(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 16 488 T2** 2004.04.22

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 088 102 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 16 488.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB98/03521**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 955 781.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/066071**
(86) PCT-Anmeldetag: **25.11.1998**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **23.12.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.04.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **16.07.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.04.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12Q 1/68**

(30) Unionspriorität:
9812768 13.06.1998 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
DxS Ltd., Manchester, GB

(74) Vertreter:
PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 10719 Berlin

(72) Erfinder:
GIBSON, Neil James, Northwich, Cheshire CW9 7RA, GB; LITTLE, Stephen, Northwich, Cheshire CW9 7RA, GB; THEAKER, Jane, Northwich, Cheshire CW9 7RA, GB; WHITCOMBE, David Mark, Northwich, Cheshire CW9 7RA, GB

(54) Bezeichnung: **PCR-PRIMERKONSTRUKTIONEN FÜR EIN INTEGRIERTES SIGNALSYSTEM**

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 eingelegt, 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

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein neues Erfassungssystem, das neue Primer und ein integriertes Signalisierungssystem aufweist. Das System wird verwendet bei der Erfassung von Target-Nukleinsäuresequenzen.

[0002] Verfügbare Verfahren für die Amplifizierung und Erfassung von Target-Nukleinsäuresequenzen enthalten die Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR), z. B. wie in den US-Patenten Nrn. 4683195 und 4683202 beschrieben.

[0003] Eine bedeutsame Verbesserung bei der obigen Amplifizierung und den Erfassungsverfahren ist das Amplification Refractory Mutation System (ARMS), wie es in unserem Europäischen Patent Nr. 0 332 435 (Zeneca Limited) und dem entsprechenden US-Patent Nr. 5 595 890 beansprucht ist.

[0004] Zweckmäßige auf einer Probe basierende Erfassungssysteme enthalten Taqman (wie in den US-Patenten Nrn. 5210015 und 5487972 offenbart) und Molecular Beacons (wie in WO 95/13399 offenbart). Bei Taqman hybridisiert ein Probenmolekül, das Fluorophor/Quencher-Spezies aufweist, in PCR-Amplifizierungsprodukte und wird zersetzt durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität einer Polymerase. Dies führt zu der Freigabe von nicht gelöschtem Fluorophor und einem entsprechenden erfassbaren Signal. In Molecular Beacons erweitert sich ein Probenmolekül mit einer Stammschleifenstruktur, das Fluorophor und Quencher-Spezies in enger Nähe hält, bei der Bindung mit seinem komplementären Target, worauf das Fluorophor nicht gelöscht wird, was zu einem erfassbaren Signal führt.

[0005] Nazarenko et al (NAR 1997, 25, 2516–2521) offenbaren so genannte "Sunrise"-Primer. Dies sind Primer, die Haarnadelschleifen an ihren 5'-Enden bilden, um ein Fluorophor- und Quencherpaar zusammenzubringen, wodurch eine geringe Fluoreszenz sichergestellt wird. Wenn diese Primer in ein PCR-Produkt eingebracht wurden, werden die Schwänze doppelsträngig und die Haarnadel wird aufgetrennt, was eine Zunahme der Fluoreszenz bewirkt. Jedoch ist die Signalerzeugung nicht amplikonabhängig, jedes doppelsträngige Amplikon (enthaltend Primerdimere) kann den Sunrise-Primer aufnehmen und somit ein unechtes Signal erzeugen.

[0006] US-A-5 573 906 (Bannwarth et al) beschreibt einen Prozess, der einen 5'-markierten Primer enthaltend eine selbstkomplemtäre Sequenz in einem Amplifizierungs- oder Erweiterungsprozess verwendet, zusammen mit einem nachfolgenden Erfassungsschritt, der eine 3'-markierte Probe für den amplifizierten oder erweiterten Bereich verwendet. Die Markierungen können räumlich nahe beieinander sein nach dem Hybridisieren der Probe nahe dem kurzen Stück der doppelsträngigen DNA, das sich ergibt aus der Rückfaltung des selbstkomplementären Bereichs des Primers, der in dem amplifizierten oder erweiterten Produkt aufgenommen ist.

[0007] Jedoch sind die Pegel der Sequenzspezifizität und der Erfassungssensitivität sowie die Geschwindigkeit des Signalsauftretens, die unter Verwendung der obigen Amplifizierungs- und Erfassungsverfahren erzielbar sind, begrenzt. Daher existiert weiterhin das Bedürfnis nach weiter verbesserten diagnostischen Verfahren.

[0008] Wir haben nun ein neues Erfassungssystem gefunden, das einen mit einem Schwanz versehenen Primer und ein integriertes Signalisierungssystem verwendet. Der Primer hat einen Template-Bindungsbereich und einen Schwanz, der einen Koppler und einen Target-Bindungsbereich aufweist. Bei der Verwendung hybridisiert der Target-Bindungsbereich in dem Schwanz an einer komplementären Sequenz in einem Erweiterungsprodukt des Primers. Dieses targetspezifische Hybridisierungsereignis ist mit einem Signalisierungssystem gekoppelt, in welchem die Hybridisierung zu einer erfassbaren Änderung führt.

[0009] Daher sehen wir bei einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Erfassung einer Target-Nukleinsäure vor, welches Verfahren das Kontaktieren von Template-Nukleinsäure von einer Probe mit (i) einem Signalisierungssystem und (ii) einem mit einem Schwanz versehenen Nukleinsäure-Primer mit einem Template-Bindungsbereich, wobei der Schwanz einen Koppler und einen Target-Bindungsbereich aufweist, in Anwesenheit von geeigneten Nukleosid-Triphosphaten und einem Mittel zur Polymerisation hiervon, unter solchen Bedingungen, dass der Template-Bindungsbereich des Primers hybridisiert wird an eine komplementäre Sequenz in der Template-Nukleinsäure und erweitert wird zur Bildung eines Primererweiterungsprodukts, und das Trennen jedes derartigen Produkts von der Template, worauf der Target-Bindungsbereich in dem Schwanz des Primers an eine Sequenz in dem Primererweiterungsprodukt entsprechend der Target-Nukleinsäure hybridisiert, enthält, und wobei jede derartige targetspezifische Hybridisierung eine erfassbare Änderung in dem Signalisierungssystem bewirkt, derart, dass die Anwesenheit oder Abwesenheit der Target-Nukleinsäure in der Probe erfasst wird durch Bezugnahme auf die Anwesenheit oder Abwesenheit einer erfassbaren Änderung in dem Signalisierungssystem.

[0010] Das Erfassungsverfahren nach der Erfindung hat eine Anzahl von bedeutsamen Vorteilen. Diese enthalten die folgenden. Nur ein einziges Primer/Detektor-Spezies ist erforderlich. Dies bedeutet Einfachheit und liefert eine erhöhte Spezifizität auf der Grundlage der bereiten Verfügbarkeit des Target-Bindungsbereichs für die Hybridisierung mit dem Primererweiterungsprodukt. Das neu zusammengesetzte Primer-Erweiterungsprodukt ist das Target-Spezies, so dass das erhältliche Ausgangssignal direkt auf die Menge des erweiterten Pri-

mers bezogen ist, Es ist nicht abhängig von zusätzlichen Hybridisierungsereignissen oder enzymatischen Schritten (wie der TaqMan-Spaltung). Der Intra- und Interstrang-Wettbewerb für die Probenstelle ist begrenzt, so dass die Probenausbildung vereinfacht wird. Wir haben gefunden, dass Proben, welche unter Standardprüfbedingungen in getrenntem Probenformat keine Bindung eingehen, bei unserer Erfindung gut arbeiten. Die Erfindung ermöglicht auch, dass homogene Prüfformate einfach verwendet werden können. Ein noch weiterer Vorteil besteht darin, dass die Wechselwirkung einmolekular ist, die Signalisierungsreaktion sehr schnell ist, was erhöhte Zyklusgeschwindigkeiten ermöglicht. Dies ist ein bedeutsames Merkmal für Prüfanordnungen.

[0011] Wilton et al (Human Mutation, 1998, 11, 252–258) offenbaren ein analytisches Verfahren, das als Snapback Single Stand Conformation Polymorphism (SSCP) bezeichnet wird. Dieses enthält die Verwendung eines mit einem Schwanz versehenen Primers, um eine sekundäre Struktur in einen Einzelstrang eines Amplikons einzuführen. Die Primer bestehen aus Standard-3'-Enden mit kurzen Schwänzen an dem 5'-Ende. Diese Schwänze sind komplementär zu einem internen Bereich des Amplikons in einigem Abstand von dem Primer und können verwendet werden zum Prüfen der Struktur der Einzelstränge, die nach dem Erwärmen und Kühlen gebildet wurden. Die durch eine Mutation an der Probenkomplementärstelle eingeführten Strukturänderungen werden durch Migrationsgeschwindigkeitsänderungen auf einem Polyacylamidgel, das mit Silber verfärbt ist, erfasst. Jedoch gibt es keine Vorwegnahme der Merkmale oder Vorteile der vorliegenden Erfindung.

[0012] Bei dem Erfassungsverfahren nach der Erfindung kann die Primererweiterung ein oder mehrere Male wiederholt werden, wie bis zu 5, bis zu 10, bis zu 15, bis zu 20, bis zu 30, bis zu 40, bis zu 50 oder darüber. Zweckmäßig wird der neue Primer nach der Erfindung als ein Amplifizierungsprimer in einem Amplifizierungssystem wie der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. In diesem Fall sind der Target-Bindungsbereich und der Schwanzbereich vorteilhaft so angeordnet, dass der Schwanzbereich einsträngig, d. h. unkopiert verbleibt. Somit ist der Schwanzbereich in den PCR-Amplifizierungsprodukten nicht amplifizierbar. Diese Facette der Primerausbildung ist in unserem Europäischen Patent Nr. 0 416 817 (Zeneca Limited) und dem entsprechend US-Patent Nr. 5 525 494 beansprucht. Zweckmäßig weist der Koppler eine Blockierungseinheit auf, die eine Polymerase-vermittelte Kettenerweiterung auf der Primer-Template verhindert. Eine bevorzugte Blockierungseinheit ist ein Hexethylenglykol(HEG)-Monomer. Alternativ weist der Primerschwanz Material wie 2-O-Alkyl-RNA auf, welches keine Polymerase-vermittelte Wiederholung eines komplementären Stranges zulässt. Alternativ weist der Schwanz eine auf 5'-3'-gesetzte Nukleinsäure an dem 5'-Ende des Primers auf, d. h. die beiden Sequenzen sind "Rücken-an-Rücken" angeordnet, wobei bei diesem Ausführungsbeispiel davon ausgegangen wird, dass die 5'-3'-Nukleinsäure des Schwanzes sowohl als der Koppler als auch als der Target-Bindungsbereich dient. Eine getrennte und unterscheidbare Kopplereinheit ist nicht wesentlich.

[0013] Der Template-Bindungsbereich des Primers hybridisiert an eine Template-Nukleinsäure einer Probe. Der Bereich ist von jeder zweckmäßigen Ausbildung, die einem Fachmann verfügbar ist, und ist nur durch praktische Erwägungen beschränkt. Er kann DNA, RNA oder etwas anderes sein, vorausgesetzt, dass er ein Substrat für eine Polymerase-vermittelte Primererweiterung ist. Die Templatebindung kann mit jeder gewünschten Stärke bewirkt werden, d. h. unter angemessenen Hybridisierungsstärkebedingungen, unter denen der Template-Bindungsbereich des Primers an den Template-Bereich (wenn in der Template vorhanden) mit dem Ausschluss anderer Bereiche hybridisieren kann. Alternativ kann die Templatebindung mit verringerter Stärke bewirkt werden, um den Primer auf jede zweckmäßige Anzahl von bezogenen Templatesequenzen zu erweitern, wie z. B. menschliche Leukozytantigen(HLA)-Gene oder andere aufbewahrte Gene, insbeProbere bakterielle oder ribosomale RNA-Gene. Es können Primer vorgesehen werden, bei denen die Template-Bindungsbereiche Glieder eines Satzes von zufälligen Hexamersequenzen sind. Somit ist beabsichtigt, dass der Ausdruck "eine komplementäre Sequenz" alle vorstehend umrissenen Sequenzen enthält, vorausgesetzt, dass der Template-Bindungsbereich und die Hybridisierungsbedingungen den gewünschten Grad von Sequenzunterscheidung ermöglichen. Beispielsweise kann der Template-Bindungsbereich 100, bis zu 95%, bis 90%, bis zu 85%, bis zu 80%, bis zu 75% oder bis zu 70% komplementär zu der entsprechenden Templatesequenz sein. Der Template-Bindungsbereich ist zweckmäßig aus 6–50 Nukleotiden wie 10–40 Nukleotiden, 15–30 Nukleotiden, insbeProbere 20–30, 17–22, 16–23 oder 15–24 Nukleotiden. Jeder der obigen Bereiche ist ein getrenntes und unabhängiges Ausführungsbeispiel der Erfindung. Alles Vorstehende gilt in analoger Weise für den Target-Bindungsbereich des Primers unter der Voraussetzung, dass der Target-Bindungsbereich im Allgemeinen kürzer als der Template-Bindungsbereich ist, wobei Beispiele für zweckmäßige und bevorzugte Bereich nachfolgend angegeben werden. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Gesamtselektivität des Verfahrens nach der Erfindung in einer Allele-spezifischen oder mehrfachen allelen Weise für den Template-Bindungsbereich oder Target-Bindungsbereich unabhängig angewendet werden kann. Jede Permutation ist ein beProberer Aspekt der Erfindung.

[0014] Wie vorstehend dargelegt ist, kann, falls erwünscht, der Target-Bindungsbereich eine nicht kopierbare Spezies wie 2'-O-Methyl-RNA, Peptidnukleinsäure (PNA) und Varianten von diesen aufweisen. In diesem Fall ist ein separat identifizierbarer Koppler nicht erforderlich, und es wird davon ausgegangen, dass der Target-Bindungsbereich einen Koppler aufweist, der den Template-Bindungsbereich und den Target-Bindungsbereich trennt. Der Target-Bindungsbereich kann kürzer sein als diejenigen, die herkömmlicherweise für die Hy-

bridisierung an Amplikonen (Amplifizierungsprodukte) ausgebildet sind, da die Amplikon-Target-Wechselwirkungen nach dieser Erfindung einmolekular sind und daher kinetisch (und thermodynamisch) gegenüber bimolekularen Wechselwirkungen bevorzugt sind. Bei einem nicht beschränkenden Beispiel kann der Target-Bindungsbereich nicht mehr als 6, nicht mehr als 7, nicht mehr als 8, nicht mehr als 9 oder nicht mehr als 10 Nukleotide aufweisen.

[0015] Es ist darauf hinzuweisen, dass der Schwanz des Primers zusätzliche Nukleotide enthalten kann, die komplementär zu einem Teil des Template-Bindungsbereichs in dem Primer sind. Diese können verwendet werden für eine "Feinabstimmung" der Affinität des Primerschwanzes für komplementäre Sequenzen.

[0016] Der Koppler trennt den Template-Bindungsbereich und den Target-Bindungsbereich. Optimale Eigenschaften des Kopplers können durch routinemäßige Experimente bestimmt werden. Während wir nicht wünschen, durch theoretische Betrachtungen gebunden zu sein, kann der Koppler nicht mehr als 200 Nukleotide oder weniger wie 100 oder 50 Nukleotide aufweisen. Im Allgemeinen werden diese Bereiche nahe beieinander gehalten, da wir glauben, dass dies eine Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs an dem Targetbereich begünstigen kann. Bei einem bevorzugten Aspekt weist der Koppler eine nicht amplifizierbare Einheit wie HEG auf, allein oder mit weiteren Nukleotiden kombiniert, bevorzugterweise allein. Wenn der Template-Bindungsbereich und der Schwanzbereich des Primers so angeordnet sind, dass das Polymerase-vermittelte Kopieren des Primerschwanzes verhindert wird, kann der Koppler eine direkte Bindung sein.

[0017] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung sehen wir Nukleinsäureprimer entsprechend den unabhängigen Ansprüchen 10 und 11 vor.

[0018] Der Template-Bindungsbereich und der Schwanzbereich sind vorzugsweise so angeordnet, dass der Schwanzbereich in den PCR-Amplifizierungsprodukten einsträngig bleibt. Bevorzugter befindet sich eine Blockierungseinheit zwischen dem Template-Bindungsbereich des Primers und dem Schwanzbereich, welche Einheit eine Polymerase-vermittelte Kettenkopierung des Schwanzbereichs der Primer-Template verhindert. Eine beProbere Blockierungseinheit ist ein Hexethylenglykol(HEG)-Monomer. Der Target-Bindungsbereich ist vorzugsweise so ausgewählt, dass er an eine komplementäre Targetsequenz in dem Primererweiterungsprodukt weniger als 200, wie weniger als 100 Basispaare, wie weniger als 50 Basispaare, wie weniger als 40 Basispaare, weniger als 30 Basispaare, weniger als 25 oder weniger 20 Basispaare wie sowenig wie 15, 10 oder sogar 5 von einer Sequenz, die komplementär zu dem Template-Bindungsbereich in dem Primer ist, hybridisiert.

[0019] Die Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs in dem Schwanz des Primers an eine komplementäre Sequenz in dem Primererweiterungsprodukt entsprechend der Target-Nukleinsäure bewirkt eine erfassbare Änderung in dem Signalisierungssystem. Jedes zweckmäßige Signalisierungssystem kann verwendet werden, mittels eines nicht beschränkenden Beispiels beziehen wir uns auf die Messung der Änderung der Fluoreszenzpolarisation einer fluoreszierend markierten Spezies (Europäisches Patent Nr. 0 382 433 – Zeneca Limited), DNA-Bindungsproteine, Schaffung von Beschränkungsstellen in Duplex-Spezies für Endpunkterfassung, das Zusammenbringen von Elementen, um eine Targetstelle zu geben, die Aufnahme von erfassbaren (modifizierten) dNTPs in Primererweiterungsprodukte und weitere Probenspezies. Zusätzlich kann jede zweckmäßige sequenzspezifische Spezies verwendet werden; Beispiele enthalten Einlagerungen wie wellenlängenspezifische Einlagerungen, auch Spezies, die zur Bildung von Triplexstrukturen verwendet werden. Zweckmäßige Einlagerungen sind für den Fachmann offensichtlich (siehe Higuchi et al, BioTechnology, 1992, 10, 413–417).

[0020] Weitere Systeme enthalten Zweikomponentensysteme, bei denen ein Signal geschaffen oder aufgehoben wird, wenn die beiden Komponenten in enge Nähe zueinander gebracht werden. Alternativ wird ein Signal geschaffen oder aufgehoben, wenn die beiden Komponenten der Bindung des Target-Bindungsbereichs folgend getrennt werden.

[0021] Beide Elemente des Zweikomponentensystems können auf denselben oder unterschiedlichen Molekülen vorgesehen sein. Beispielhaft befinden sich die Elemente auf verschiedenen Molekülen, wobei die Target-spezifische Bindung eines der Moleküle in Lösung versetzt, was zu einem erfassbaren Signal führt.

[0022] Zweckmäßige Zweikomponentensysteme können auf der Verwendung von Energieübertragung basieren, z. B. zwischen einem Fluorophor und einem Quencher. Gemäß einem beProberen Aspekt der Erfindung weist das Erfassungssystem ein Fluorophor/Quencher-Paar auf. Zweckmäßige und bevorzugte Anbringungspunkte für Energieübertragungspartner können durch routinemäßige Experimente bestimmt werden. Eine Anzahl von zweckmäßigen Fluorophor/Quencher-Paaren sind im Einzelnen in der Literatur aufgeführt (z. B. Glazer et al, Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8, 94–102) sowie in Katalogen wie denjenigen von Molecular Probes, Glen and Applied Biosystems (ABI). Jedes fluoreszierende Molekül ist geeignet für die Signalisierung, vorausgesetzt, es kann durch die verfügbaren Instrumente erfasst werden. Am bevorzugtesten sind solche, die mit dem 488 nm-Laser des ABI PRISM 7700 kompatibel sind (Fluorescein- und Rhodamin-Derivate). Der Quencher muss in der Lage sein, die fragliche Farbe zu löschen und dies kann über einen Fluorescence Resonance Engergy Transfer (FRET)-Mechanismus erfolgen, der ein zweites Rezeptorfluorophor einbezieht, oder bevorzugter über einen Kollisionsmechanismus, der einen nicht-fluorogenen Quencher wie DA-

BCYL einbezieht, welches ein "Universeller" Quencher für die Fluoreszenz ist. Weiterhin ist bevorzugt, dass die ausgewählten Fluorophore und Quencher leicht in die Oligonukleotide aufgenommen werden können, am zweckmäßigsten über Phosphoramiditchemie. Zweckmäßige Donoren enthalten FAM, HAX und TET.

[0023] Wir fanden überraschend, dass ohne den Einschluss eines bestimmten Quenchers der Schwanz allein ein ausreichendes Löschen der Fluoreszenz liefern kann. Wenn der Target-Bindungsbereich an eine komplementäre Sequenz in dem Primererweiterungsprodukt hybridisiert, wird ein klares Fluoreszenzsignal beobachtet. Der optimale Punkt der Anbindung des Fluorophors kann durch routinemäßige Experimente bestimmt werden. Bei einem weiteren Aspekt der Erfindung weist das Signalisierungssystem ein Fluorophor auf, das an dem Schwanzbereich des Primers angebunden ist, zweckmäßig an oder benachbart dem 5'-Ende des Primers. Während wir nicht wünschen, durch theoretische Betrachtungen beschränkt zu werden, kann jede G-reiche Sequenz von zumindest 5 Basispaaren wie zumindest 10 oder zumindest 15, wie zumindest 20 Basispaaren als Quencher-Spezies verwendet werden.

[0024] Bei einem weiteren beProberen Ausführungsbeispiel enthält der Primerschwanz einen interkalierenden Farbstoff, wobei die Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs bewirkt, dass der Farbstoff zwischen den Basen der doppelsträngigen DNA aufgenommen wird, und somit fluoresziert. Der Farbstoff sollte vorzugsweise eine geringe Fluoreszenz haben, wenn er nicht eingefügt ist, und eine starke Fluoreszenzerhöhung nach der Einfügung. Die bevorzugten Moleküle sollten wieder leicht an die Olegonukleotide anfügbar sein durch Festphasenchemie oder durch einfache Postsyntheseaddition.

[0025] Es ist darauf hinzuweisen, dass die Gesamtlänge des Primerschwanzes im Wesentlichen bestimmt wird durch die beabsichtigten Funktionen seiner individuellen Komponenten. Im Allgemeinen hat der Primerschwanz zumindest 10 Basispaare wie zumindest 20, 30, 40 oder 50 Basispaare, z. B. 10–30 oder 15–25 Basispaare.

[0026] Es ist wünschenswert, dass alle Farbstoffe, Quencher, Koppler/Blockierer wiederholte Runden von PCR ertragen, welche ein mehrfaches Ausgesetztsein gegenüber hohen Temperaturen enthalten.

[0027] Bei einem bevorzugten Aspekt der Erfindung ist zumindest eine Komponente des Signalisierungssytems und der Nukleinsäureprimer eine integrale Spezies.

[0028] Die Template-Nukleinsäure ist jede zweckmäßige Nukleinsäure für die Analyse. Am allgemeinsten wird dies DNA von einer Amplifizierungsreaktion wie der PCR sein. Dieses DNA-Target kann von einer umgekehrten Transkriptionsreaktion (RT) abgeleitet sein. Tatsächlich kann der Primer nach der Erfindung in der RT-Reaktion selbst verwendet und direkt verwendet werden ohne weitere Amplifizierung. Andere in Vitro-Amplifizierungstechniken wie die Ligase-Kettenreaktion (LCR), OLA, NASBA und Strand Displacement Amplification (SDA) können auch geeignet sein. Es ist jedoch wichtig, dass es ein einsträngiges Zwischenglied gibt, welches dem Target-Bindungsbereich ermöglicht, an eine komplementäre Sequenz in dem Primererweiterungsprodukt zu hybridisieren. Im Allgemeinen wird das Verfahren nach unserer Erfindung als der letzte (Erfassungs-) Schritt bei den vorgenannten Verfahren verwendet. Es ist darauf hinzuweisen, dass eine Optimierung/Umgestaltung erforderlich sein kann, aber die relevanten Schritte sind für den Fachmann augenscheinlich.

[0029] Quellen für Nukleinsäureproben enthalten menschliche Zellen wie zirkulierendes Blut, Mundepithelzellen, kultivierte Zellen und Tumorzellen. Auch anderes Säugetiergewebe, -blut und kultivierte Zellen sind geeignete Quellen für Template-Nukleinsäuren. Zusätzlich können Viren, Bakteriophagen, Bakterien, Pilze und andere Mikroorganismen die Quelle für Nukleinsäure für die Analyse sein. Die DNA kann genomisch sein oder sie kann in Plasmiden, Bakteriophagen, künstlichen bakteriellen Chromosomen (BACs), künstlichen Hefechromosomen (YACs) oder anderen Vektoren geklont sein. RNA kann direkt von den relevanten Zellen isoliert sein oder sie kann durch in Vitro-Primen aus einem geeigneten RNA-Promotor oder durch in Vitro-Tanskription erzeugt sein.

[0030] Die vorliegende Erfindung kann für die Erfassung der Veränderung in genomischer DNA sein, wobei sie menschlich, tierisch oder anderer Herkunft sein kann. Sie findet beProbere Verwendung bei der Analyse von ererbten oder erworbenen Krankheiten oder Fehlfunktionen. Eine beProbere Verwendung ist die Erfassung von ererbten Krankheiten. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Target-Nukleinsäure direkt oder indirekt mit der Sequenz oder dem interessierenden Bereich für die Analyse gekoppelt ist. Bei einem bevorzugten Aspekt wird der Primer nach der Erfindung verwendet als der gemeinsame Primer in einer PCR kombiniert mit einem ARMS-Primer (wie z. B. in EP-B1-0 332 435 offenbart ist). Dies ist ein Beispiel der indirekten Kopplung an die Sequenz oder den interessierenden Bereich. Alternativ wird die Sequenz oder der interessierende Bereich identifiziert, wenn sie/er in Wechselwirkung mit dem spezifischen Templatebereich in einer allelespezifischen Weise steht, vorzugsweise als ein ARMS-Primer (siehe oben). Alternativ kann die Sequenz oder der interessierende Bereich identifiziert werden durch allelespezifische Wechselwirkung mit dem Target-Bindungsbereich in dem Primerschwanz. Weiterhin kann die Sequenz oder der interessierende Bereich eine Kombination eines Targetbereichs und einer Template-Bindungssequenz in dem Primer sein, vorausgesetzt, dass die Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs in dem Primerschwanz abhängig ist von der Bildung eines Primererweiterungsprodukts.

[0031] Zusätzlich zu der auf Genen basierenden Diagnostik der vererbbaren menschlichen Krankheit ist die Erfindung nützlich bei der Erfassung von Amplikons aus anderen Quellen. Eine beProbere Verwendung besteht in der Erfassung von ansteckenden Mitteln (Bakterien, Viren usw.) wie HIV, bei der die Kombination von allelespezifischem Primen und alleler Unterscheidung über den Target-Bindungsbereich Gelegenheit bietet, das Auftreten von beProberen Varianten von HIV in einer Viruspopulation bei einem Patienten zu überwachen. Andere Ansteckungsmittel, für die quantitative Daten (gemessen durch Echtzeit-PCR) hilfreich wären, enthalten das Hepatitis-C-Virus und andere.

[0032] Bei anderen medizinisch-mikrobiologischen Anwendungen ist es wichtig, in der Lage zu sein, beProbere Spezien von Mikroorganismen zu erfassen und zu quantifizieren. Die Verwendung von fluroreszenten Scorpions-Primern erleichtert dies erheblich.

[0033] Die Anwesenheit von Bakterien in Nahrungsmitteln oder anderen Produkten kann ebenfalls nützlich überwacht werden unter Verwendung der Echtzeit-PCR mit Scorpions-Fluoreszenzverfahren. Die Spezifizität der Probenerfassung kann modifiziert werden, um die Erfassung von verwandten Targets zu ermöglichen oder auszuschließen.

[0034] Ein beProberer Vorteil besteht darin, dass die neuen Primer nach der Erfindung nicht mit einer 100%igen Primerkonzentration verwendet werden müssen, d. h., dass das Erfassungsverfahren selbst dann gut arbeitet, wenn nur ein kleiner Anteil von neuem zu herkömmlichem Primer verwendet wird. Während wir nicht wünschen, durch theoretische Betrachtungen gebunden zu sein, glauben wir, dass nur wenige Prozent, z. B. bis zu 10%, bis zu 20%, bis zu 30%, bis zu 40% oder bis zu 50% oder 60% neuer Primer verwendet wird. Alternativ werden zumindest 50%, 60%, 70%, 80%, 90% oder 100 neuer Primer verwendet.

[0035] Der/die Primer kann/können in jeder zweckmäßigen Stufe in einer Amplifizierungsreaktion hinzugefügt werden, z. B. in dem letzten Amplifizierungszyklus, wobei alles, was gefordert ist, eine oder mehrere Primererweiterungsreaktionen sind. Für homogene Erfassungssysteme ist es bevorzugt, den/die Primer am Beginn jedes Amplifizierungsvorgangs hinzuzufügen.

[0036] Der Primerschwanz kann in einer Anzahl von unterschiedlichen Wegen ausgebildet sein, wobei das einzige Erfordernis darin besteht, dass der Target-Bindungsbereich in dem Schwanz nach der Primererweiterung verfügbar ist, um mit einer komplementären Sequenz (falls vorhanden) in dem Primererweiterungsprodukt zu hybridisieren. In seiner einfachsten Form ist der Primerschwanz zufällig gewunden, wenn Fluoreszenzerfassungsmittel verwendet werden, ist der Primer selbst gelöscht vor der Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs.

[0037] Der Primer kann einen oder mehrere Bereiche von interner Hybridisierung enthalten, welche helfen, das Signalisierungssystem in einer gegebenen Position, d. h. einer beProberen Konfiguration zu stabilisieren. Solche(r) Bereich(e) ist/sind zweckmäßig innerhalb des Primerschwanzes angeordnet und kann/können jeweils aus zwei oder mehr Basenpaaren bestehen. Die erworbenen Konfigurationen sind nur durch praktische Erwägungen begrenzt und können die Verwendung von einer oder mehreren Strukturen enthalten, die aus Haarnadeln, Armen, Ellenbogen, Stämmen, Blasen und Schleifen ausgewählt sind. Wenn zweckmäßige Strukturen gefunden wurden, können diese als gemeinsame Merkmale in den mit einem Schwanz versehenen Primern nach der Erfindung verwendet werden.

[0038] Der Target-Bindungsbereich kann jede zweckmäßige Anzahl von zusätzlichen Basen an seinem 5'-Ende haben. Alle oder einige dieser zusätzlichen Basen können einen Teil von irgendeinem Bereich von interner Hybridisierung sein.

[0039] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung kann der Primer einen Aufnahmebereich aufweisen. Dieser kann an jeder zweckmäßigen Stelle, vorzugsweise an dem Primerschwanz angeordnet sein. Der Aufnahmebereich kann eine zusammenhängende oder verzweigte Struktur haben (siehe **Fig.** 8c). Der Aufnahmebereich hybridisiert an der komplementären Sequenz auf beispielsweise einer festen Phase.

[0040] Jede zweckmäßige Template-abhängige Polymerase kann verwendet werden, dies ist vorzugsweise ein thermostabiles Polymeraseenzym wie Taq, bevorzugter Taq Gold.

[0041] In gleicher Weise können jede geeigneten Nukleosid-Triphosphate für herkömmliche Basenpaarung verwendet werden. Falls erforderlich, können diese für die Fluoreszenz modifiziert werden. Da diese die Polymerisationsgeschwindigkeiten beeinträchtigen können, werden nur bis zu etwa 1 von 20 verwendeten dNTPs für die besten Ergebnisse modifiziert.

[0042] Weitere Einzelheiten von zweckmäßigen Polymerasen, Nukleosid-Triphosphaten, anderen PCR-Reagenzien, der Primerausbildung, der Instrumente und der Verbrauchsstoffe sind gegeben in "PCR" von C. R. Newton und A. Graham (The Introduction to Biotechniques series, zweite Ausgabe 1997, ISBN 1 85996 011 1, Bios Scientific Publishers Limited, Oxford). Weitere Informationen können gefunden werden in "Laboratory protocols for mutation detection", herausgegeben von Ulf Landegren, veröffentlicht durch die Oxford University Press, Oxford, 1996, ISBN 0 190 857795 8.

[0043] Die Erfindung wird nun weiterhin illustriert durch die folgende nicht beschränkende beProbere Beschreibung, in der die mit einem Schwanz versehenen Primer nach der Erfindung als Scorpions-Primer bezeichnet werden.

[0044] Die Ausbildung von Scorpions-Primern kann bekannten Richtlinien für PCR-Amplimer folgen; das 3'-Ende des Scorpions-Primers und/oder der Target-Bindungsbereich kann direkt beispielsweise von einer bestehenden PCR- oder ARMS-Probe genommen werden.

[0045] Target-Bindungsbereiche sind typischerweise etwa 17 Basen (DNA), obgleich (abhängig von der Temperatur, bei der die Messungen durchgeführt werden) kürzere (6 bis 10 Basen) Target-Bindungsbereiche verwendet werden können. In diesem Zusammenhang ist festzustellen, dass nicht natürliche Nukleinsäuren wie PNA oder 2'-O-Alkyl-RNA (insbeProbere 2'-O-Methyl-RNA) nützlich sind, da sie höhere Tms haben, wenn sie an ihre Targets gebunden sind. Der Abstand auf einem DNA-Strang zwischen dem Amplicon-Bindungsbereich und seiner komplementären Sequenz innerhalb des Amplicon kann so klein wie 30 Basen (das ist direkt angrenzend an den Primerbereich) oder kann so groß wie etwa 200 – 300 Basen sein. Es wird erwartet, dass der Wirkungsgrad der einmolekularen Wechselwirkung abnimmt, wenn dieser Abstand zunimmt.

[0046] Wenn Stammbereiche verwendet werden, können sie im Bereich von 2 Basen (insbeProbere nützlich für 2'-O-Methyl-RNA oder PNA) bis etwa 6, 8, 10 oder mehr Basen liegen. Das Gleichgewicht zwischen der Stammlänge und der Amplicon-Bindungslänge ist wichtig: der Proben-Targetkomplex sollte eine stärkere (negativere) ΔG (freie Energie) haben als das Stammduplex bei der Versuchstemperatur.

[0047] Jede Polymerisations-Blockierungsgruppe wie die in unserem EP-B1-0 416817 (Zeneca Limited) beschriebene ist geeignet. Jedoch bevorzugen wir, dass sie leicht durch Festphasen-Oligonukleotidchemie aufgenommen werden sollte und auch ein Substrat für eine weitere Erweiterung nach derselben Chemie bilden sollte. Zweckmäßige Beispiele enthalten Hexethylenglykol (HEG)- und Tetraethylenglykol (TEG)-Phosporamidite.

[0048] Der Bereich von Prüfungen, die unter Verwendung der Scorpions-Primer durchgeführt werden können, ist weit. Die Erfassung kann beispielsweise nach der PCR-Amplifizierung und bei Raumtemperaturen bewirkt werden, da die einmolekularen Hybridisierungsvorgänge rasch erfolgen und für längere Perioden (zumindest über Nacht) stabil sind. Weiterhin sind positive Fluoreszenzsignale so hoch und Hintergrundstörungen so niedrig, dass die Fluoreszenz mit dem Auge bei zweckmäßiger Beleuchtung und bei Umgebungstemperatur beobachtet werden kann. Dies sind bedeutsame Vorteile.

[0049] Wenn eine allele Unterscheidung als ein Endpunkt verwendet wird, kann dies die Verwendung einer Temperatursteuerung erfordern, um ein fehlangepasstes Target selektiv zu destabilisieren.

[0050] Die Scorpions-Primer nach dieser Erfindung sind beProbers geeignet für Echtzeit-Prüfungen, da die Signalerzeugung schnell ist und nur eine einmolekulare Wechselwirkung erfordert. Zusätzlich sind Hintergrundstörungen niedrig und die Signale sind hoch, was eine große Flexibilität bei der Ausbildung der Prüfung ermöglicht. Eine kontinuierliche Überwachung der Fluoreszenz durch PCR ist mit der zweckmäßigen Ausstattung möglich.

[0051] Scorpions-Primer haben auch wesentliche Vorteile für in-situ-Techniken wie der in-situ-PCR (ISPCR) und der geprimten in-situ-Synthese (PRINS). Nur Primereignisse, die das gewünschte Produkt erzeugen, ergeben ein Signal, und dies liefert wesentliche Vorteile gegenüber anderen Techniken zum Erfassen von Produkten innerhalb einer Zelle.

[0052] Es ist allgemein wünschenswert, die Scorpions-Primer am Beginn der Reaktion einzufügen und die Fluoreszenz in dem geschlossenen Rohr (homogen) entweder kontinuierlich oder post-PCR zu messen. Alternativ kann der Scorpions-Primer in einer späteren Stufe der Amplifizierung hinzugefügt werden; das einzige Erfordernis besteht darin, dass der Scorpions-Primer einer einzelnen Erweiterungsrunde unterzogen wird und das einmolekulare Schwanz/Target-Duplex erzeugt.

[0053] Bei Verwendung geeigneter Signalisierungssysteme (z. B. unterschiedliche Fluorophore) ist es möglich, die Ausgangssignale von mehreren Scorpions-Primern in einer einzigen Reaktion zu kombinieren (Multiplex). Die Anzahl von Primern, die verwendet werden können, ist nur durch experimentelle Erwägungen begrenzt.

[0054] Wir offenbaren jetzt die folgenden nicht beschränkenden Ausführungsbeispiele:

Fluorphor/Quencher-Ausführungsbeispiel

[0055] Siehe **Fig.** 1. Das Löschen (Quenchen) wird erreicht durch das zufällige Falten des Schwanzes, das das Fluorophor/Quencher(F/Q)-Paar zufällig in die Nähe bringt (**Fig.** 2). Um dieses Quenchen zu maximieren, ist es bevorzugt, aber nicht wesentlich, das Fluorophor in der Mitte des Moleküls zu haben, wobei der Quencher am 5'-Ende ist. Das Signal "Einschalten" ist durch denselben Verlust des Quenchens bewirkt durch die Hybridisierung der Probe (**Fig.** 3). Bei diesem Ausführungsbeispiel ist es nicht kritisch, dass F und Q an entgegengesetzten Enden der Probe sind, und es kann vorteilhaft sein, sie innerhalb des Probenbereichs enger zusammen anzuordnen. Es ist dennoch wichtig, die Target-Bindungsfunktion des Schwanzes nicht zu zerstören durch Einführung voluminöser, keine Basenpaare bildender Elemente, aber sowohl Fluorophor als auch der Quencher könnten auf Uracil-Monomeren eingeführt werden, wodurch Thymidine in der Probe ersetzt werden. Wir glauben, dass dieses Ausführungsbeispiel am besten als ein Amplikon-Detektor arbeiten kann.

Einfügungs-Ausführungsbeispiel

[0056] Bei diesem Ausführungsbeispiel ist die Ausbildung des Scorpion-Primers weiter vereinfacht, da kein Quencher einbezogen ist. Statt dessen trägt der Schwanz einen interkalierenden Farbstoff, der in der Lage ist, zwischen den Basen eines doppelsträngigen Nukleinsäuremoleküls eingefügt zu werden, worauf er stark fluoreszierend wird. Auf diese Weise wird eine sequenzspezifische Einfügung erzielt (**Fig.** 4a, b). Im Gegensatz zu dem bei dem vorhergehenden Ausführungsbeispiel beschriebenen "Kein-Stamm"-Verfahren wird das interkalierende Fluorophor besser an dem 5'-Ende des Scorpions-Moleküls oder als ein interner Teil der Schleife angeordnet. Das interne Falten innerhalb des Primers ist am besten minimiert, um die Abwesenheit von doppelsträngiger DNA sicherzustellen, die dann eingefügt werden kann, was zu einem hohen Hintergrundrauschen führt. Wenn der Farbstoff innerhalb des Schleifenbereichs des Moleküls angeordnet ist, kann es möglich sein, eine Haarnadelstruktur zu haben (was die Allele-Spezifizität der Hybridisierung vergrößern würde). Der verwendete Farbstoff ist vorzugsweise nicht ein Standardfluorophor Probern eher ein eingefügtes Mittel mit geringer Fluoreszenz in Abwesenheit eines doppelsträngigen Targets und einer starken Vergrößerung, wenn er eingefügt ist. Geeignete Fluorophore enthalten die Zyaninfarbstoffe, die von Molecular Probes entwickelt wurden, Ethidium Bromid, Acridin und andere. Es kann erforderlich sein, dass die Farbstoffe modifiziert werden, um ihre sichere Anbindung an den Scorpions-Primer oder die Aufnahme über Phosphoramidid (Festphasen)-Chemie sicherzustellen.

FRET-Ausführungsbeispiel

[0057] Bei dieser Modifikation des Grundsystems bilden die verwendeten Farbstoffe ein Energieübertragungspaar. Einer der Farbstoffe ist nahe dem 3'-Ende des Target-Bindungsbereichs positioniert, während sich der andere nahe dem 3'-Ende des Amplikon-Bindungsbereichs befindet (siehe **Fig.** 5a, b). Die Probe muss sehr nahe an dem Primer hybridisieren, wodurch das FRET-Paar zusammengebracht wird und ein verstärktes Fluoreszenzsignal erzeugt wird.

Kein-Quencher-Ausführungsbeispiel

[0058] Ein Fluorophor ist an den Schwanz des Scorpions-Primer angebunden (siehe **Fig.** 6(a), (b) & (c)). Die zufällige Faltung des Scorpion-Primers um das Fluorophor herum ergibt ein ausreichendes Quenchen des Fluorophors. Wir glauben, dass dies hauptsächlich aufgrund des Nukleotids Guanylsäure erfolgt. Um das Quenchen zu maximieren, ist es bevorzugt, aber nicht wesentlich, dass das Fluorophor in oder um die Mitte des Primers ist, mit ausreichender zusätzlicher DNA, um wirksam zu quenchen. Der Quenchwirkungsgrad ist abhängig von der Sequenz der umgebenden DNA. Die Bindung des Target-Bindungsbereichs des Schwanzes an dem Targetbereich ändert die Struktur der DNA ausreichend, um dieses Quenchen zu beseitigen. Wir bevorzugen dieses Ausführungsbeispiel als ein Amplikon-Detektor.

Bimolekulares Ausführungsbeispiel

[0059] Das Fluorophor und der Quencher können auf zwei getrennten, aber komplementären Molekülen eingeführt werden (**Fig.** 7a). Das Fluorophor und der Quencher können an jeweils einem Ende der Probe oder der komplementären Stränge sein, vorausgesetzt, dass die Hybridisierung der beiden Stränge das Fluorophor/Quencher-Paar in enge Nähe bringt. Nach einer Runde der Denaturierung, des Glühens und der Erweiterung bleibt das Fluorophor gequencht, wenn sich die bimolekulare Einheit wieder bildet (**Fig.** 7b). Der Nicht-Scorpion, freie Strang ist im Überschuss, um sicherzustellen, dass diese bimolekulare Wechselwirkung stattfindet und aus diesem Grund ist bevorzugt, dass dieses Molekül den Quencher trägt, um Hintergrundstörungen zu minimieren. Jedoch nach einer weiteren Runde der Denaturierung und des Glühens bildet sich der selbstprüfende Strang (**Fig.** 7c) und der freie Quencher (oligo) ist nicht in der Lage, kinetisch oder thermodynamisch mit diesem Ereignis zu konkurrieren, was zu einer Zunahme der Fluoreszenz führt.

[0060] Falls erforderlich, kann eines der Moleküle eine sekundäre Struktur wie eine Haarnadelstruktur aufweisen, um die Anbindung von z. B. Mehrquencher-Spezies für ein wirksameres Quenchen eines Fluorophors auf dem anderen Molekül zu ermöglichen.

Aufnahmeprobe-Ausführungsbeispiel

[0061] Zusätzlich zu den vorstehend diskutierten Ausführungsbeispielen können Amplikons beProbers aufgenommen und geprüft werden unter Verwendung desselben nicht amplifizierbaren Schwanzes (siehe **Fig.** 8a & 8b). Bei einem weiteren beProberen Ausführungsbeispiel sind die Aufnahme und die Schwanzsequenzen vorgesehen als nicht zusammenhängende Merkmale, d.h. zusammen mit dem Template-Bindungsbereich bil-

den sie eine verzweigte Primerstruktur (siehe **Fig.** 8c). Nach der Amplifizierung kann das Amplikon auf einer festen Oberfläche aufgenommen werden, während die Signalerzeugung amplikonspezifisch bleibt. Alternativ können die Aufnahmesequenzen und das Signalisierungssystem an den entgegengesetzten Enden des Amplikons sein. Auf diese Weise können generelle "Chips" mit denselben Aufnahmesequenzen verwendet werden, um viele verschiedene Targets zu analysieren – die Aufnahmebereiche bleiben unverändert, während der Amplifizierer und die Probenelemente sich ändern.

Stamm-Ausführungsbeispiel

[0062] Bei diesem Ausführungsbeispiel weist der Primerschwanz selbstkomplementäre Stämme auf (auch DNA, RNA, 2'-O-Methyl-RNA, PNA und ihre Varianten), die den Amplikon-Bindungsbereich flankieren und die ein Fluorophor/Quencher-Paar tragen, derart, dass eine Haarnadelformation durch die beiden Stämme das F/Q-Paar zusammenbringt was bewirkt, dass die Fluoreszenz im Wesentlichen gequencht wird ("aus"). Das Fluorophor und der Quencher können jeweils auf einem Arm angeordnet sein, abhängig von der Bevorzugung oder der Einfachheit des Kunststoffs; wir bevorzugen, dass der Quencher auf dem 3'-Arm ist (d. h. benachbart dem Blockierer in der Mitte des Moleküls).
[0063] Bei hohen Temperaturen wird der Stammduplex unterbrochen und das Fluorophor ist nicht gequencht (d. h. "ein" **Fig.** 9a); bei niedrigeren Temperaturen bildet sich jedoch der Stammduplex und die Fluroreszenz ist im Wesentlichen aus (**Fig.** 9b).

In einem Amplifizierungszyklus

[0064] Nach anfänglicher Denaturierung, Glühen und Erweiterung weist das Scorpions-Amplikon einen Bereich auf, der komplementär zu dem Schleifenbereich an seinem 5'-Ende ist (**Fig.** 10a). Nach einer zweiten Runde der Denaturierung (**Fig.** 10b) und des Glühens hybridisiert der Schwanz an dem neu zusammengesetzten Bereich mit großem Wirkungsgrad (eine einmolekulare Wechselwirkung) und die Fluoreszenz bleibt ungequencht (**Fig.** 10c). Nicht erweiterte Primer fahren jedoch fort, ihre gequenchte Struktur zu bilden. Unterdessen hat der "umgekehrte" Primer an demselben Strang hybridisiert und die Synthese geht weiter. Wir glauben, dass der Schwanz (zumindest teilweise) durch die Taq-Polymerase versetzt wird und der Rest leicht wegschmilzt, da die Proben kurz sind. In dieser Stufe beendet die Taq-Polymerase die Synthese dieses Stranges, bis sie auf den Amplifizierungsblockierer trifft. Da die Signale stark sind und die Primfunktion identisch mit der Nicht-Scorpionsvariante ist, müssen nicht alle Primer in der Scorpions-Form sein. Tatsächlich haben wir starke Signale erhalten, wenn 10% oder weniger des Primers in der Scorpions-Form waren. Dies ermöglicht kostengünstigere Reaktionen und ermöglicht auch den Ausgleich von Signalstärken, wenn zwei unterschiedliche Fluorophore verwendet werden.
[0065] Die Scorpions-Primer nach der Erfindung können anstelle von herkömmlichen Amplifizierungsprimern wie PCR-Primern verwendet werden und es wird nicht erwartet, dass sie ihre Amplifizierungsfunktion stören. Bei einer Zweirohr-ARMS-Prüfung (normal und mutant) kann der Scorpions-Primer zweckmäßig der gemeinsame Primer sein (**Fig.** 11a), mit der Erzeugung des Signals in Abhängigkeit von der ARMS-Amplifizierung.
[0066] Jedoch ist es in gleicher Weise lebensfähig, die Signalisierungsgröße auf den ARMS-Primern anzuordnen. Jeder ARMS-Primer kann mit unterschiedlichen Fluorochromen (F1, F2) markiert werden, wodurch eine Einrohr-Genotypisierung (STG) ermöglicht wird – d. h., beide Reaktionen laufen in demselben Rohr ab und die Amplikons werden durch ihre charakteristische "Farbe" unterschieden (**Fig.** 11b). Alternativ kann die Signallisierungsgröße die allele Spezifizität tragen (siehe Beispiel 2): die Primer sind Standardprimer (nicht ARMS) und zwei unterschiedliche Probensequenzen zum Anpassen der beiden allelen Varianten werden auf zwei Varianten von einem der Primer eingeführt (**Fig.** 12a, b). Es wurde gefunden, dass Proben, die Haarnadeln bilden können, in der Abwesenheit eines Targets bessere Unterscheidungen von Einzelbasen-Fehlanpassungen geben als die Versionen derselben Proben ohne Schwanz. Bei einer anderen Demonstration können Proben für jede Variante auf jedem der beiden Amplimere eingeführt werden (**Fig.** 12c, d), wodurch unterschiedliche Stränge der Reaktion geprüft werden. Schließlich sind Kombinationen dieser Ideen möglich. Ein Subsatz von Scorpions-Primern kann für eine allele Unterscheidung verwendet werden, während andere Primer in derselben Mischung als Kontrollproben wirken können, um das Amplikon selbst zu erfassen (**Fig.** 12e). Eine Unterscheidung zwischen diesen Ereignissen wird erreicht entweder durch Fluoreszenzwellenlänge oder alternativ durch die Verwendung von Probenelementen mit demselben Fluorophor aber unterschiedlichem T_ms, die dann unterschieden werden können durch Messen der Fluoreszenz über einen Temperaturbereich.
[0067] Die Erfindung wird nun illustriert, aber nicht beschränkt durch Bezugnahme auf die folgenden Figuren und Beispiele, in denen:
[0068] **Fig.** 1 zeigt die grundsätzlichen Merkmale einer herkömmlichen Primerausbildung, wobei der Template-Bindungsbereich durch den schattierten Pfeil angezeigt ist, der Schwanzbereich eine Blockierungsgruppe aufweist, die durch H angezeigt ist, und auch ein Quencher und ein Fluorophor gezeigt sind, und der Tar-

get-Bindungsbereich in dem Bereich ist, der durch die ausgezogene Linie zwischen dem Quencher und dem Fluorophor angezeigt ist.

[0069] **Fig.** 2 zeigt das durch zufällige Windung des Schwanzes erzielte Quenchen, bei dem der Schwanz das Fluorophor/Quencher-Paar in enge Nähe bringt.

[0070] **Fig.** 3 zeigt die Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs an eine komplementäre Sequenz in dem Primererweiterungsprodukt entsprechend dem Targetbereich.

[0071] **Fig.** 4(a) zeigt den Einschluss eines interkalierenden Fluorophors (IF) in dem Schwanz des Primers und die Primererweiterung auf einer Probentemplate, (b) zeigt die Interkalierung nach der Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs an einer komplementären Sequenz in dem Primererweiterungsprodukt entsprechend dem Targetbereich.

[0072] **Fig.** 5(a) zeigt die Verwendung von Farbstoffen (R & F), die in dem Primer aufgenommen sind und die ein Energieübertragungspaar bilden, (b) zeigt ihre relative Position nach der Hybridisierung.

[0073] **Fig.** 6(a) zeigt die Verwendung eines Primers mit einem einzelnen Fluorophor (F), das an das 5'-Ende angebunden ist, eine Blockierungsgruppe (H) ist gezeigt und der Target-Bindungsbereich ist durch den Pfeil nach rechts angezeigt, (b) zeigt die zufällige Windung und das Quenchen des Fluorophors in Lösung, und (c) zeigt die Hybridisierung eines Target-Bindungsbereichs nach der Primererweiterung.

[0074] **Fig.** 7(a) zeigt das bimolekulare Ausführungsbeispiel der Erfindung, das Fluorophor und der Quencher sind auf getrennten Spezies vorgesehen, in (b) ist der Primer auf derselben Template erweitert, und in (c) ist die Trennung des Fluorophors und des Quenchers bei der Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs gezeigt.

[0075] **Fig.** 8(a) zeigt das Aufnahmeprobe-Ausführungsbeispiel der Erfindung, in (b) sind Amplikons auf einer festen Phase aufgenommen und geprüft unter Verwendung desselben nicht amplifizierbaren Schwanzes, in (c) weist der Primer eine verzweigte Struktur des Schwanzes und der Aufnahmesequenzen auf.

[0076] **Fig.** 9 zeigt das Stamm-Ausführungsbeispiel nach der Erfindung, (a) bei hohen Temperaturen ist der Stammduplex unterbrochen und das Fluorophor ist ungequencht, d.h. "ein"; (b) bei niedrigeren Temperaturen bildet sich jedoch der Stammduplex und die Fluoreszenz ist im Wesentlichen aus.

[0077] **Fig.** 10 zeigt den Primer, wie er in einem Amplifizierungszyklus verwendet wird; (a) nach anfänglicher Denaturierung, Glühen und Erweitern, weist das Scorpions-Amplikon einen Bereich komplementär zu dem Schleifenbereich an seinem 5'-Ende auf; (b) nach einer zweiten Runde der Denaturierung und des Glühens hybridisiert der Schwanz (c) zu dem neu zusammengesetzten Bereich mit hohem Wirkungsgrad (eine einmolekulare Wechselwirkung) und die Fluoreszenz bleibt ungequencht (**Fig.** 10c). Nicht erweiterte Primer jedoch fahren fort, ihre gequenchte Struktur zu bilden.

[0078] **Fig.** 11 zeigt die Verwendung des Primers als (a) einen gemeinsamen Primer bei einer Zweirohr-ARMS-Prüfung und (b) als allelspezifische Primer "a" und "b" bei einer Einzelrohr-ARMS-Prüfung.

[0079] **Fig.** 12 zeigt die Verwendung des Primers, bei der die Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs in einer allelspezifischen Weise erfolgt, in (a) gibt die Primererweiterung ein Produkt entsprechend dem Allel "a" oder "b", in (b) ist die Hybridisierung allelspezifisch oder fehlangepasst, in (c) und (d) sind Proben für jede Variante auf jedem der beiden Amplimere vorgesehen, wodurch unterschiedliche Stränge der Reaktion geprüft werden, und in (e) können unterschiedliche Primer in derselben Mischung für eine allele Unterscheidung und als Kontrollprimer für eine Amplikonerfassung verwendet werden.

[0080] **Fig.** 13 zeigt eine Echtzeit-Erfassung der Amplifizierung, das Fluoreszenzsignal wird erzeugt bei der Hybridisierung eines angepassten Target-Bindungsbereichs im Gegensatz zu einem fehlangepassten Target.

[0081] **Fig.** 14 zeigt eine Allelunterscheidung, das fluoreszente Signal wird erzeugt bei Hybridisierung eines angepassten Target-Bindungsbereichs im Gegensatz zu einer Nichttemplate-Kontrolle und einem fehlangepassten Target.

[0082] **Fig.** 15 zeigt eine Primertitration, das fluoreszente Signal wird erzeugt bei Hybridisierung eines angepassten Target-Bindungsbereichs im Gegensatz zu einem fehlangepassten Target. Die folgenden Anteile von Scorpion-Primer wurden verwendet: (a) 100%), (b) 80%, (c) 50%, (d) 20% und (e) 10%.

[0083] **Fig.** 16 zeigt eine Heteroplasmie-Analyse, wobei verschiedene Mischungen von C-Homozygot und A-Homozygot wie gezeigt verwendet wurden und Messungen nach 40 Zyklen der PCR durchgeführt wurden.

[0084] **Fig.** 17 zeigt einen Vergleich zwischen dieser Erfindung und einem bimolekularen Äquivalent. In (a) zeigen fehlangepasste Targets keine merkliche Amplifizierung, in (b) und (c) wird ein erhebliches allelspezifisches Signal nur bei den angepassten Scorpions-Primern erzeugt. In **Fig.** 17 sind unter Verwendung von Scorpions-Primern erhaltene Ergebnissen als Dreiecke und Kreuze gezeigt.

[0085] **Fig.** 18 zeigt die Verwendung des Kein-Quencher-Ausführungsbeispiels nach der Erfindung, ein fluoreszentes Signal wird erzeugt bei Hybridisierung eines angepassten Target-Bindungsbereichs im Gegensatz zu einer Keine-Template-Steuerung.

[0086] **Fig.** 19 zeigt, dass eine zufällige Windung eines Primers nach der Erfindung ausreichend ist, um das Fluorophor und den Quencher zusammenzubringen.

[0087] **Fig.** 20 zeigt das bimolekulare Ausführungsbeispiel nach der Erfindung, wobei unterschiedliche Men-

gen von Quencher-Oligonukleotid hinzugefügt wurden, (a) keine, (b) 0,5 µM, (c) 2 µM und (d) 20 µM.
[0088] **Fig.** 21 zeigt (a) den Anteil von frei schwebendem Quencher zu dem Scorpions-Primer, d. h. 40X, 4X, 1X bzw. 0X, und (b) die Wirkung bei Fehlen eines Quenchers.

Beispiele
Materialien
Primer/Scorpions-Primer:

B2098-BRCA-Scorpions: FAM-

CGCACGATGTAGCACATCAGAAGCGTGCG-MR-HEG-

TTGGAGATTTTGTCACTTCCACTCTCAAA

[0089] Die unterstrichenen Bereiche sind die Haarnadelbildungsteile, FAM ist der Fluorescein-Farbstoff, MR ist ein nichtfluorogenes Fluorophor, das an ein Uracil angebunden ist, HEG ist das replikationsblockierende Hexethylenglykol-Monomer. Die Probe ist der "C-Variante" des BRCA2-Polymorphismus angepasst und der "A-Variante" nicht angepasst.

R186-98: Äquivalenz ohne Schwanz von B2098:

TTGGAGATTTTGTCACTTCCACTCTCAAA

[0090] R187-98: Entgegengesetzter Primer zu R186-98 und den äquivalenten Scorpions.

Z3702: das Probensegment der Scorpions B2098:

FAM-CGCACGATGTAGCACATCAGAAGCGTGCG-MR

[0091] Template-DNA: Vorher genotypisierte DNA, die durch Proteinase K und Phenol/Chlorophorm-Extraktion hergestellt wurde, wurde mit 50 ng pro 50 µl-Reaktion verwendet. Genotypen waren typischerweise ein homozygotes A/A, ein homozygotes C/C und ein heterozygotes (A/C).
[0092] Puffer (1 ×): 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,2 mM oder 3,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, dNTPs (jeweils bei 100 µM), Gelatine bei 0,01 (w/v).
[0093] Enzyme: AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer/ABI) war in der Reaktionsmischung mit 2 Einheiten/50 µl-Reaktion enthalten.

Beispiel 1

In Echtzeit erfasste Amplifizierung

[0094] Um das Leistungsvermögen eines Scorpions-Primers in einer homogenen Amplifizierungsreaktion zu überwachen, wurde eine PCR durchgeführt unter Verwendung von Primern, die einen Polymorphismus in dem BRCA2-Gen flankieren. Die gewählte Targetsequenz wurde vorher verwendet für eine allele Unterscheidung der beiden Varianten, aber war zu kurz für eine Echtzeit-Erfassung (die Probe hybridisierte nicht bei 60°C – der niedrigsten Temperatur in dem Thermozykluslauf). Die (oberer Strang) Probeneinheit wurde synthetisiert als Teil eines unteren Strangprimers mit einer Blockierung HEG zwischen den beiden Funktionalitäten. Die Target-DNA konnte ausgewählt werden, um ein Amplikon zu erzeugen, das der Probe angepasst oder nicht angepasst wäre.
[0095] Reaktionsbedingungen: Nach der Zugabe von Template-DNR wurden die Rohre versiegelt und Reaktionen wurden zyklisch durchgeführt unter den folgenden Bedingungen: 20 min. bei 94°C, um das Amplitaq Gold zu aktivieren; und 40 Zyklen {94°C während 45 s, 60°C während 45 s}. Die Reaktionen wurden in einer ABI PRISM 7700 Fluoreszenz-PCR-Maschine durchgeführt.
[0096] Ergebnisse: Siehe **Fig.** 13. Es ist sehr klar, dass, wenn sich das Amplikon akkumuliert, ein fluoreszentes Signal erzeugt wird. Es gibt mehrere Fluoreszenzmessungen zu jedem Zeitpunkt, und die scharfe, schrittweise Natur des Signalanstiegs reflektiert die schnelle Erzeugung des Probe/Target-Duplex in dem frühen Teil der Thermozyklus-Verweilzeit. Dies ergibt sich aufgrund der einmolekularen Art der Wirkung eines Scorpion-Primers, wodurch die sofortige Erkennung eines zweckmäßigen Amplikons ermöglicht wird.

Beispiel 2

Allele Unterscheidung

[0097] Materialien und Verfahren wie vorstehend.
[0098] Ergebnisse: Siehe **Fig.** 14. Bei diesem Experiment war die Probe den Amplikons bei der polymorphen Basis angepasst oder nicht angepasst. Beide Amplifizierungen waren gleichermaßen wirksam (wie betrachtet durch Agarosegels [Ergebnisse sind nicht gezeigt), aber das angepasste Produkt wurde viel leichter erfasst als das nicht angepasste. Dies illustriert die starke Spezifizität des Systems selbst herunter bis zu einer Änderung einer Einzelbase in dem Amplikon.

Beispiel 3

Primertitration

[0099] Materialien und Verfahren, sie vorstehend. Titration des Primers B2098 mit seinem Äquivalent ohne Schwanz (R186-98) war von 100% Scorpions bis 10% Scorpions; Gesamtprimer war konstant bei 500 nM.
[0100] Ergebnisse: Siehe **Fig.** 15. Bei allen Verhältnissen von Scorpions: Primer ohne Schwanz waren die Reaktionen klar erfassbar mit dem ABI 7700. Tatsächlich war der Ct (der Punkt, an dem das Signal einen Schwellenwert oberhalb "Hintergrund" kreuzt) identisch ungeachtet des Verhältnisses von Scorpions zu Primer ohne Schwanz, was dieselben Pegel des Primwirkungsgrades über die Reihe anzeigt. Die einzige Variable war das absolute Fluoreszenzsignal (wie zu erwarten war). Der Wirkungsgrad dieses Systems ist in einem markierten Kontrast zu verfügbaren Verfahren, bei denen höhere Konzentrationen der Probe erforderlich sind, um genetisch das bimolekulare Prüfungsereignis durchzuführen.

Beispiel 4

Endpunktmessungen

[0101] Materialien und Verfahren: Reaktionen wurden durchgeführt wie vorstehend, aber wurden bei zwei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen (1,2 und 3,5 mM) ausgeführt. Die DNAs aller drei Genotypen und eine Kein-Template-Steuerung (NTC) wurden durchgeführt und die Fluoreszenz wurde vor und nach der Amplifizierung gemessen. Die Fluoreszenzzahlen sind das Mittel von zumindest sechs getrennten Messungen von Duplikatproben.

Ergebnisse

Probe	CC		AC		AA		NTC	
Mg	1,2	3,5	1,2	3,5	1,2	3,5	1,2	3,5
Vorher	6396	3706	5700	2958	6157	3299	6257	3685
Nachher	12144	10316	8614	6140	6818	4641	6616	4453
Änderung	5748	6610	2914	3182	661	1342	359	768

[0102] Fluoreszenzmessungen erhöhten sich durch das PCR in einer targetabhängigen Weise. Tatsächlich sind die für Heterozygote erzeugten Signale ungefähr die Hälfte von denjenigen für die CC-Homozygote, und dies kann nützlich sein für die Genotypisierung auf eine einfache Weise oder für die Analyse von Heteroplasmie, bei der sich die Allelverhältnisse stärker verändern als 100 : 0, 50 : 50 oder 0 : 100. Zusätzlich waren die für nicht angepasste Targets erzeugten Signale ähnlich den Hintergrundpegeln, was zeigte, dass obgleich eine Amplifizierung stattgefunden hat, die Probe nicht wirksam hybridisierte, wenn nicht eine perfekte Anpassung vorlag. Die Erhöhung der Magnesiumkonzentration verringerte diesen Unterschied, aber stellte auch sicher, dass der Hintergrund niedriger war, vermutlich durch Fördern der Hybridisierung im Allgemeinen.
[0103] Zusätzlich zu der Beobachtung dieser Signaländerungen durch Fluorometer konnte eine erhöhte Fluoreszenz erfasst werden durch visuelle Untersuchung des Rücklichts der Rohre durch eine UV-Durchleuchtungsvorrichtung. Dies ist eine bemerkenswerte Beobachtung, da der FAM-Farbstoff ein Erregungsoptimum bei 490 nm hat, während die UV-Zelle bei ~330–360 nm beleuchtet. Dies bedeutet, dass die Fluoreszenzaus-

beute weit vom Optimalen entfernt war und durch die Verwendung geeigneterer Wellenlängen erheblich verbessert werden kann.

Beispiel 5

Analyse der Heteroplasmie durch Scorpions

[0104] Reaktionen wurden wie bei Beispiel 4 durchgeführt, aber die Template-DNA war eine Standardmenge mit sich ändernden Mischungen von C-Homozygot zu A-Homozygot: 100% : 0%, 90 : 10, 50 : 50, 10 : 90, 0 : 100 und NTC. Nach 40 Zyklen der PCR wurden FAM-Fluoreszenzmessungen durchgeführt und NCT von jedem Messwert subtrahiert. Die Daten sind in **Fig.** 16 gezeigt.

Beispiel 6

Vergleichendes Leistungsvermögen von Scorpions

[0105] Um das relative Leistungsvermögen von Scorpions gegenüber einem bimolekularen Äquivalent zu untersuchen, wurden dasselbe Amplikon und Probensequenzen in jedem Format verwendet. Das bimolekulare Format bildete 500 nM jeweils von Primern R186-98 und R187-98, plus 500 nM Molecular Beacon /3702, während die einmolkulare Version B2098 und R187-98 jeweils mit 500 nM enthielt. Andere Reaktionsbestandteile waren identisch mit vorhergehenden Experimenten (mit 1,2 mM Mg) und der Vorgang erfolgte über 40 Zyklen wie vorstehend. Die Ergebnisse dieser Amplifizierungen in Echtzeit mit Targets, die homozygotes C, homozygotes A oder heterozygotes A/C sind, sind in **Fig.** 17 gezeigt. Es ist klar ersichtlich, dass keine wesentliche Amplifizierung über den Hintergrund für die Reaktionen mit einer bimolekularen Probenart stattfand, während im Wesentlichen allelspezifische Signale bei den Scorpions-Reaktionen erzeugt wurden. Es ist darauf hinzuweisen, dass der endgültige Signalpegel für das Heterozygot die Hälfte von dem war, der bei der homozygoten C-Amplifizierung erzeugt wurde. Dieses Experiment illustriert die wesentlichen kinetischen Vorteile der einmolekularen Hybridisierung nach dieser Erfindung.

Beispiele 7 und 8
Ausführungsbeispiel mit zufälliger Windung und bimolekulares Ausführungsbeispiel

Scorpion B2731:

fam-AGGTAGTGCAGAGAGTG-mr-h-

GAGCCTCAACATCCTGCTCCCCTCCTACTAC

Scorpion B4249 (kein Quencher auf demselben Molekül)

fam-AGGTAGTGCAGAGAGTG-h-

GAGCCTCAACATCCTGCTCCCCTCCTACTAC

Quencher-Oligonucleotid (Komplement des Schwanzes von B4249):

CACTCTCTGCACTACCT-mr

[0106]

ARMS-Primer R284-97:

TTCGGGGCTCCACACGGCGACTCTCAAC

ARMS-Primer R283-97:

TTCGGGGCTCCACACGGCGACTCTCAAG

[0107] Target ist die H63D-Polymorphie des menschlichen vererbbaren Hämochromatose-Gens (HH), B2731 und B4249 sind "gemeinsame" Primer, um den ARMS-Primern R283-97, R283-97 entgegenzustehen. Zyklus-

bedingungen und Reaktionszusammensetzung wie vorstehend. Primer (einschließlich Scorpion-Primer) wurden mit einer 500 nM-Konzentration verwendet.

[0108] Für das Zweimolekülbeispiel wurde das Quencher-Oligonukleotid mit 0, 0,5, 2 und 20 mM eingefügt, d. h.: das 0-, 1-, 4-, 40-fache relativ zu dem Scorpion-Primer.

[0109] Das Ausführungsbeispiel mit zufälliger Windung (**Fig.** 19) bestätigt, dass die zufällige Windung allein ausreichend sein kann, um die Probe und den Quencher zusammenzubringen, und dass eine Zunahme des Signals ohne weiteres bei kontinuierlicher Überwachung der PCR erhalten wird. (Weiterhin ist festzustellen, dass dieses beProbere Amplikon sich vorher als refraktär erwiesen hat gegenüber einer Prüfung in einer TaqMan- oder Molecular Beacons-Probe).

[0110] Das bimolekulare Ausführungsbeispiel hat ebenfalls gute Resultate ergeben (siehe **Fig.** 20 und 21). Je mehr Quencher hinzugefügt wurde, desto niedriger waren die Hintergrundsignale bei Abwesenheit des Amplikons. Das optimale Gesamtleistungsvermögen (unter Berücksichtigung der absoluten Signalstärke und des Signal/Rauschens) wurde äquimolar und mit 4fachem Quencherüberschuss erzielt.

Beispiel 9
Ausführungsbeispiel ohne Quencher
Scorpion B4249 (kein Quencher)

fam-AGGTAGTGCAGAGAGTG-h

GAGCCTCAACATCCTGCTCCCCTCCTACTAC

ARMS-Primer R284-97

TTCGGGGCTCCACACGGCGACTCTCAAC

[0111] Die Reaktionen wurden durchgeführt wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben. Primer waren mit 500 nm enthalten. Das Target war die H63D-Mutation des menschlichen vererbbaren Hämochromatose-Gens (HH). 25 ng DNA wurden pro Reaktion hinzugefügt. B4249 war der gemeinsame Primer kombiniert mit dem ARMS-Mutantenprimer R284-97. Der Zyklus war wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben. Die Ergebnisse sind in **Fig.** 18 gezeigt.

[0112] Bei diesem Beispiel wurde ein mutationsspezifisches Signal bei Abwesenheit eines Quenchers erzeugt. Die zufällige Faltung des Scorpion-Primers um das Fluorophor ergibt ein ausreichendes Quenchen des Fluorophors. Eine Zunahme des Signals wird auf einfache Weise während des kontinuierlichen Überwachens der PCR erhalten.

SEQUENZAUFLISTUNG

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Zeneca Ltd
(B) STRASSE: 15 Stanhope Gate
(C) STADT: London
(D) BEZIRK: Greater London
(E) STAAT: England
(F) POSTLEITZAHL: (ZIP): W1Y 6LN
(G) TELEFON: 0171 304 5000
(H) TELEFAX: 0171 304 5151
(I) TELEX: 0171 834 2042

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: VERFAHREN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

(iv) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) TYP DES MEDIUMS: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
(C) OPERATIONSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(v) DATEN DER PRIORITÄTSANMELDUNG:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: GB 9812768:1

(B) ANMELDUNGSDATUM: 13-JUN-1998

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCACGATGT AGCACATCAG AAGCGTGCG

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

TTGGAGATTT TGTCACTTCC ACTCTCAAA

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 17 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AGGTAGTGCA GAGAGTG

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(E) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GAGCCTCAAC ATCCTGCTCC CCTCCTACTA C

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 17 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CACTCTCTGC ACTACCT

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

TTCGGGGCTC CACACGGCGA CTCTCAAC

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TTCGGGGCTC CACACGGCGA CTCTCAAG

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erfassung einer Target-Nukleinsäure, welches Verfahren das Kontaktieren von Template-Nukleinsäure von einer Probe mit (i) einem Signalisierungssystem und (ii) einem mit einem Schwanz versehenen Nukleinsäure-Primer mit einem Template-Bindungsbereich, wobei der Schwanz einen Koppler und einen Target-Bindungsbereich aufweist, in Anwesenheit von geeigneten Nukleosid-Triphosphaten und einem Mittel zur Polymerisation hiervon, unter solchen Bedingungen, dass der Template-Bindungsbereich des Primers hybridisiert wird an eine komplementäre Sequenz in der Template-Nukleinsäure und verlängert wird zur Bildung eines Primerverlängerungsprodukts, und das Trennen jedes derartigen Produkts von der Template, worauf der Target-Bindungsbereich in dem Schwanz des Primers an eine Sequenz in dem Primererweiterungsprodukt entsprechend der Target-Nukleinsäure hybridisiert, enthält, und wobei jede derartige target-spezifische Hybridisierung ein erfassbare Änderung in dem Signalisierungssystem bewirkt, derart, dass die Anwesenheit oder Abwesenheit der Target-Nukleinsäure in der Probe erfasst wird durch Bezugnahme auf die Anwesenheit oder Abwesenheit einer erfassbaren Änderung in dem Signalisierungssystem.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der mit einem Schwanz versehene Nukleinsäure-Primer als ein Amplifizierungsprimer in einem Amplifizierungssystem verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem das Amplifizierungssystem die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, bei dem der Schwanz des Nukleinsäure-Primers während der Amplifizierung unkopiert bleibt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem der Koppler in dem Schwanz eine Blockierungseinheit enthält, um das Kopieren des Schwanzes zu verhindern.

6. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem der Schwanz des Nukleinsäure-Primers eine nicht kopierbare Spezies aufweist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Hybridisierung des mit einem Schwanz versehenen Primers an eine Template-Nukleinsäure mit einer derartigen Genauigkeit erfolgt, dass dem Primer eine Verlängerung an verwandten Template-Sequenzen ermöglicht wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem die verwandten Template-Sequenzen menschliche Leukozytantigen (HLA)-Sequenzen sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Hybridisierung des Template-Bindungsbereichs und/oder des Target-Bindungsbereichs des Primers an eine komplementäre Sequenz allelspezifisch ist.

10. Diagnostischer Primer zur Verwendung bei einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und aufweisend (i) einen Template-Bindungsbereich und (ii) einen Schwanz mit einem Target-Bindungsbereich, und bei dem der Target-Bindungsbereich an eine komplementäre Sequenz in einem Verlängerungssprodukt des Primers die der Target-Nukleinsäure entspricht, hybridisiert, und die komplementäre Sequenz weniger als 200 Basenpaare von dem Template-Bindungsbereich entfernt ist, welcher Primer weiterhin zumindest eine Komponente eines integralen Signalisierungssystems aufweist, um die Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs an eine komplementäre Sequenz an einem Primerverlängerungsprodukt des Primers anzuzeigen.

11. Diagnostischer Primer zur Verwendung bei einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und aufweisend (i) einen Template-Bindungsbereich und (ii) einen Schwanz mit einem Koppler und einem Target-Bindungsbereich, und bei dem der Target-Bindungsbereich an eine komplementäre Sequenz in einem Erweiterungsprodukt des Primers, die der Target-Nukleinsäure entspricht, hybridisiert, welcher Primer weiterhin zumindest eine Komponente eines integralen Signalisierungssystems aufweist, um die Hybridisierung des Target-Bindungsbereichs an eine komplementäre Sequenz in einem Primerverlängerungsprodukt des Primers anzuzeigen.

12. Primer nach Anspruch 10 oder Anspruch 11, bei dem der Template-Bindungsbereich und der Schwanzbereich so angeordnet sind, dass der Schwanzbereich während der Amplifizierung unkopiert bleibt.

13. Primer nach einem der Ansprüche 10 bis 12, bei dem der Koppler eine Blockierungseinheit enthält, die ein polymerase-vermitteltes Kopieren des Primerschwanzes verhindert.

14. Primer nach einem der Ansprüche 10 bis 13, bei dem Primerschwanz einen interkalierenden Farbstoff trägt.

15. Primer nach einem der Ansprüche 10 bis 13, bei dem der Primerschwanz ein Fluorophor für die Erfassung der Targetbindung durch Fluoreszenzpolarisation aufweist.

16. Diagnostischer Primer nach einem der Ansprüche 10 bis 13, der weiterhin eine separate Spezies hat, die zumindest eine Komponente eines integralen Signalisierungssystems aufweist, die lösbar an den Primerschwanz angefügt ist.

17. Primer nach Anspruch 16, bei dem das Signalisierungssystem eine Energieübertragung zwischen Fluorophor und Quencher-Spezies aufweist.

18. Primer nach einem der Ansprüche 10 bis 13, bei dem der Primerschwanz als eine Quencher-Spezies wirkt.

19. Primer nach Anspruch 13, bei dem der Primerschwanz einen oder mehrere Bereiche interner Hybridisierung enthält, um eine oder mehrere Komponente(n) des Signalisierungssystems in einer gegebenen Position zu stabilisieren.

20. Primer nach Anspruch 19, bei dem der Primerschwanz ein selbstkomplementäres Stammduplex mit einem Fluorophor, das durch eine Quencher-Spezies gelöscht ist, aufweist, und bei dem das Fluorophor nichtgelöscht wird, wenn das Stammduplex unterbrochen wird.

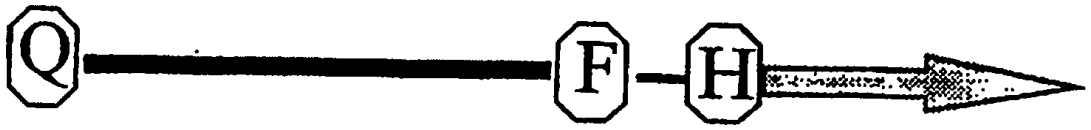
21. Primer nach einem der Ansprüche 10 bis 20, der weiterhin einen Fangbereich aufweist, der an eine komplementäre Sequenz auf einer Festphase hybridisiert.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem mehr als ein Nukleinsäure-Primer für die Erfassung von mehr einer Target-Nukleinsäuresequenz verwendet wird.

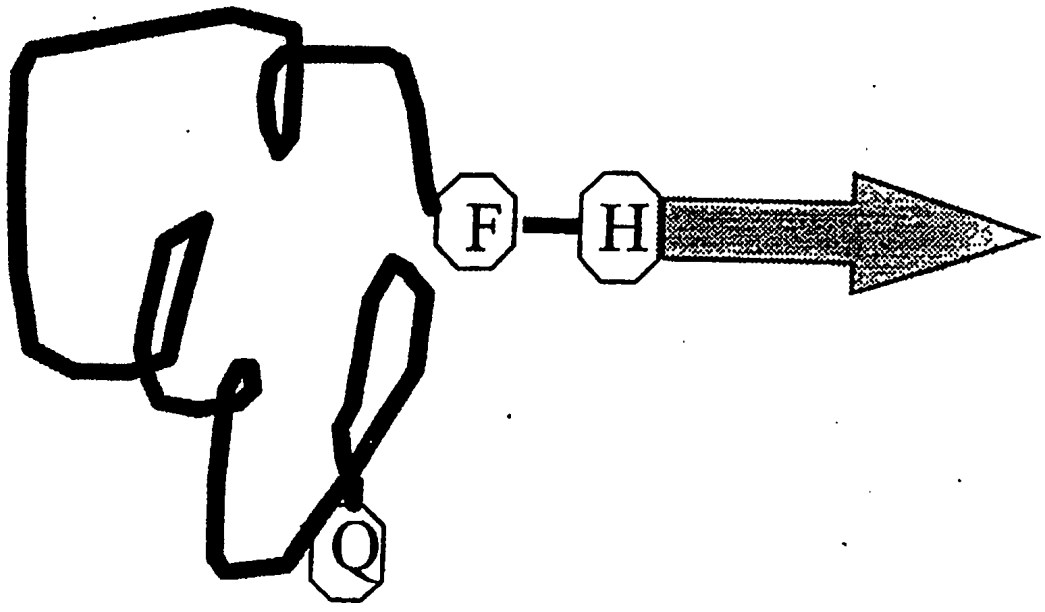
Es folgen 42 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

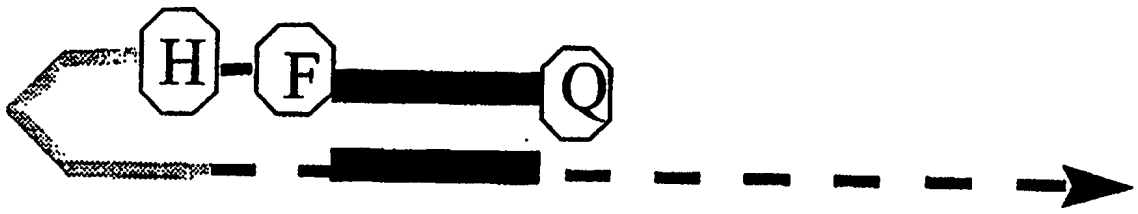
Figur 1



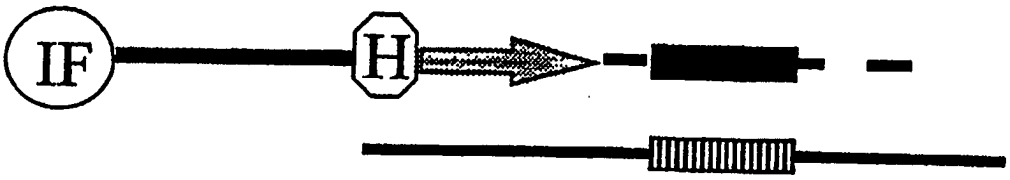
Figur 2



Figur 3



Figur 4



a.

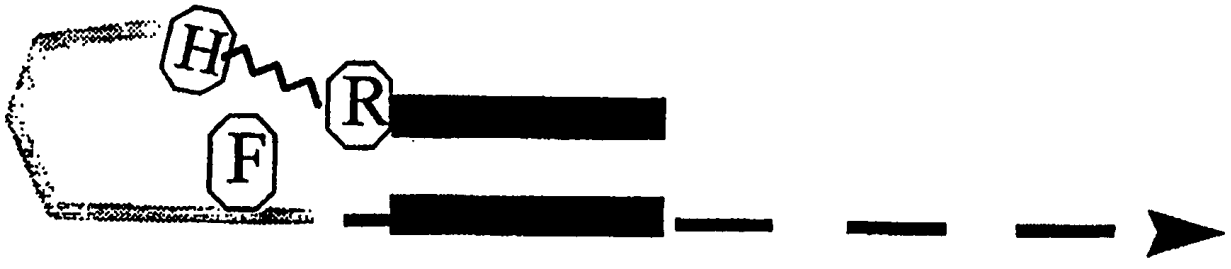
b.



Figur 5

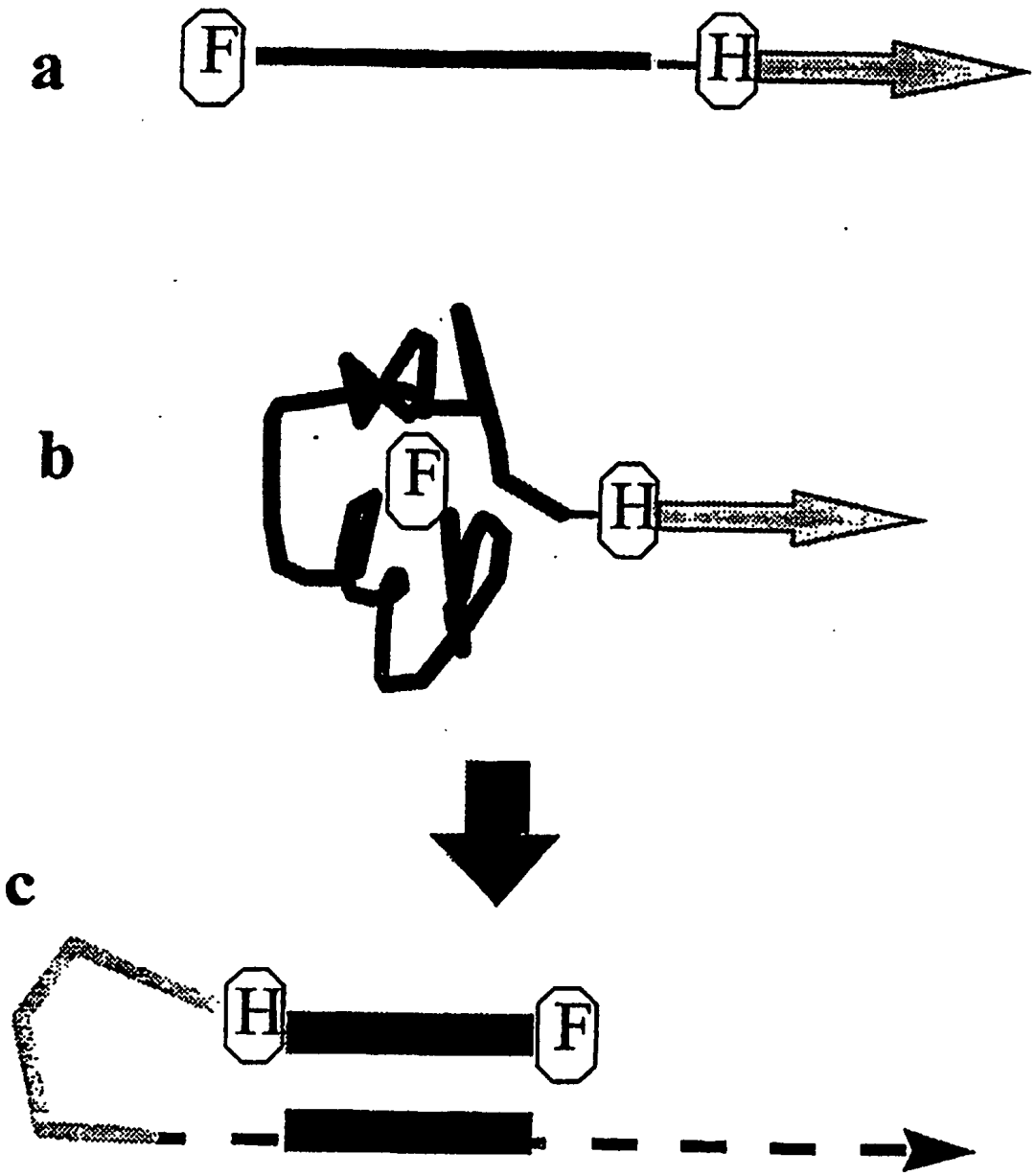


a.

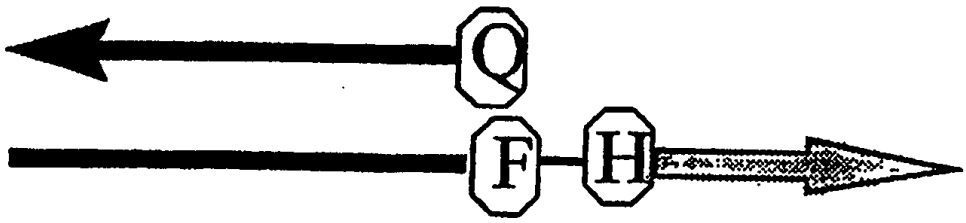


b.

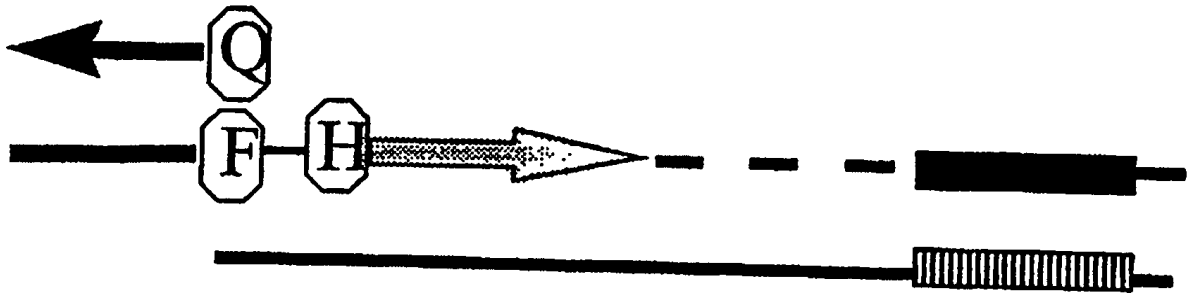
Figur 6



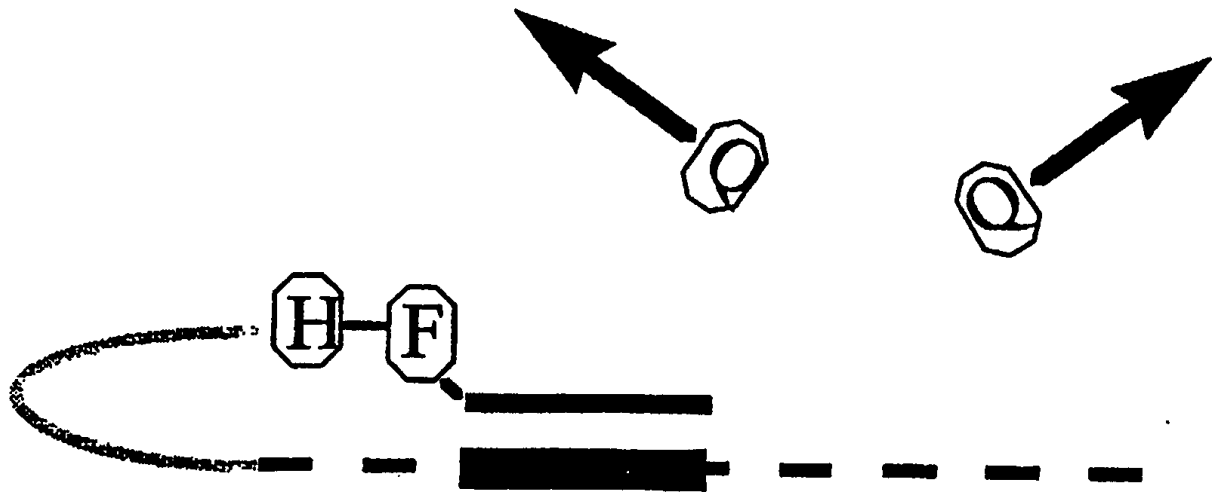
Figur 7a



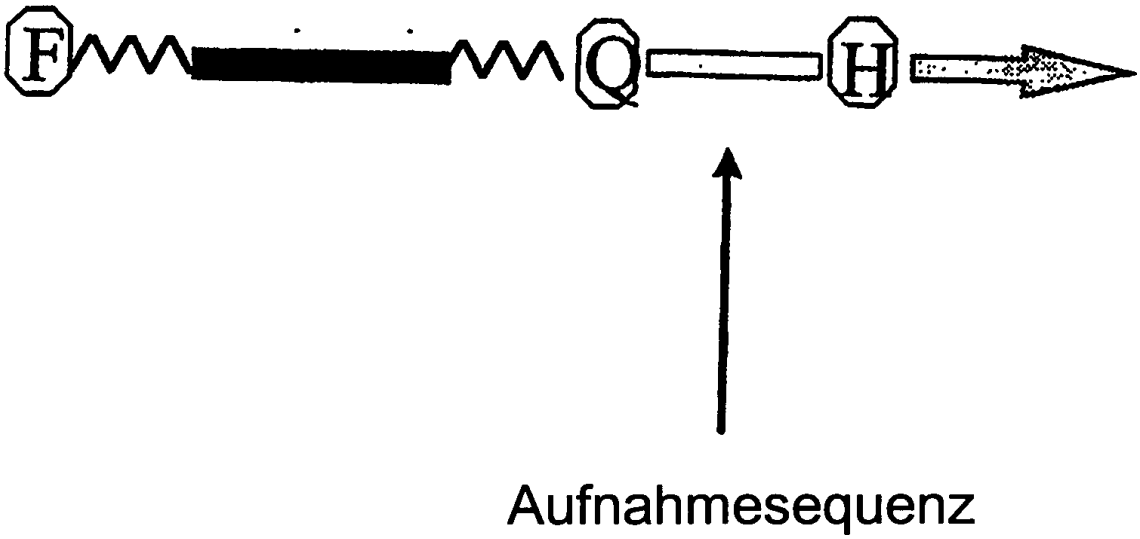
Figur 7b



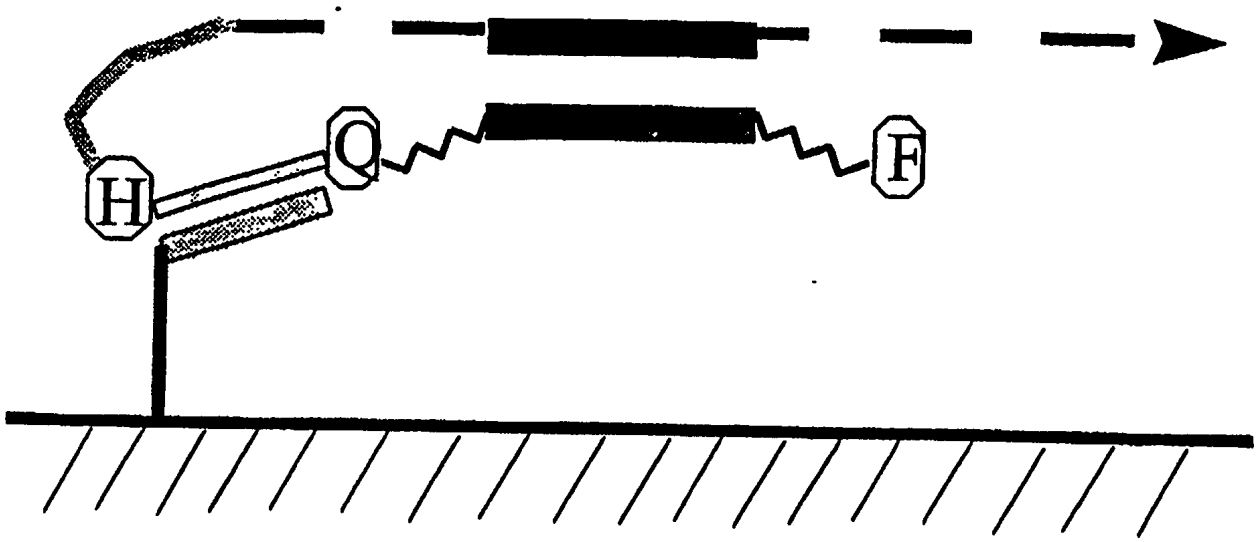
Figur 7c



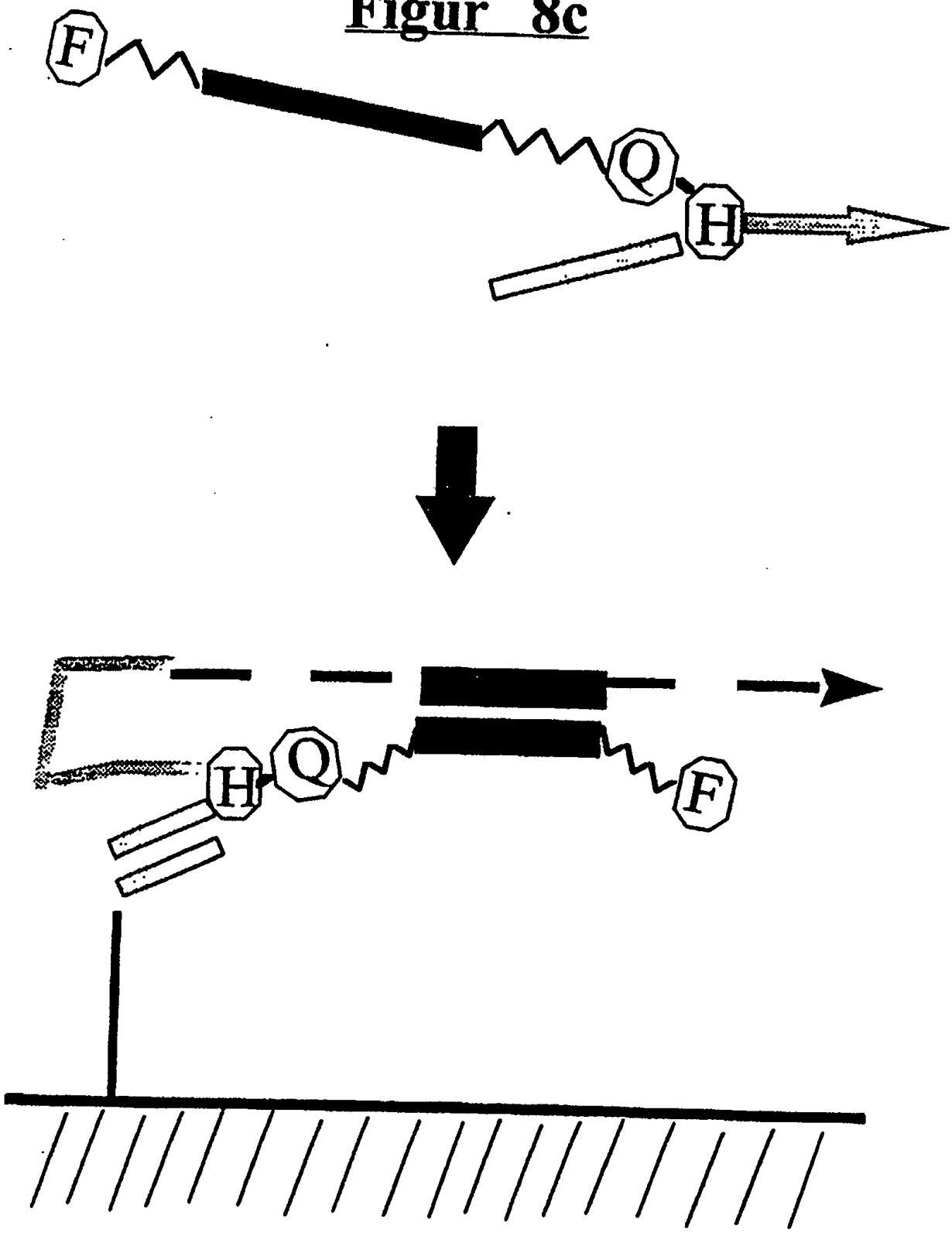
Figur 8a



Figur 8b



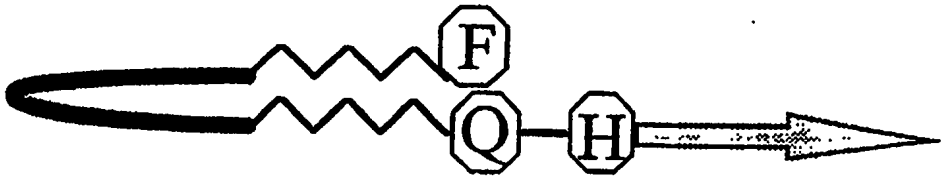
Figur 8c



Figur 9

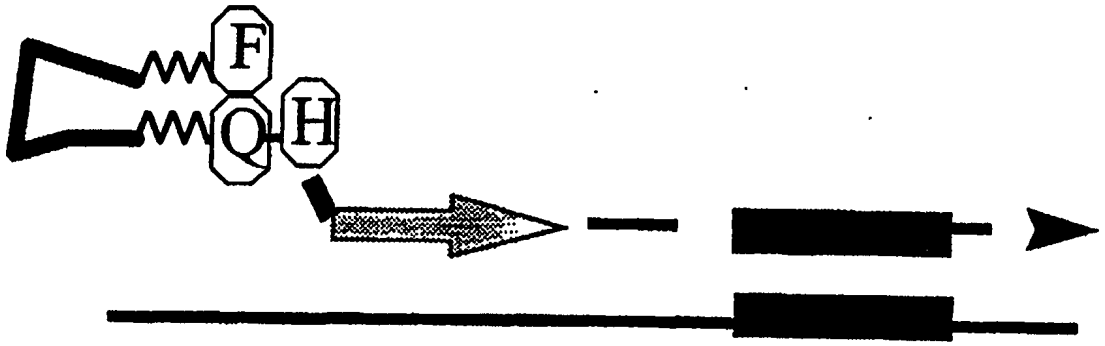


a.

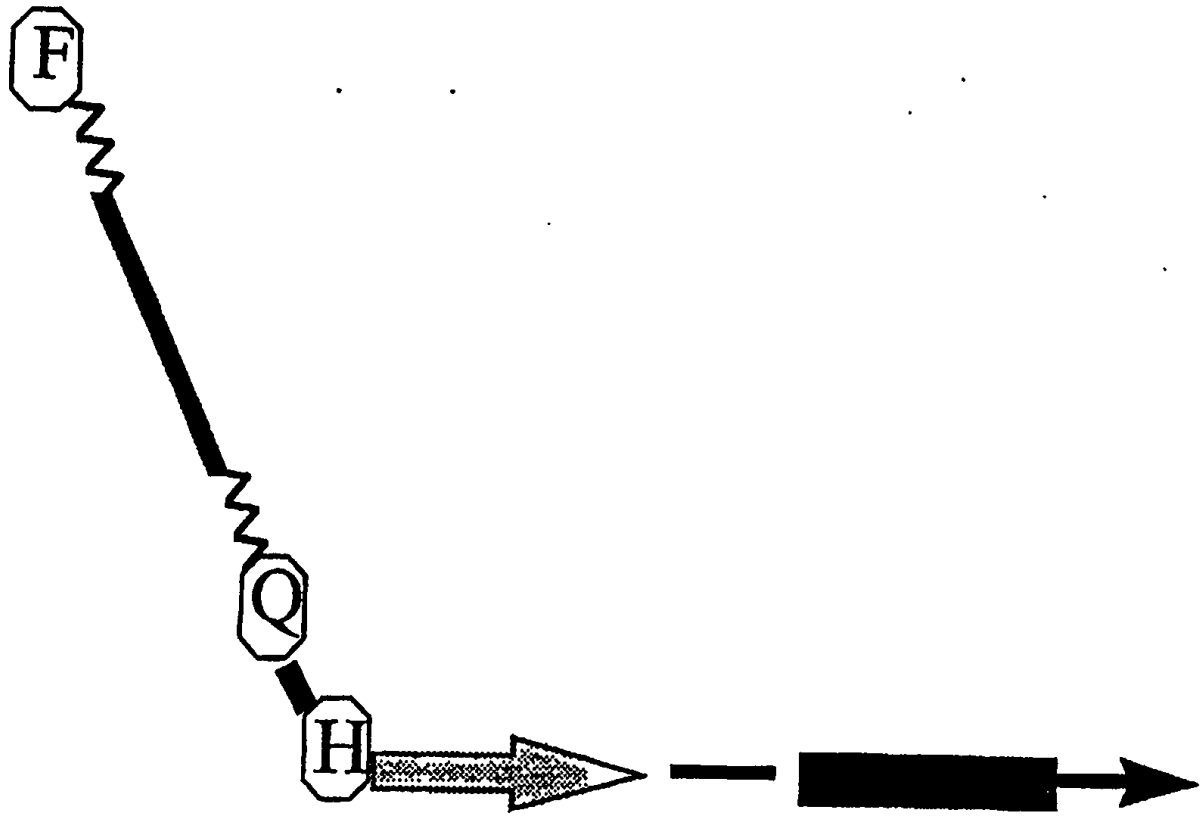


b.

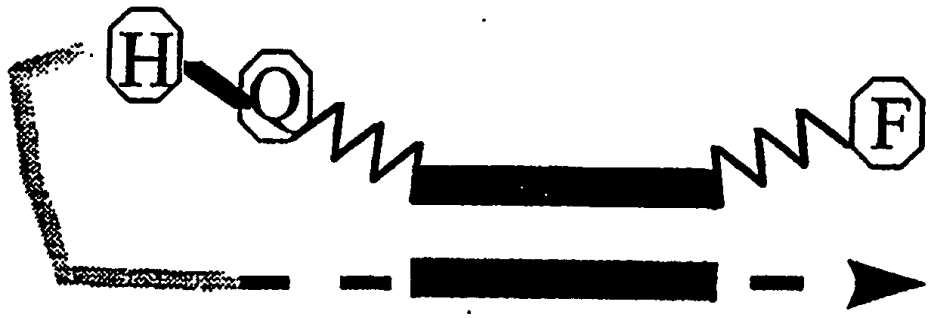
Figur 10a



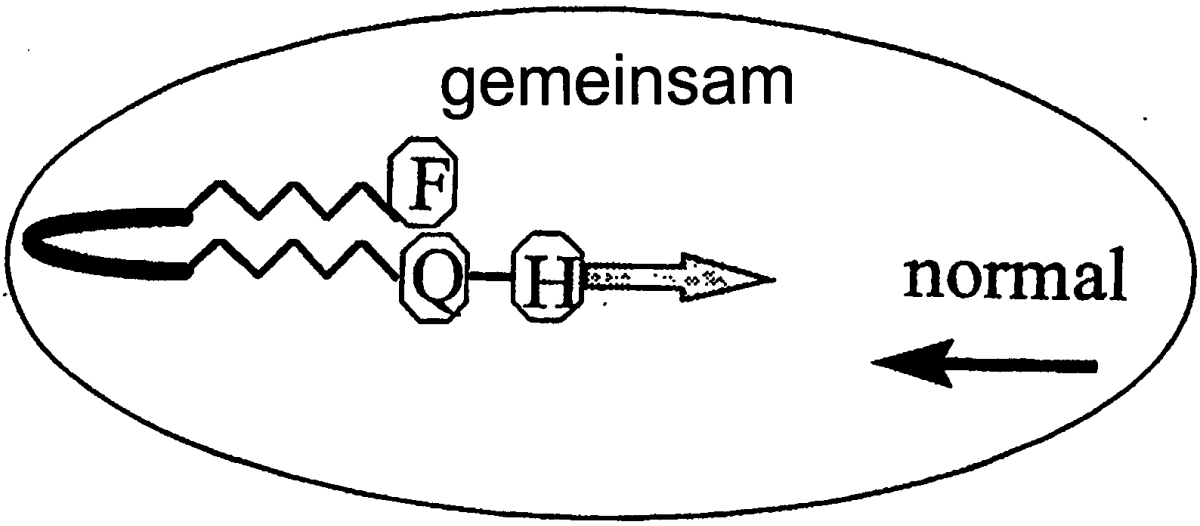
Figur 10b



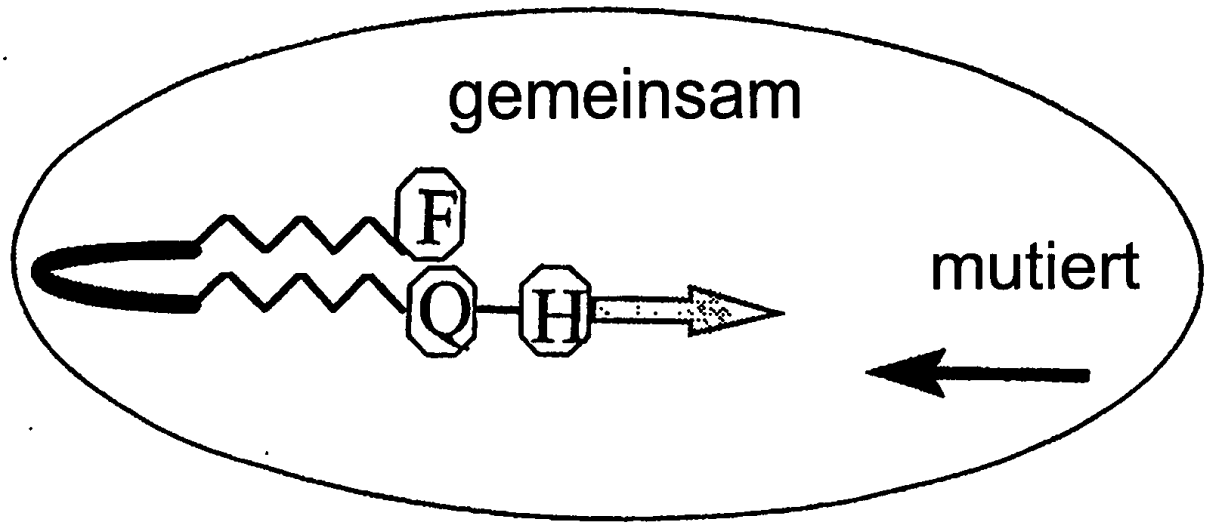
Figur 10c



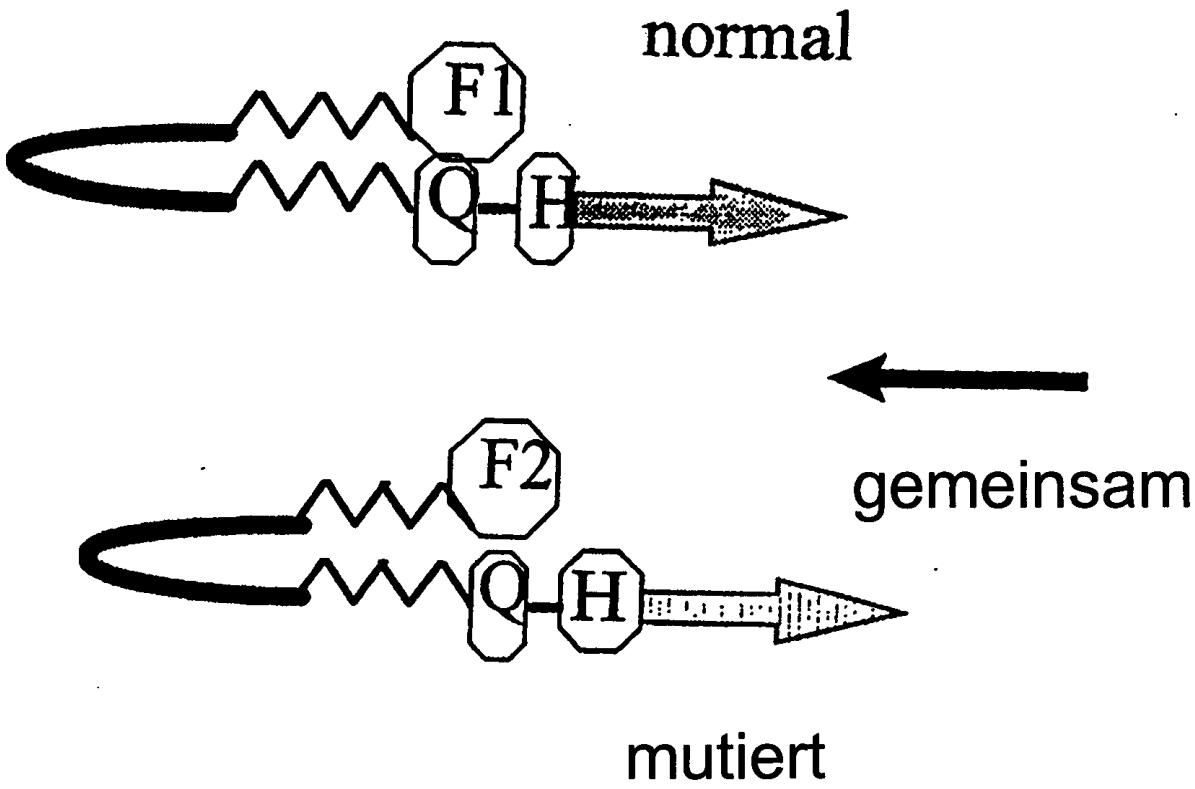
Figur 11a



Zweirohr-Prüfung

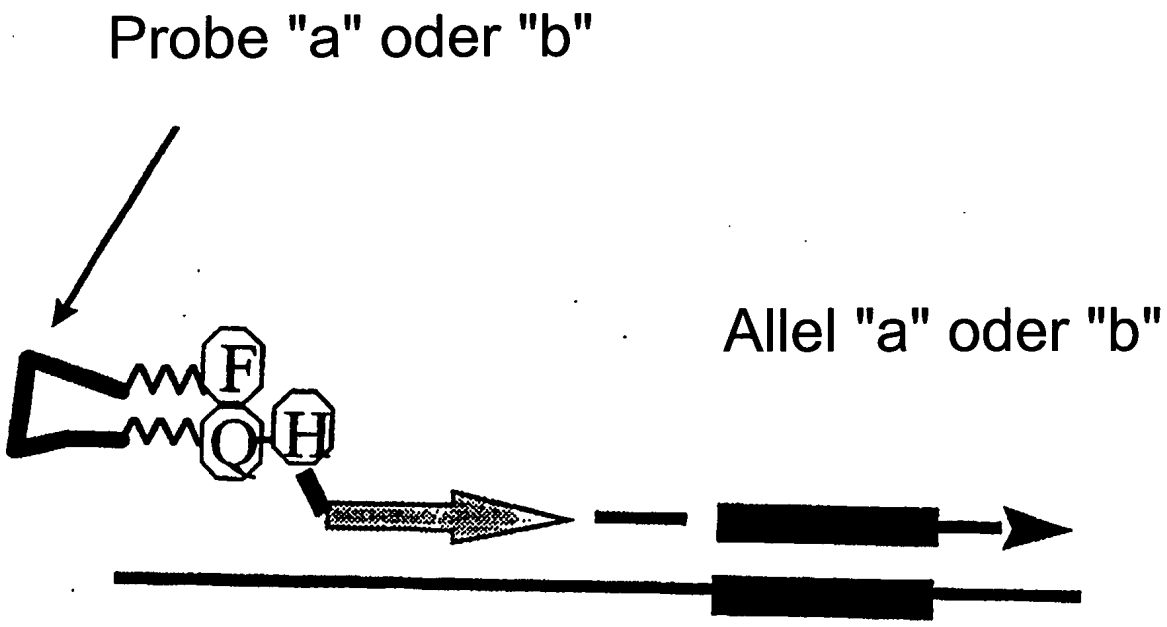


Figur 11b



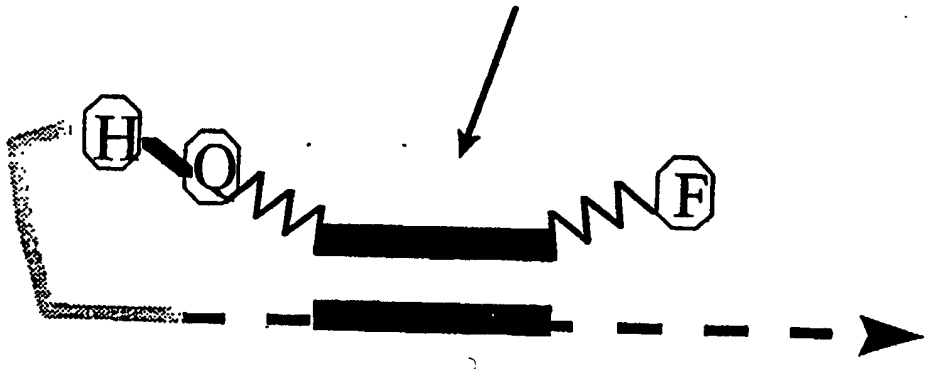
Einrohr-Prüfung

Figur 12a

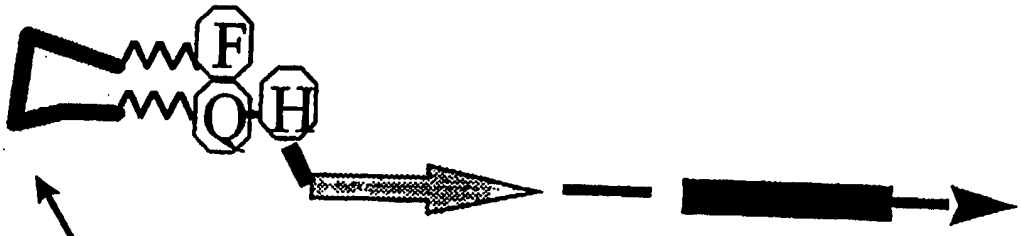


Figur 12b

Probe stimmt mit Target überein,
Flurorophor nicht gequencht

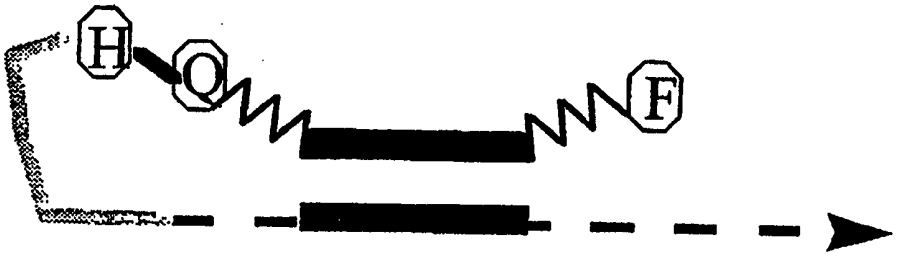


ODER

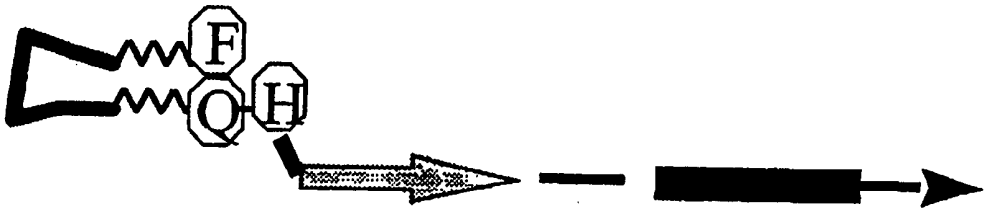


Probe und Target stimmen nicht überein,
intern gequenchte Strukturformen

Figur 12c

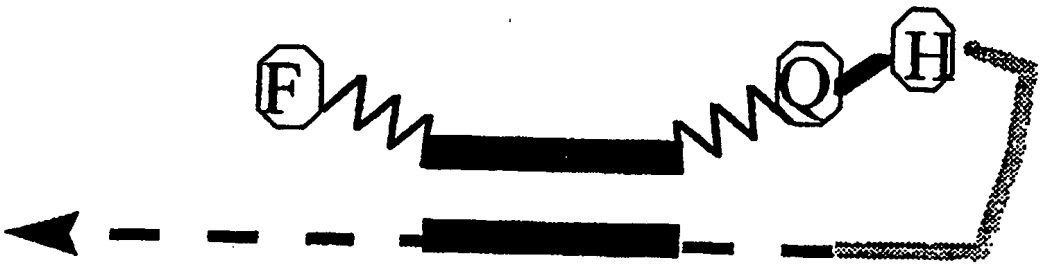


ODER

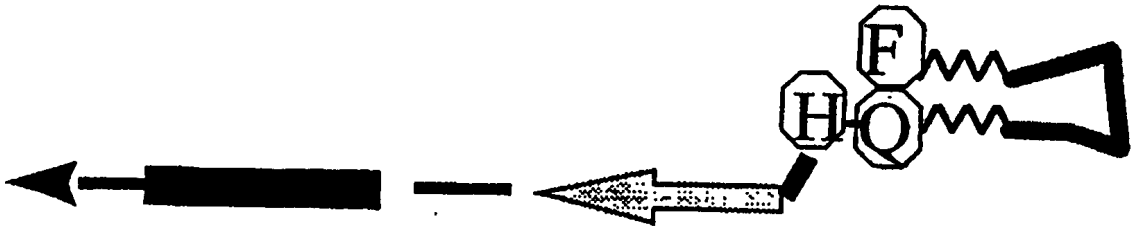


Für Allel "a" auf dem Vorwärtsstrang

Figur 12d



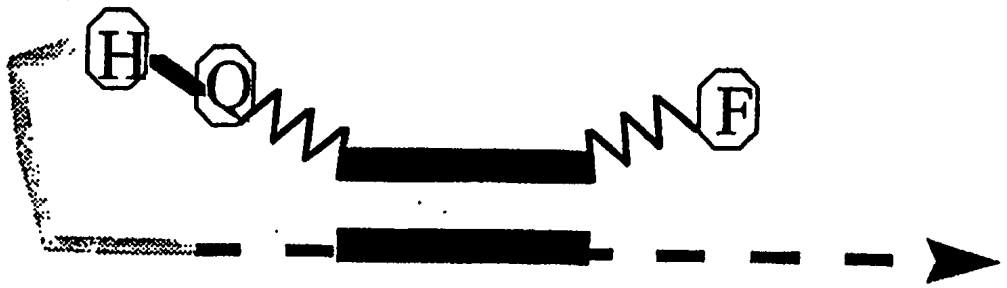
ODER



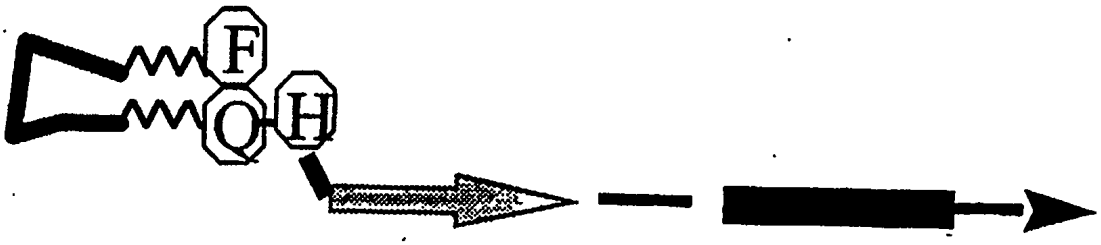
Für Allel "a" auf dem Rückwärtsstrang

Figur 12e

Allele Unterscheidung
auf dem oberen Strang

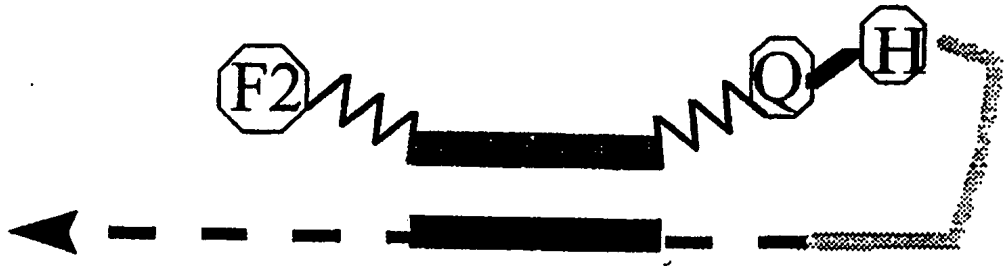


ODER

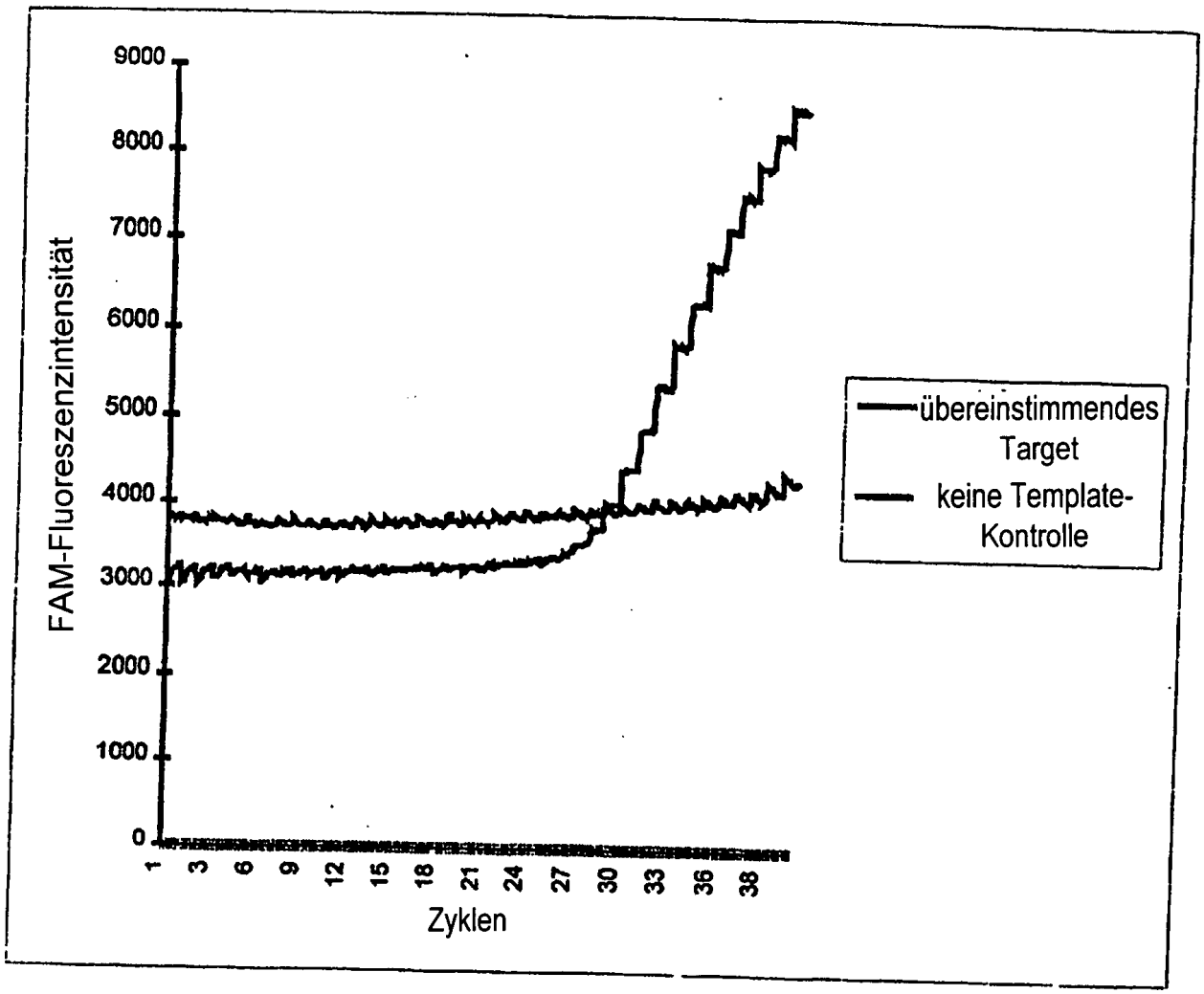


PLUS

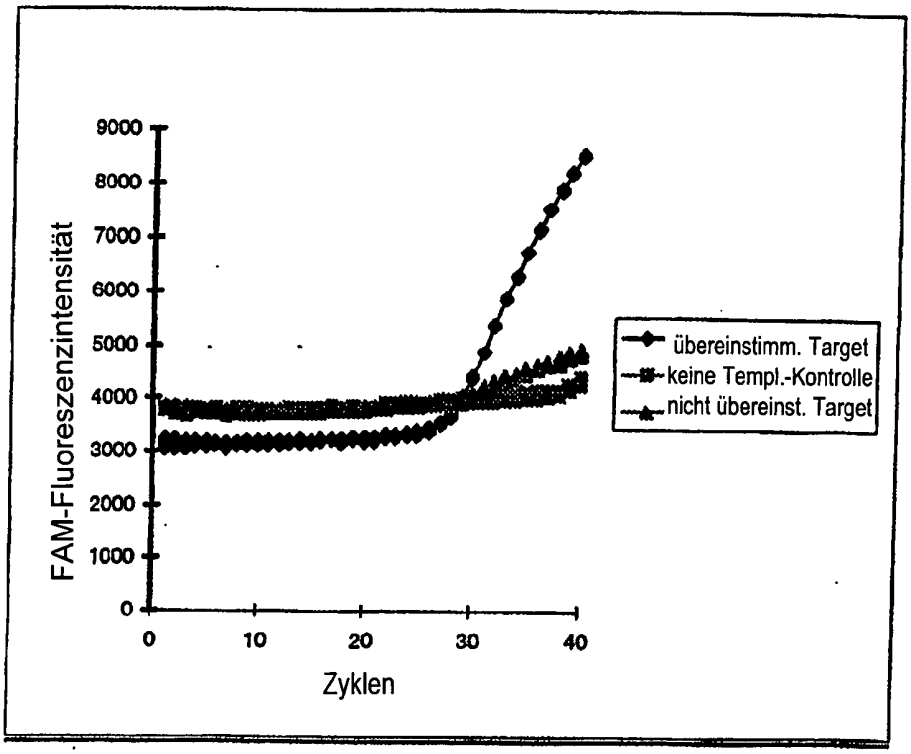
Amplicon-Kontrolle auf dem anderen Strang
unter Verwendung eines zweiten Fluorophors



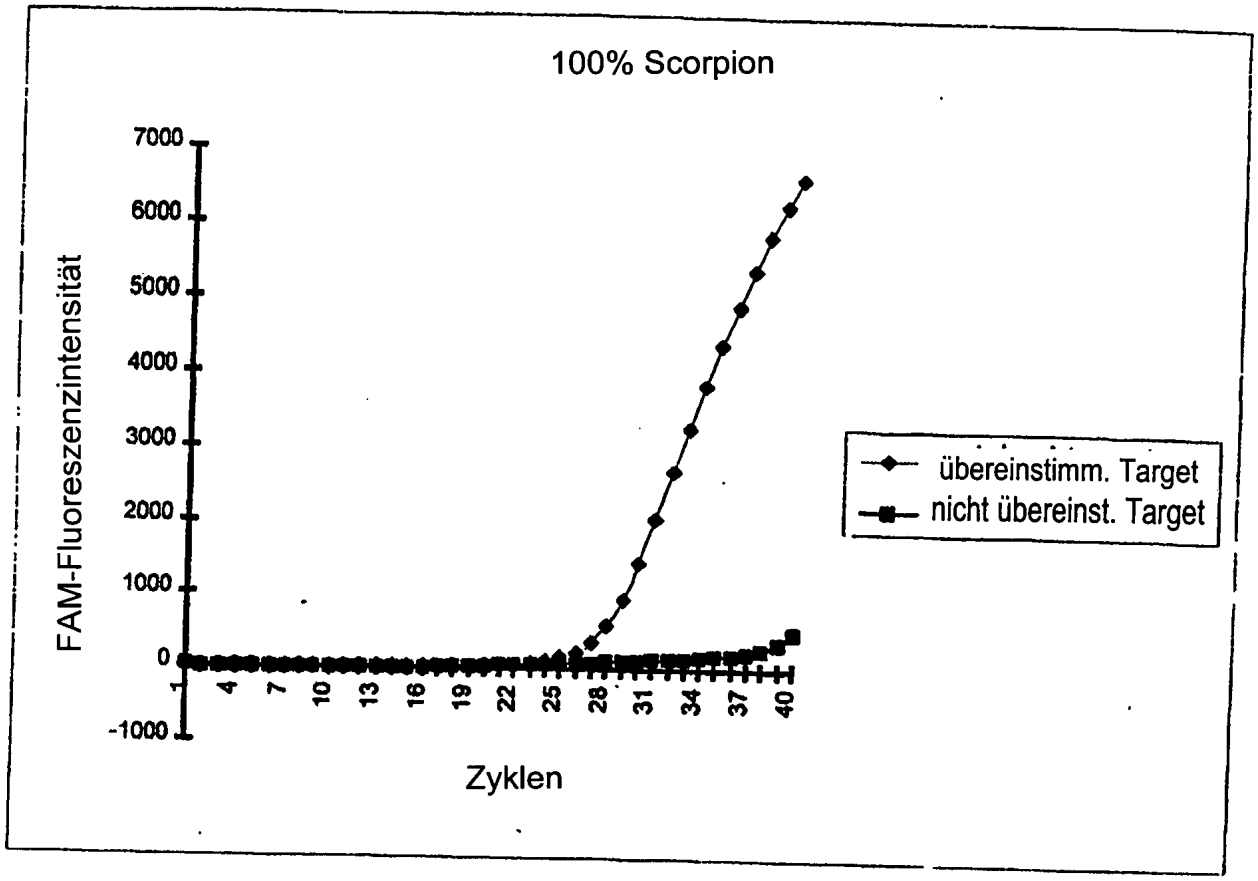
FIGUR 13


FAM-Fluoreszenzintensität
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
1
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
33
36
38
Zyklen
übereinstimmendes Target
keine Template-Kontrolle

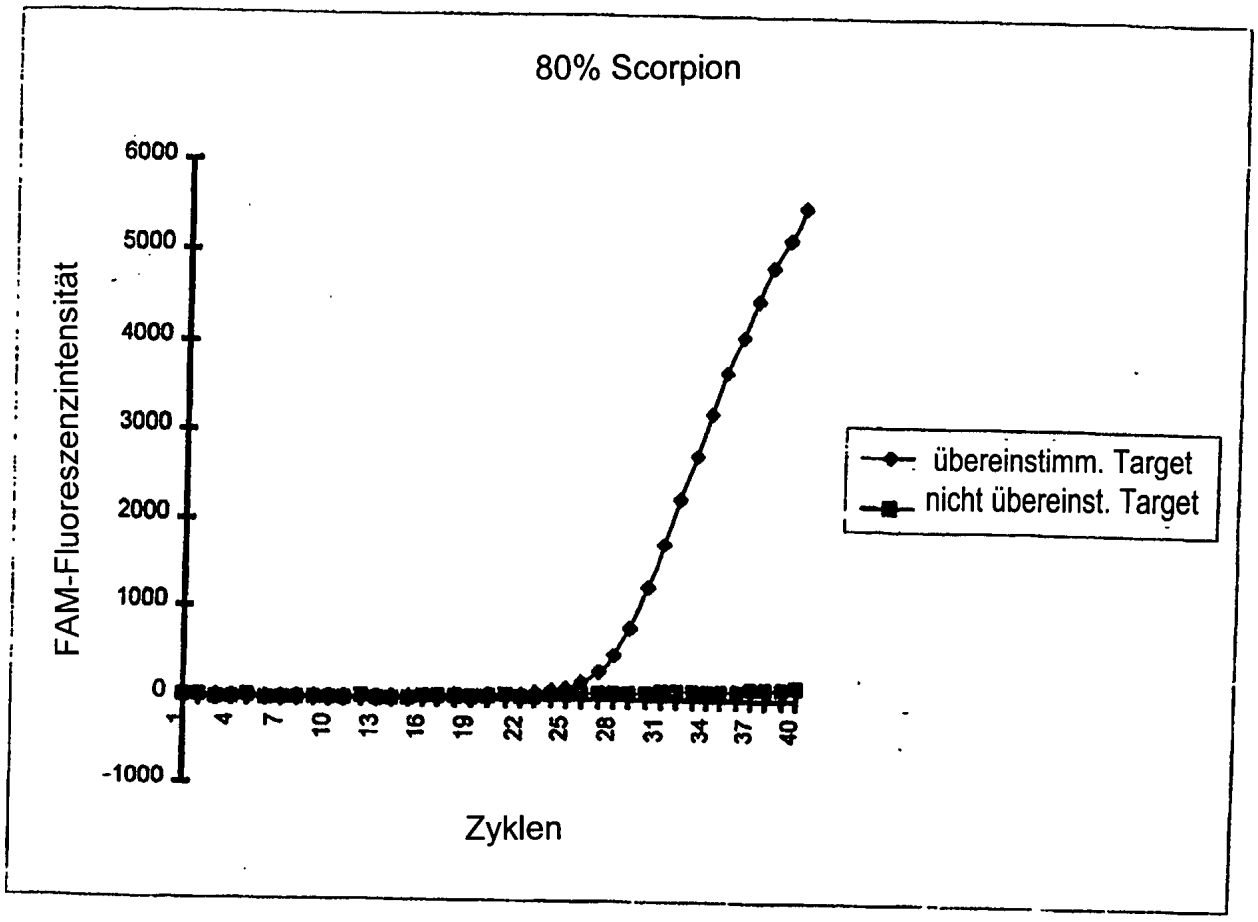
FIGUR 14


FAM-Fluoreszenzintensität
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
Zyklen
übereinstimm. Target
keine Templ.-Kontrolle
nicht übereinst. Target

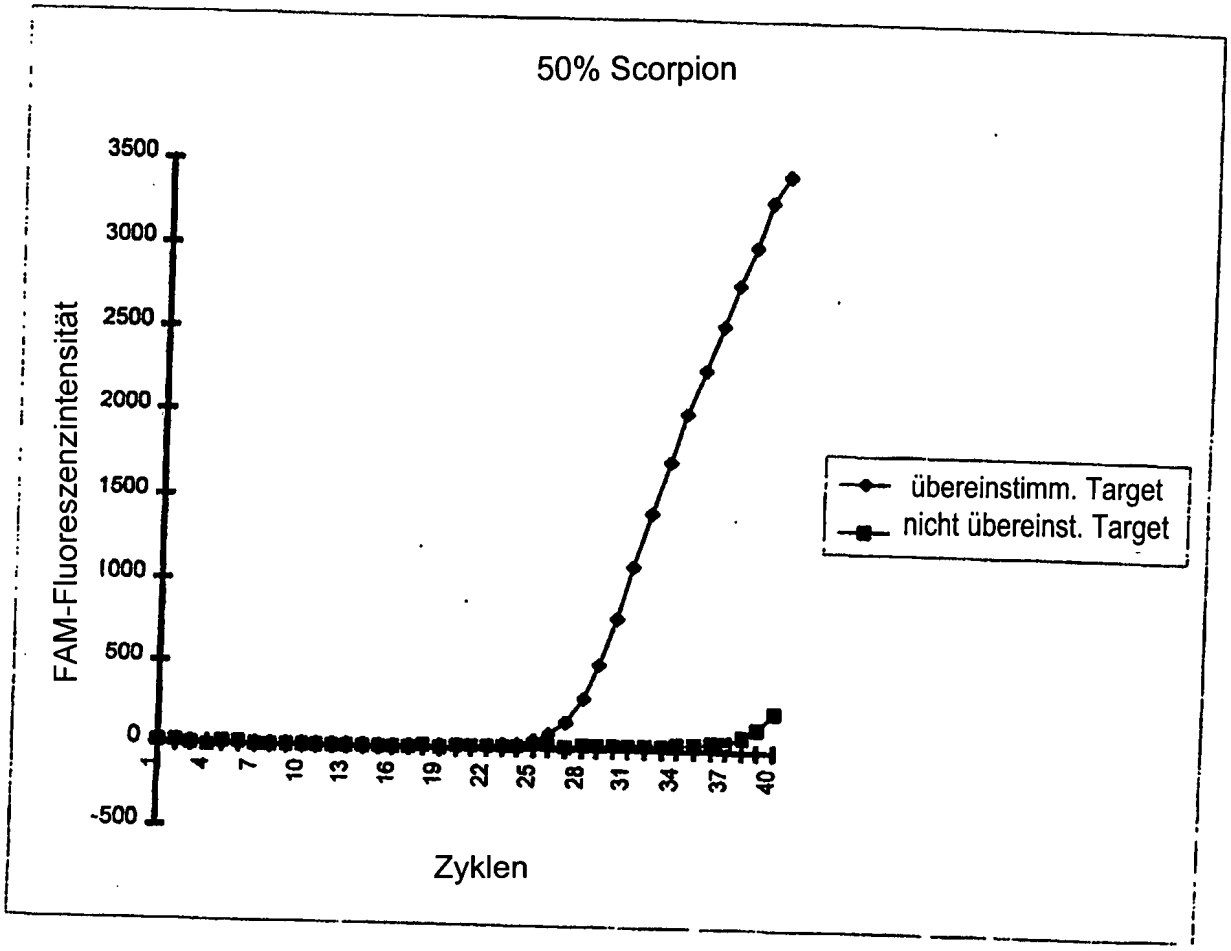
FIGUR 15a


100% Scorpion
FAM-Fluoreszenzintensität
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
1
4
7
10
13
16
19
22
25
28
31
34
37
40
Zyklen
übereinstimm. Target
nicht übereinst. Target

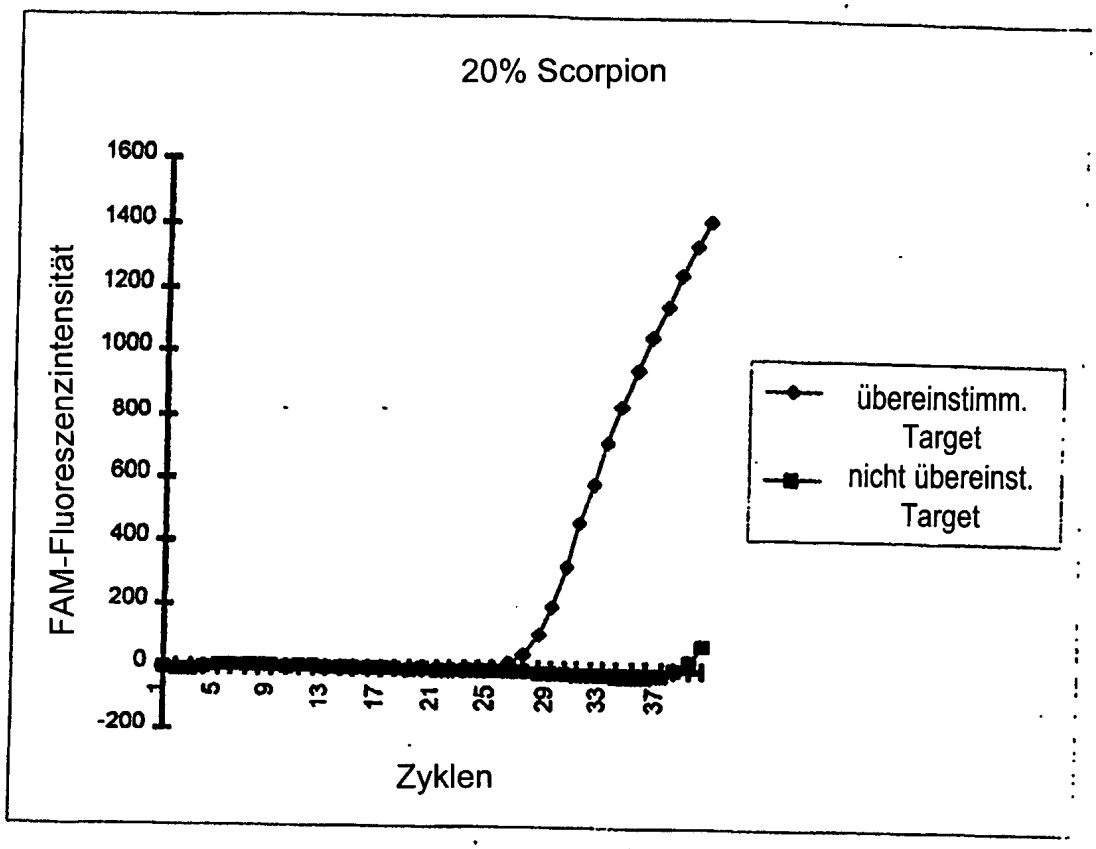
FIGUR 15b


80% Scorpion
FAM-Fluoreszenzintensität
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
1
4
7
10
13
16
19
22
25
28
31
34
37
40
Zyklen
übereinstimm. Target
nicht übereinst. Target

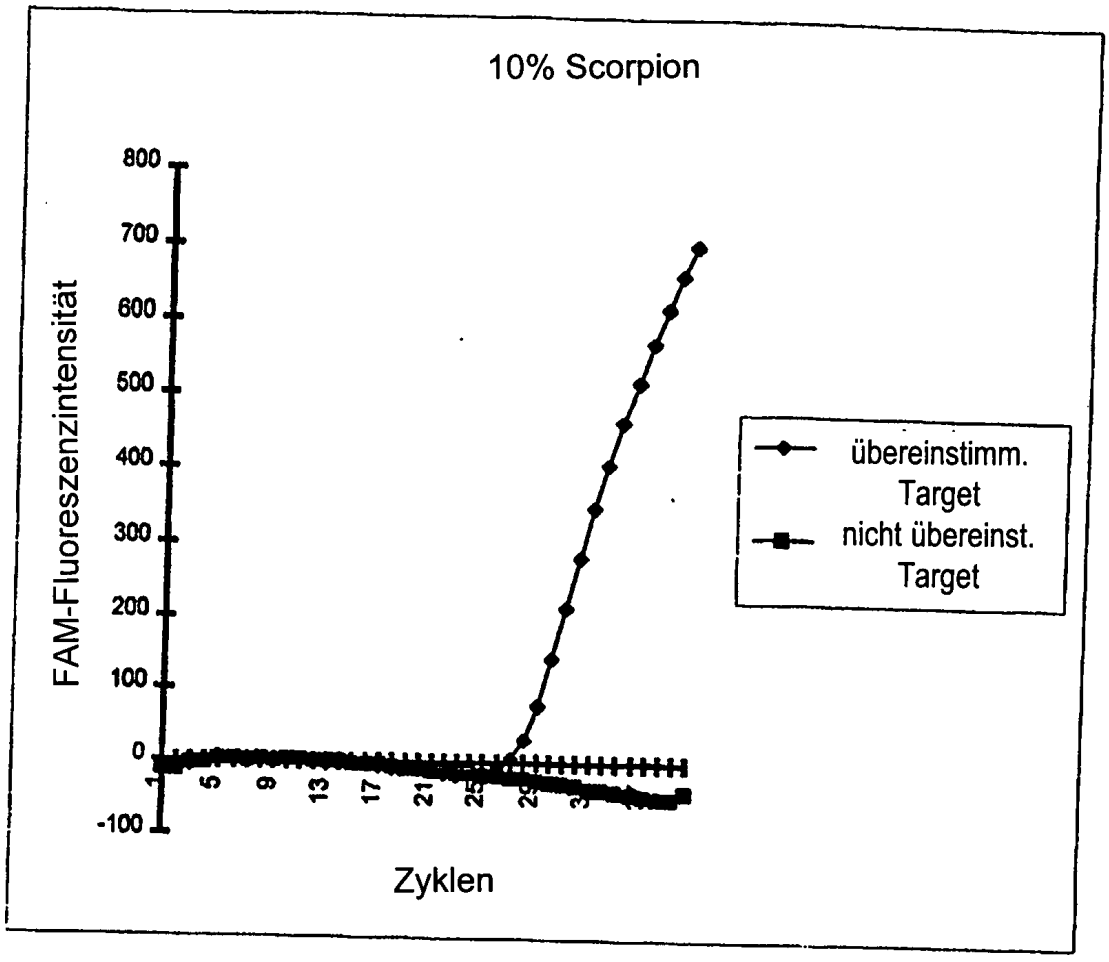
FIGUR 15c


50% Scorpion
FAM-Fluoreszenzintensität
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
1
4
7
10
13
16
19
22
25
28
31
34
37
40
Zyklen
übereinstimm. Target
nicht übereinst. Target

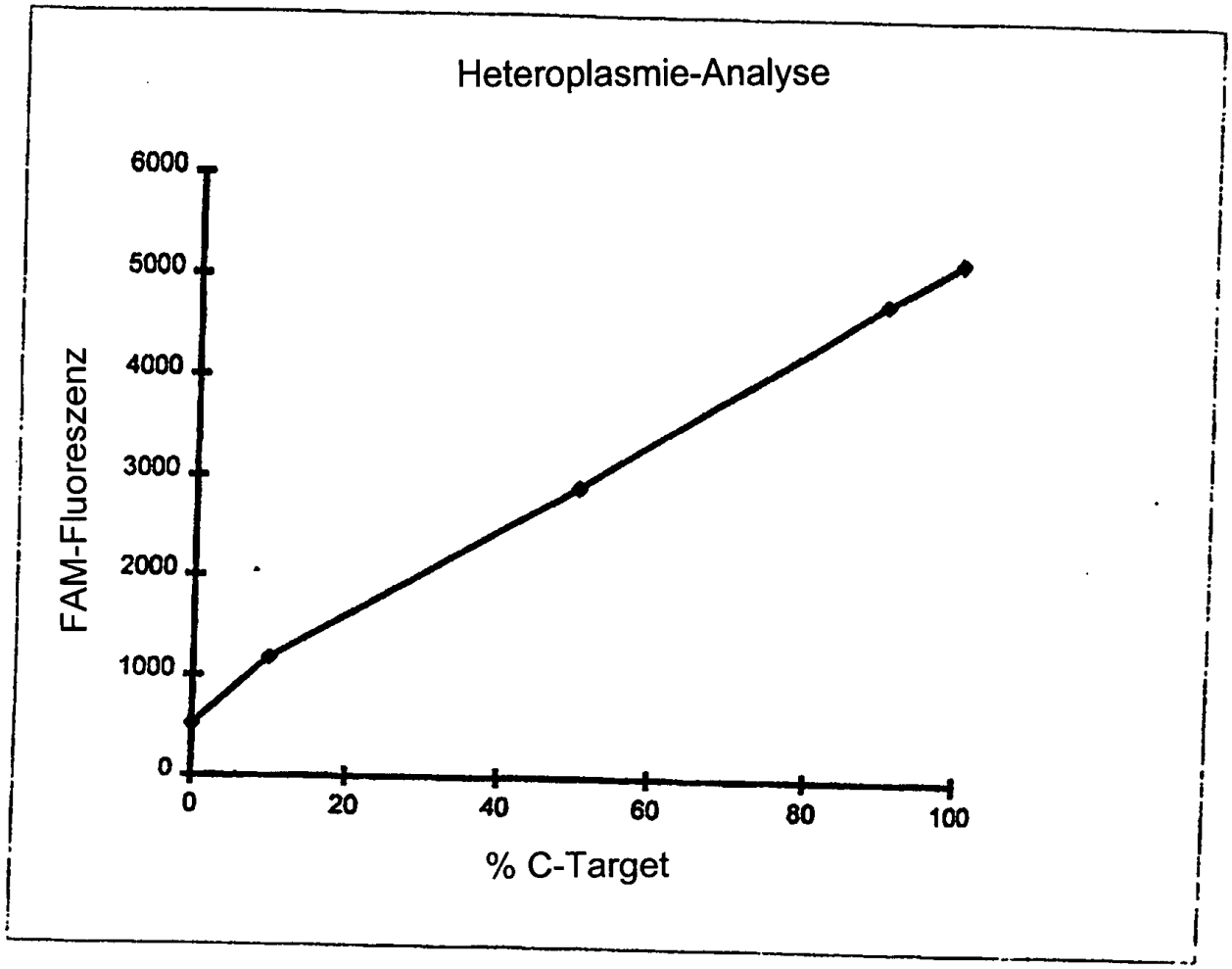
FIGUR 15d


20% Scorpion
FAM-Fluoreszenzintensität
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
Zyklen
übereinstimm. Target
nicht übereinst. Target

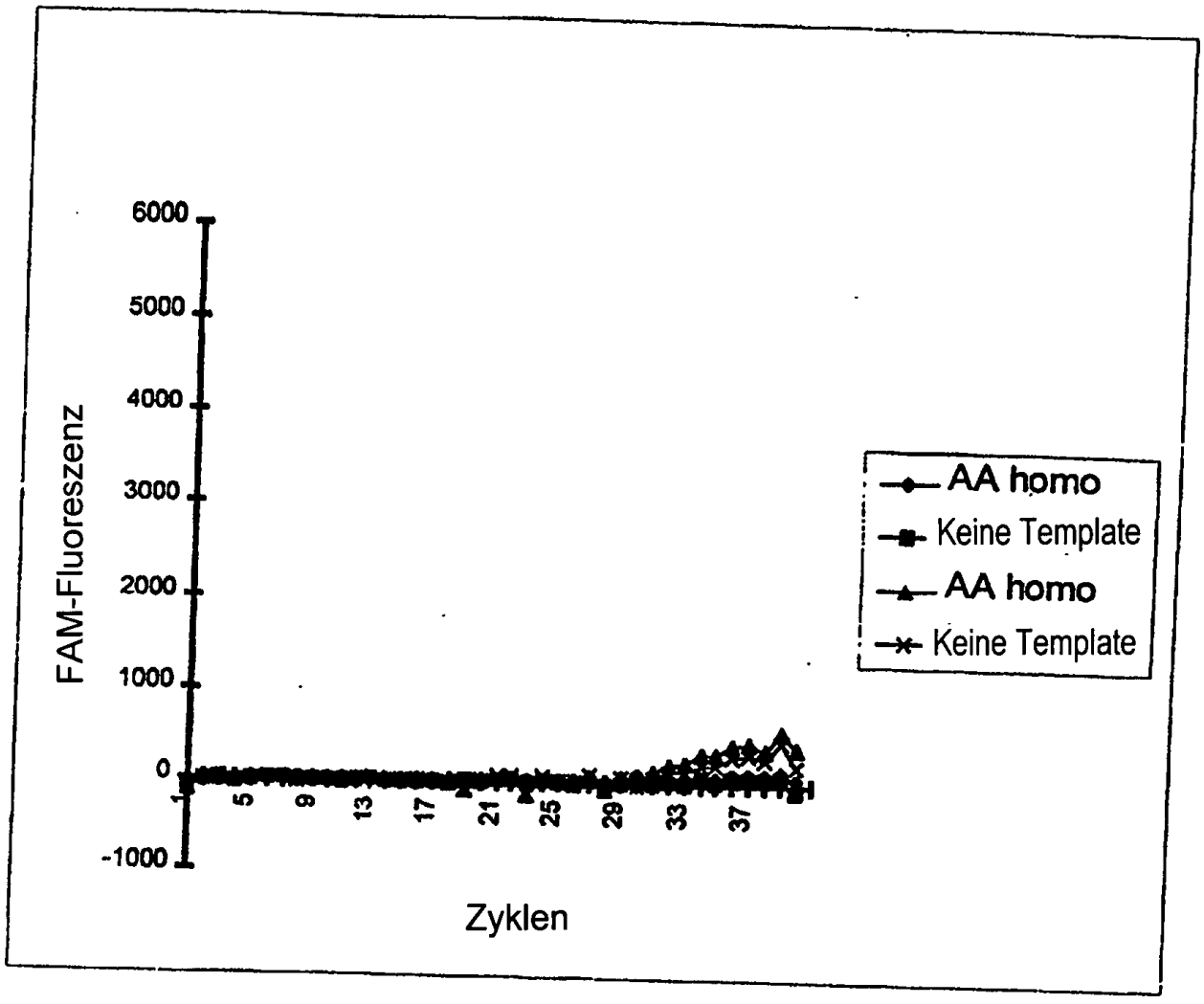
FIGUR 15e


10% Scorpion
FAM-Fluoreszenzintensität
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
1
5
9
13
17
21
25
29
Zyklen
übereinstimm. Target
nicht übereinst. Target

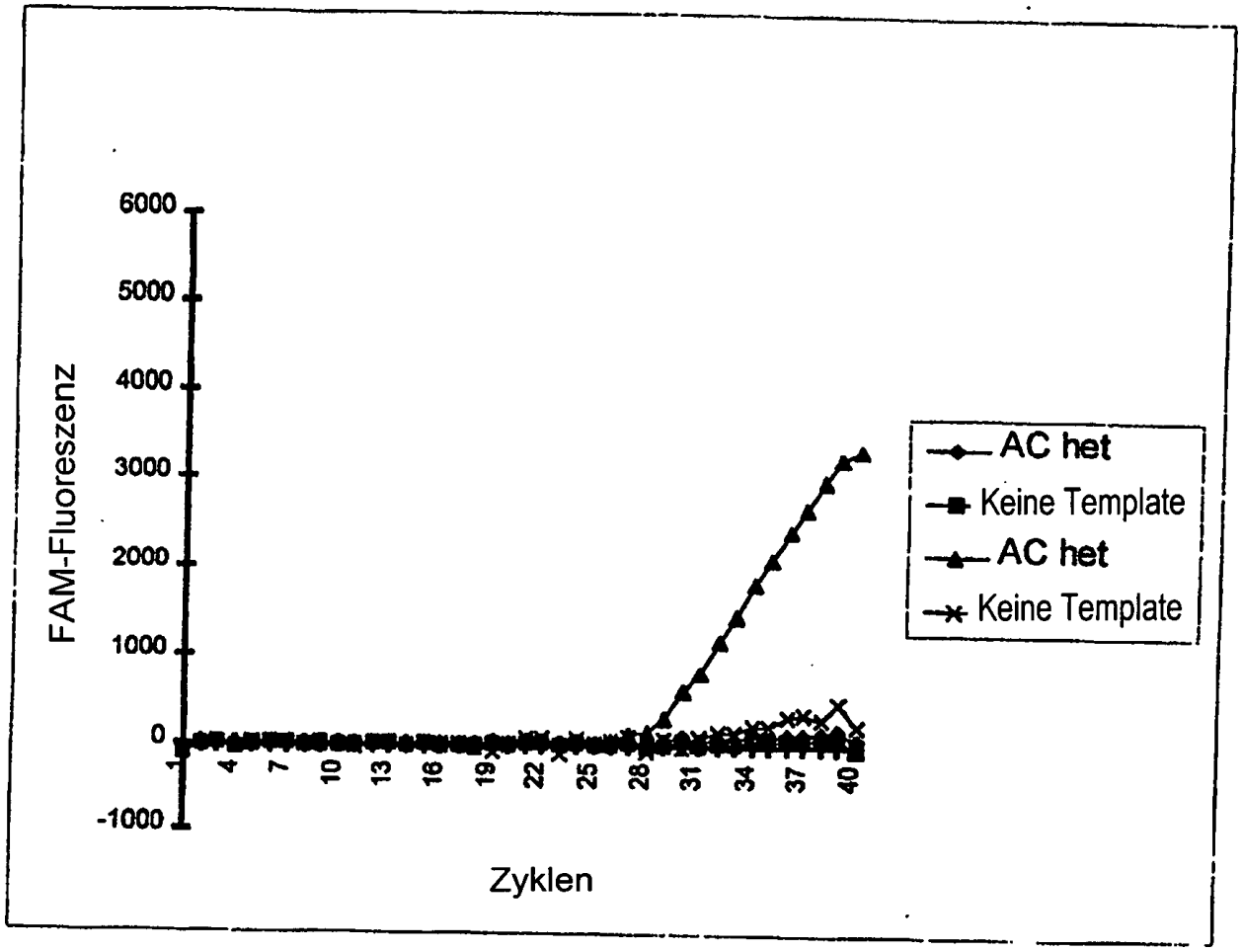
FIGUR 16


Heteroplasmie-Analyse
FAM-Fluoreszenz
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
% C-Target

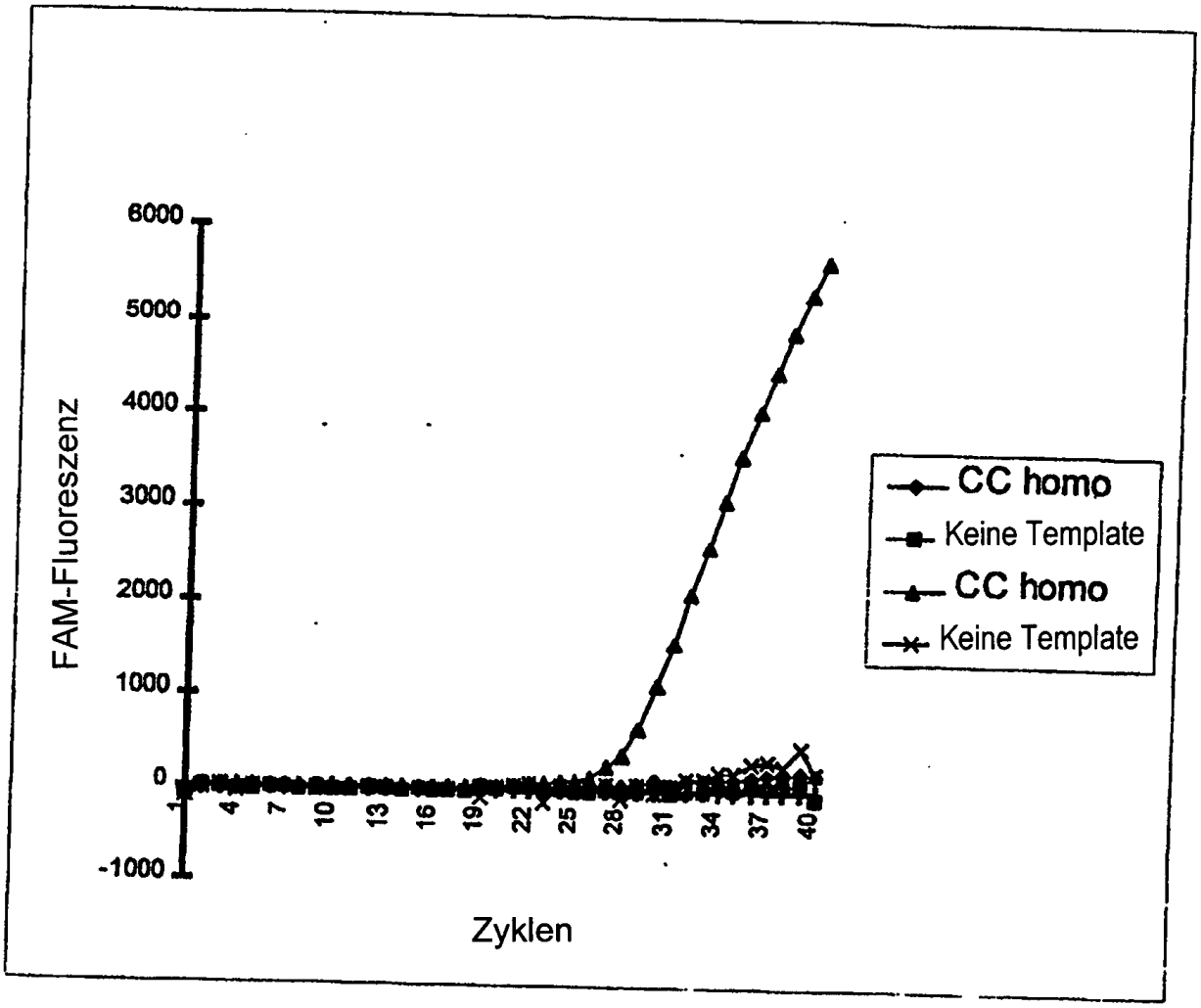
FIGUR 17a


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
FAM-Fluoreszenz
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
Zyklen
AA homo
Keine Template
AA homo
Keine Template

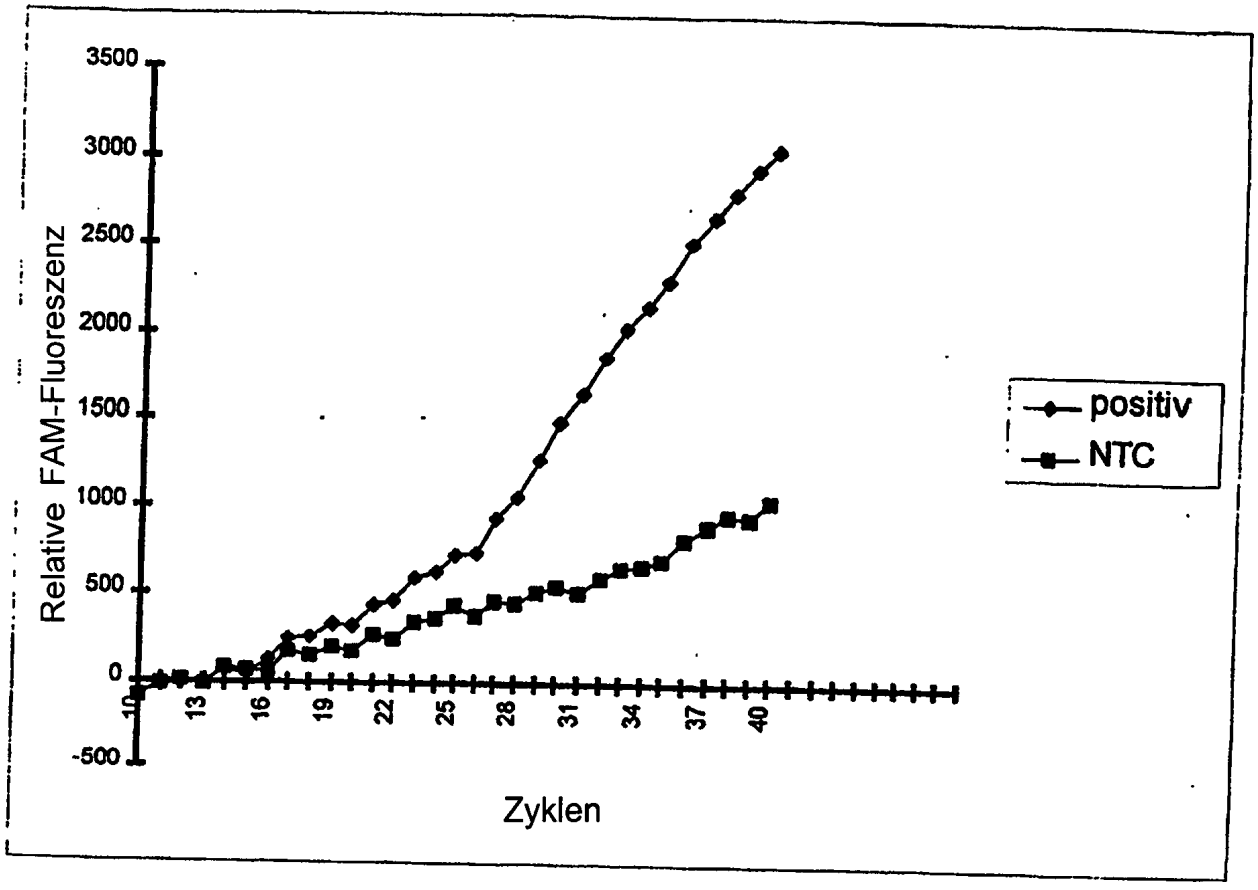
FIGUR 17b


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
FAM-Fluoreszenz
1
4
7
10
13
16
19
22
25
28
31
34
37
40
Zyklen
AC het
Keine Template
AC het
Keine Template

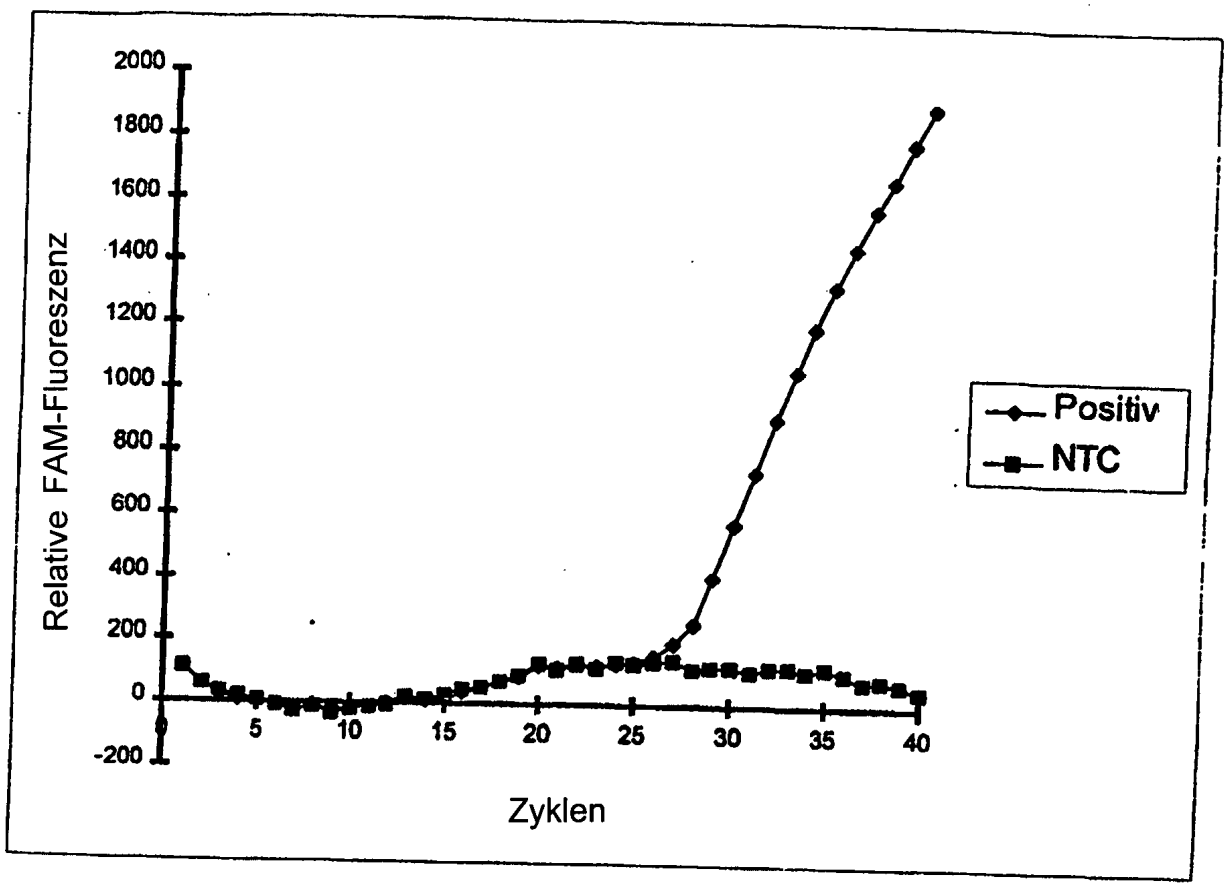
FIGUR 17c


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
FAM-Fluoreszenz
1
4
7
10
13
16
19
22
25
28
31
34
37
40
Zyklen
CC homo
Keine Template
CC homo
Keine Template

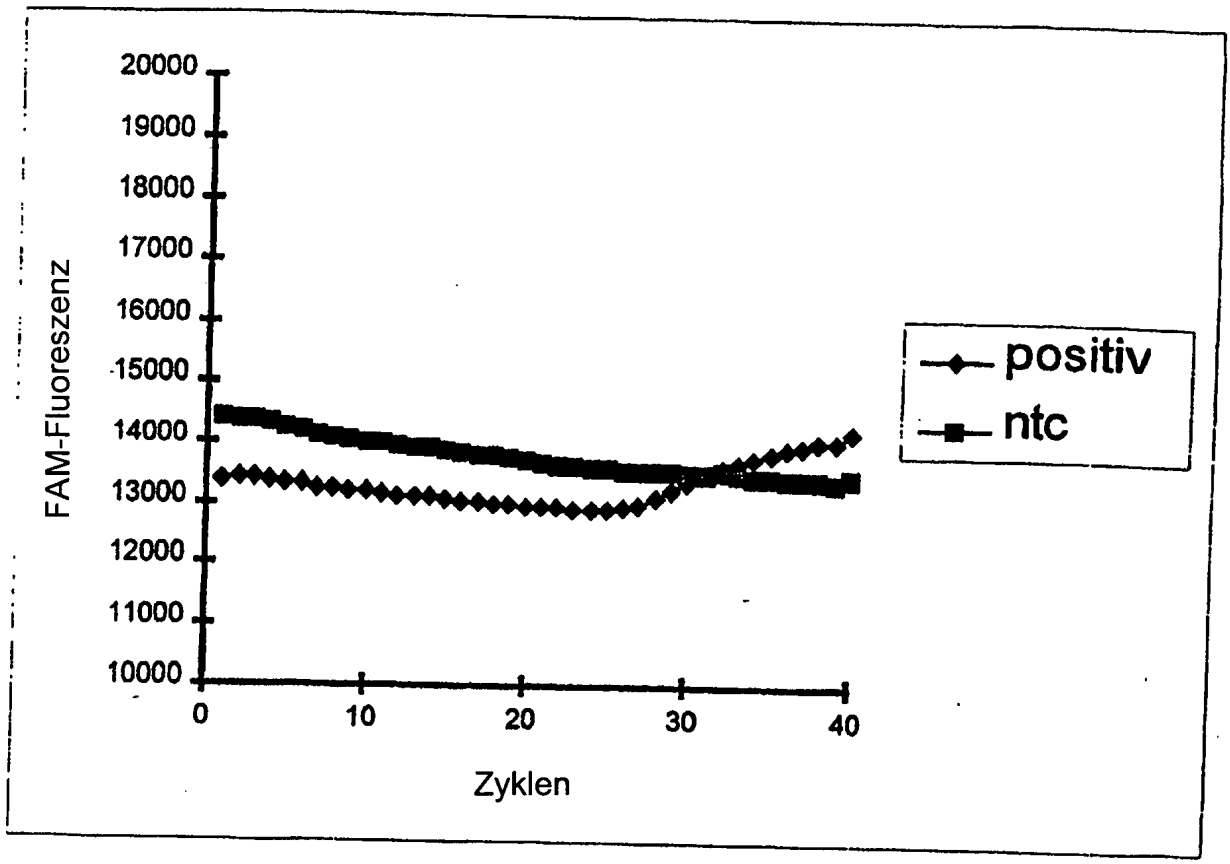
FIGUR 18


3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
Relative FAM-Fluoreszenz
10
13
16
19
22
25
28
31
34
37
40
Zyklen
positiv
NTC

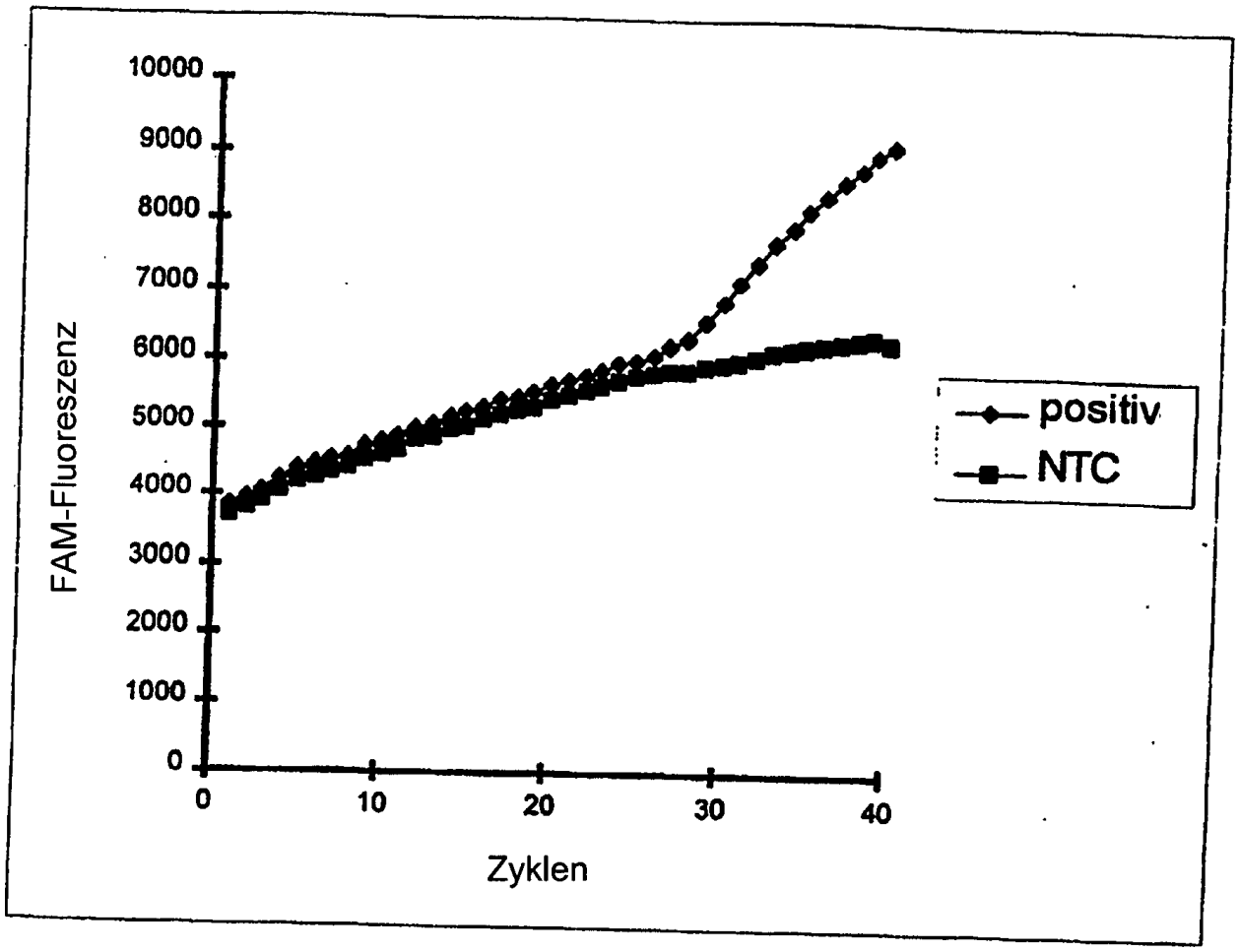
FIGUR 19


Relative FAM-Fluoreszenz
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Zyklen
Positiv
NTC

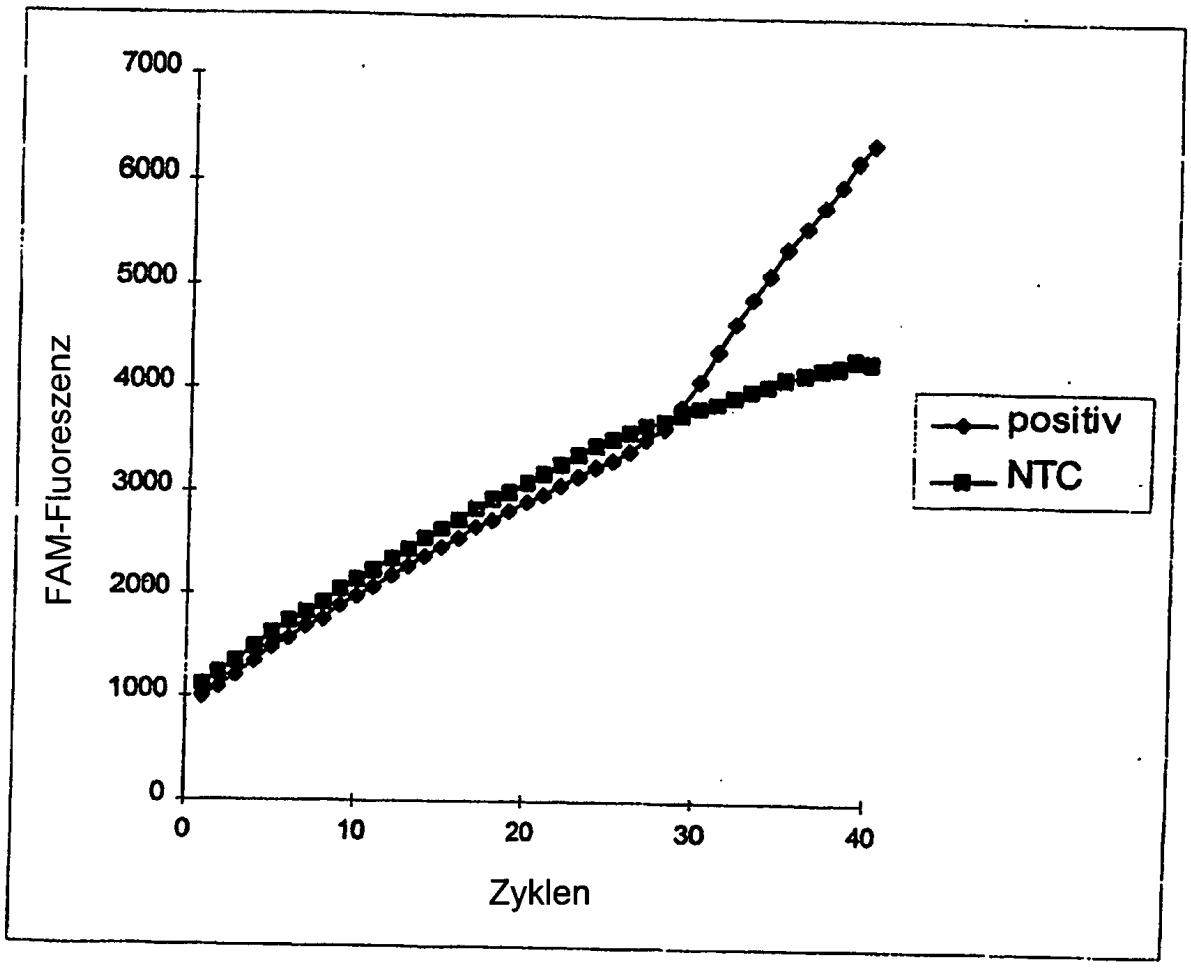
FIGUR 20a


20000
19000
18000
17000
16000
15000
14000
13000
12000
11000
10000
FAM-Fluoreszenz
0
10
20
30
40
Zyklen
positiv
ntc

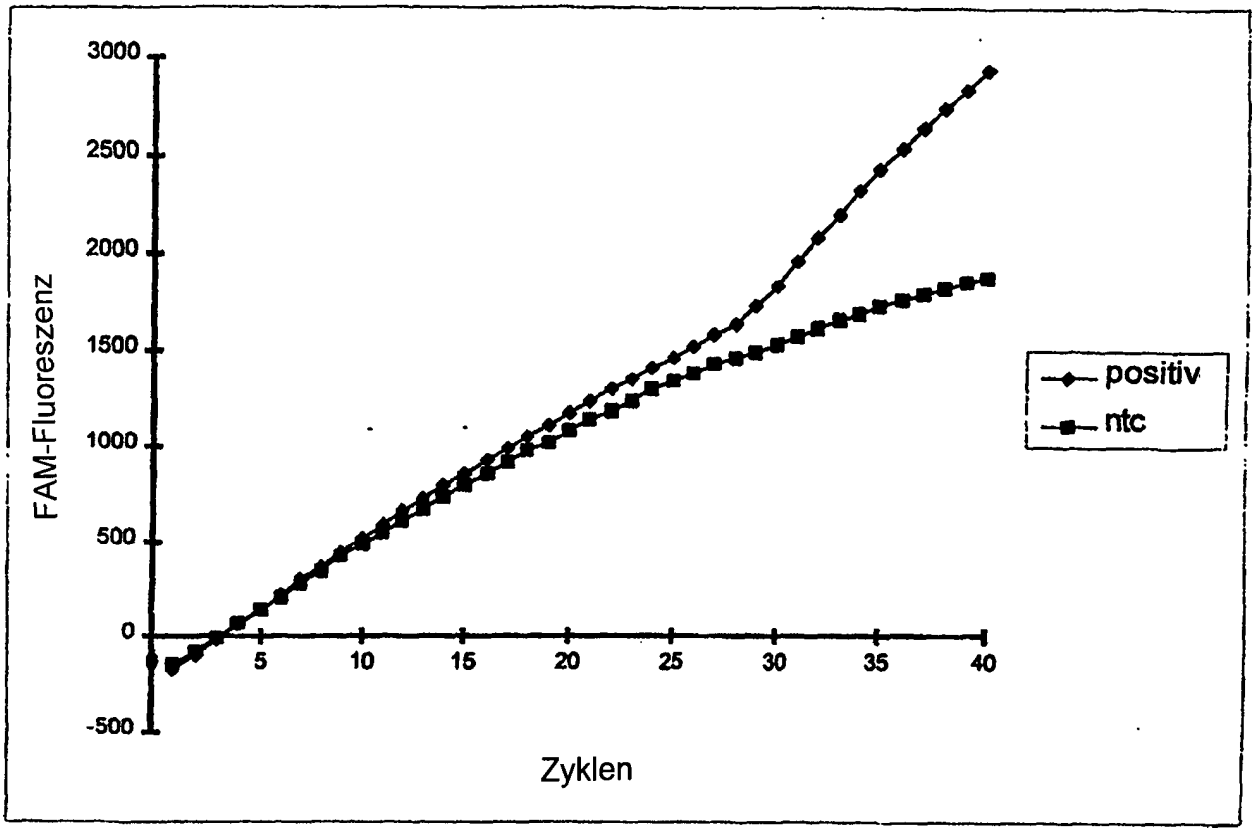
FIGUR 20b


10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
FAM-Fluoreszenz
0
10
20
30
40
Zyklen
positiv
NTC

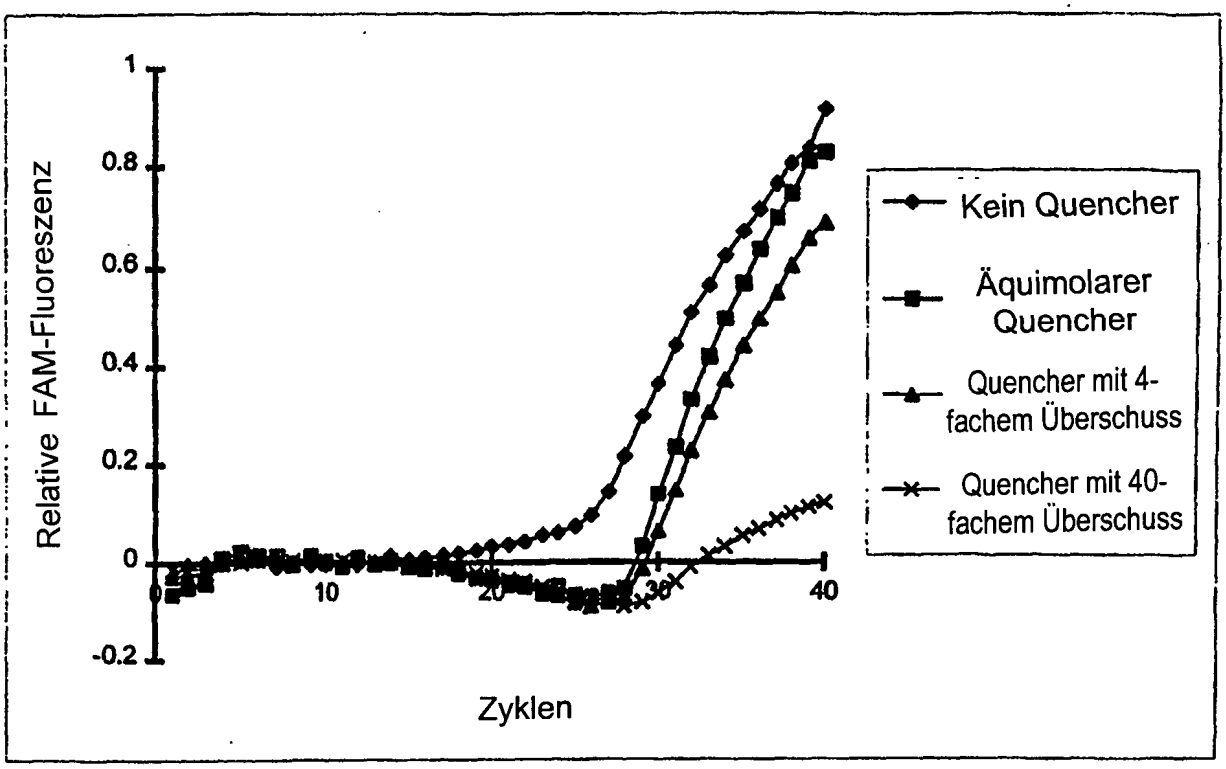
FIGUR 20c


7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
FAM-Fluoreszenz
0
10
20
30
40
Zyklen
positiv
NTC

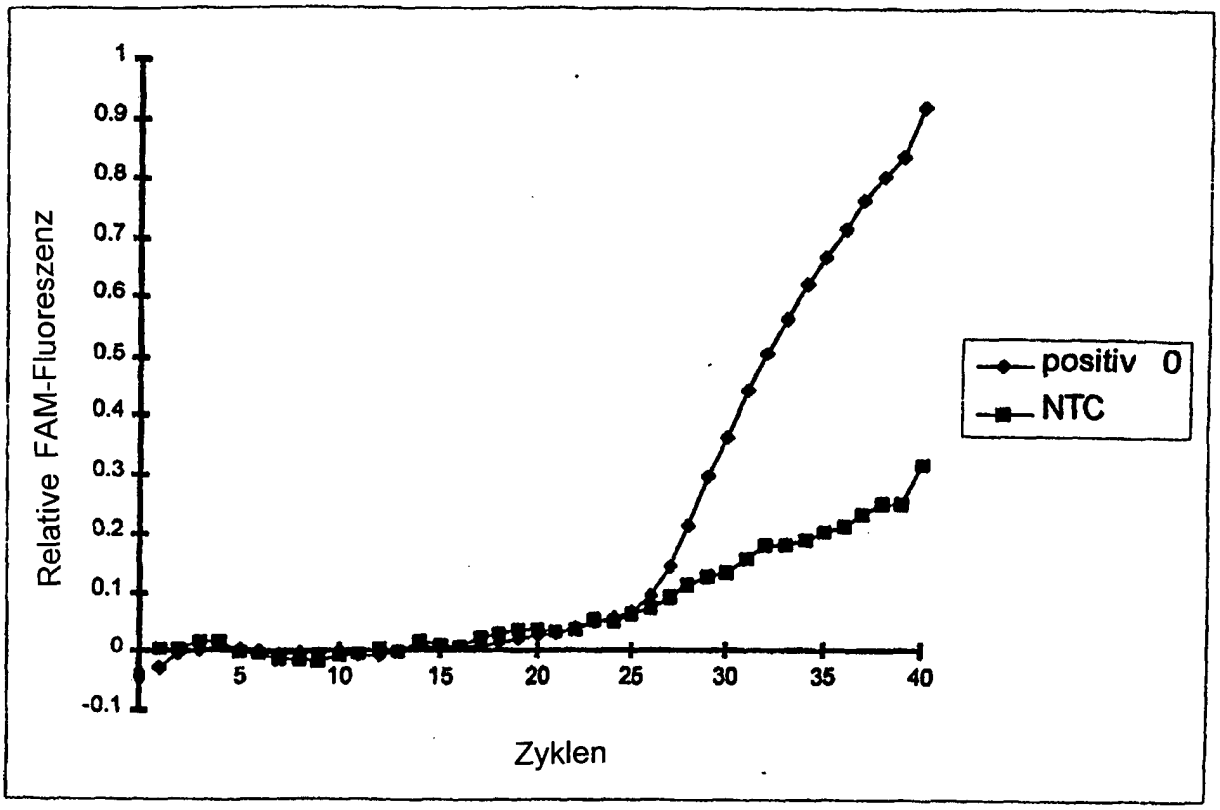
FIGUR 20d


3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
FAM-Fluoreszenz
5
10
15
20
25
30
35
40
Zyklen
positiv
ntc

FIGUR 21a


Relative FAM-Fluoreszenz
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
0
10
20
30
40
Zyklen
Kein Quencher
Äquimolarer Quencher
Quencher mit 4-fachem Überschuss
Quencher mit 40-fachem Überschuss

FIGUR 21b


Relative FAM-Fluoreszenz
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
5
10
15
20
25
30
35
40
Zyklen
positiv 0
NTC