



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 14 816 T2 2006.07.27

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 290 228 B1

(51) Int Cl.⁸: C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 14 816.9

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/BE01/00101

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 944 762.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/096592

(86) PCT-Anmeldetag: 14.06.2001

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 20.12.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 12.03.2003

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 09.11.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 27.07.2006

(30) Unionspriorität:

00870127 14.06.2000 EP

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Eppendorf Array Technologies SA (EAT), Namur,
BE

(72) Erfinder:

REMACLE, Jose, B-5020 Malonne, BE; ART,
Muriel, B-5000 Namur, BE; LOCKMAN, Laurence,
B-6600 Bastogne, BE; ZAMMATTEO, Nathalie,
B-5024 Gelbressee, BE

(74) Vertreter:

Patentanwaltskanzlei Vièl & Wieske, 66119
Saarbrücken

(54) Bezeichnung: UMGEKEHRTER NACHWEIS ZUR IDENTIFIZIERUNG UND/ODER QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEOTID-ZIELSEQUENZEN MITTELS BIOCHIPS

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

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

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren für die Identifizierung und/oder die Quantifizierung einer oder mehrerer in einer Probe vorhandener Nukleotidzielsequenzen bereit, das deren Unterscheidung von homologen Sequenzen ermöglicht, vor allem die Identifizierung und Quantifizierung bestimmter Arten von Mikroorganismen, die zur selben Familie gehören, oder für den Nachweis und/oder die Quantifizierung verschiedener Isotypen einer allgemeinen Sequenz, die zu einem bestimmten Organismus gehört (einschließlich Sequenzen mit Einzelnukleotidpolymorphismen).

HINTERGRUND DER ERFINDUNG UND STAND DER TECHNIK

[0002] Biochips, die mit vielen spezifischen Bindungs- oder Capture-Nukleotidsequenzen hergestellt sind, sind gut geeignete Hilfsmittel, um eine Unterscheidung zwischen entsprechenden verschiedenen homologen Nukleotidsequenzen durchzuführen, die in einer Probe nachzuweisen sind.

[0003] Es bestehen allerdings Unterschiede in einem Mikroorganismus oder zwischen Mikroorganismen, die sich nur durch eine Base der DNA- oder RNA-Sequenz unterscheiden. Da diese Sequenzen sehr ähnlich sind, kann zwischen einer bestimmten Nukleotidzielsequenz und verschiedenen Capture-Nukleotidsequenzen, an die sie binden kann, eine Kreuzreaktion auftreten.

[0004] Die Biochips-Technologie, welche die Hybridisierung und den Nachweis einer oder mehrerer Nukleotidzielsequenzen durch Verkleinerung ermöglicht, ist aufgrund der hohen Anzahl der auf dem Biochip gebundenen Capture-Nukleotidsequenzen ein nützliches Hilfsmittel für den Nachweis (die Unterscheidung) zwischen einer oder mehreren Nukleotidzielsequenzen. Sie erlaubt auch den Nachweis eines Genexpressionsmusters eines Gewebes, das erhalten wird, indem mRNA in cDNA kopiert und diese auf Biochips mit zu diesen Sequenzen komplementären Capture-Nukleotidsequenzen hybridisiert wird. Da sich die cDNA-Sequenzen voneinander unterscheiden, ist der Grad der Kreuzreaktionen gering, wobei die Capture-Nukleotidsequenzen aus einer aus dem Gewebe klonierten cDNA-Bank konstruiert sind (und ziemlich lange Sequenzen sind) und die Rate und der Ertrag der Hybridisierung hoch sind.

[0005] Wenn kleine Capture-Nukleotidsequenzen verwendet werden, ist der Hybridisierungsgrad eher gering, außer wenn die Zielsequenzen in kleinere Stücke geschnitten werden. In Lösung ist die Geschwindigkeit der Hybridisierung proportional zur Quadratwurzel der Stranglänge, wobei die Kürze limitierend ist (Wetmur, J. G., Biopolymers 10, 601 (1971); Anderson et Young in „Nucleic acid and hybridisation“, IRL Press, Hames, B. and Higgins, S. Hrsg., 73–111, Oxford-Washington DC (1985)). Wenn die Reaktion auf einer festen Fläche durchgeführt wird, ist der Einfluss der Länge der Capture-Nukleotidsequenzen noch größer als in Lösung, so dass der Unterschied zwischen der Fixierungsgeschwindigkeit einer bestimmten DNA-Zielsequenz auf kleinen oder langen Capture-Nukleotidsequenzen sehr groß ist.

[0006] Der Nachweis von DNA-Nukleotidzielsequenzen ist noch schwieriger, da die DNA zunächst amplifiziert werden muss (in der Regel durch PCR). Amplikons sind doppelsträngige DNA und neigen dazu, in Lösung zu reassoziiieren und nicht mit Capture-Nukleotidsequenzen zu hybridisieren, die an die feste Fläche gebunden sind (WO98/11253). Dieser Effekt ist außerdem direkt von der Länge der Capture-Nukleotidsequenzen abhängig, und kleine Capture-Nukleotidsequenzen führen zu einem Mangel an Empfindlichkeit. Es ist möglich, die DNA unspezifisch in Stücke zu schneiden (in Anbetracht der großen Anzahl von Sequenzen, die auf Chips analysiert werden). Es ist auch möglich, so viele Capture-Nukleotidsequenzen wie möglich auf einer Oberfläche des festen Trägers zu binden, um den Ertrag der Reaktion zu beeinflussen, aber die Konzentration, die gebunden werden kann, ist beschränkt. Schließlich ist die Auswahl der Sequenzen wichtig, da manche Sequenzen selbst bei gleicher Länge einen höheren Hybridisierungsertrag liefern als Andere (Bildung einer Sekundärstruktur, die den ersten Schritt, der zur Bildung eines Doppelstrangs führt, begünstigen oder beschleunigen kann).

[0007] Deshalb sind Capture-Nukleotidsequenzen mittlerer Länge, die noch einen guten Hybridisierungsertrag liefern, während sie den Nachweis homologer Zielsequenzen ermöglichen, als Kompromiss vorgeschlagen worden.

[0008] Kleine Capture-Nukleotidsequenzen erlauben jedoch die Unterscheidung zwischen Sequenzen, die sich nur in einer Base unterscheiden. Eine Anwendung dieser Anordnungen, die kleine Capture-Nukleotidse-

quenzen tragen, ist die Identifizierung von Sequenzen mit Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) (WO98/56954).

[0009] Die Patentanmeldung WO93/25563 beschreibt ein Verfahren zum Unterscheiden zwischen Sequenzen, die sich voneinander lediglich in einem einzigen Nukleotid unterscheiden, durch Verwendung eines PCR-Amplifizierungsverfahrens mit speziellem Primerdesign. Die Sequenz des Primers ist aus zwei Abschnitten zusammen gesetzt, der 3'-Abschnitt ist für die gewünschte Nukleotidzielsequenz spezifisch und der 5'-Abschnitt ist zu einer vorselektierten Nukleinsäuresequenz komplementär, die vorzugsweise an einen festen Träger als ein Bestandteil eines Rasters mit einer Gruppe von Sequenzen gebunden ist. Einer Hybridisierung des Primers an seine Zielsequenz folgt ein Verlängerungsschritt. Die Verlängerung des 3'-Abschnitts des Primers mit einem markierten Desoxynukleotidtriphosphat ergibt ein markiertes Verlängerungsprodukt, wenn die Vorlage die richtige Zielsequenz enthält, aber nur dann. Das markierte Verlängerungsprodukt wird durch Hybridisierung des 5'-Abschnitts der vorselektierten Sequenz und nicht durch einen für das Ziel spezifischen Sequenzabschnitt nachgewiesen.

[0010] Von Armour et al. (Nucl. Ac. Res. 28, 605–609, 2000) wurde ein Verfahren auf der Basis der Hybridisierung mittellanger Sonden auf immobilisierter langer DNA zum Nachweis des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins eines Lokus in genomicscher DNA vorgeschlagen. In diesem Verfahren wird eine genomicsche DNA auf einem Nylonfilter immobilisiert und dann mit spezifischen Sonden inkubiert. Die fixierten Sonden haben dieselben Primerbindungsstellen und werden anschließend amplifiziert. Die Sonden haben eine Länge von 140 bis 600 Basen und sind nicht geeignet, um kleine Unterschiede im Genom wie bei dem Nachweis homologer Sequenzen nachzuweisen.

ZIELE DER ERFINDUNG

[0011] Es ist das Ziel der vorliegenden Erfindung, eine neue und verbesserte Lösung für die Identifizierung und/oder Quantifizierung einer Nukleotidzielsequenz unter anderen möglichen homologen Zielsequenzen bereit zu stellen, indem Anordnungen verwendet werden, die Capture-Nukleotidsequenzen tragen, welche für die unterschiedlichen homologen Zielsequenzen spezifisch sind und welche nicht die Nachteile aus dem Stand der Technik aufweisen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0012] Die vorliegende Erfindung erlaubt die Unterscheidung zwischen homologen Zielsequenzen, die gleichzeitig in einer Probe vorhanden sein könnten, durch Umkehrung des Hybridisierungsvorgangs der zu hybridisierenden Sequenzen auf der Anordnung.

[0013] Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt eine Identifizierung (Nachweis und Charakterisierung) und/oder eine Quantifizierung von Nukleotidzielsequenzen auf der Basis eines zweistufigen Bindungsvorgangs, bei dem die Nukleotidsequenzen, die im ersten Schritt an das Ziel binden, im zweiten Schritt als auf der Anordnung nachzuweisende Ziele verwendet werden.

[0014] In dem erfindungsgemäßen Verfahren reagiert die Ziel-DNA (oder -RNA) zuerst mit unterschiedlichen, gegebenenfalls markierten Nukleotidsequenzen, anschließend, nach einem Wachschritt, werden die gegebenenfalls markierten Nukleotidsequenzen von den Nukleotidzielsequenzen gelöst und schließlich auf einer Anordnung, die Capture-Nukleotidsequenzen trägt, welche zu den gegebenenfalls markierten Nukleotidsequenzen komplementär sind, identifiziert. Erfindungsgemäß sind es die gegebenenfalls markierten Nukleotidsequenzen, die auf der Anordnung hybridisieren, und nicht die Nukleotidzielsequenzen.

[0015] In dem erfindungsgemäßen Verfahren haben die Capture-Nukleotidsequenzen und die Nukleotidzielsequenzen mindestens einen identischen Teil oder Abschnitt in ihrer Sequenz, während die gegebenenfalls markierten Nukleotidsequenzen zu diesen komplementär sind. Ein solches umgekehrtes Verfahren, wie in den beigefügten Ansprüchen beschrieben, löst das Problem einer effizienten Unterscheidung zwischen homologen Zielsequenzen vorteilhaft.

[0016] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung einer oder mehrerer Nukleotidzielsequenzen, die möglicherweise in einer Probe vorhanden sind, und zur Unterscheidung von anderen homologen Sequenzen, indem zwei Sätze von Nukleotidsequenzen verwendet werden, wobei in einem ersten Schritt ein erster Satz von (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenzen, die zwischen 8 und 60 Basen umfassen, spezifisch an die Nukleotidzielsequenzen bindet, wobei die (gegebenenfalls markierten)

Sequenzen des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen, die nicht an die Nukleotidzielsequenz gebunden sind, entfernt werden, wobei die (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenzen des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen, die an die Nukleotidzielsequenz gebunden sind, voneinander enthybridisiert und in einem zweiten Schritt durch Hybridisierung mit einem zweiten Satz von Capture-Nukleotidsequenzen nachgewiesen und/oder quantifiziert werden, bei denen mindestens ein Teil ihrer Nukleotidsequenz zu dem Teil der Nukleotidsequenz der (gegebenenfalls markierten) Sequenzen des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen, der spezifisch an die Nukleotidzielsequenzen bindet, komplementär ist, wobei die Capture-Nukleotidsequenzen auf der Oberfläche eines festen Trägers gemäß einer Anordnung von mindestens 4 unterschiedlichen Bereichen/cm² immobilisiert sind, wobei an jeden der diskreten Bereiche eine Art von Capture-Nukleotidsequenzen gebunden ist und wobei die Identifizierung und Quantifizierung der Bindung zwischen der (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenz und ihrer entsprechenden Capture-Nukleotidsequenz mit der Identifizierung und der Quantifizierung der in der Probe vorhandenen Nukleotidzielsequenzen korreliert.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem einen diagnostischen Apparat und/oder einen Quantifizierungsapparat einer oder mehrerer möglicherweise in einer Probe vorhandenen homologen Nukleotidzielsequenzen, welcher zwei gesonderte Kammern umfasst, die sich auf einem festen Träger befinden, und eine flüssige Verbindung zwischen den beiden Kammern, und wobei die zweite Kammer Capture-Nukleotidsequenzen enthält, die gemäß einer Anordnung von mindestens 4 unterschiedlichen Bereichen/cm² auf der Oberfläche des festen Trägers immobilisiert sind, wobei an jeden der diskreten Bereiche eine Art von Capture-Nukleotidsequenzen gebunden ist.

Definitionen

[0018] „Homologe Nukleotidsequenzen“ bedeutet DNA- oder RNA-Sequenzen mit demselben Nukleotid an entsprechenden Positionen. Der Grad der Homologie (oder Sequenzidentität) wird als Prozentanteil identischer Nukleotide an bestimmten Stellen nach optimaler gegenseitiger Ausrichtung der Sequenzen (ganze Sequenz) berechnet, wobei Insertionen oder Deletionen wie Lücken in einer der beiden zu vergleichenden Sequenzen berücksichtigt werden. Dies ist der Fall für Sequenzen eines bestimmten Gens, das in genetisch unterschiedlichen Quellen wie beispielsweise unterschiedlichen Organismusarten oder für Proteine oder Enzyme mit ähnlichen Funktionen (von derselben Familie oder mit gemeinsamer struktureller Domäne) vorhanden ist. Der Homologiegrad (oder die Sequenzidentität) kann stark variieren, wobei Sequenzen an einer bestimmten Stelle oder an mehreren bestimmten Stellen oder über die gesamte Sequenz hinweg homolog sein können. Die Teile (oder Abschnitte) der in beiden Sequenzen identischen Sequenzen werden als „konserviert“ bezeichnet. Die Sequenzen, die einen hohen Grad an Invarianz in ihren Sequenzen aufweisen, werden als hoch konserviert bezeichnet und geben einen hohen Homologiegrad wieder. Sequenzen, die sich durch nur eine Base unterscheiden können als Sequenzen mit dem höchsten Homologiegrad gelten. Dies ist der Fall bei Sequenzen, die für die Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms) oder SNP-Sequenzen verantwortlich sind.

[0019] Homologie (oder Sequenzidentität) wird berechnet, nachdem Sequenzen zueinander ausgerichtet worden sind, und basiert auf lokalen Homologiealgorithmen, die im Rechner berechnet worden sind (beispielsweise, jedoch nicht ausschließlich, Clustal, Intelligenetics, Mountain View, Kalifornien, USA, oder GAP, BESTFIT, FASTA und TFASTA aus dem Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group Madison, Wisconsin, USA, oder Boxshade).

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0020] [Fig. 1](#) ist eine Schemadarstellung von erfindungsgemäß umgekehrten Biochips, die aus zwei Kammern **5** und **6** bestehen, die auf demselben festen Träger **4** vorhanden und zum Zweck der Automatisierung verbunden sind.

AUSFÜHLICHE BESCHREIBUNG DER VORLIEGENDEN ERFINDUNG

[0021] Die Erfindung umfasst vorteilhafterweise die Verwendung von doppelten Biochips, wobei eine erste Kammer **5**, die eine zu identifizierende und aus einer Probe isolierte Nukleotidzielsequenz **3** trägt, eingeführt wird, und wobei eine zweite Kammer **6** vorhanden ist, welche verschiedene, an den festen Träger **4** der Biochips **7** gebundene Capture-Nukleotidsequenzen **2** umfasst, wobei die Capture-Nukleotidsequenzen, wie in [Fig. 1](#) dargestellt, für die markierten Nukleotidsequenzen **1** spezifisch sind. Zur Vereinfachung der Durchführung von Tests sind die Nukleotidzielsequenzen **3** auf dem festen Träger **4** immobilisiert, so dass sie mit verschiedenen markierten Nukleotidsequenzen **1** in der ersten Kammer reagieren können. Diese Immobilisierung

ist für die Erfindung jedoch nicht ausschlaggebend, da eine erste Hybridisierung in Lösung durchgeführt werden kann und die markierten Nukleotidsequenzen **1** danach von den Nukleotidzielsequenzen **3** getrennt werden können, bevor sie selbst auf der Anordnung nachgewiesen werden (Hybridisierung mit entsprechenden Capture-Nukleotidsequenzen **2**).

[0022] Der erste Vorteil des Verfahrens ist, eine Spezifität mit der Nachweisgeschwindigkeit zu verknüpfen. Die Spezifität wird durch die Tatsache erhalten, dass kleine markierte Nukleotidsequenzen verwendet werden, so dass sie in dem Teil der Nukleotidzielsequenzen gewählt werden können, in dem sie sich voneinander unterscheiden. Die Tatsache, dass es kleine Sequenzen verwendet, erlaubt auch die Unterscheidung von Sequenzen, die sich nur in einer Base unterscheiden (SNP-Sequenzen). In einer bevorzugten Ausführungsform haben die markierten Nukleotidsequenzen eine Sequenz zwischen 8 und 60 Basen, aber vorzugsweise zwischen 15 und 30 Basen, die spezifisch für die entsprechenden Nukleotidzielsequenzen sind.

[0023] Der zweite Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass die Hybridisierung der markierten Nukleotidsequenz **1** auf den immobilisierten Nukleotidzielsequenzen **3** im Vergleich zu einer Situation, bei der Capture-Nukleotidsequenzen **2** klein und Nukleotidzielsequenzen **3** in Lösung lange und in der Regel doppelsträngige Fragmente sind, ein eher schneller Prozess ist. Darüber hinaus lässt sich die Geschwindigkeit beschleunigen, indem eine Sequenz zur Hybridisierung der markierten Nukleotidsequenzen **1** ausgewählt wird, die sich entfernt von der Bindungsstelle der Nukleotidzielsequenzen **3** an den festen Träger befindet, und indem die markierten Nukleotidsequenzen **1** im Überschuss zugegeben werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die markierten Nukleotidsequenzen **1** in hohem Überschuss zugegeben, das heißt über 100 Mal mehr als die Menge der Nukleotidzielsequenzen, um die Geschwindigkeit und den Ertrag der Fixierung dieser markierten Nukleotidsequenzen **1** auf Nukleotidzielsequenzen **3** zu erhöhen.

[0024] Alle markierten Nukleotidsequenzen **1** sind gemeinsam zur Hybridisierung auf Nukleotidzielsequenzen **3** vorhanden, so dass die Reaktionen untereinander kompetitiv sind. Da die Sequenzen in derselben oder ähnlichen Konzentration vorhanden sind, richtet sich der Ertrag der Bindung nach der Affinität zu den Nukleotidzielsequenzen. Es wurde eine günstige Bindung der komplementären Sequenzen im Vergleich zu nicht-komplementären Sequenzen beobachtet, selbst wenn sie sich nur in einer Base unterscheiden, und die Unterscheidung zwischen homologen Sequenzen ist sehr gut.

[0025] In der zweiten Kammer **6** (der Anordnung) ist der Hybridisierungsertrag bei den verschiedenen markierten Nukleotidsequenzen **1** ähnlich, da sie dieselbe (oder ähnliche) Größe haben und auf Capture-Nukleotidsequenzen **2** ähnlicher Größe hybridisieren. Die Intensität der Punkte (Spots) gibt den Anteil an markierten Nukleotidsequenzen **1** an, die sich von den ersten Nukleotidzielsequenzen (die in der Probe vorhanden sind) abgelöst haben und für eine Hybridisierung in der zweiten Kammer **6** (der Anordnung) zur Verfügung stehen.

[0026] Die zweite Hybridisierung der Sequenz auf den Capture-Nukleotidsequenzen **2** in der Anordnung ist ein schneller Prozess, da auf Capture-Nukleotidsequenzen **2**, die konzipiert sind, um schnelle Reaktionen zu erlauben, kleine Sequenzen reagieren. Die Capture-Nukleotidsequenzen **2** können für eine solche Reaktion optimiert werden, damit diese in einer schnellen Geschwindigkeit abläuft, wobei die Verlängerung der spezifischen Sequenz vom Punkt der Bindung an den festen Träger **4** aus die Hybridisierungsgeschwindigkeit erhöht. Da die komplementäre Sequenz im Vergleich zu anderen nicht-komplementären Sequenzen immer im Überschuss vorhanden ist, ergibt der entsprechende Punkt (Spot) von Beginn der Reaktion an immer ein stärkeres Signal, was eine Identifizierung der Nukleotidzielsequenz ermöglicht. Wenn nur eine qualitative Bestimmung erforderlich ist, kann die Reaktion vor Abschluss angehalten werden, da die Signalstärke auf dem Punkt (Spot) ihren Anteil in der Lösung vom Start der Reaktion wiedergibt.

[0027] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist der Nachweis doppelsträngiger Ziel-DNA. Beim klassischen Nachweis von DNA-Zielsequenzen auf einer Anordnung ist die Hybridisierungsgeschwindigkeit in Anbetracht der Tatsache, dass die DNA-Zielsequenzen in Lösung erneut Duplizes bilden können, gering. Eine Möglichkeit, einer solchen Situation entgegen zu wirken, ist es, die Länge der Capture-Nukleotidsequenzen zu erhöhen, aber in diesem Fall werden homologe Sequenzen auf derselben Capture-Nukleotidsequenz kreuz-hybridisiert, was den Nachweis verfälscht. In dieser Erfindung wird das Ziel entweder vor oder nach der Immobilisierung in eine einzelsträngige Form überführt, damit die Konkurrenz zwischen den markierten Capture-Nukleotidsequenzen und dem zweiten Zielstrang zur Hybridisierung verringert oder reduziert wird. Die markierten Nukleotidsequenzen sind vorzugsweise einzelsträngige Nukleotide, um ihre Rehybridisierung in Lösung zu vermeiden.

[0028] Die Erfindung ist insbesondere für die Identifizierung und/oder Quantifizierung homologer Sequenzen

geeignet (Identifizierung eines besonderen Stamms von Mikroorganismen in einer Probe oder in der Forschung, wenn Gene spezifisch identifiziert werden müssen, die unter einer Population verwandter Gene für Proteine mit unterschiedlichen Rollen in normalen oder pathologischen Situationen kodieren). Dies gilt vor allem für regulatorische Gene wie Rezeptoren, Kinasen, Phosphatasen, Cycline, Transkriptionsfaktoren oder Onkogene. Homologe Nukleotidzielsequenzen, bei denen ein Teil ihrer Sequenz identisch ist, können durch Verwendung von Konsensusprimern amplifiziert oder kopiert werden. In vielen Anwendungen hat der Nachweis die Funktion, zwischen Nukleotidzielsequenzen ähnlicher Organismen zu unterscheiden (homologe DNA- oder RNA-Sequenzen). In diesem Fall werden Teile oder Abschnitte der konservierten Sequenzen zur Bindung von Primern verwendet, die alle diese homologen Nukleotidsequenzen erkennen (falls in der Probe vorhanden). Die Verwendung von lediglich einem Primerpaar für eine Familie oder Gattung von Organismen ist gegenüber der Verwendung von Primern, die für jede Art oder Unterart spezifisch sind, ein Vorteil, da manche Familien von Organismen mehr als dreißig Arten umfassen. Es ist außerdem schwierig (wenn nicht unmöglich), Amplifizierungsbedingungen zu finden, welche die Amplifizierung all dieser Arten in einer Multiplex-PCR erlauben (bereits eine Multiplex-PCR für 5 unterschiedliche Nukleotidsequenzen ist in reproduzierbarer Weise in Proben schwierig). Erfindungsgemäß kann ein Test konzipiert werden, um jede Familie von Organismen (wie die Bakterienfamilien) mit nur einem Primerpaar pro Familie zu amplifizieren. Wenn nur eine Kopie durchgeführt wird, wie im Falle einer reversen Transkription von mRNA, kann eine einzelne poly-dT-Sequenz der Transkriptase als Vorlage dienen, um die cDNA-Kopie zu erstellen.

[0029] Für die Hybridisierung in ersten sowie im zweiten Hybridisierungsschritt werden vorzugsweise kleine markierte Nukleotidsequenzen **1** verwendet. Die Verwendung kleiner Nukleotidsequenzen **1** erlaubt die Unterscheidung sehr homologer Sequenzen (mit einer Homologie zwischen 30 und 98%). Wenn die markierten Nukleotidsequenzen geeignet gewählt sind, können sie zwischen zwei Sequenzen unterscheiden, die sich nur in einer Base unterscheiden (SNP), was die Bestimmung eines Polymorphismus erlaubt.

[0030] In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten die markierte Nukleotidsequenzen **1** einen Teil in ihrer Sequenz, der spezifisch für ihre Nukleotidzielsequenzen **3** ist, sowie einen zusätzlichen Schwanz, der nicht spezifisch für die Nukleotidzielsequenzen **3** und spezifisch für eine bestimmte markierte Nukleotidsequenz ist. Dieser Schwanz ist komplementär zu den Capture-Nukleotidsequenzen **2**, die auf der Kammer **6** der Anordnung vorhanden sind. Da sich der Schwanz für jede markierte Nukleotidsequenz **1** unterscheidet, stabilisiert er eine perfekte Übereinstimmung auf der Anordnung, was zur Folge hat, dass eng verwandte markierte Nukleotidsequenzen, die sich beispielsweise in dem Teil der Sequenz, der für die Nukleotidzielsequenzen spezifisch ist, in einer Base unterscheiden, auf der Anordnung besser unterschieden werden.

[0031] Das Verfahren kann zum Nachweis von SNP-Sequenzen angewandt werden, indem Modifikationen der Nukleotidsequenzen **1** verwendet werden, die auf der DNA-Zielsequenz hybridisiert und anschließend in einem zweiten Schritt auf der Kammer **6** der Anordnung, welche die verschiedenen Capture-Nukleotidsequenzen **2** trägt, nachgewiesen werden.

[0032] In einer Ausführungsform wird die Erfindung angewandt, um SNP-Sequenzen nachzuweisen, indem eine Mischung von zwei oder mehreren markierten Nukleotidsequenzen verwendet wird, die am Ende ein anderes Nukleotid aufweisen, welches an die Nukleotidzielsequenz neben der möglichen SNP-Sequenz bindet, wobei eines der Endnukleotide der Nukleotidsequenz eine perfekte Übereinstimmung zu der SNP-Sequenz aufweist. Das Vorhandensein einer anderen angehängten Nukleotidsequenz, die neben der markierten Nukleotidsequenz bindet, ermöglicht, dass die perfekt übereinstimmende Nukleotidsequenz mithilfe einer Ligase mit dieser Nukleotidsequenz ligiert wird. Die ligierte Nukleotidsequenz wird dann auf der zweiten Anordnung nachgewiesen, so dass die SNP-Sequenz identifiziert wird. Die verschiedenen markierten Nukleotidsequenzen können unterschiedliche Markierungen tragen wie beispielsweise Cy3, Cy5 oder Cy7, so dass sie leicht identifiziert werden können. Falls nicht markiert, muss die zweite angehängte Nukleotidsequenz markiert werden, so dass das resultierende ligierte Produkt markiert ist.

[0033] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird eine Mischung der markierten Nukleotidsequenzen verwendet, von denen sich jede an mindestens einer Base unterscheidet, die sich am Ort desselben SNP befindet. Nach der Hybridisierung werden die nicht übereinstimmenden Nukleotidsequenzen von einer für einen Einzelstrang spezifischen Nuklease ohne Wirkung auf die doppelsträngige DNA geschnitten und der Vorgang wiederholt. Die ungeschnittenen und geschnittenen Nukleotidsequenzen werden dann zur Hybridisierung auf Kammer **6** der Anordnung verarbeitet. Bei geeigneten Hybridisierungsbedingungen und mit gut gewählten Capture-Nukleotidsequenzen auf der Anordnungskammer können sie entweder die langen ungeschnittenen oder die kleinen geschnittenen Nukleotidsequenzen hybridisieren, was die Identifizierung der SNP-Sequenz erlaubt.

[0034] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird eine Mischung mehrerer Nukleotidsequenzen verwendet, die unterschiedliche Teile der Nukleotidzielsequenzen erkennt, wie beispielsweise SNP-Sequenzen entlang der Nukleotidzielsequenz, und im zweiten Schritt des Verfahrens auf der Anordnung nachgewiesen. Zahlreiche Capture-Nukleotidsequenzen **2** können auf der Anordnung fixiert werden und können zwischen zahlreichen markierten Nukleotidsequenzen **1** unterscheiden. Auf diese Weise ist es möglich, in einem Test mehrere Variationen wie beispielsweise möglicherweise in einer bestimmten Nukleotidzielsequenz vorhandene Mutationen zu untersuchen. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn alle diese Variationen möglicherweise im Ziel vorhanden sind und wenn sie mit einer pathologischen Situation korreliert sind. Dies ist der Fall für Mutationen, die in Onkogenen (wie p53) auftreten, wobei viele davon mit einem Fortschreiten als Krebserkrankung verbunden sind, während bei HIV Virusenzyme zu einer Resistenz gegenüber der Arzneimittelbehandlung führen. SNP könnten darüber hinaus auch mit einer individuellen Variabilität verknüpft sein, was das Ansprechen auf eine Arzneimittelbehandlung oder auf Pathologien beeinflusst.

[0035] In einer bevorzugten Ausführungsform werden beim ersten Hybridisierungsschritt mehrere Nukleotidzielsequenzen verwendet, um eine breitere Antwort auf das gegebene Problem zu erhalten und aus den zahlreichen auf der Anordnung möglichen Nachweisen einen Vorteil zu ziehen.

[0036] Vorteilhafterweise können Nukleotidzielsequenzen nachgewiesen werden, ohne dass sie in einem Kopier- oder Amplifizierungsschritt markiert werden, was den direkten Nachweis von DNA- oder RNA-Sequenzen ermöglicht (bei den meisten vorherigen Verfahren werden Nukleotidzielsequenzen während des Amplifizierungs- oder Transkriptionsschrittes markiert). Dies erlaubt eine Vereinfachung der endgültigen Verwendung der Biochips, da der Anwender die Amplifizierung auf jede Art und Weise durchführen kann und keine Rücksicht auf mögliche Wechselwirkungen mit dem markierten Reagenz während dieses Schrittes nehmen muss. Diese Eigenschaft erlaubt auch die Identifizierung von Sequenzen unmittelbar nach der Extraktion aus Proben, wobei der Schritt des Kopierens oder Amplifizierens entfällt, was die Durchführung erleichtert. Dieser direkte Nachweis kann nur durchgeführt werden, wenn genug Material verfügbar ist. Die erfindungsgemäßen Anwendungen gelten (jedoch nicht ausschließlich) für die RNAs wie beispielsweise die ribosomale RNA 16s, 23s, 18s oder 25s, jedoch auch für die mRNA. Da es sich bei dieser RNA um Einzelstrangnukleotide handelt, ist es nicht erforderlich, nach deren Immobilisierung auf dem Träger eine solch drastische Denaturierung wie im Falle von doppelsträngigen Amplikons zu verwenden, so dass in diesem Schritt eine nicht kovalente Bindung verwendet werden kann. Der Nachweis von RNA, ob ribosomale RNA oder Boten-RNA (mRNA), entweder direkt oder nach Kopieren in ihre komplementäre DNA-Sequenz, ist eine bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung, da sie in der Regel in Zellen in vielen Kopien vorliegt, so dass ihr Nachweis bei vielen Anwendungen ohne Amplifizierung durchgeführt werden kann. Dieser direkte Nachweis erleichtert auch die Quantifizierung, da eine Vermeidung der Amplifizierung die Variation reduziert, die sich durch diesen Schritt ergibt, was sehr häufig schwer in den Griff zu bekommen ist. Ein direkter Nachweis kann auch auf lange DNA-Sequenzen abgestimmt werden, nachdem diese extrahiert und denaturiert sind oder nachdem sie in kleinere Stücke geschnitten wurden sind.

[0037] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Nukleotidzielsequenz **3** unter Verwendung von Konsensusprimern (Sequenzen, die von denselben Primern amplifiziert werden), amplifiziert. Homologe Sequenzen sind beispielsweise Sequenzen von Genen in derselben Familie oder Gattung von Mikroorganismen. Für diese Amplifizierung wird einer der Primer aminiert, so dass einer der Amplikonstränge nach der Amplifizierung diese Aminogruppe trägt. Die Amplikons werden dann auf einer Oberfläche inkubiert, die Aldehydgruppen trägt. Die Reaktion zwischen dem Amin und dem Aldehyd ist unter normalen Bedingungen spontan, es ist kein anderes Reagenz erforderlich. Nach der Reaktion wird anschließend ein Reduktionsmittel (NaBH_4) zugegeben, um die reaktiven Doppelbindungen zu beseitigen. Der zweite Strang wird anschließend entfernt, indem Denaturierungsbedingungen für die Nukleotidsequenzen verwendet werden. Es ist möglich, die Temperatur über den Schmelzpunkt der Nukleotidsequenzen zu erhöhen, so dass sie sich vom Zielstrang lösen, aber es können andere Bedingungen wie die Verwendung einer alkalischen Lösung verwendet werden (eine Konzentration von 0,1 oder sogar 0,05 N einer NaOH-Lösung ist ausreichend, um die beiden Stränge zu trennen).

[0038] Die Bindung der Amplikons an die aktivierte Oberfläche kann durch das Vorhandensein der Primer, die nach der Amplifizierung noch in der Lösung vorhanden sind, begrenzt werden. Diese Primer können auch auf der aktivierte Oberfläche reagieren, und damit die Fixierung der Zielamplikons verringern. Gegebenenfalls werden die Amplikons vor der Durchführung ihrer Fixierung auf der Oberfläche getrennt (Trennung auf Zentrifugations-Säule, aber für eine solche Trennung eignet sich auch eine auf Kieselgel basierende Adsorption wie der PCR-Reinigungs-Kit Nucleo-Trap (Clonetech) oder die Filtration auf einem Gelfilter (Nucleo Spin Clonetech)).

[0039] Auch elektrophoretische Verfahren liefern gute Trennungen von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe und durch die Miniaturisierung solcher Techniken eignen sie sich nun für derzeitige Anwendungen wie sie in solchen Routineanwendungen benötigt werden.

[0040] Erfindungsgemäß ist der Test ein Tandem-Chip, der auf demselben Träger **4** durchgeführt wird. Auf der ersten Kammer **5** werden die Nukleotidzielsequenzen durch kovalente Fixierung auf einem aktiven Träger **4** immobilisiert. Kovalente Reaktionen sind in der Chemie gut bekannt und viele von ihnen werden bereits für die Bildung von Chips verwendet, beispielsweise durch die Reaktion einer aminierten Nukleotidzielsequenz mit einer auf der Chip-Oberfläche vorhandenen Aldehydgruppe. In einer anderen Ausführungsform werden die Zielsequenzen entweder direkt oder während des Kopier- oder Amplifizierungsschrittes vorzugsweise an einem Strang biotinyliert und das Ziel auf einer Streptavidinbeschichteten Oberfläche immobilisiert. In einer anderen Ausführungsform wird ein beliebiges Hapten oder ein beliebiger Ligand auf der Zielsequenz fixiert, so dass sie durch den entsprechenden, auf einer Oberfläche immobilisierten Antikörper oder Rezeptor immobilisiert wird.

[0041] Viele Träger können so angepasst werden, dass dieser Schritt stattfinden kann. Glas wird aktiviert, um Aldehydgruppen zu tragen. Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten, Aldehydgruppen auf eine Oberfläche zu übertragen. Glas reagiert mit Aminosilan und danach mit Glutaraldehyd. Man kann Carboxylgruppen auf die Oberfläche des festen Trägers binden und sie dann zu einem Aldehyd reduzieren. Auch Alkoholfunktionen können zu Aldehyden oxidiert werden. Allerdings ist auch die Verwendung bifunktioneller Aktivatoren wie SMCC oder DSS nützlich, da sie Aminogruppen aktivieren und sie entsprechend mit Thiol- oder Amingruppen verknüpfen können. Eine solche chemische Kopplung ergibt eine kovalente Fixierung der Nukleotidzielsequenzen an den Träger, die vor allem dann nützlich ist, wenn die Nukleotidzielsequenzen doppelsträngig sind und in einer Denaturierungslösung behandelt werden müssen. Auch eine einfache Adsorption auf einer Oberfläche wie Nylon, Zellulosederivat oder einer positiv geladenen Oberfläche, die beispielsweise mit Polylysin beschichtet ist, oder auf einem Copolymer wie Poly(Phe-Lys) ist ein geeignetes Verfahren für die Adsorption von Nukleotidsequenzen auf einer Oberfläche. In diesem Fall werden Bedingungen für die Adsorption langer DNA-Zielfragmente anstatt kleiner Primer ausgearbeitet.

[0042] Während Glas viele Vorteile aufweist, wie beispielsweise inert zu sein und eine geringe Eigenfluoreszenz aufzuweisen, können andere Träger, beispielsweise Polymere, ebenfalls nützlich sein, da auch sie mit verschiedenen chemisch gut charakterisierten Gruppen auf ihrer Oberfläche erhalten werden können, was die Fixierung der Ziel-DNA ermöglicht. Polystyrol wurde aktiviert, um Carboxyl- oder Aminogruppen an der Oberfläche zu erhalten, was eine kovalente Fixierung von Amino-DNA ermöglicht (Anal. Biochem. 236. 85 (1996)). Die meisten Polymere können aktiviert werden, um Carboxyl-, Amino- oder Aldehydgruppen zu erhalten. Polystyrol ist nur als flacher Träger erhältlich, sondern auch als Mikrokügelchen, die vorteilhafterweise verwendet werden, um den ersten Bindungsschritt der markierten Sonden auf den immobilisierten Zielen durchzuführen.

[0043] Es können alle anderen Träger verwendet werden, die DNA fixieren können, wie beispielsweise Filter, Silikonträger, Metallträger, Compact Discs, Kunststoffvorrichtungen oder elektronische Vorrichtungen. Vorteilhafterweise ist der feste Träger eine einzelne Glas- oder Kunststoffplatte, die weitere Mittel (Strichcodes, Markierungen, etc.) oder Medien (Beschichtung, etc.) umfassen kann, um das erfindungsgemäße Verfahren zu verbessern. Eine Kombination von Trägern wie Glas, das in einen Kunststoffträger eingesetzt ist, eignet sich zur Handhabung der Chips zur Automatisierung.

[0044] Nach und/oder vor der Bindung werden die Nukleotidzielsequenzen denaturiert, was zu der Bildung einer einzelsträngigen immobilisierten Nukleotidzielsequenz führt. Die Lösung, welche die verschiedenen markierten Nukleotidsequenzen enthält, wird dann zu diesen ersten Monochips gegeben und sie können reagieren, wenn ihre komplementäre Sequenz auf der Nukleotidzielsequenzen vorhanden ist. Nach dem Waschen wird die Lösung erhitzt und die gebundenen Nukleotidsequenzen von den Nukleotidzielsequenzen abgelöst und in Lösung vorgefunden. Diese Lösung wird dann durch spezifische Kanäle oder andere Mittel auf die zweite Kammer **6** (Waschschritt anhand von Mikropumpen oder Ventilen), welche die für die markierten Nukleotidsequenzen spezifischen Capture-Nukleotidsequenzen enthält, übertragen. Anschließend wird die zweite Hybridisierung durchgeführt, welche es ermöglicht, die markierten Nukleotidsequenzen und damit die Nukleotidzielsequenz zu identifizieren. Wenn die verschiedenen Schritte gut durchgeführt werden, kann der Test quantitativ durchgeführt werden, was nicht nur die Identifizierung sondern auch die Quantifizierung der Nukleotidzielsequenzen erlaubt. Da alle Schritte auf derselben Oberfläche **4** durchgeführt werden, ist der Test anwendbar und kann automatisiert werden.

[0045] In der bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung werden Konsensusprimer bei der PCR-Amplifi-

zierung der möglicherweise in der Probe vorhandenen homologen Sequenzen verwendet. Es sind funktionelle Gruppen wie NH₂ oder Biotin eingebaut, um sie auf einer festen Oberfläche, wie oben beschrieben, anzubringen. Es sind auch andere Amplifizierungsverfahren wie LCR, CPR, NASBA, ICR, TMA oder Avalanche-DNA möglich. Auf dieselbe Weise kann nach einer reversen Transkription auch eine RNA-Amplifizierung durchgeführt werden. Es können auch kurze DNA-Sequenzen durch spezifische Spaltung mit Restriktionsenzymen und kleine RNA-Sequenzen durch unspezifische Spaltung durch Hitze oder in Gegenwart einer Base erhalten werden (WO97/10365).

[0046] Es kann eine indirekte Markierung mittels biotinylierter markierter Nukleotidsequenzen, die danach ein Streptavidinkonjugat mit entweder fluoreszierenden Molekülen oder mit Enzymen oder mit kolloidalen Goldpartikeln binden, verwendet werden. Diese Goldpartikel können selbst nachgewiesen werden oder dienen als Katalysatoren für die Reduktion von Silber. Das Präzipitat wird anschließend nachgewiesen und gegebenenfalls quantifiziert (EP-99870106.4).

[0047] Eine Markierung könnte auch mit einer Hapten- oder Antikörperreaktion erhalten werden, wobei der Antikörper die Markierung ist oder an ein Molekül gebunden ist, das ein Signal geben kann.

[0048] Alle Verfahren des Nachweises von DNA, die auf Fluoreszenz, Kolorimetrie, Magnetismus, Elektronik, Elektrolumineszenz, Biolumineszenz oder Radioaktivität beruhen, die auf DNA-Chips abgestimmt sind, können zum Nachweis der Anordnung verwendet werden.

[0049] Die Auswahl der nachweismarkierten Nukleotidsequenzen und ihrer komplementären Capture-Nukleotidsequenzen ist ein wichtiger Schritt im Gesamtverfahren, wenn homologe Sequenzen voneinander spezifisch unterschieden werden müssen. Je höher die Homologie zwischen den Sequenzen ist, desto wichtiger ist die Auswahl dieser Sequenzen. Vorzugsweise wird ein kleiner Sequenzbereich (oder -abschnitt) ausgewählt, in dem sich die homologen Sequenzen am meisten (oder sehr) unterscheiden, und es werden die markierten Nukleotidsequenzen als zu diesem Bereich (oder Abschnitt) komplementär ausgewählt. Auch die Länge der Sequenzen variiert je nach Homologie; sie ist länger, wenn die Sequenzen eher unterschiedlich sind, und sie ist kürzer, wenn sie sehr homolog sind. Die Sequenzen haben eine Länge zwischen 15 und 30 Basen, können aber auch nur 8 Basen kurz oder bis zu 60 Basen lang sein. Die punktweise auf der Anordnung aufgetragenen Capture-Nukleotidsequenzen sind komplementär zu den markierten Nukleotidsequenzen. In einer bevorzugten Ausführungsform befinden sich diese Sequenzen **2** in einem bestimmten Abstand zu der Oberfläche **4**, entweder indem sie unspezifische Sequenzen haben, welche an die Oberfläche **4** gebunden sind, oder indem für die Fixierung ein Linker verwendet wird.

[0050] Die Verwendung einer einzelnen Oberfläche zur Durchführung der beiden Hybridisierungsschritte ermöglicht die Anpassung des Verfahrens an eine Automatisierung und an Mikrofluidtechnologie. Die Oberfläche ist in zwei Kammern aufgeteilt, wobei in der ersten Kammer die Ziel-DNA oder – RNA gebunden ist und die markierten Sequenzen auf den Zielsequenzen hybridisieren und die zweite Kammer die Anordnung darstellt und die verschiedenen Capture-Sequenzen enthält. Injektion und Entfernen von Flüssigkeiten aus jeder Kammer kann durch Kanäle und Pumpen erfolgen, so dass Inkubationen und Waschschritte möglich sind. Die Kammern können auch auf die erforderliche Temperatur erwärmt werden.

[0051] Die zwei Kammern können auch durch eine kleine Röhre oder einen kleinen Kanal verbunden sein, so dass nach Ablösung der markierten Nukleotidsequenzen von dem Ziel die Lösung in eine zweite Kammer überführt und für die Hybridisierung auf der Anordnung verarbeitet werden kann. Der gesamte Vorgang, sogar einschließlich des Nachweises, kann automatisiert werden, was den umgekehrten Chipnachweis zu einem einfachen Verfahren macht. Diese Erfindung wiederholt die Schritte des Bindens und Ablösen markierter Nukleotidsequenzen auf den immobilisierten Zielen, so dass die spezifischen Nukleotidsequenzen sich in der Anordnung ansammeln, um auf Capture-Nukleotidsequenzen unterschieden zu werden. Automatisierung des Verfahrens durch einen Automaten oder eine Maschine eignet sich besonders gut zur Wiederholung des Vorgangs.

[0052] Diese Technologie lässt sich leicht an bestehende Automaten anpassen. Einer davon ist der VIDAS (Biomerieux, Lyon, Frankreich), entwickelt für ELISA-Assays. Er hat die Eigenart, die Antigen/Antikörper-Reaktion in den Spitzen durchzuführen, welche dann schrittweise in die verschiedenen Lösungen zum Waschen und Inkubieren weitergeleitet werden. Anschließend wird das in einer solchen Spalte erhältene Endsignal aufgezeichnet. Die Anordnung kann wie eine Pipettierspitze in eine Vorrichtung eingesetzt werden, so dass Lösungen nach innen gepumpt werden und auf der Anordnung umgesetzt, gewaschen und inkubiert werden können. Die Durchführung der Reaktion auf einer Spalte wurde für Antikörper-/Antigenreaktionen entwickelt und

ist gut an, die von der VIDAS-Maschine (Biomerieux, Lyon, Frankreich) durchgeführte Automatisierung angepasst. Nach Abschluss der Reaktion wird das Signal wie hiernach beschrieben auf der Anordnung nachgewiesen.

[0053] Ein System mit einer doppelten Anordnung könnte auf die gleiche Weise behandelt werden, wobei jede Anordnung in eine Mikropipettenvorrichtung eingesetzt und mit der anderen verbunden ist, um die Lösung mit Nukleotidsequenzen weiterzugeben, wenn dies vom Protokoll vorgesehen ist.

[0054] Mikrofluidtechniken machen es außerdem möglich, dass der gesamte Prozess der Amplifizierung und/oder der Trennung von Amplikons von den überschüssigen Primern auf derselben Oberfläche durchgeführt werden, was zu einem „Labor-auf-einem-Chip“-Produkt führt. Die endgültige Oberfläche enthält mehrere oder alle der Kompartimente: eine Kammer, in welcher die PCR durchgeführt wird, eine Trennvorrichtung für die Reinigung der Amplikons, falls erforderlich, eine Kammer für die Immobilisierung der Amplikons und die erste Hybridisierung mit den verschiedenen markierten Nukleotidsequenzen und schließlich eine Kammer mit der Anordnung für die endgültige Identifikation der Nachweisnukleotidsequenz. Das Endprodukt würde die erforderlichen Verbindungen aufweisen, damit die Flüssigkeiten von einer Kammer in die andere geleitet werden kann sowie für die Inkubationen und Waschschritte mit den externen Lösungen. Dem Automaten könnte auch ein Detektor hinzugefügt werden, um eine voll automatisierte Analyse des Assays zu erhalten. Die Trennung der Amplikons von den Primern kann anhand von Filtration, einem Adsorptions-Desorptions-Prozess oder Mikroelektrophorese erfolgen, wie beispielsweise von ACLARA Biosciences (Mountain View, CA, USA) vorgeschlagen.

Analyse des Ergebnisses der Hybridisierung

[0055] Das Ergebnis der Hybridisierung auf der Anordnung muss von der Maschine nachgewiesen und/oder quantifiziert werden, indem ein Nachweissystem verwendet wird, das auf das Signal, was bei einer positiven Hybridisierung ausgesandt wird, abgestimmt ist. Die häufigste Markierung von in Mikroanordnungen verwendetem DNA beruht auf dem Gebrauch fluoreszierender Nukleotidsequenzen. In diesem Fall dienen Fluoreszenz-Scanner als Detektoren (d.h. ein konfokaler Fluoreszenz-Scanner (Genetic Microsystem, Woburn, MA, USA)).

[0056] Die Bildung eines Präzipitats auf den positiven Punkten (Spots), vor allem Silberpräzipitat nach Markierung mit Nanogold, eignet sich besonders gut für einen einfachen Nachweis, da kolorimetrische Scanner oder fotografische Detektoren, die eine besonders kostengünstige Technologie darstellen, den Grad der Reaktion nachweisen und/oder quantifizieren können (EP-99870106.4).

[0057] Es ist eine Software-Analyse zur Bilderkennung an die Punkte (Spots) angepasst worden, gefolgt von einer Quantifizierung des auf jedem Punkt (Spot) vorhandenen Signals, wobei die Stärke des Hintergrunds berücksichtigt wird. Eine andere Art von Analyse beruht auf einer Korrelationsanalyse der Punkte (Spots), wobei die Form und die Stärke jedes Pixels der Punkte (Spots) berücksichtigt werden. Eine Klassifizierung der Punkte (Spots) entsprechend dem Grad der Korrelation erlaubt anschließend eine Klassifizierung in positive oder negative Punkte (Spots), was dem Anwender eine einfache Antwort darauf gibt, ob die Ziele in der ursprünglichen Probe vorhanden sind oder nicht.

[0058] Die Quantifizierung der Hybridisierung erfolgt anhand von herkömmlichen Ansätzen, entweder durch einen internen oder einen externen Standard, der Korrekturen der verschiedenen Erträge erlaubt, welche in den verschiedenen Schritten des Prozesses erhalten werden, angefangen bei der Extraktion, der Kopie oder Amplifizierung, der ersten Hybridisierung und der zweiten Hybridisierung auf der Anordnung. In der bevorzugten Ausführungsform wird der Probe ein externer Standard in einer bekannten Konzentration zugegeben und während aller Schritte mitverarbeitet, um die Effizienz des Gesamtverfahrens zu korrigieren. Da das Verfahren in der Regel ein Kopier- oder Amplifizierungsverfahren enthält, ist ein kompetitiver Standard die bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. Einer davon ist in Dokument WO98/11253 vorgeschlagen worden.

[0059] Vorzugsweise ist der Hybridisierungsertrag des Standards durch diese spezifische Sequenz ideal oder unterscheidet sich um nicht mehr als 20% vom Hybridisierungsertrag der Zielsequenz, und eine Quantifizierung wird wie in WO98/11253 beschrieben erhalten.

[0060] Vorteilhafterweise ist auch die Standardnukleotidsequenz, ein externer und/oder interner Standard in dem Kit (der Vorrichtung) oder dem Apparat gemäß der Erfindung enthalten, gegebenenfalls mit allen Medien und Mitteln, die zum Durchführen der verschiedenen erfindungsgemäßen Schritte erforderlich sind (Hybridisie-

rungs- und Kulturmedien, Polymerase und andere Enzyme, Standardsequenz(en), Markierungsmolekül(e), etc.).

Beispiel

Identifizierung von Staphylokokkus-Arten durch Nachweis der spezifischen FemA-Gene

[0061] Die FemA-Gene sind hoch konservierte Gene und haben zwischen den verschiedenen Staphylokokkus-Arten eine Homologie von 50 bis 90%. Die Identifizierung von *Staphylococcus epidermidis* in einer Probe anhand einer Voramplifizierung mit Konsensusprimern durchgeführt, welche die 5 häufigsten Staphylokokken amplifizieren: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* und *S. saprophyticus*. Einer der Primer war aminiert, so dass ein Strang der Amplikons eine Aminogruppe an seinem 5'-Ende trug. Die Amplikons wurden anschließend kovalent an ein Glas fixiert, das Aldehydgruppen trug, und dann durch Erhitzen auf 100°C denaturiert. Die markierten, für die 5 Staphylokokken-Arten spezifischen Nukleotidsequenzen wurden dann mit diesen Einzelstrangamplikons inkubiert. Nach der Reaktion und Waschen wurden sie in einer Lösung von NaOH wiedergewonnen. Diese Lösung wurde anschließend auf die Anordnung gegeben, die von Punkten (Spots) von Capture-Nukleotidsequenzen, die für jede der markierten Nukleotidsequenzen spezifisch sind, gebildet wurde. Nach der Reaktion und Waschen wurde ein Streptavidin-Cy5-Konjugat zugegeben, gefolgt von der Messung mit einem konfokalen Fluoreszenzscanner (Genetic Microsystem). Das Prinzip dieses Verfahrens ist in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt. Es sind nur die Punkte (Spots) positiv, welche die für *S. epidermidis* spezifischen Capture-Nukleotidsequenzen tragen.

Amplifizierung des FemA-Gens anhand von Konsensusprimern

[0062] Die für die PCR-Amplifizierung verwendeten Primer haben folgende Sequenz:

FP 1: 5' CCA CTA GCG TAC ATC AAT TTT GA 3'

FP 1HS: 5' CCC ACT CGC TTA TAT AGA ATT TGA 3'

FP 3: 5' GGT TTA ATA AAG TCA CCA ACA TAT T 3'

mit einer NH₂-Gruppe am 5'-Ende. Diese Primer amplifizieren eine Sequenz von 487 bp im FemA-Gen.

Fixierung der DNA der Amplikons auf einer Oberfläche

[0063] Amplikons werden auf dem High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim, Deutschland) chromatografisch gereinigt, um aminierte Primer und freie Nukleotide zu beseitigen. Für die Fixierung auf der Oberfläche wurden 100 µl der Lösung SSC3X pH 5, die 150 nM der gereinigten Amplikons enthielt, 30 Min. bei 23°C auf silylierten Mikroskopie-Objektträgern inkubiert (Cell Associates, Houston, USA), die von einer Hybridisierungskammer eingerahmt wurden. Nach der Inkubation wurden die Objektträger einmal mit 0,1% SDS, zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend 5 Min. mit NaBH₄ (2,5 mg gelöst in 750 µl PBS und 250 µl 100 Ethanol) inkubiert und 3 Min. in kochendem Wasser. Die Objektträger wurden bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Hybridisierung und Entfernen der spezifischen Nukleotidsequenzen vom Ziel

[0064] Die spezifischen biotinylierten Nukleotidsequenzen für den Nachweis der 5 Staphylokokkenarten sind wie folgt:

S. aureus

ASaur01: 5' CTA AAT GAA GAG CGT GAT ATT TTA AAT 3'

S. epidermidis

ASepi01: 5' CTA AAT AAT GAA AGA AAT GTG CTT AAT 3'

S. haemolyticus

AShae01: 5' TTA CAA AAT GAA CGT GAA ACT TTA AAT 3'

S. hominis

AShom01: 5' CTT CAT GCA GAA CGT CAG ACA TTA AAT 3'

S. saprophyticus

ASsap01: 5' TTA AAG GCT GAA CGC GAA GTA TTA AGT 3'

[0065] Die Sequenz der biotinylierten Nukleotidsequenzkontrolle ist:

CMV23Biot 5' GGT TAT CAG AGG CCG CTT GGC CA 3'

[0066] Jede Sonde trägt ein Biotin an ihrem 5'-Ende.

[0067] Für die Hybridisierung werden 100 µl Hybridisierungslösung auf einen Glasobjektträger mit Ziel-DNA geladen. Diese Mischung enthält 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,4, 7% SDS, 100 µg/ml Lachsspermien-DNA, 30 nM biotinylierte Nukleotidsequenzen von *S. epidermidis* (**1** Nukleotidsequenz) oder 30 nM jeder der Nukleotidsequenzen (**5** Nukleotidsequenzen). Die Hybridisierung wird in einer Hybridisierungskammer bei 60°C für 2 Std. durchgeführt. Die Proben werden 4 Mal mit 10 mM Maleinpuffer, pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,03 Tween gewaschen.

[0068] Hybridisierte Sonden werden abgelöst, indem innerhalb des mit einem wasserfesten Stift abgegrenzten Hybridisierungsbereichs für 5 Min. bei 25°C mit 70 µl 0,05 N NaOH inkubiert wurde. 50 µl der Lösung werden dann in ein Mikroröhrchen überführt und mit 56 µl Lösung mit 0,7 M Phosphatpuffer pH 7,4, 10% SDS, 200 µg/ml Lachsspermien-DNA, 10 nM biotinylierter CMV-Nukleotidsequenz (Hybridisierungskontrolle) neutralisiert.

Nachweis der markierten Nukleotidsequenzen auf der Anordnung

[0069] Sequenzen der Capture-Nukleotidsequenzen:

[0070] Die Capture-Nukleotidsequenzen für die 5 Staphylokokkenarten sind wie folgt:

S. aureus

ATaur02: 5' ATT TAA AAT ATC ACG CTC TTC ATT TAG 3'

S. epidermidis

ATepi02: 5' ATT AAG CAC ATT TCT TTC ATT ATT TAG 3'

S. haemolyticus

AThae02: 5' ATT TAA AGT TTC ACG TTC ATT TTG TAA 3'

S. hominis

ATHom01: 5' ATT TAA TGT CTG ACG TTC TGC ATG AAG 3'

S. saprophyticus

ATsap02: 5' ACT TAA TAC TTC GCG TTC AGC CTT TAA 3'

[0071] Die Sequenz der Capture-Nukleotidsequenzkontrolle ist.

CMVNH2: 5' TGG CCA AGC GGC CTC TGA TAA CC 3'

[0072] Jede Capture-Nukleotidsequenz trägt eine NH₂-Gruppe an ihrem 5'-Ende.

Capture-Sonden-Immobilisierung

[0073] Es wurde das von Schena et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10614, 1996) für das Aufbringen (Grafting) aminierter DNA auf ein Aldehyd beschriebene Protokoll mit kleinen Änderungen befolgt.

[0074] Die aminierten Capture-Nukleotidsequenzen wurden bei einer Konzentration von 1,6 µM punktförmig aufgetragen. Die Capture-Nukleotidsequenzen wurden auf die silylierten Mikroskopie-Objektträger mit einer selbst gemachten Vorrichtung zur Erstellung von Anordnungen aufgedruckt. Die Capture-Nukleotidsequenzen waren zu den markierten Nukleotidsequenzen komplementär und hatten eine Aminogruppe an ihrem 5'-Ende. 250-µm-Stifte von Genetix (GB) und silylierte (Aldehyd) Mikroskopie-Objektträger von Cell Associates (Houston, USA) wurden verwendet. Die Punkte (Spots) haben einen Durchmesser von 400 µm und das ausgegebene Volumen war etwa 1 Nanoliter. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C aufgewahrt.

Hybridisierung und Nachweis

[0075] 106 µl denaturiertes Produkt werden in einer Hybridisierungskammer für 30 Min. bei 50°C inkubiert. Die Objektträger werden anschließend 4 Mal mit 10 mM Maleinpuffer, pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,03% Tween (Waschpuffer) gewaschen. Die Glasproben werden 45 Min. bei Raumtemperatur mit 800 µl Streptavidin-markiertem Cyab5 (Sigma St. Louis, Mi, USA), 500 × verdünnt in 100 mM Maleinpuffer pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Gloria-Milchpulver, inkubiert. Die Objektträger werden 5 Mal mit Waschpuffer gewaschen, einmal mit Wasser gespült und getrocknet. Die Objektträger werden mit einem Konfokalscanner von Genetic Microsystem (Woburn, MA, USA) gemessen.

[0076] Tabelle 1 gibt ein Ergebnis an, das mit erfindungsgemäßen umgekehrten Biochips zum Nachweis einer spezifischen Sequenz von *Staphylococcus epidermidis* (A) erhalten wurde, wenn Zielamplikons von *S. epi-*

dermidis immobilisiert und in einer ersten Kammer **5** mit einer Mischung der markierten Nukleotidsequenzen **1** inkubiert wurden, die spezifisch für die 5 Staphylokokken-Stämme sind, oder (B), wenn Zielamplikons von *S. aureus* immobilisiert und mit spezifischen markierten Nukleotidsequenzen von *S. epidermidis* inkubiert wurden. Die Nukleotidsequenzen **1**, die von der Nukleotidzielsequenz nach der Hybridisierung abgelöst wurden, wurden dann auf eine Anordnung (Kammer **6**) überführt, die Capture-Sonden **2** für die 5 möglichen markierten, für die 5 Staphylokokkus-Arten spezifischen Sequenzen tragen, und nachgewiesen.

Tabelle I

Nachweis auf der Anordnung, welche die folgenden Capture-Sonden trägt Schritt II	A. Schritt I Immobilisierte Zielsequenz von <i>S. epidermidis</i> in Gegenwart der 5 markierten Sonden	B. Schritt I Immobilisierte Zielsequenz von <i>S. aureus</i> in Gegenwart der markierten <i>S. epidermidis</i> -Sonde
<i>S. aureus</i>	2	0
<i>S. epidermidis</i>	19	0
<i>S. haemolyticus</i>	1	1
<i>S. hominis</i>	0	0
<i>S. saprophyticum</i>	0	0
Kontrollhybridisierung +	51	25
Kontrollhybridisierung -	1	0

Patentansprüche

1. Verfahren für eine Identifizierung und/oder eine Quantifizierung einer oder mehrerer Nukleotidzielsequenzen (**3**), die möglicherweise in einer Probe vorhanden sind, und für eine Unterscheidung von anderen homologen Sequenzen durch Verwendung von zwei Sätzen von Nukleotidsequenzen (**1** und **2**),
 - wobei in einem ersten Schritt ein erster Satz von (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenzen (**1**), die zwischen 8 und 60 Basen umfassen, spezifisch an die Nukleotidzielsequenzen (**3**) bindet,
 - wobei die (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenzen des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen (**1**), die nicht an die Nukleotidzielsequenzen (**3**) gebunden sind, entfernt werden,
 - wobei die (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenzen (**1**) des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen, die an die Nukleotidzielsequenz (**3**) gebunden sind, voneinander enthybridisiert werden und in einem zweiten Schritt durch Hybridisierung mit einem zweiten Satz von Capture-Nukleotidsequenzen (**2**) nachgewiesen und/oder quantifiziert werden, bei denen mindestens ein Teil ihrer Nukleotidsequenz zu dem Teil der Nukleotidsequenz der (gegebenenfalls markierten) Sequenzen (**1**) des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen, welcher spezifisch an die Nukleotidzielsequenzen (**3**) bindet, komplementär ist, wobei die Capture-Nukleotidsequenzen (**2**) auf der Oberfläche (**4**) eines festen Trägers gemäß einer Anordnung von mindestens 4 diskreten Bereichen/cm² immobilisiert sind, wobei an jeden der diskreten Bereiche eine Art von Capture-Nukleotidsequenzen (**2**) gebunden ist, und
 - wobei die Identifizierung und Quantifizierung der Bindung zwischen den (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenzen (**1**) und ihren entsprechenden Capture-Nukleotidsequenzen (**2**) mit der Identifizierung und der Quantifizierung der in der Probe vorhandenen Nukleotidzielsequenzen (**3**) korreliert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Nukleotidzielsequenzen (**3**) vor ihrer Hybridisierungsbindung mit einer oder mehreren (gegebenenfalls markierten) Sequenzen (**1**) des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen zuerst auf einem festen Träger (**4**) gebunden werden, vorzugsweise durch kovalente Bindung.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Bindung zwischen den Nukleotidzielsequenzen (**3**) und

den (gegebenenfalls markierten) Sequenzen (1) des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen in Lösung abläuft.

4. Verfahren nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche 1 bis 3, wobei die (gegebenenfalls markierten) Sequenzen (1) des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen eine Länge haben, die im Wesentlichen identisch oder ähnlich ist wie die Länge der Capture-Nukleotidsequenzen (2) des zweiten Satzes von Nukleotidsequenzen.

5. Verfahren nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei die zu identifizierenden und/oder zu quantifizierenden Nukleotidzielsequenzen (3) eine Homologie mit anderen in der Probe vorhandenen homologen Sequenzen darstellen, die höher als 30%, vorzugsweise höher als 60%, mehr bevorzugt höher als 80% ist.

6. Verfahren nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei sich die zu identifizierenden und/oder zu quantifizierenden Nukleotidzielsequenzen (3) von homologen Sequenzen um nur eine Base unterscheiden.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Capture-Nukleotidsequenzen (2) des zweiten Satzes von Nukleotidsequenzen eine Sequenz aufweisen, die zu den (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenzen (1) des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen auf ihrer vollständigen Sequenz komplementär ist, oder eine Sequenz aufweisen, welche über einen Abstandshalter mit einer Länge, die zwischen 10 und 200 Basen umfasst, an den festen Träger gebunden ist.

8. Verfahren nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei die (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenzen (1) eine Mischung aus zwei oder mehr markierten Sequenzen enthalten, die von einem unterschiedlichen Nukleotid beendet werden, welches an die neben einem möglichen SNP liegende Nukleotidzielsequenz bindet, wobei eines der Endnukleotide perfekt mit dem SNP übereinstimmt, und eine andere angehängte Sonde, welche an die andere Stelle der SNP-Zielsequenz bindet, wobei die perfekt übereinstimmende Sonde durch eine Ligase an diese Sequenz ligiert wird, bevor sie auf einer entsprechenden Capture-Nukleotidsequenz (2) nachgewiesen wird.

9. Verfahren nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei die markierten Nukleotidsequenzen (1) eine Mischung von Sonden enthalten, die sich jeweils in mindestens einer sich an einer SNP-Stelle befindenden Base unterscheiden und mit einer spezifischen Nukleare behandelt werden, bevor sie auf einer entsprechenden Capture-Nukleotidsequenz nachgewiesen werden.

10. Verfahren nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei die eine oder mehrere nachzuweisenden und/oder zu quantifizierenden Nukleotidzielsequenzen (3) rRNAs sind, die vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus 16S, 23S, 18S und 25S rRNAs besteht.

11. Verfahren nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche 1 bis 9, wobei die eine oder mehrere nachzuweisenden und/oder zu quantifizierenden Nukleotidzielsequenzen (3) mRNAs sind, vorzugsweise eine mRNA, die von einer Konsensussequenz in eine cDNA zurückgeschrieben wird.

12. Verfahren nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei der feste Träger aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Glas, einer elektronischen Vorrichtung, einem Siliziumträger, einem Kunststoffträger, einer CD (Compact Disc), einem Filter, einem Metallträger, mit Polylysinsbeschichteten Flächen oder einer Mischung davon besteht.

13. Verfahren nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei der erste Satz von (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenzen (1) spezifisch an die Nukleotidzielsequenzen (3) in einer ersten Kammer (5) bindet,

– wobei die (gegebenenfalls markierten) Sequenzen des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen (1), die an die Nukleotidzielsequenzen (3) gebunden sind, von der ersten Kammer (5) entfernt und in die zweite Kammer (6) überführt werden, und wobei die gegebenenfalls markierten Nukleotidsequenzen (1) des ersten Satzes von Nukleotidsequenzen durch Hybridisierung mit dem zweiten Satz von Capture-Nukleotidsequenzen (2) in der zweiten Kammer (6) nachgewiesen und/oder quantifiziert werden.

14. Diagnostischer Apparat und/oder Quantifizierungsapparat einer oder mehrerer homologer Nukleotidzielsequenzen, die möglicherweise in einer Probe vorhanden sind, der zwei getrennte Kammern (5 und 6), die auf einem festen Träger (4) vorhanden sind, und eine flüssige Verbindung zwischen den beiden Kammern (5, 6) umfasst und wobei die zweite Kammer (6) Capture-Nukleotidsequenzen (2) enthält, die auf der Oberfläche des festen Trägers gemäß einer Anordnung von mindestens 4 diskreten Bereichen/cm² immobilisiert sind, wo-

bei an jeden der diskreten Bereiche eine Art von Capture-Nukleotidsequenzen (2) gebunden ist.

15. Diagnostischer Apparat und/oder Quantifizierungsapparat nach Anspruch 14, der des Weiteren einen ersten Satz von (gegebenenfalls markierten) Nukleotidsequenzen (1) umfasst, die mit den in der ersten Kammer (5) nachzuweisenden und/oder zu quantifizierenden Nukleotidzielsequenzen reagieren können und die die in der zweiten Kammer (6) vorhandenen Capture-Nukleotidsequenzen (2) hybridisieren können.

16. Apparat nach Anspruch 14 oder 15, wobei die beiden Kammern (5 und 6) auf einer einzigen Oberfläche eines festen Trägers (4) vorhanden sind.

17. Apparat nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche 14 bis 16, wobei die beiden Kammern (5 und 6) durch eine kleine Röhre oder einen kleinen Kanal für die Lösungsübertragung von einer Kammer (5) in die andere Kammer (6) verbunden sind.

18. Maschine oder Automat für die Durchführung der verschiedenen Schritte des Verfahrens nach irgendeinem der vorherigen Ansprüche 1 bis 13 und umfassend den Apparat nach den Ansprüchen 14 bis 17.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

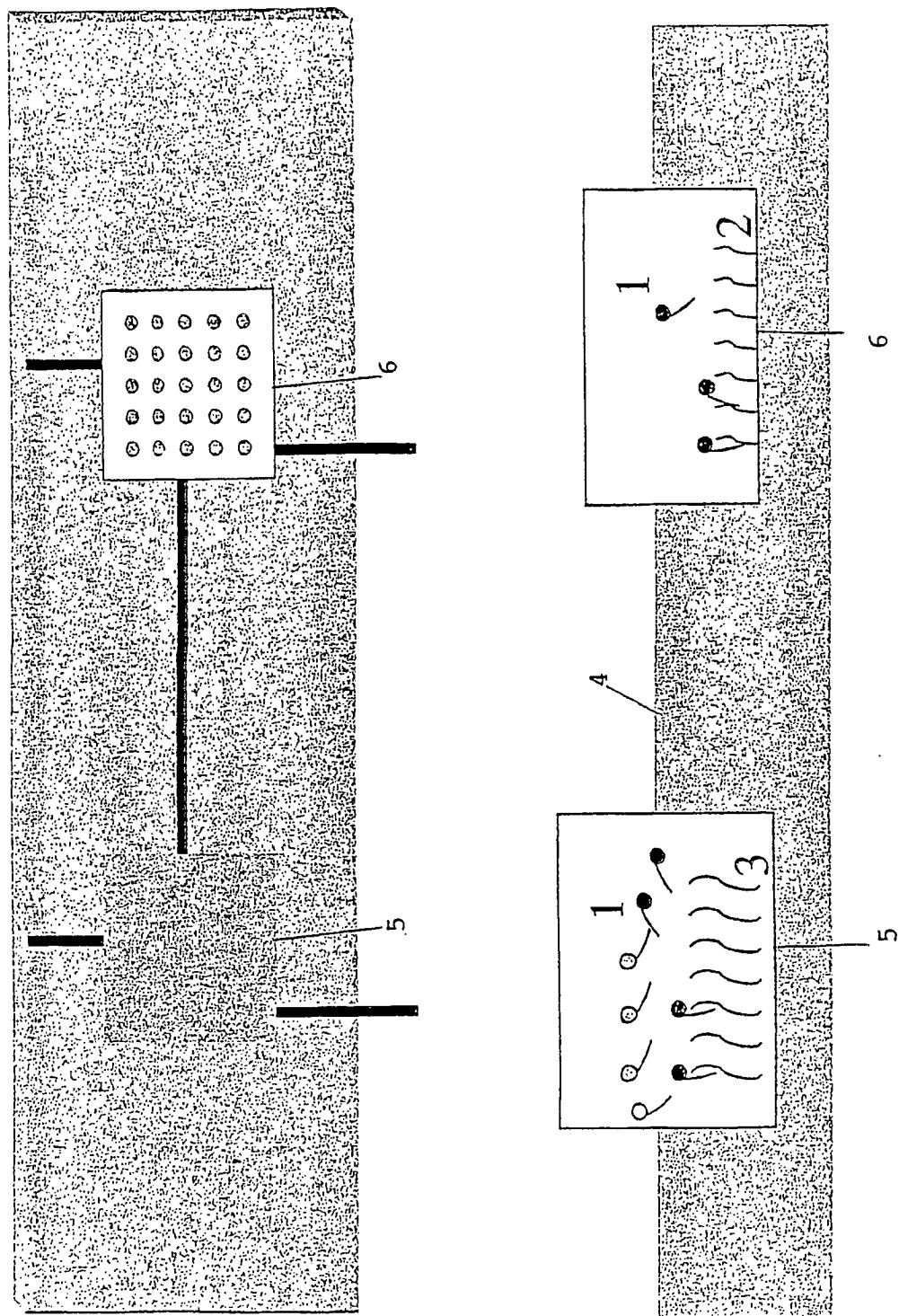


FIG. 1