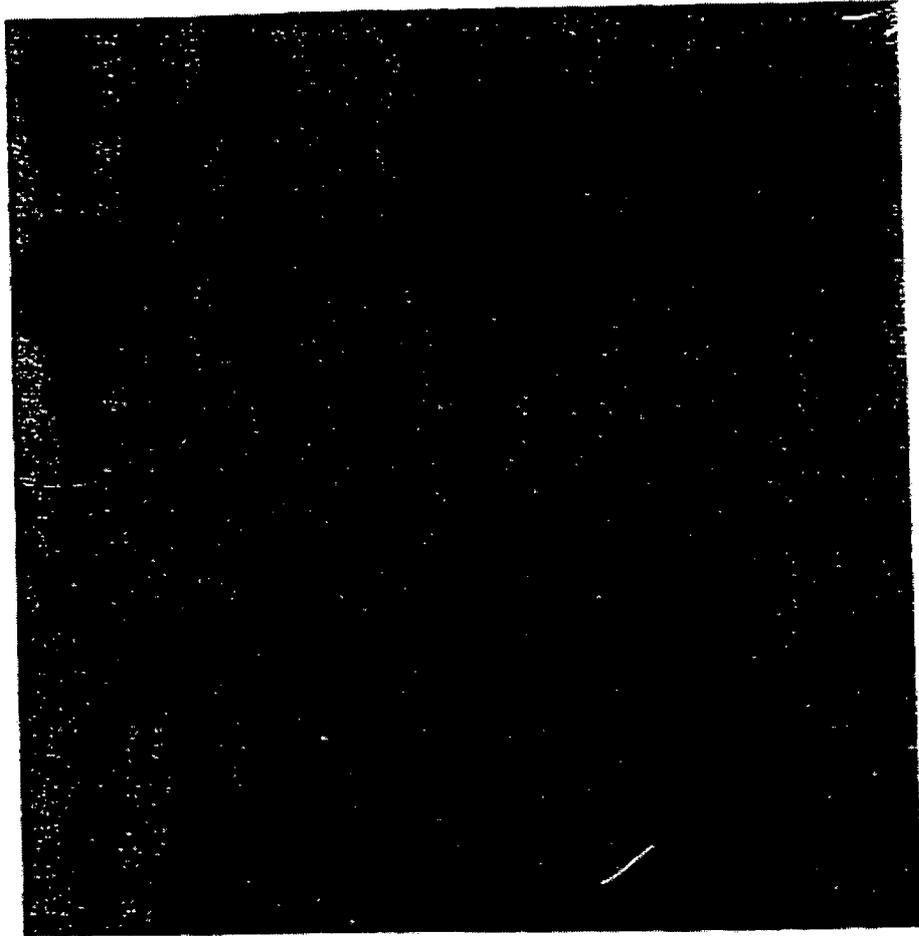
**FIG. 6**



**FIG. 7A**

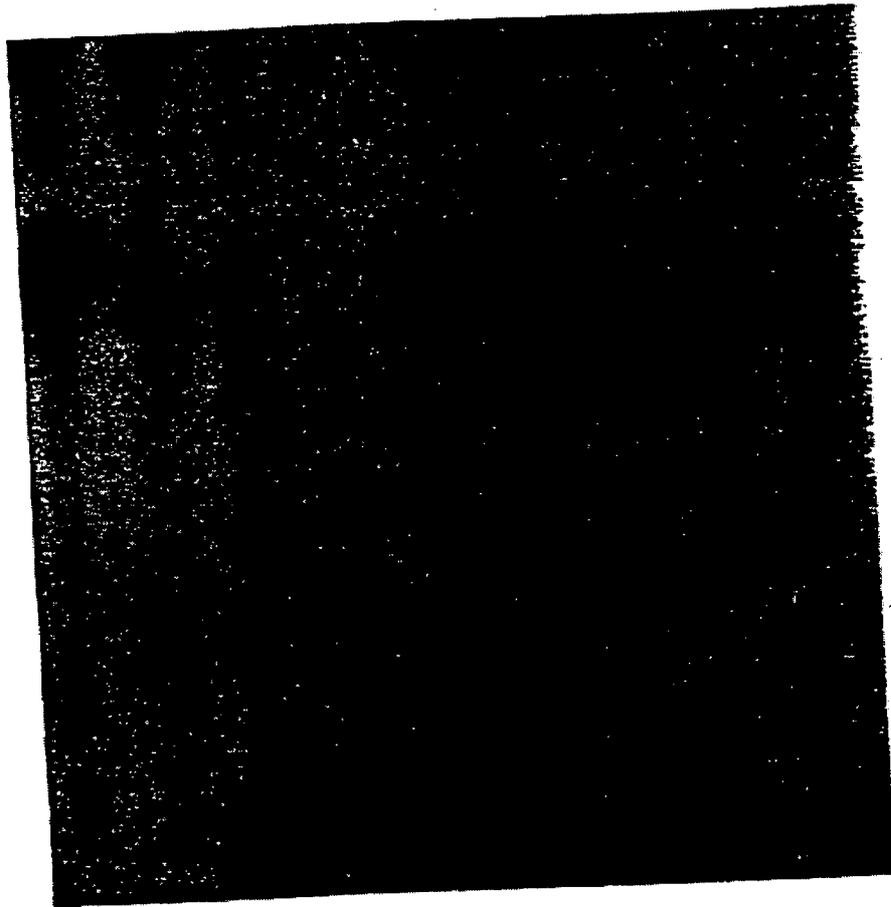


**FIG. 7B**



1 2 3 4 5 6 7 8 9

**FIG. 8A**



1 2 3 4 5 6 7 8 9

**FIG. 8B**

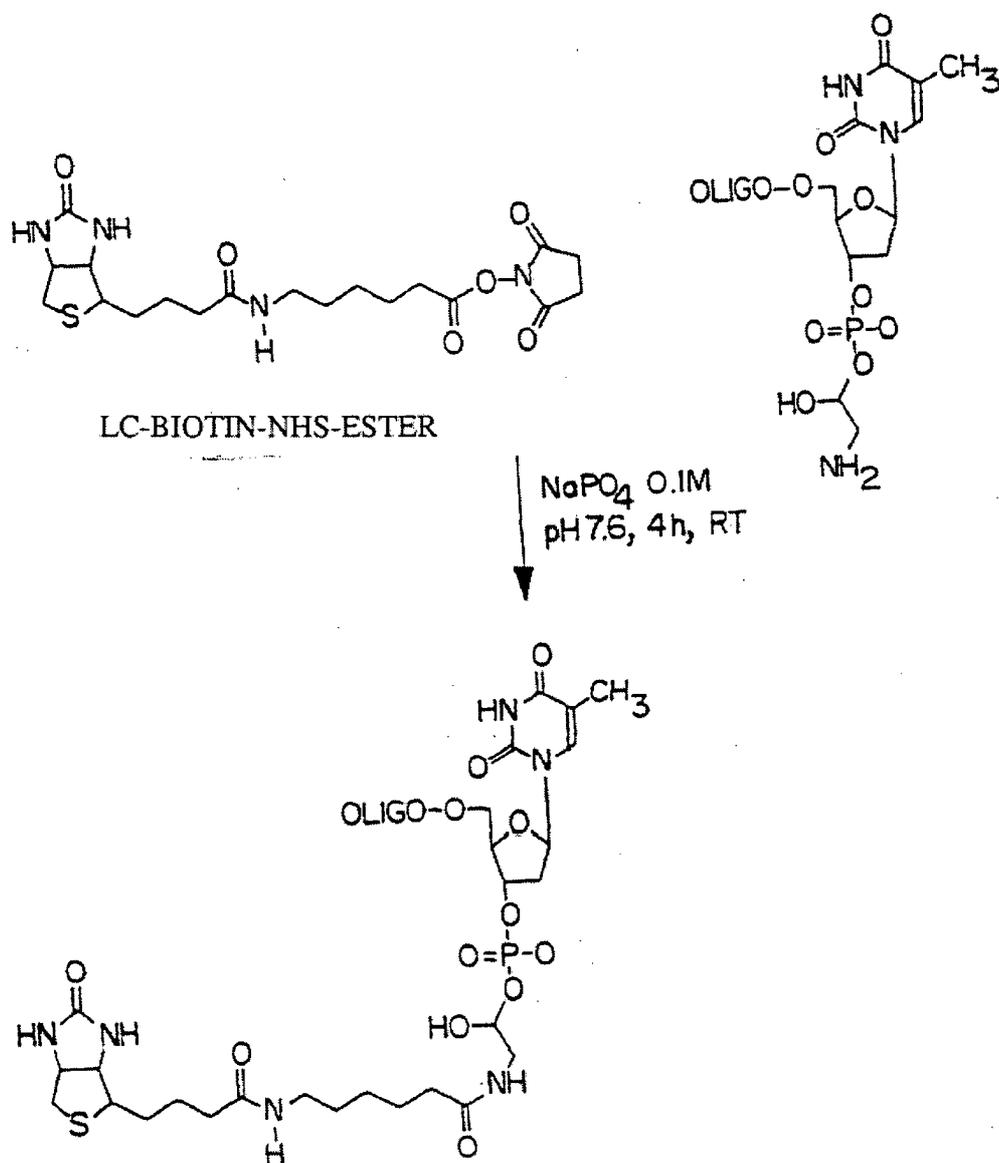
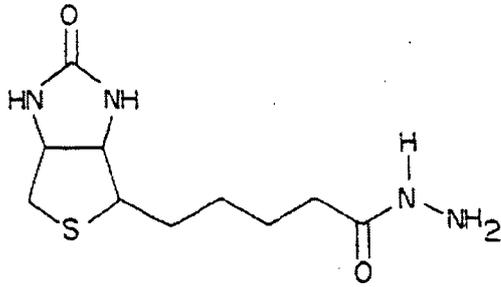
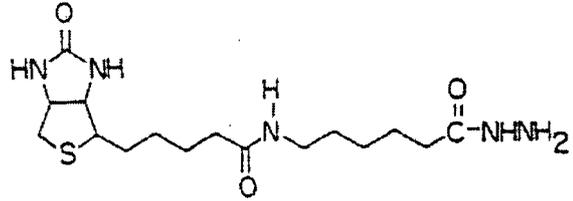


FIG. 9



BIOTINHYDRAZID



LANGKETTIGES BIOTINHYDRAZID

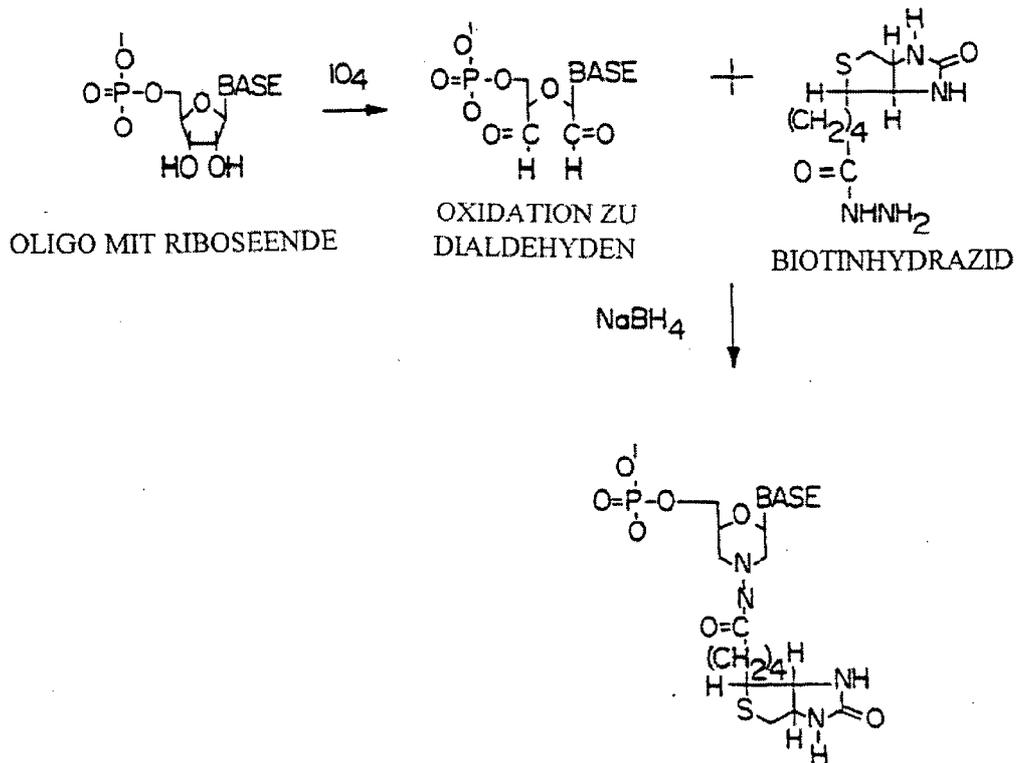


FIG. 10

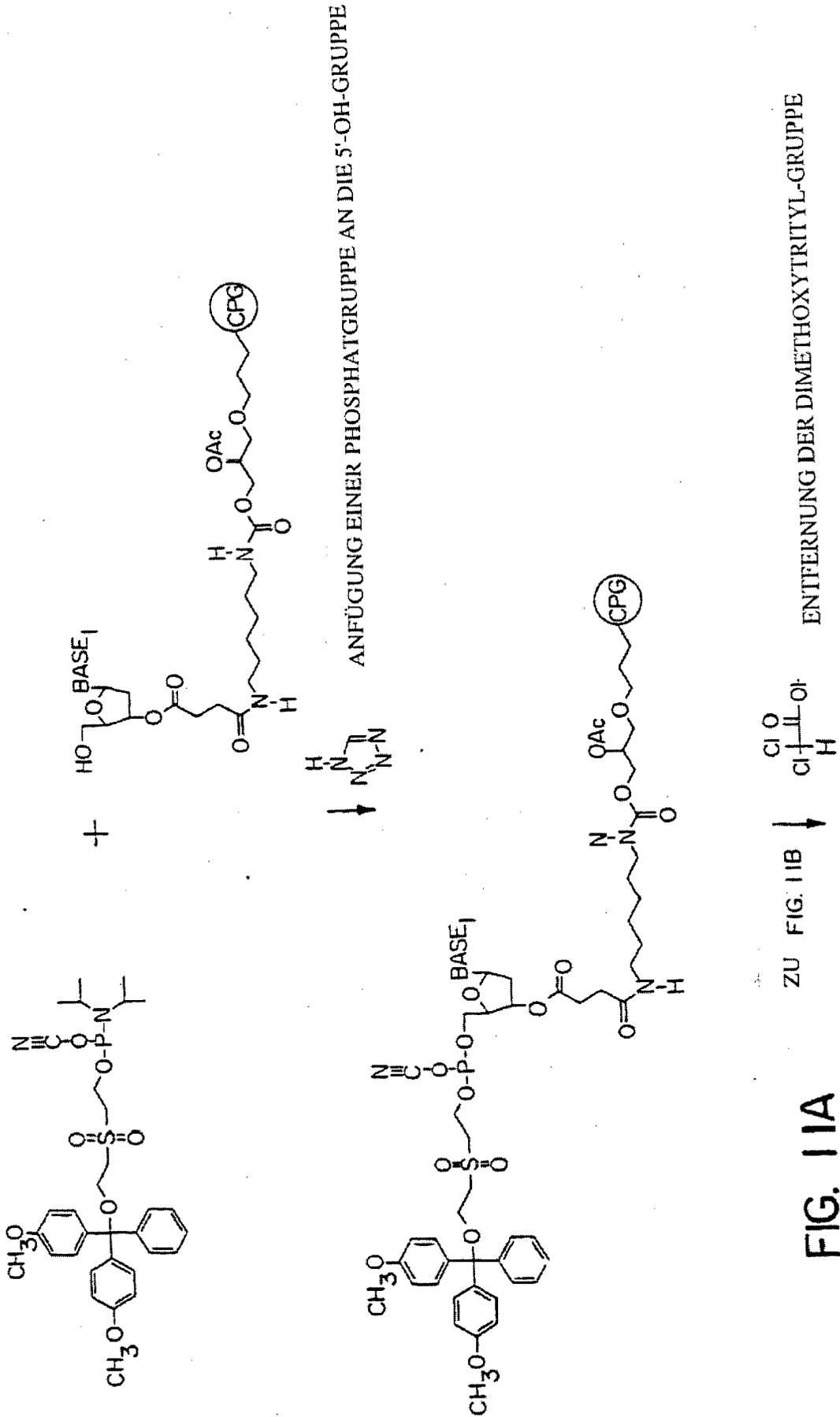


FIG. 11A

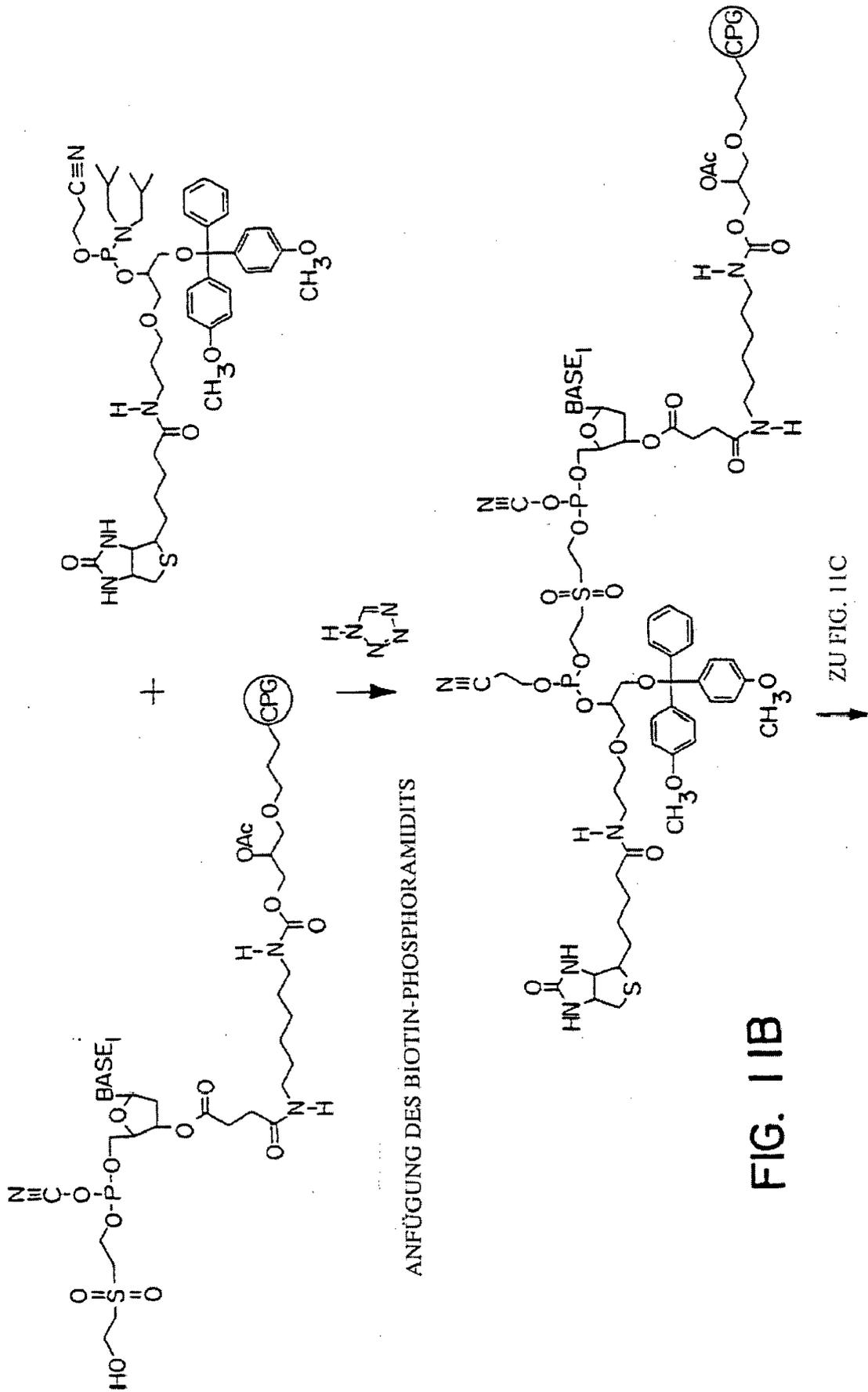


FIG. 11B

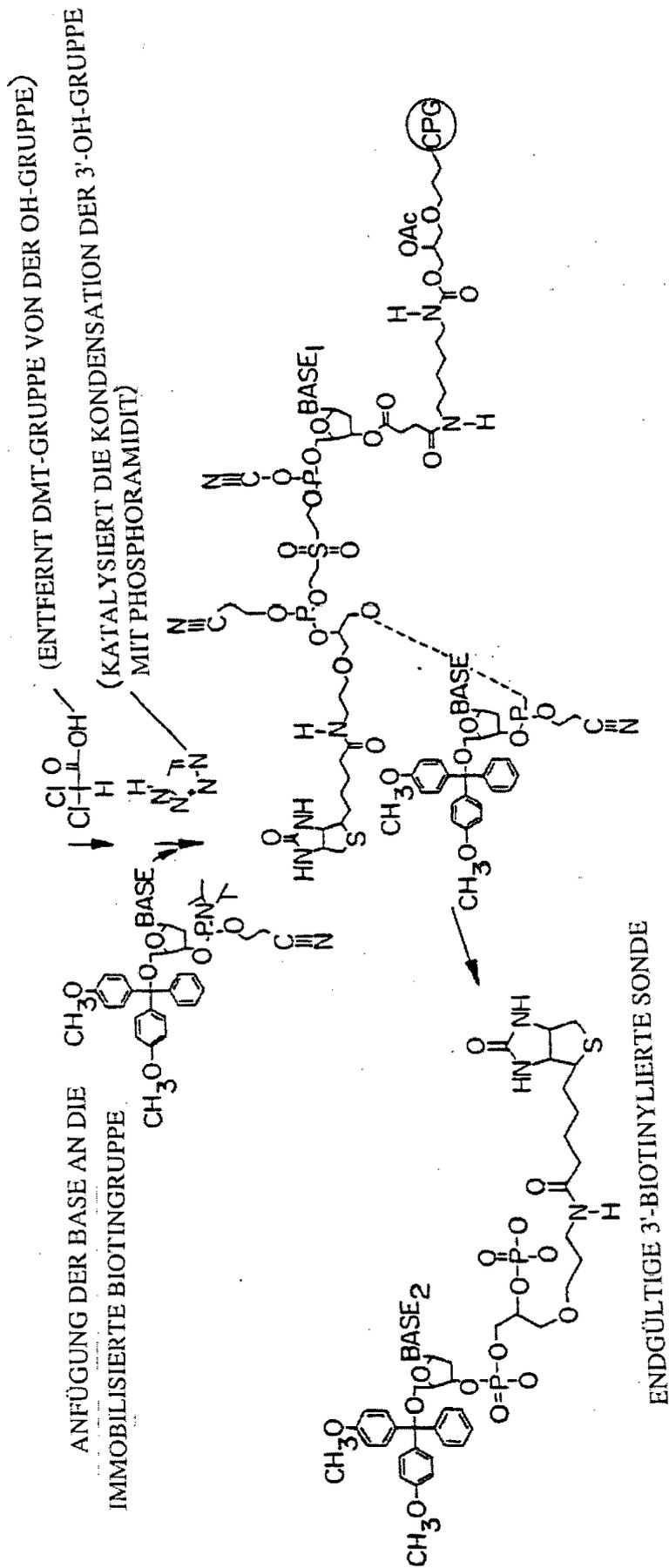


FIG. 1 IC

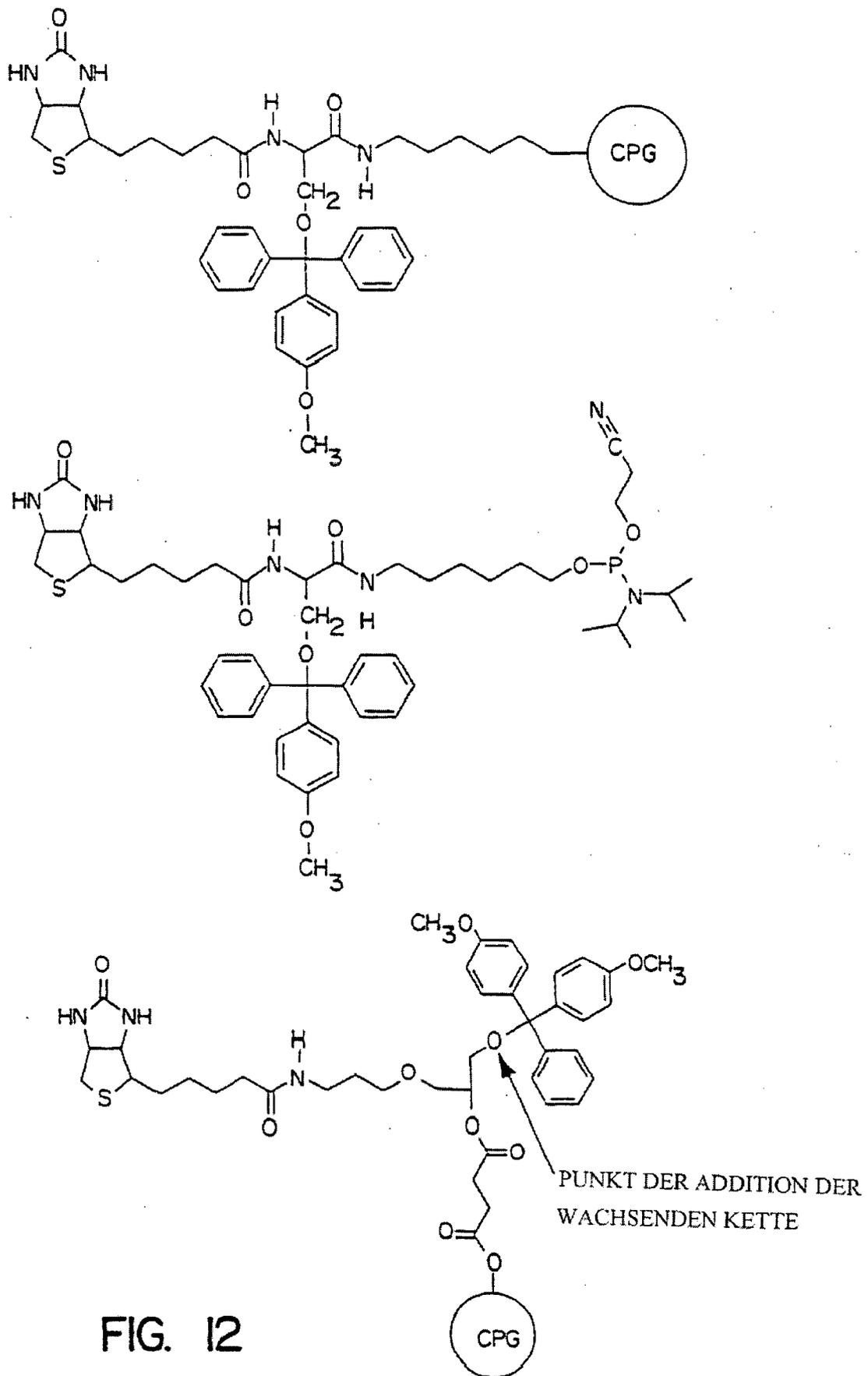


FIG. 12



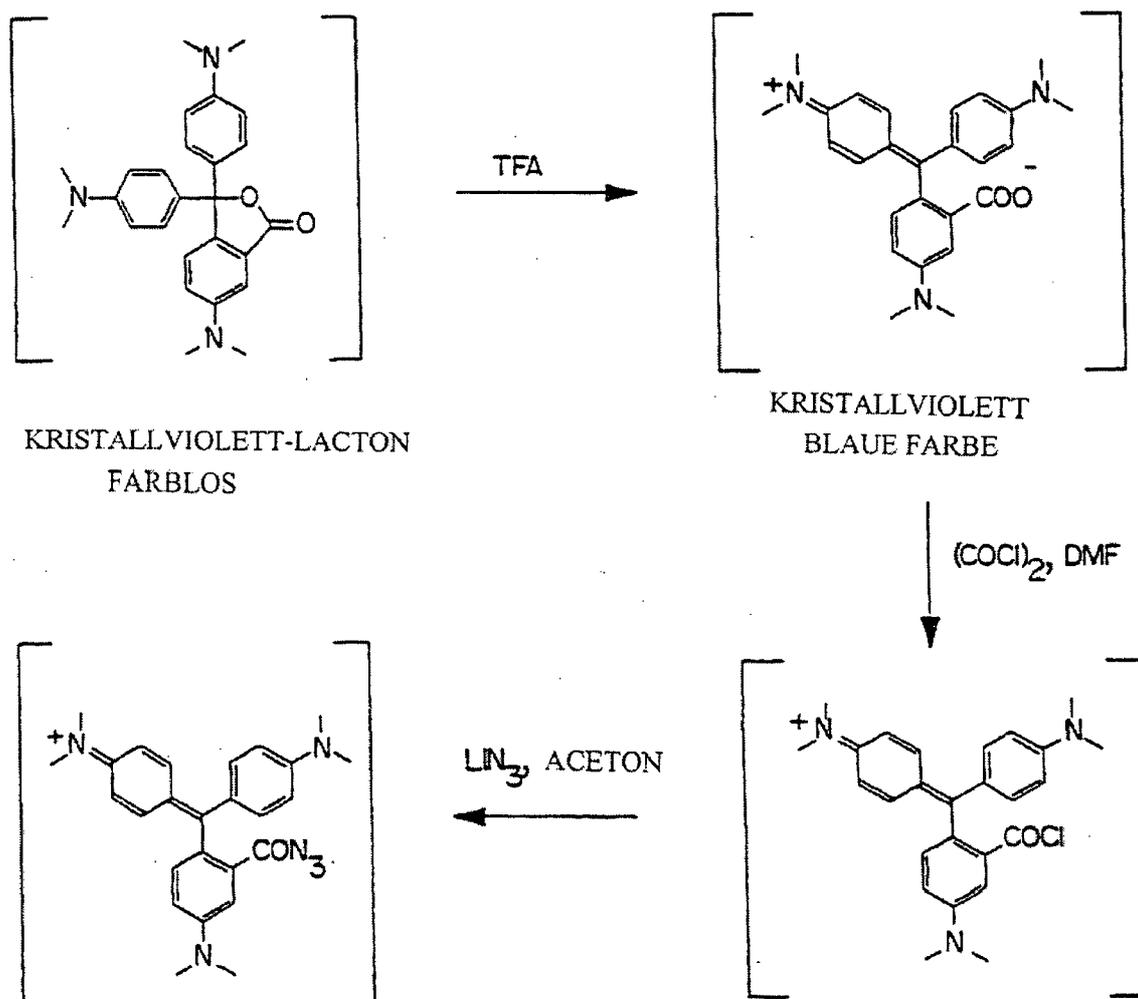


FIG. 14

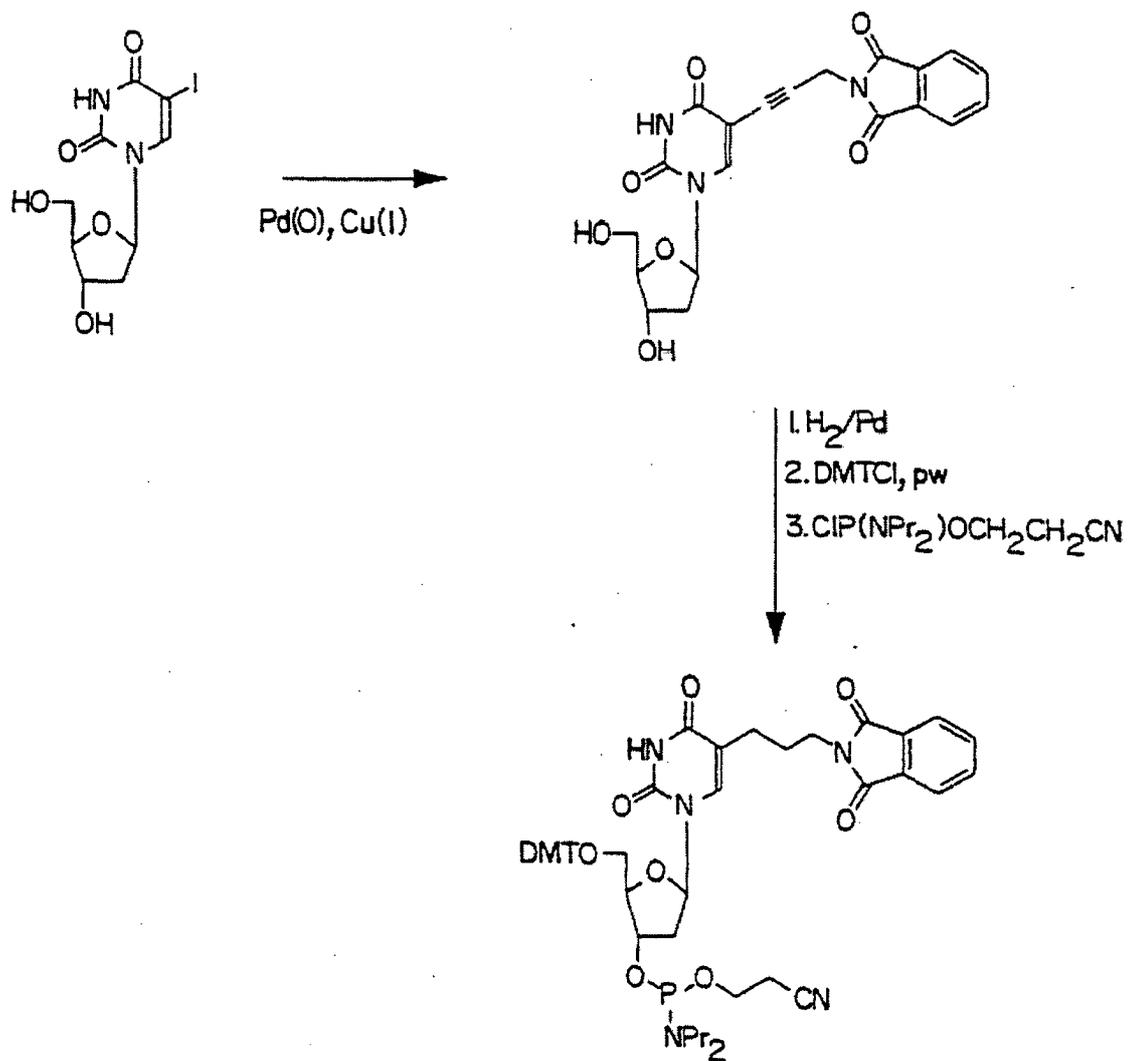


FIG. 15

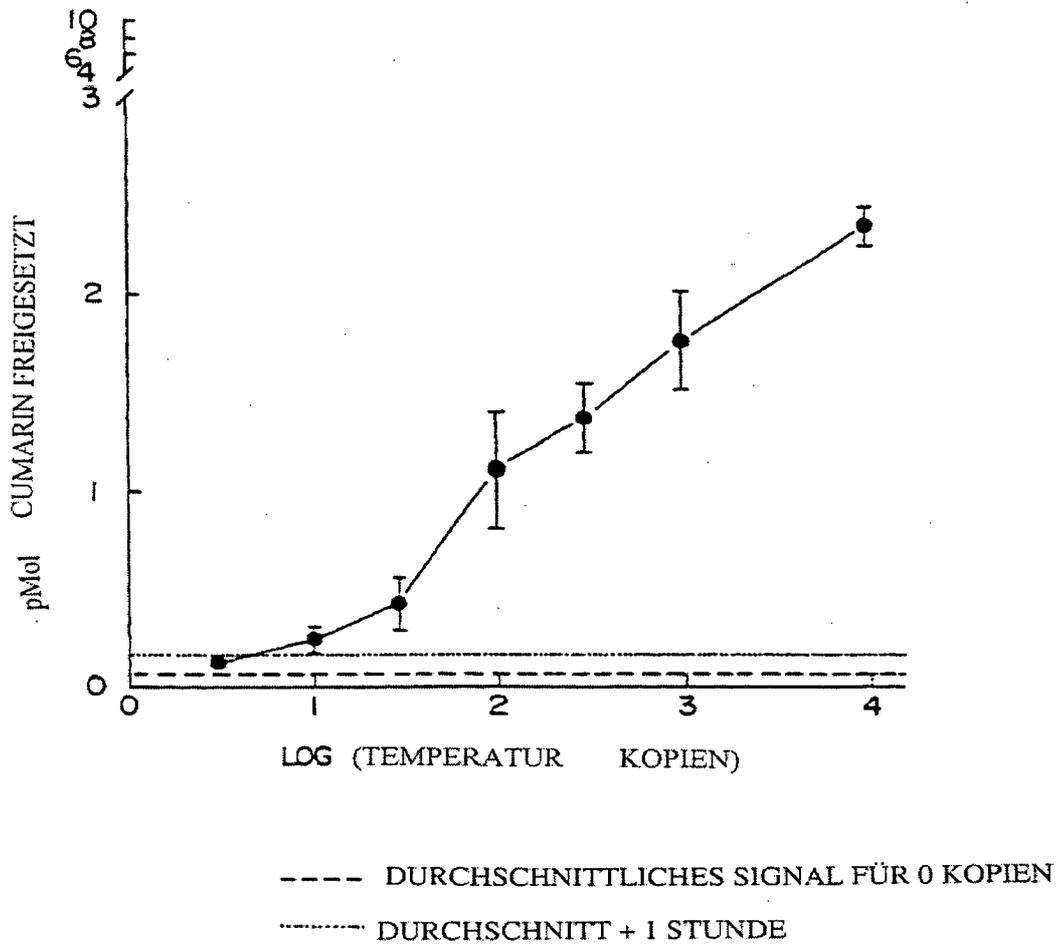


FIG. 16