

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. März 2002 (28.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/24944 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

KOSAK, Hans [DE/DE]; Von-Witzlebener-Strasse 23,
53123 Bonn (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03564

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. September 2001 (18.09.2001)

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstr. 49A,
91052 Erlangen (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
100 46 184.0 18. September 2000 (18.09.2000) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT
GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN
[DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 39, 91056 Erlangen (DE).

Veröffentlicht:

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

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SCHÜLEIN, Jür-
gen [DE/DE]; Neue Strasse 26, 91054 Erlangen (DE).

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

(54) Title: METHOD FOR DETECTING AT LEAST ONE NUCLEIC ACID SEQUENCE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS MINDESTENS EINER NUKLEINSÄURESEQUENZ

(57) Abstract: The invention relates to a kit for carrying out a method, containing: a) bond sequences immobilised on a support and b) bonds respectively formed from one first primer that is specific to the nucleic acids to be detected and one identification sequence specific to the first primer, whereby the identification sequence is selected from a group of identification sequences that do not cross-hybridise in predetermined uniform hybridisation conditions.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Kit zur Durchführung eines Verfahrens enthaltend: a) an einem Träger immobilisierte Bindungssequenzen und b) Verbindungen, jeweils gebildet aus einem für die nachzuweisenden Nukleinsäuren spezifischen ersten Primern und einer für den ersten Primer spezifischen Identifizierungssequenz, wobei die Identifizierungssequenz aus einer Gruppe von Identifizierungssequenzen ausgewählt ist, welche bei vorgegebenen einheitlichen Hybridisierungsbedingungen nicht kreuzhybridisieren.



WO 02/24944 A2

Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäuresequenz

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäuresequenz und einen Kit zur Durchführung des
5 erfindungsgemäßen Verfahrens.

Zum Nachweis einer Nukleinsäuresequenz ist es allgemein bekannt, die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz mittels spezifischer DNA-Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
10 zu vervielfältigen. Die vervielfältigten Sequenzen können dann mittels einer Hybridisierung mit einer für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischen Bindungssequenz nachgewiesen werden. Bei diesem Verfahren ist es nachteilig, daß für jede nachzuweisende Nukleinsäuresequenz eine spezifische Bindungssequenz erforderlich ist. Weiterhin ist es von
15 Nachteil, daß für jede Hybridisierung mit dieser Bindungssequenz spezifische Hybridisierungsbedingungen eingehalten werden müssen.

20 Aus Whitcombe, D. et al., Nature Biotechnology 17 (1999) Seiten 804 bis 807 ist es bekannt, eine PCR mit einem speziellen Primer durchzuführen. Der Primer weist einen Bereich auf, in dem die Synthese eines Gegenstrangs durch ein Blockiermittel für eine Polymerase verhindert wird. Der Bereich weist ein
25 Fluorophor und einen Quencher auf, welche sich durch Basenpaarungen in unmittelbarer Nachbarschaft befinden. Ein Fluoreszenz-Signal kann nicht erzeugt werden. Der Bereich weist in einem nicht basengepaarten Abschnitt eine Sequenz auf, die komplementär zu einem durch die Verlängerung des Primers bei
30 der PCR entstehenden Produkt ist. Nach einer Denaturierung des Produkts, kommt es unter geeigneten Bedingungen zu einer Basenpaarung des Abschnitts mit dem komplementären Bereich in dem Produkt. Dadurch wird der Quencher von dem Fluorophor ge-

trennt, so daß ein Fluoreszenz-Signal entstehen kann. Das Fluoreszenz-Signals dient als Nachweis für das Vorhandensein einer für den Primer spezifischen DNA-Sequenz. Bei dem Verfahren ist es nachteilig, daß ein für jede nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischer Primer mit einem spezifischen komplementären Abschnitt synthetisiert werden muß. Durch die verschiedenen funktionellen Einheiten ist der Primer verhältnismäßig lang und damit aufwendig herzustellen.

- 10 Aus der EP 0 401 037 ist es bekannt bei einer PCR Nukleotide einzusetzen, die in der zu vervielfältigenden Nukleinsäuresequenz nicht vorkommen. Ein solches Nukleotid kann Desoxy-Uridin sein. Nach einer Vervielfältigungsreaktion kann ein unerwünschtes Produkt mit Uracil-DNA-Glycosylase behandelt werden. Uracil-DNA-Glycolyase spaltet die glycosidische Bindung zwischen der Base Uracil und dem Zucker Desoxy-Ribose eines in einem DNA-Molekül eingebauten Desoxy-Uridin-Rests. Dadurch kann das unerwünschte Produkt bei einer weiteren Vervielfältigungsreaktion nicht mehr als Matrize dienen. Ein
- 15 weiteres einsetzbares Nukleotid ist Bromdesoxy-Uridin. Bromdesoxy-Uridin enthaltende DNA kann durch Behandlung mit Licht unter geeigneten Bedingungen abgebaut werden.
- 20

- Aus der US 5,744,311 ist ein auf einer Strangverdrängung basierendes Vervielfältigungsverfahren für Nukleinsäuren bekannt. Dabei wird ein Primer mit dem 3'-Ende einer zu vervielfältigenden einzelsträngigen Nukleinsäure hybridisiert und mittels einer DNA-Polymerase verlängert. Zum Verlängern werden Desoxy-Nukleosidtriphosphate verwendet, die zum Teil derivatisiert sind. Geeignete derivatisierte Desoxy-Nukleosidtriphosphate sind z.B. α -Thio-Desoxy-Nukleosidtriphosphate. Ein Strang der entstandenen doppelsträngigen DNA mit derivatisierte Desoxy-Nukleotid-Resten wird an bestimmten Stel-
- 25
- 30

len von einer Restriktionsendonuklease erkannt und geschnitten. Ausgehend von dem Schnitt verlängert die DNA-Polymerase das 3'-Ende des geschnittenen DNA-Strangs. Der andere Teil des geschnittenen DNA-Strangs wird von der doppelsträngigen DNA verdrängt. Durch Wiederholen des Verfahrens wird der verdrängte DNA-Strang vervielfältigt.

Aus der WO 97/31256 ist es bekannt, Zielsequenzen in Nukleinsäuren mittels einer Ligase-Reaktion und einer immobilisierte Bindungssequenzen aufweisenden adressierbaren Matrix nachzuweisen. Dabei wird für jede nachzuweisende Zielsequenz eine Oligonukleotid-Sonde verwendet, die einen Zielsequenz-spezifischen und einen Bindungssequenz-spezifischen Anteil aufweist. Ferner wird eine Markierungssubstanz aufweisende zweite Oligonukleotid-Sonde eingesetzt, die an der nachzuweisenden Zielsequenz in unmittelbarer Nachbarschaft zu der ersten Oligonukleotid-Sonde binden kann. Beim Vorhandensein der Zielsequenz binden die erste und die zweite Oligonukleotid-Sonde an der Zielsequenz. Sie werden durch eine Ligase kovalent miteinander verbunden. Die verbundenen Oligonukleotid-Sonden werden mit den immobilisierten Bindungssequenzen in Kontakt gebracht, so daß eine Hybridisierung stattfindet. Das Vorhandensein der Zielsequenz wird durch das Detektieren der Markierungssubstanz am Ort der Hybridisierung nachgewiesen. Der Nachteil des Verfahrens besteht darin, daß es häufig falsch-positive Ergebnisse liefert.

Die U.S. 5,525,494 beschreibt ein Verfahren zur Amplifizierung einer Ziel-Nukleotidsequenz, wobei ein erster Primer verwendet wird. Der erste Primer weist einen Bindungsabschnitt auf, der im wesentlichen komplementär zur Ziel-Nukleotidsequenz ist. Daran ist ein Verlängerungsabschnitt gebunden. Der Verlängerungsabschnitt ist so ausgebildet, daß

eine Synthese eines dazu komplementären Verlängerungsabschnitts unterdrückt wird. Der am 5'-Ende gebildete Verlängerungsabschnitt bleibt einzelsträngig. Damit können die bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) gebildeten Produkte an geeigneten an einer festen Phase immobilisierten Oligonukleotiden gebunden werden. - Die Nachweisempfindlichkeit des bekannten Verfahrens ist nicht besonders hoch.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Insbesondere sollen ein universelles Verfahren und ein Kit zum parallelen Nachweis von Nukleinsäuresequenzen angegeben werden.

Die Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 33 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 - 32 und 34 - 43.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zum parallelen Nachweis von Nukleinsäuren unter Verwendung einer abschnittsweise einzelsträngige Nukleinsäuren erzeugenden Reaktion vorgesehen mit folgenden Schritten:

a) Bereitstellen von Verbindungen jeweils gebildet aus einem für die nachzuweisenden Nukleinsäuren spezifischen ersten Primer und einer für die ersten Primer spezifischen Identifizierungssequenz, wobei die Identifizierungssequenz aus einer Gruppe von Identifizierungssequenzen ausgewählt ist, welche bei vorgegebenen einheitlichen Hybridisierungsbedingungen nicht untereinander und nicht mit den ersten Primern kreuzhybridisieren, und wobei in der Verbindung ein Mittel vorgesehen ist, daß die Einzelsträngigkeit eines Abschnitts des in lit. c gebildeten Produkts bewirkt,

b) Inkontaktbringen der Nukleinsäuren mit den Verbindungen und mit für die nachzuweisenden Nukleinsäuren spezifischen zweiten Primern, wobei die zweiten Primer aus einer Gruppe von zweiten Primern ausgewählt sind, welche bei vorgegebenen
5 einheitlichen Hybridisierungsbedingungen mit den Identifizierungssequenzen nicht kreuzhybridisieren,

c) Durchführen der Reaktion, wobei die Verbindungen und die zweiten Primer durch eine Polymerase verlängert werden und
10 Hybride bilden derart, daß spezifische Produkte bestehend aus einem doppelsträngigen Abschnitt und einem einzelsträngigen Abschnitt hergestellt werden, wobei der einzelsträngige Abschnitt entweder die Identifizierungssequenz oder die komplementäre Identifizierungssequenz ist,

15 d) Trennen der spezifischen Produkte von nicht verlängerten Verbindungen,

e) Inkontaktbringen der spezifischen Produkte mit an einem
20 Träger immobilisierten Bindungssequenzen, welche komplementär zu den einzelsträngigen Abschnitten der Produkte sind, so daß die Bindungssequenzen mit den einzelsträngigen Abschnitten der Produkte spezifisch hybridisieren, wobei die Bedingungen so gewählt sind, daß die doppelsträngigen Abschnitte der spezifischen Produkte erhalten bleiben, und wobei die Bindungs-
25 sequenzen aus einer Gruppe von Bindungssequenzen ausgewählt sind, welche mit nicht vollständig komplementären einzelsträngigen Abschnitten der spezifischen Produkte bei vorgegebenen einheitlichen Hybridisierungsbedingungen nicht kreuzhy-
30 bridisieren, und

f) Nachweis der Hybridisierung der spezifischen Produkte mit den Bindungssequenzen.

Unter einem Primer wird ein durch eine Polymerase verlängerbares Oligonukleotid verstanden. Die Primer können aus DNA bestehen. Für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifische erste und zweite Primer sind Primer, welche unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen spezifisch mit der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz oder einem dazu komplementären Gegenstrang hybridisieren. Eine für den ersten Primer spezifische Identifizierungssequenz ist eine Identifizierungssequenz, die eindeutig dem ersten DNA-Primer zugeordnet ist.

10 Das Mittel kann innerhalb der Identifizierungssequenz, innerhalb des ersten Primers oder zwischen dem ersten Primer und der Identifizierungssequenz enthalten sein.

Unter einem spezifischen Produkt wird ein Produkt verstanden, welches spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz ist. Ein solches Produkt wird beim Schritt lit. c insbesondere unter stringenten Bedingungen gebildet.

Beim Schritt lit. e erfolgt das spezifische Hybridisieren der Identifizierungssequenz bzw. des einzelsträngigen Abschnitts mit der Bindungssequenz unter geeigneten stringenten Bedingungen. Diese Bedingungen sind abhängig von den Identifizierungssequenzen bzw. den Bindungssequenzen.

25 Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß das gebildete spezifische Produkt direkt mit der immobilisierten Bindungssequenz hybridisieren kann, ohne zuvor denaturiert zu sein. Dadurch wird verhindert, daß die den doppelsträngigen Abschnitt des spezifischen Produkts bildenden Einzelstränge die Hybridisierung mit den Bindungssequenzen, z.B. durch Kreuzhybridisierung, stören. Weiterhin ist es bei dem Verfahren vorteilhaft, daß bei der Hybridisierung der Produkte mit den Bindungssequenzen einzelsträngige Bereiche hybridisieren. Ei-

ne Hybridisierung zwischen einzelsträngigen Abschnitten ist erheblich schneller und effizienter im Vergleich zu einer Hybridisierung zwischen denaturierten doppelsträngigen Abschnitten. Weiterhin ist es vorteilhaft, daß die Träger mit einem Satz von immobilisierten Bindungssequenzen zum Nachweis verschiedener Nukleinsäuresequenzen verwendet werden kann. Vorgegebene identische Identifizierungssequenzen können in verschiedenen Nachweisverfahren mit unterschiedlichen ersten Primern verbunden sein. Identische Bindungssequenzen können dann für den Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist universell zum Nachweis von Nukleinsäuren einsetzbar. Wegen der vorgeschlagenen Auswahl von Primer-Identifizierungs- und Bindungssequenzen, können beliebig viele Nukleinsäuren in einem parallelen Verfahren nachgewiesen werden. Diese Eigenschaft wird auch als Multiplexfähigkeit bezeichnet.

Die vorgeschlagene Auswahl der ersten und zweiten Primer bewirkt, daß die Bildung von Primerdimeren reduziert wird. Primerdimere würden beim Schritt lit. e zu falsch-positiven Ergebnissen führen und die Menge der gebildeten spezifischen Produkte beim Schritt lit. c reduzieren.- Indem nach weiterer Maßgabe der Erfindung ausgeschlossen ist, daß die ersten Primer mit den Identifizierungssequenzen hybridisieren, wird verhindert, daß die Menge der zur Bildung des spezifischen Produkts benötigten ersten Primer verringert wird. Außerdem wird verhindert, daß die Menge der zur Bildung des spezifischen Produkts benötigten einzelsträngigen Abschnitte verringert wird.

30

Die Multiplexfähigkeit erfordert spezifische Eigenschaften der verwendeten zweiten Primer, der Identifizierungssequenzen und der Bindungssequenzen. Die zweiten Primer sollten aus ei-

- ner Gruppe von zweiten Primern ausgewählt sein, welche unter einer für alle Primer geltenden Hybridisierungsbedingung spezifisch jeweils an ihre komplementären Sequenzen an den nachzuweisenden Nukleinsäuren binden. Ferner sind die zweiten
- 5 Primer so ausgewählt, daß unter dem Hybridisierungsbedingungen gemäß lit. c keine Kreuzhybridisierung untereinander und keine Hybridisierung der Primer mit den Identifizierungssequenzen stattfindet. Außerdem ist es zweckmäßig, die zweiten Primer so auszuwählen, daß unter den Bedingungen des Schritts
- 10 lit. e eine Kreuzhybridisierung der zweiten Primer mit den Bindungssequenzen ausgeschlossen ist. Das ist insbesondere dann zweckmäßig, wenn im Schritt lit. d freie Primer nicht abgetrennt werden.
- 15 Die Auswahl der Identifizierungssequenzen hat den Vorteil, daß die Menge der im Schritt lit. c gebildeten Produkte erhöht und gleichzeitig die Menge an unspezifischen Produkten verringert wird.
- 20 Die einzelsträngigen Abschnitte der Produkte können aus einer Gruppe von einzelsträngigen Abschnitten ausgewählt sein, die zumindest unter den Bedingungen des Schritts lit. e nicht untereinander hybridisieren. Eine Hybridisierung wäre in diesem Fall nachteilig, weil die Konzentration der für die Bindung
- 25 der einzelsträngigen Abschnitte an die Bindungssequenzen reduziert würde.

Die Bindungssequenzen sind zweckmäßigerweise aus einer Gruppe von Bindungssequenzen ausgewählt, die zumindest unter den Bedingungen des Schritts lit. e spezifisch mit den komplementären, einzelsträngigen Abschnitten der Produkte hybridisieren. Sie hybridisieren nicht mit nicht-komplementären einzelsträngigen Abschnitten der Produkte. Eine Hybridisierung der Bin-

30

dungssequenzen mit nicht vollständig komplementären Bindungssequenzen der Produkte würde zu falsch-positiven Resultaten oder zumindest einer geringeren Nachweisempfindlichkeit der nachzuweisenden Nukleinsäuren führen.

5

Auch die ersten Primer können aus einer Gruppe von ersten Primern ausgewählt sein, welche bei vorgegebenen einheitlichen Hybridisierungsbedingungen nicht kreuzhybridisieren.

- 10 Die Verbindungen können nach einer vorteilhaften Ausgestaltung ein Mittel enthalten, welches bei der Reaktion eine Synthese eines zur Identifizierungssequenz komplementären Gegenstrangs verändert. Bei dem Mittel kann es sich um PNA (=Peptid-Nucleic-Acid), einen PEG (=Polyethylenglycol-Lin-
- 15 ker, eine Peptid- oder Disulfid-Bindung handeln.

- Die Verbindungen können nach einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung ein Mittel enthalten, welches bei der Reaktion eine Abbaureaktion der Identifizierungssequenz oder ihres
- 20 komplementären Gegenstrangs ermöglicht. Das Mittel kann z.B. ein Uracil, ein Thionukleotid und/oder ein Ribonukleotid sein.

- Die Abbaureaktion kann mittels Uracil-DNA-Glycosylase, Exonuklease, RNaseH, unter Lichteinwirkung oder mittels einer die
- 25 Identifizierungssequenz oder deren Gegenstrang spaltenden Restriktionsendonuklease, insbesondere BsrI, BstNI, BsmAI, BsII, BsoBI oder BstOI durchgeführt werden.

- 30 Unter einer Abbaureaktion wird eine die Identifizierungssequenz oder deren Gegenstrang modifizierende Reaktion verstanden. Sie bewirkt eine Trennung der Identifizierungssequenz oder des Gegenstrangs vom jeweils nicht modifizierten komple-

mentären Strang. Die Abbaureaktion kann eine nur einzelne Bindungen in der Identifizierungssequenz oder dem Gegenstrang spaltende Reaktion sein. Eine solche Reaktion kann zu einer Fragmentierung der Identifizierungssequenz oder des Gegenstrangs führen. Das Hybrid aus der Identifizierungssequenz und dem Gegenstrang wird dadurch thermodynamisch so destabilisiert, daß es spätestens unter den für Schritt lit. e erforderlichen stringenten Bedingungen dissoziiert.

- 10 Die Identifizierungssequenz kann in den terminalen Bereichen komplementär ausgebildet sein. Sie kann eine, vorzugsweise 4 bis 10 Basenpaare aufweisende, Rückfaltung besitzen. Das erhöht die Stringenz der Hybridisierung in Schritt lit. e.
- 15 Nach einem vorteilhaften Ausgestaltungsmerkmal wird die Reaktion unter der Bildung von Primerdimeren entgegenwirkenden Bedingungen durchgeführt. Das trägt zur Verhinderung von falsch-positiven Ergebnissen bei. Die Bedingungen sind dabei so gewählt, daß bei der das Produkt erzeugenden Reaktion die
- 20 ersten und zweiten Primer nicht miteinander hybridisieren. Zur Verhinderung einer solchen Kreuzhybridisierung der Primer können die Primer aus einer Gruppe von Primern ausgebildet sein, bei denen die Schmelzpunkte der Kreuzhybride mindestens 10° C unterhalb des geringsten Schmelzpunkts eines spezifischen Hybrids eines Primers mit der nachzuweisenden Nukleinsäure liegt. Weiterhin können die Primer aus einer Gruppe von Primern ausgewählt sein, bei der Kreuzhybride aus Primern und Identifizierungssequenzen mindestens 10° C unterhalb des geringsten Schmelzpunkts eines spezifischen Hybrids eines Primers liegt. Vorteilhafterweise liegen die vorgenannten
- 30 Schmelzpunkte aller verwendeten Primer innerhalb eines Temperaturbereichs von 5° C. Es ist zweckmäßig, daß alle Primer

eine im wesentlichen gleich Länge und einen im wesentlichen gleichen GC-Gehalt aufweisen.

Bei der Reaktion kann es sich um eine Primerverlängerungsreaktion, vorzugsweise eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder eine Strang-Displacement-Reaktion, handeln. Zweckmäßigerweise werden bei der Primerverlängerungsreaktion als Bedingungen hot-start-Bedingungen gewählt. Das wirkt der Bildung von Primerdimeren und anderen unspezifischen Produkten entgegen.

Bei der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz kann es sich um eine DNA oder auch eine RNA handeln. Sofern es sich um eine RNA handelt, kann die Verbindung zusätzlich mit einer reversen Transkriptase in Kontakt gebracht werden und beim Schritt lit. c zusätzlich eine reverse Transkription durchgeführt werden. Dabei kann beim Schritt lit. b zusätzlich ein dritter, für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischer Primer zugesetzt werden, an welchem beim Schritt lit. c mittels der reversen Transkriptase Nukleotide angefügt werden.

Nach einer weiteren Ausgestaltung kann bei der Reaktion eine optisch oder elektrisch nachweisbare Markierung in das Produkt eingebaut werden. Z.B. kann der zweite Primer über eine bevorzugt 5'-terminale Markierungsgruppe verfügen, oder es können während des Schritts lit. c markierte Nukleotide in das Produkt durch Polymerisation eingefügt werden. Als Markierung eignen sich z.B. fluoreszierende Nukleotide, Biotin, Hapten oder auch Redoxmarker.

30

Zweckmäßigerweise ist der Schmelzpunkt des doppelsträngigen Abschnitts des Produkts größer als die Hybridisierungstempe-

ratur eines aus dem einzelsträngigen Abschnitt des Produkts mit der Bindungssequenz gebildeten Hybrids.

Die Bindungssequenz kann in den terminalen Bereichen komplementär ausgebildet sein. Sie kann eine, vorzugsweise 4 bis 10 Basenpaare aufweisende, Rückfaltung besitzen. Das erhöht die Stringenz der Hybridisierung der Bindungssequenzen mit den einzelsträngigen Bereichen der Produkte.

10 Beim Schritt lit. d werden die Produkte von nicht verlängerten Verbindungen getrennt. Die Trennung kann mittels Glas/Silika-Partikeln oder einem Filter erfolgen. Durch die Abtrennung der nicht verlängerten Verbindungen, werden insbesondere Identifizierungssequenzen entfernt. Dadurch wird die
15 Nachweisempfindlichkeit des Verfahrens wird erheblich gesteigert. Zum Abtrennen der Identifizierungssequenzen nicht verlängerten Verbindungen können die Identifizierungssequenzen nach der Bildung der spezifischen Produkte gezielt zerstört werden. Das ist beispielsweise bei der Verwendung von Uracil
20 in den Identifizierungssequenzen und der Behandlung mit Uracilglycolyse bei der Verwendung von Ribonukleotiden in den Identifizierungssequenzen möglich. Eine solche Behandlung erfolgt zweckmäßigerweise im alkalischen Milieu. In diesem Fall wird das Milieu anschließend wieder neutralisiert, um eine
25 Renaturierung zum Doppelstrang des Produkts vor dem Kontakt mit dem Bindungssequenzen zu gewährleisten. Es ist aber auch möglich, nicht in das Produkt umgewandelte Identifizierungssequenzen gemeinsam mit den freien Primern von den Produkten zu trennen. Dazu können z.B. herkömmliche Primer-Removal-Kits
30 hergenommen werden. Die Produkte können in Schritt lit. d außerdem von zweiten Primern und Spaltprodukten getrennt werden.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, enthaltend:

a) an einem Träger immobilisierte Bindungssequenzen

5 und

b) Verbindungen, jeweils gebildet aus einem für die nachzuweisenden Nukleinsäuren spezifischen ersten Primer und einer für den ersten Primer spezifischen Identifizierungssequenz, wobei die Identifizierungssequenz aus einer Gruppe von Identifizierungssequenzen ausgewählt ist, welche bei vorgegebenen einheitlichen Hybridisierungsbedingungen nicht kreuzhybridisieren.

15 Wegen der vorteilhaften Ausgestaltungen des Kits wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen. Die dort erwähnten Merkmale können sinngemäß auch Merkmale und/oder Bestandteile des Kits sein.

20 Der Kit kann des weiteren aktivierte Identifizierungssequenzen enthalten, die zur Kopplung an 5'-modifizierte Primer geeignet sind. Die Identifizierungssequenz können aus einer Gruppe von Identifizierungssequenzen ausgewählt sein, welche bei vorgegebenen einheitlichen Hybridisierungsbedingungen nicht kreuzhybridisieren. Das Ende einer Identifizierungssequenz kann über eine Maleimid- oder Succinimidgruppe verfügen. Diese Gruppen ermöglichen eine einfache Kopplung der Identifizierungssequenz an einen mit einer Thiol- oder Amingruppe modifizierten Primer. Der Vorteil eines solchen Kits besteht darin, daß ein Anwender des Verfahrens den gleichen Satz an immobilisierten Bindungssequenzen und Identifizierungssequenzen für jeweils seine spezifischen nachzuweisenden Nukleinsäuren nutzen kann.

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltungen des Kits wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen. Die dort erwähnten Merkmale können sinngemäß auch Merkmale und/oder Bestandteile des Kits sein.

5

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung beschrieben. Hierin zeigen:

- 10 Fig. 1 a, b eine schematische Darstellung der Vervielfältigung einer nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz mittels einer PCR,
- 15 Fig. 2 a - c eine schematische Darstellung von auf einem Träger immobilisierten Bindungssequenzen und deren Hybridisierung mit (Fig. 2 b) und ohne (Fig. 2 c) die Entfernung freier Verbindungen,
- 20 Fig. 3 eine schematische Darstellung der Vervielfältigung einer RNA mittels einer Reversen Transkriptase und einer DNA-Polymerase in einem Flußdiagramm und
- 25 Fig. 4 eine schematische Darstellung einer Vervielfältigung einer nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz mittels einer PCR und einer anschließenden Abbaureaktion.

30 In Fig. 1 a ist eine aus einem ersten Primer 10 und einer Identifizierungssequenz 12 zusammengesetzte Verbindung 14 dargestellt. Der Primer 10 bindet an die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz 16. Der zweite Primer 18 weist eine Markierungssubstanz 20 auf. Er bindet an den Gegenstrang der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz 16. In Fig. 1b ist schema-

tisch das Ergebnis einer PCR gezeigt, die mit der in Fig. 1 a dargestellten Verbindung 14, dem zweiten Primer 18 und der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz 16 durchgeführt worden ist. Die Identifizierungssequenz 12 enthält Mittel, die es
5 verhindern, daß der Bereich der Identifizierungssequenz 12 doppelsträngig wird. Es sind Produkte mit einem doppelsträngigen Abschnitt und der einzelsträngigen Identifizierungssequenz entstanden.

- 10 Fig. 2 a zeigt einen Träger 22. Dabei kann es sich z.B. um eine Membran handeln. An dem Träger 22 sind über Linker 24 Bindungssequenzen 26 gebunden. In Fig. 2b ist die Situation nach dem Inkontaktbringen der in Fig. 2a dargestellten Bindungssequenzen 26 mit den einzelsträngigen Abschnitten der
15 Produkte gezeigt. Durch die Markierungssubstanz ist die Hybridisierung auf dem Träger 22 nachweisbar. Fig. 2c zeigt im Vergleich dazu eine Situation, bei der nicht verlängerte Verbindungen vor dem Inkontaktbringen des Produkts mit dem Bindungssequenzen 26 nicht entfernt worden sind. Durch das
20 gleichzeitige Vorhandensein von Produkt- und freien Verbindungen kann es zu einer Konkurrenz um die spezifischen Bindungssequenzen auf dem Träger 22 kommen. Wegen der größeren Beweglichkeit, der geringeren Größe, der geringeren Ladungsdichte und der größeren Anzahl der freien Verbindungen im
25 Vergleich zu dem Produkt ist die Bindung der freien Verbindung die bevorzugte Reaktion mit den Bindungssequenzen 26.

Fig. 3 zeigt schematisch ein Verfahren, bei dem die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz 16 eine RNA ist. Dabei bindet
30 zunächst der die Markierungssubstanz 20 enthaltende zweite Primer 18 an die RNA. Er wird mittels einer Reversen Transkriptase verlängert. Dabei entsteht ein doppelsträngiges DNA-RNA-Hybrid. Nach einer Denaturierung des DNA-RNA-Hybrids

bindet der erste Primer 10 an den DNA-Strang. Zur Vervielfältigung des DNA-Strangs wird eine PCR durchgeführt.

Fig. 4 zeigt eine aus einem Primer 10 und einer Identifizierungssequenz 12 bestehende Verbindung 14. Die Identifizierungssequenz 12 weist Nukleotide 13 auf, die durch eine Abbaureaktion spaltbar sind. Eine PCR-Reaktion mit dieser Verbindung, einer nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz 16 und einem zweiten Primer 18 führt zu vollständig doppelsträngigen PCR-Produkten. Die darin enthaltenen Identifizierungssequenzen werden durch eine Abbaureaktion entfernt. Es entstehen doppelsträngige Produkte mit einem einzelsträngigen Gegenstrang der Identifizierungssequenz.

Bezugszeichenliste

	10	erster Primer
	12	Identifizierungssequenz
5	13	modifizierbares Nukleotid
	14	Verbindung
	16	Nukleinsäuresequenz
	18	zweiter Primer
	20	Markierungssubstanz
10	22	Träger
	24	Linker
	26	Bindungssequenz

Patentansprüche

1. Verfahren zum parallelen Nachweis von Nukleinsäuren (16)
unter Verwendung einer abschnittsweise einzelsträngige Nu-
5 kleinsäuren erzeugenden Reaktion mit folgenden Schritten:

a) Bereitstellen von Verbindungen (14) jeweils gebildet aus
einem für die nachzuweisenden Nukleinsäuren (16) spezifischen
ersten Primer (10) und einer für die ersten Primer (10) spe-
10 zifischen Identifizierungssequenz (12), wobei die Identifi-
zierungssequenz (12) aus einer Gruppe von Identifizierungsse-
quenzen ausgewählt ist, welche bei vorgegebenen einheitlichen
Hybridisierungsbedingungen nicht untereinander und nicht mit
den ersten Primern kreuzhybridisieren, und wobei in der Ver-
15 bindung ein Mittel vorgesehen ist, daß die Einzelsträngigkeit
eines Abschnitts des in lit. c gebildeten Produkts bewirkt,

b) Inkontaktbringen der Nukleinsäuren (16) mit den Verbin-
dungen (14) und mit für die nachzuweisenden Nukleinsäuren
20 (16) spezifischen zweiten Primern (18), wobei die zweiten
Primer aus einer Gruppe von zweiten Primern ausgewählt sind,
welche bei vorgegebenen einheitlichen Hybridisierungsbedin-
gungen mit den Identifizierungssequenzen nicht kreuzhybridi-
sieren,

25 c) Durchführen der Reaktion, wobei die Verbindungen (14)
und die zweiten Primer (18) durch eine Polymerase verlängert
werden und Hybride bilden derart, daß spezifische Produkte
bestehend aus einem doppelsträngigen Abschnitt und einem ein-
30 zelsträngigen Abschnitt (XX) hergestellt werden, wobei der
einzelsträngige Abschnitt (XX) entweder die Identifizierungs-
sequenz (12) oder die komplementäre Identifizierungssequenz
ist,

d) Trennen der spezifischen Produkte von nicht verlängerten Verbindungen,

e) Inkontaktbringen der spezifischen Produkte mit an einem
5 Träger (22) immobilisierten Bindungssequenzen (26), welche
komplementär zu den einzelsträngigen Abschnitten (XX) der
Produkte sind, so daß die Bindungssequenzen (26) mit den einzelsträngigen Abschnitten (XX) der Produkte spezifisch hybridisieren, wobei die Bedingungen so gewählt sind, daß die doppelsträngigen Abschnitte der spezifischen Produkte erhalten
10 bleiben, und wobei die Bindungssequenzen (26) aus einer Gruppe von Bindungssequenzen ausgewählt sind, welche mit nicht vollständig komplementären einzelsträngigen Abschnitten (XX) der spezifischen Produkte bei vorgegebenen einheitlichen Hybridisierungsbedingungen nicht kreuzhybridisieren, und
15

f) Nachweis der Hybridisierung der spezifischen Produkte mit den Bindungssequenzen (26).

20 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die ersten Primer (10) aus einer Gruppe von ersten Primern ausgewählt sind, welche bei vorgegebenen einheitlichen Hybridisierungsbedingungen nicht kreuzhybridisieren.

25 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Identifizierungssequenzen zwischen 5 und 30 Basen lang sind.

30 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei alle Identifizierungssequenzen den gleichen GC-Gehalt besitzen.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die alle Identifizierungssequenzen die gleiche Länge besitzen.

5 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Schmelzpunkte aller Identifizierungssequenzen weniger als 5°C auseinander liegen.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
10 der höchste Schmelzpunkt eines Hybrids zweier Identifizierungssequenzen mindestens 5°C unterhalb des niedrigsten Schmelzpunktes eines Hybrids einer Identifizierungssequenz mit ihrer komplementären Sequenz ist.

15 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bindungssequenzen zwischen 5 und 30 Basen lang sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Bindungssequenzen den gleichen GC-Gehalt besitzen.

20

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bindungssequenzen die gleiche Länge besitzen.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
25 die Schmelzpunkte aller Bindungssequenzen weniger als 5°C auseinander liegen.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
30 der höchste Schmelzpunkt eines Hybrids einer Bindungssequenz mit einer nicht vollständig komplementären Identifizierungssequenz mindestens 5°C unterhalb des niedrigsten Schmelzpunktes eines Hybrids aus einer Bindungssequenz und einer vollständig komplementären Identifizierungssequenz ist.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Verbindungen (14) ein Mittel enthalten, welches bei der Reaktion eine Synthese eines zur Identifizierungssequenz (12) komplementären Gegenstrangs verhindert.

5

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Mittel eine PNA, ein PEG-Linker, eine Peptid- oder Disulfid-Bindung ist.

10 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Verbindung (14) mindestens ein Nukleotid enthält oder bei der Reaktion mindestens ein Nukleotid in die Verbindung (14) eingebaut wird, welches eine Abbaureaktion der Identifizierungssequenz (12) oder eines zur Identifizierungssequenz (12) gebildeten komplementären Gegenstrangs ermöglicht.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Mittel Uracil, ein Thionukleotid und/oder ein Ribonukleotid ist.

20

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Abbaureaktion mittels Uracil-DNA-Glycosylase, RNaseH, Exonuklease, unter Lichteinwirkung oder mittels einer die Identifizierungssequenz (12) oder deren Gegenstrang spaltenden Restriktionsendonuklease, insbesondere BsrI, BstNI, BsmAI, BsII, BsoBI oder BstOI, durchgeführt wird.

25

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Identifizierungssequenz (12) in den terminalen Bereichen
30 komplementär ausgebildet.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Identifizierungssequenz (12) eine, vorzugsweise 4 bis 10 Basenpaare aufweisende, Rückfaltung besitzt.

5 20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Reaktion unter der Bildung von Primerdimeren entgegenwirkenden Bedingungen durchgeführt wird.

10 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Reaktion eine Primerverlängerungsreaktion, vorzugsweise eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder eine Strang-Displacement-Reaktion, ist.

15 22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei der Primerverlängerungsreaktion als Bedingungen hot-start-Bedingungen gewählt werden.

20 23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Reaktion eine reverse Transkriptase-Reaktion umfaßt.

24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei der Reaktion eine optisch oder elektrisch nachweisbare Markierung in das Produkt eingebaut wird.

25 25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Markierung ein Fluorogen, Hapten, Biotin oder eine Redox-Gruppe enthält.

30 26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei der Reaktion zweite Primer (18) verwendet werden, welche die Markierung enthalten.

27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Träger (22) eine Membran, ein Chip oder ein identifizierbares Partikel verwendet wird.

5 28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Schmelzpunkt des doppelsträngigen Abschnitts des Produkts höher ist als die Hybridisierungstemperatur eines aus dem einzelsträngigen Abschnitt (XX) des Produkts mit der Bindungssequenz (26) gebildeten Hybrids.

10

29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bindungssequenz (26) in den terminalen Bereichen komplementär ausgebildet.

15 30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bindungssequenz eine, vorzugsweise 4 bis 10 Basenpaare aufweisende, Rückfaltung besitzt.

31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
20 beim Schritt lit. d die Produkte von zweiten Primern und/oder Spaltprodukten getrennt werden.

32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Trennung mittels Glas/Silika-Partikeln oder einem Filter
25 erfolgt.

33. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, enthaltend:

30 a) an einem Träger (22) immobilisierte Bindungssequenzen (26)

und

b) Verbindungen (14), jeweils gebildet aus einem für die nachzuweisenden Nukleinsäuren (16) spezifischen ersten Primern (10) und einer für den ersten Primer (10) spezifischen Identifizierungssequenz (12), wobei die Identifizierungssequenz (12) aus einer Gruppe von Identifizierungssequenzen ausgewählt ist, welche bei vorgegebenen einheitlichen Hybridisierungsbedingungen nicht kreuz-hybridisieren.

34. Kit nach Anspruch 33, wobei in der Verbindung (14) ein Mittel vorgesehen ist, welches bei der Reaktion eine Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizierungssequenz (12) verhindert.

35. Kit nach einem der Ansprüche 33 oder 34, wobei die Bindungssequenz (26) an einer definierten Stelle des Trägers (22) immobilisiert ist oder der Träger (22) ein identifizierbarer Träger (22) ist.

36. Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei der Träger (22) aus Glas oder Kunststoff besteht und/oder in Form eines identifizierbaren Partikels, einer Membran oder eines Chips vorliegt.

37. Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 36, wobei das Mittel aus mindestens einem Nukleotidanalogen, RNA, PNA oder einer Unterbrechung der Abfolge der die Nukleotide in der Verbindung (14) verbindenden Phosphodiesterbindungen, insbesondere durch einen Polyethylenglycol-Linker, eine Peptidbindung oder eine Disulfidbindung, besteht.

38. Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 37, wobei eine Polymerase und ggf. eine reverse Transkriptase enthalten ist/sind.

39. Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 38, wobei ein, insbesondere eine Markierungssubstanz (20) aufweisender, zweiter Primer (18) enthalten ist.

5 40. Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 39, wobei mit einer Markierungssubstanz (20) versehene Nukleotide enthalten sind.

41. Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 40, wobei ein doppelstrangspezifischer Interkalator, insbesondere SYBR Green,
10 enthalten ist.

42. Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 41 enthaltend ferner einen Primer-Removal-Kit und/oder Glas/Silika-Partikeln und/oder einen Filter.

15

43. Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 42 enthaltend aktivierte Identifizierungssequenzen, die zur Kopplung an 5'-modifizierte Primer geeignet sind.

1/4

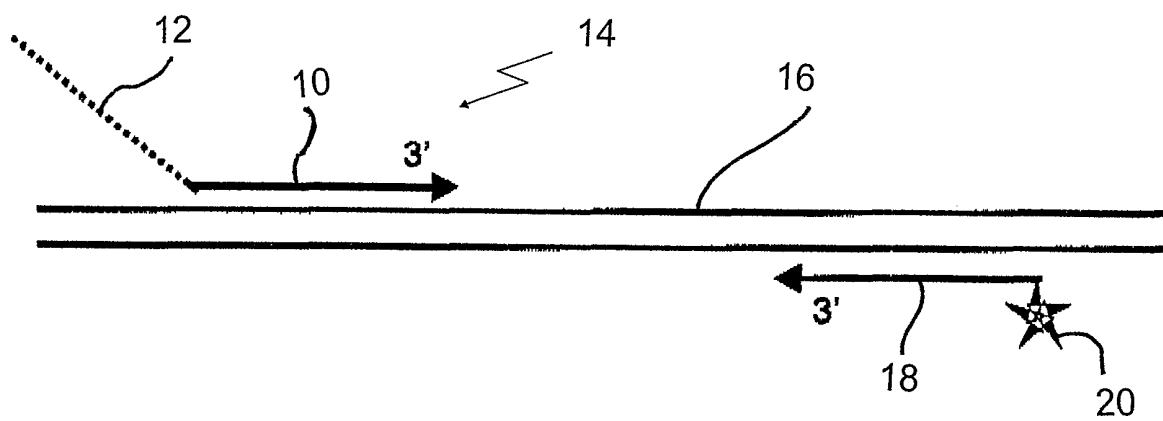


Fig. 1a

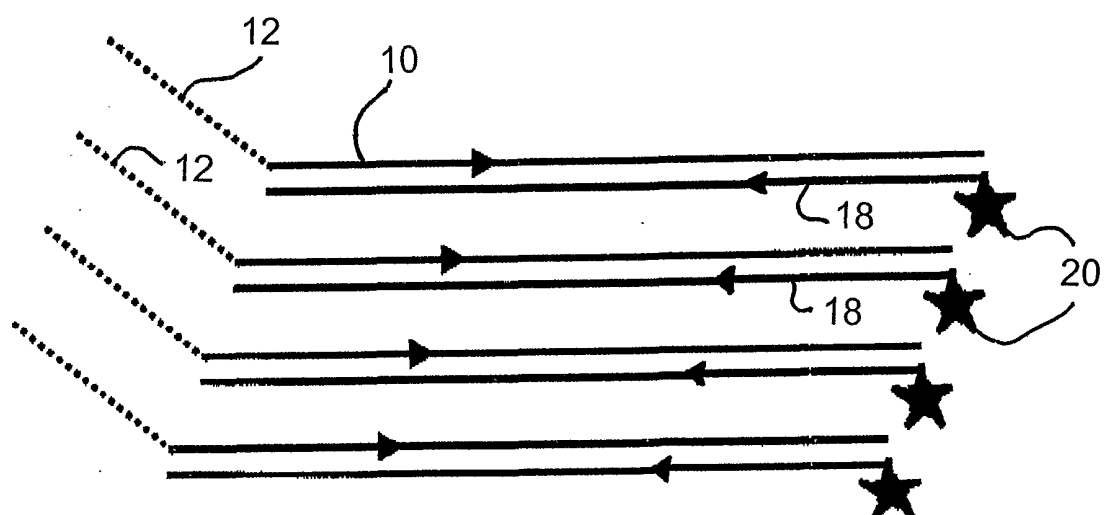


Fig. 1b

2/4

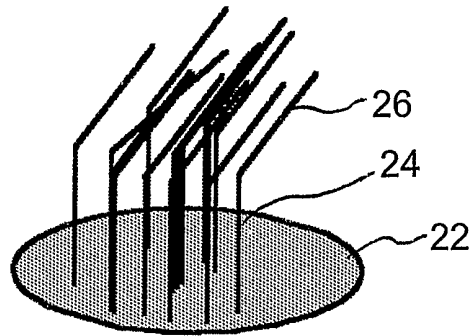


Fig. 2a

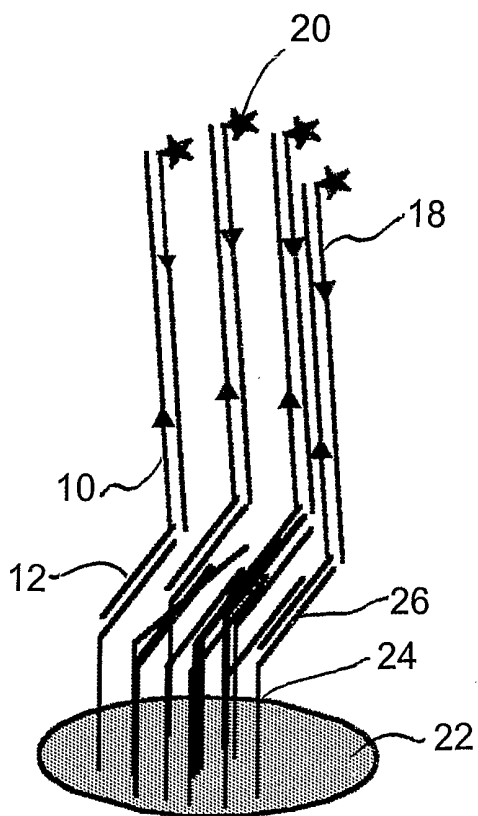


Fig. 2b

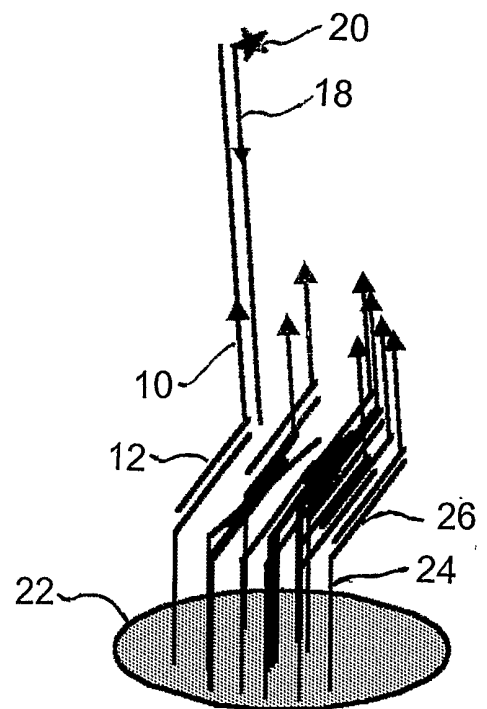


Fig. 2c

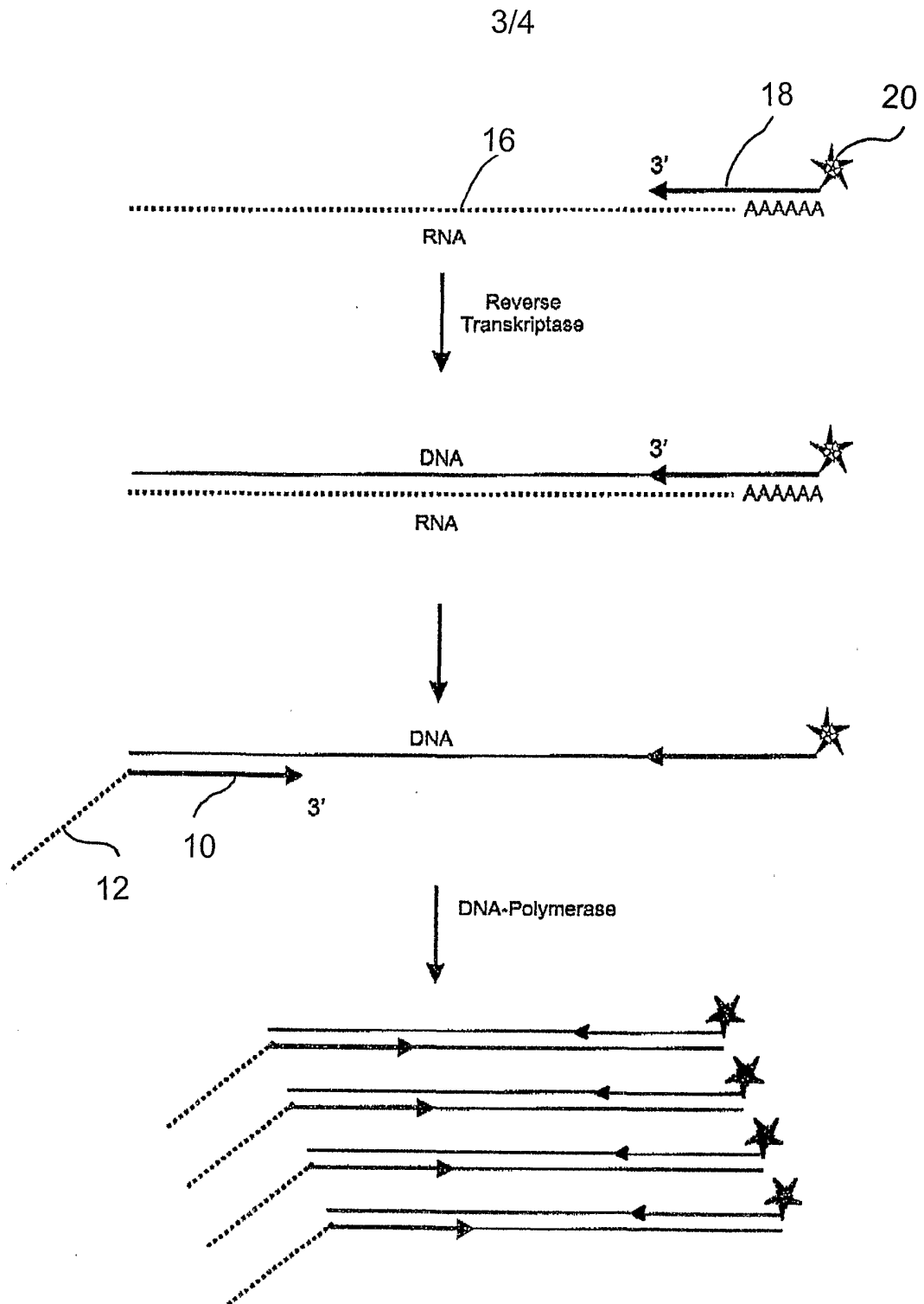


Fig. 3

