

(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  
21. März 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/22865 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03617
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
15. September 2001 (15.09.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
100 46 079.8 15. September 2000 (15.09.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.** [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, 80636 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BORLAK, Jürgen** [DE/DE]; Arpker Strasse 12g, 31275 Lehrte/OT Immensen (DE). **THUM, Thomas** [DE/DE]; Rühmkorfstrasse 19, 30163 Hannover (DE).
- (74) Anwalt: **BAUMBACH, Fritz**; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

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

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: PCR REACTION MIXTURE FOR FLUORESCENCE-BASED GENE ANALYSIS AND GENE MUTATION ANALYSIS

(54) Bezeichnung: PCR-REAKTIONSGEMISCH FÜR FLUORESCENZ-BASIERENDE GENEXPRESSIONS- UND GENMUTATIONSANALYSEN

(57) Abstract: The aim of the invention is to increase the selectivity and sensitivity of fluorescence-based gene expression and gene mutation analyses and to prevent misdiagnoses and erroneous findings. The PCR reaction mixture for fluorescence-based gene expression and gene mutation analyses is characterized in that it contains bovine serum albumen in addition to the usual reaction components and has an increased MgCl<sub>2</sub> concentration.

(57) Zusammenfassung: Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Selektivität und Sensitivität Fluoreszenz-basierender Genexpressions- und Genmutationsanalysen zu steigern und Fehldiagnosen und irrtümliche Befunde zu verhindern. Das PCR-Reaktionsgemisch für Fluoreszenz-basierende Genexpressions- und Genmutationsanalysen ist dadurch gekennzeichnet, dass es neben den üblichen Reaktionskomponenten zusätzlich Bovines Serum Albumin enthält und eine erhöhte MgCl<sub>2</sub>-Konzentration aufweist.



**WO 02/22865 A2**

## PCR-Reaktionsgemisch für Fluoreszenz-basierende Genexpressions- und Genmutationsanalysen

### 5 Beschreibung

Die Genexpression nimmt eine Schlüsselfunktion in der Beurteilung molekularer Vorgänge im Körper ein, und es werden große Anstrengungen unternommen, die Bedeutung der Genexpression zahlreicher Gene auch infolge der Arzneistoffwirkungen zu untersuchen und hinsichtlich ihres Prädiktionwertes bezüglich Krankheitsverlauf und Therapieerfolg zu überprüfen.

Voraussetzung für die Umsetzung einer genetischen Information ist zunächst das Umschreiben der entsprechenden DNA-Sequenz in mRNA. Die Regulation der Genexpression kann sowohl auf der Ebene der Transkription, als auch posttranskriptionell erfolgen. Für eine Evidenz-basierende Medizin ist die Aufklärung der Mechanismen, die zu einer veränderten Genexpression im Krankheitsverlauf führen, ein wesentliches Ziel, da sich hieraus neue Therapiekonzepte ableiten, die zu einer verbesserten Behandlung von Patienten führt.

Die Analyse der Genexpression in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben, die wichtige Hinweise über den normalen Zustand und in der Genese des pathologischen Zustandes von Zellen/Geweben erlauben, stellt in der heutigen Post-Genom-Epoche, nachdem das menschliche Genom identifiziert ist, die größte Herausforderung dar.

Eine Vielzahl von Methoden werden zur Analyse der Genexpression angewendet, u.a. Northern-Blot und RT-PCR Techniken. Mittels Chip-basierender Technologien, das sind planare Träger aus Plastik, Glas, Gelatine u.a., auf deren Oberfläche eine Vielzahl unterschiedlicher, aber in ihrer Position bekannter und adressierbarer (DNA) Moleküle angeordnet sind, können simultan Tausende von Genen hinsichtlich ihrer Expression untersucht werden.

Neben den verschiedenen methodischen Ansätzen zur Genexpressionsanalytik, werden neue Technologien entwickelt, um Nukleotidpolymorphismen (das sind unterschiedliche Varianten eines Gens) a) methodisch erfassen zu können und b) hinsichtlich ihrer biologischen Bedeutung im Krankheitsverlauf und bei medizinischen Anwendung, im Sinne einer individualisierten Therapie, beurteilen zu können.

Ein relativ junges Verfahren für fluoreszenz-basierende Genexpressions- und Genmutationsanalysen stellt die Untersuchung der mittels der PCR-Technik amplifizierten Proben in Echtzeit-PCR-Analyse-Automaten, wie im LightCycler® (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Technical Note No. LC 1/99), TaqMan® (Perkin-Elmer GmbH, <http://www.appliedbiosystems.com/products/>) oder anderen, dar.

Der LightCycler® ist mit einem Drei-Kanal Fluorimeter ausgestattet, das Fluoreszenz bei 530nm (SYBR®-Green), 640nm (LC-RED 640) und 705nm (LC-RED 705) detektieren kann. Für die PCR-Amplifikation im LightCycler® stellt der Hersteller Roche Diagnostics GmbH verschiedene Kits zur Verfügung, die je nach Labeling-Art (SYBR®-Green oder FRET-Verfahren; siehe unten) eingesetzt werden können.

### *Farbstofflabeling*

Um in der anschließenden Echtzeit PCR die jeweils de novo synthetisierte DNA vermessen zu können, muß diese durch geeignete detektierbare Farbstoffe markiert werden. Zur Detektion der Fluoreszenzsignale sind diverse Echtzeit-PCR-Detektionssysteme bekannt, mit denen es möglich ist, die gesamte PCR-Reaktion zu verfolgen. Im Folgenden werden grundsätzliche Prinzipien der Detektion erläutert:

- 1.) Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Verfahren
  - 15 a) Als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet man einen Vorgang, bei dem ein nach Anregung durch kurzwelliges Licht fluoreszierendes Donatormolekül seine Emissionsenergie auf ein zweites Akzeptormolekül überträgt, das darauf mit der Emission längerwelligen Lichtes reagiert. Der Energietransfer von einem auf das andere Molekül erfolgt über den Elektronenfluß. Das Reportermolekül gibt dabei  
20 Auskunft über die Produktzunahme während der PCR. Das sogenannte Quencher-molekül absorbiert die Fluoreszenzsignale des Reportermoleküls, solange beide Moleküle in der Hybridisierungssonde direkt benachbart zueinander liegen. In diesem Grundzustand ist die Reporteremissionsstrahlung für den Fluoreszenzdetektor, mit dem die Produktzunahme in der PCR gemessen wird, unsichtbar. Erst mit der  
25 PCR-Produktzunahme erfolgt eine räumliche Trennung von Reporter und Quencher-molekül. Dadurch wird die Reporterfluoreszenz detektierbar und korreliert direkt mit der in der Reaktion gebildeten PCR-Produktmenge.
  - b) Andere nach dem FRET-Prinzip synthetisierten Hybridisierungssonden lassen sich verwenden, um Mutationsanalysen durchzuführen. Besonders wichtig ist die Detektion  
30 sogenannter Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), die durch Austausch einzelner Basen zustande kommen. Zur SNP-Analyse werden zwei jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Hybridisierungssonden verwendet. Eine Donorsonde bindet unmittelbar benachbart zu dem Mutationsbereich. Eine zweite Sonde wird so gefertigt, dass sie entweder komplementär zum Wildtyp oder über der Mutationsstelle  
35 bindet. In der nach der PCR durchgeführten Schmelzpunktanalyse schmilzt die Sonde bei einer bestimmten Temperatur ab. Bindet die Sonde komplementär zum Wildtyp, so schmilzt diese bei höheren Temperaturen ab, während beim Vorhandensein einer

Mutation die Sonde bei niedrigeren Temperaturen abschmilzt und deshalb eine Mutationsanalyse möglich wird. Der Fluoreszenzabfall wird als negative erste Ableitung (als ein Schmelzhügel) berechnet. Durch die verschobene Schmelzkurve kann die Mutation diagnostiziert werden. Nur mittels Echt-Zeit-Detektionssystem kann dieses Verfahren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zur Anwendung kommen.

- 5
- c) Das Prinzip der Echtzeit-Detektionssysteme liegt auch dem LightCycler® von Roche Diagnostics zugrunde. Der LightCycler® hat drei Kanäle, durch die emittierte Lichtquanten von Farbstoffen detektiert werden können. DNA kann mit SYBR®-Green gelabelt werden; darüber hinaus können mit FRET-Sonden, die mit den Farbstoffen LC-Red 640 oder LC-Red 705 gelabelt sind, eingesetzt werden. Wenn das FRET-Verfahren im LightCycler® eingesetzt wird, müssen spezielle Hybridisierungs sonden zum Reaktionsgemisch hinzugegeben werden, welche neben Fluorescein entweder mit LC-Red 640 oder LC-Red 705 (von Roche Diagnostics) gelabelt sind. Fluoreszenz ist nur zu beobachten, wenn beide Sonden (Donor- und Akzeptor-Sonde) in unmittelbarer räumlicher Nähe an die Zielsequenz gebunden haben. Dann kommt es zur Übertragung von Lichtquanten ( $h \cdot \nu$ ), dem Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET; siehe Abbildung 1).
- 10
- d) Beim TaqMan-Verfahren (oder 5'-Nuklease-Assay) binden die Fluoreszenz-markierten Hybridisierungs sonden am komplementären Zielstrang zwischen den Primerbindungsstellen. Bei der Neustrangsynthese wird die Hybridisierungssonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in kleine Fragmente geschnitten und aus dem Zielstrang freigesetzt. Reporter- und Quencher moleküle liegen jetzt getrennt im Reaktionsmix vor, und die gemessene Zunahme der Reporterfluoreszenz pro PCR-Zyklus korreliert direkt mit der PCR-Produktzunahme.
- 15
- 20
- 25

## 2.) SYBR® -Green Verfahren

- a) Im SYBR®-Green Verfahren interkaliert der Farbstoff SYBR® -Green jeweils zwischen 2 komplementäre Basensträngen während der DNA Synthese und erfährt damit mit fortschreitender PCR-Reaktion einen meßbaren Fluoreszenzanstieg (siehe Abbildung 2). Bei der Verwendung von SYBR® -Green fehlt allerdings jede Spezifität hinsichtlich des zu untersuchenden Templates (das ist die DNA-Bindungsstelle), denn auch Primer-Dimere, die sich während der Reaktion bilden, verursachen einen Fluoreszenzanstieg. Dieser ist zunächst nicht von dem des gewünschten DNA-Synthese-Produktes zu unterscheiden und kann zu Fehlinterpretationen führen. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren kann jedoch nach abgeschlossener PCR mittels einer Schmelzkurvenanalyse erfolgen. Bei dieser werden
- 30
- 35

die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt und ihrem Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang vorliegen. Die damit einhergehende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Kleinere Fragmente, wie die Primer-Dimere weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als größere PCR-Produkte.

5 Die daraus abgeleitete Darstellung der Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzsignal-Veränderungen ergibt einen Kurvenverlauf, in dem das spezifische PCR-Produkt von den Primer-Dimeren unterscheidbar wird, wenn sich die Schmelzpunkte deutlich voneinander unterscheiden.

#### 10 *PCR-Amplifikation allgemein*

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können klar definierte DNA-Abschnitte eines Gens millionenfach vermehrt werden. Dafür werden zwei der Zielsequenz komplementäre Oligonukleotide (Primer), die sich jeweils einem der DNA-Stränge anlagern, in das PCR-Reaktionsgemisch hinzugegeben. Darüber hinaus werden  
15 ausreichende Mengen der vier Desoxynucleosidtriphosphate, eine bestimmte Menge an Magnesiumchlorid und eine hitzebeständige DNA-Polymerase in den Reaktionscocktail hinzugegeben. Es sind zahlreiche PCR-Puffersysteme bekannt. Solche Systeme für die PCR-Reaktion werden als fertige Testkits von zahlreichen Unternehmen angeboten (z.B. von Roche Diagnostics GmbH, Qiagen GmbH u.a.), wobei nur noch die spezifischen  
20 Primer und die zu untersuchende DNA hinzupipettiert werden muß.

Die Fluoreszenz-basierenden Genexpressions- und Genmutationsanalysen unter Verwendung von Reaktionsgemischen mit den an sich üblichen Komponenten und Konzentrationen bzw. unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Testkits sind in  
25 ihrer Aussagekraft jedoch aufgrund ihrer geringeren Sensitivität, Selektivität und durch die Bildung von Primer-Dimeren sehr beschränkt einsetzbar. Insbesondere ist die Bildung von Primer-Dimeren hervorzuheben, bei denen es sich um falsche DNA-Synthese-Produkte handelt, welche den großen Nachteil haben, dass sie zu falschen Befundungen führen können, wodurch erhebliche Risiken für den Patienten und für die biomedizinische  
30 Forschung allgemein entstehen, und daher eine verlässliche Medizinaldiagnostik beispielsweise bei Begleituntersuchungen während der Therapie nicht gewährleistet werden kann. Weiterhin sind diese Untersuchungen sehr kostenintensiv, wodurch die Anzahl der möglichen Untersuchungen stark limitiert wird.

35

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, Mittel zu finden und in Gemischen für die PCR-Reaktion bereitzustellen, die einerseits kostengünstig sind und die zum anderen die

Selektivität und Sensitivität Fluoreszenz-basierender Genexpressions- und Genmutationsanalysen steigern sowie die Primer-Dimeren-Bildung (siehe Abbildung 3) unterdrücken und somit Fehldiagnosen und irrtümliche Befunde verhindern. Aufgabe der Erfindung war es ferner, ein Verfahren zu entwickeln, das vielfältige Untersuchungen  
5 mittels der Fluoreszenz-basierenden Genexpressions- und Genmutationsanalyse aus unterschiedlichsten Patientenprobe gestattet und sichere Befunde liefert.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Das erfindungsgemäße PCR-Reaktionsgemisch für Fluoreszenz-basierende Genexpressions- und Genmutationsanalysen  
10 umfasst (neben an sich üblichen Reagenzien) eine beliebige Taq-Polymerase, eine geringe Menge an BSA (Bovines Serum Albumin), welches im Reaktionsgemisch mit einer maximalen Konzentration von 400 bis 800 µg/ml vorliegt, eine hohe Menge an MgCl<sub>2</sub> in Abhängigkeit der eingesetzten Taq-Polymerase mit einer Konzentration von > 3,5 mM (mmol/l) bis maximal 5 mM im Reaktionsgemisch sowie ein fluoreszierendes Material. In  
15 einer bevorzugten Ausführung umfasst das PCR-Reaktionsgemisch BSA in einer Endkonzentration von 400 bis 600 µg/ml, vorzugsweise 500 µg/ml, und MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 5 mM. Alle handelsüblichen Taq DNA Polymerasen können eingesetzt werden.

20 Es wurde festgestellt, dass bei der erfindungsgemäßen exakten Einstellung von BSA und MgCl<sub>2</sub> in einem an sich üblichen Reaktionsgemisch, die Echtzeit-PCR Genexpressions- und Genmutationsmessungen optimiert werden konnte. Überraschend wurden mit anderen BSA-Konzentrationen als 400 - 800 µg/ml (niedriger oder höher) keine messbaren oder nicht verwertbaren Ergebnisse erzielt.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung wird ein PCR-Reaktionsgemisch mit den folgenden Reaktionskomponenten bereitgestellt:

Tris-HCl, KCl, eine beliebige DNA Taq-Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, BSA und als  
30 fluoreszierende Materialien SYBR®-Green I (1:20000 verdünnt) oder FRET-markierte Fluoreszenzsonden, z.B. LC-RED640 oder LC-RED705.

Für die Durchführung von HotStart-Verfahren (hierfür wird eine besondere Taq-Polymerase eingesetzt, die durch 15 minütige Erwärmung bei 95°C aktiviert wird) enthält das erfindungsgemäße Gemisch zusätzlich (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

35 Mit dem erfindungsgemäßen Gemisch ist überraschend auch eine erhebliche Reduzierung der Menge von kostenintensivem fluoreszierenden Material verbunden, welches im

Vergleich zu jetzt üblichen Kits in einer hohen Verdünnung, ca. mehr als das 15000-fache eingesetzt werden kann, vorzugsweise wird es in ca. 20.000-facher Verdünnung eingesetzt.

- 5 Aufgrund der verbesserten Sensitivität des erfindungsgemäßen PCR-Gemisches kann die sonst übliche Menge von 2.5Units Taq-Polymerase auf 0.9Units pro Reaktion reduziert werden, wodurch ein erhebliches Einsparungspotential entsteht. Es kann auch noch weniger als 0.9U, beispielsweise 0.5U TaqPolymerase / Reaktion, eingesetzt werden, wodurch der dynamische Amplifikationsanstieg um etwas höhere Zykluszahlen  
10 verschoben wird, hinsichtlich der Spezifität aber keine Einbußen entstehen (siehe Abb. 17).

Das erfindungsgemäße PCR-Reaktionsgemisch kann vielfältig zur Echtzeit-PCR mittels einer Fluoreszenz-basierenden Genexpressions- und Genmutationsanalyse verwendet  
15 werden. Dabei werden nach an sich fachgemäßen Methoden DNA oder RNA aus beliebigen biologischen Materialien isoliert und, ggf. nach vorheriger Bearbeitung, wie z.B. Umschreibung in cDNA, mit spezifischen Oligonukleotidprimern (deren Herstellung und Auffinden dem Fachmann bekannt ist) in Kontakt gebracht. Anschließend erfolgt in Abhängigkeit des Farbstoff-Labelings oder der eingesetzten Sonden die Auswertung,  
20 vorzugsweise nach dem SYBR®-Green- oder nach dem FRET-Verfahren.

Zur Auswertung werden handelsübliche Echtzeit-PCR-Analyse-Automaten eingesetzt, wie z.B. ein LightCycler® oder TaqMan®. Die vorliegende PCR-Reagenzmischung ist zum Nachweis zahlreicher und vielfältiger Untersuchungen mittels der Fluoreszenz-basierenden  
25 Genexpressions- und Genmutationsanalyse aus unterschiedlichsten Patientenprobe geeignet und liefert wie anhand von Ausführungsbeispielen belegt wird, sichere Befunde.

So erfolgte z.B. der Nachweis einer Genpolymorphie in Morbus Meulengracht Patienten, der Nachweis der sarcoplasmatischen Calcium-ATPase aus gewonnener cDNA von  
30 humanen Herzen, der Nachweis des beta-myosin-heavy-chain- (MHC) Gens aus gewonnener cDNA von humanem Herzgewebe, der Nachweis des brain natriuretic peptide (BNP) Gens aus gewonnener cDNA von humanem Herzgewebe, der Nachweis des atrialen natriuretischen Peptid (ANP) Gens aus cDNA von kultivierten Kardiomyozyten, der Nachweis des alpha skelettalen Aktin Gens aus cDNA von kultivierten Kardiomyozyten,  
35 der Nachweis des Albumin Gens aus cDNA von kultivierten Hepatozyten, der Nachweis des Transkriptionsfaktors HNF-3gamma aus cDNA von kultivierten Hepatozyten, der Nachweis des N-Acetyltransferase 2 Allel 5\* Genotyps aus humaner lymphozytärer DNA.

Die Verwendung des erfindungsgemäßen PCR-Reaktionsgemisches führte zu einer deutlich verbesserten Sensitivität und Selektivität von Fluoreszenz-basierenden Genexpressions- und Genmutationsanalysen im tierischen, bakteriellen, pflanzlichen und menschlichen Genom und verhinderte Fehldiagnosen. Insbesondere ist hervorzuheben, dass es möglich ist, derartige Nachweise bzw. Untersuchungen an Proben durchzuführen, die wegen ihrer geringen RNA- bzw. DNA-Konzentration einer entsprechenden Analyse vorher nicht zugänglich waren. Das erfindungsgemäße PCR-Reaktionsgemisch ermöglicht eine deutliche Steigerung der Aussagekraft der semi- und totalquantitativen Ermittlung der Genexpression in Geweben und Organen im gesunden, erkrankten und medikamentös beeinflussten Zustand.

Darüber hinaus konnten die Kosten für die Durchführung einer Analyse aufgrund der eingesetzten billigen Substanzen und erheblichen Minimierung der Menge an Fluoreszenzmittel enorm gesenkt werden. Die Kosten pro Probe im Vergleich zu handelsüblichen Tests für eine Genexpressionsanalyse oder zum Nachweis von Nukleotidpolymorphismen konnten bis zu 1/6 (im Falle des HotStart-Verfahrens) bis zu 1/40 (Standard-Verfahren) des ursprünglichen Preises reduziert werden.

Das technische Anwendungsgebiet der Erfindung umfaßt vor allem **a)** die Pharmakogenomics und hier insbesondere die Entdeckung genomischer Targets für in der Forschung und Entwicklung befindlichen Arzneistoffkandidaten, oder bereits auf dem Markt eingeführter Produkte, **b)** den Nachweis von Nukleotid-Polymorphismen, insbesondere in der molekularen Diagnostik von Erkrankungen basierend auf Genmutationsanalysen und Gen-Polymorphismen, in der Arzneimitteltherapie und hier insbesondere in der individualisierten Dosierung von Arzneistoffen und zur rationalen Interpretation pharmakokinetischer Therapieverläufe, **c)** für die Charakterisierung von potentiellen Arzneistoffen auf der Genexpressionsebene, **d)** die Toxikogenomics und hier insbesondere den Einsatz bei toxikologischen Untersuchungen in der präklinischen Entwicklung und zur Vorhersage von toxischen Wirkungen und zur toxikologischen Charakterisierung von einzelnen Stoffen und Stoffgemischen auf der Genexpressionsebene, **e)** die molekulare Diagnostik und hier insbesondere das Screening und die Diagnose von krankheitsrelevanten Genen, das Monitoring im Krankheits- und Therapie-Verlauf und die molekulare Prognostik von Erkrankungen und **f)** die Forschung und hier insbesondere die Erkennung von molekularen Interaktionen von Stoffen, Stoffgemischen und biologischen

Agenzien auf der Genomebene, die Erkennung von Gen-Interaktionen und Funktionsanalyse neuer Gene, einschließlich Sequenzanalysen und Genklonierungen.

### Ausführungsbeispiele

5

Die Nachweise erfolgten mit einem PCR-Reaktionsgemisch, das sich aus den folgenden Komponenten zusammensetzt:

#### Standard-Verfahren

- 10 10mM Tris-Cl, 50mM KCl, 0.9Units einer beliebigen DNA Taq-Polymerase, 200 $\mu$ M dNTPs, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 500 $\mu$ g/ml BSA und als fluoreszierende Materialien SYBR®-Green I (1:20000 verdünnt) oder FRET-markierte Fluoreszenzsonden, z.B. LC-RED640 oder LC-RED705.

#### 15 HotStart-Verfahren

- HotStarTaq Master Mix Kit der Qiagen GmbH gemäß HotStarTaq PCR Handbook von 2001 (HotStarTaq Polymerase, die Puffer Tris-Cl, KCl und Ammoniumsulfat, pH 8,7, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs)
- zusätzlich BSA (500  $\mu$ g/l), MgCl<sub>2</sub> für eine Endkonzentration von 5 mM,
- 20 - SYBR®-Green I in einer 20000-fachen Verdünnung oder für FRET-Verfahren Hybridisierungssonden (Donor-Sonde mit Fluoreszein gelabelt, Acceptor-Sonde mit LC-RED 640 bzw. mit LC-RED705)

#### Probengewinnung und Nukleinsäuren-Isolation

- 25 Zuerst wird das zu untersuchende biologische Material in geeigneter Weise gewonnen und isoliert. Demnach werden Nukleinsäuren (RNA und DNA) aus Vollblut (kernhaltige Lymphozyten) oder tierischen / menschlichen Geweben isoliert und aufgereinigt. Mittels Standardisierter Methoden kann DNA oder RNA aus Blut und/oder Geweben isoliert werden. Im Falle der RNA-Gewinnung muß diese vor Einsatz in der PCR in
- 30 copyDNA umgeschrieben werden, um darauffolgend große Mengen der Ziel-DNA synthetisieren zu können. Dazu wird eine definierte Menge an RNA mittels reverser Transcriptase in copyDNA umgeschrieben.

Beispiel 1)

- 35 *Nachweis einer Genpolymorphie in Morbus Meulengracht Patienten mittels FRET-Verfahren*

Der Morbus Meulengracht (Gilberts syndrome) ist eine Erkrankung, die durch eine TA-Insertions-Polymorphie im Bereich der TATA-Box des Uridin-5'-diphosphoglucose-Glukuronyltransferase-Gens (UGT1A1) hervorgerufen wird. Erfindungsgemäß wurde eine Methode entwickelt, um diese Polymorphie schnell und einfach zu diagnostizieren.

5

Nach der Entnahme von Blutproben (200µl Vollblut pro Patient in der Regel in EDTA haltigen Gefäßen, z.B. Monovetten) werden diese bei -20° bis zur Probenaufarbeitung gelagert. Mittels eines DNA Isolations Kits wird die DNA aus den nukleierten Blutzellen isoliert und aufgereinigt. In die gekühlte LightCycler Kapillare wird vergleichend

10

- hinzugegeben:
- a) ein Standard PCR-Reaktionsgemisch der Roche Diagnostics GmbH (LightCycler DNA Master Hybridization Probes oder LightCycler FastStartDNA Master Hybridization Probes,
  - b) das erfindungsgemäße PCR-Reaktionsgemisch wie oben erwähnt

15

Beiden Gemischen werden spezifische Oligonukleotidprimer (je 400nM), die Hybridisierungssonden (je 100nM; Donor-Sonde mit Fluoreszein gelabelt, Acceptor-Sonde mit LC-RED 640) und die patientenspezifische DNA (2µl) hinzupipettiert.

20 Die PCR-Reaktion wird dann mit einer 15 minütigen Denaturierungsphase bei 95°C gestartet. (Im Falle des Lightcycler- DNA Master Hybridisation-Kits betrug die Denaturierungsphase 2min). Danach werden 50 Zyklen mit folgendem Ablauf wiederholt: 95°C für 3s, dann 55°C für 7s und 72°C für 12s. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dazu werden die entstandenen Syntheseprodukte

25

auf 45°C erwärmt und langsam (0,2°C/s) auf 80°C erhitzt. Während dieser Zeitspanne wird online/Echtzeit die Fluoreszenz ermittelt.

Sobald die über der zu detektierenden Mutation liegende Hybridisierungssonde abschmilzt, findet kein Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET siehe oben) mehr statt. Die Fluoreszenz wird durch eine spezielle Software anhand der Schmelzkurven berechnet,

30

welche dann als erste negative Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur (-dF/dT vs T) graphisch angegeben werden (siehe Abbildung 4).

Die eingesetzten Mittel sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Im vorliegenden Anwendungsbeispiel wird die Sensitivität des erfindungsgemäßen FRET-Reaktionsgemisches mit dem von Roche Diagnostics GmbH (Lightcycler- FastStart DNA

35

Master Hybridisation Probes) verglichen.

Wie der Abbildung 4 zu entnehmen ist, ist das erfindungsgemäße PCR-Reaktionsgemisch bis zu 10.000fach im Vergleich zu den angebotenen Kits von Roche Diagnostics sensitiver. Darüber hinaus ist ein ausgesprochen wichtiges Merkmal, dass die Schmelzkurven bei der Verwendung des erfindungsgemäßen Kits höher und schmaler sind, womit spezifischer und somit eindeutiger die einzelnen Genotypen unterschieden werden können. Für die medizinische Beurteilung von Nukleotidpolymorphismen, in der medizinischen Diagnostik und für die individualisierte dosisangepasste Therapie ist dieser Unterschied von grundsätzlicher Bedeutung (siehe Abbildung 4).

10 Beispiel 2)

*Nachweis der sarcoplasmatischen Calcium-ATPase aus cDNA des humanen Herzens mittels SYBR®-Green-Labelings*

Nach Explantation des humanen Herzens im Rahmen einer Herztransplantation wurde einem Patienten Biopsiematerial entnommen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Dann wurden 50mg Herzgewebe entnommen und mittels standardisierter Verfahren wurde RNA isoliert und aufgereinigt. 2µg RNA und Random-Primer (Roche Diagnostics) werden für 10min bei 70°C erhitzt, um anschließend die reverse Transkription zu initiieren (60min bei 42°C). Es werden zu Random-Primern und RNA Pufferlösung (Promega), dNTPs (1nM, Roche Diagnostics), Rnase Inhibitor (40U, Stratagene) und AMV-Reverse Transkriptase (20U, Promega) hinzupipettiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 95°C für 5min gestoppt.

Im Anschluss wird in eine LightCycler Kapillare wiederum vergleichend hinzugegeben

- a) ein PCR-Reaktionsgemisch (LightCycler- DNA Master SYBR®-Green I oder Lightcycler- FastStart DNA Master SYBR®-Green I (beide Roche Diagnostics GmbH) oder
- b) das erfindungsgemäße PCR-Gemisch wie oben erwähnt

Dazu werden je 400nM der spezifischen Oligonukleotid Primer und die entsprechende copyDNA hinzupipettiert. Die PCR-Reaktion wird im Anschluss an eine 15 minütige Denaturierungsphase bei 95°C gestartet (Im Falle des Lightcycler- DNA Master SYBR®-Green I-Kits betrug die Denaturierungsphase 2min). Danach werden 60 Zyklen mit folgendem Ablauf wiederholt: 95°C für 3s, dann 55°C für 7s und 72°C für 12s. Bei 87°C erfolgte bei jedem Zyklus pro Kapillare eine aktuelle Fluoreszenzmessung, aus der sich die in Abbildung 5 dargestellte Echt-Zeit-PCR Kurve ergibt. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dazu werden die DNA-Syntheseprodukte auf 68°C erwärmt und langsam (0,2°C/s) auf 95°C erhitzt. Während

dieser Zeitspanne wird online die Fluoreszenz ermittelt. Für das jeweilige DNA-Syntheseprodukt wird eine spezifische Schmelztemperatur erreicht, wodurch sich die angelagerten fluoreszierenden SYBR®-Green Moleküle von den schmelzenden DNA-Strängen ablösen, womit sich die Fluoreszenzausbeute schlagartig verringert. Das  
5 Fluoreszenzverhalten wird durch eine spezielle Software in Schmelzkurven umgerechnet, welche dann als erste negative Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur ( $-dF/dT$  vs T) graphisch angegeben werden (siehe Abbildung 5).

Die eingesetzten Mittel sind der Tabelle 1 zu entnehmen. In diesem Anwendungsbeispiel  
10 wird die Sensitivität des beanspruchten SYBR®-Green Reaktionsgemisches mit den AnalyseKits von Roche Diagnostics GmbH verglichen. Abbildung 5 zeigt, dass die Verwendung des erfindungsgemäßen Gemisches zu einer wesentlich verbesserten, weil höheren Dynamik (Fluoreszenzanstieg / Zyklus) bei der DNA-Synthese führt. Auch bei der Schmelzpunktanalyse ist die Dynamik (Fluoreszenzverlust / sec) viel höher, so dass die  
15 Schmelzpunktpeaks schmaler und die Amplitude höher ist, wodurch die Genexpression spezifischer und somit genauer ermittelt werden kann.

In den folgenden Beispielen ist die erfolgreiche Verwendung des neuen Reaktionsgemisches bei der Amplifikation krankheitsrelevanter Gene aus humanen und  
20 tierischen Geweben und in Zellkulturexperimenten beschrieben.

### Beispiel 3)

*Nachweis des beta-myosin-heavy-chain (MHC)-Gens aus cDNA des humanen Herzens mittels SYBR®-Green-Labelings*

25

Nach Explantation des humanen Herzens im Rahmen einer Herztransplantation wurde Biopsiematerial entnommen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Dann wurden 50mg Herzgewebe entnommen und mittels standardisierter Verfahren wurde RNA isoliert und aufgereinigt. 2µg RNA und Random-  
30 Primer (Roche Diagnostics GmbH) werden für 10min bei 70°C erhitzt, um anschließend die reverse Transkription zu initiieren (60min bei 42°C). Es werden zu Random-Primern und RNA Pufferlösung (Promega), dNTPs (1nM, Roche Diagnostics), RNase Inhibitor (40U, Stratagene) und AMV-Reverse Transkriptase (20U, Promega) hinzupipettiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 95°C für 5min gestoppt.

35 Im Anschluss wird in eine LightCycler Kapillare das erfindungsgemäße PCR-Gemisch hinzugegeben. Dazu werden je 400nM der spezifischen Oligonukleotid Primer und die entsprechende copyDNA hinzupipettiert (10ng, 1ng und 100pg).

Die PCR-Reaktion wird im Anschluss an eine 15 minütige Denaturierungsphase bei 95°C gestartet. Danach werden 38 Zyklen mit folgendem Ablauf wiederholt: 95°C für 3s, dann 57°C für 8s und 72°C für 12s. Bei 89°C erfolgte bei jedem Zyklus pro Kapillare eine aktuelle Fluoreszenzmessung, aus der sich die in Abbildung 6 dargestellte Echt-Zeit-PCR Kurve ergibt. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dazu werden die DNA-Syntheseprodukte auf 68°C erwärmt und langsam (0,2°C/s) auf 95°C erhitzt. Während dieser Zeitspanne wird online die Fluoreszenz ermittelt. Für das jeweilige DNA-Syntheseprodukt wird eine spezifische Schmelztemperatur erreicht, wodurch sich die angelagerten fluoreszierenden SYBR®-Green Moleküle von den schmelzenden DNA-Strängen ablösen, womit sich die Fluoreszenzausbeute schlagartig verringert. Das Fluoreszenzverhalten wird durch eine spezielle Software in Schmelzkurven umgerechnet, welche dann als erste negative Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur (-dF/dT vs T) graphisch angegeben werden (siehe Abbildung 6).

15

Beispiel 4)

*Nachweis des brain natriuretic peptide (BNP) -Gens aus cDNA des humanen Herzens mittels SYBR®-Green-Labelings*

20 Nach Explantation des humanen Herzens im Rahmen einer Herztransplantation wurde Biopsiematerial entnommen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Dann wurden 50mg Herzgewebe entnommen und mittels standardisierter Verfahren wurde RNA isoliert und aufgereinigt. 2µg RNA und Random-Primer (Roche Diagnostics) werden für 10min bei 70°C erhitzt, um anschließend die reverse Transkription zu initiieren (60min bei 42°C). Es werden zu Random-Primern und RNA Pufferlösung (Promega), dNTPs (1nM, Roche Diagnostics), Rnase Inhibitor (40U, Stratagene) und AMV-Reverse Transkriptase (20U, Promega) hinzupipettiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 95°C für 5min gestoppt.

30 Im Anschluss wird in eine LightCycler Kapillare das erfindungsgemäße PCR-Gemisch hinzugegeben. Dazu werden je 400nM der spezifischen Oligonukleotid Primer und die entsprechende copyDNA hinzupipettiert (10ng, 1ng und 100pg).

Die PCR-Reaktion wird im Anschluss an eine 15 minütige Denaturierungsphase bei 95°C gestartet. Danach werden 46 Zyklen mit folgendem Ablauf wiederholt: 95°C für 3s, dann 55°C für 8s und 72°C für 10s. Bei 89°C erfolgte bei jedem Zyklus pro Kapillare eine aktuelle Fluoreszenzmessung, aus der sich die in Abbildung 7 dargestellte Echtzeit-PCR Kurve ergibt. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dazu werden die DNA-Syntheseprodukte auf 68°C erwärmt und langsam

35

(0,2°C/s) auf 95°C erhitzt. Während dieser Zeitspanne wird online die Fluoreszenz ermittelt.

Für das jeweilige DNA-Syntheseprodukt wird eine spezifische Schmelztemperatur erreicht, wodurch sich die angelagerten fluoreszierenden SYBR®-Green Moleküle von den schmelzenden DNA-Strängen ablösen, womit sich die Fluoreszenzausbeute schlagartig verringert. Das Fluoreszenzverhalten wird durch eine spezielle Software in Schmelzkurven umgerechnet, welche dann als erste negative Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur (-dF/dT vs T) graphisch angegeben werden (siehe Abbildung 7).

#### 10 Beispiel 5)

*Nachweis des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) Gens aus cDNA kultivierter Kardiomyozyten der Ratte mittels SYBR®-Green Technik*

Nach Isolation und 48h Kultur adulter Kardiomyozyten der Ratte wurden die Zellen geerntet und unmittelbar in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Mittels standardisierter Verfahren wurde RNA isoliert und aufgereinigt. 2µg RNA und Random-Primer (Roche Diagnostics) werden für 10min bei 70°C erhitzt, um anschließend die reverse Transkription zu initiieren (60min bei 42°C). Es werden zu Random-Primern und RNA Pufferlösung (Promega), dNTPs (1nM, Roche Diagnostics), Rnase Inhibitor (40U, Stratagene) und AMV-Reverse Transkriptase (20U, Promega) hinzupipettiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 95°C für 5min gestoppt.

Im Anschluss wird in eine LightCycler Kapillare das erfindungsgemäße PCR-Gemisch hinzugegeben. Dazu werden je 400nM der spezifischen Oligonukleotid Primer und die entsprechende copyDNA hinzupipettiert (10ng, 1ng und 100pg).

Die PCR-Reaktion wird im Anschluss an eine 15 minütige Denaturierungsphase bei 95°C gestartet. Danach werden 55 Zyklen mit folgendem Ablauf wiederholt: 95°C für 3s, dann 55°C für 7s und 72°C für 12s. Bei 91°C erfolgte bei jedem Zyklus pro Kapillare eine aktuelle Fluoreszenzmessung, aus der sich die in Abbildung 8 dargestellte Echtzeit-PCR Kurve ergibt. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dazu werden die DNA-Syntheseprodukte auf 68°C erwärmt und langsam (0,2°C/s) auf 95°C erhitzt. Während dieser Zeitspanne wird online die Fluoreszenz ermittelt. Für das jeweilige DNA-Syntheseprodukt wird eine spezifische Schmelztemperatur erreicht, wodurch sich die angelagerten fluoreszierenden SYBR®-Green Moleküle von den schmelzenden DNA-Strängen ablösen, womit sich die Fluoreszenzausbeute schlagartig verringert. Das Fluoreszenzverhalten wird durch eine spezielle Software in Schmelzkurven umgerechnet, welche dann als erste negative

Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur ( $-dF/dT$  vs  $T$ ) graphisch angegeben werden (siehe Abbildung 8).

Beispiel 6)

- 5 *Nachweis des alpha skeletalen actin Gens aus cDNA von frisch entnommenen Herzgewebe der Ratte mittels SYBR®-Green Technik*

Nach Explantation des Rattenherzens wurde Biopsiematerial entnommen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Mittels standardisierter  
10 Verfahren wurde RNA isoliert und aufgereinigt. 2µg RNA und Random-Primer (Roche Diagnostics) werden für 10min bei 70°C erhitzt, um anschließend die reverse Transkription zu initiieren (60min bei 42°C). Es werden zu Random-Primern und RNA Pufferlösung (Promega), dNTPs (1nM, Roche Diagnostics), Rnase Inhibitor (40U, Stratagene) und AMV-Reverse Transkriptase (20U, Promega) hinzupipettiert. Die  
15 Reaktion wird durch Erhitzen auf 95°C für 5min gestoppt.

Im Anschluss wird in eine LightCycler Kapillare das erfindungsgemäße PCR-Gemisch hinzugegeben. Dazu werden je 400nM der spezifischen Oligonukleotid Primer und die entsprechende copyDNA hinzupipettiert (10ng, 1ng und 100pg).

Die PCR-Reaktion wird im Anschluss an eine 15 minütige Denaturierungsphase bei 95°C  
20 gestartet. Danach werden 46 Zyklen mit folgendem Ablauf wiederholt: 95°C für 3s, dann 55°C für 7s und 72°C für 15s. Bei 90°C erfolgte bei jedem Zyklus pro Kapillare eine aktuelle Fluoreszenzmessung, aus der sich die in Abbildung 9 dargestellte Echt-Zeit-PCR Kurve ergibt. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dazu werden die DNA-Syntheseprodukte auf 68°C erwärmt und langsam  
25 (0,2°C/s) auf 95°C erhitzt. Während dieser Zeitspanne wird online die Fluoreszenz ermittelt. Für das jeweilige DNA-Syntheseprodukt wird eine spezifische Schmelztemperatur erreicht, wodurch sich die angelagerten fluoreszierenden SYBR®-Green Moleküle von den schmelzenden DNA-Strängen ablösen, womit sich die Fluoreszenzausbeute schlagartig verringert.

30 Das Fluoreszenzverhalten wird durch eine spezielle Software in Schmelzkurven umgerechnet, welche dann als erste negative Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur ( $-dF/dT$  vs  $T$ ) graphisch angegeben werden (siehe Abbildung 9).

Beispiel 7)

- 35 *Nachweis des Albumin Gens aus cDNA von kultivierten Hepatozyten der Ratte mittels SYBR®-Green Technik*

Nach Isolation und 48h Kultivierung von Hepatozyten der Ratte wurden die Zellen geerntet und mittels standardisierter Verfahren wurde RNA isoliert und aufgereinigt. 2µg RNA und Random-Primer (Roche Diagnostics) werden für 10min bei 70°C erhitzt, um anschließend die reverse Transkription zu initiieren (60min bei 42°C). Es werden zu  
5 Random-Primern und RNA Pufferlösung (Promega), dNTPs (1nM, Roche Diagnostics), Rnase Inhibitor (40U, Stratagene) und AMV-Reverse Transkriptase (20U, Promega) hinzupipettiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 95°C für 5min gestoppt.

Im Anschluss wird in eine LightCycler Kapillare das erfindungsgemäße PCR-Gemisch hinzugegeben. Dazu werden je 400nM der spezifischen Oligonukleotid Primer und die  
10 entsprechende copyDNA hinzupipettiert (10ng, 1ng und 100pg).

Die PCR-Reaktion wird im Anschluss an eine 15 minütige Denaturierungsphase bei 95°C gestartet. Danach werden 36 Zyklen mit folgendem Ablauf wiederholt: 95°C für 3s, dann 55°C für 7s und 72°C für 12s. Bei 83°C erfolgte bei jedem Zyklus pro Kapillare eine aktuelle Fluoreszenzmessung, aus der sich die in Abbildung 10 dargestellte Echt-Zeit-PCR  
15 Kurve ergibt. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dazu werden die DNA-Syntheseprodukte auf 68°C erwärmt und langsam (0,2°C/s) auf 95°C erhitzt. Während dieser Zeitspanne wird online die Fluoreszenz ermittelt. Für das jeweilige DNA-Syntheseprodukt wird eine spezifische Schmelztemperatur erreicht, wodurch sich die angelagerten fluoreszierenden SYBR®-  
20 Green Moleküle von den schmelzenden DNA-Strängen ablösen, womit sich die Fluoreszenzausbeute schlagartig verringert. Das Fluoreszenzverhalten wird durch eine spezielle Software in Schmelzkurven umgerechnet, welche dann als erste negative Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur (-dF/dT vs T) graphisch angegeben werden (siehe Abbildung 10).

25

Beispiel 8)

*Nachweis des Transkriptionsfaktors Hepatic Nuclear Factor (HNF) 3 gamma aus cDNA kultivierter Hepatozyten der Ratte mittels SYBR®-Green Technik*

30 Nach Isolation und 48h Kultivierung von Hepatozyten der Ratte wurden die Zellen geerntet und es wurde mittels standardisierter Verfahren RNA isoliert und aufgereinigt. 2µg RNA und Random-Primer (Roche Diagnostics) werden für 10min bei 70°C erhitzt, um anschließend die reverse Transkription zu initiieren (60min bei 42°C). Es werden zu  
35 Random-Primern und RNA Pufferlösung (Promega), dNTPs (1nM, Roche Diagnostics), Rnase Inhibitor (40U, Stratagene) und AMV-Reverse Transkriptase (20U, Promega) hinzupipettiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 95°C für 5min gestoppt.

Im Anschluss wird in eine LightCycler Kapillare das erfindungsgemäße PCR-Gemisch hinzugegeben. Dazu werden je 400nM der spezifischen Oligonukleotid Primer und die entsprechende copyDNA hinzupipettiert (6 mal 100pg).

Die PCR-Reaktion wird im Anschluss an eine 15 minütige Denaturierungsphase bei 95°C gestartet. Danach werden 46 Zyklen mit folgendem Ablauf wiederholt: 95°C für 3s, dann 57°C für 8s und 72°C für 12s. Bei 88°C erfolgte bei jedem Zyklus pro Kapillare eine aktuelle Fluoreszenzmessung, aus der sich die in Abbildung 11 dargestellte Echt-Zeit-PCR Kurve ergibt. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dazu werden die DNA-Syntheseprodukte auf 66°C erwärmt und langsam (0,2°C/s) auf 95°C erhitzt. Während dieser Zeitspanne wird online die Fluoreszenz ermittelt.

Für das jeweilige DNA-Syntheseprodukt wird eine spezifische Schmelztemperatur erreicht, wodurch sich die angelagerten fluoreszierenden SYBR®-Green Moleküle von den schmelzenden DNA-Strängen ablösen, womit sich die Fluoreszenzausbeute schlagartig verringert. Das Fluoreszenzverhalten wird durch eine spezielle Software in Schmelzkurven umgerechnet, welche dann als erste negative Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur (-dF/dT vs T) graphisch angegeben werden (siehe Abbildung 11).

Beispiel 9)

20 *Identifikation des N-Acetyltransferase 2 Allel5\* Genotyps aus humaner lymphozytärer DNA mittels FRET-Verfahren mittels FERT-Technik*

Die N-Acetyltransferase 2 ist in der Verstoffwechslung vieler Arzneimittel involviert. Patienten mit Polymorphismen (Genmutationen durch Basenaustausch oder Deletionen) haben ein erhöhtes Risiko durch Arzneistoffnebenwirkungen vergiftet zu werden.

Nach der Entnahme von Blutproben (200µl Vollblut pro Patient in der Regel in EDTA haltigen Gefäßen, z.B. Monovetten) werden diese bei -20° bis zur Probenaufarbeitung gelagert. Mittels eines DNA Isolations Kits wird die DNA aus den nukleierten Blutzellen isoliert und aufgereinigt. In die gekühlte LightCycler Kapillare wird das beanspruchte PCR-Reaktionsgemisch (siehe Tabelle 1) hinzugegeben. Dazu werden spezifische Oligonukleotidprimer (je 400nM), die Hybridisierungssonden (je 10nM; Donor-Sonde mit Fluoreszein gelabelt, Acceptor-Sonde mit LC-RED 640) und die patientenspezifische DNA (2µl) hinzupipettiert.

Die PCR-Reaktion wird dann mit einer 15 minütigen Denaturierungsphase bei 95°C gestartet. (Im Falle des Lightcycler- DNA Master Hybridisation-Kits betrug die Denaturierungsphase 2min). Danach werden 60 Zyklen mit folgendem Ablauf wiederholt: 95°C für 3s, dann 45°C für 10s und 72°C für 20s. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird

eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dazu werden die entstandenen Syntheseprodukte auf 45°C erwärmt und langsam (0,2°C/s) auf 75°C erhitzt. Während dieser Zeitspanne wird online/Echtzeit die Fluoreszenz ermittelt. Sobald die über der zu detektierenden Mutation liegende Hybridisierungssonde abschmilzt, findet kein Fluorescence Resonance Energy Transfer (siehe oben) mehr statt. Die Fluoreszenz wird durch eine spezielle Software anhand der Schmelzkurven berechnet, welche dann als erste negative Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur (-dF/dT vs T) graphisch angegeben werden (siehe Abbildung 12).

10 Beispiel 10)

*Nachweis des CYP2J3 Gens aus cDNA explantierter Herzen der Ratte mittels SYBR®-Green Technik*

Nach Explantation des Rattenherzens wurden mittels standardisierter Verfahren RNA isoliert und aufgereinigt. 2µg RNA und Random-Primer (Roche Diagnostics) werden für 10min bei 70°C erhitzt, um anschließend die reverse Transkription zu initiieren (60min bei 42°C). Es werden zu Random-Primern und RNA Pufferlösung (Promega), dNTPs (1nM, Roche Diagnostics), Rnase Inhibitor (40U, Stratagene) und AMV-Reverse Transkriptase (20U, Promega) hinzupipettiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 95°C für 5min gestoppt.

Im Anschluss wird in eine LightCycler Kapillare das erfindungsgemäße PCR-Gemisch hinzugegeben. Dazu werden je 400nM der spezifischen Oligonukleotid Primer und die entsprechende copyDNA hinzupipettiert (10ng und 1ng).

Die PCR-Reaktion wird im Anschluss an eine 2 minütige Denaturierungsphase bei 95°C gestartet. Danach werden 55 Zyklen mit folgendem Ablauf wiederholt: 95°C für 0s, dann 57°C für 8s und 72°C für 12s. Bei 86°C erfolgte bei jedem Zyklus pro Kapillare eine aktuelle Fluoreszenzmessung, aus der sich die in Abbildung 18 dargestellte Echt-Zeit-PCR Kurve ergibt. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dazu werden die DNA-Syntheseprodukte auf 64°C erwärmt und langsam (0,2°C/s) auf 98°C erhitzt. Während dieser Zeitspanne wird online die Fluoreszenz ermittelt.

Für das jeweilige DNA-Syntheseprodukt wird eine spezifische Schmelztemperatur erreicht, wodurch sich die angelagerten fluoreszierenden SYBR®-Green Moleküle von den schmelzenden DNA-Strängen ablösen, womit sich die Fluoreszenzausbeute schlagartig verringert. Das Fluoreszenzverhalten wird durch eine spezielle Software in Schmelzkurven umgerechnet, welche dann als erste negative Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur (-dF/dT vs T) graphisch angegeben werden (siehe Abbildung 18).

### Einstellung des optimalen PCR-Reaktionsgemisches

5 a) *Einstellung der optimalen SYBR®-Green-Konzentration*

Getestet wurden SYBR®-Green Verdünnungen von 1:2.000 bis 1:2.000.000 aus der SYBR®-Green Stammlösung. Es wurde die sarcoplasmatischen Calcium-ATPase aus gewonnener cDNA des humanen Herzens amplifiziert. Die genauen Versuchsbedingungen sind unter Beispiel 2 beschrieben. Der größte meßbare Fluoreszenzanstieg und damit das beste Ergebnis wurde bei einer Verdünnung von 1:20.000 erzielt. Dadurch wird die Dynamik während der Amplifikation und beim Abschmelzen bei einer Verdünnung von 1:20.000 am größten, so dass auch bei der Schmelzpunktanalyse die Amplitude der durch den Einsatz einer SYBR®-Green-Verdünnung von 1:20.000 erzeugten Schmelzkurve am höchsten ist, wodurch eindeutige Befundungen erzielt werden. Andere  
10 Verdünnungsstufen, die über oder unter der Verdünnung von 1:20.000 lagen, ergaben deutlich schlechtere Ergebnisse, bishin zur fehlenden Detektion (siehe Abbildung 13).

b) *Einstellung der optimalen MgCl<sub>2</sub>-Konzentration*

20 Eine Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 1,5mM über 3mM auf 5mM führte zu einer konsequenten Verkürzung des Beginns der exponentiellen (log) DNA-Synthese, wie anhand der geringeren PCR-Zykluszahlen dokumentiert wird (siehe Abbildung 13). Eine zusätzliche Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration auf 7mM führte zu keiner Verbesserung in der Analytik. Fluoreszenzanstiegs.

25 Die Amplituden (Höhe) der entstandenen Schmelzkurven sind bei einer MgCl<sub>2</sub> Konzentration von 3, 5 und 7mM vergleichbar. Die beobachtete Verschiebung der Schmelzkurven zu höheren Temperaturen ist auf die veränderte MgCl<sub>2</sub>-Konzentration zurückzuführen (siehe Abbildung 14).

30 c) *Einstellung der optimalen BSA-Konzentration*

Das beste Ergebnis ließ sich bei einer Konzentration von ca. 500µg/ml BSA erzielen (siehe Abb. 16). Bei dieser Konzentration ist die Dynamik des Fluoreszenzanstiegs und des Abschmelzens am größten. Im Gegensatz zu den Roche Diagnostics und QuantiTect Qiagen Kits entstehen im erfindungsgemäßen Verfahren bei einer BSA-Konzentration von  
35 500µg/ml in der PCR-Reaktion keine unspezifischen Primer-Dimere, die zu einer Fehlbeurteilung führen können. Wenn die BSA-Konzentration nicht exakt eingestellt ist, kommt es zu ausgeprägten Primer-Dimer-Bildungen (siehe Abbildung 15).

d) *Abhängigkeit der verwendeten Taq-Polymerase*

Es wurden Taq DNA Polymerasen von verschiedenen Herstellern (TaqDNA-Polymerase von Roche Diagnostics, Taq DNA Polymerase von Life Technologies, PCR Supermix von  
5 Life Technologies, Platinum Taq Polymerase von Life Technologies, Taq DNA Polymerase von Promega, Taq DNA Polymerase von TaKaRa, Taq DNA Polymerase von Qiagen, HotStart Taq DNA Polymerase Mastermix von Qiagen) untersucht. Mit Taq-Polymerasen anderer Anbieter ist unser beanspruchtes Hersteller auch durchführbar.

10 e) *Abhängigkeit von der eingesetzten Unitmenge an Taq-Polymerase*

Getestet wurde die Unitmenge 5U, 2.5U, 2.0U, 1.5U, 1.0U, 0.9U und 0.5U. Wie aus  
Abbildung 17 ersichtlich ließen sich mit unserem beanspruchten Verfahren mit den  
Unitmengen 0.9U bis 2.5 U gleich gute Ergebnisse erzielen. Auch mit 0.5U  
TaqPolymerase / Reaktion konnte die Reaktion ohne Einbußen in der Spezifität  
15 durchgeführt werden, lediglich der dynamische Amplifikationsanstieg war zu etwas  
höheren Zykluszahlen verschoben (siehe Abb. 17).

Der Tabelle 1) ist eine vergleichende Darstellung der Zusammensetzung des  
20 erfindungsgemäßen PCR-Reaktionsgemisches unter Verwendung des HotStarTaq Master  
Mix von Qiagen GmbH (HotStart Variante) und der Standard-PCR Variante (s.o.) mit den  
kommerziell angebotenen Kits der Roche Diagnostics GmbH und Qiagen (QuantiTect) zu  
entnehmen.

25 In Tabelle 2) sind die Vorteile der Erfindung und die Nachteile der Kits des Standes der  
Technik (Roche Diagnostics GmbH) dargestellt.

**Anmerkungen zum QuantiTect SYBR®-Green PCR Kit der Firma Qiagen**

Im Vergleich zum Verfahren mit einem erfindungsgemäßen Gemisch (HotStart und  
30 normale PCR Variante) wurden deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt (siehe Abb.19). Bei  
der Amplifikation des CYP 1A1 Gens aus cDNA kultivierter Hepatozyten war die  
Fluoreszenzausbeute des QuantiTect Verfahrens etwa 10 fach geringer im Vergleich zum  
erfindungsgemäßen Verfahren. Während erfindungsgemäß keine unspezifischen Primer-  
Dimere entstehen, konnte bei der Nutzung des QuantiTect Verfahrens die quantitativ  
35 bedeutsame Bildung unspezifischer Dimere beobachtet werden, wodurch  
Fehlbeurteilungen möglich sind, zumindest aber die quantitative Bewertung der  
Genexpression beeinträchtigt wird und damit definitiv falsche Ergebnisse erzielt werden.

Die Schmelzhügel der spezifischen Produkte waren im erfindungsgemäßen Verfahren deutlich höher, so dass bei höheren Temperaturen (höhere Spezifität) höhere Fluoreszenzausbeuten bessere und exaktere Befundungen im Vergleich zu dem QuantiTect Verfahren der Firma Qiagen gezeigt werden können (siehe auch Abb. 19). Eine genaue

5 Befundung unter Benutzung des QuantiTect Systems ist so gut wie unmöglich, da Schmelzhügel der spezifischen Produkte und Primer Dimere sehr eng zusammen liegen (innerhalb von 1-2°C), wodurch erhebliche Risiken in der Beurteilung der Genamplifikationsprodukte entstehen. Nach Rücksprache mit dem technischen Service der Firma Qiagen wurde berichtet, daß die spezifischen Produkte im Vergleich zu dem Roche

10 Kit ca. 3 - 8°C niedriger liegen. Da potentiell entstehende Primer Dimere gewöhnlich bei Temperaturen von 70 - 80°C abschmelzen, ist eine exakte Identifizierung bei den meisten der amplifizierten Gene aufgrund des zu niedrigeren Temperaturen verschobenen Schmelzhügels unter Nutzung des QuantiTect Systems nicht möglich. Ein typisches Beispiel liefert Abbildung 19. Eine Gen-Amplifizierung ist laut Produktinformation des

15 QuantiTect Verfahrens der Firma Qiagen nur möglich, wenn die Denaturierungsphase innerhalb eines PCR-Zyklusses mindestens 15s beträgt und die Annealingphase mindestens 20s. Dadurch kann der zeitliche Ablauf im Vergleich zu dem beanspruchten Verfahren um bis zu 100% verlängert werden (siehe auch QuantiTect SYBR®-Green PCR Handbook, Stand Juni 2001, Firma Qiagen).

20

### **Beschreibungen der Abbildungen**

Abbildung 1) Darstellung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Prinzips.

25 Fluoreszenz-gelabelte Hybridisierungssonden binden an die komplementäre DNA. Im Falle eines Nukleotidpolymorphismus (siehe Markierung) hat die entsprechende Hybridisierungssonde ein anderes Schmelzverhalten und der Nukleotidpolymorphismus wird somit detektiert.

30 Abbildung 2) Darstellung des SYBR-Green I Labelings. Der fluoreszierende Farbstoff SYBR®-Green I interkaliert zwischen doppelsträngige DNA und die PCR-synthetisierte DNA-Menge korreliert mit dem zunehmenden Fluoreszenzsignal.

Abbildung 3) Schmelzkurvenanalyse nach Amplifikation des Transkriptionsfaktors HNF3

35  $\alpha$  aus cDNA kultivierter Hepatozyten der Ratte. Die Abbildung dokumentiert die Bildung von unspezifischen Primer-Dimeren nach Verwendung des Roche Diagnostics-LightCycler-FastStart-DNA-Master-Hybridisation Probes-Kits. In der erfindungsgemäßen

Verwendung kann gezeigt werden, dass unter sonst gleichen Bedingungen die Bildung von unspezifischen Primer-Dimeren unterdrückt wird. Die Bildung von unspezifischen Primer-Dimeren kann zu Fehldiagnosen und Fehlinterpretationen führen.

5 Abbildung 4) Nachweis einer Genpolymorphie in Morbus Meulengracht Patienten. Mittels FRET-Technologie wurde der Wildtyp des UGT1A1 Gens diagnostiziert. Mit dem beanspruchten Verfahren kann aus 1pg eingesetzter lymphozytärer DNA die Genpolymorphie, die dem Morbus Meulengracht zugrunde liegen eindeutig identifiziert werden, so dass das erfindungsgemäße Gemisch im Vergleich zu den Roche Diagnostic  
10 Kits eine 10.000fach höhere Sensitivität aufweist.

Abbildung 5) Nachweis der sarcoplasmatischen Calcium-ATPase aus gewonnener cDNA von humanen Herzen unter Einsatz des beanspruchten Verfahrens.. Die Abbildung zeigt die Amplifikation und die Schmelzkurve dieses Gens. Mit dem erfindungsgemäßen  
15 Gemisch werden wesentlich höhere Fluoreszenzausbeuten erzielt, die eine verbesserte und quantitative Befundung des krankheitsrelevanten Genes ermöglicht.

Abbildung 6) Nachweis des beta-myosin-heavy-chain- (MHC) Gens aus gewonnener cDNA von humanem Herzgewebe unter Einsatz des erfindungsgemäßen Gemisches. Die  
20 Abbildung zeigt die Amplifikation und die Schmelzkurvenanalyse dieses Gens bei Einsatz von 3 verschiedenen Ausgangsverdünnungen der cDNA.

Abbildung 7) Nachweis des brain natriuretic peptide (BNP) Gens aus gewonnener cDNA von humanem Herzgewebe. Die Abbildung zeigt die Amplifikation und die  
25 Schmelzkurvenanalyse dieses Gens bei Einsatz von 3 verschiedenen Ausgangsverdünnungen der cDNA..

Abbildung 8) Nachweis des atrialen natriuretischen Peptid (ANP) Gens aus cDNA von kultivierten Kardiomyozyten der Ratte unter Einsatz des beanspruchten Verfahrens. Die  
30 Abbildung zeigt die Amplifikation und die Schmelzkurvenanalyse dieses Gens bei Einsatz von 3 verschiedenen Ausgangsverdünnungen der cDNA.

Abbildung 9) Nachweis des alpha skelettalen Aktin Gens aus cDNA von kultivierten  
35 Kardiomyozyten der Ratte unter Einsatz des erfindungsgemäßen Gemisches. Die Abbildung zeigt die Amplifikation und die Schmelzkurvenanalyse dieses Gens bei Einsatz von 3 verschiedenen Ausgangsverdünnungen der cDNA.

Abbildung 10) Nachweis des Albumin Gens aus cDNA von kultivierten Hepatozyten der Ratte unter Einsatz des beanspruchten Verfahrens. Die Abbildung zeigt die Amplifikation und die Schmelzkurvenanalyse dieses Gens bei Einsatz von 3 verschiedenen Ausgangsverdünnungen der cDNA.  
5

Abbildung 11) Nachweis des Transkriptionsfaktors HNF-3gamma aus cDNA von kultivierten Hepatozyten der Ratte unter Einsatz des erfindungsgemäßen Gemisches. Die Abbildung zeigt die Amplifikation und die Schmelzkurvenanalyse dieses Gens bei Einsatz von 3 verschiedenen Ausgangsverdünnungen der cDNA.  
10

Abbildung 12) Nachweis des N-Acetyltransferase 2 Allel 5\* Genotyps aus humaner lymphozytärer DNA mit FRET-Hybridisierungssonden unter Einsatz des beanspruchten Verfahrens. Das beanspruchte Verfahren ermöglicht die exakte Zuordnung von Wildtyp und mutierten Genotypen. Im Falle einer Gen-Mutation schmilzt die Hybridisierungssonde 8°C niedriger ab, womit eine exakte Zuordnung der Genotypen ermöglicht wird.  
15

Abbildung 13) Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit des eingesetzten SYBR®-Green I Labelings im beanspruchten Verfahren. Bei einer Konzentration von 1:20000 wurde das beste Ergebnis erzielt.  
20

Abbildung 14) Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit des eingesetzten MgCl<sub>2</sub> im beanspruchten Verfahren. Bei einer Konzentration von 5mM wurde das beste Ergebnis erzielt.  
25

Abbildung 15) Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit des eingesetzten BSA (bovines Serum Albumin) im erfindungsgemäßen Gemisch.

Abbildung 16) Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit des eingesetzten BSA (bovines Serum Albumin) im erfindungsgemäßen Gemisch. Es wurden die Konzentrationen 400µg/ml bis 2000µg/ml in engen Abständen untersucht. Bei einer Konzentration von 500µg/ml wurde das beste Ergebnis erzielt.  
30

Abbildung 17) Darstellung der Abhängigkeit der verwendeten Unitmenge an Taq-DNA Polymerase. Getestet wurden die Mengen 0.5U bis 5U. Bei einer Konzentration von 0.9U Taq-Polymerase konnten die besten Ergebnisse erzielt werden.  
35

Abbildung 18) Nachweis des CYP2J3 Gens aus cDNA explantierter Rattenherzen unter Einsatz des beanspruchten Verfahrens. Die Abbildung zeigt die Amplifikation und die Schmelzkurvenanalyse dieses Gens unter Verwendung von 2 verschiedenen Ausgangsverdünnungen der cDNA.

5

Abbildung 19) Vergleich des Verfahrens mit einem erfindungsgemäßen Gemisch mit dem QuantiTect Verfahren der Firma Qiagen. Wie aus Abbildung 19 ersichtlich, ist die Sensitivität und Genauigkeit der Erfindung deutlich überlegen. Eine Identifizierung von Genamplifikaten unter Nutzung des QuantiTect Verfahrens der Firma Qiagen ist aufgrund  
10 ähnlicher Schmelzhügel von spezifischen Produkt und Primer Dimeren nicht möglich. Unter Verwendung des erfindungsgemäßen Gemisches ist eine Identifizierung ohne Probleme durchführbar.

Tabelle 1

Verfahren	Roche Diagnostics GmbH Standard- und HotStart Methode	QuantiTect SYBR Green PCR Qiagen nur HotStart Methode	erfindungsgemäßes PCR-Gemisch Standard-Verfahren	erfindungsgemäßes PCR-Gemisch HotStart Verfahren
Farbstoff labeling SYBR®-Green	verschiedene Puffer dATP, dCTP, dGTP dUTP TAQ DNA polymerase MgCl <sub>2</sub> SYBR® Green	HotStarTaq DNA Polymerase TrisCl KCl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MgCl <sub>2</sub> dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP SYBR® Green I and ROX	DNA TAQ Polymerase 0,9 Units 10mM Tris-Cl pH 8.3, 50mM KCl MgCl <sub>2</sub> 5mM, dNTPs (200 µM) Bovines Serum Albumin (500µg/ml) SYBR®-Green I (Verd. 1:20000)	HotStar TAQ Polymerase Mastermix (Qiagen) (HotStarTaq DNA Polymerase 0.9 U, Tris-Cl, KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH8,7, MgCl <sub>2</sub> 1,5mM,dNTPs, 200 µM) Bovines Serum Albumin (500µg/ml) SYBR®-Green I (Verd. 1:20000) MgCl <sub>2</sub> (Endkonzentration 5mM)
FRET	verschiedene Puffer dATP, dCTP, dGTP dUTP TAQ DNA polymerase MgCl <sub>2</sub> Hybridisierungssonden	nicht erhältlich	DNA TAQ Polymerase 0,9 Units 10mM Tris-Cl pH8.3, 50mM KCl MgCl <sub>2</sub> 5mM, dNTPs (200 µM) Bovines Serum Albumin (500µg/ml) Hybridisierungssonden	HotStar TAQ Polymerase Mastermix (Qiagen) (HotStarTaq DNA Polymerase 0.9 U Tris-Cl, KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH8,7, HotStarTaq DNA Polymerase MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs, 200 µM) Bovines Serum Albumin (500µg/ml) MgCl <sub>2</sub> (Endkonzentration 5mM) Hybridisierungssonden

**Tabelle 2**

	<b>QuantiTect Qiagen Kit</b>	<b>Roche Diagnostics Kits</b>	<b>Erfindung</b>
<b>Verfahren</b>	Sensitivität: detektierbare DNA / cDNA Menge	Sensitivität: detektierbare DNA / cDNA Menge	Sensitivität: detektierbare DNA / cDNA Menge
<b>FRET-Verfahren</b>	nicht möglich	LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	Verfahren mit erfindungsgemäßigem Gemisch: 10.000-fach höhere Sensitivität zum Roche Verfahren (1pg DNA)
<b>SYBR-Green Verfahren</b>		LightCycler-DNA Master Hybridization Probes	Verfahren mit erfindungsgemäßigem Gemisch: 10-fach höhere Sensitivität (1pg DNA)
		LightCycler-DNA Master SYBR Green I:	Verfahren mit erfindungsgemäßigem Gemisch: 7-fach höhere absolute Fluoreszenzausbeute (1pg) (siehe Abbildung 4)
<b>Primer-Dimer Bildung</b>	10ng teilweise ausgeprägte Primer-Dimer Bildungen, die zu Fehlinterpertation und irrtümlichen Befundungen führen können.	1pg teilweise ausgeprägte Primer-Dimer Bildungen, die zu Fehlinterpertation und irrtümlichen Befundungen führen können.	7-fach höhere absolute Fluoreszenzausbeute (1pg) Durch das von uns beanspruchte Verfahren wird die Primer-Dimer-Bildung unterdrückt.
<b>Schmelzkurven-Verhalten</b>	breitere und niedrigere (ungenauere) Schmelzkurvenpeaks, die zu Fehlbeurteilungen führen können.	breitere und niedrigere (ungenauere) Schmelzkurvenpeaks, die zu Fehlbeurteilungen führen können.	Aufgrund des verbesserten Schmelzverhaltens unter Verwendung des erfindungsgemäßes Gemischs kann aus der ersten negativen Ableitung (-d(F1)/dT) eine höhere Sensitivität und wie aus Abbildung 3 und 4 ersichtlich eine exakte Zuordnung der DNA-Syntheseprodukte im Vergleich zu den Roche Diagnostics Produkten erzielt werden. Die Schmelzkurvenamplifunde ist im Vergleich zu den Roche Diagnostik Produkten bis zu 400% höher. (siehe Abbildung 4).
<b>Dynamik der Amplifikation (in der log-linearen Phase)</b>	niedriger als unter Verwendung des erfindungsgemäßes Gemischs	niedriger als unter Verwendung des erfindungsgemäßes Gemischs (0,5 Fluoreszenzeinheiten pro PCR-Zyklus)	unter Verwendung des erfindungsgemäßes Gemischs 4-fach höher als bei Roche Diagnostic Kits (2,0 Fluoreszenzeinheiten pro PCR-Zyklus) (siehe Abbildung 4)
<b>Kosten</b>			
<b>SYBR-Green Format</b>	ca. 4DM / Probe	3,75 - 4,13DM / Probe	075DM/ Probe HotStart Variante; ca. 0.13 DM / Probe Standard Methode
<b>FRET-Format</b>	nicht möglich	3,50 - 3,84DM / Probe	0,75DM/ Probe HotStart Variante; ca. 0.13 DM / Probe Standard Methode

**Patentansprüche**

1. PCR-Reaktionsgemisch für Fluoreszenz-basierende Genexpressions- und  
5 Genmutationsanalysen umfassend
  - eine beliebige Taq-Polymerase,
  - BSA (Bovines Serum Albumin), welches im Reaktionsgemisch mit einer maximalen Endkonzentration von 400 bis 800 µg/ml vorliegt,
  - eine hohe Menge an MgCl<sub>2</sub> in Abhängigkeit der eingesetzten Taq-  
10 Polymerase mit einer maximalen Endkonzentration von > 3,5 mM bis 5 mM im Reaktionsgemisch sowie
  - ein fluoreszierendes Material.
  
2. PCR-Reaktionsgemisch nach Anspruch 1 umfassend  
15
  - BSA in einer Endkonzentration von 400 bis 600 µg/ml, vorzugsweise 500 µg/ml, und
  - MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 5 mM.
  
3. PCR-Reaktionsgemisch nach Anspruch 1 oder 2 gekennzeichnet durch die  
20 folgenden Reaktionskomponenten:
  - Tris-Cl, KCl, dNTPs, ggf. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
  - DNA Taq-Polymerase,
  - MgCl<sub>2</sub>,
  - BSA,
  - 25 • SYBR®-Green I oder FRET-markierte Fluoreszenzsonden.
  
4. PCR-Reaktionsgemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch  
gekennzeichnet, dass das fluoreszierende Material in einer hohen Verdünnung, ca.  
mehr als das 15000-fache, vorliegt.  
30
  
5. PCR-Reaktionsgemisch nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das  
fluoreszierende Material in ca. 20.000-facher Verdünnung vorliegt.
  
6. Verwendung eines PCR-Reaktionsgemisches gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5  
35 zur Fluoreszenz-basierenden Genexpressions- und Genmutationsanalyse, wobei  
DNA oder RNA aus biologischen Materialien isoliert und, ggf. nach vorheriger  
Bearbeitung, mit spezifischen Oligonukleotidprimern in Kontakt gebracht wird und

anschließend in Abhängigkeit des Farbstoff-Labelings oder der Sonden die Auswertung erfolgt, vorzugsweise nach dem SYBR®-Green- oder nach dem FRET-Verfahren.

- 5 7. Verwendung nach Anspruch 6 zum Nachweis von Nukleotid-Polymorphismen; für die Charakterisierung von potentiellen Arzneistoffen auf der Genexpressionsebene; zur Pharmakogenomic und Toxikogenomic; zur molekularen Diagnostik; zur Erkennung von molekularen Interaktionen von Stoffen, Stoffgemischen und biologischen Agenzien auf der Genomebene, zur Erkennung von Gen-Interaktionen  
10 und Funktionsanalyse neuer Gene, einschließlich Sequenzanalysen und Genklonierungen.
8. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zum Nachweis einer Genpolymorphie in Morbus Meulengracht Patienten.
- 15 9. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zum Nachweis der sarcoplasmatischen Calcium-ATPase aus gewonnener cDNA von humanen Herzen.
10. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zum Nachweis des beta-myosin-heavy-chain-  
20 (MHC) Gens aus gewonnener cDNA von humanem Herzgewebe.
11. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zum Nachweis des brain natriuretic peptide (BNP) Gens aus gewonnener cDNA von humanem Herzgewebe.
- 25 12. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zum Nachweis des atrialen natriuretischen Peptid (ANP) Gens aus cDNA von kultivierten Kardiomyozyten.
13. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zum Nachweis des alpha skelettalen Aktin Gens aus cDNA von kultivierten Kardiomyozyten.
- 30 14. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zum Nachweis des Albumin Gens aus cDNA von kultivierten Hepatozyten.
15. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zum Nachweis des Transkriptionsfaktors  
35 HNF-3gamma aus cDNA von kultivierten Hepatozyten.

16. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zum Nachweis des N-Acetyltransferase 2 Allel 5\* Genotyps aus humaner lymphozytärer DNA.
  17. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zum Nachweis des CYP2J3 Gens aus cDNA explantierter Rattenherzen.
- 5

Abbildung 1

# Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) *Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)*

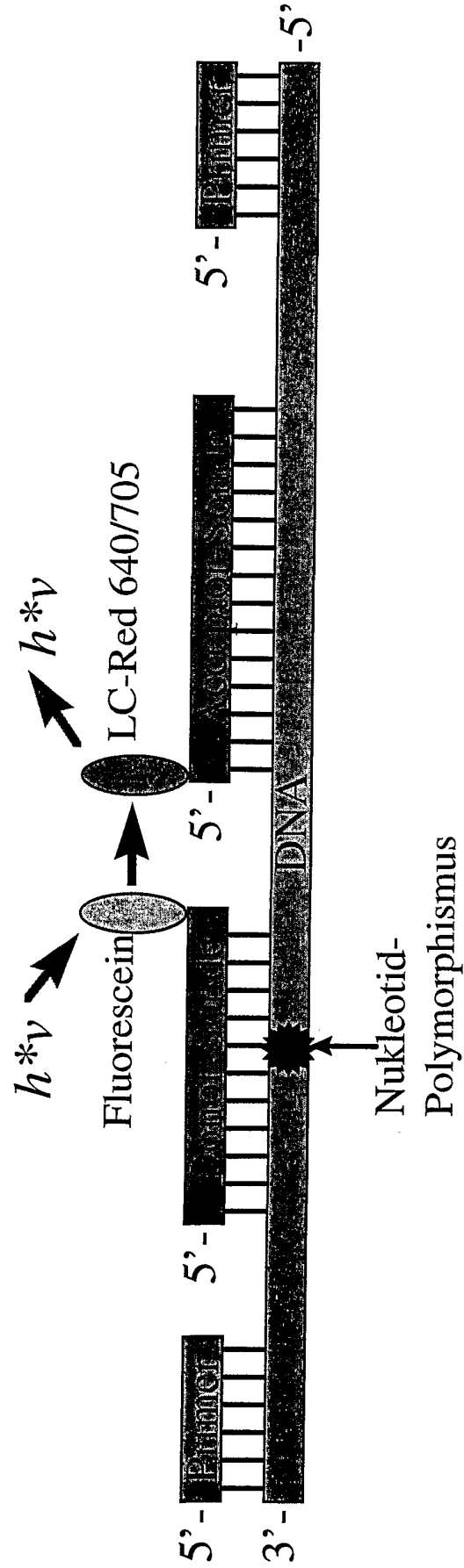
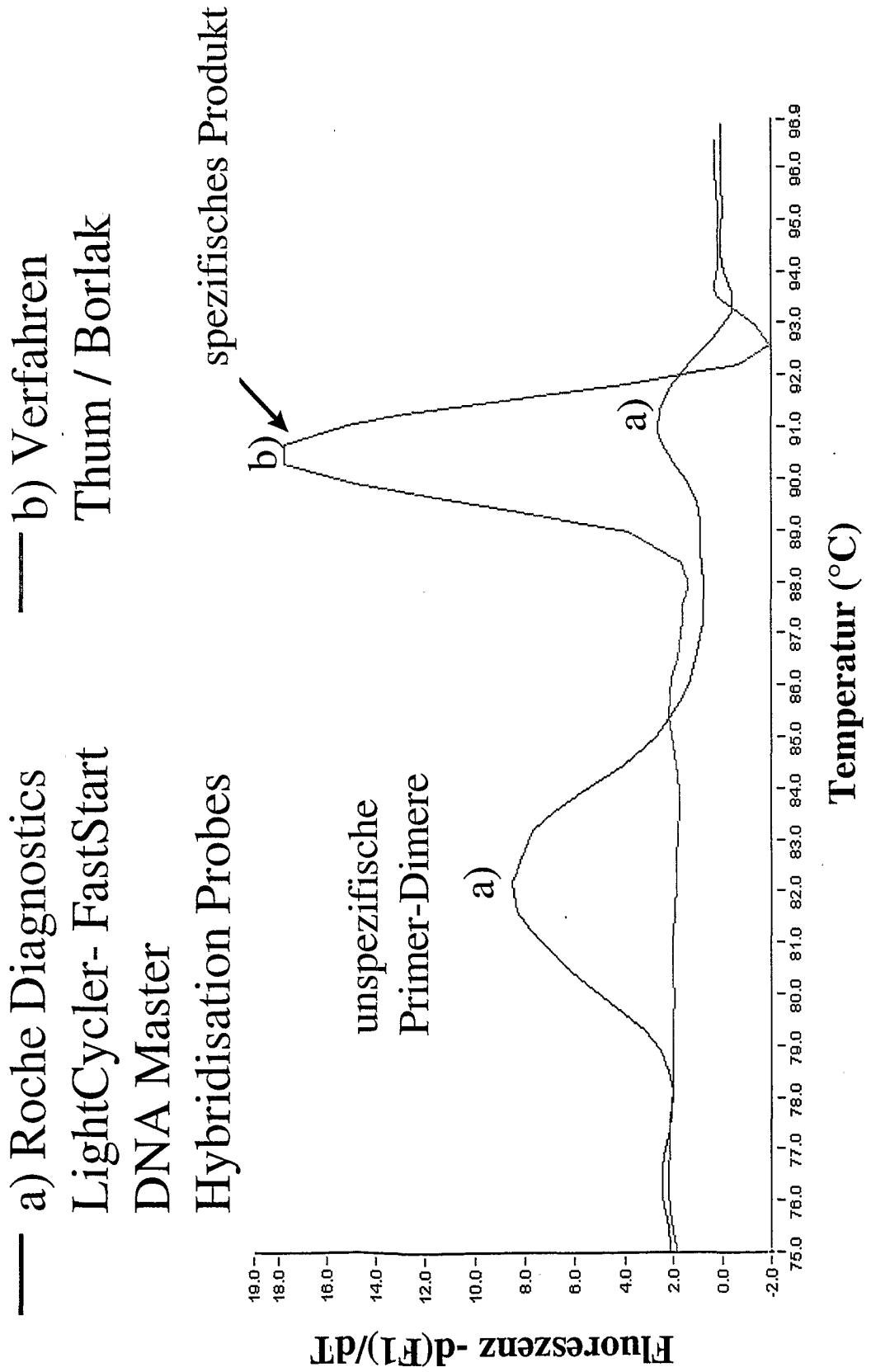




Abbildung 3 Primer-Dimer Bildung



# Verfahren Thum/Borlak

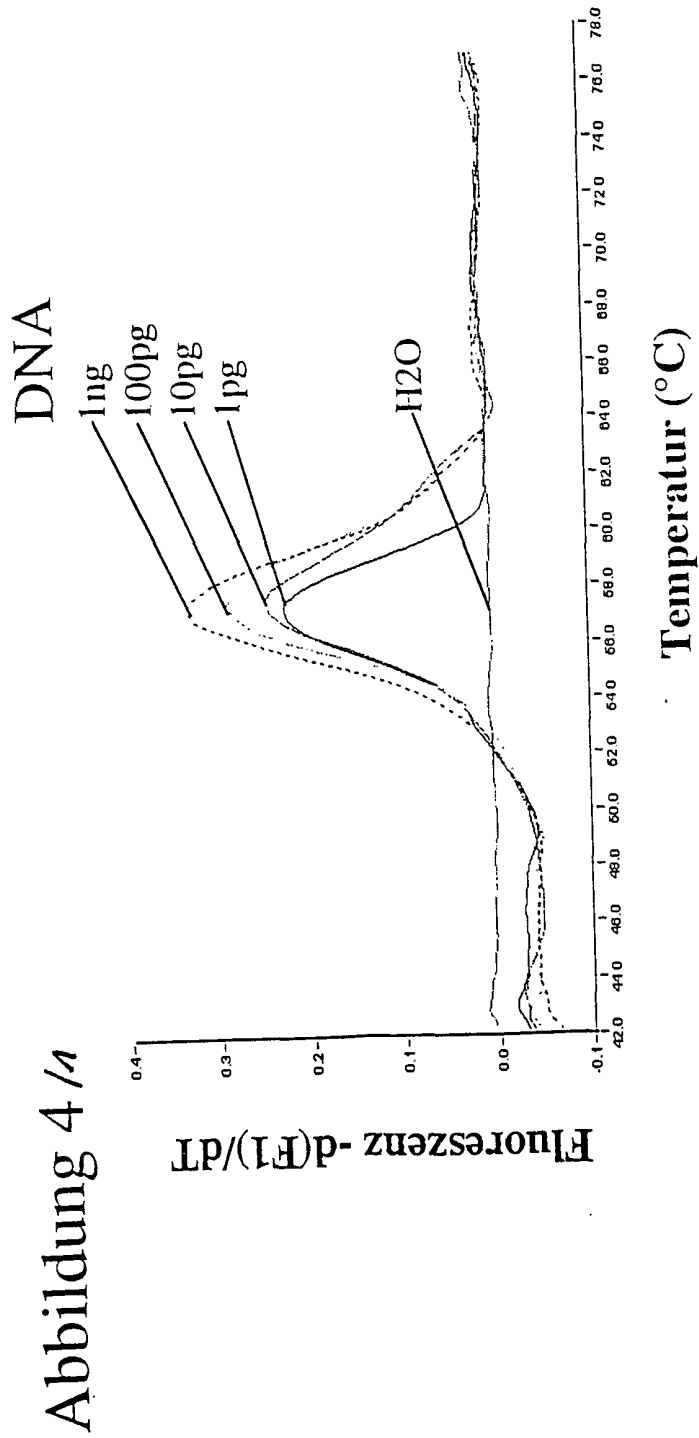


Abbildung 4 /2

# Roche Diagnostics LightCycler- FastStart DNA Master Hybridisation Probes

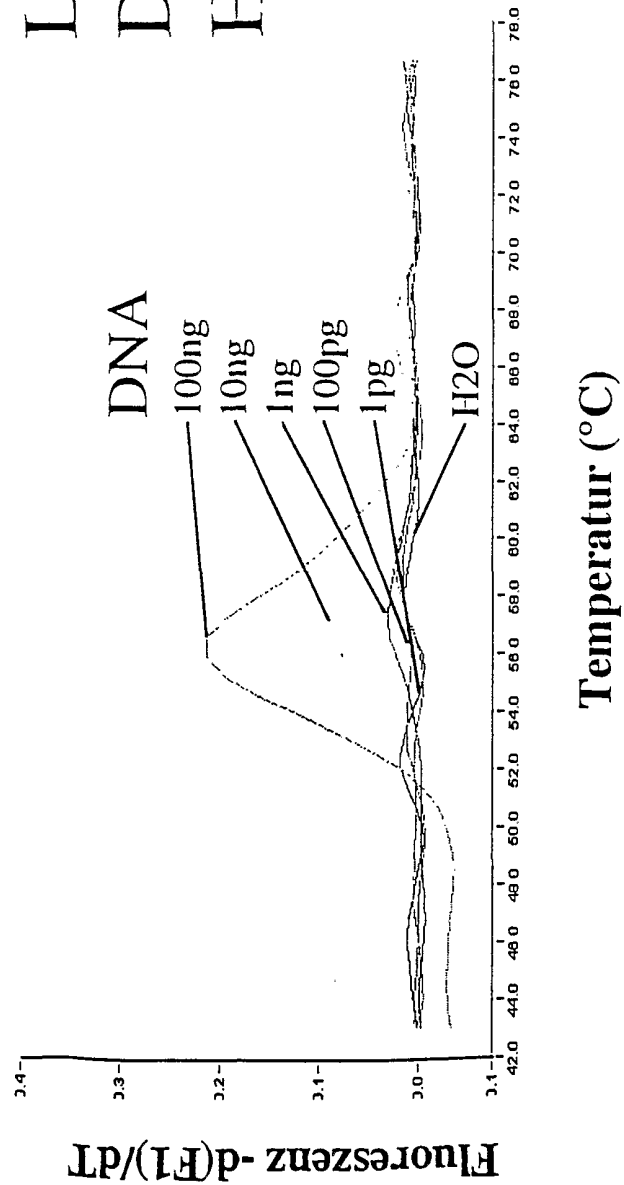


Abbildung 5/1

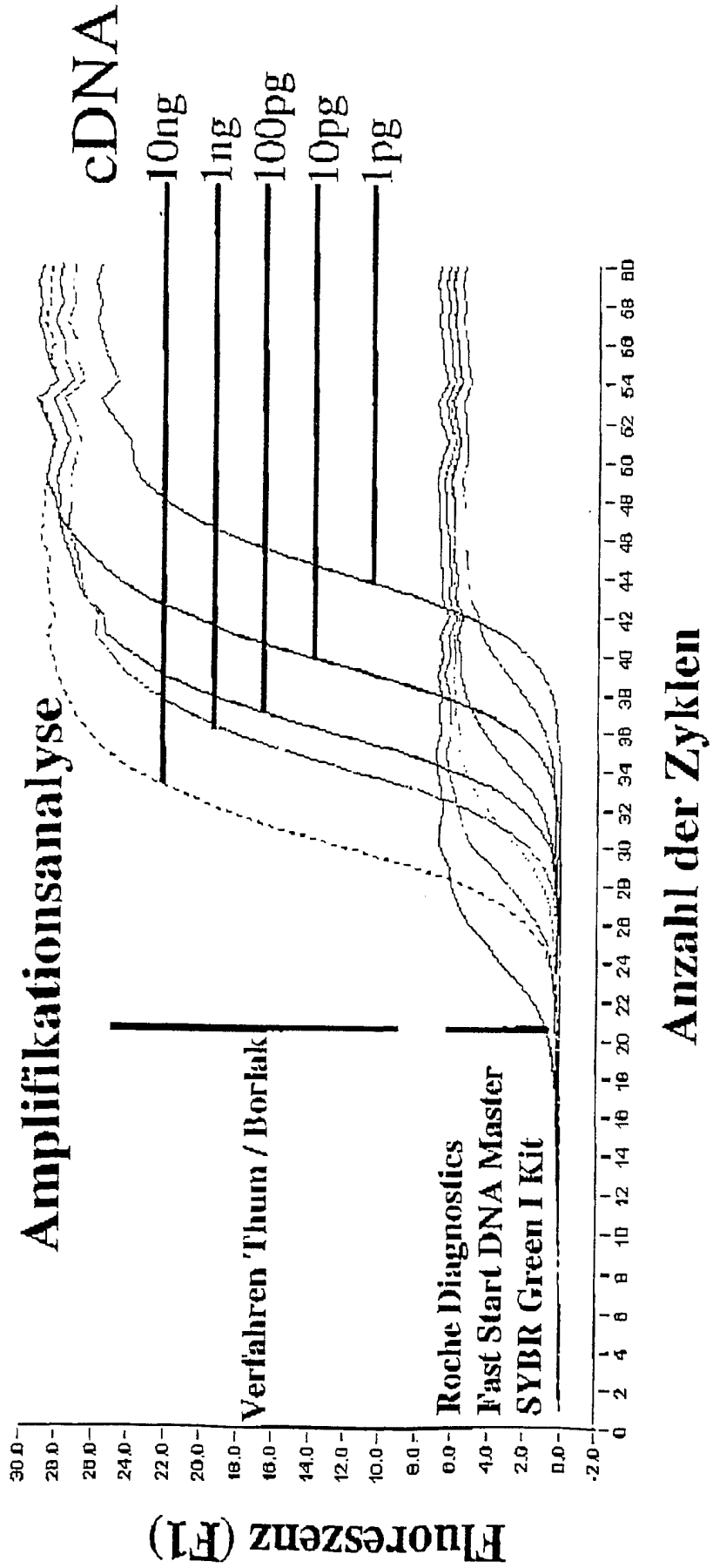


Abbildung 5 / 2

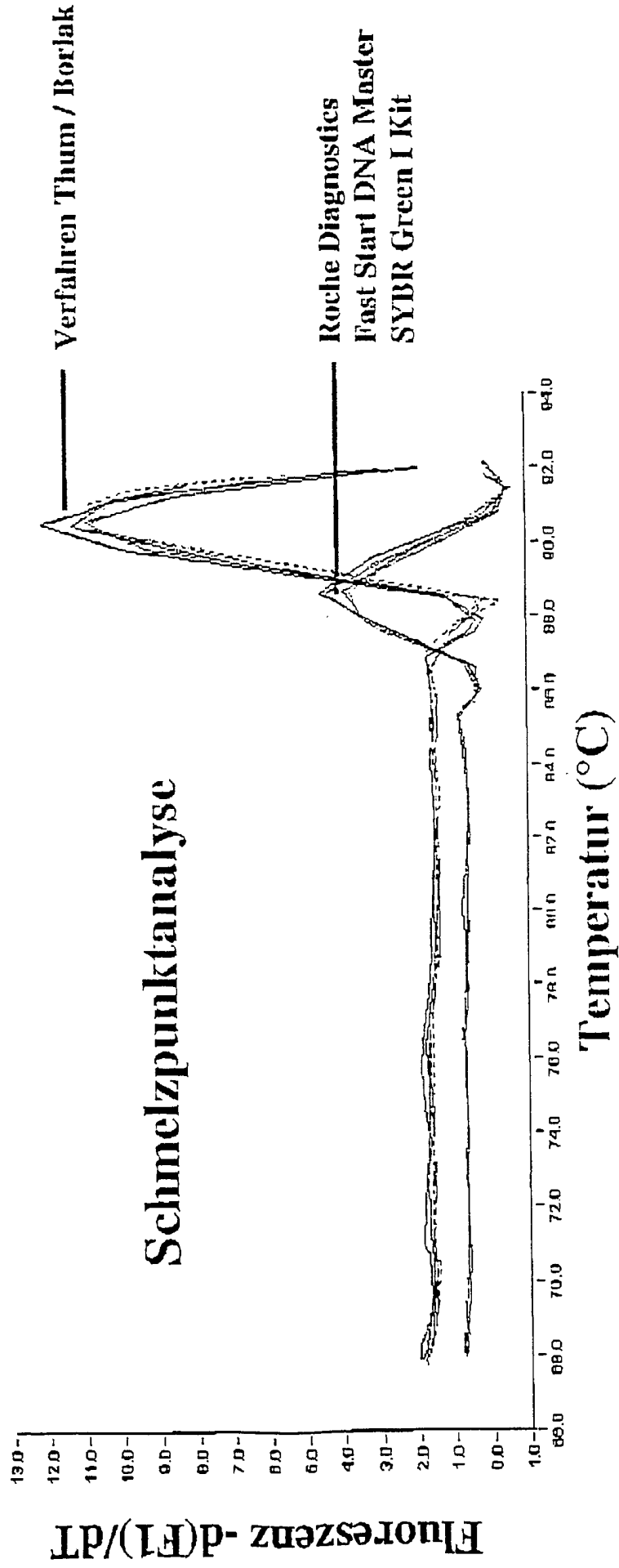


Abbildung 6 1/1

Nachweis des beta-MHC-Gens im humanen Herzen

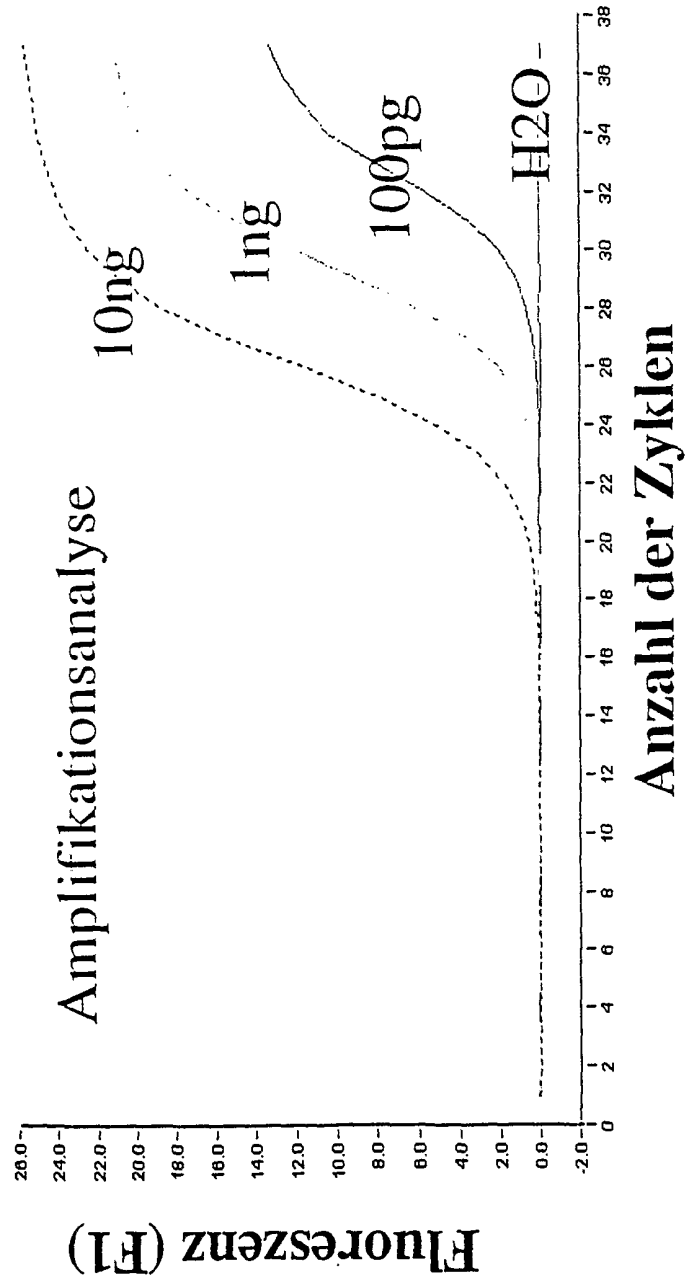


Abbildung 6 12

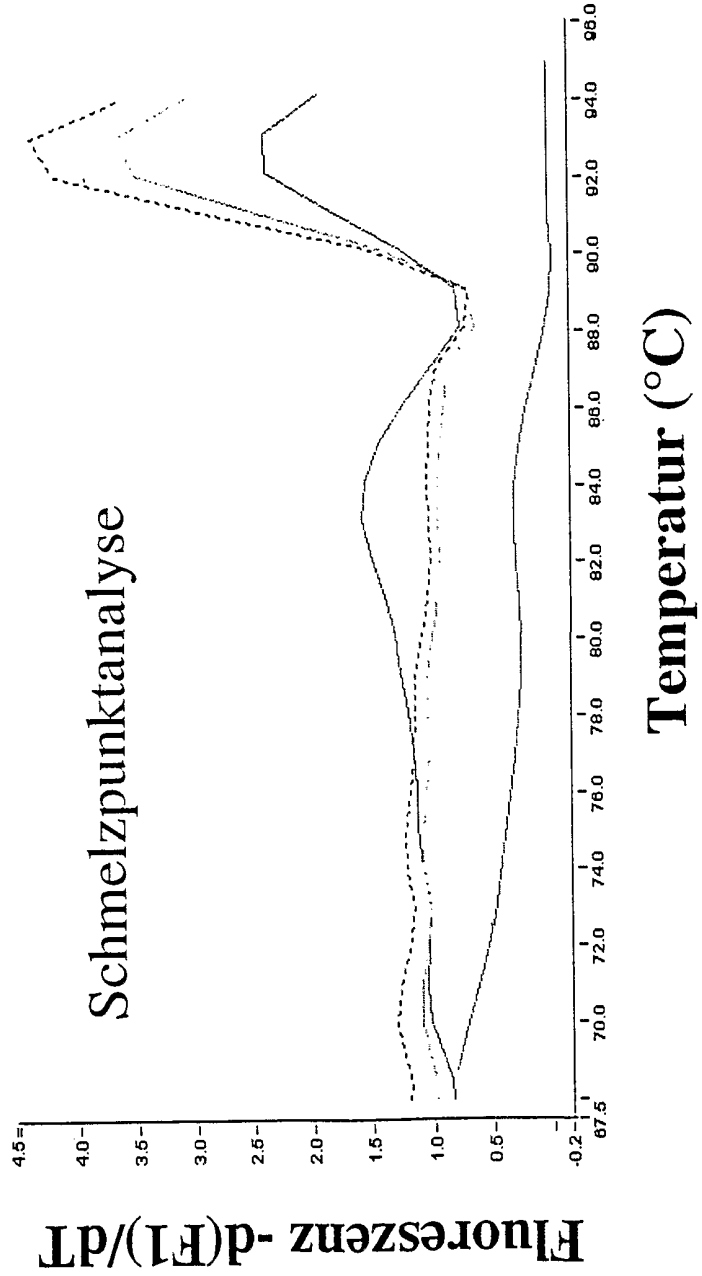


Abbildung 7 1a

Nachweis des BNP-Gens im humanen Herzen

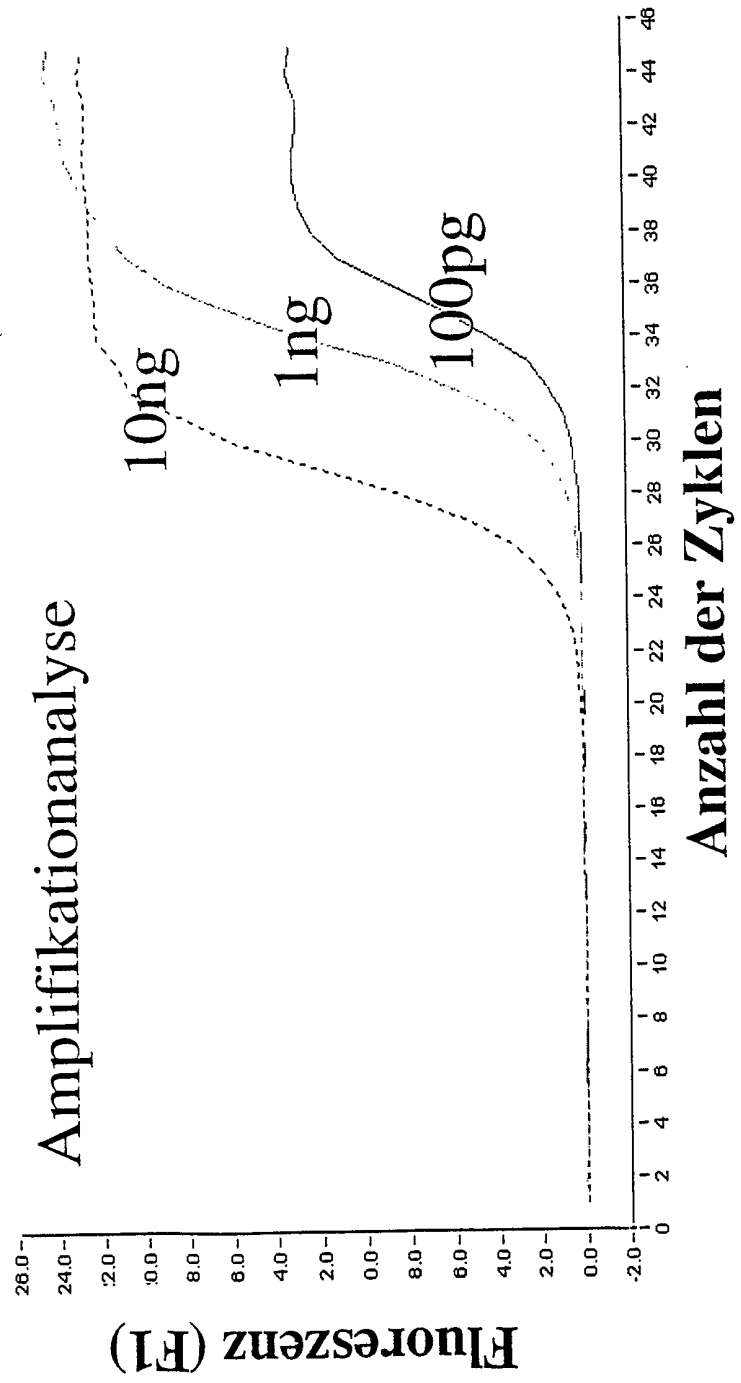
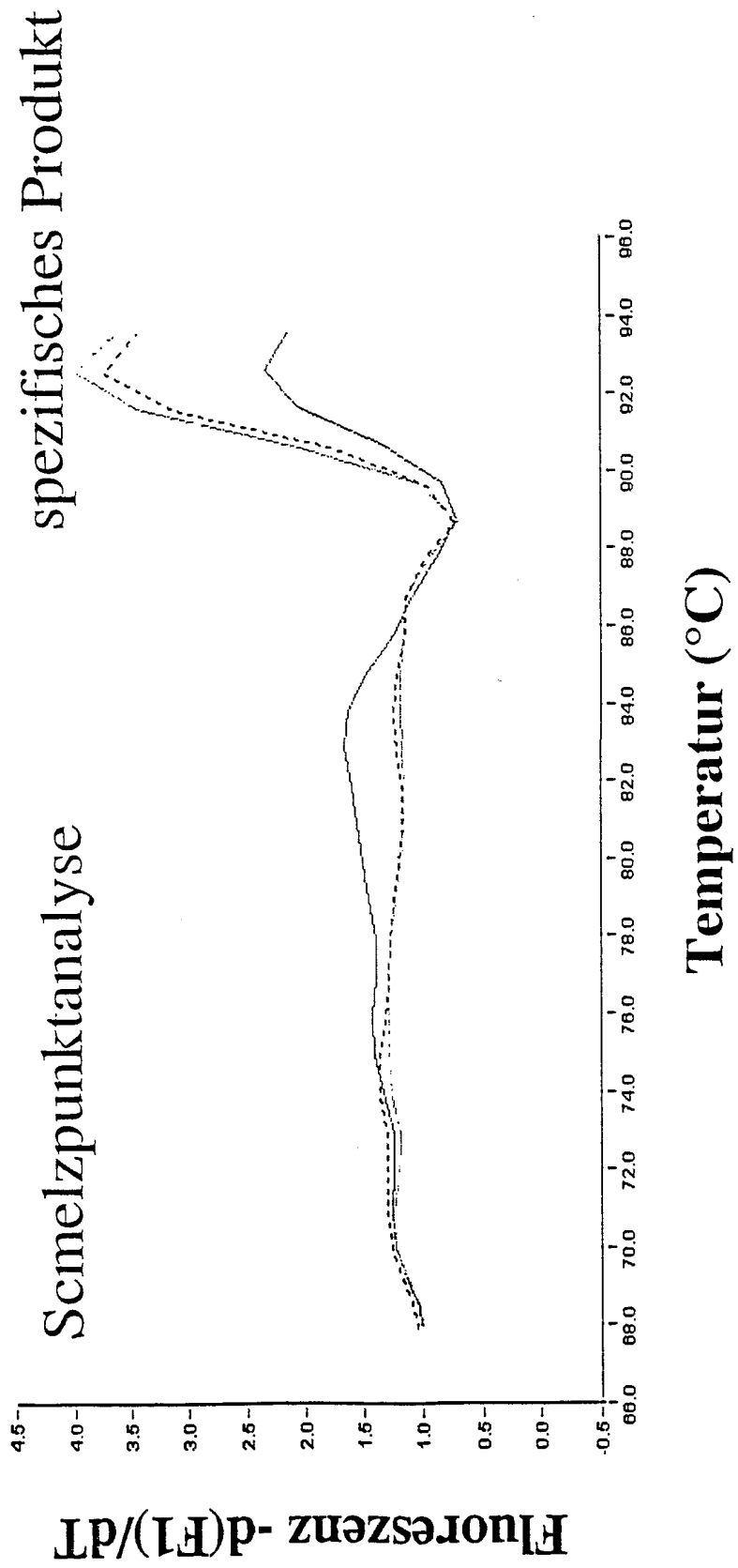


Abbildung 7/2



# Abbildung 8 14

Nachweis des ANP-Gens im kultivierten Kardiomyozyten der Ratte

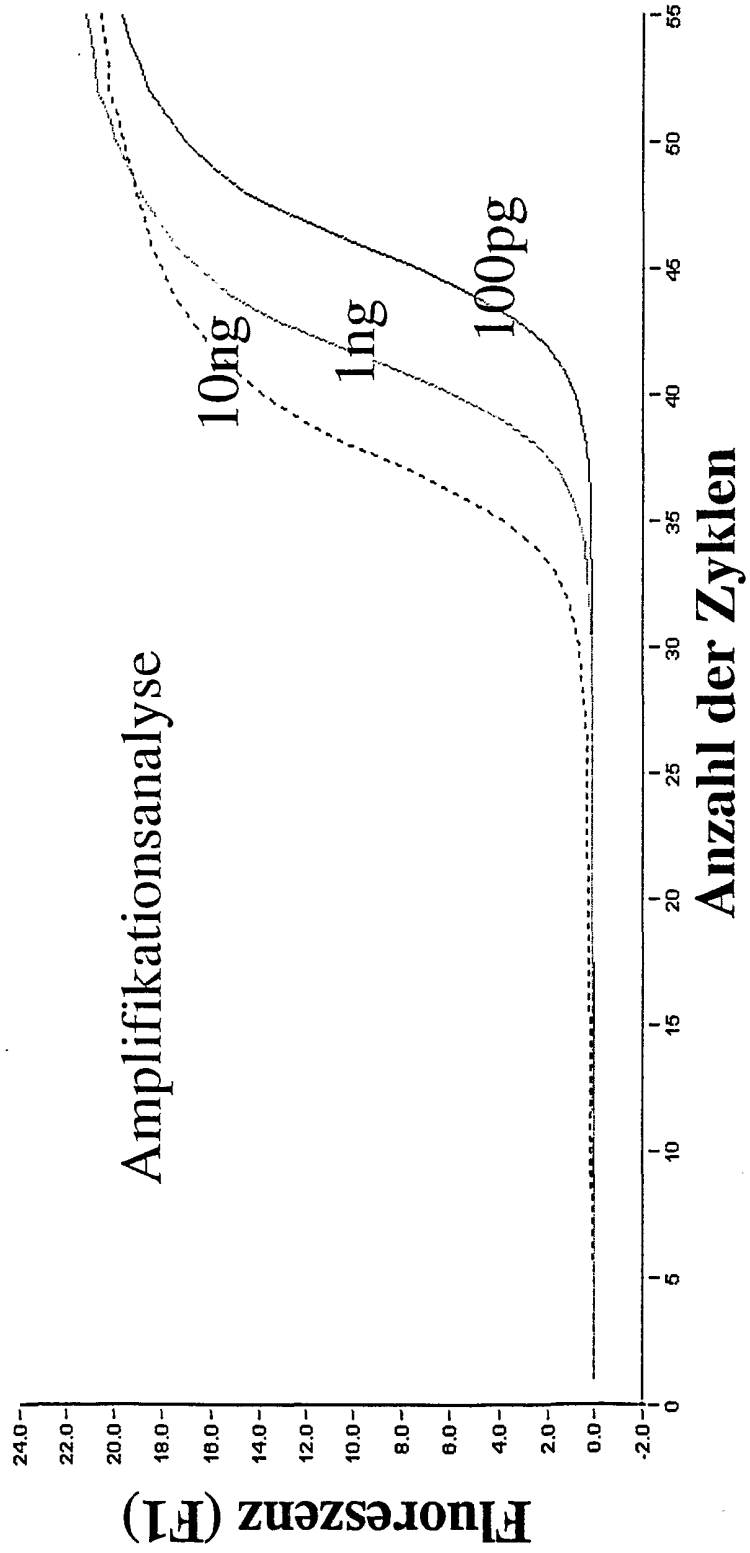


Abbildung 8/2

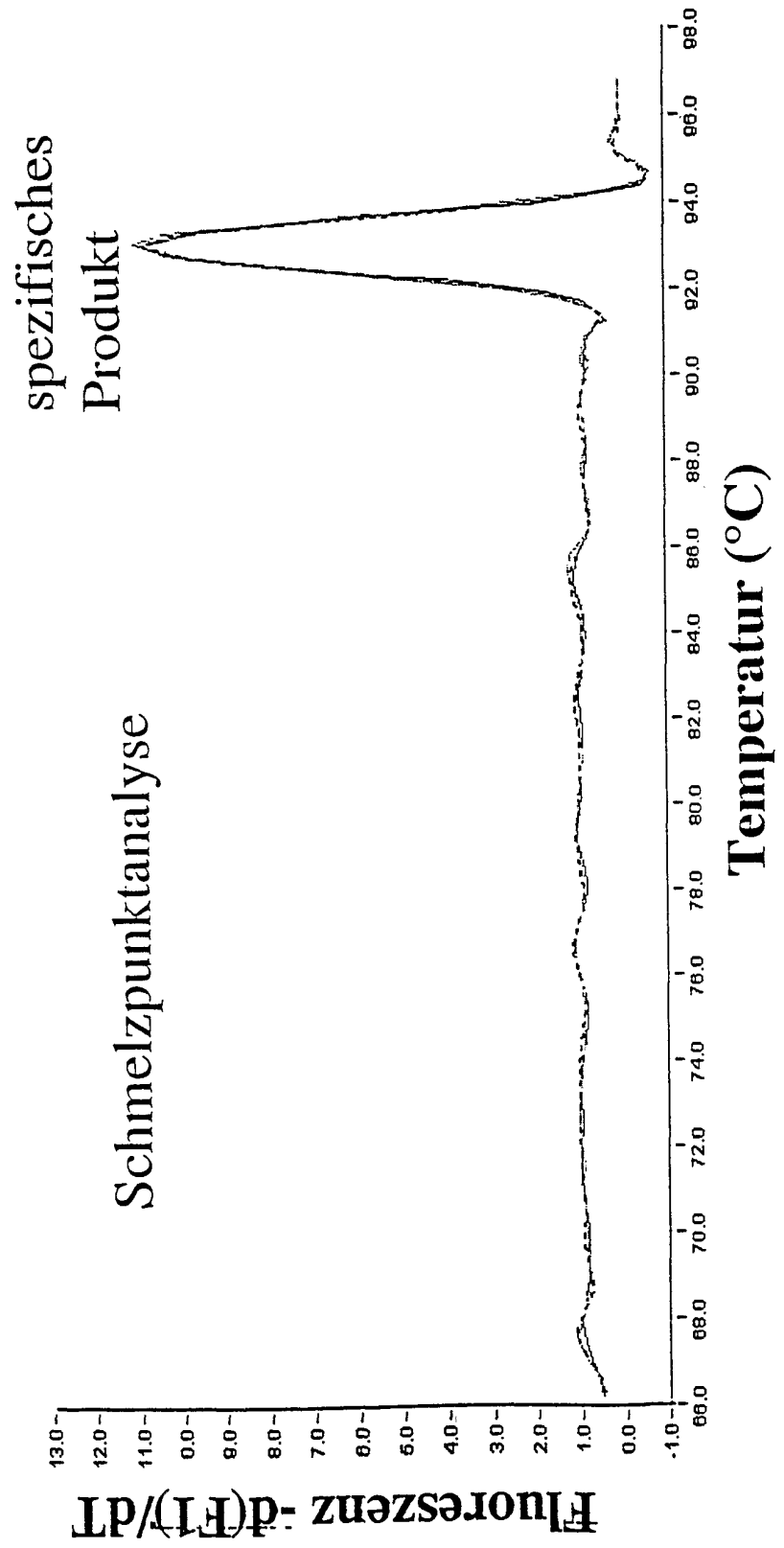


Abbildung 9/14

Nachweis des alpha skeletalen Aktin Gens in Herzgewebe der Ratte

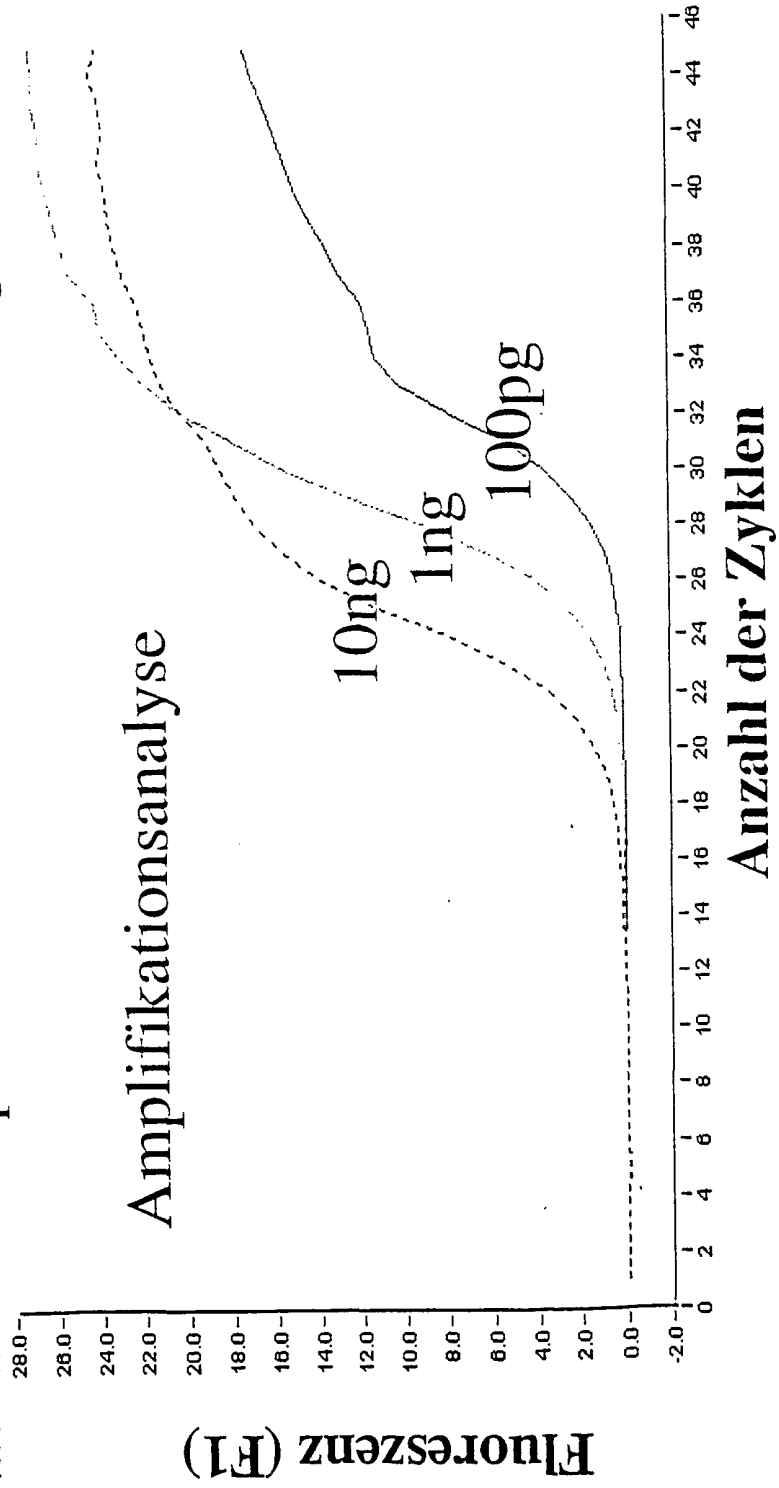


Abbildung 912

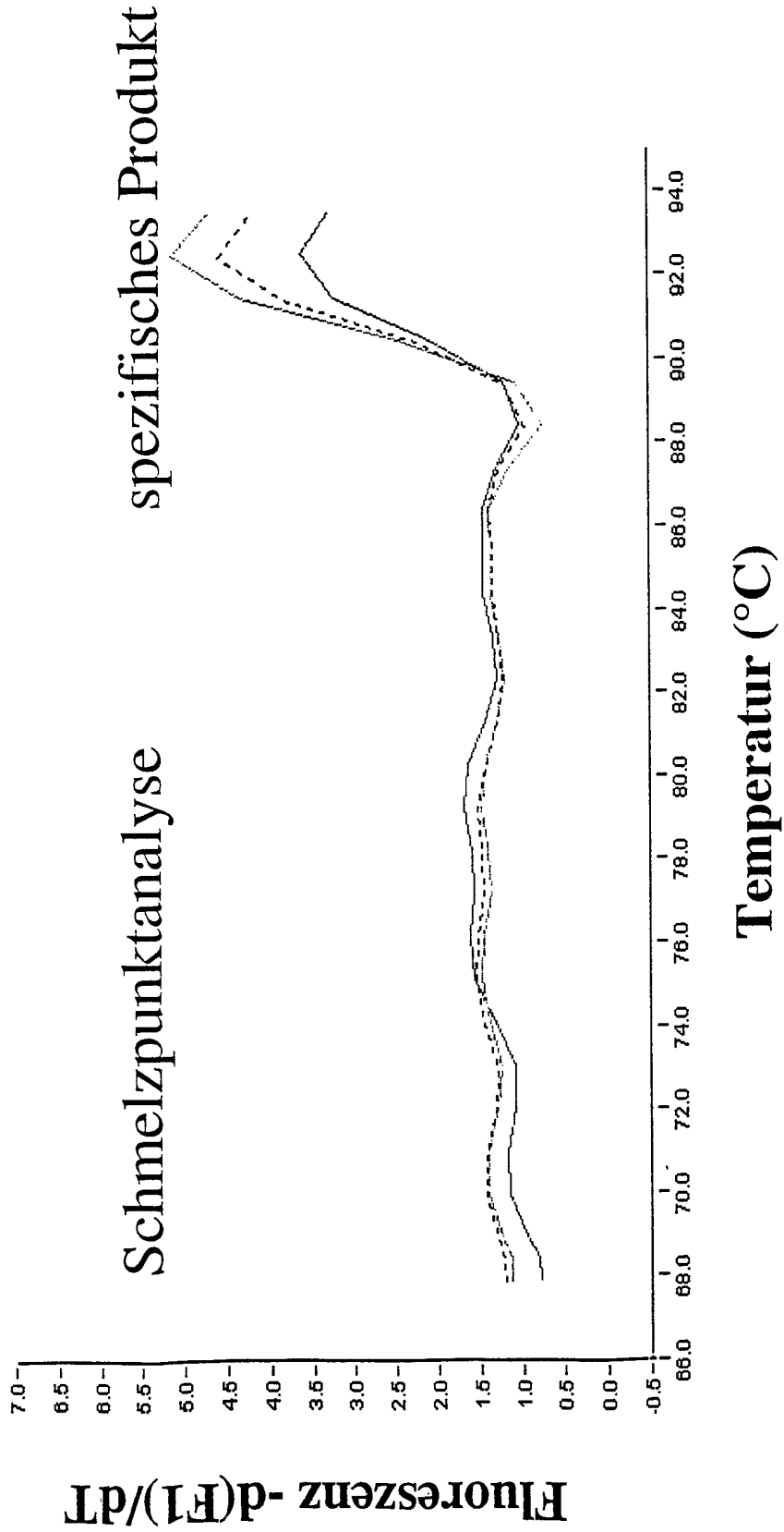


Abbildung 10 1A

Nachweis des Albumin Gens in kultivierten Hepatozyten der Ratte

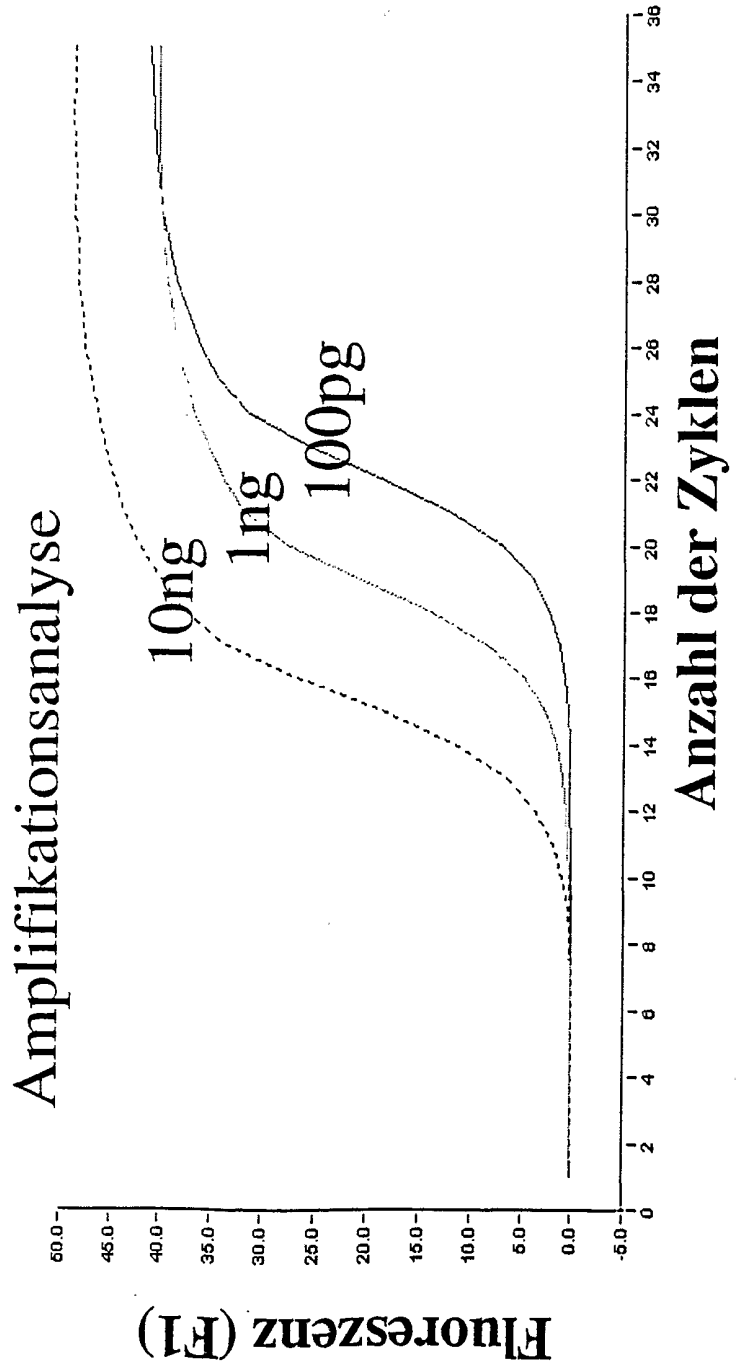


Abbildung 10<sub>12</sub>

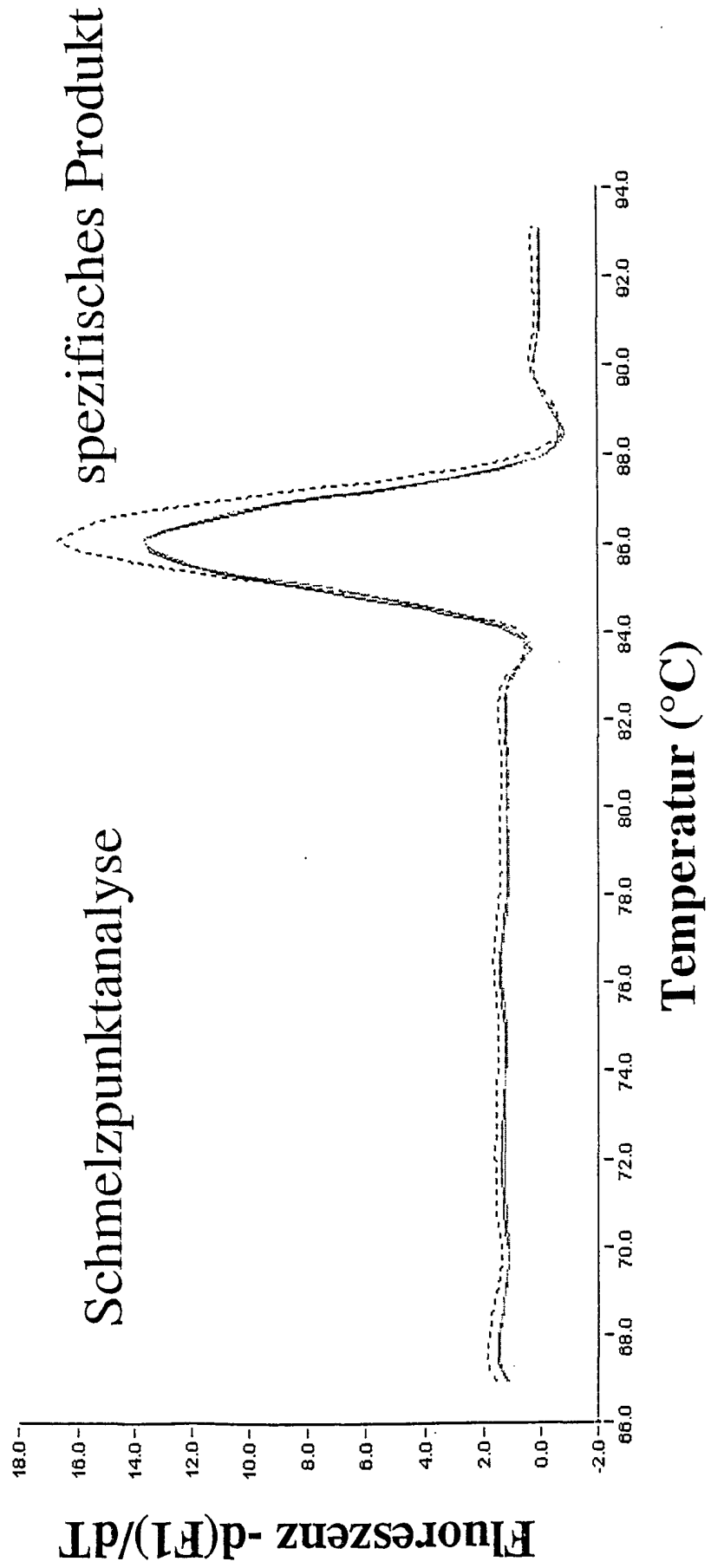


Abbildung 11 1/a

Nachweis von HNF3gamma in kultivierten Hepatozyten der Ratte

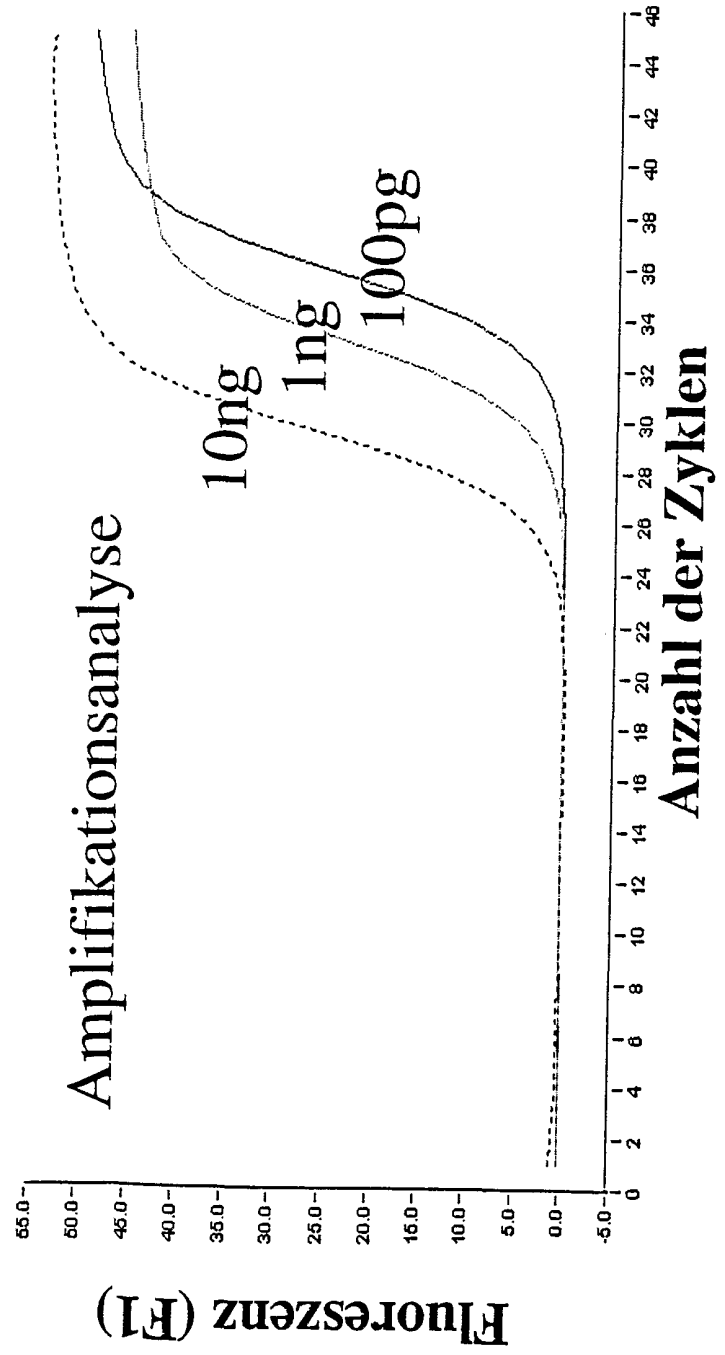


Abbildung 11 / 2

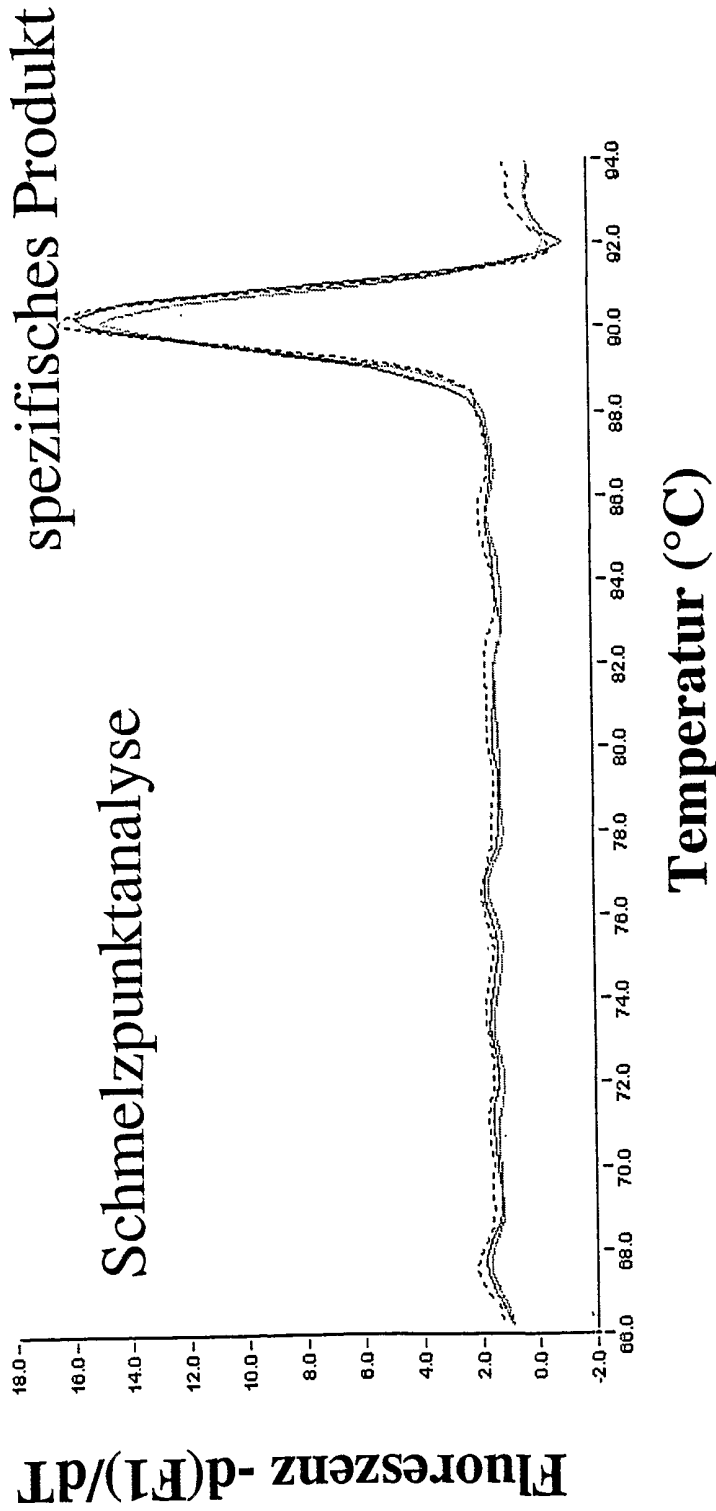


Abbildung 12 Nachweis des N-Acetyltransferase 2 Genotyps in humaner DNA

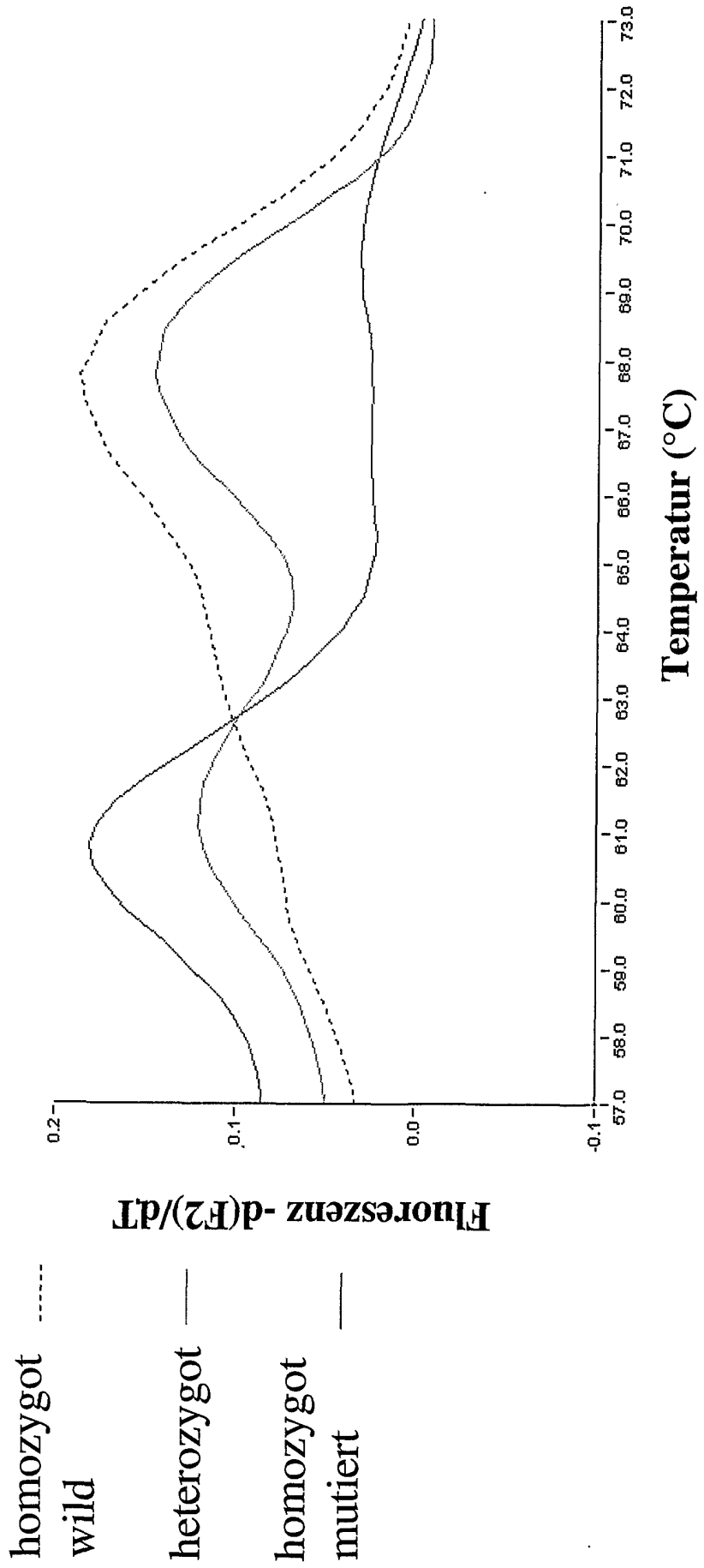


Abbildung 13/1

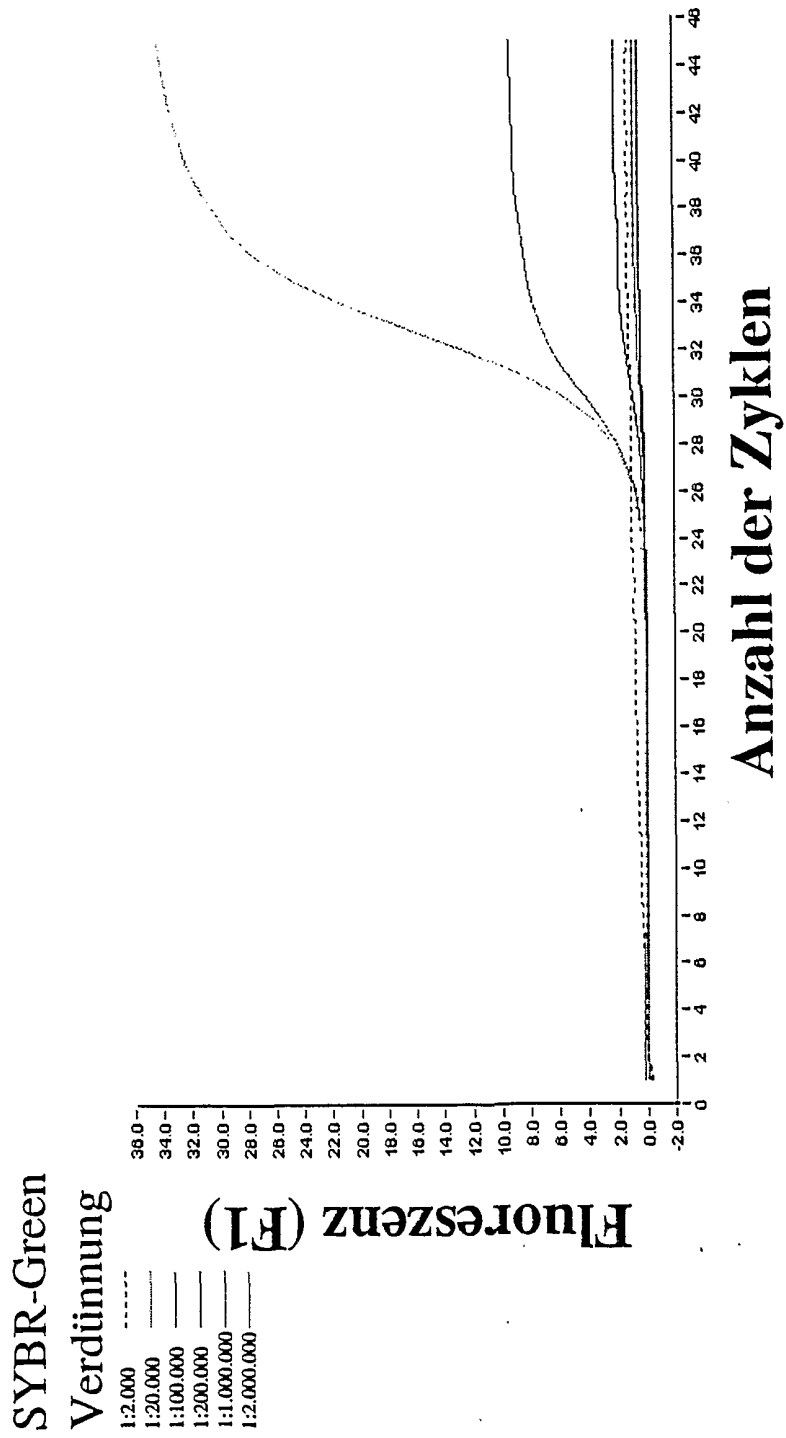


Abbildung 13 1/2

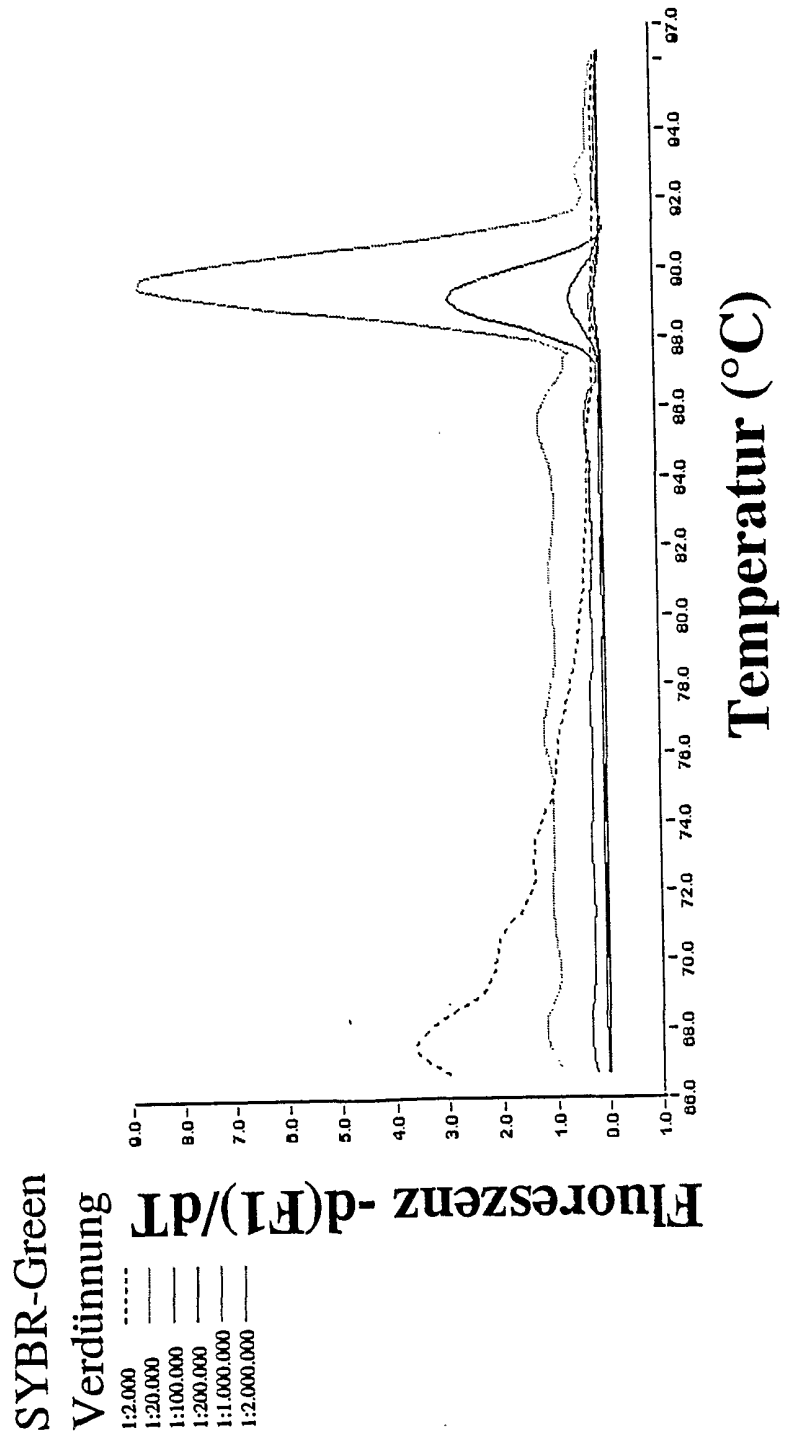
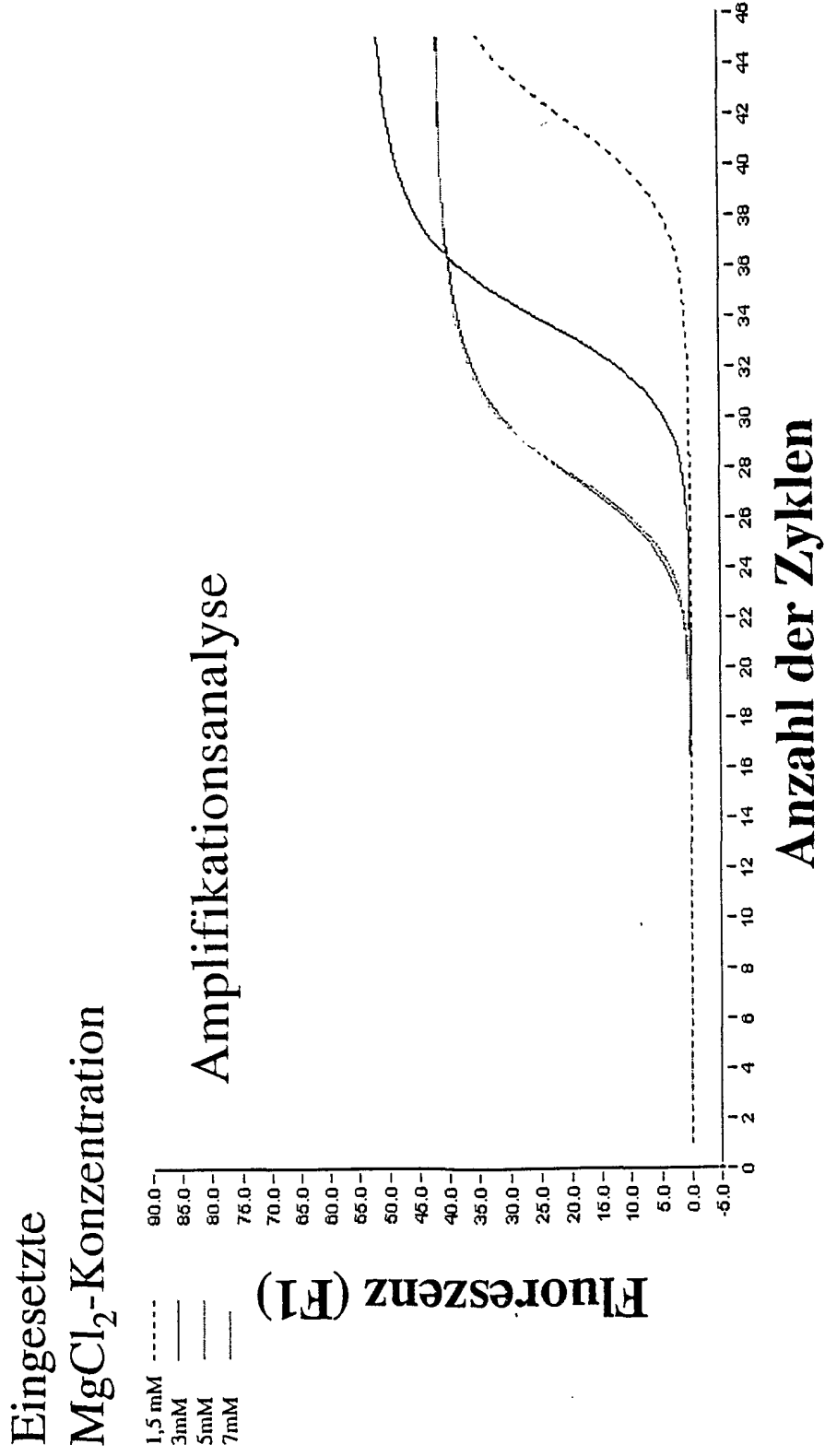


Abbildung 14/1



# Abbildung 14 /z

Eingesetzte  
MgCl<sub>2</sub>-Konzentration  
Schmelzpunktanalyse

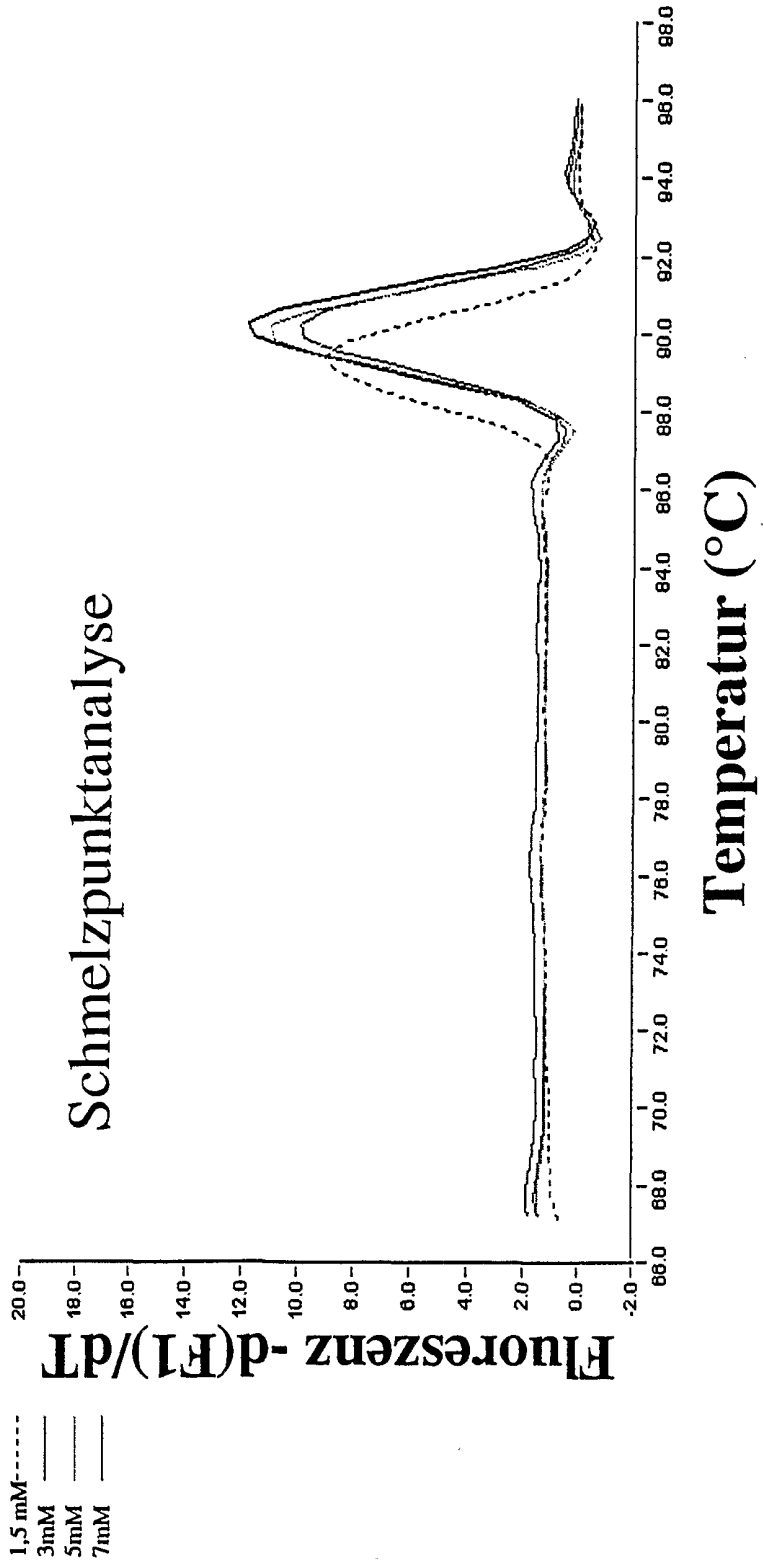
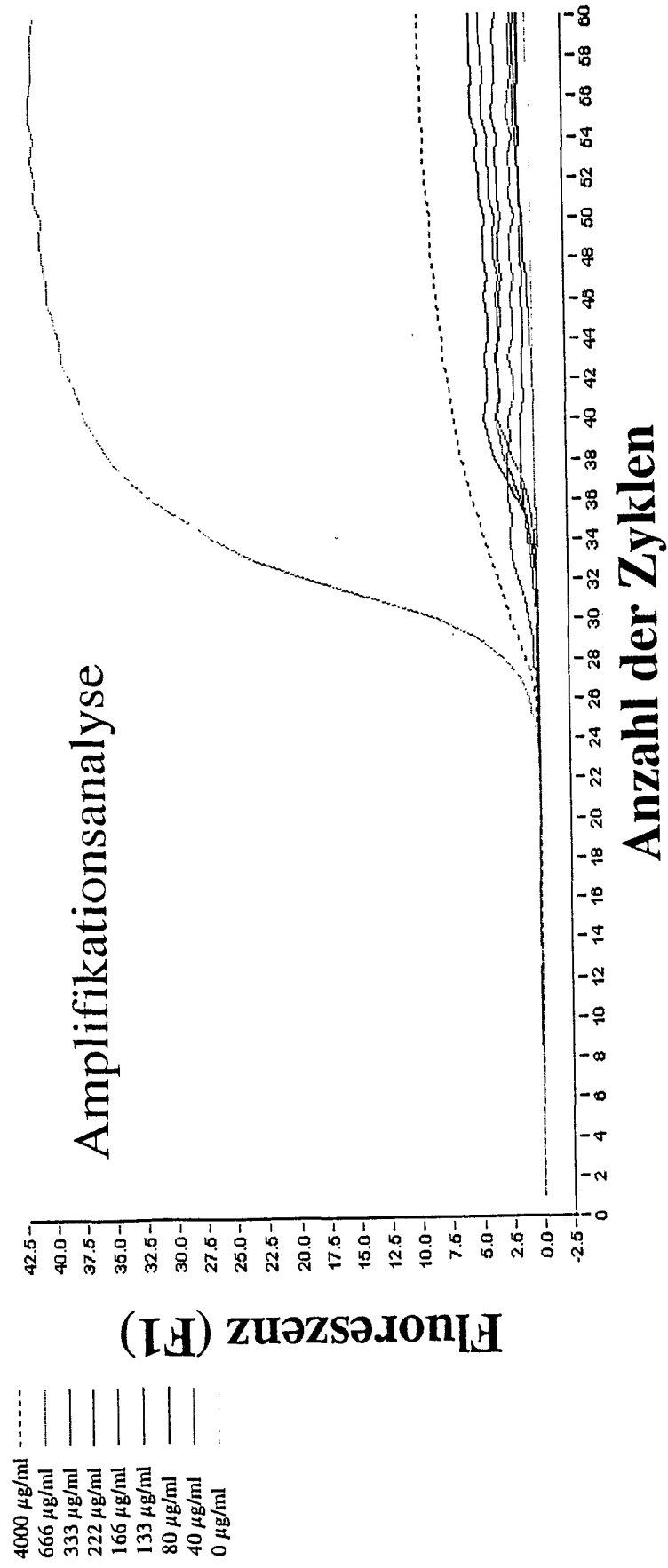


Abbildung 15/a

eingesetzte BSA-Konzentration



# Abbildung 15 /2

eingesetzte BSA-Konzentration

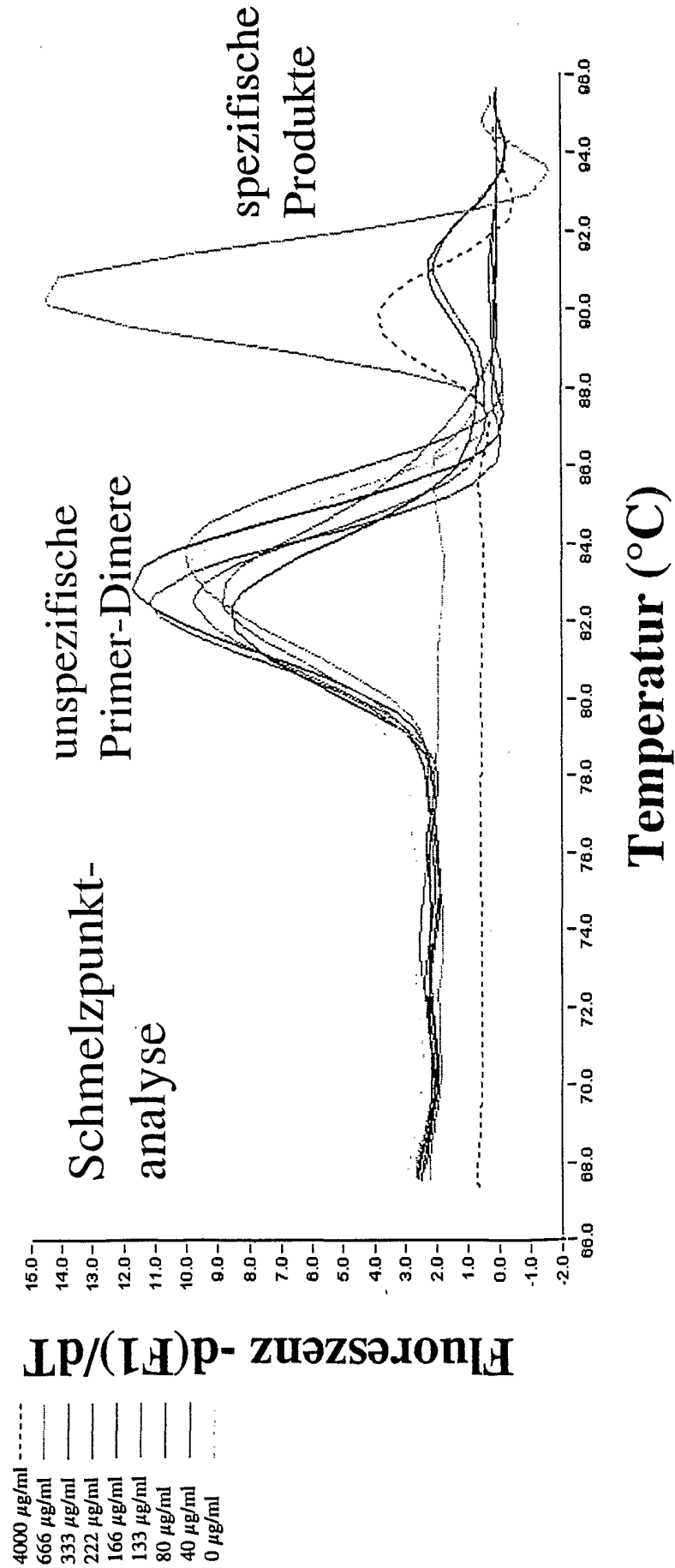


Abbildung 16 / 1

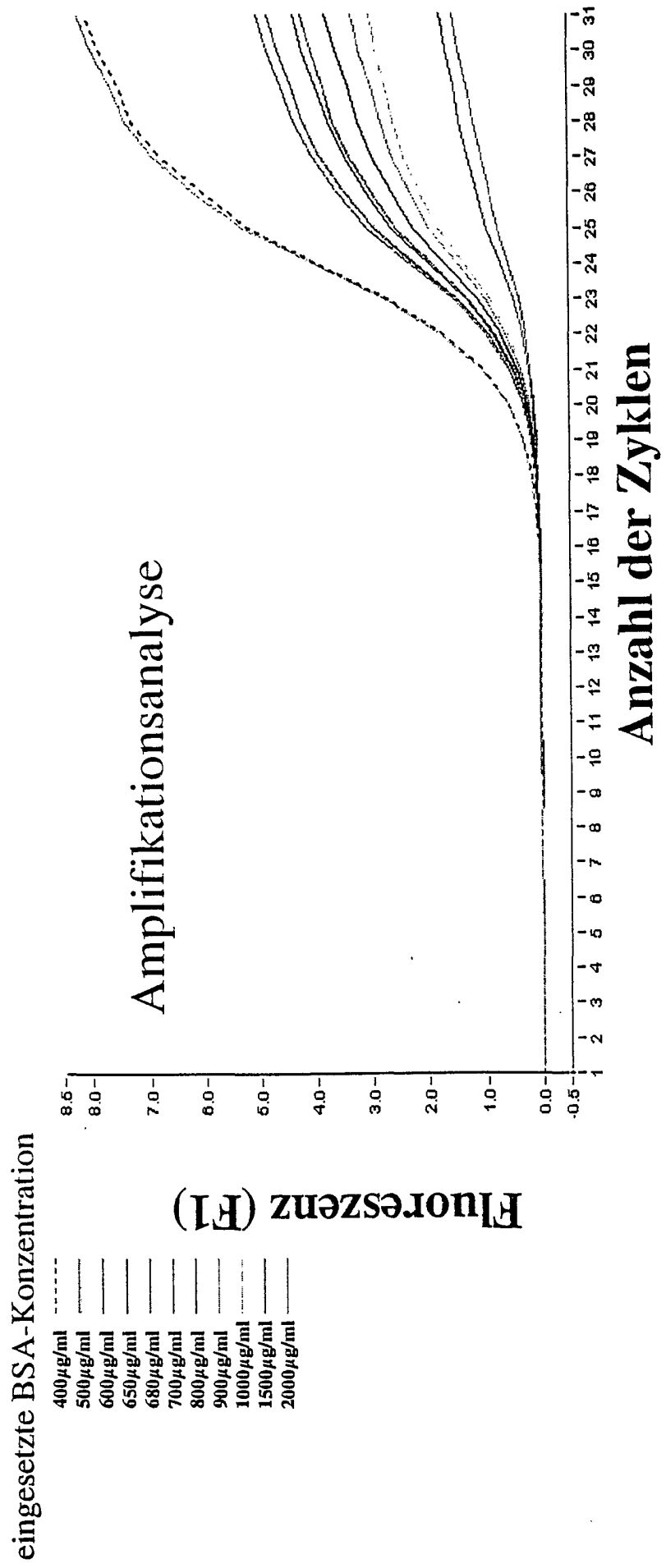


Abbildung 16 /2

eingesetzte BSA-Konzentration

- 400 µg/ml
- 500 µg/ml
- 600 µg/ml
- 650 µg/ml
- 680 µg/ml
- 700 µg/ml
- 800 µg/ml
- 900 µg/ml
- 1000 µg/ml
- 1500 µg/ml
- 2000 µg/ml

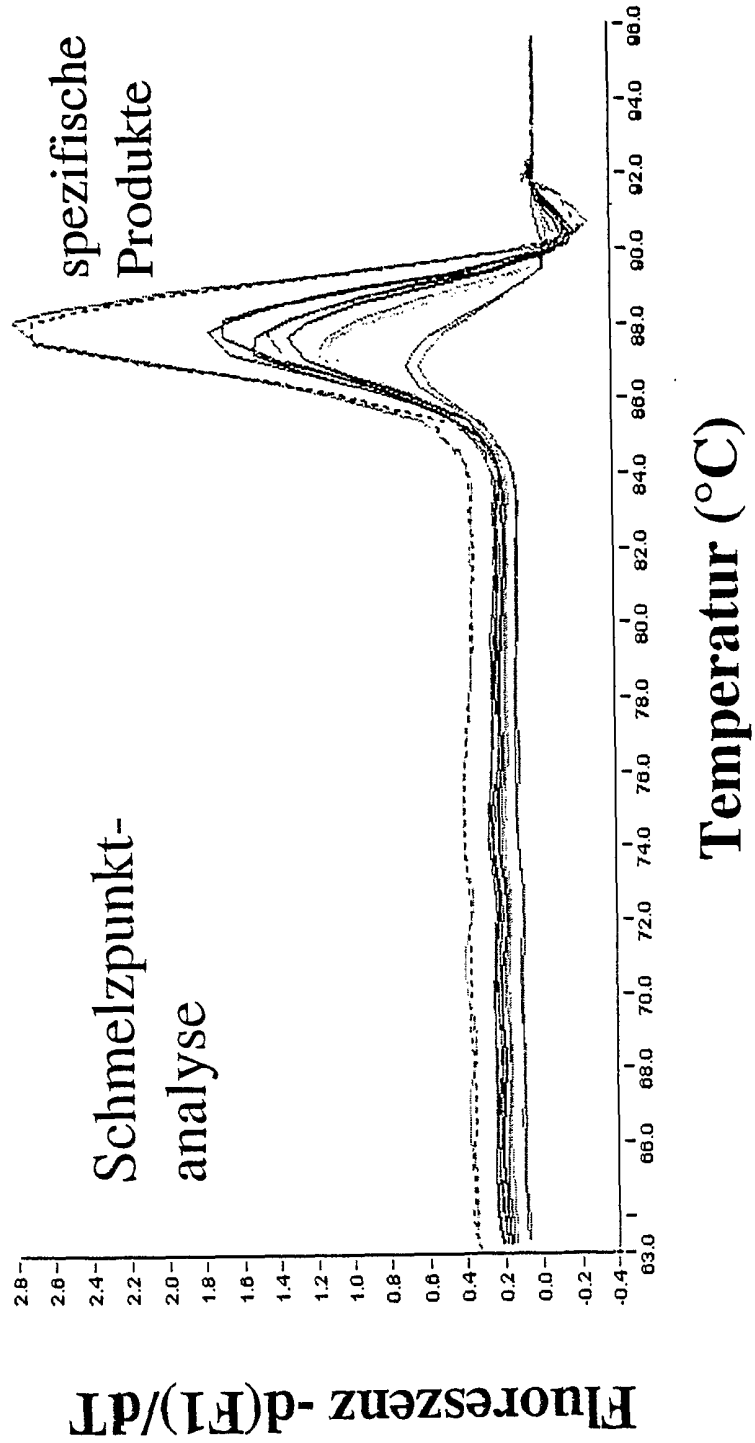


Abbildung 17/1

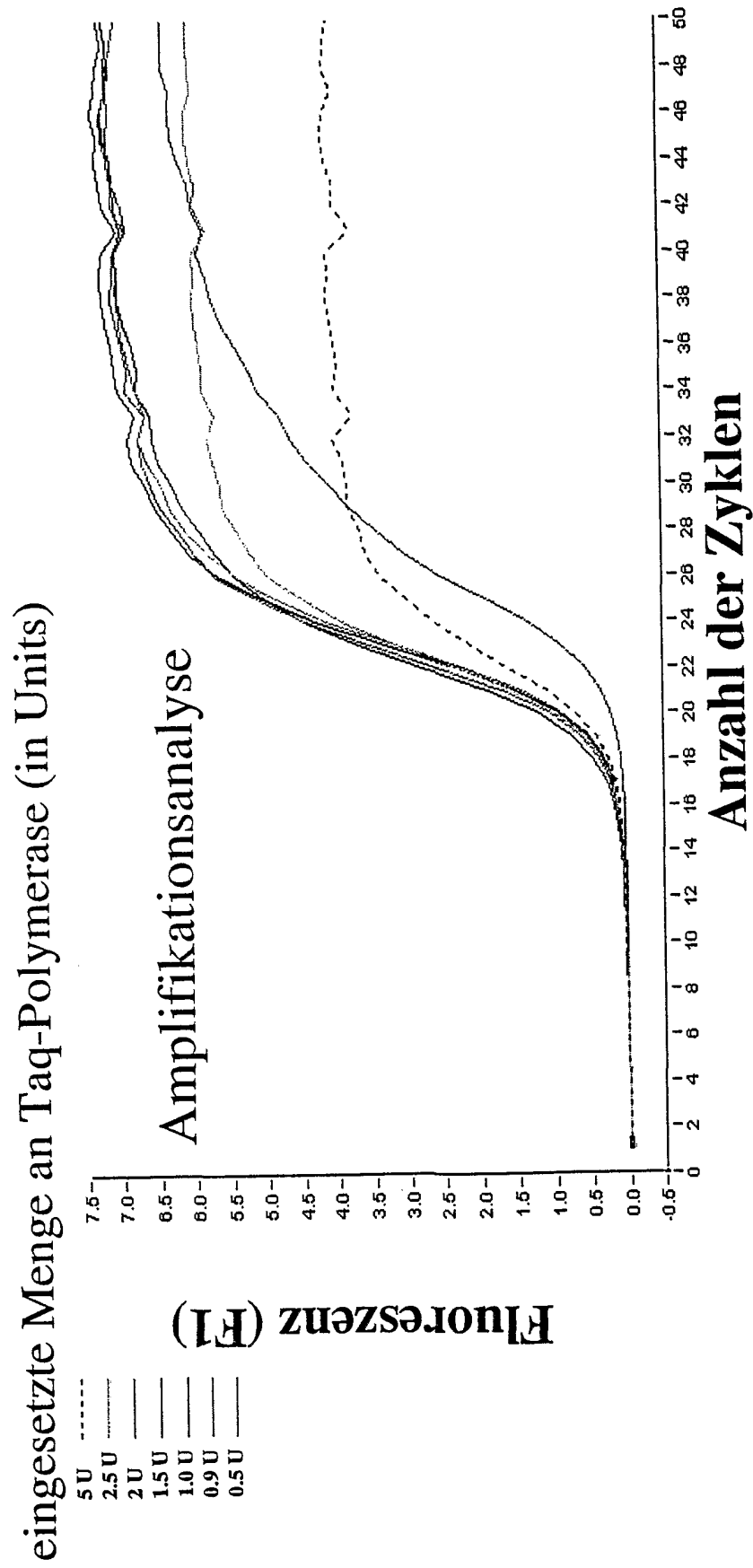
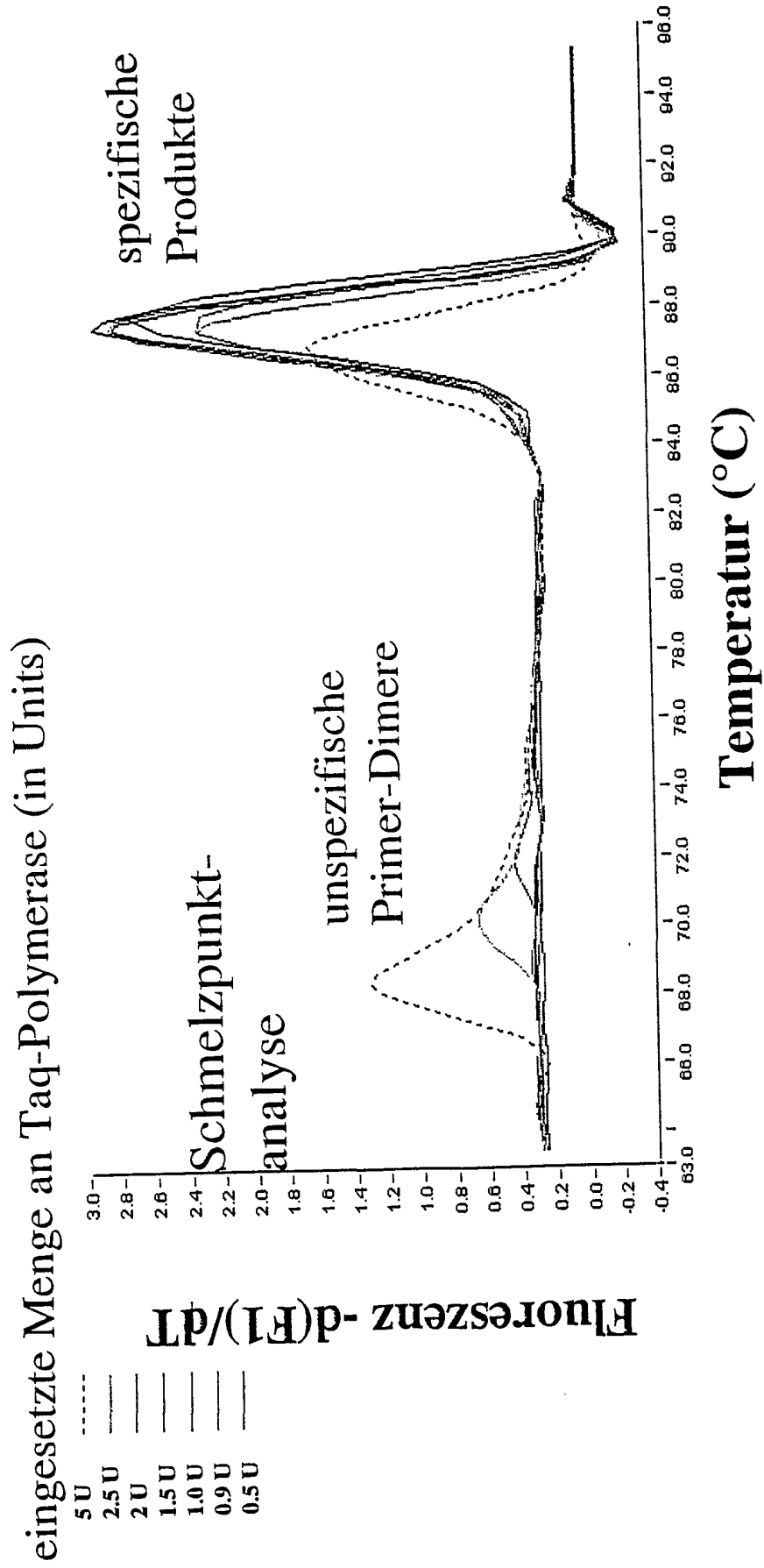


Abbildung 17 /2



# Abbildung 18 / 1

## Nachweis des CYP2J3-Gens im explantierten Rattenherzen

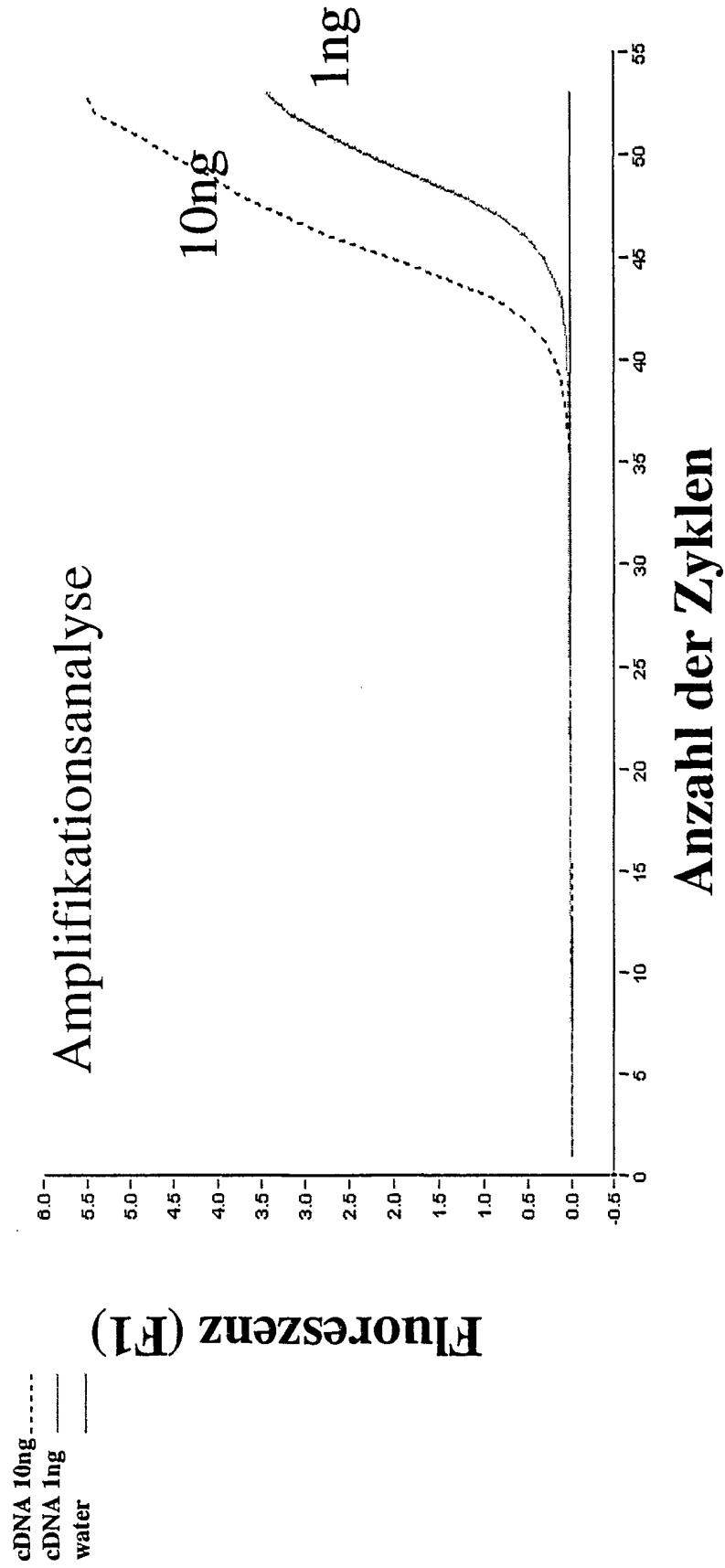


Abbildung 18 / 2

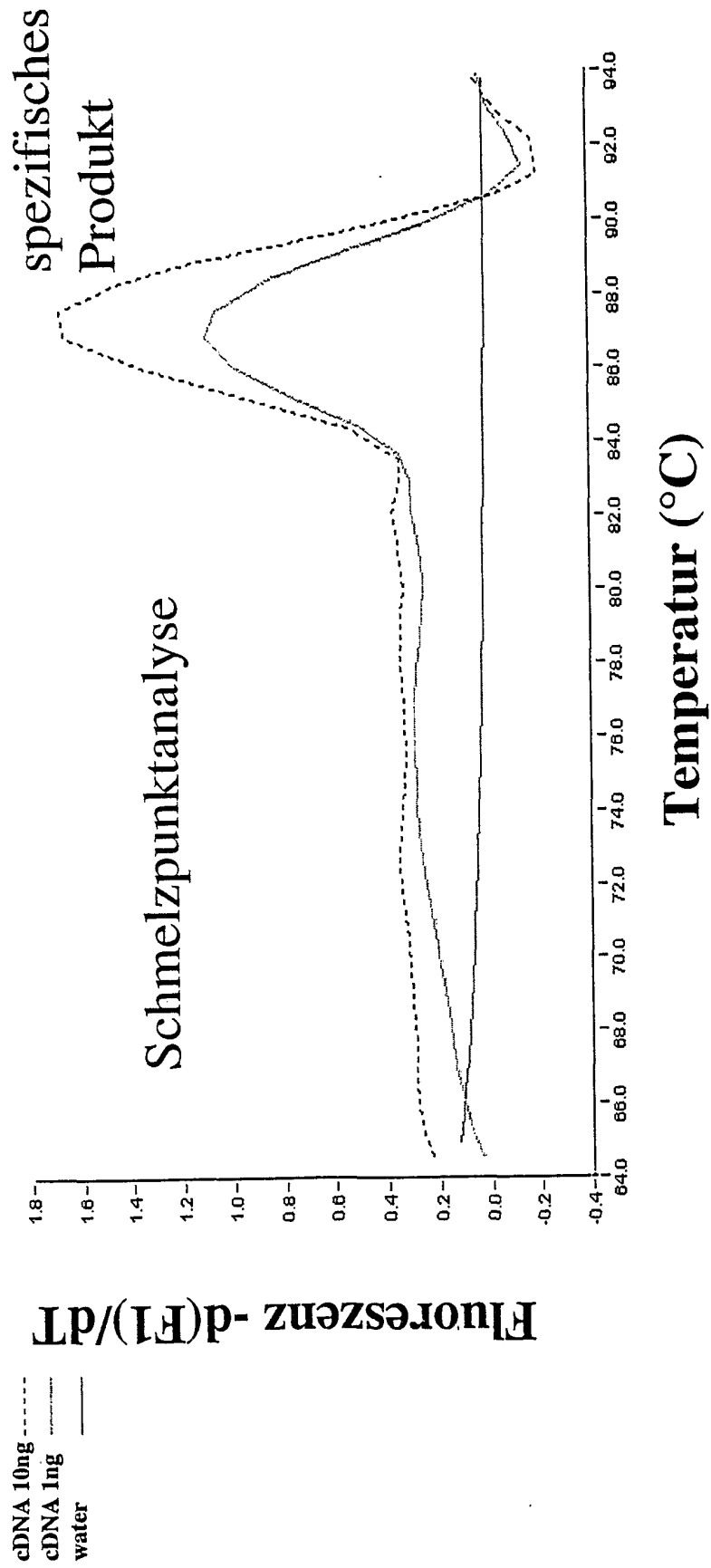


Abbildung 19A

Vergleich des Verfahrens Thum/Borlak mit dem QuantiTect Verfahren (Qiagen)

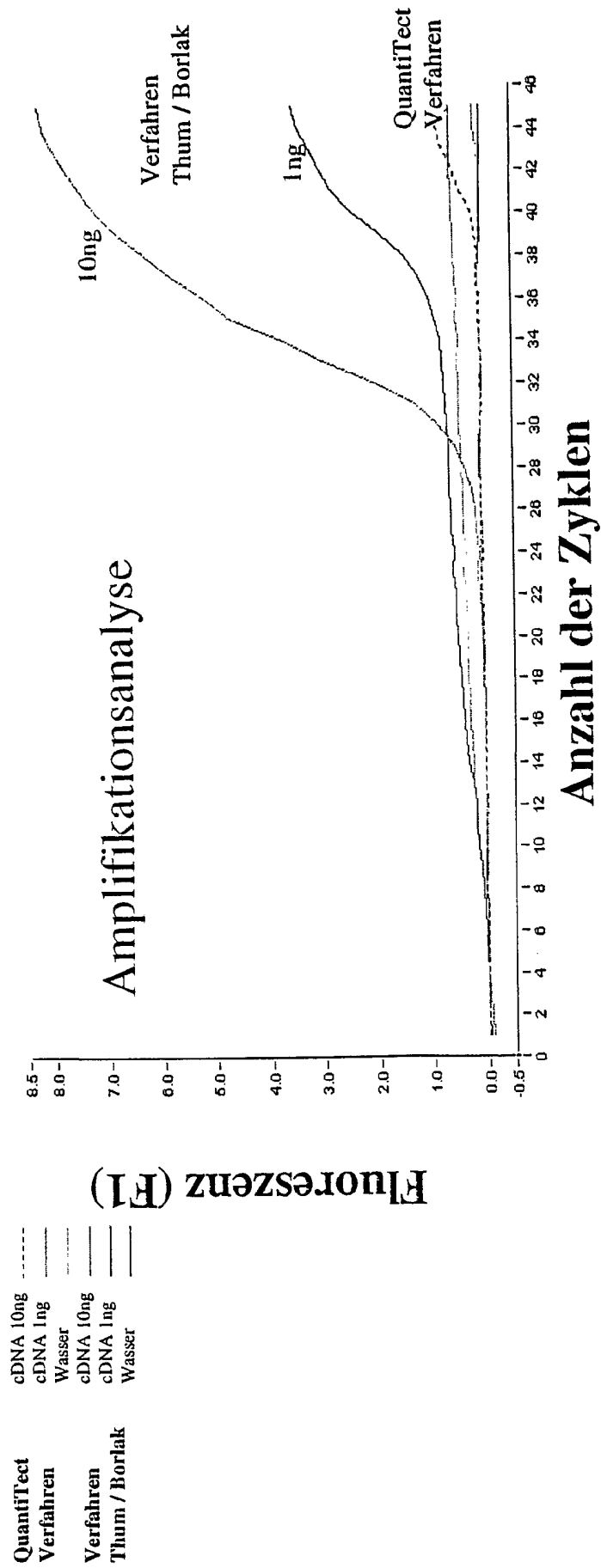


Abbildung 19/2

