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

(10) **DE 693 33 289 T2** 2004.08.26

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 672 181 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 289.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/02960**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 909 210.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 93/020235**
(86) PCT-Anmeldetag: **31.03.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.10.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.09.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **05.11.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.08.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12Q 1/68**
C12Q 1/34, C12P 19/34

(30) Unionspriorität:
861910 **01.04.1992** **US**

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

(73) Patentinhaber:
The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Md., US

(72) Erfinder:
VOGELSTEIN, Bert, Baltimore, US; KINZLER, W., Kenneth, Baltimore, US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON SÄUGETIER NUKLEINSÄUREN AUS STUHLPROBEN UND DAFÜR BENÖTIGTE REAGENZIEN**

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

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

1. Bereich der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Zielnukleinsäure in einer Stuhlprobe und dafür benötigte Reagenzien.

2. Beschreibung verwandter Verfahren

[0002] Eine wachsende Anzahl von Befunden sieht somatische Mutationen in ursächlichem Zusammenhang mit der Induktion menschlicher Krebserkrankungen. Diese somatischen Mutationen können in den Genomen von zuvor normalen Zellen akkumulieren, von denen dann einige die Phänotypen ausprägen, die mit malignem Wachstum verbunden sind. Solche onkogenen Mutationen können eine Reihe von unterschiedlichen Veränderungstypen in der DNA-Struktur umfassen, einschließlich Deletionen, Translokationen und Änderungen einzelner Nukleotide. Letztere, auch als Punktmutationen bekannt, können häufig die Karzinogenese vermitteln, bei der eine Reihe von mutagenen Chemikalien solche Mutationen auslösen. Zusätzlich können solche Mutationen spontan als eine Folge von Fehlern bei der DNA-Replikation auftreten.

[0003] Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie führten zur Entdeckung von normalen Zellgenen (Proto-Onkogene und Tumor-Suppressorgene), die Wachstum, Entwicklung und Differenzierung kontrollieren. Unter bestimmten Umständen ist die Regulierung dieser Gene verändert, und sie veranlassen normale Zellen, neoplastisches Wachstumsverhalten anzunehmen. Zur Zeit sind über 40 Proto-Onkogene und Suppressorgene bekannt, die in Abhängigkeit von ihren funktionellen Eigenschaften in verschiedene Kategorien unterteilt werden. Diese umfassen (1) Wachstumsfaktoren und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, (2) Boten für intrazelluläre Signalübertragungswege, zum Beispiel zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern, und (3) regulierende Proteine, die Genexpression und DNA-Replikation beeinflussen.

[0004] Punktmutationen wurden direkt mit der Verursachung von vielen menschlichen Tumoren in Zusammenhang gebracht. Einige Tumoren tragen Onkogene der ras-Genfamilie, die sich von ihren normalen zellulären Proto-Onkogen-Gegenstücken durch das Auftreten einer Punktmutation an einer Stelle aus einer begrenzten Anzahl von Stellen in diesen Genen unterscheiden. In ähnlicher Weise werden Punktmutationen in kritischen Regionen von Tumor-Suppressorgenen, wie etwa p53, oft in Tumorzellen nachgewiesen. Diese Mutationen stellen qualitative Änderungen im Genom der Tumorzellen dar, die diese Zellen von normalen Zellen unterscheiden und eine Basis zur Diagnose des genetischen Ursprungs eines in Untersuchung befindlichen Tumors liefern. Die Erkennung der Mutationen, die zu aktiven Onkogenen geführt haben, kann wichtige diagnostische und prognostische Schlüsse in Bezug auf die Tumorentwicklung ermöglichen. Zum Beispiel fand man heraus, dass eine Reihe von Mutationen das 12. Codon des ras-Onkogens verändern, die das Ersetzen eines normalerweise anwesenden Glycin durch eines aus einer Reihe von alternativen Aminosäureresten verursachen. Solche Substitutionen von Aminosäuren erzeugen ein wirkungsvolles transformierendes Allel. Auf diese Weise kann das Auftreten einer bestimmten Nukleotidsubstitution einen starken Einfluss auf das Verhalten der Tumorzelle haben (z. B. seine Wachstumsrate, Invasivität etc.). Als eine Folge daraus sind DNA-Sonden aus onkogenen Mutationen vielversprechend als diagnostische Reagenzien in der klinischen Onkologie.

[0005] Unter den verschiedenen Typen von Neoplasmen werden eine Reihe von denen, die im Verdauungstrakt gefunden werden, mit onkogenetischen Mutationen in Verbindung gebracht. Diese Verbindung ist für kolorektale Krebserkrankungen besonders signifikant. Die kolorektale Krebserkrankung ist die dritthäufigste Krebserkrankung der Welt, für 1992 werden 570.000 neue Fälle erwartet. Allein in den Vereinigten Staaten werden in diesem einzelnen Jahr über 60.000 Menschen an kolorektaler Krebserkrankung sterben. Während die Prognose für Patienten mit fortgeschrittener Krankheit sehr schlecht ist, können kolorektale Tumoren, die in jedem Stadium vor der Metastasierung diagnostiziert werden, normalerweise durch operative oder kolonoskopische Entfernung geheilt werden. Ein Verfahren zum Nachweis von operativ zu entfernenden Tumoren könnte daher die durch diese Krankheit bedingten Tode wesentlich reduzieren (Winawer et al., J. National Cancer Institute, 83: 243, 1991). Der einzige nicht invasive Test, der zur Zeit für einen solchen Zweck verfügbar ist, besteht aus der Untersuchung einer Stuhlprobe auf okkultes Blut. Obwohl Untersuchungen auf Stuhlblut unter bestimmten Umständen wertvoll sein können, ist ihr Einsatz kontrovers, zum Teil, weil das Auftreten von Hämoglobin im Stuhl nicht für Neoplasie spezifisch ist (Ransohoff et al., New England Journal of Medicine, 325: 37, 1991; Miller et al., Int. J. Cancer 46: 761, 1990). Obwohl dadurch die Bemühungen angeregt wurden, zusätzliche nicht invasive Tests zu entwickeln, die Neoplasmen des Kolons und des Rektums verlässlicher nachweisen können, schlugen diese Versuche fehl. Die vorliegende Erfindung richtet sich auf diesen Bedarf.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die vorliegende Erfindung entstand aus dem unerwarteten Befund, dass Nukleinsäure mit einer mutierten Nukleotidsequenz, die mit gastrointestinaler Neoplasie in Zusammenhang steht, in nachweisbaren Mengen in Stuhlproben von Patienten mit gastrointestinaler Nepolasie vorhanden ist.
[0007] Als eine Folge dieser Entdeckung bietet die vorliegende Erfindung einen signifikanten Vorteil gegenüber solchen Techniken wie Gewebebiopsie, indem sie ein nicht invasives, schnelles und zuverlässiges Verfahren zum Nachweis von mutierten Nukleotidsequenzen bietet, die mit gastrointestinaler Neoplasie in Zusammenhang stehen. Basierend auf diesen Befunden ist es jetzt möglich, zahlreiche andere Zielnukleinsäuren nachzuweisen, die mit anderen Krankheitszuständen in Zusammenhang stehen.

BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0008] **Fig.** 1. RAS-Gen Mutationen in Stuhlproben wurden durch Plaque-Hybridisierung nachgewiesen. PCR-Produkte, die das erste kodierende Exon von K-ras enthielten, wurden aus DNA erzeugt, die aus den Stuhlproben der Patienten 1, 2, und 10 (Tafel I) extrahiert und in einen Bakteriophagenvektor cloniert wurde. Die Plaque-Ablösungen wurden mit einem Oligonukleotid hybridisiert, das für den Ras-Wildtyp spezifisch war, mit einem Oligonukleotid, das für 12^{val} spezifisch war (Mutant-Sonde 1) und mit einem Oligonukleotid, das für 13^{asp} spezifisch war (Mutant-Sonde 2). Die Anzahl der Plaques, die für die Hybridisierung mit den Mutant-spezifischen Oligonukleotiden verwendet wurden, war fünfmal höher als jene, die für das Wildtyp-spezifische Oligonukleotid verwendet wurde, um eine statistisch signifikante Anzahl von hybridisierten Plaques zu erhalten. Das Verhältnis von Plaques, die mit der Mutant-spezifischen Sonde hybridisierten, zu der Wildtypspezifischen Sonde betrug 0,08 : 1 beziehungsweise 0,04 : 1 bei Patient 1 beziehungsweise 2.
[0009] **Fig.** 2. RAS-Genmutationen wurden mit Hilfe von einer Southern-Blot Untersuchung von PCR-amplifizierten Produkten nachgewiesen. PCR-Produkte, die das erste kodierende Exon von K-ras enthielten, wurden aus DNA hergestellt, die aus Stuhlproben und Tumoren der Patienten 1, 3, 4 und 11 extrahiert worden war. Die PCR-Produkte wurden der Elektrophorese auf 2% Agarosegel unterworfen und durch Nylonfilter gefiltert. Die Blots wurden an Oligonukleotid-Sonden hybridisiert, die für Wildtyp-RAS (untere Tafel), die 12^{asp}-Mutation (mittlere Tafel) oder die 12^{val}-Mutation (obere Tafel) spezifisch waren. Die Stuhl- und Tumor-DNA-Proben der Patienten 3 und 4 enthielten eine 12^{asp}-Mutation, während jene des Patienten 1 eine 12^{val}-Mutation enthielten. Weder die Stuhl-DNA noch die Tumor-DNA von Patient 11 enthielt eine dieser Mutationen.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer in Stuhlproben vorkommenden Nukleinsäure, die eine mutierte Nukleotidsequenz aufweist, wobei die Anwesenheit der veränderten Nukleinsäuresequenz mit Neoplasie des Verdauungstraktes assoziiert ist.
[0011] In ihrem weitesten Sinne erlaubt die vorliegende Erfindung den Nachweis jeder Zielnukleinsäuresequenz mit diagnostischer oder therapeutischer Relevanz, sobald die Zielnukleinsäuresequenz im Stuhl auftritt. Auf diese Weise kann die Zielnukleotidsequenz zum Beispiel ein mutiertes Nukleotid, ein Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), eine Nukleotiddeletion, eine Nukleotidsubstitution oder jede andere interessierende Nukleinsäuresequenz eines Säugers sein.
[0012] In einer Ausführungsform kann das Verfahren der Erfindung zur Verstärkung der Nachweisbarkeit von mutierten Nukleotidsequenzen angewendet werden, die sowohl mit gutartigen, als auch mit bösartigen Neoplasien assoziiert sind. In einer bevorzugten Ausführungsform wird Neoplasie des Verdauungstraktes, einschließlich sowohl des Dünndarms als auch des Dickdarms, der Bauchspeicheldrüse und des Magens nachgewiesen, obwohl das Verfahren zum Nachweis jeder neoplastischen mutierten Nukleotidsequenz jeglichen Ursprungs eingesetzt werden kann, solange die Sequenz nachweisbar im Stuhl vorkommt.
[0013] Gutartige Neoplasien des Dünndarms umschließen Adenome, Leiomyome, Lipome und Angiome, gutartige Neoplasien des Dickdarms hingegen sind in erster Linie Adenomatuspolypen. Die bösartigen Neoplasien des Dünndarms umschließen Adenokarzinome, Leiomyosarkome, Lymphome und karzinoide Tumoren. Im Fall von Dickdarm und Kolon ist das kolorektale Karzinom die häufigste identifizierte bösartige Neoplasie.
[0014] Zahlreiche Nukleinsäuren mit mutierten Nukleotidsequenzen, die ein unnormales Genprodukt produzieren, sind dafür bekannt, dass sie mit verschiedenen Neoplasien assoziiert sind. Zu den häufigsten mutierten Nukleotidsequenzen gehören Onkogene und Tumor-Suppressorgene wie etwa MCC, DCC, APC, FAP und p53. Von besonderer Signifikanz in der vorliegenden Erfindung ist der Nachweis von K-ras mutiertem Onkogen und dem p53 Tumor-Suppressorgen (Vogelstein, Nature, 348: 681, 1990). Weitere Unterstützung für den Nachweis von DCC, MCC, APC und p53 kann in den schwebenden US-Patentanmeldungen mit den Seriennummern 460,981, eingereicht am 4. Januar 1990; 07/670,611, eingereicht am 13. März 1991; 07/741,940, eingereicht am 8. August 1991 beziehungsweise 446,584, eingereicht am 6. Dezember 1989, eingeholt wer-

den, die hierin als Referenz eingeschlossen werden.

[0015] Um Stuhlproben nach dem Verfahren der Erfindung zu analysieren, ist es notwendig, die in den Proben vorkommende Säuger-Nukleinsäure abzutrennen. Es bestehen zwei Hauptprobleme im Zusammenhang mit der Gewinnung von Säuger-Nukleinsäure aus Stuhl. Erstens muss die Säuger-Nukleinsäure von Säugerzellen befreit und von Bakterienzellen getrennt werden. Dieser Schritt wird durch die Tatsache weiter erschwert, dass es wünschenswert ist, die Freisetzung von Nukleinsäure aus den Bakterienzellen zu verhindern, weil es in den Stuhlproben im Vergleich zu eukaryotischer Nukleinsäure einen so großen Überschuss an bakterieller Nukleinsäure gibt. Zweitens kann die Säuger-Nukleinsäure, sobald sie befreit ist, vor der relativ hohen Konzentration von Nukleasen geschützt werden, die im Stuhl anwesend sind und die die befreite Säuger-Nukleinsäure abbauen und auf diese Weise ihre Analyse verhindern könnten. In der vorliegenden Erfindung wurde herausgefunden, dass diesen stringenten Kriterien begegnet werden kann, indem der Stuhl mit einer speziell entworfenen Stuhl-Lysierungspufferlösung inkubiert wird, bestehend aus einer hohen Konzentration an Pufferlösung von mindestens etwa 500 mM bei einem pH-Wert von mindestens etwa 8, die ein Chelat bildendens Agens wie etwa EDTA und eine relativ niedrige Salzkonzentration, bevorzugt weniger als 10 mM, enthält.

[0016] Die Stuhl-Lysierungspufferlösung minimiert Nukleinsäure-Abbau durch die pH-Wert- und Chelat bildenden Eigenschaften, lysiert eukaryotische Zellen, nicht aber Bakterienzellen, und ist für weitere Schritte zur Reinigung und/oder Konzentration der eukaryotischen Nukleinsäure geeignet. Nach Behandlung mit der Stuhl-Lysierungspufferlösung werden die Proben weiter behandelt (z. B. durch Zentrifugation), um Bakterien und andere unerwünschte Reste zu entfernen. Die Nicht-Partikelfraktion des Lysats wird darauf mit einer Proteinase (wie etwa 0,5 µg/ml Proteinase K) in SDS (1%) inkubiert, um Nukleasen und andere Proteine abzubauen. Die Nukleinsäure in der Probe kann mit chemischen Mitteln weiter abgetrennt werden, wie etwa der Extraktion mit Phenol/Chloroform, Ammoniumacetat, um Peptide von Nukleinsäuren zu trennen und der Fällung mit Ethanol.

[0017] Zusätzlich wurde herausgefunden, dass Stuhl Inhibitoren enthält, die bevorzugt entfernt werden, wenn die mutierte Nukleotidsequenz, die in der Nukleinsäure aus dem Stuhl vorhanden ist, amplifiziert werden soll, etwa durch Polymerasekettenreaktion (PCR). Einer dieser Inhibitoren tritt mit DNA-Amplifizierung durch taq-Polymerase in Wechselwirkung. Dieser Inhibitor kann entfernt werden, indem die Stuhl-Nukleinsäure in Anwesenheit von chaotropischen Salzen, wie etwa 6,0 M Natriumjodid oder Natriumperchlorat an eine stationäre Matrix gebunden wird. Überraschend stellte sich heraus, dass Glas die bevorzugte Matrix für diesen Zweck ist. Besonders bevorzugte kommerzielle Glasversionen sind Prep-A-Gene™ (Bio-Rad) und Spin-Bind™ (FMC).

[0018] Der andere im Stuhl vorkommende Inhibitor verhindert die Bindung von Nukleinsäure an Glas. Es wurde herausgefunden, dass dieser zweite Inhibitor durch die Bindung des Inhibitors an ein modifiziertes Ionenaustausch-Harz (z. B. Qiagen) in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen wie mindestens etwa 1,0 M entfernt werden kann. Fachleute auf diesem Gebiet können sich zahlreiche Wege vorstellen, auf denen das vorstehend beschriebene Verfahren zur Konzentration und/oder Reinigung von Säuger-DNA aus Stuhlproben abgewandelt werden kann, sobald einmal erkannt ist, dass Säuger-Nukleinsäure selektiv aus Stuhlproben gewonnen werden kann. Alternativ können Fachleute auf dem Gebiet ohne übermäßiges Experimentieren alternative Reagenzien und Bedingungen ermitteln, die jenen, die hierin beschrieben werden, funktionell gleichwertig sind, da nun bekannt ist, dass solche Verfahren mit Stuhlproben durchführbar sind. Solche Modifikationen und funktionellen Äquivalente werden von der vorliegenden Erfindung eingeschlossen.

[0019] Aminosäuren, auf die hierin Bezug genommen wird, können nach den folgenden Abkürzungen mit drei Buchstaben oder einem Buchstaben identifiziert werden:

Aminosäure	Abkürzung mit drei Buchstaben	Abkürzung mit einem Buchstaben
L-Alanin	Ala	A
L-Arginin	Arg	R
L-Asparagin	Asn	N
L-Asparaginsäure	Asp	D
L-Cystein	Cys	C
L-Glutamin	Gln	Q
L-Glutaminsäure	Glu	E
L-Glycin	Gly	G
L-Histidin	His	H
L-lsoleucin	Ile	I
L-Leucin	Leu	L
L-Lysin	Lys	K
L-Methionin	Met	M
L-Phenylalanin	Phe	F
L-Prolin	Pro	P
L-Serin	Ser	S
L-Threonin	Thr	T
L-Tryptophan	Trp	W
L- Tyrosin	Tyr	Y
L-Valin	Val	V

[0020] Wenn es erwünscht ist, die mutierte Nukleinsäure vor dem Nachweis zu amplifizieren, kann dies mit Hilfe von Oligonukleotid(en), die Primer für die Amplifikation sind, durchgeführt werden. Diese besonderen Oligonukleotid-Primer basieren auf der Identifikation der flankierenden Regionen, die der mutierten Nukleotidsequenz benachbart sind. Zum Beispiel enthalten diese Oligonukleotid-Primer im Fall von K-ras Sequenzen, die in der Lage sind, mit der flankierenden Nukleotidsequenz 5'-TCCTTAAGTACTGACTTATATTTGAACA-3' und/oder 5'-TAGCTTAAGATACGTATAATTTTGTTCTAA-3' und hierzu komplementären Sequenzen zu hybridisieren.

[0021] Die Primer, die nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen Oligonukleotide mit ausreichender Länge und geeigneter Sequenz, so dass die spezifische Initiation der Polymerisation einer signifikanten Anzahl von Nukleinsäuremolekülen, die die Zielnukleinsäure enthalten, in Gang gesetzt wird. Auf diese Weise ist es möglich, selektiv die spezifische Zielnukleinsäuresequenz zu amplifizieren, die die interessierende Nukleinsäure enthält. Besonders der hierin verwendete Ausdruck "Primer" bezieht sich auf eine Sequenz, die zwei oder mehr Desoxyribonukleotide oder Ribonukleotide umfasst, bevorzugt mindestens acht, wobei diese Sequenz in der Lage ist, die Synthese eines Primer-Extensionsprodukts in Gang zu setzen, das im Wesentlichen einem Zielnukleinsäurestrang komplementär ist. Der Oligonukleotid-Primer besteht typischerweise aus 15–22 oder mehr Nukleotiden, obgleich er auch weniger Nukleotide enthalten kann.

[0022] Experimentelle Bedingungen, die die Synthese fördern, umschließen die Anwesenheit von Nukleosidtriphosphaten und einem Agens für die Polymerisation, wie etwa DNA-Polymerase, und geeignete Temperatur und geeigneten pH-Wert. Für maximale Wirksamkeit bei der Amplifikation liegt der Primer bevorzugt als Einzelstrang vor, kann aber auch doppelsträngig sein. Falls der Primer doppelsträngig ist, muss er zuerst behandelt werden, um seine Stränge zu trennen, bevor er zur Herstellung von Extensionsprodukten eingesetzt werden kann. Bevorzugt ist der Primer ein Oligodesoxyribonukleotid. Der Primer muss von ausreichender Länge sein, um die Synthese von Extensionsprodukten in Anwesenheit des induzierenden Agens zur Polymerisation einzuleiten. Die genaue Länge des Primers hängt von vielen Faktoren ab, einschließlich Temperatur, Pufferlösung und Nukleotidzusammensetzung.

[0023] Primer, die im Rahmen des Verfahrens der Erfindung verwendet werden, sind so zusammengesetzt, dass sie "wesentlich" komplementär zu jedem Strang der zu amplifizierenden mutierten Nukleotidsequenz sind. Wesentlich komplementär bedeutet, dass die Primer ausreichend komplementär sein müssen, um mit ihren entsprechenden Strängen unter Bedingungen, die dem Agens für die Polymerisation ein Funktionieren ermöglichen, zu hybridisieren. Mit anderen Worten sollten die Primer ausreichend komplementär zu den flankierenden Sequenzen sein, um mit ihnen zu hybridisieren und Amplifikation der mutierten Nukleotidsequenz zu erlauben. Bevorzugt besitzt das Ende des Primers, der erweitert wird, perfekte Basenpaar-Komplementarität mit dem komplementären flankierenden Strang.

[0024] Oligonukleotid-Primer, die im Rahmen der Erfindung verwendet werden, werden in jedem Amplifikationsprozess eingesetzt, bei dem erhöhte Mengen von Zielnukleinsäure produziert werden. Typischerweise ist ein Primer komplementär zu dem negativen (–) Strang der mutierten Nukleotidsequenz, und der andere ist komplementär zu dem positiven (+) Strang. Anheften der Primer an denaturierte Nukleinsäure mit anschließender Extension mit einem Enzym, wie etwa dem großen Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow) oder Taq-DNA-Polymerase und Nukleotiden oder Ligasen, führt zu neu synthetisierten + und – Strängen, die die Zielnukleinsäure enthalten. Weil diese neu synthetisierten Nukleinsäuren auch Matrizen sind, führen wiederholte Kreisläufe von Denaturierung, Primer-Anheftung und Extension zu exponentieller Produktion der Region (d. h. der mutierten Zielnukleotidsequenz), die durch den Primer definiert ist. Das Produkt der Amplifikationsreaktion ist ein bestimmtes Nukleinsäureduplikat mit Enden, die den Enden der spezifischen verwendeten Primer entsprechen. Fachleute auf dem Gebiet werden auch andere Amplifikationsverfahren kennen, die gleichfalls verwendet werden können, um die Anzahl der Kopien der Zielnukleinsäure zu erhöhen.

[0025] Die Oligonukleotid-Primer zur Verwendung in der Erfindung können unter Verwendung jedes geeigneten Verfahrens, wie etwa herkömmlicher Phosphotriester- und Phosphodiester-Verfahren oder automatisierter Ausführungsformen hiervon hergestellt werden. In einer solchen automatisierten Ausführungsform werden Diethylphosphoramidite als Startmaterialien verwendet und können wie von Beaucage et al. beschrieben (Tetrahedron Letters, 22: 1859–1862, 1981) synthetisiert werden. Ein Verfahren zur Synthese von Oligonukleotiden auf einer modifizierten festen Unterlage wird im US-Patent Nr. 4,458,066 beschrieben. Ein Verfahren zur Amplifikation, das im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden kann, ist die Polymerasekettenreaktion (PCR), beschrieben in den US-Patenten Nr. 4,683,202 und 4,683,195.

[0026] Jede Nukleinsäure aus einer Stuhlprobe kann, in gereinigter oder nicht gereinigter Form, als die Startnukleinsäure oder -säuren verwendet werden, vorausgesetzt, sie enthält oder steht unter dem Verdacht, die spezifische Nukleinsäuresequenz, die die Zielnukleinsäure enthält, zu enthalten. Daher können in dem Verfahren zum Beispiel DNA oder RNA, einschließlich Boten-RNA eingesetzt werden, wobei DNA oder RNA einzelsträngig oder doppelsträngig sein können. In dem Fall, dass RNA als eine Matrize verwendet werden soll, würden Enzyme und/oder Bedingungen verwendet werden, die optimal für die reverse Transkription der Matrize in DNA sind. Zusätzlich kann ein DNA-RNA-Hybrid, der einen Strang von jedem enthält, verwendet werden. Ein Gemisch aus Nukleinsäuren kann ebenfalls verwendet werden, oder die Nukleinsäuren, die in einer voraus gehenden Amplifikationsreaktion hierbei hergestellt wurden, unter Verwendung der gleichen oder anderer Primer, können so verwendet werden. Die zu amplifizierende mutierte Nukleotidsequenz kann eine Fraktion größerer Moleküle sein oder kann anfänglich als ein diskretes Molekül vorliegen, so dass die spezifische Sequenz aus der gesamten Nukleinsäure besteht. Es ist nicht notwendig, dass die zu amplifizierende Nukleinsäure am Anfang in einer reinen Form vorliegt; es kann eine kleinere Fraktion aus einem komplexen Gemisch sein, wie es etwa in der gesamten menschlichen DNA enthalten ist.

[0027] Wenn die mutierte Zielnukleotidsequenz der Probe aus zwei Strängen besteht, ist es notwendig, die Stränge der Nukleinsäure zu trennen, bevor sie als die Matrize verwendet werden kann. Strangtrennung kann entweder als ein separater Schritt oder gleichzeitig mit der Synthese der Primer-Extensionsprodukte durchgeführt werden. Diese Strangtrennung kann unter Verwendung verschiedener geeigneter Denaturierungsbedingungen einschließlich physikalischer, chemischer oder enzymatischer Mittel durchgeführt werden; der Ausdruck "Denaturierung" umschließt alle solche Mittel. Ein physikalisches Verfahren zur Trennung von Nukleinsäuresträngen stellt das Erhitzen der Nukleinsäure dar, bis sie denaturiert ist. Typische Hitzedenaturierung kann Temperaturen umfassen, die zwischen 80° bis 105°C liegen, über Zeiten, die von etwa 1 bis 10 Minuten reichen. Strangtrennung kann auch durch ein Enzym aus der Klasse der Enzyme, die als Helicasen bekannt sind, induziert werden, oder durch das Enzym RecA, das Helicase-Aktivität besitzt, und von dem bekannt ist, dass es in Anwesenheit von riboAtp DNA denaturiert. Die Reaktionsbedingungen, die für Strangtrennung von Nukleinsäuren mit Helicasen geeignet sind, werden von Kuhn Hoffmann-Berling (CSH-Quantitative Biology, 43: 63, 1978) beschrieben, und Techniken zum Gebrauch von RecA werden in C. Radding (Ann. Rev. Genetics, 16: 405–437, 1982) besprochen.

[0028] Wenn die zu amplifizierende Nukleinsäure, die die Zielnukleinsäure enthält, als Einzelstrang vorliegt, wird ihr Komplementärstrang durch Zugabe von einem oder zwei Oligonukleotid-Primern synthetisiert. Wenn ein einzelner Primer verwendet wird, wird ein Primer-Extensionsprodukt in Anwesenheit des Primers, einem Agens zur Polymerisation und den vier nachstehend beschriebenen Nukleosidtriphosphaten synthetisiert. Das Produkt wird komplementär zu der einzelsträngigen Nukleinsäure sein und wird mit einer einzelsträngigen Nukleinsäure hybridisieren, um einen Doppelstrang aus ungleich langen Strängen zu bilden, die dann in Einzelstränge getrennt werden können, um zwei einzelne, getrennte komplementäre Stränge zu erhalten. Alternativ können zwei Primer zu der einzelsträngigen Nukleinsäure zugegeben werden, und die Reaktion kann wie beschrieben durchgeführt werden.

[0029] Wenn komplementäre Stränge von Nukleinsäure oder -säuren getrennt werden, wobei es keine Rolle spielt, ob die Nukleinsäure ursprünglich doppel- oder einzelsträngig war, können die getrennten Stränge direkt als eine Matrize für die Synthese von weiteren Nukleinsäuresträngen verwendet werden. Diese Synthese wird

unter Bedingungen durchgeführt, die zulassen, dass Hybridisierung von Primern an Matrizen stattfindet. Allgemein findet Synthese in einer gepufferten wässrigen Lösung statt, bevorzugt bei einem pH-Wert von 7–9, am meisten bevorzugt von etwa 8. Bevorzugt wird ein molarer Überschuss (für genomische Nukleinsäure gewöhnlich etwa 10^8 : 1 Primer : Matrize) der beiden Oligonukleotid-Primer zur Pufferlösung zugegeben, die die getrennten Matrizenstränge enthält. Es ist jedoch einleuchtend, dass die Menge an Komplementärstrang nicht bekannt sein kann, wenn das Verfahren der Erfindung für diagnostische Zwecke verwendet wird, so dass die Menge an Primer relativ zur Menge an Komplementärstrang nicht mit Genauigkeit bestimmt werden kann. Aus praktischen Gründen wird jedoch die Menge an zugegebenem Primer allgemein in molarem Überschuss gegenüber der Menge an Komplementärstrang (Matrize) vorliegen, wenn die zu amplifizierende Sequenz in einem Gemisch aus komplizierten Langketten-Nukleinsäuresträngen enthalten ist. Ein großer molarer Überschuss ist bevorzugt, um die Wirksamkeit des Prozesses zu verbessern.

[0030] In einigen Ausführungsformen der Amplifikation werden die Substrate, zum Beispiel die Desoxyribonukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP, entweder getrennt oder zusammen mit den Primern in geeigneten Mengen zum Synthesegemisch zugegeben, und die resultierende Lösung wird auf etwa 90°–100°C über etwa 1 bis 10 Minuten, bevorzugt über 1 bis 4 Minuten erhitzt. Nach dieser Erhitzungsperiode lässt man die Lösung auf Zimmertemperatur abkühlen, die für die Hybridisierung der Primer vorzuziehen ist. Zum abgekühlten Gemisch wird ein geeignetes Agens zur Durchführung der Primer-Extensionsreaktion zugegeben (hierin "Agens für die Polymerisation" genannt), und man lässt die Reaktion unter Bedingungen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, ablaufen. Das Agens für die Polymerisation kann auch zusammen mit den anderen Reagenzien zugegeben werden, wenn es hitzestabil ist. Diese Synthese- (oder Amplifikations-) Reaktion kann bei Zimmertemperatur bis zu einer Temperatur ablaufen, oberhalb derer das Agens für die Polymerisation nicht mehr funktioniert. Daher ist zum Beispiel, wenn DNA-Polymerase als das Agens verwendet wird, die Temperatur allgemein nicht höher als etwa 40°C. In den meisten Fällen läuft die Reaktion bei Zimmertemperatur ab.

[0031] Das Agens für die Polymerisation kann jede Verbindung oder jedes System sein, das die Durchführung der Synthese der Primer-Extensionsprodukte bewirkt, Enzyme eingeschlossen. Für diesen Zweck geeignete Enzyme umschließen zum Beispiel DNA-Polymerase I von E. coli, Taq-Polymerase, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von E. coli, DNA-Polymerase von T4, andere geeignete DNA-Polymerasen, Polymerase-Muteine, reverse Transkriptase, Ligase und andere Enzyme, einschließlich hitzestabiler Enzyme (d. h. jene Enzyme, die Primer-Extension durchführen, nachdem sie ausreichend erhöhten Temperaturen ausgesetzt waren, um Denaturierung zu verursachen). Geeignete Enzyme werden die Zusammensetzung der Nukleotide in der erwünschten Weise erleichtern, um die Primer-Extensionsprodukte zu bilden, die zu jedem einzelnen mutierten Nukleotidstrang komplementär sind. Allgemein wird die Synthese am 3'-Ende jedes Primers in Gang gesetzt und in der 5'-Richtung entlang des Matrizenstrangs fortgeführt, bis die Synthese beendet wird, wobei Moleküle unterschiedlicher Längen erzeugt werden. Es kann jedoch auch Agenzien für die Polymerisation geben, die die Synthese am 5'-Ende in Gang setzen und in die entgegengesetzte Richtung fortführen, wobei sie die gleiche Prozedur verwenden, wie vorstehend beschrieben. In jedem Fall ist das Verfahren der Erfindung nicht durch die Ausführungsformen der Amplifikation, die hierin beschrieben werden, begrenzt.

[0032] Der neu synthetisierte Nukleotidstrang und sein komplementärer Nukleinsäurestrang werden unter den vorstehend beschriebenen hybridisierenden Bedingungen ein doppelsträngiges Molekül bilden, und dieses Hybridmolekül wird in den folgenden Schritten des Prozesses verwendet. Im nächsten Schritt wird das neu synthetisierte doppelsträngige Molekül denaturierenden Bedingungen ausgesetzt, indem eines der vorstehend beschriebenen Verfahren verwendet wird, um einzelsträngige Moleküle zu erzeugen.

[0033] Der vorstehend beschriebene Prozess wird mit den einzelsträngigen Molekülen wiederholt. Zusätzliches Agens für die Polymerisation, Nukleoside und Primer können zugegeben werden, falls notwendig, um die Reaktion unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen ablaufen zu lassen. Wiederum wird die Synthese an einem Ende von jedem der Oligonukleotid-Primer in Gang gesetzt und wird entlang der Einzelstränge der Matrize fortgeführt, um zusätzliche Nukleinsäure zu erzeugen. Nach diesem Schritt wird die Hälfte des Extensionsproduktes aus der spezifischen Nukleinsäuresequenz bestehen, die mit den beiden Primern verbunden ist.

[0034] Die Schritte Denaturierung und Synthese von Extensionsprodukten können so oft wie nötig wiederholt werden, um die mutierte Zielnukleotidsequenz um das Maß zu vermehren, das für den Nachweis notwendig ist. Die Menge der produzierten mutierten Nukleinsäuresequenz wird in exponentieller Weise anwachsen.

[0035] Das amplifizierte Produkt kann nachgewiesen werden, indem es durch Southern-Blots analysiert wird, ohne dass radioaktive Sonden verwendet werden. In einem solchen Verfahren, wird zum Beispiel eine kleine DNA-Probe, die eine sehr kleine Menge an mutierter Nukleotidsequenz enthält, amplifiziert und mit Hilfe einer Southern-Blot-Technik analysiert. Die Verwendung von nicht radioaktiven Sonden oder Markern wird durch den hohen Spiegel des amplifizierten Signals erleichtert.

[0036] Nukleinsäuren, die eine Mutation aufweisen und mit dem Verfahren der Erfindung nachgewiesen werden, können weiter ausgewertet, nachgewiesen, cloniert, sequenziert und dergleichen werden, entweder in Lösung oder nach Bindung an eine feste Unterlage und mit jedem Verfahren, das gewöhnlich zum Nachweis ei-

ner spezifischen DNA-Sequenz angewendet wird, wie etwa PCR, Oligomer-Restriktion (Saiki et al., Bio/Technology, 3: 1008– 1012, 1985), Allel-spezifische Oligonukleotid (ASO) Sonden-Analyse (Conner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 278, 1983), Oligonukleotid-Ligationsassays OLAs) (Landegren et al., Science, 241: 1077, 1988) und dergleichen. Molekulare Techniken zur DNA-Analyse sind besprochen worden (Landegren et al., Science, 242: 229–237, 1988). Auf diese Weise wird in einer bevorzugten Ausführungsform, wobei die nachzuweisende mutierte Nukleotidsequenz K-ras ist, eine Hybridisierungssonde benutzt, die in der Lage ist, mit mutierten Nukleotidsequenzen, bestehend aus 5'-CCTCGACAACCGCATCCGTT-3', 5'-CCTCGACTACCGCATCCGTT-3' oder 5'-CCTCGACCACTGCATCCGTT-3' und Sequenzen zu hybridisieren, die hierzu komplementär sind.

[0037] In einer Ausführungsform der Erfindung werden gereinigte Nukleinsäurefragmente, die eingeschobene Sequenzen oder Oligonukleotidsequenzen von 10–50 Basenpaaren enthalten, radioaktiv markiert. Die markierten Präparationen werden verwendet, um Nukleinsäure aus Stuhl mittels der Southern-Hybridisierungstechnik zu sondieren. Nukleotidfragmente aus Stuhl werden vor oder nach Amplifikation durch Gelelektrophorese in Fragmente unterschiedlicher Molekularmasse aufgetrennt und auf Filter übertragen, die Nukleinsäure binden. Nachdem sie der markierten Sonde ausgesetzt wurden, die an die Nukleotidfragmente hybridisieren wird, die die Zielnukleinsäurefragmente enthalten, wird die Bindung der radioaktiven Sonde an die Zielnukleinsäurefragmente durch Autoradiographie identifiziert (vgl. Genetic Engineering, 1, Hrsg. Robert Williamson, Academic Press, (1981), 72–81). Alternativ kann Nukleinsäure aus Stuhl direkt an Filter gebunden werden, an die die radioaktive Sonde selektiv Nukleinsäuren bindet, die die Sequenz der interessierenden spezifischen Sequenzen aufweisen, und der Grad der Bindung wird durch direkte Zählung der radioaktiven Zerfälle quantifiziert.

[0038] Wenn die Zielnukleinsäure nicht amplifiziert wird, kann der Nachweis unter Verwendung einer geeigneten Hybridisierungssonde direkt mit der getrennten Säuger-Nukleinsäure durchgeführt werden. In jenen Fällen, in denen die Zielnukleinsäure amplifiziert wird, würde der Nachweis mit der geeigneten Hybridisierungssonde nach der Amplifikation durchgeführt werden.

[0039] Die Sonden der vorliegenden Erfindung können zur Untersuchung der Verteilung der nachgewiesenen spezifischen Fragmente ebenso verwendet werden, wie der quantitative (relative) Bindungsgrad der Sonde zur Bestimmung des Auftretens von spezifisch stark bindenden (hybridisierenden) Sequenzen, auf diese Weise die Wahrscheinlichkeit für ein Individuum anzeigend, ein niedriges Risiko oder hohes Risiko für eine neoplastische Erkrankung, wie etwa das kolorektale Karzinom, zu tragen.

[0040] In den meisten Fällen wird die Sonde mit einem Atom oder anorganischen Radikal markiert, in den meisten Fällen werden Radionuklide verwendet, gelegentlich aber vielleicht auch schwere Metalle. Auf herkömmliche Weise kann eine radioaktive Markierung verwendet werden. Radioaktive Markierungen umschließen ^{32}P, ^{125}J, ^{3}H, ^{14}C oder dergleichen. Jede radioaktive Markierung kann verwendet werden, die ein adäquates Signal liefert und eine ausreichende Halbwertszeit aufweist. Andere Markierungen umschließen Liganden, die als ein spezifisches Teil des Bindungspaars für einen markierten Liganden dienen können und dergleichen. Eine breite Vielzahl von Markierungen sind in Immunoassays eingesetzt worden, die direkt auch für die vorliegende Untersuchung verwendet werden können. Die Wahl der Markierung wird durch die Wirkung der Markierung auf die Hybridisierungsrate und die Bindung der Sonde an die mutierte Nukleotidsequenz bestimmt. Es wird notwendig sein, dass die Markierung genügend Sensitivität aufweist, die Menge der mutierten Nukleotidsequenz aufzudecken, die für die Hybridisierung zur Verfügung steht. Andere Kriterien werden Leichtigkeit der Synthese der Sonde, bereitstehendes verfügbares Instrumentarium, Fähigkeit zur Automatisierung, Geeignetheit und dergleichen sein.

[0041] Die Art, in der die Markierung an die Sonde gebunden ist, wird in Abhängigkeit von der Art der Markierung variieren. Bei einer radioaktiven Markierung kann eine breite Vielzahl von Techniken angewendet werden. Allgemein verwendet wird die Nick-Translation mit einem ^{32}P-dNtp oder terminale Phosphathydrolyse durch alkaline Phosphatase mit anschließender Markierung mit radioaktivem ^{32}P durch Verwendung von ^{32}P-NTP und T4-Polynukleotid-Kinase. Alternativ können die Nukleotide synthetisiert werden, wobei eines oder mehrere der vorkommenden Elemente durch ein radioaktives Isotop ersetzt werden, z. B. Wasserstoff durch Tritium. Falls erwünscht, können komplementäre markierte Stränge als Sonden verwendet werden, um die Konzentration der hybridisierten Markierung zu verstärken.

[0042] Wenn andere Radionuklid-Markierungen betroffen sind, können verschiedene Bindungsgruppen verwendet werden. Eine terminale Hydroxylgruppe kann verestert werden, etwa mit anorganischen Säuren, z. B. ^{32}P-Phospat oder organischen ^{14}C-Säuren oder kann anders verestert werden, um Bindungsgruppen zur Markierung zu gewinnen. Alternativ können intermediäre Basen mit aktivierbaren Bindungsgruppen versehen sein, die dann mit einer Markierung verbunden werden können.

[0043] Interessierende Enzyme als Vermittlergruppen sind in erster Linie Hydrolasen, besonders Esterasen und Glycosidasen oder Oxidoreduktasen, besonders Peroxidasen. Fluoreszierende Verbindungen umschließen Fluorescein und seine Derivate, Rhodamin und seine Derivate, Dansyl, Umbelliferon und so weiter. Chemolumineszierende Verbindungen umschließen Luziferin und 2,3-dihydro-Phthalazinedione (z. B. Luminol).

[0044] Die Sonde kann zur Hybridisierung an eine Nukleotidsequenz verwendet werden, die an eine wasserunlösliche poröse Unterlage fixiert ist. In Abhängigkeit von der Quelle der Nukleinsäure kann die Art, in der die Nukleinsäure an der Unterlage befestigt ist, variieren. Fachleute auf dem Gebiet kennen oder können leicht in Erfahrung bringen, welche verschiedenen Unterlagen für das Verfahren der Erfindung verwendet werden können.

[0045] Die Nukleinsäure aus einer Stuhlprobe wird auf einen Filter gesprenkelt oder ausgebreitet, um eine Vielzahl von einzelnen Portionen zu erhalten. Der Filter besteht aus einer inerten, porösen, festen Unterlage, z. B. Nitrozellulose. Alle Säugerzellen, die im Stuhl vorhanden sind, werden behandelt, um ihre Nukleinsäure frei zu setzen. Die Lysierung und Denaturierung der Nukleinsäure, wie auch die nachfolgenden Waschungen können mit einer geeigneten Lösung über einen ausreichenden Zeitraum durchgeführt werden, um die Zellen zu lysieren und die Nukleinsäure zu denaturieren. Für die Lysierung wird allgemein chemische Lysierung angewendet, wie vorstehend für die Pufferlösung zur Stuhl-Lysierung beschrieben. Andere Denaturierungsagenzien umschließen erhöhte Temperaturen, organische Reagenzien, z. B. Alkohole, Amide, Amine, Harnstoffe, Phenole und Sulfoxide oder bestimmte anorganische Ionen, z. B. Thiocyanat und Perchlorat.

[0046] Nach der Denaturierung wird der Filter in einer wässrigen gepufferten Lösung wie etwa Tris, allgemein mit einem pH-Wert von 6 bis 8, gewöhnlich 7, gewaschen. Ein oder mehrere Waschgänge können durchgeführt werden, in geeigneter Weise unter Verwendung der gleichen Vorgehensweise, die auch für Lysierung und Denaturierung angewendet wurde.

[0047] Nachdem Lysierung, Denaturierung und Waschungen durchgeführt worden sind, wird der mit Nukleinsäure besprenkelte Filter bei einer erhöhten Temperatur getrocknet, generell von 50°C bis 70°C. Während dieser Prozedur wird die Nukleinsäure in ihrer Position fixiert und kann mit der Sonde untersucht werden, wann es passend ist.

[0048] Prä-Hybridisierung kann durchgeführt werden, indem der Filter bei einer leicht erhöhten Temperatur über einen ausreichenden Zeitraum mit der Hybridisierungslösung inkubiert wird, ohne dass die Sonde den Filter vollständig durchnässt. Zahlreiche Hybridisierungslösungen können verwendet werden, die von etwa 20% bis 60% des Volumens, bevorzugt 30% aus einem inerten, polaren organischen Lösungsmittel bestehen. Eine gebräuchliche Hybridisierungslösung besteht aus etwa 50% Formamid, etwa 0,5 bis 1 M Natriumchlorid, etwa 0,05 bis 0,1 M Natriumcitrat, etwa 0,05 bis 0,2% Natriumdodecylsulfat und kleineren Mengen EDTA, Ficoll (etwa 300–500 kD), Polyvinylpyrrolidon (etwa 250–500 kD) und Serumalbumin. Ebenfalls wird allgemein in der Hybridisierungslösung von etwa 0,5 bis 5 mg/ml Schall-behandelte denaturierte DNA, z. B. Kälberthymus von Lachssperma, enthalten sein; und bei Bedarf von etwa 0,5 bis 2% Gew./Vol Glycin. Andere Zusätze können ebenfalls eingeschlossen sein, wie etwa Dextransulfat von etwa 100 bis 1.000 kD und in einer Menge von etwa 8 bis 15 Gewichtsprozenten der Hybridisierungslösung.

[0049] Die genaue Hybridisierungstechnik ist für die Erfindung nicht wesentlich. Andere Hybridisierungstechniken werden von Gall und Pardue, Proc. Natl. Acad. Sci. 63: 378, 1969; und John et al., Nature, 223: 582, 1969 beschrieben. Falls Verbesserungen bei den Hybridisierungstechniken gemacht werden, können diese direkt in das Verfahren der Erfindung übernommen werden.

[0050] Die Menge der markierten Sonde, die in der Hybridisierungslösung vorhanden ist, wird in Abhängigkeit von der Natur der Markierung, der Menge der markierten Sonde, die vernünftigerweise an den Filter binden kann und der Genauigkeit der Hybridisierung stark variieren. Allgemein wird starker Überschuss über stöchiometrische Konzentrationen der Sonde verwendet, um die Bindungsrate der Sonde an die fixierte Zielnukleinsäure zu erhöhen.

[0051] Verschiedene Genauigkeitsgrade der Hybridisierung können angewendet werden. Je strenger die Bedingungen sind, desto größer ist die Komplementarität, die für die Hybridisierung zwischen der Sonde und der einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäuresequenz für die Doppelstrangbildung benötigt wird. Strenge Bedingungen können über Temperatur, Sondenkonzentration, Sondenlänge, Ionenstärke, Zeit und dergleichen kontrolliert werden. Es ist vorteilhaft, die Stringenz der Hybridisierung durch die Änderung der Polarität der Reaktionslösung zu variieren, indem die Konzentration von Formamid in dem Bereich von 20% bis 50% verändert wird. Die verwendeten Temperaturen liegen normalerweise in dem Bereich von etwa 20°C bis 80°C, gewöhnlich 30°C bis 75°C (vgl. allgemein, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, Hrsg. Wiley & Sons, 1989).

[0052] Nachdem der Filter mit einer Hybridisierungslösung bei einer moderaten Temperatur über einen Zeitraum, der ausreicht, um die Hybridisierung stattfinden zu lassen, in Kontakt gebracht worden ist, wird der Filter dann in eine zweite Lösung überführt, die analoge Konzentrationen von Natriumchlorid, Natriumcitrat und Natriumdodecylsulfat aufweist, wie die in der Hybridisierungslösung verwendeten. Der Zeitraum, in dem der Filter in der zweiten Lösung gehalten wird, kann von fünf Minuten bis zu drei Stunden oder mehr variieren. Die zweite Lösung bestimmt die Stringenz, sie löst überkreuzte Doppelstränge und kurze komplementäre Sequenzen. Nach Abspülen des Filters bei Zimmertemperatur mit verdünnter Natriumcitrat-Natriumchloridlösung kann der Filter nun auf die Anwesenheit von Doppelsträngen in Übereinstimmung mit der Art der Markierung untersucht werden. Wenn die Markierung radioaktiv ist, wird der Filter getrocknet und einem Röntgenfilm ausgesetzt.

[0053] Die Materialien zum Gebrauch in der Untersuchung der Erfindung sind ideal zur Zusammenstellung

eines Kits geeignet. Solch ein Kit kann aus einem in Kompartimente unterteilten Träger bestehen, der in enger Nachbarschaft einen oder mehrere Behälter wie etwa Violen, Röhrchen oder dergleichen aufnimmt, jeder dieser Behälter enthält eines der einzelnen Elemente, die in dem Verfahren verwendet werden.

[0054] Zum Beispiel kann einer der Behälter eine Hybridisierungssonde enthalten, die nachweisbar markiert ist oder werden kann. Ein zweiter Behälter kann eine Pufferlösung zur Lysierung des Stuhls enthalten. Der Kit kann auch Behälter beinhalten, die Nukleotid(e) zur Amplifikation der Zielnukleinsäure enthalten und/oder einen Behälter mit einem Vermittler, wie etwa einem Biotin-Bindungsprotein, wie etwa Avidin oder Streptavidin, gebunden an ein Vermittlermolekül, wie etwa eine enzymatische, fluoreszierende oder eine Radionuklid-Markierung.

[0055] Die vorstehende Offenlegung beschreibt die Erfindung im Allgemeinen. Ein vollständigeres Verständnis kann durch Bezugnahme auf die nachfolgenden speziellen Beispiele erlangt werden, die hierin lediglich zum Zweck der Veranschaulichung angegeben werden und den Rahmen der Erfindung nicht begrenzen sollen.

BEISPIEL 1

NACHWEIS VON NEOPLASTISCHER DNA AUS STUHLPROBEN

[0056] Eine Anfangsstudie wurde durchgeführt, um die Tumoren von 24 Patienten auf die Anwesenheit von K-ras-Genmutationen in den Codons 12 oder 13 zu analysieren. Diese Fälle bestanden aus einer fortlaufenden Reihe von Klinikpatienten, deren Stuhlproben vor der Vorbereitung des Darms für Darmspiegelung oder Operation genommen werden konnten, und bei denen sich später herausstellte, dass sie entweder einen bösartigen kolorektalen Tumor (Karzinom) oder einen gutartigen Tumor (Adenom) hatten, der größer als 1 cm im Durchmesser war. Adenome dieser Größe sind die klinisch wichtigsten, da sie sich viel häufiger zur Bösartigkeit entwickeln als kleinere Tumoren.

[0057] Das erste Exon des K-ras-Gens wurde aus DNA amplifiziert, die aus Kryostat-Sektionen dieser Tumoren (Fearon, et al., Nature, 318: 377, 1985) mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) gereinigt worden war. Für die PCR war der Richtungsprimer 5'-AGGAATTCATGACTGAATATAAACTTGT-3', und der Gegenrichtungsprimer war 5'-ATCGAATTCTATGCATATTAAAACAAGATT-3'. Diese Primer umschlossen EcoRI-Stellen an ihren 5'-Enden, um Clonierung zu erleichtern. Jeder PCR-Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C über 30 s, gefolgt vom Anheftungsschritt bei 55°C über 30 s und der Extension bei 70°C über 45 s. Für jede PCR wurden 500 ng Matrizen-DNA und 5 Einheiten Taq Polymerase in einem 50 µl Reaktionsgemisch verwendet, das aus 1.5 und mM dNTP's, 16,6 mM Ammoniumsulfat, 67 mM Tris, pH-Wert 8,8, 8,67 mM $MgCl_2$, 10 mM β-Mercaptoethanol und 10% Dimethylsulfoxid bestand. In diesem spezifischen Beispiel wurden 35 Zyklen für die Tumor-DNA und 45 Zyklen für die DNA aus den Stuhlproben durchgeführt.

[0058] Die PCR-Produkte wurden en masse cloniert und zusammen gegeben, um Mutationen zu identifizieren. Die PCR-Produkte wurden durch Extraktion mit Phenol-Chloroform und Ethanol-Fällung gereinigt. Sie wurden mit EcoRI gespalten, erneut gereinigt, und etwa 50 ng DNA wurden an Lambda-Zap-II-Vektorarme (Stratagene) gebunden und nach den Anweisungen des Herstellers verpackt. XLI-Blue-Zellen (Stratagene) wurden mit dem Bakteriophagen infiziert, und doppelsträngige Plasmide wurden unter Verwendung einer Helfer-Phage erhalten (Nigro et al., Nature 342: 705, 1989). Ein Minimum von 100 Clonen wurde für die Sequenzierung unter Verwendung des Primers 5'-ATTCGTCCACAAAATGAT-3' zusammen gegeben. Es stellte sich heraus, dass in dieser Studie 9 der 24 Tumoren (37%) Mutationen dieses Exons enthielten. Drei verschiedene Mutationen wurden identifiziert (Codon 12: Gly→Val oder Asp; Codon 13: Gly→Asp). Diese Daten stimmten mit voraus gehenden Studien von ähnlichen Tumoren überein, die zeigten, dass annähernd 50% Ras-Gen Mutationen enthielten, wobei 84% der Mutationen die Codons 12 oder 13 von K-ras betrafen (Vogelstein et al., N. Engl. J. Med. 319: 525, 1988).

[0059] Als nächstes wurden Stuhlproben der beiden ersten der neun Patienten analysiert. Mehrere Verfahren zur Reinigung der DNA wurden ausgewertet und die am Besten reproduzierbare Vorgehensweise im Folgenden angewendet. In dieser Vorgehensweise wurden etwa 100 mg Stuhl, bei –80°C eingefroren, mit 300 µl Lysierungspufferlösung (500 mM Tris, 50 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH-Wert 9.0) verdünnt, gevortext und Partikel und die meisten Bakterien durch Zentrifugation (12.000 g, 2 min, 30 s) entfernt. DNA im Überstand wurde durch SDS-Proteinase K-Abbau, Extraktion mit Phenol-Chloroform und Ethanol-Fällung gereinigt (Goelz et al., Biochem Biophys Res. Commun., 13: 118, 1985). Die DNA aus Stuhl wurde dann weiter durch Bindung an Glasperlen unter Verwendung einer Prepagene-Matrix (BioRad) gereinigt (Vogelstein und Gillespie, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 615, 1978). Fünf Mikroliter der Matrix wurden nach den vom Hersteller spezifizierten Bedingungen verwendet, um die DNA aus 100 mg Stuhl zu reinigen. Typischerweise wurden 0,5 bis 5 µg DNA erhalten.

[0060] Das erste Exon des K-ras-Gens wurde dann aus dieser DNA in gleicher Art, wie vorstehend für die DNA aus Tumoren beschrieben, PCR-amplifiziert. Weil zu Beginn erwartet wurde, dass mutierte Ras-Gene nur

einen kleinen Teil der gesamten Ras-Gene im Stuhl repräsentieren würden (falls überhaupt vorkommend), wurde eine sehr empfindliche Analysetechnik für K-ras verwendet, die Clonierung in einen Bakteriophagen einschloss. Für diese Technik war schon zuvor bewiesen worden, dass sich mit ihr eine kleine Fraktion mutierter p53-Gene im Urin von Patienten mit fortgeschrittenen Blasenkrebserkrankungen erkennen und die Existenz von nur einem mutierten Gen unter mehreren Tausend normalen Genen enthüllen ließ (Sidransky et al., Science, 252: 706, 1991).

[0061] SL1-Zellen, die mit einem PCR-Produkte enthaltenden Bakteriophagen infiziert waren, wurden mit einer Dichte von 100–2.000 Plaques pro Platte auf L-Agar aufgebracht, auf Nylonmembranen übertragen und mit Oligonukleotiden hybridisiert, die für Wildtyp- oder mutierte K-ras-Gene spezifisch waren. Hybridisierung wurde über eine Stunde bei 50°C in Pufferlösung H (0.9 M Natriumchlorid, 0,005 M EDTA, 0,05 M Natriumphosphat, pH-Wert 7,0, 1% Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,5% Magermilchpulver, 10% Formamid und 6% Polyethylenglycol 6000) mit 10^7 dpm/ml Sonde durchgeführt. Spülungen wurden bei 63°C in 450 mM Natriumchlorid, 18 mM Natriumcitrat, 1 mm Tris, pH-Wert 7,2, 0.1% SDS über 15 min durchgeführt. Die Filme wurden über 1–8 Stunden bei –80°C mit intensivierenden Filtern belichtet. Die für die Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide waren 5'-GGAGCTGGTGGCGTAGGCAA-3' für Wildtyp- (wt) Ras, 5'-GGAGCTGTTGGCGTAGGCAA-3' für den 12^{val}-Mutanten, 5'-GGAGCTGATGGCGT AGGCAA-3' für den 12^{asp}-Mutanten und 5'-GGAGCTGGTGACGTAGGCAA-3' für den 13^{asp}-Mutanten. Die Oligonukleotide wurden unter Verwendung von T4-Polynukleotid-Kinase auf eine spezifische Aktivität von etwa 10^8 dpm/µg markiert.

[0062] Die Analyse dieser Befunde zeigte überraschend, dass beide Patienten mutierte Ras-Gene in der aus ihren Stuhlproben gereinigten DNA aufwiesen. Die mutierten Gene, die im Stuhl nachgewiesen wurden, waren die gleichen wie jene, die in den Tumoren nachgewiesen worden waren (12^{val} im Stuhl und Tumor bei Patient 1; 13^{asp} im Stuhl von Patient 2, **Fig.** 1). Eine Kontroll-Stuhlprobe eines Patienten ohne eine Ras-Gen-Mutation in seinem Tumor enthielt an keiner dieser Positionen Mutationen (**Fig.** 1, Patient 10).

[0063] Die Fraktion der Phagen-Plaques, die an das Mutant-spezifische Oligonukleotid der Patienten 1 und 2 hybridisierte, war recht hoch, sie repräsentierte 8% beziehungsweise 4% der Phage, die an das für das K-ras-Gen des Wildtyps spezifische Oligonukleotid hybridisierte. Diese unerwarteten Befunde zeigten, dass eine weniger empfindliche, aber einfachere Untersuchung verwendet werden kann, um mutierte Gene in Stuhlproben zu identifizieren.

[0064] Um die Möglichkeit auszuloten, ob eine einfachere und schnellere Technik verwendet werden kann, um eine spezifische Zielsequenz nachzuweisen, wurden in diesem Fall die verschiedenen K-ras-Gene, unfertige PCR-Produkte einfach der Elektrophorese durch ein Agarosegel unterworfen und mit Hilfe des Southern-Verfahrens auf Nylonfilter übertragen. Diese Blots wurden dann mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert, die Wildtyp- oder mutierte K-ras-Gene erkannten. Beispiele der Ergebnisse werden in **Fig.** 2 für gepaarte Tumor- und Stuhlproben dargestellt. Die in Patient 1 gefundene 12^{val}-Mutation konnte leicht in ihrem Stuhl mit Hilfe der Southern-Blot-Untersuchung beobachtet werden (**Fig.** 2, obere Tafel). Die für den 12^{val}-Mutanten spezifischen Oligonukleotide lieferten eine negative Kontrolle (**Fig.** 2, mittlere Tafel). Das Wildtyp-spezifische Oligonukleotid hybridisierte an DNA sowohl aus Tumor als auch aus Stuhl, wie erwartet (**Fig.** 2, untere Tafel). In ähnlicher Weise ergab die Southern-Blot Analyse, dass die Tumoren und der Stuhl der DNA der Patienten 3 und 4 beide die 12^{asp}-Mutation enthielten, während keine mit dem 12^{val}-spezifischen Oligonukleotid hybridisierte (**Fig.** 2). Das Verhältnis von Mutant- zu Wildtyp-Hybridisierung in den Stuhlproben war, übereinstimmend mit den Untersuchungen zur Plaque-Hybridisierung, 5–10 mal niedriger als das in den Tumoren.

[0065] Die Stuhlproben von allen neun Patienten wurden durch Southern-Blot Analysen analysiert, und bei acht von ihnen wurden Mutationen nachgewiesen (Tabelle 1). Mutationen aus gutartigen Tumoren (Patienten 2 und 9), wie auch Mutationen aus bösartigen Tumoren waren im Stuhl nachweisbar. Tumoren, nicht größer als 1,3 cm^3, hinterließen nachweisbare mutierte Gene im Stuhl (Patient 2). Darüber hinaus schien die Stelle im Darm nicht kritisch zu sein, denn selbst sehr proximal gelegene Tumoren ergaben positive Signale (Patient 9, Blinddarm; Patient 7, aufsteigendes Kolon).

TABELLE 1

AUF RAS-GEN-MUTATIONEN IM STUHL UNTERSUCHTE PATIENTEN

PATIENT	ALTER/ GESCHLECHT	LAGE DES TUMORS	TUMORTYP/ STADIUM[1]	TUMOR-GRÖßE	TUMOR-MUTATION[2]	MUTIERTES RAS-GEN IM STUHL
1	52/W	Rektum	Karzinom/C	5,8*6,5*2,7 cm	12^{val}	+
2	63/M	sigmoidales Kolon	Adenom	1,5*1,5*0,6 cm	13^{asp}	+
3	51/W	Rektum	Karzinom/C	2,8*2,0*0,4 cm	12^{asp}	+
4	61/M	Rektum	Karzinom/C	2,5*4,7*1,8 cm	12^{asp}	+
5	70/M	Rektum	Karzinom/A	1,0*0,9*0,4 cm	13^{asp}	-
6	71/M	Rektum	Karzinom/B	5,9*6,4*1,7 cm	12^{asp}	+
7	51/W	Aufsteigendes Kolon	Karzinom/B	4,3*3,4*1,4 cm	12^{asp}	+
8	69/M	sigmoidales Kolon	Karzinom/B	4,8*3,0*1,2 cm	13^{asp}	+
9	67/M	Blinddarm	Adenom	6,0*4,0 cm	12^{asp}	+
10	61/M	Milz-Flex	Karzinom/C	12*6,5 cm^5	keine	-
11	34/M	sigmoidales Kolon	Karzinom/B	7*3*2 cm^5	keine	-
12	63/M	sigmoidales Kolon	Karzinom/C	2,1*3,1*04 cm	keine	-
13	42/W	NA[4]	NA	-	NA	-
14	53/W	NA	NA	-	NA	-
15	63/W	NA	NA	-	NA	-

[1] Karzinome wurden nach Duke (13) klassifiziert: A = begrenzt auf Muscularis propria; B = Ausdehnung über Muscular propria hinaus, aber auf das Kolon begrenzt; C = metastatisch in regionalen Lymphknoten.

[2] Durch Sequenzanalyse der Codons 12 oder 13 von K-ras bestimmt (wie im Text beschrieben).

[3] Wie durch die Plaque-Hybridisierung oder Southern-Blot Untersuchung unter Verwendung von drei Mutant-spezifischen Oligomeren (12^{val}, 12^{asp} und 13^{asp}) als Nachweise (vgl. Text) untersucht.

[4] Bei Patienten 13, 14 und 15 wurden keine kolorektalen Neoplasmen bei Darmspiegelung gefunden (NA = nicht anwendbar).

[5] Nur Messungen der externen Oberflächen dieser Tumoren standen zur Verfügung.

[0066] Als Kontrollen wurden sechs Stuhlproben untersucht, drei von Patienten ohne kolorektale Neoplasie und drei von Patienten mit kolorektalen Tumoren, die keine K-ras Mutationen an den Codons 12 oder 13 ent-

hielten. In allen sechs Fällen wurde starke Hybridisierung mit den Wildtyp-spezifischen Oligonukleotiden, nicht aber mit den für die 12^{val}, 12^{asp} oder 13^{asp}-Mutationen spezifischen Oligonukleotiden beobachtet (TABELLE 1, Beispiele in den **Fig.** 1 und 2).

[0067] Die Ergebnisse dieser Experimente stellen eine Ausführungsform zur Verfügung, mit der erfolgreicher Nachweis von Neoplasie erreicht wurde, und die eine praktische Basis für einen neuen Ansatz zum Nachweis des Bestehens von Neoplasie, wie etwa kolorektalen Tumoren, auf eine nicht invasive Weise liefert. Der Ansatz könnte bei der Überwachung von Patientenpopulationen mit verschiedenen Diäten oder Behandlungsformen nützlich sein, die das Auftreten von Neoplasie minimieren sollen. Er könnte auch für das Screenen asymptomatischer Patienten eingesetzt werden, besonders jener, bei denen ein durch ererbte oder Umweltfaktoren bedingtes Risiko für das Vorkommen von Neoplasie besteht. Die laufenden Ergebnisse zeigen an, dass ein signifikanter Teil von frühen kolorektalen Krebserkrankungen und gefährlichen Vorstufen bösartiger Veränderungen durch diese Strategie erfasst werden können. Zusätzlich zeigen diese Befunde an, dass andere mutierte Nukleotidsequenzen außer K-ras, die mit Neoplasien des Verdauungstraktes in Zusammenhang stehen oder darauf hinweisen, ebenfalls in Stuhlproben nachweisbar sein würden. Solche Sequenzen umschließen zum Beispiel die Gene für DCC, MCC, FAP und APC, bei denen p53 gefunden werden kann.

[0068] Die vorstehende Offenlegung beschreibt die Erfindung im Allgemeinen. Ein vollständigeres Verständnis kann durch Bezugnahme auf die nachfolgenden speziellen Beispiele erlangt werden, die hierin lediglich zum Zweck der Veranschaulichung angegeben werden und den Rahmen der Erfindung nicht begrenzen sollen.

ZUSAMMENFASSUNG DER SEQUENZEN

Sequenz ID. Nr. 1 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotid-Primers, verwendet zur Amplifikation einer mutierten Nukleinsäuresequenz in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung (Seite 8, Zeile 36);
Sequenz ID. Nr. 2 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotid-Primers, verwendet zur Amplifikation einer mutierten Nukleinsäuresequenz in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung (Seite 8, Zeile 37);
Sequenz ID. Nr. 3 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotid-Primers, verwendet zur Amplifikation einer mutierten Nukleinsäuresequenz in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung (Seite 15, Zeile 15);
Sequenz ID. Nr. 4 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotid-Primers, verwendet zur Amplifikation einer mutierten Nukleinsäuresequenz in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung (Seite 15, Zeile 16 vorstehend);
Sequenz ID. Nr. 5 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotid-Primers, verwendet zur Amplifikation einer mutierten Nukleinsäuresequenz in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung (Seite 15, Zeile 16, nachstehend);
Sequenz ID. Nr. 6 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotids für die Sequenz in Richtung des ersten Exons des K-ras-Gens (Seite 21, Zeile 24);
Sequenz ID. Nr. 7 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotids für die Sequenz in Gegenrichtung des ersten Exons des K-ras-Gens (Seite 21, Zeile 25);
Sequenz ID. Nr. 8 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotid-Primers, verwendet zur Amplifikation einer mutierten Nukleinsäuresequenz in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung (Seite 22, Zeile 12);
Sequenz ID. Nr. 9 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotids für Wildtyp-Ras (Seite 23, Zeile 20);
Sequenz ID. Nr. 10 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotids für den Ras-12^{val}-Mutanten (Seite 23, Zeile 21);
Sequenz ID. Nr. 11 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotids für den Ras-12^{asp-} Mutanten (Seite 23, Zeile 22); und
Sequenz ID. Nr. 12 ist eine Nukleinsäuresequenz eines Oligonukleotids für den Ras-13^{asp}-Mutanten (Seite 23, Zeile 23).

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: Vogelstein, Bert
Kinzler, Kenneth W.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON ZIEL-NUKLEINSÄURE DURCH STUHLANALYSE

(III) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) POSTANSCHRIFT:

(A) ADRESSAT: Spensley Horn Jubas & Lubitz

(B) STRASSE: 1880 Century Park East - Suite 500

(C) STADT: Los Angeles

(D) BUNDESSTAAT: Kalifornien

(E) LAND: USA

(F) ZIP: 90067

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) TYP DES MEDIUMS: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) LAUFENDE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: US 07/861,910

(B) ANMELDETAG: 01. April 1992

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) PATENTANWALT/AGENT:

(A) NAME: Wetherell, Jr. Ph.D., John W.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 31,678

(C) REFERENZ/AKTENNUMMER: PD-1901

(ix) TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: (619) 455-5100

(B) TELEFAX: (619) 455-5110

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..28

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 1:

TCCTTAAGTA CTGACTTATA TTTGAACA 28

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 2

TAGCTTAAGA TACGTATAAT TTTGTTCTAA 30

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 3

CCTCGACAAC CGCATCCGTT 20

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 4

CCTCGACCAC TGCATCCGTT 20

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 5:

CCTCGACCAC TGCATCCGTT 20

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..28

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 6:

AGGAATTCAT GACTGAATAT AAACTTGT 28

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 7

ATCGAATTCT ATGCATATTA AAACAAGATT 30

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..18

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 8:

ATTCGTCCAC AAAATGAT 18

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 9:

GGAGCTGGTG GCGTAGGCAA 20

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 10:

GGAGCTGTTG GCGTAGGCAA 20

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 11:

GGAGCTGATG GCGTAGGCAA 20

(2) INFORMATION ZU SEQ. ID. Nr. 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) ERSCHEINUNGSFORM:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA

(B) LOKATION: 1..20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NR. 12:

GGAGCTGGTG ACGTAGGCAA 20

Patentansprüche

1. Verfahren zur Verstärkung der Nachweisbarkeit einer Zielnucleinsäure in einer Säugernucleinsäure in einer Stuhlprobe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst: Anreichern der Zielnucleinsäure durch Trennen einer in der Stuhlprobe vorhandenen Säugernucleinsäure von in der Stuhlprobe vorhandenen bakteriellen Zellen und Nachweisen des Vorhandenseins der Zielnucleinsäure in der Säugernucleinsäure.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zielnucleinsäure vor dem Nachweis amplifiziert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Amplifikation mit Hilfe von Oligonucleotid(en) erfolgt, das (die) in der Lage ist (sind), an die flankierenden Regionen der Zielnucleinsäure zu hybridisieren.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Zielnucleinsäure eine Mutation, einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, eine Nucleinsäuredeletion oder eine Nucleinsäuresubstitution umfasst.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Mutation mit einem Neoplasma assoziiert ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Neoplasma aus dem Gastrointestinaltrakt ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Neoplasma im Dünndarm gefunden wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei das Neoplasma gutartig ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Neoplasma ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Adenomen, Leiomyomen, Lipomen und Angiomen.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche von 5 bis 7, wobei das Neoplasma bösartig ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Neoplasma ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Adenokarzinomen, Leiomyosarkomen, Lymphomen und karzinoiden Tumoren.

12. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Neoplasma im Dickdarm gefunden wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das Neoplasma gutartig ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Neoplasma ein Adenomatuspolyp ist.

15. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das Neoplasma bösartig ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das Neoplasma ein kolorektales Karzinom ist.

17. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Neoplasma ein Bauchspeicheldrüsenkarzinom ist.

18. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Neoplasma ein Magenkarzinom ist.

19. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Zielnucleinsäure, die mit dem Neoplasma assoziiert ist, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Oncogen und einem Tumorsuppressorgen.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das Oncogen ein Mitglied der ras-Familie ist.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Oncogen K-ras ist.

22. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das Tumorsuppressorgen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus p53, DCC, MCC, FAP und APC.

23. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Nucleotidsequenz der flankierenden Region, an die das Oligonucleotid hypridisieren kann, ausgewählt ist aus
5'-ACAAGTTTATATTCAGTCATGAATTCCT-3'
oder
5'-AATCTTGTTTTAATATGCATAGAATTCGAT-3',
und dazu komplementären Sequenzen.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei das Oligonucleotid
5'-AGGAATTCATGACTGAATATAAACTTGT-3'
oder
5'-ATCGAATTCTATGCATATTAAAACAAGATT-3',
und dazu komplementären Sequenzen ist.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, wobei die Zielnucleinsäure durch Verwendung einer Nucleotidhybridisierungssonde nachgewiesen wird.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Zielnucleinsäure, an die die Nucleotidhybridisierungssonde hybridisieren kann, ausgewählt ist aus
5'-TTGCCTACGCCAACAGCTCC-3';
5'-TTGCCTACGCCATCAGCTCC-3';
oder
5'-TTGCCTACGTCACCAGCTCC-3';
und dazu komplementären Sequenzen.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei die Nucleotidhybridisierungssonde ausgewählt ist aus
5'-GGAGCTGTTGGCGTAGGCAA-3';
5'-GGAGCTGATGGCGTAGGCAA-3';
oder
5'-GGAGCTGGTGACGTAGGCAA-3';
und dazu komplementären Sequenzen.

28. Verfahren zur Trennung von Säugernucleinsäure von einer Stuhlprobe, umfassend:
(a) Entfernen eines Feststoffes aus einer Stuhlprobe in Stuhl-Lysepuffer in einer Konzentration von 500 mM zum Herstellen einer Nicht-Feststofffraktion; und
(b) Abtrennen der Nucleinsäure von der Nicht-Feststofffraktion.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Nicht-Feststofffraktion behandelt wird, um Nucleasen abzubauen.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die behandelte Nicht-Feststofffraktion extrahiert wird, um die Nucleinsäure zu konzentrieren.

31. Verfahren nach Anspruch 29, weiterhin umfassend mindestens einen der Schritte der Bindung der Nucleinsäure an Glas in der Gegenwart eines chaotropen Salzes oder Bindung der Nucleinsäure an eine modifizierte Ionenaustauschermatrix.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 31, wobei der Stuhl-Lysepuffer einen pH-Wert von etwa 8,0 bis etwa 9,0, einen Chelatbildner in einer Konzentration von etwa 10 mM bis etwa 200 mM, einen Puffer in einer Konzentration von mindestens 500 mM und eine Salzkonzentration von etwa 1 mM bis etwa 20 mM hat.

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei der Chelatbildner EDTA ist.

34. Verfahren nach Anspruch 32, wobei das Salz NaCl ist.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 34, wobei der Feststoff durch Zentrifugation entfernt wird.

36. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Nucleasen durch Proteinase K abgebaut werden.

37. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Nicht-Feststofffraktion mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Ethanol ausgefällt wird.

38. Verwendung eines Stuhl-Lysepuffers in einem der Ansprüche 1 bis 37, wobei der Puffer einen Puffer in einer Konzentration von mindestens 500 mM, einen Chelatbilder in einer Konzentration von 10 mM bis 200 mM und ein Salz in einer Konzentration von 1 mM bis 20 mM bei einem pH-Wert von 8,0 bis 9,0 umfasst.

39. Verwendung nach Anspruch 38, wobei der Chelatbildner EDTA ist.

40. Verwendung nach Anspruch 38, wobei das Salz NaCl ist.

41. Verwendung nach einem der Ansprüche 38 bis 40, weiterhin umfassend Tris in einer Konzentration von 0,1 M bis 1 M.

42. Verwendung eines Kits zum Nachweis einer Zielnucleinsäure aus einer Stuhlprobe, wobei das Kit Trägermittel umfasst, die kompartimentiert sind, um darin getrennt voneinander einen oder mehrere Behälter aufzunehmen, wobei die Behälter einen ersten Behälter, der eine Hybridisierungssonde enthält, sowie einen zweiten Behälter umfassen, der einen Stuhl-Lysepuffer nach einem der Ansprüche 38 bis 41 enthält.

43. Verwendung nach Anspruch 42, weiterhin umfassend einen Behälter, der einen Oligonucleotidprimer zur Amplifikation der Zielnucleinsäure enthält.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

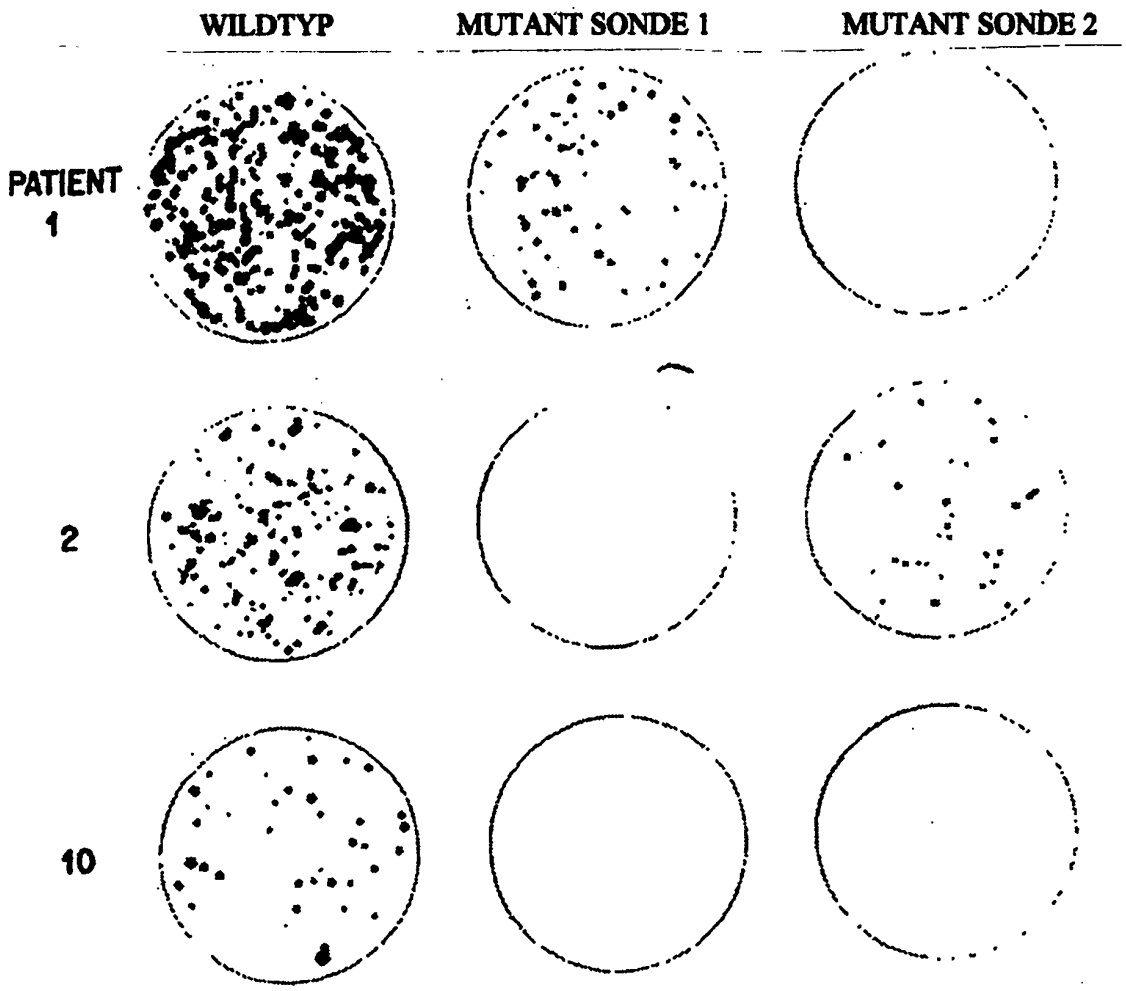


FIG. 1

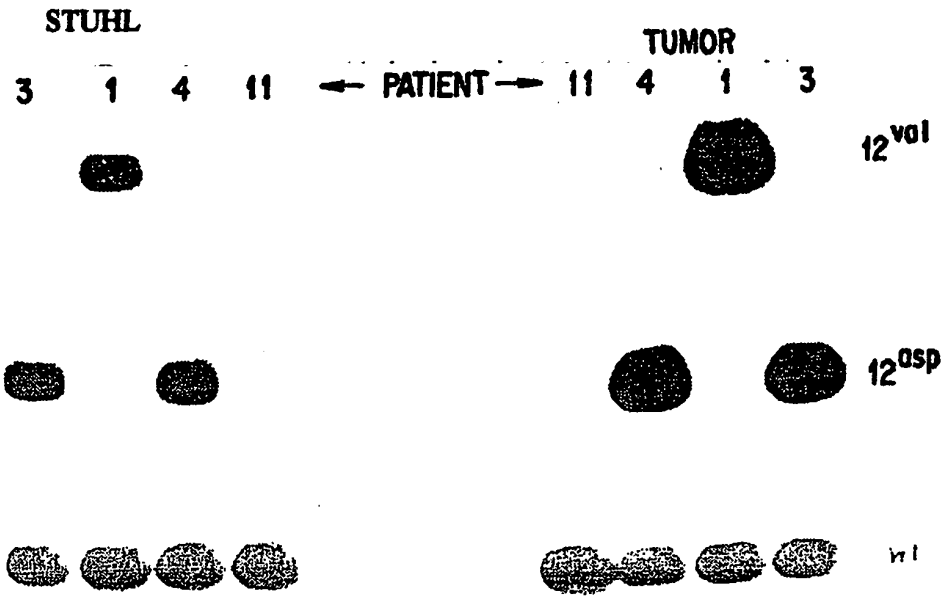


FIG. 2