



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2007 031 137 A1 2008.12.18**

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 031 137.2**

(22) Anmeldetag: **29.06.2007**

(43) Offenlegungstag: **18.12.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68 (2006.01)**

C12M 1/16 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

(66) Innere Priorität:

10 2007 027 779.4 13.06.2007

(71) Anmelder:

**Attomol GmbH Molekulare Diagnostika, 03205
 Bronkow, DE**

(74) Vertreter:

**Anwaltskanzlei Gulde Hengelhaupt Ziebig &
 Schneider, 10179 Berlin**

(72) Erfinder:

Lehmann, Werner, Dr., 03205 Bronkow, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:

DE 103 20 519 A1

US 65 14 750 B2

US 61 50 097 A

US 61 74 670 B1

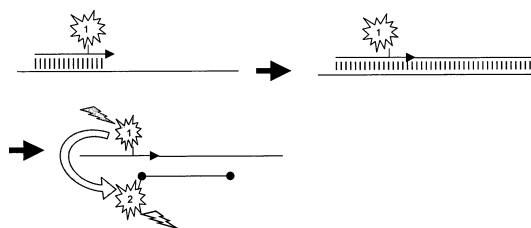
WO 01/48 237 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Sonden/Primärsystem zum "real time" Nachweis eines Nukleinsäuretargets**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum "real time" Nachweis eines Nukleinsäuretargets. Gegenstand der Erfindung sind auch ein Primer/Sonden-system und ein Kit zum Nachweis eines Nukleinsäuretargetts und seine Verwendung in einer Lösung oder im Array, vorzugsweise zur Flüssigphasen-PCR und zur Multiplex-PCR. Das Verfahren umfasst die Schritte: Einsatz von mindestens einem Primer, der mindestens eine für die zu amplifizierende Nukleinsäure spezifische Sequenz - Target-bindungssequenz(en) (TBS) - umfasst und der am 3'-Ende Modifikationen trägt, die eine enzymatische Verlängerung komplementär zum Target gestatten, Einführung eines Fluorophors 1, zum Nachweis Einsatz von mindestens einer Sonde, die mindestens am 3'-Ende ein Fluorophor 2 trägt, wobei die mindestens eine Sonde mit dem Komplementärstrang des zur Targetsequenz am 3'-Ende verlängerten Primers oder bei Verwendung mehrerer Primer mit dem Targetstrang hybridisieren kann, wobei einer der beiden Fluorophore durch Licht geeigneter Wellenlänge angeregt wird, so dass zwischen Fluorophor 1 und 2 ein FRET stattfindet, der fluoreszenzoptisch detektiert wird.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der Nukleinsäureamplifikation. Insbesondere betrifft sie ein Verfahren zum „real time“ Nachweis eines Nukleinsäuretargets. Gegenstand der Erfindung sind auch ein Primer/Sondensystem und ein Kit zum Nachweis eines Nukleinsäuretargets und seine Verwendung in einer Lösung oder im Array, vorzugsweise zur Flüssigphasen-PCR und zur Multiplex-PCR.

[0002] Verfahren zur Erkennung und Mengenbestimmung von Nukleinsäuren sind bekannt. Ausgehend von einer zu analysierenden mRNA wird zunächst eine einzelsträngige cDNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase hergestellt, mit Hilfe von PCR wird dann ein doppelsträngiges DNA-Amplifikationsprodukt erzeugt. Die PCR ist sowohl für qualitative als auch für quantitative Aussagen einsetzbar. Eine Mengenbestimmung von PCR-Produkten kann auf unterschiedlichen Arten erfolgen. Neuere Detektionsmethoden erlauben es, die in vitro Synthese von PCR-Produkten „real time“, d. h. homogen direkt im jeweils verwendeten PCR-Reaktionsgefäß zu messen. Diese so genannte „real time“ PCR (RT-PCR) stellt eine besonders sensitive Methode dar. Hierbei wird in jedem Zyklus der PCR die Entstehung von PCR-Produkten verfolgt. Die Messung der Amplifikation erfolgt dabei in der Regel in Thermozyklen, welche zusätzliche Mittel zur Messung von Fluoreszenzsignalen während der Amplifikationsreaktion aufweisen. Die Amplifikationsprodukte werden beispielsweise durch Fluoreszenz-markierte Hybridisationsproben, die lediglich bei Bindung an die Targetnukleinsäure Fluoreszenzsignale emittieren oder in bestimmten Fällen auch durch Doppelstrang-DNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe detektiert. Ein definierter Signalschwellenwert wird für alle analysierten Reaktionen festgelegt und die zur Erreichung des Schwellenwerts notwendige Zykluszahl C_p sowohl für die Targetnukleinsäure als auch für die Referenznukleinsäuren bestimmt. Auf der Grundlage der für die Targetnukleinsäure sowie die Referenznukleinsäure erhaltenen C_p -Werte können so entweder absolute oder relative Kopienzahlen des Targetmoleküls bestimmt werden.

[0003] Ein neueres Verfahren zum Nachweis eines spezifischen Nukleinsäuremoleküls verwendet so genannte „Molecular Beacons“ (Tyagi et al. US 6,150,097A) Molecular Beacons sind farbstoffmarkierte Oligonukleotide, die eine Stamm-Schleifen-Struktur haben. An den beiden freien Enden der Stamm-Abschnitte (dem 3'- und dem 5'-Ende) ist jeweils ein Fluorophor gekoppelt, wobei der eine als Reporter-Farbstoff und der andere als Quencher-Farbstoff, der die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs bei hinreichender räumlicher Nähe durch Förster-Energietransfer löscht. Die Sequenzen der Stammabschnitte an beiden Enden der Molecular Beacons sind so gewählt, dass dann, wenn sich der Molecular Beacon faltet, die Stammabschnitte ausschließlich aneinander, nicht aber mit anderen Abschnitten des Oligonukleotids hybridisieren. Der Abstand zwischen Reporter- und Quencher-Farbstoff ist im Zustand der hybridisierten Stammabschnitte hinreichend klein, so dass der Fluoreszenz-Farbstoff auch bei geeigneter Anregung mit Licht nicht fluoresziert. Der Schleifen-Abschnitt weist eine Sequenz auf, die zur Sequenz einer Targetsequenz komplementär ist. Befinden sich die Molecular Beacons und die Targetsequenz aufweisenden Nukleinsäure-Moleküle in einer Lösung, können die Schleifenabschnitte und die Targetsequenz-Abschnitte hybridisieren, wodurch sich der Molecular Beacon unter Lösung der Hybridisierung der beiden Stammabschnitte entfaltet. Diese Entfaltung führt zur Vergrößerung des räumlichen Abstands zwischen dem Reporter-Farbstoff und dem Quencher-Farbstoff und der Reporter-Farbstoff wird zur Fluoreszenz angeregt. Bei kontinuierlicher Beobachtung der Fluoreszenz-Intensität kann ein Anstieg der Intensität festgestellt werden, wenn die Molecular Beacons die Targetsequenzen aufspüren und an diesen hybridisieren. So können die Nukleinsäuremoleküle quantitativ nachgewiesen werden. Diese Molecular Beacons haben den großen Nachteil einer aufwändigen und teuren Synthese, da diese Sonden sowohl mit dem Fluoreszenz- als auch mit dem Quencher-Farbstoff markiert werden müssen. Quencher-Fluoreszenzfarbstoff-Systeme werden in vergleichbaren Sondensystemen wie Amplifluor-Primer, Scorpions und TaqMan-Sonden genutzt.

[0004] Ein weiteres bekanntes System ist das Light-Cycler-System. Hier werden die Fluoreszenzfarbstoffe auf zwei verschiedene Oligonukleotide verteilt. Am 3'-Ende des ersten Oligonukleotides befindet sich der eine Fluoreszenzfarbstoff, z. B. Fluorescein, und das sich stromabwärts anlagernde Oligonukleotid hat am 5'-Ende einen weiteren Fluoreszenzfarbstoff, z. B. IC Red 640. Fluorescein wird von einer LED als Lichtquelle angeregt und emittiert Licht, das über Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) das zweite Fluoreszenzmolekül anregt. Das von dem zweiten Farbstoff emittierte Licht wird über einen entsprechenden Filter detektiert. Eine Anregung des zweiten Farbstoffs kann nur dann erfolgen, wenn sich durch die Anlagerung der beiden Oligonukleotide an ihren Komplementärstrang die beiden Farbstoffmoleküle in räumlicher Nähe (Distanz 1 bis 5 Nukleotiden) befinden. Das Prinzip dieses Systems beruht auf der sekundären Anregung eines zweiten Fluoreszenzfarbstoffs, die erst durch die Generation des PCR-Produktes ermöglicht wird.

[0005] Die genannten Systeme sind grundsätzlich für Multiplexanwendungen einsetzbar, haben jedoch den

Nachteil, dass – sollen verschiedene Zielsequenzen nebeneinander nachgewiesen werden – der Reaktionsansatz wegen der steigenden Zahl der verschiedenen Detektionssonden relativ teuer wird und die zunehmende Zahl der Sonden die Amplifikationsreaktion beeinträchtigen kann. Außerdem sind nicht genügend FRET-Paare bekannt, um einen hohen Multiplex-Grad zu erzielen.

[0006] Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, Verfahren und Primer/Sonden-Systeme bereitzustellen, die kostengünstiger und einfach synthetisiert werden können und die gleiche oder verbesserte Sensitivität aufweisen. Durch geeignete Veränderung der Primerstrukturen soll eine Möglichkeit gefunden werden, den teuren Einsatz jeweils spezifischer Sondenoligonukleotide zu umgehen, wobei die Multiplex-Anwendung, die für die heutige Diagnostik immer wichtiger wird, nicht beeinträchtigt werden soll.

[0007] Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zum „real-time“ Nachweis von Nukleinsäuretargets als Produkte einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion mittels eines neuen Primer/Sondensystems. Dieses Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

- a) Verwendung von mindestens einem Primer, der mindestens eine für die zu amplifizierende Nukleinsäure spezifische Sequenz – im folgenden auch Targetbindungssequenz(en) (TBS) genannt – umfasst und der am 3'-Ende Modifikationen trägt, die eine enzymatische Verlängerung komplementär zum Target gestatten.
- b) Einführung eines Fluophors 1. Dabei kann dieses Fluorophor 1 in einer Ausführungsvariante direkt an einem ersten oder weiteren Primer vorliegen oder in einer Markierungsreaktion in einen Primer eingeführt werden. Alternativ kann es auch an einer Sonde vorliegen.
- c) Nach enzymatischer Verlängerung erfolgt der Einsatz von mindestens einer Sonde zum Nachweis des Targets, die mindestens am 3'-Ende ein Fluorophor 2 trägt. Dabei kann die mindestens eine Sonde mit dem Komplementärstrang des zur Targetsequenz am 3'-Ende verlängerten Primers hybridisieren oder bei Verwendung mehrerer Primer an die Targetsequenz.

[0008] Die zwei verschiedenen, jeweils mit einem FREI-Donor bzw. FREI-Akzeptor markierten Primer/Sonden-Nukleotide sind so konstruiert, dass sich nach erfolgter Hybridisierung die Fluorophore 1 und 2 in einer für den FREI ausreichenden Nähe befinden, so dass sie während eines PCR-Zyklus eine Fluoreszenz des Akzeptors ermöglichen. Das heißt einer der beiden Fluorophore wird durch Licht geeigneter Wellenlänge angeregt, so dass zwischen Fluorophor 1 und 2 ein FREI stattfindet, der fluoreszenzoptisch detektiert wird.

[0009] In einer Ausführungsvariante der Erfindung weist der mindestens eine Primer am 5'-Ende zusätzlich einen zum Target unspezifischen Schwanz auf. Fluorophor 1 kann zum Beispiel am spezifischen oder unspezifischen Teil eines ersten Primers oder an einem weiteren Primer vorliegen. Die Anordnung der Fluorophore ist dabei austauschbar, so dass Fluorophor 1 an einem Primer und Fluorophor 2 an der Sonde vorliegen kann bzw. umgekehrt. Alternativ können Fluorophor 1 und 2 in Sonden eingebracht werden. In welcher Richtung FREI erfolgt ist letztlich egal. Vorzugsweise liegen die Fluorophore 1 und 2 kovalent gebunden an Primern und Sonden vor.

[0010] Die Erfindung basiert auf einem neuartigen Primer/Sonden-Design, wobei in einer ganz besonders bevorzugten Variante mindestens ein Primer eine Teilsequenz aufweist, die im 5'-Bereich teilweise komplementär zum 3'-Bereich ist, so dass sie eine Haarnadel bildet.

[0011] Vorzugsweise kann der mindestens eine Primer das Fluorophor 1 am 5'-Ende aufweisen, wobei der Primer entweder nur aus einer Target-spezifischen Sequenz besteht oder zusätzlich einen unspezifischen Schwanz besitzt. Nach enzymatischer Verlängerung und erfolgter Sondenhybridisierung bildet zum Nachweis des Targets der Primer am 5'-Ende keine Haarnadel oder partiell bzw. vollständig eine Haarnadel mit sich selbst oder zu der komplementär zum Target verlängerten Primersequenz, so dass ein FREI-Signal entsteht.

[0012] In einer ganz bevorzugten erfindungsgemäßen Ausgestaltung ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens drei Primer verwendet. Dabei umfasst es die folgenden Schritte:

In einer ersten Reaktion erfolgt der Einsatz eines Primerpaares 1 und 2. Der gewählte Vorwärtsprimer 1 umfasst mindestens eine Targetbindungssequenz 1 (TBS 1) und mindestens eine Targetbindungssequenz 2 (TBS 2) und ist so konstruiert, dass TBS 1 an das zu amplifizierende Target binden kann. Anschließend wird dieser Primer 1 komplementär zum Target verlängert, Rückwärtsprimer 2 bindet an das komplementäre Target und wird ebenfalls verlängert. Primer 1 enthält vorzugsweise eine TBS 1 und eine TBS 2. In einer Variante enthält er mehrere TBS 2, die sich geringfügig bis vollständig unterscheiden. So können in einer Reaktion mehrere Targetsequenzen in Summe erfasst werden (z. B. Erfassung humaner Papillomaviren der Gruppen „hohes Risiko“ und „geringes Risiko“).

[0013] In einer weiteren Reaktion wird ein Primer 3 eingesetzt, welcher mit dem 5'-Bereich von Primer 1 identisch oder teilweise identisch ist, jedoch keine TBS aufweist. Primer 3 trägt gegebenenfalls das Fluorophor 1 am 5'-Ende. Er ist so konstruiert, dass er eine Haarnadel 1 vollständig oder teilweise mit sich selbst oder mit komplementären Abschnitten der Primer 1-Sequenz bilden kann. Die Bedingungen werden so eingestellt, dass mit Primer 2 und 3 die Amplifikation stattfindet. Dabei bindet die mindestens eine TBS 2 von Primer 1 an einen oder mehrere weitere(n) Targetbindungsabschnitt(e), welche(r) nun zwischen verlängertem Primer 1 und der komplementären Sequenz von Primer 2 liegt, wodurch eine Haarnadel 2 entsteht. Wird das Amplifikat dann mit der mit Fluorophor 2 markierten Sonde in Kontakt gebracht kann das mit dem Fluorophor 1 gebildete FREI-Signal detektiert werden. In einer bevorzugten Ausgestaltung trägt der Primer 3 Fluorophor 1 und die Sonde mit Fluorophor 2 am 3'-Ende hybridisiert vollständig an der Targets substanz. Alternativ kann die Sonde mit Fluorophor 2 am 3'-Ende über Haarnadel 2 und Primer 1 an der Targets substanz hybridisieren.

[0014] In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung können die drei Primer und zwei Sonden verwendet werden, die jeweils FREI-Donor und -Akzeptor (Fluorophor 1 und 2) tragen, wobei die eingesetzte Sonde 1 Primer 1-spezifisch ist und die verwendete Sonde 2 Target-spezifisch.

[0015] Die erfindungsgemäß eingesetzten Fluophore 1 und 2 sind ausgewählt aus Fluoreszenzfarbstoffmolekülen, wobei das Licht, das vom ersten Fluorophor absorbiert und remittiert wird, vom zweiten, nach Bindung der Sonde(n) dem ersten Fluorophor räumlich nahen zweiten Fluorophor erneut absorbiert und remittiert wird. Vorzugsweise dienen verschiedene Fluorophore als Donor und Akzeptor, so dass ein FREI-Signal als Auftreten Donor-stimulierter Fluoreszenz des Akzeptors aufgezeichnet werden kann. Alternativ kann auch derselbe Farbstoff als Donor und Akzeptor eingesetzt werden und die resultierende Depolarisation der Fluoreszenz detektiert werden. Bevorzugt ist Fluorophor 1 Fluorescein und Fluorophor 2 LC Red 640 oder LC Red 705 Beispiele für weitere bevorzugte FREI-Paare sind:

Fluophor 1	Fluophor 2
Aminocumarin	Fluorescein
Fluorescein	Rhodamin oder Tetramethylrhodamin
Fluorescein	Cy3
Cy3	Cy5
Cy3	Tetramethylrhodamin
Europium	Cy5
Terbium	Rhodamin
Bodipy	Bodipy
Dansyl	Fluorescein
Naphtalen	Dansyl
Ruthenium	Cy5.

[0016] Wie bereits ausgeführt, kann erfindungsgemäß Fluophor 1 an einem Primer und Fluophor 2 an der Sonde vorliegen bzw. umgekehrt. Das FREI-Paar kann auch an Sonden gebunden vorliegen. Die erfindungsgemäß eingesetzten FREI-Paare erzielen einen hohen Multiplex-Grad. Es sind für das erfindungsgemäße Verfahren zahlreiche Fluorophore für den Spektralbereich von 350 bis 750 nm, das heißt von Ultraviolett bis Infrarot, verfügbar.

[0017] Die Amplifikationsreaktion ist vorzugsweise eine homogene Flüssigphasen-PCR, eine Multiplex-PCR, eine asymmetrische PCR, eine Festphasen-PCR, eine RT-PCR, eine in situ-PCR, eine immuno-PCR oder eine nested PCR.

[0018] Das neuartige Primer/Sondensystem zum Nachweis von Nukleinsäuren umfasst:

- mindestens einen Primer, der mindestens eine für das nachzuweisende Nukleinsäuretarget spezifische Sequenz umfasst und am 3'-Ende Modifikationen aufweist, die eine enzymatische Verlängerung gestatten, wobei gegebenenfalls einer der Primer mit einem Fluorophor 1 markiert ist,
- mindestens eine Sonde, die ein Fluorophor 2 trägt oder mehrere Sonden die jeweils Fluorophor 1 und 2 tragen.

[0019] Vorzugsweise kommen für die verschiedenen Amplikons oder Polymorphismen unterschiedliche FREI-Paare zum Einsatz.

[0020] Ein bevorzugtes Primer/Sondensystem umfasst:

- einen Primer, der mindestens eine für das nachzuweisende Nukleinsäuretarget spezifische Sequenz um-

fasst und am 3'-Ende Modifikationen aufweist, die eine enzymatische Verlängerung gestatten, wobei dieser Primer mit dem Fluorophor 1 markiert ist,

b) eine Sonde, die am 3'-Ende das Fluorophor 2 trägt und die für den 3'-verlängerten Komplementärstrang von a) spezifisch ist.

[0021] Ein weiteres bevorzugtes Primer/Sondensystem umfasst:

a) drei Primer, wobei

– ein Primerpaar 1 und 2 als Vorwärts- und Rückwärtsprimer fungieren und Primer 1 mindestens zwei für das nachzuweisende Nukleinsäuretarget spezifische Sequenzen (TBS 1 und 2) umfasst und beide Modifikationen aufweisen, die eine enzymatische Verlängerung gestatten, und

– einen Primer 3, der mit dem 5'-Bereich von Primer 1 teilweise oder vollständig identisch ist, ebenfalls enzymatisch verlängerbar ist und Fluorophor 1 trägt, wobei er so konstruiert ist, dass er eine Haarnadel 1 vollständig oder partiell mit sich selbst oder mit komplementären Abschnitten der Primer 1-Sequenz bilden kann,

b) eine Sonde, die am 3'-Ende Fluorophor 2 trägt und die vollständig für die Targetsequenz spezifisch ist, oder die für die Targetsequenz und Primer 1 spezifisch ist.

[0022] Gegenstand der Erfindung kann auch ein Primer/Sondensystem sein, das umfasst:

a) drei Primer, wobei

– ein Primerpaar 1 und 2 als Vorwärts- und Rückwärtsprimer fungieren und wobei Primer 1 mindestens zwei für das nachzuweisende Nukleinsäuretarget spezifische Sequenzen (TBS) umfasst und beide Modifikationen aufweisen, die eine enzymatische Verlängerung gestatten, und

– Primer 3, der mit dem 5'-Bereich von Primer 1 teilweise oder vollständig identisch ist und ebenfalls enzymatisch verlängerbar ist,

b) zwei Sonden, die jeweils Fluorophor 1 und 2 tragen und die vollständig für die Targetsequenz spezifisch sind, oder die für die Targetsequenz und Primer 1 spezifisch sind.

[0023] Gegenstand der Erfindung ist auch ein Reagenzienkit zum Nachweis von Nukleinsäuren umfassend

– mindestens ein neuartiges Primer/Sondensystem,

– geeignete Puffer und ggf. weitere Hilfsstoffe.

[0024] Puffer und Hilfsstoffe sind dem Fachmann bekannt. Sie umfassen vorzugsweise thermostabile Polymerase, dNTP-Mix, PCR-Puffer und ggf. $MgCl_2$.

[0025] Bei der technischen Realisierung von Nukleinsäureassays für Routine-Untersuchungen sind insbesondere von Bedeutung, das homogene Assay, das Multiplex-Verfahren und die so genannten Mikroarrays (auch Gen- oder Biochips genannt). In einer erfindungsgemäßen Multiplex-PCR mit dem Primer/Sondensystem bzw. dem Kit lassen sich mit dem oben beschriebenen Verfahren mehrere Primersätze kombinieren, die aufgrund unterschiedlicher Targetbindungssequenzen (TBS) die Detektion mehrerer Zielsequenzen in einem Reaktionsansatz erlauben. Qualitative Messungen erfolgen, indem nach einer vorher definierten Anzahl von Amplifikationszyklen geprüft wird, ob die Konzentration der aufgekoppelten Nukleinsäuremoleküle einen bestimmten Schwellwert übersteigt. Für eine Quantifizierung wird diese Konzentration nach jedem Zyklus erfasst und die Anzahl der Zyklen bis zum Erreichen eines bestimmten Schwellwertes bestimmt. Diese Anzahl ist ein Maß für die Konzentration der gesuchten Nukleinsäure in einer Probe.

[0026] Das Prinzip eines Array-Experiments besteht darin, alle auf dem Array befindlichen Genproben simultan mit einer Nukleinsäureprobe zu hybridisieren. Entscheidend ist hierbei, dass die durch reverse Transkription von RNA aus Zellen oder Gewebe gewonnene cDNA im Idealfall alle dort spezifisch exprimierten Gene umfasst. Das parallele Hybridisieren einer Nukleinsäureprobe mit einer Vielzahl von komplementären Genproben auf einem DNA-Array führt zu einem charakteristischen Hybridisierungsmuster mit entsprechender Hybridisierungsintensität. Hier zeigt sich der entscheidende Vorteil dieser Technologie gegenüber anderen Methoden zur Untersuchung von Genexpression. Während sich herkömmliche Methoden auf die Untersuchung einzelner Gene beschränken, liefert ein DNA-Array ein komplettes Genexpressionsprofil der untersuchten Zelle bzw. des untersuchten Gewebes. Besonders interessant ist die hierdurch gegebene Möglichkeit, die Interaktion verschiedener Gene zu untersuchen. Das Erfassen von Unterschieden in der Genexpression ist durch das gleichzeitige Hybridisieren von normalen/immortalisierten oder foetalen/adulten Zellen möglich.

[0027] Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Systems und Verfahrens können zur gleichzeitigen Unterscheidung von mehreren Targetsequenzen die Targetsequenzen im Sondenbindungsbereich, im Primerbindungsbereich oder im Stamm der Haarnadel(n) vorzugsweise durch Schmelzkurvenanalyse unterschieden werden.

[0028] Darüber hinaus können zur gleichzeitigen Unterscheidung von mehreren Targetsequenzen mehrere Primer-/Sondensysteme eingesetzt werden, die sich mindestens teilweise oder vollständig in den targetsequenzspezifischen Abschnitten und den Emissionswellenlängen der emittierenden Fluophore unterscheiden, so dass diese durch Mehrfarbenfluoreszenzdetektion differentiell erfasst werden können.

[0029] Weiterhin können zum Nachweis von mehreren Targetsequenzen die targetspezifischen Primer sich im 3'-Bereich unterscheiden und dadurch vollständig oder unvollständig komplementär mit der Targetsequenz in der jeweiligen Probe sind, wodurch sie detektiert oder nicht detektiert werden.

[0030] Weiterhin können zum gleichzeitigen Nachweis von mehreren Targetsequenzen unterschiedliche Detektionssysteme eingesetzt werden, wobei die einzusetzenden targetspezifischen Primer Längenpolymorphismen und Fluorszenzmarkierungen enthalten können.

[0031] Darüber hinaus können die Targetsequenzen durch Echtzeitfluoreszenzanalyse, durch Elektrophorese oder durch Hybridisierung ohne Amplifikation der Targetsequenz, durch Hybridisierung nach der Amplifikation der Targetsequenz oder durch Hybridisierung während der Amplifikation der Targetsequenz erfasst werden.

[0032] Ihre weite Verbreitung verdankt die Real-Time-PCR zwei Eigenschaften, die im Laboralltag nur selten gut zusammenpassen: sie ist schnell und gleichzeitig präzise. Länger als zwei Stunden benötigt kaum ein Real-Time-Cycler, um winzigste DNA-Mengen zu vervielfältigen und zu quantifizieren. Das Ganze funktioniert auch im Hochdurchsatz. Bis zu 384 PCR-Reaktionen gleichzeitig können Geräte durchführen, deren Cyclerblöcke sich mit entsprechenden Mikrotiterplatten bestücken lassen.

[0033] Real-Time-Cycler sind zahlreich bekannt. Sie ermöglichen eine Detektion von bis vorzugsweise zu fünf Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig für Multiplex Anwendungen, besitzen Heizblöcke vorzugsweise im Viererpack für 96er oder 384er-Well Mikrotiterplatten, zeigen schnelle Heiz-/Kühlraten die z. B. 30 PCR-Zyklen in 30 Minuten möglich machen, Quantifizierungssoftware, Schmelzpunktanalyse und vieles mehr. Das erfindungsgemäße System und Verfahren ist auch für Hochdurchsatzlabore geeignet, die ganze Berge von Proben abarbeiten müssen, wodurch bis zu 5000 Analysen pro Tag mit entsprechenden automatisierten Real-Time-PCR-Robotern der neuesten Generation möglich sind. Falls kein Wert auf Real-Time-Quantifizierung gelegt wird und nur Interesse an der Endpunkt-PCR besteht, kann bis zu 30.000 Proben in knapp 3 Stunden durch entsprechende PCR-Roboter ermöglicht werden.

[0034] Mit dem erfindungsgemäßen System kann ein vorgefertigter Real-Time-PCR-Kit bereitgestellt werden, der alle nötigen Ingredienzien enthält. Damit ist das einzelne Pipettieren von Puffer, Nucleotidmix, Reporter-moleküle, Polymerasen und Primer nicht notwendig. Für die Quantifizierung nutzt man bei diesem (klassischen) Verfahren der Real-Time-PCR die Schmelzpunktbestimmung der amplifizierten DNA und die Analyse des Schwellenwertes der Fluoreszenzintensität (CT).

[0035] Die Bestimmung eines genauen Hybridisierungsereignisses von Sonden an die immobilisierten Nucleotid-Sequenzen ist ein entscheidender Schritt für ein Erhalten von optimalen Ergebnissen bei einer Durchführung eines Mikroarrays.

[0036] Erfindungsgemäß kann die Verwendung eines erfindungsgemäßen Primer/Sonden-systems in einer Vorrichtung erfolgen, welche die Sonden als Fangsonden immobilisiert umfasst, zur simultanen Detektion von Targetsequenzen während der Amplifikation der Targetsequenzen, wobei die zufällig oder systematisch in der Reaktionsumgebung verteilten Messpunkte, an die die Targetsequenzen über die immobilisierte Fangsonden hybridisieren, bildgebend fluoreszenzoptisch erfasst, dekodiert und vermessen werden und die Reaktionsumgebung thermozyklisch steuerbar ist, ggf. mittels Peltierelementen, Luftstrom, Wasserbad, Wärmestrahlung, Induktion oder Mikrowellen.

[0037] Bevorzugt werden Vorrichtungen zur simultanen Detektion von Targetsequenzen während der Amplifikation der Targetsequenzen verwendet, die einen optisch transparenten Gefäßboden und/oder Gefäßdeckel mit geringer Eigenfluoreszenz umfassen, welche die fluoreszenzoptische Auswertung während der thermozyklischen oder isothermischen Durchführung der Nachweisreaktion ermöglichen.

[0038] Der feste Träger kann in irgendeiner Form vorliegen, und kann aus verschiedenen Materialien bzw. Werkstoffen bestehen, die insbesondere verschiedene Metalle, Glas und Kunststoffe umfassen. Bevorzugte feste Träger sind Nylonmembranen, Epoxidglas und Borfluoratglas. Der Vorteil der Verwendung von Glas und

Kunststoffen kann in der Durchsichtigkeit der Materialien liegen, die die Herstellung von Trägern in der Art von Objektträgern oder Mikroplatten für den parallelen Hochdurchsatz von Proben und einer daraus herrührenden Kostenverringerung ermöglicht. Die Mikroarrays können in Form eines Objektträgers oder einer Mikroplatte (ebenfalls als Mikrotiterplatte bezeichnet) vorliegen. Bei der Mikroplatte handelt es sich um einen geschüsselten (dished) Behälter mit mehreren (mindestens zwei) Vertiefungen. Bei auf Mikroplatten basierenden Mikroarrays handelt es sich um eine Mikroplatte mit mehreren Vertiefungen, in deren Böden in den Mikroarray-Biochip platziert ist. Ein Beispiel der Mikroplatte ist eine gut bekannte ELISA Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen.

[0039] Weiterhin sind auf selbst-anordnenden Schichtsystemen basierende feste Träger ebenso für die Implementierung der vorliegenden Erfindung geeignet. Die Anwendung kann unter Verwendung automatischer Verfahren erfolgen.

[0040] Um die Zuordnung jeder Nukleinsäure an eine bestimmte Stelle auf dem festen Träger zu ermöglichen, ist der weiterhin in verschiedene symmetrische, beispielsweise rechteckige, Bereich der gleichen Größe unterteilt, um das Muster zu erhalten, in dem die Sonden auf dem festen Träger immobilisiert sind. Das Muster ermöglicht die Analyse der Ergebnisse auf eine vereinfachte Art, da eine einfache und spezifische Zuordnung der jeweiligen Hybridisierungsereignisse möglich ist.

[0041] Bevorzugt wird eine Vorrichtung verwendet, die in einer Ausführung der Erfindung als Messpunkte fluoreszenzkodierte Mikropartikel beinhaltet, die die Fangsonden tragen und durch Schwerkraft, magnetische Kräfte oder durch chemische oder physikalische Bindung am Gefäßboden permanent oder während der Dauer des Meßvorganges immobilisiert sind. Die Erfassung erfolgt invers durch den optisch transparenten Gefäßboden oder im Auflicht durch Öl und einen optisch transparenten Deckel und durch die Ölbeschichtung. Alternativ zur Ölüberschichtung kann ein perforierter Heizdeckel im Thermocycler eingesetzt werden, der die Bildaufnahme im Auflicht nicht behindert.

[0042] Die Verfügbarkeit von reaktiven oder nichtreaktiven Additiven flüssiger Kunststoffe, z. B. Thermoplaste, Elastomere, Duromere, lässt sich effizient durch Umhüllung oder Einbettung in linearkettige oder netzwerkbildende Polymere steuern. Derartige polymerbasierte Mikrokomposite sind in Form von Mikrokapseln mit Kern-Schale-Struktur bzw. von mikroskaligen Matrixpartikeln mit weitgehend homogener Verteilung der Komponenten über den Partikelquerschnitt bekannt. Der Kern von Mikrokapseln kann in fester, flüssiger oder gasförmiger Form (Hohlkugeln) vorliegen. Bei Matrixpartikeln sind homogen- und heterogenphasige Systeme bekannt. Erfindungsgemäß kommen alle Mikropartikel in Frage, die eine Immobilisierung ermöglichen. Die Trägerteilchen bestehen vorzugsweise aus einem Polymermaterial. Bevorzugt sind folgende Polymermaterialien, welche umfassen, jedoch nicht hierauf beschränkt sind: Polystyrol, Polyacrylsäure, Polyacrylnitril, Polyamid, Polyacrylamid, Polyacrolein, Polybutadien, Polycaprolacton, Polycarbonat, Polyester, Polyethylen, Polyethylenterephthalat, Polydimethylsiloxan, Polyisopren, Polyurethan, Polyvinylacetat, Polyvinylchlorid, Polyvinylpyridin, Polyvinylbenzylchlorid, Polyvinyltoluol, Polyvinylidenchlorid, Polydivinylbenzol, Polymethylmethacrylat, Polylactid, Polyglycolid, Poly(lactid-co-glycolid), Polyanhydrid, Polyorthoester, Polysulfon oder Kombinationen derselben. Andere Polymermaterialien, wie zum Beispiel Kohlehydrate, wie Carboxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Agar, Gel, ein eiweißartiges Polymer, Polypeptide, eukaryotische und prokaryotische Zellen, Lipide, Metall, Harze, Latex, Kautschuk, Silikon, wie zum Beispiel Polydimethyldiphenylsiloxan, Glas, Melamin, Keramik, Holzkohle, Kaolinit, Bentonit und dergl. können in gleicher Weise verwendet werden. In diese Polymeren können auch ein Magnet oder ein aus der Gruppe ausgewähltes magnetisch ansprechbares Metalloxid eingearbeitet werden, das aus superparamagnetischem, paramagnetischem oder ferromagnetischem Metalloxid besteht. Die Partikel können zusätzliche funktionelle Gruppen an der Oberfläche enthalten, wie zum Beispiel Carboxylate, Ester, Alkohole, Carbamide, Aldehyde, Amine, Schwefeloxide, Stickoxide oder Halogenide, die eine Bindung analytischer Reaktanden und/oder ein Binden von Teilchen an Teilchen erleichtern können.

[0043] Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln mittels reaktiver und nichtreaktiver Partikelbildungsprozesse sind vielfach beschrieben. Bei der reaktiven Partikelbildung erfolgt die Bildung der Wand oder der Matrix parallel zu einem Polymerisations-, Polykondensations- oder Polyadditionsprozess. Bei den nichtreaktiven Verfahren werden filmbildende Polymere direkt eingesetzt, die auf thermodynamische Weise zur Phasenseparation und zur Partikelbildung gebracht werden. In Verfahren zur Verkapselung fester oder flüssiger Kernmaterialien werden z. B. Melamin-Formaldehyd-Harze eingesetzt. Insbesondere Melamin-Formaldehyd-Harze sind vielfältig und problemlos einsetzbar, und sie können zur Partikelbildung aus wässriger Phase appliziert werden. Die Mikrokapselgröße kann in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen, z. B. Emulgatorzusatz oder Dispergiermethode eingestellt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die hydrothermale Vernetzung von Hydroxymethyl-Melamin.

[0044] Fluoreszenzkodierte Mikropartikel sind dem Fachmann bekannt und z. B. in DE 699 07 630 T2 beschrieben. Die Farbstoffe, wenn mehr als ein Farbstoff zum Färben von mehr als einer Population von Partikeln verwendet wird, sind derart ausgewählt, dass sie wesentlich verschiedene Emissionsspektren besitzen, vorzugsweise mit Emissionsmaxima, welche um mehr als 10 nm, bevorzugter mit Emissionsmaxima, die um mehr als 25 nm, getrennt sind, noch bevorzugter um mehr als 50 nm getrennt sind. Die Farbstoffe können ausgewählt werden, um Emissionsbanden aufzuweisen, welche zu im Handel erhältlichen Filtern passen, oder zum Nachweis von Mehrfachfluorophoren mit verschiedenen Erregungs- und Emissionsbanden.

[0045] Gemäß der Erfindung werden bevorzugt Mikropartikel aus Melamin, Silika, Polysulfon und Polyether, ganz bevorzugt aus Melamin eingesetzt. Sie haben i. d. R. einen Durchmesser von 0,5–20 µm. Die bevorzugte Partikelgröße beträgt 5–10 µm.

[0046] Die vorzugsweise verwendeten Mikropartikel zeichnen sich dadurch aus, dass sie bevorzugt aus 2 Schichten und einem Kern bestehen, die sich fluoreszenzoptisch unterscheiden und wobei wenigstens die äußere Schichttemperaturbeständig ist und z. B. aus Melamin besteht. Die mittlere und äußere Schicht bestehen bevorzugt ebenfalls aus Melamin. Die mittlere Schicht enthält Partikel wie z. B. Magnetpartikel, mit deren Hilfe eine sichere Immobilisierung der Partikel während der Messung gewährleistet ist.

[0047] Das Grundelement eines bevorzugt verwendeten Chips besteht vorzugsweise aus einem Glas- oder Kunststoffträger, wie sie in der Mikroskopie verwendet werden. Auf einen solchen Träger werden die Sonden (bevorzugt an Mikropartikeln) z. B. von einem Roboter aufgebracht. Dieser muss hoch präzise und sauber arbeiten. Für jeden Spot werden Milliardstel Liter (normalerweise 0,6 nl) der Oligonukleotid-Lösung verwendet. Nach jedem Durchgang findet eine gründliche Selbstreinigung der Nadeln (Spülung, Ultraschall) statt, um keine Verunreinigungen zu verschleppen. An einem Ende der Oligonukleotide befindet sich eine Aminogruppe (NH₂). Diese verbindet sich mit einer chemischen Reaktion dauerhaft auf dem Träger bzw. an dem Mikropartikel. Diese so genannten Spots haben einen Durchmesser von bevorzugt 100 µm (0,1 mm). Aufgrund dieser geringen Menge und des kleinen Abstandes zwischen den einzelnen Punkten (vzw. 0,3 mm) haben auf einem Glasträger bis zu 30.000 Spots Platz. Diese dienen als spätere Andockstellen für die Proben-DNA. Die unbenutzte Fläche des Trägers muss abschließend „gesperrt“ werden. Das geschieht durch eine Behandlung mit einer speziellen Blocking-Solution, die bereits im fertigen Kit enthalten sein kann. Mit Hilfe von PCR werden die spezifischen Targetgene vermehrt, mit einer Fluoreszenz gekoppelt, auf die Träger aufgetragen und zur Hybridisierung inkubiert. Gegebenenfalls entfernt man durch mehrere Waschungen ungebundene DNA. Ein spezieller Scanner bestrahlt die Chips mit Licht einer passenden Wellenlänge, das die Fluoreszenz zum Leuchten bringt. Das daraus resultierende Ergebnis wird anschließend ausgewertet: Leuchten die entsprechenden Spots ist das Ergebnis positiv.

[0048] Die Auswertung erfolgt fachgemäß, normalerweise unter Einbeziehung von Referenzwerten.

[0049] Geräte zur erfindungsgemäßen Durchführung von Real-Time PCR-Reaktionen an einem Array, die vollautomatisch computermäßig steuerbar sind, umfassen:

- Thermocycler, der einen Reaktionsbereich mit mehreren temperierbaren Aufnahmen für Reaktionsgefäße aufweist,
- Positioniereinrichtung für den Thermocycler,
- dem Reaktionsbereich zugeordnete Beleuchtungseinrichtungen (LED und/oder Laser) mit denen Anregungslicht strahlbar ist,
- Detektoreinrichtung, die in Abhängigkeit von einer gemessenen Lichtintensität Messwerte erzeugt, mit Optikeinrichtungen vorzugsweise für Durchlicht und Auflicht,
- ggf. eine Referenzeinrichtung, die einen Referenzwert erzeugt,
- Auswerteeinrichtungen.

[0050] Für den Einsatz von Mikropartikeln können die Geräte zusätzlich Immobilisierungseinrichtungen für z. B. magnetische oder paramagnetische Partikel umfassen.

[0051] Durch die Verwendung optisch transparenter Gefäßböden und/oder Gefäßdeckel mit geringer Eigenfluoreszenz, welche die fluoreszenzoptische Auswertung während der thermozyklischen oder isothermischen Durchführung der Nachweisreaktion ermöglichen, sind Messungen mit Auflicht und Durchlichtfluoreszenz möglich. Bei Auflichtfluoreszenz können handelsübliche Mikrotiterplatten eingesetzt werden wie z. B. Nucleo-link oder Nucleosorb. Die verwendeten handelsüblichen Reaktionsgefäße können zur Verringerung der Eigenfluoreszenz beschichtet werden.

[0052] Die Durchführung von Real-time-Nachweisen am Array kann unter Verwendung der erfindungsgemäßen Sondensysteme aber auch unter Verwendung von anderen Sondensystemen wie z. B. Molecular Beacon, FREI-Sonden, TaqMan, Scorpions, GenePins oder Amplifluor-Primern vorgenommen werden.

Vorteile:

- Kombination von Real-time Amplifikation und Chip-Detektion im PCR-Array als ein geschlossenes System ermöglicht eine genaue Bestimmung von Targetsequenzen, wobei der Multiplex-Grad nur durch den Miniaturisierungsgrad verwendeter Array-Systeme begrenzt wird.
- Ein Primer, der universell für verschiedene Amplifikate eingesetzt werden kann trägt bereits ein Fluophor. Dadurch können kostengünstig die Fluophore der Sonden verschiedener Amplikons detektiert werden (Beispiel 3).
- Die farbstoffmarkierten Sonden und Primer müssen nicht polymorph sein, da die Polymorphismen über variierende Targetbindungssequenzen von unmarkierten Primer 1 erfaßt werden können. Dadurch ist es möglich, die farbstoffmarkierten Sonden und Primer auf maximale Detektionssensitivität zu optimieren und die Spezifitätsbestimmung für die Identifizierung von Sequenzunterschieden auf die Optimierung nicht markierter Primer zu begrenzen (z. B. Primer 1, Beispiel 3), was den Kostenaufwand bei der Optimierung der PCR-Systeme reduziert.
- Da ein Fluoreszenzfarbstoff über einen Primer kovalent an das Amplifikat gebunden wird und somit nur eine Sonde eingesetzt werden muß, können höhere Empfindlichkeiten erzielt werden, können über einen höheren Temperaturbereich stabilere Meßwerte erzielt werden, was das System robuster als das klassische Zwei-Sonden-System macht.
- Da weitere Targetbindungssequenzen in Primer 1 eingeführt werden können, Polymorphismen über die Primerspezifität zu detektieren, ohne, anders als bei der klassischen allelspezifischen PCR, die Sequenz in das Priming-Ereignis mit einzubeziehen und damit zu gegebenenfalls zu verfälschen. Damit ist eine nachfolgende Sequenzierung oder Klonierung der detektierten Ursprungssequenz problemlos möglich.
- Die eingesetzten Partikel lassen eine hohe Zahl an Kodierungen zu, da Schicht 1 (außen), der Kern und gegebenenfalls die mittlere Schicht unterschiedlich kodiert werden können. Die Einbeziehung unterschiedlicher Schichtdicken bzw. Kerndurchmesser als Kodierungsparameter bei dem Vorteil insgesamt etwa gleichgroße Partikel einsetzen zu können, erhöht weiterhin die Anzahl unterschiedlicher Kodierungsmöglichkeiten bei hoher Testgenauigkeit. Die äußere Schicht ist als Ringfluoreszenz zu erkennen, die sich gegen den Kern scharf durch die Einpolymerisation von Magnetpartikeln oder anderer Fluorochrome abgrenzen läßt. Dadurch ist es möglich äußere Schicht und Kern unter Verwendung identischer Fluorochrome oder aber auch unter Verwendung des Ligandenfarbstoffs zu kodieren. Damit erhöhen sich die Kodierungsmöglichkeiten für Mikropartikelpopulationen beträchtlich, so daß komplexe Detektionsansätze wie die Komplettypisierung von Amplikons, Exons oder Genen im Real-time-Format möglich wird.
- Bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Fangprimer oder Fangsonden zur Immobilisierung an der Partikeloberfläche und nicht markierter Oligos in der Flüssigphase können FREI-Signale nur an immobilisiertem Amplifikat und nicht an Amplifikat in der Lösung entstehen, so daß störende Hintergrundfluoreszenz zugunsten der Testsensitivität minimiert wird.
- Die Nutzung von aktiven, auf Elektromagneten basierenden Systemen zur Immobilisierung von Mikropartikeln hat den Vorteil, daß die Mikropartikel während des Meßvorganges immobilisiert werden können und ansonsten während der PCR-Reaktion auf Grund thermischer Turbulenzen frei beweglich sind. Dadurch wird der üblicherweise bei Biochips auftretende und die Sensitivität limitierende Massentransport der Analyten zur Fangsonde/Fangprimer überwunden. Intensives Schütteln, was im Thermocycler schwer technisch zu realisieren ist, kann entfallen. Strömungsabhängige Unterschiede im Gefäßlumen, wie sie sich bei ortskodierten Biochips nachteilig bemerkbar machen, verlieren an Bedeutung.

[0053] Die Erfindung ist schematisch in den [Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#) dargestellt. Gegenstand der Erfindung ist auch ein Gerätesystem zur kombinierten Amplifikation von Targetsequenzen und Detektion der Amplifikate an einem Array insbesondere an einem Mikropartikelarray und in den [Fig. 4](#) und [5](#) näher erläutert. Das vollautomatisch computergesteuerte Gerät stellt von seinen Leistungsparametern her eine Kombination aus Fluoreszenzmikroskop und Thermocycler dar, kann jedoch auch als vollintegrierte Lösung konstruiert sein. Die verschiedenen Nachweis und Gerätesysteme entsprechend [Fig. 1](#) bis [5](#) funktionieren immer für alle möglichen Anwendungen, so z. B. zum Nachweis von verschiedenen Krankheitserregern, wie z. B. Viren, von Polymorphismen, zu simultanen Nachweisen, insbesondere zur Multiplex-Anwendung und/oder im Mikroarray.

[0054] Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Zeichnungen und Ausführungsbeispielen näher erläutert, wobei sie nicht darauf beschränkt werden soll.

Fig. 1 – schematische Darstellung des Einsatzes eines Primer/Sondensystems unter Verwendung eines Primers und einer Sonde

[0055] Ein Primer 1 trägt ein kovalent gebundenes Fluorophor 1, bindet mit seiner Targetbindungssequenz 1 am 3'-Ende an die Targetsequenz und wird durch eine DNS-Polymerase unter geeigneten Bedingungen komplementär zum Target verlängert. Nach Denaturierung des Doppelstranges kann die Sonde, die Fluorophor 2 am 3'-Ende trägt an den komplementär zum Target verlängerten Primer 1 hybridisieren. Durch Bestrahlung des Reaktionsgemisches mit Licht einer definierten Wellenlänge wird ein über Fluorophor 1 vermittelter FREI ausgelöst und die Emission bei ebenfalls definierter Wellenlänge korreliert mit der im Reaktionsgemisch befindlichen Menge an Template.

Fig. 2 – schematische Darstellung des Einsatzes des Primer/Sondensystems unter Verwendung eines Primers und einer Sonde zur Detektion eines Target-Polymorphismus

[0056] Primer 1 trägt ein kovalent am 5'-Ende gebundenes Fluorophor 1 sowie eine Targetbindungssequenz 1 und 2, wobei die Targetbindungssequenz 2 zur Polymorphismuserfassung dient. Primer 1 bindet mit der Targetbindungssequenz 1 seines 3'-Endes an die Targetsequenz in einer 1. Position und wird durch eine DNS-Polymerase unter geeigneten Bedingungen komplementär verlängert. Nach Denaturierung des Doppelstranges bildet das 5'-Ende von Primer 1 über Targetbindungssequenz 2 eine Haarnadel mit der Targetsequenz 2 des Gens, die den Polymorphismus umfasst. Außerdem bindet die Sonde, die Fluorophor 2 am 3'-Ende trägt an den komplementär zum Target verlängerten Primer unmittelbar anschließend an die gebildete Haarnadel. Durch Bestrahlung des Reaktionsgemisches wird mit Licht definierter Wellenlänge von Fluorophor 1 vermittelter FREI ausgelöst und eine Emission von Fluorophor 2 gemessen. Diese Emission korreliert mit der im Reaktionsgemisch befindlichen Menge an Template, die den Polymorphismus umfasst. Zur besseren Unterscheidung von Targetsequenzen mit Polymorphismus und von Targetsequenzen ohne, die sich nur geringfügig in ihrer Targetsequenz 2 unterscheiden wird eine Schmelzkurve erstellt. Sind beide Targetsequenzen im Reaktionsgemisch enthalten, resultieren zwei Peaks in der Darstellung der 1. Ableitung der Schmelzkurve.

Fig. 3 – schematische Darstellung des Einsatzes des Primer/Sondensystems unter Verwendung dreier Primer und einer Sonde zum Real-time-Nachweis und zum elektrophoretischen Nachweis von Polymorphismen

(A) Primer 1 umfasst zwei Targetbindungssequenzen 1 und 2 sowie ein 5'-Ende, welches der Sequenz von Primer 3 entspricht. Primer 1 bindet mit der Targetbindungssequenz 1 seines 3'-Endes an die Targetsequenz des zu detektierenden Gens und wird durch eine DNS-Polymerase unter geeigneten Bedingungen komplementär zum Target verlängert. Nach Denaturierung des Doppelstranges bindet Primer 2 an den verlängerten Primer 1 und wird komplementär dazu verlängert.

(B) Der resultierende Doppelstrang wird denaturiert, so dass (C) Primer 3 mit Fluorophor 1 am 5'-Ende an das komplementäre Ende von Primer 1 bindet und verlängert wird.

(D) Der resultierende Doppelstrang wird denaturiert, so dass bei der Rehybridisierung sich eine Haarnadel 1 zwischen Targetbindungssequenz 2 und Targetsequenz 2 ausbildet. Außerdem bildet sich zwischen dem 5'-Ende der Primer 3-Sequenz und Primer 1 eine Haarnadel 2 aus. Die Sonde, die eine Markierung mit Fluorophor 2 am 3'-Ende trägt, bindet an den komplementär zum Target verlängerten Primer 3 unmittelbar anschließend an die Haarnadel 1.

(D1) Zur selektiven Amplifikation unterschiedlicher Targetsequenzen unterscheidet sich Primer 1 in der Targetbindungssequenz 1 und durch einen Längenmarker zwischen Primerbindungssequenz 1 am 3'-Ende sowie Primersequenz 3 an seinem 5'-Ende von anderen Primern 1 für andere Targetsequenzen im Multiplex-Ansatz.

[0057] Durch Bestrahlung des Reaktionsgemisches mit Licht definierter Wellenlänge wird ein über Fluorophor 1 vermittelter FREI ausgelöst und eine Emission von Fluorophor 2 bei definierter Wellenlänge gemessen. Diese Emission korreliert mit der im Reaktionsgemisch befindlichen Menge an Template, die den Polymorphismus umfasst. Zur besseren Unterscheidung von Targetsequenzen mit Polymorphismus und von Targetsequenzen ohne, die sich nur geringfügig in ihrer Targetsequenz 2 unterscheiden wird eine Schmelzkurve erstellt. Sind beide Targetsequenzen im Reaktionsgemisch enthalten, resultieren zwei Peaks in der Darstellung der 1. Ableitung der Schmelzkurve. Auf Grund unterschiedlicher Längenmarker in unterschiedlichen Primern 1 (siehe D1?) können die Amplifikate zusätzlich auch durch Gelelektrophorese oder Massenspektroskopie detektiert bzw. unterschieden werden.

Fig. 4a: schematische Darstellung des Nachweises mehrerer Targetsequenzen mit einer Kombination aus Real-time-PCR und Mikropartikelarray

[0058] Als feste Phase für die Hybridisierung von Amplifikat unterschiedlicher oder ein und der selben Nukleotidsequenz an in ihrer Sequenz verschiedener, mit Fluorophor 2 am 3'-Ende markierter und über ihr 5'-Ende kovalent immobilisierter Fangsonden (bestehend aus DNA, PTO-DNA oder LNA) dienen fluoreszenzkodierte Mikropartikel.

[0059] Die verwendeten Mikropartikel sind an sich dem Fachmann bekannt und zeichnen sich dadurch aus, dass sie bevorzugt aus 2 Schichten und einem Kern bestehen, die sich fluoreszenzoptisch unterscheiden und wobei wenigstens die äußere Schicht temperaturbeständig ist und z. B. aus Melamin besteht. Die mittlere und äußere Schicht bestehen bevorzugt ebenfalls aus Melamin. Die mittlere Schicht enthält Partikel wie z. B. Magnetpartikel, mit deren Hilfe eine sichere Immobilisierung der Partikel während der Messung gewährleistet ist.

[0060] Die Erfindung kommt beispielsweise in einem Array wie folgt zur Anwendung: Partikel aus Partikelpopulation 1 (linke Abbildungshälfte):

Der Kern enthält z. B. 100 Teile Aminocumarin und z. B. 20 Teile Nilblau (100/20). Die mittlere Schicht enthält z. B. 100 Teile Fluorescein und die äußere Schicht enthält z. B. 50 Teile Aminocumarin und z. B. 100 Teile Nilblau.

[0061] Farbstoff 1 im hybridisierten Amplifikat ist z. B. Fluorescein als Fluorophor 1 und Farbstoff 2 am 3'-Ende der Fangsonde ist z. B. Rhodamin als Fluorophor 2, so dass ein FREI-Paar entsteht.

Partikel aus Partikelpopulation 2 (rechte Abbildungshälfte):

[0062] Der Kern enthält z. B. 100 Teile Aminocumarin und z. B. 20 Teile Nilblau (100/20). Die mittlere Schicht enthält z. B. 20 Teile Fluorescein und die äußere Schicht enthält z. B. 100 Teile Aminocumarin und z. B. 100 Teile Nilblau.

[0063] Wenn kein Amplifikat hybridisiert, kann kein FREI-Paar zwischen Farbstoff 1 (z. B. Fluorescein) und Farbstoff 2 am 3'-Ende der Fangsonde (z. B. Rhodamin) entstehen. Nachdem die amplifikathaltige Probe mit den Mikropartikeln in Kontakt gebracht wurde oder zyklisch während der Amplifikation im selben Reaktionsgefäß das Amplifikat entsteht, werden vor dem Messvorgang mittels mikroskopischer Optik, um die Hybridisierung des Amplifikates an unterschiedliche Mikropartikelpopulationen zu messen, alle Mikropartikel im Ansatz sedimentiert oder durch einen permanenten oder elektrischen Magneten am Gefäßboden fixiert.

[0064] Durch Fluoreszenzspektroskopie werden die Mikropartikelpopulationen identifiziert und damit festgestellt, welche Fangsonde sich an welchem Mikropartikel befinden und ob fluoreszierendes Amplifikat hybridisierte. Dazu erfolgt die Anregung des beispielhaft genannten Aminocumarins bei einer Wellenlänge von 350 nm, um die erste Kodierungsfluoreszenz der Partikel in der äußeren und in der inneren Schicht zu erfassen. Anschließend wird z. B. Fluorescein bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und bei 520 nm gemessen, um die zweite Kodierungs/Referenzfluoreszenz der Partikel zu bestimmen und simultan bei Verwendung eines Strahlteilerprismas (bei 560 nm) um das FREI-Signal (hier z. B. die Rhodaminfluoreszenz) des hybridisierten Amplifikates zu erfassen. Durch nachfolgende Anregung bei 680 nm und Detektion bei 720 nm wird das beispielhaft genannte Nilblau angeregt und detektiert, um die zweite Kodierungsfluoreszenz des Kerns bzw. der äußeren Schicht zu bestimmen.

[0065] Die Verrechnung der orts aufgelöst detektierten Fluoreszenzsignale erfolgt nach folgenden Regeln:

Kern:

- Ermittlung des Quotienten 1 aus Aminocumarin- und Nilblau-Fluoreszenz
- Ermittlung des Kerndurchmessers

Mittlere Schicht:

- Ermittlung des Quotienten 2 aus Fluoresceinfluoreszenz und Quotienten 1
- Ermittlung der Dicke von Schicht 2

Äußere Schicht:

- Ermittlung des Quotienten 3 aus Aminocumarin- und Nilblau-Fluoreszenz
- Ermittlung der Dicke von Schicht 3

[0066] Nach diesen Regeln können die Mikropartikel des vorliegenden Beispiels dadurch unterschieden werden, daß Quotient 3 beider Partikel sich messbar unterscheidet.

Quotient 3

Partikelpopulation 1: 0,5

Partikelpopulation 2: 1

[0067] Alle übrigen Quotienten und alle anderen Durchmesser und Schichtdicken der Partikel unterscheiden sich nicht.

[0068] Die Amplifikat-Fluoreszenz, z. B. die der Emission des Rhodamin-FRET-Signals entspricht, kann als Intensität ausgegeben werden oder gegen einen konstant gehaltenen Parameter wie den Partikelgesamtdurchmesser der z. B. über das Fluorescein- oder Rhodaminsignal erfasst werden kann, referenziert werden.

[0069] Wird die (z. B. Rhodamin)-Fluoreszenz während jedes PCR-Zyklus' gemessen, wenn PCR und Detektion simultan ablaufen, ist die Probe als positiv bewertet, wenn das FRET-Signal die Hintergrundintensität durchbricht (Threshold-Cycle). Je mehr amplifizierte Targetsequenz in der Probe ist, um so höher ist die Signalintensität oder um so früher wird der Threshold-Cycle erreicht. Insbesondere die Bestimmung des Threshold-Cycle lässt eine genaue Multiplex-Quantifizierung von Targetsequenzen zu. Alternativ kann für alle Mikropartikel am Ende der PCR eine Schmelzkurve aufgezeichnet werden (siehe auch Beispiel 2).

Fig. 4b: schematische Darstellung des Nachweises eines Polymorphismus' an Amplifikat, welches durch Festphasen-PCR auf der Oberfläche von Mikropartikeln immobilisiert wird (am Bspile eines Polymorphismus im Faktor 2-Gen)

[0070] Als feste Phase für die Immobilisierung von Amplifikat unterschiedlicher oder ein und der selben Nucleotidsequenz an in ihrer Sequenz verschiedener, mit über ihr 5'-Ende kovalent immobilisierter Fangprimer dienen fluoreszenzkodierte Mikropartikel. Die verwendeten Mikropartikel zeichnen sich dadurch aus, daß sie bevorzugt aus 2 Schichten und einem Kern bestehen, die sich fluoreszenzoptisch unterscheiden und wobei wenigstens die äußere Schicht temperaturbeständig ist und z. B. aus Melamin besteht. Die mittlere und äußere Schicht bestehen hier ebenfalls aus Melamin. Die mittlere Schicht enthält Partikel wie z. B. Magnetpartikel, mit deren Hilfe eine sichere Immobilisierung der Partikel während der Messung gewährleistet ist. Der Einfachheit halber wurde hier nur ein Partikel aus Partikelpopulation 1 dargestellt, wobei für die Detektion mehrerer Polymorphismen auch mehrere Partikelpopulationen mit jeweils targetspezifischen Fangsonden eingesetzt werden können.

Partikel aus Partikelpopulation 1,

[0071] Der Kern enthält 100 Teile Aminocumarin und 20 Teile Nilblau (100/20). Die mittlere Schicht enthält 100 Teile Fluorescein und die äußere Schicht enthält 50 Teile Aminocumarin und 100 Teile Nilblau.

[0072] Farbstoff 1 im immobilisierten Amplifikat ist Fluorescein und Farbstoff 2 am 3'-Ende der Fangsonde ist Rhodamin, so daß ein FRET-Paar entsteht.

[0073] Nachdem die Probe mit den Mikropartikeln in Kontakt gebracht und thermozyklisch amplifiziert wurde, werden vor dem Meßvorgang mittels mikroskopischer Optik, um die Hybridisierung des Amplifikates an unterschiedliche Mikropartikelpopulationen zu messen, alle Mikropartikel im Ansatz sedimentiert oder wie hier im Beispiel durch einen permanenten oder elektrischen Magneten am Gefäßboden fixiert.

[0074] Durch Fluoreszenzspektroskopie werden die Mikropartikelpopulationen orts aufgelöst identifiziert und damit festgestellt, welcher Fangprimer sich an welchem Mikropartikel befindet und ob fluoreszierendes Amplifikat immobilisiert wurde. Dazu erfolgt die Anregung des Aminocumarin bei einer Wellenlänge von 350 nm, um die erste Kodierungsfluoreszenz der Partikel in der äußeren und in der inneren Schicht zu erfassen. Anschließend wird Fluorescein bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und bei 520 nm gemessen, um die zweite

Kodierungs/Referenzfluoreszenz der Partikel zu bestimmen und simultan, bei dehybridisierter Sonde, um immobilisiertes Amplifikat zu detektieren. Für die Analyse etwaiger Polymorphismen wird anschließend bei 480 nm Anregungswellenlänge und bei 560 nm Emissionswellenlänge orts aufgelöst detektiert um das FREI-Signal (Rhodaminfluoreszenz) der an das Amplifikat hybridisierten Sonde über einen Temperaturstufengradienten zu erfassen. Durch nachfolgende Anregung bei 680 nm und Detektion bei 720 nm wird Nilblau angeregt und detektiert, um die zweite Kodierungsfluoreszenz des Kerns bzw. der äußeren Schicht zu bestimmen. Die Verrechnung der orts aufgelöst detektierten Fluoreszenzsignale erfolgt nach folgenden Regeln:

Kern:

- Ermittlung des Quotienten 1 aus Aminocumarin- und Nilblau-Fluoreszenz
- Ermittlung des Kerndurchmessers

Mittlere Schicht:

- Ermittlung des Quotienten 2 aus Fluoresceinfluoreszenz und Quotienten 1
- Ermittlung der Dicke von Schicht 2

Äußere Schicht:

- Ermittlung des Quotienten 3 aus Aminocumarin- und Nilblau-Fluoreszenz
- Ermittlung der Dicke von Schicht 3

[0075] Nach diesen Regeln können die Mikropartikel des vorliegenden Beispiels dadurch unterschieden werden, daß Quotient 3 beider Partikel sich meßbar unterscheidet.

Quotient 3

Partikelpopulation 1: 0,5

Partikelpopulation 2: 1

[0076] Alle übrigen Quotienten und alle anderen Durchmesser und Schichtdicken der Partikel unterscheiden sich nicht.

[0077] Die Amplifikat-Fluoreszenz, die der Emission des Rhodamin-FREI-Signals entspricht kann als Intensität ausgegeben werden oder gegen einen konstant gehaltenen Parameter wie den Partikelgesamtdurchmesser der über das Fluorescein- oder Rhodaminsignal erfaßt werden kann, referenziert werden.

[0078] Obwohl der Nachweis von Nukleisäurepolymorphismen auch entsprechend [Fig. 4a](#) durchgeführt werden kann, wird man bevorzugt folgendermaßen vorgehen. Nachdem durch die PCR ausreichend Amplifikat auf den Mikropartikeln immobilisiert wurde, wird eine Schmelzkurve gefahren, d. h., im kritischen Temperaturbereich zwischen 50°C und 70°C werden Messungen im Stufengradienten mit einem Abstand zwischen Stufen von 2°C durchgeführt. Alternativ genügt es, eine Zweipunktmessung im Bereich des Schmelzkurvenpeaks jedes Amplikons (Sondenbereich oder Stambereich der Haarnadel) durchzuführen oder aber die Signale über den Stufengradienten in kleineren Schritten oder kontinuierlich zu detektieren. Die Signale, die für einen Mikropartikelpopulation erfaßt werden, können gemittelt oder einzeln analysiert und dargestellt werden.

[0079] Erfolgt die Schmelzpunktbestimmung für einen Polymorphismus an einem Partikel an zwei Punkten, dann können die Absolutwerte der Signale miteinander verglichen werden oder ein Quotient aus beiden Signalen gebildet werden. Wird ein Signal detektiert, bedeutet dies die Anwesenheit des entsprechenden Polymorphismus in der Probe.

[0080] Das Signal entsteht dann, wenn ausreichend Amplifikat über die Fangprimer an der Partikeloberfläche immobilisiert wird, die Sonde an das Amplifikat hybridisiert und das 5'-Ende des targetspezifischen Abschnittes des Fangprimers unter Ausbildung einer Haarnadel mit der/den Nukleotidposition(en) des Polymorphismus hybridisiert. Fehlpaarungen im Stamm der Haarnadel können über die Schmelzpunktanalyse erfaßt werden. Während das im Schema dargestellte Amplikon ohne Fehlpaarung eine Haarnadel bildet, tritt mit Variation der Stammsequenz der Haarnadel im polymorphen Nukleotid an dieser Stelle eine Fehlpaarung auf, so daß bei der gleichen Temperatur sich die Haarnadel nicht ausbildet.

[0081] Durch Kombination mehrerer Partikelpopulationen in einer Nachweisreaktion, können mehrere Amplifikate unterschiedlicher oder gleicher Genfragmente gleichzeitig auf Polymorphismen untersucht werden.

Fig. 5: Schematische Darstellung eines Gerätesystems (A) und einer Reaktionsumgebung (B) zur kombinierten Amplifikation von Targetsequenzen und Detektion der Amplifikate am Mikropartikelarray

(A) Das vollautomatisch computergesteuerte Gerät stellt von seinen Leistungsparametern her eine Kombination aus Fluoreszenzmikroskop und Thermocycler dar.

An einem Stativ **6** mit motorisiertem (z-Trieb) befinden sich die optischen Komponenten mindestens bestehend aus einer Long-Distanz-Optik **5** für die Fluoreszenzdetektion mit einem 20er-Objektiv und Elementen zur Strahlführung und zum Bildaufbau ausgestattet. Die Anregung erfolgt über mindestens drei verschiedene LED **3** oder LASER **4** in den Spektralbereichen 350–400 nm; 450–500 nm; 550–600 nm. Die konkrete Wellenlängen des Anregungslichtes richten sich nach den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen und werden bei Bedarf durch passende Filter **2** feinjustiert. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wird durch entsprechende Emissionsfilter **1** vom Anregungslicht getrennt und durch eine sensitivierte CCD-Kamera aufgezeichnet **3**. Der Objektisch besitzt einen x/y-Antrieb der eine Genauigkeit von unter 0,1 mm aufweist und den Thermocycler mit Probenhalterung (hier für 96 Reaktionsgefäße mit 0,2 ml Fassungsvermögen) aufnimmt. Unter den Reaktionsgefäßen, die einen planaren Boden aufweisen, ist ein Magnet **11** (Dauermagnet oder ein Elektromagnet) positioniert, so dass paramagnetische Mikropartikel während des Messvorganges gut immobilisiert werden.

Eine automatische Computersteuerung umfasst das PCR-Programm und damit das Temperaturprofil der PCR-Reaktion, die Filterwechsler, die CCD-Kamera, die Bildakquise und Bildverarbeitung, den x/y/z-Antrieb und die Steuerung des Anregungslichtes, so dass während der PCR-Reaktion sowie die Ausgabe der Amplifikat-Fluoreszenzen für die verschiedenen Partikelpopulationen gewährleistet werden kann.

(B) Als Reaktionsgefäße werden z. B. Nukleosorb 8er-Riegel **12** verwendet, die mit einem Glasdeckglas verschlossen werden.

(C) Der PCR-Mastermix wird zusammen mit der Proben-DNS **16** in das Reaktionsgefäß pipettiert und mit Öl überschichtet. Danach wird das Reaktionsgefäß mit einem Deckglas verschlossen und der PCR-/Messvorgang gestartet. Während die PCR-Zyklen ablaufen erfolgt die Messung der Fluoreszenzen bevorzugt in der Phase des Annealings bei isothermen Bedingungen. Alternativ erfolgt das Aufzeichnen einer Schmelzkurve am Ende der PCR. Die Mikropartikel sind während der PCR bevorzugt ständig immobilisiert durch kovalente Kopplung, Sedimentation oder magnetische Anziehung. Bei Verwendung von Elektromagneten können die Partikel während der PCR immobilisiert oder frei flottierend vorliegen und werden für jede Messung neu immobilisiert.

Bezugszeichenliste

- | | |
|-----------|---------------------------------------|
| 1 | Emissionsfilter |
| 2 | Filter für Anregungslicht |
| 3 | CCD-Kamera |
| 4 | LED oder Laser zur Anregung |
| 5 | Long-Distanz-Optik |
| 6 | Stativ |
| 7 | z-Antrieb |
| 8 | Thermocycler |
| 9 | x/y-Antrieb |
| 10 | Ausschnittsmarkierung |
| 11 | Magnet |
| 12 | Nukleosorb 8er Riegel |
| 13 | Reaktionsgefäßaufnahme im Thermoblock |
| 14 | Deckel |
| 15 | Ölüberschichtung |
| 16 | Master-Mix + Proben-DNS |

Beispiel 1

[0082] Nachweis des Erregers Herpes simplex Virus in einer Probe Ein Volumen von 5 µl aus Abstrichen von Lippenbläschen gereinigter Proben-DNS wird zu 15 µl Master-Mix folgender Zusammensetzung gegeben:

Primer 1	400 nM
Primer 2	300 nM
Sonde	100 nM

in Taq-DNS-Polymerase, Nukleotide, Magnesiumchlorid, Tris/HCl-Puffer und Tween 20 gelöst.

[0083] Der Reaktionsansatz wird in eine LightCycler-Kapillare pipettiert und anschließend in den LightCycler überführt und thermocyclisch amplifiziert. Das Verfahren ist schematisch in [Fig. 1](#) dargestellt. Primer 1 trägt ein kovalent gebundenes Fluorescein am 4. Nukleotid vom 3'-Ende aus gezählt, bindet mit seiner Targetbindungssequenz 1 am 3'-Ende an die Targetsequenz des Herpes simplex-Virus-Genoms und wird durch eine DNS-Polymerase unter geeigneten Bedingungen komplementär zum Target verlängert. Nach Denaturierung des Doppelstranges kann die Sonde, die eine Rhodamin-Markierung am 3'-Ende trägt an den komplementär zum Target verlängerten Primer hybridisieren. Durch Bestrahlung des Reaktionsgemisches mit Licht einer Wellenlänge von 480 nm wird ein über Fluorescein vermittelter FREI ausgelöst und die Emission bei 560 nm korreliert mit der im Reaktionsgemisch befindlichen Menge an Template.

[0084] Nach Abschluß der Amplifikation wird für alle Proben, die ein ausreichend hohes Meßsignal aufweisen, eine Schmelzkurve aufgezeichnet.

Sequenzen

Primer 1: 5'-CAT CAC CGA CCC GGA GAG GGA C-3'
 G an Position 20 (grau hinterlegt) trägt kovalent ein FITC-Molekül.
 Primer 2: 5'-GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A-3'
 Sonde: 5'-GGTGAGGACAAAGTCCTGGAT-3'-Rhodamin

Beispiel 2:

Nachweis eines Faktor 2-Polymorphismus

[0085] Ein Volumen von 5 µl aus Patientenblut gereinigter Proben-DNS wird zu 15 µl Master-Mix folgender Zusammensetzung gegeben:

Primer 1 (FITC-modifiziert)	300 nM
Primer 2	300 nM
Sonde	100 nM

in Taq-DNS-Polymerase, Nukleotide, Magnesiumchlorid, Tris/HCl-Puffer und Tween 20 gelöst.

[0086] Der Reaktionsansatz wird in eine LightCycler-Kapillare pipettiert und anschließend in den LightCycler überführt und thermocyclisch amplifiziert. Das Verfahren ist schematisch in [Fig. 2](#) dargestellt. Primer 1 trägt ein kovalent am 5'-Ende gebundenes Fluorescein sowie eine Targetbindungssequenz 2, bindet mit der Targetbindungssequenz 1 seines 3'-Endes an die Targetsequenz des humanen Faktor 2-Gens und wird durch eine DNS-Polymerase unter geeigneten Bedingungen komplementär zum Target verlängert. Nach Denaturierung des Doppelstranges bildet das 5'-Ende von Primer 1 eine Haarnadel mit der Targetsequenz zwei die den Polymorphismus umfaßt. Außerdem bindet die Sonde, die eine Rhodamin-Markierung am 3'-Ende trägt an den komplementär zum Target verlängerten Primer unmittelbar anschließend an die Haarnadel. Durch Bestrahlung des Reaktionsgemisches mit Licht einer Wellenlänge von 480 nm wird ein über Fluorescein vermittelter FREI ausgelöst und eine Emission von Rhodamin bei 560 nm gemessen. Diese Emission korreliert mit der im Reaktionsgemisch befindlichen Menge an Template, die den Polymorphismus umfaßt. Zur besseren Unterscheidung von Targetsequenzen mit Polymorphismus und von Targetsequenzen ohne, die sich nur geringfügig in ihrer Targetsequenz 2 unterscheiden wird eine Schmelzkurve erstellt. Sind beide Targetsequenzen im Reaktionsgemisch enthalten, resultieren zwei Peaks in der Darstellung der 1. Ableitung der Schmelzkurve.

[0087] Nach Abschluß der Amplifikation wird für alle Proben, die ein ausreichend hohes Meßsignal aufweisen, eine Schmelzkurve aufgezeichnet.

[0088] Alternativ ist die Unterscheidung der gebildeten Amplifikate auf Grund des Längenmarkers in Primer 1b elektrophoretisch möglich.

Sequenzen

Primer 1 (FITC-modifiziert): FITC-5'-ggctcgcctcaataaa agtgactctc a-3'

Primer 2: 5'-ccaggtggtggattcttaagtc-3'

Sonde: 5'-gctgccatgaatagcactggagcatt-3'-Rhodamin

Beispiel 3:

Simultaner Nachweis von Herpes simplex DNS und interner Standard in einer Probe

[0089] Ein Volumen von 5 µl aus Patientenblut gereinigter Proben-DNS wird zu 15 µl Master-Mix folgender Zusammensetzung gegeben:

Primer 1a	10 nM
Primer 1b	10 nM
Primer 2	300 nM
Primer 3 (FITC-modifiziert)	300 nM
Sonde 1	100 nM
Sonde 2	100 nM
Interner Stan	dard 100 fM

in Taq-DNS-Polymerase, Nukleotide, Magnesiumchlorid, Tris/HCl-Puffer und Tween 20 gelöst.

[0090] Der Reaktionsansatz wird in eine LightCycler-Kapillare pipettiert und anschließend in den LightCycler überführt und thermocyclisch amplifiziert. Das Verfahren ist schematisch in [Fig. 3](#) dargestellt. Nach Abschluß der Amplifikation wird für alle Proben, die ein ausreichend hohes Meßsignal aufweisen, eine Schmelzkurve aufgezeichnet, um Amplifikat des internen Standards und, bei HSV-positiven Proben, HSV-Amplifikat zu detektieren.

Sequenzen

Primer 1a:

5'-actgcagctcacacggacg gtgcagtaagtctctgg CAT CAC CGA CCC GGA GAG GGA C-3'

Primer 1b:

5'-actgcagctcacacggacgctgtgtgtgtg ttgtgtgtgt gttgtgtgtg ttgtgtgtg gcgtgcagt gcggtccac
CATCACCGAC CCGGACAGCC CA-3'

Primer 2: 5'-GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A-3'

Primer 3: FITC-5'-actgcagctcacacggacg-3'

Sonde 1: 5'-tcagttcggcgggtgaggaca-3'-Rhodamin

Interner Standard: 5'-CATCACCGAC CCGGACAGCC CACCAGCGTG GACCGCTGT CCT CAC CGC CGA
ACT GA GGCCAG GCGGTGAAGG GCAATCAGCT GTTGCCCGTC TCGCTGGTGA AAAGAAAAAC CAC-
CCTGGCG CCCAATACGC AAACCGCCTA CACCAACAAG CGCCTGGCCC-3'

Beispiel 4:

Kombination aus Sondensystem für die Real-time-PCR mit einem Mikropartikelarray zum simultanen Nachweis verschiedener Targetsequenzen eines Faktor 2- und eines Faktor 5-Polymorphismus'. Das Verfahren ist schematisch in [Fig. 4](#) dargestellt.

[0091] Ein Volumen von 5 µl aus Patientenblut gereinigter Proben-DNS wird zu 15 µl Master-Mix folgender Zusammensetzung gegeben (Oligonukleotidsequenzen für Faktor 5 und Faktor 2 siehe unten):

Primer 1 (Flüssigphase)	300 nM
Primer 1 (FITC-markierter Fangprimer zur Beschichtung der Mikropartikel mittels EDC-Kopplung:	100 nM
Primer 2 (Flüssigphase)	300 nM
Sonde (Rhodamin-markiert)	100 nM

in Taq-DNS-Polymerase, Nukleotide, Magnesiumchlorid, Tris/HCl-Puffer und Tween 20 gelöst.

[0092] Der Reaktionsansatz wird in einem Nukleosorb (schwarz)-8er-Riegel pipettiert und anschließend in

den Thermocycler der Meßstation (**Fig. 5**) überführt, mit Öl überschichtet, mit einem Glasdeckglas verschlossen, thermocyclisch amplifiziert und nach der Amplifikation mittels Schmelzkurvenanalyse detektiert (siehe **Fig. 4** und **Fig. 5**).

Mirkopartikel:

[0093] Es werden die Partikel mit den Eigenschaften aus [Abb. 4a](#) entsprechend mit Fangprimer für spezifisch für die Amplifikat-Sequenzen von Faktor 5 und Faktor 2-Gen mittels EDC-Kopplung beschichtet.

Sequenzen

Faktor 2:

Primer 1 (FITC-modifiziert, zur Festphasenimmobilisierung):
 Aminohexyl-5'-ttgttggtggtggctcgctccaataaa agtgactctc a-3'
 Grau unterlegt: Polymorphismus
 Fett-kursiv: FITC-Markierung

Primer 1 (Flüssigphase):
 ggctcgctccaataaaagtgactctca-3'
 Grau unterlegt: Polymorphismus

Primer 2 (Flüssigphase): 5'-ccagtggtgattcttaagtc-3'
 Sonde: 5'-gctgccatgaatagcactgggagcatt-3'-Rhodamin













Faktor 5:

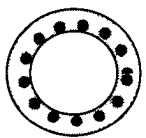
Primer 1 (FITC-modifiziert, zur Festphasenimmobilisierung):
 Aminohexyl-5'-ttgttggttgaggaccggagatccctggacaggc-3'
 Grau unterlegt: Polymorphismus
 Fett-kursiv: FITC-Markierung

Primer 1 (Flüssigphase):
 5'-aggaccggagatccctggacaggc-3'
 Grau unterlegt: Polymorphismus

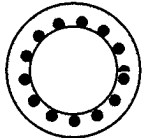
Primer 2 (Flüssigphase): 5'-ctgaaggaaa tgccccatta ttag-3'
 Sonde: 5'-ctgaaaggtt actcaagga caaaatacct gtat-3'-Rhodamin

Legende zu den Abbildungen

	Primer		Targetbindungssequenz 2
	Komplementär zum Primer		Targetsequenz 2
	Sonde		Hybridisierter Nukleinsäuredoppelstrang
	Fluophor 1		Anregung
	Fluophor 2		Emission
	Target		FRET
x	Polymorphismus im Target		



Mittlere Partikelschicht mit Magnetpartikeln und 100 Teilen Fluorophor, z.B. Fluorescein



Mittlere Partikelschicht mit Magnetpartikeln und 20 Teilen Fluorophor, z.B. Fluorescein

Sequenzen

Primer 1: 5'-CAT CAC CGA CCC GGA GAG GGA C-3'
 G an Position 20 (grau hinterlegt) trägt kovalent ein FITC-Molekül.
 Primer 2: 5'-GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A-3'
 Sonde: 5'-GGTGAGGACAAAGTCCTGGAT-3'-Rhodamin

Beispiel 2:

Nachweis eines Faktor 2-Polymorphismus

[0094] Ein Volumen von 5 µl aus Patientenblut gereinigter Proben-DNS wird zu 15 µl Master-Mix folgender Zusammensetzung gegeben:

Primer 1 (FITC-modifiziert)	300 nM
Primer 2	300 nM
Sonde	100 nM

in Taq-DNS-Polymerase, Nukleotide, Magnesiumchlorid, Tris/HCl-Puffer und Tween 20 gelöst.

[0095] Der Reaktionsansatz wird in eine LightCycler-Kapillare pipettiert und anschließend in den LightCycler überführt und thermocyclisch amplifiziert. Das Verfahren ist schematisch in [Fig. 2](#) dargestellt. Primer 1 trägt ein kovalent am 5'-Ende gebundenes Fluorescein sowie eine Targetbindungssequenz 2, bindet mit der Targetbindungssequenz 1 seines 3'-Endes an die Targetsequenz des humanen Faktor 2-Gens und wird durch eine DNS-Polymerase unter geeigneten Bedingungen komplementär zum Target verlängert. Nach Denaturierung

des Doppelstranges bildet das 5'-Ende von Primer 1 eine Haarnadel mit der Targetsequenz zwei die den Polymorphismus umfaßt. Außerdem bindet die Sonde, die eine Rhodamin-Markierung am 3'-Ende trägt an den komplementär zum Target verlängerten Primer unmittelbar anschließend an die Haarnadel. Durch Bestrahlung des Reaktionsgemisches mit Licht einer Wellenlänge von 480 nm wird ein über Fluorescein vermittelter FREI ausgelöst und eine Emission von Rhodamin bei 560 nm gemessen. Diese Emission korreliert mit der im Reaktionsgemisch befindlichen Menge an Template, die den Polymorphismus umfaßt. Zur besseren Unterscheidung von Targetsequenzen mit Polymorphismus und von Targetsequenzen ohne, die sich nur geringfügig in ihrer Targetsequenz unterscheiden wird eine Schmelzkurve erstellt. Sind beide Targetsequenzen im Reaktionsgemisch enthalten, resultieren zwei Peaks in der Darstellung der 1. Ableitung der Schmelzkurve.

[0096] Nach Abschluß der Amplifikation wird für alle Proben, die ein ausreichend hohes Meßsignal aufweisen, eine Schmelzkurve aufgezeichnet.

[0097] Alternativ ist die Unterscheidung der gebildeten Amplifikate auf Grund des Längenmarkers in Primer 1b elektrophoretisch möglich.

Sequenzen

Primer 1 (FITC-modifiziert): FITC-5'-ggctcgcctcaataaa agtgactctc a-3'

Primer 2: 5'-ccaggtggtgattcttaagtc-3'

Sonde: 5'-gctgccatgaatagcactggagcatt-3'-Rhodamin

Beispiel 3:

Simultaner Nachweis von Herpes simplex DNS und interner Standard in einer Probe

[0098] Ein Volumen von 5 µl aus Patientenblut gereinigter Proben-DNS wird zu 15 µl Master-Mix folgender Zusammensetzung gegeben:

Primer 1a	10 nM
Primer 1b	10 nM
Primer 2	300 nM
Primer 3 (FITC-modifiziert)	300 nM
Sonde 1	100 nM
Sonde 2	100 nM
Interner Stan	dard 100 fM

in Taq-DNS-Polymerase, Nukleotide, Magnesiumchlorid, Tris/HCl-Puffer und Tween 20 gelöst.

[0099] Der Reaktionsansatz wird in eine LightCycler-Kapillare pipettiert und anschließend in den LightCycler überführt und thermocyclisch amplifiziert. Das Verfahren ist schematisch in [Fig. 3](#) dargestellt. Nach Abschluß der Amplifikation wird für alle Proben, die ein ausreichend hohes Meßsignal aufweisen, eine Schmelzkurve aufgezeichnet, um Amplifikat des internen Standards und, bei HSV-positiven Proben, HSV-Amplifikat zu detektieren.

Sequenzen

Primer 1a:

5'-actgcagctcacacggacg gtgcagtaagtctctg CAT CAC CGA CCC GGA GAG GGA C-3'

Primer 1b:

5'-actgcagctcacacggacgtgtgtgtgtg ttgtgtgtgt gttgtgtgt ttgtgtgtg gcgtgcagt gcggtccac CATCACCGAC CCG-GACAGCC CA-3'

Primer 2: 5'-GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A-3'

Primer 3: FITC-5'-actgcagctcacacggacg-3'

Sonde 1: 5'-tcagttcggcggtgaggaca-3'-Rhodamin

Interner Standard: 5'-CATCACCGAC CCGGACAGCC CACCAGCGTG GACCGCTGT CCT CAC CGC CGA ACT GA GGCCAG GCGGTGAAGG GCAATCAGCT GTTGCCCGTC TCGCTGGTGA AAAGAAAAAC CAC-CCTGGCG CCCAATACGC AAACCGCCTA CACCAACAAG CGCCTGGCCC-3'

Beispiel 4:

[0100] Kombination aus Sondensystem für die Real-time-PCR mit einem Mikropartikelarray zum simultanen Nachweis verschiedener Targetsequenzen eines Faktor 2- und eines Faktor 5-Polymorphismus'. Das Verfahren ist schematisch in **Fig. 4** dargestellt.

[0101] Ein Volumen von 5 µl aus Patientenblut gereinigter Proben-DNS wird zu 15 µl Master-Mix folgender Zusammensetzung gegeben (Oligonukleotidsequenzen für Faktor 5 und Faktor 2 siehe unten):

Primer 1 (Flüssigphase)	300 nM
Primer 1 (FITC-markierter Fangprimer zur Beschichtung der Mikropartikel mittels EDC-Kopplung:	100 nM
Primer 2 (Flüssigphase)	300 nM
Sonde (Rhodamin-markiert)	100 nM

in Taq-DNS-Polymerase, Nukleotide, Magnesiumchlorid, Tris/HCl-Puffer und Tween 20 gelöst.

[0102] Der Reaktionsansatz wird in einem Nucleosorb (schwarz)-8er-Riegel pipettiert und anschließend in den Thermocycler der Meßstation (**Fig. 5**) überführt, mit Öl überschichtet, mit einem Glasdeckglas verschlossen, thermocyclisch amplifiziert und nach der Amplifikation mittels Schmelzkurvenanalyse detektiert (siehe **Fig. 4** und **Fig. 5**).

Mirkopartikel:

[0103] Es werden die Partikel mit den Eigenschaften aus [Abb. 4a](#) entsprechend mit Fangprimer für spezifisch für die Amplifikat-Sequenzen von Faktor 5 und Faktor 2-Gen mittels EDC-Kopplung beschichtet.

Sequenzen

Faktor 2:

Primer 1 (FITC-modifiziert, zur Festphasenimmobilisierung):
 Aminoethyl-5'-ttgtgtgtgtggcctcgctccaataaa agtgactctc a-3'
 Grau unterlegt: Polymorphismus
 Fett-kursiv: FITC-Markierung

Primer 1 (Flüssigphase):
 ggctcgctccaataaaagtgactctca-3'
 Grau unterlegt: Polymorphismus

Primer 2 (Flüssigphase): 5'-ccagtggtgattcttaagtc-3'
 Sonde: 5'-gctgcccataagtagcactggagcatt-3'-Rhodamin

Faktor 5:

Primer 1 (FITC-modifiziert, zur Festphasenimmobilisierung):
 Aminoethyl-5'-ttgtgtgttgaggaccggagatccctggacaggc-3'
 Grau unterlegt: Polymorphismus
 Fett-kursiv: FITC-Markierung

Primer 1 (Flüssigphase):
 5'-aggaccggagatccctggacaggc-3"
 Grau unterlegt: Polymorphismus

Primer 2 (Flüssigphase): 5'-cttgaaggaaa tgcccatta ttag-3'
 Sonde: 5'-ctgaaaggtt actcaagga caaataacct gtat-3'-Rhodamin

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Attomol GmbH Molekulare Diagnostika

<120> Verfahren und Sonden/Primersystem zum "real time"
Nachweis eines Nukleinsäuretargets

<130> P471207DE1

<140> DE 10 2007 031 137.2

<141> 2007-06-29

<150> DE 10 2007 027 779.4

<151> 2007-06-13

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 1

catcaccgac ccggagaggg ac

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 2

gggccagggc cttgttggtg ta

22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 3

ggtgaggaca aagtcctgga t

21

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 4

ggctcgctcc aataaaagtg actctca

27

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 5

ccaggtggtg gattcttaag tc

22

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 6

gctgcccattg aatagcactg ggagcatt

28

<210> 7

<211> 58

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 7

actgcacgct cacacggacg gtgcagtaag tcttggcatc accgacccgg agagggac 58

<210> 8

<211> 100

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 8

actgcacgct cacacggacg ttgttggtgt tgttggtgtt gttggtgttg ttgttggtgt 60
gcgtgcagtg cgggccacca tcaccgaccc ggacagccca 100

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 9

actgcacgct cacacggacg 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 10

tcagttcggc ggtgaggaca 20

<210> 11

<211> 162

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 11

catcaccgac ccggacagcc caccagcgtg gaccgctgtc ctcaccgccg aactgaggcc 60
aggcggtgaa gggcaatcag ctggtgcccg tctcgctggt gaaaagaaaa accaccctgg 120
cgccaatac gcaaaccgcc tacaccaaca agcgcttggc cc 162

<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 12

ttgttgttgt tgttgggctc gctccaataa aagtgactct ca 42

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 13

ggctcgctcc aataaaagtg actctca 27

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 14

ccaggtggtg gattcttaag tc 22

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 15

gctgcccatg aatagcactg ggagcatt

28

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 16

ttgttgtgtg tgaggaccgg agatccctgg acaggc

36

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 17

aggaccggag atccctggac aggc

24

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 18

cttgaaggaa atgccccatt atttag

26

<210> 19

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer/Sonde

<400> 19

ctgaaagggtt acttcaagga caaaatacct gtat

34

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- US 6150097 A [0003]
- DE 69907630 T2 [0044]

Patentansprüche

1. Verfahren zum „real-time“ Nachweis von Nukleinsäuretargets als Produkte einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion mittels einem Primer/Sondensystem umfassend die Schritte:

- a) Einsatz von mindestens einem Primer, der mindestens eine für die zu amplifizierende Nukleinsäure spezifische Sequenz – Targetbindungssequenz(en) (TBS) – umfasst und der am 3'-Ende Modifikationen trägt, die eine enzymatische Verlängerung komplementär zum Target gestatten,
- b) Einführung eines Fluophors 1,
- c) zum Nachweis Einsatz von mindestens einer Sonde, die mindestens am 3'-Ende ein Fluorophor 2 trägt, wobei die mindestens eine Sonde mit dem Komplementärstrang des zur Targetsequenz am 3'-Ende verlängerten Primers oder bei Verwendung mehrerer Primer mit dem Targetstrang hybridisieren kann, wobei einer der beiden Fluorophore durch Licht geeigneter Wellenlänge angeregt wird, so dass zwischen Fluorophor 1 und 2 ein FREI stattfindet, der fluoresszenzoptisch detektiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Primer am 5'-Ende zusätzlich einen zum Target unspezifischen Schwanz aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Fluorophor 1 sich an einem Primer oder an einer weiteren Sonde befindet oder eingebracht wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Fluorophore 1 und 2 kovalent gebunden an Primern und Sonden vorliegen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Primer eine für die zu amplifizierende Targetsequenz spezifische Sequenz (TBS), im 5'-Bereich teilweise komplementär zum 3'-Bereich umfasst, so dass sie eine Haarnadel bildet.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Fluorophor 1 an den spezifischen oder unspezifischen Teil eines ersten Primers oder an einem weiteren Primer vorliegt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Primer das Fluorophor am 5'-Ende aufweist, wobei zum Nachweis des Targets der Primer am 5'-Ende partiell oder vollständig eine Haarnadel mit sich selbst oder der komplementär zum Target verlängerten Primersequenz bildet.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens drei Primer verwendet werden, und das die folgenden Schritte umfasst:

- in einer ersten Reaktion Einsatz eines Primerpaares 1 und 2, wobei der Vorwärtsprimer 1 mindestens eine Targetbindungssequenz 1 (TBS 1) und und mindestens eine Targetbindungssequenz 2 (TBS 2) umfasst, so dass TBS 1 an das zu amplifizierende Target bindet, anschließend Primer 1 komplementär zum Target verlängert wird, Rückwärtsprimer 2 an das komplementäre Target bindet und ebenfalls verlängert wird,
- in einer weiteren Reaktion zwischen Primer 3, welcher mit dem 5'-Bereich von Primer 1 identisch oder teilweise identisch ist und der gegebenenfalls das Fluorophor 1 am 5'-Ende trägt, und Primer 2 die Amplifikation stattfindet, wobei Primer 3 so konstruiert ist, dass er eine Haarnadel 1 vollständig oder teilweise mit sich selbst oder mit komplementären Abschnitten der Primer 1-Sequenz bildet, und wobei die mindestens eine TBS 2 an mindestens einen weiteren Targetbindungsabschnitt bindet(en), welche(r) zwischen verlängertem Primer 1 und der komplementären Sequenz von Primer 2 liegt(en), wodurch eine Haarnadel 2 entsteht,
- dann eine mit dem Fluorophor 2 markierte Sonde mit dem Amplifikat in Kontakt gebracht wird und dass das mit dem Fluorophor 1 gebildete FREI-Signal detektiert wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass Primer 3 Fluorophor 1 trägt und die Sonde mit Fluorophor 2 am 3'-Ende vollständig an der Targetsubstanz hybridisiert.

10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass Primer 3 Fluorophor 1 trägt und die Sonde mit Fluorophor 2 am 3'-Ende über Haarnadel 2 und Primer 1 an der Targetsubstanz hybridisiert.

11. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass zwei Sonden verwendet werden, die jeweils Fluorophor 1 und 2 tragen, wobei Sonde 1 Primer 1-spezifisch ist und Sonde 2 Target-spezifisch ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Fluophore 1 und 2

ausgewählt sind aus Fluoreszenzfarbstoffmolekülen, wobei das Licht, das vom ersten Fluorophor absorbiert und remittiert wird, vom zweiten, nach Bindung der Sonde(n) dem ersten Fluorophor räumlich nahen zweiten Fluorophor erneut absorbiert und remittiert wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Fluorophore verwendet werden:

Fluorophor 1	Fluorophor 2
Fluorescein	LC Red 640 oder LC Red 705
Aminocumarin	Fluorescein
Fluorescein	Rhodamin oder Tetramethylrhodamin
Fluorescein	Cy3
Cy3	Cy5
Cy3	Tetramethylrhodamin
Europium	Cy5
Terbium	Rhodamin
Bodipy	Bodipy
Dansyl	Fluorescein
Naphtalen	Dansyl
Ruthenium	Cy5.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikationsreaktion eine homogene Flüssigphasen-PCR, eine Multiplex-PCR, eine asymmetrische PCR, eine Festphasen-PCR, eine RT-PCR, eine in situ-PCR, eine immuno-PCR oder eine nested PCR ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass zur gleichzeitigen Unterscheidung von mehreren Targetsequenzen, die Targetsequenzen im Sondenbindungsbereich, im Primerbindungsbereich, im Stamm der Haarnadel(n) durch Schmelzkurvenanalyse oder durch den Einsatz mehrerer Fluorophore oder Längenmarker unterschieden werden.

16. Primer/Sondensystem zum Nachweis von Nukleinsäuren umfassend:

- a) mindestens einen Primer, der mindestens eine für das nachzuweisende Nukleinsäuretarget spezifische Sequenz umfasst und am 3'-Ende Modifikationen aufweist, die eine enzymatische Verlängerung gestatten, wobei gegebenenfalls einer der Primer mit einem Fluorophor 1 markiert ist,
- b) mindestens eine Sonde, wobei mindestens eine ein Fluorophor 2 trägt und ggf. eine weitere, die Fluorophor 1 aufweist.

17. Primer/Sondensystem nach Anspruch 16 umfassend:

- a) einen Primer, der mindestens eine für das nachzuweisende Nukleinsäuretarget spezifische Sequenz umfasst und am 3'-Ende Modifikationen aufweist, die eine enzymatische Verlängerung gestatten, wobei dieser Primer mit dem Fluorophor 1 markiert ist,
- b) eine Sonde, die am 3'-Ende das Fluorophor 2 trägt und die für den 3'-verlängerten Komplementärstrang von a) spezifisch ist.

18. Primer/Sondensystem nach Anspruch 16 umfassend:

- a) drei Primer, wobei
 - ein Primerpaar 1 und 2 als Vorwärts- und Rückwärtsprimer fungieren und wobei Primer 1 mindestens zwei für das nachzuweisende Nukleinsäuretarget spezifische Sequenzen umfasst und beide Modifikationen aufweisen, die eine enzymatische Verlängerung gestatten, und
 - Primer 3, der mit dem 5'-Bereich von Primer 1 teilweise oder vollständig identisch ist, ebenfalls enzymatisch verlängerbar ist und Fluorophor 1 trägt, wobei er so konstruiert ist, dass er eine Haarnadel 1 vollständig oder partiell mit sich selbst, mit komplementären Abschnitten der Primer 1-Sequenz oder komplementären Abschnitten des Targets bilden kann,
- b) eine Sonde, die am 3'-Ende Fluorophor 2 trägt und die vollständig für die Targetsequenz spezifisch ist, oder die für die Targetsequenz und Primer 1 spezifisch ist.

19. Primer/Sondensystem nach Anspruch 16 umfassend:

- a) drei Primer, wobei
 - ein Primerpaar 1 und 2 als Vorwärts- und Rückwärtsprimer fungieren und wobei Primer 1 mindestens zwei für das nachzuweisende Nukleinsäuretarget spezifische Sequenzen umfasst und beide Modifikationen aufweisen, die eine enzymatische Verlängerung gestatten, und

- Primer 3, der mit dem 5'-Bereich von Primer 1 teilweise oder vollständig identisch ist, ebenfalls enzymatisch verlängerbar ist,
- b) zwei Sonden, die jeweils Fluorophor 1 und 2 tragen und die vollständig für die Targetsequenz spezifisch sind, oder die für die Targetsequenz und Primer 1 spezifisch sind.

20. Reagenzienkit zum Nachweis von Nukleinsäuren umfassend

- a) mindestens ein Primer/Sondensystem gemäß einem der Ansprüche 16 bis 19,
- b) geeignete Puffer und gegebenenfalls weitere Hilfsstoffe.

21. Verwendung eines Primer/Sondenystems nach einem der Ansprüche 16 bis 19 oder eines Reagenzienkits gemäß Anspruch 20 zur gleichzeitigen Unterscheidung von mehreren Targetsequenzen, wobei mehrere Primer-/Sonden-systeme eingesetzt werden, die sich mindestens teilweise oder vollständig in den targetsequenzspezifischen Abschnitten und den Emissionswellenlängen der emittierenden Fluophore unterscheiden, so dass diese durch Mehrfarbenfluoreszenzdetektion differentiell erfasst werden können.

22. Verwendung eines Primer/Sondenystems nach einem der Ansprüche 16 bis 19 oder eines Reagenzienkits gemäß Anspruch 20 zum Nachweis von mehreren Targetsequenzen, wobei die targetspezifischen Primer sich im 3'-Bereich unterscheiden und dadurch vollständig oder unvollständig komplementär mit der Targetsequenz in der jeweiligen Probe sind und dadurch detektiert oder nicht detektiert werden.

23. Verwendung eines Primer/Sondenystems nach einem der Ansprüche 16 bis 19 oder eines Reagenzienkits gemäß Anspruch 20 zum gleichzeitigen Nachweis von mehreren Targetsequenzen unter Verwendung unterschiedlicher Detektionssysteme, wobei die einzusetzenden targetspezifischen Primer Längenpolymorphismen enthalten und Fluoreszenzmarkierungen enthalten können.

24. Verwendung eines Primer/Sondenystems nach einem der Ansprüche 16 bis 19 oder eines Reagenzienkits gemäß Anspruch 20, wobei die Targetsequenzen durch Echtzeitfluoreszenzanalyse, durch Elektrophorese oder durch Hybridisierung ohne Amplifikation der Targetsequenz, durch Hybridisierung nach der Amplifikation der Targetsequenz oder durch Hybridisierung während der Amplifikation der Targetsequenz erfasst werden.

25. Verwendung eines Primer/Sondenystems nach einem der Ansprüche 16 bis 19 oder eines Reagenzienkits gemäß Anspruch 20, in einem Mikroarray, welches die Sonden als Fangsonden oder eine Teilmenge eines Primers als Fangprimer immobilisiert umfasst.

26. Gerätesystem zur Durchführung von Real-Time PCR-Reaktionen, das vollautomatisch computermäßig steuerbar ist, umfassend:

- Thermocycler, der einen Reaktionsbereich mit mehreren temperierbaren Aufnahmen für Reaktionsgefäße aufweist,
 - gegebenenfalls ein Immobilisierungssystem für Mikropartikel,
 - dem Reaktionsbereich zugeordnete Beleuchtungseinrichtungen (LED und/oder Laser) mit denen Anregungslicht strahlbar ist,
 - Detektoreinrichtung, die in Abhängigkeit von einer gemessenen Lichtintensität Messwerte erzeugt, mit Optikeinrichtungen,
 - ggf. eine Referenzeinrichtung, die einen Referenzwert erzeugt,
 - Auswerteeinrichtungen,
- wobei Reaktionsgefäße verwendet werden, die einen optisch transparenten Gefäßboden und/oder Gefäßdeckel mit geringer Eigenfluoreszenz umfassen, welche die fluoreszenzoptische Auswertung während der thermostatischen oder isothermischen Durchführung der Nachweisreaktion ermöglichen.

27. Gerätesystem zur simultanen Detektion von Targetsequenzen während der Amplifikation der Targetsequenzen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsgefäße einen Mikroarray darstellen, welches die Sonden als Fangsonden immobilisiert über zufällig oder systematisch in der Reaktionsumgebung verteilte Messpunkte umfasst, an die die Targetsequenzen über die immobilisierten Fangsonden hybridisieren, bildgebend fluoreszenzoptisch erfasst, dekodiert und vermessen werden und wobei die Reaktionsumgebung thermostatisch steuerbar ist, vorzugsweise mittels Peltierelementen, Luftstrom, Wasserbad, Wärmestrahlung oder Mikrowellen.

28. Gerätesystem nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsgefäße Messpunkte umfassen, wobei als Messpunkte Mikropartikel, vorzugsweise fluoreszenzkodierte, eingesetzt werden,

die Fangsonden tragen und durch Schwerkraft, magnetische Kräfte oder durch chemische oder physikalische Bindung am Gefäßboden permanent oder während der Dauer des Messvorganges immobilisiert sind.

29. Gerätesystem nach einem der Ansprüche 26 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass der Gefäßboden transparent oder nichttransparent ist und der Gefäßdeckel transparent, wobei die Messung durch den transparenten Gefäßboden von unten oder von oben und durch den nichttransparenten Gefäßboden von oben durchgeführt wird.

30. Reaktionsgefäß zur PCR mit transparentem Gefäßboden.

31. Verwendung eines Gerätesystems gemäß einem der Ansprüche 26 bis 30 zur fluoreszenzoptischen Auswertung während der thermozyklischen oder isothermischen Durchführung der Nachweisreaktion mittels Auflicht und Durchlichtfluoreszenz.

32. Immuno-PCR bei der die Multiplex-Immunreaktion unter Verwendung nicht fluoreszierenden Beads, porösen oder nichtporösen flächigen oder stäbchenförmigen Trägermaterialien erfolgt und in einem zweiten Reaktionsschritt die Analytspezifischen Amplifikationsprodukte an fluoreszenzkodierten Mikropartikeln entsprechend Anspruch 1–27 nachgewiesen werden.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

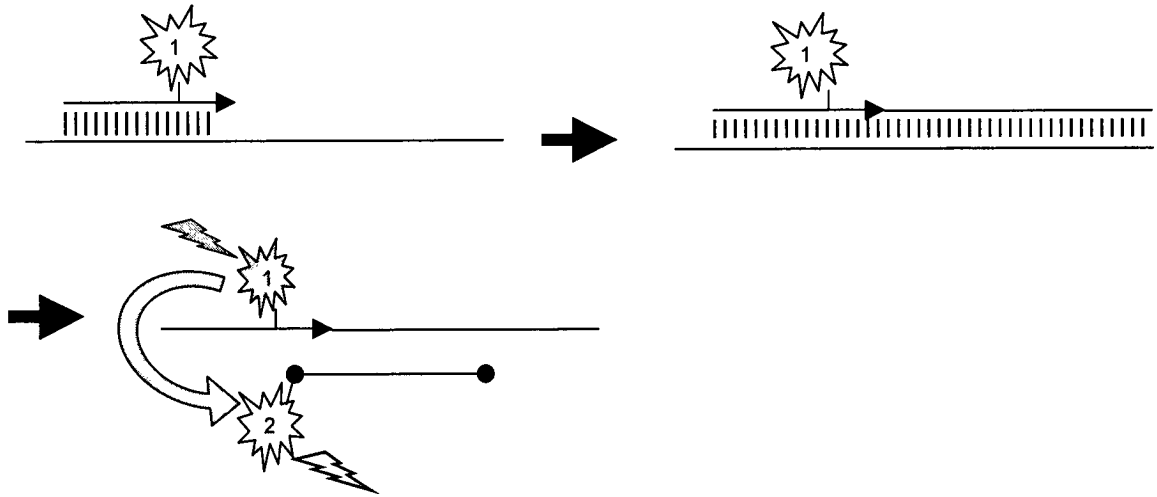


Fig. 2

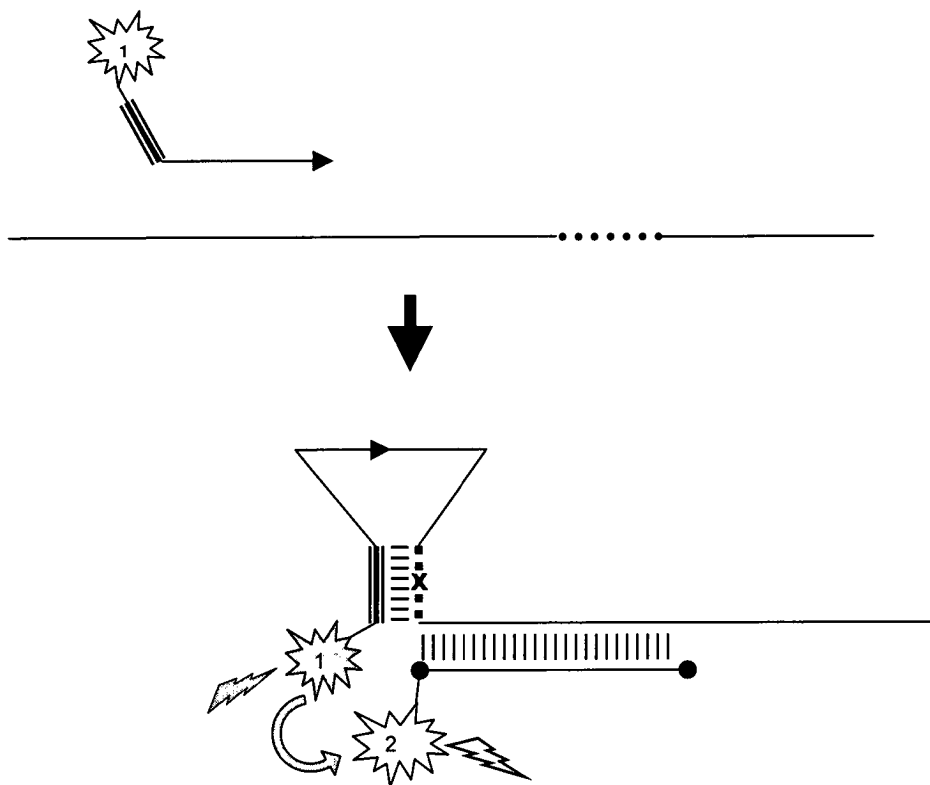
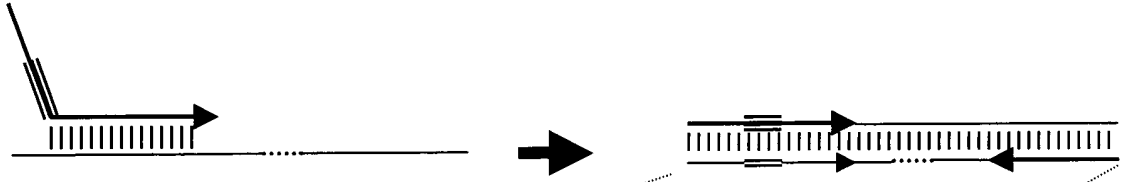
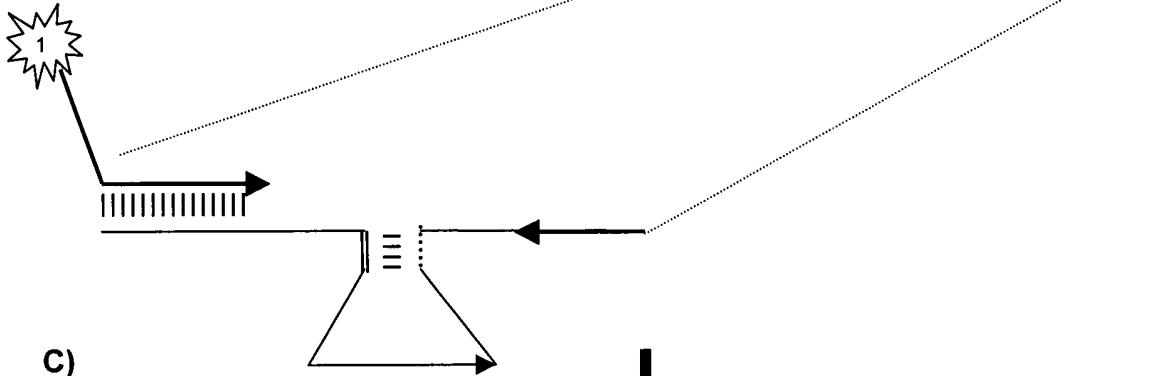


Fig. 3

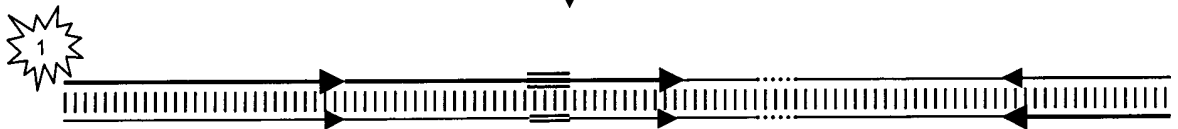
A)



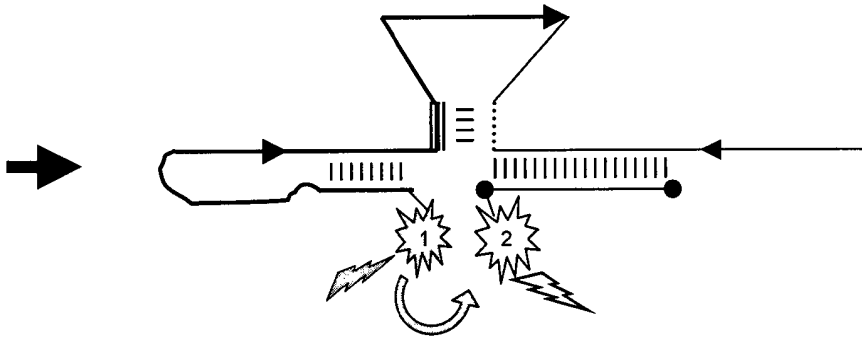
B)



C)



D)



D1)

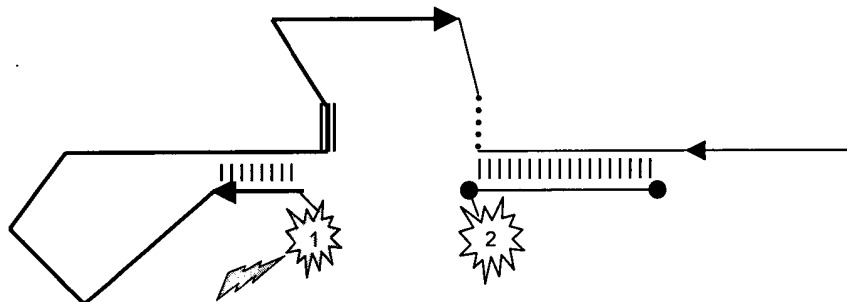


Fig. 4a:

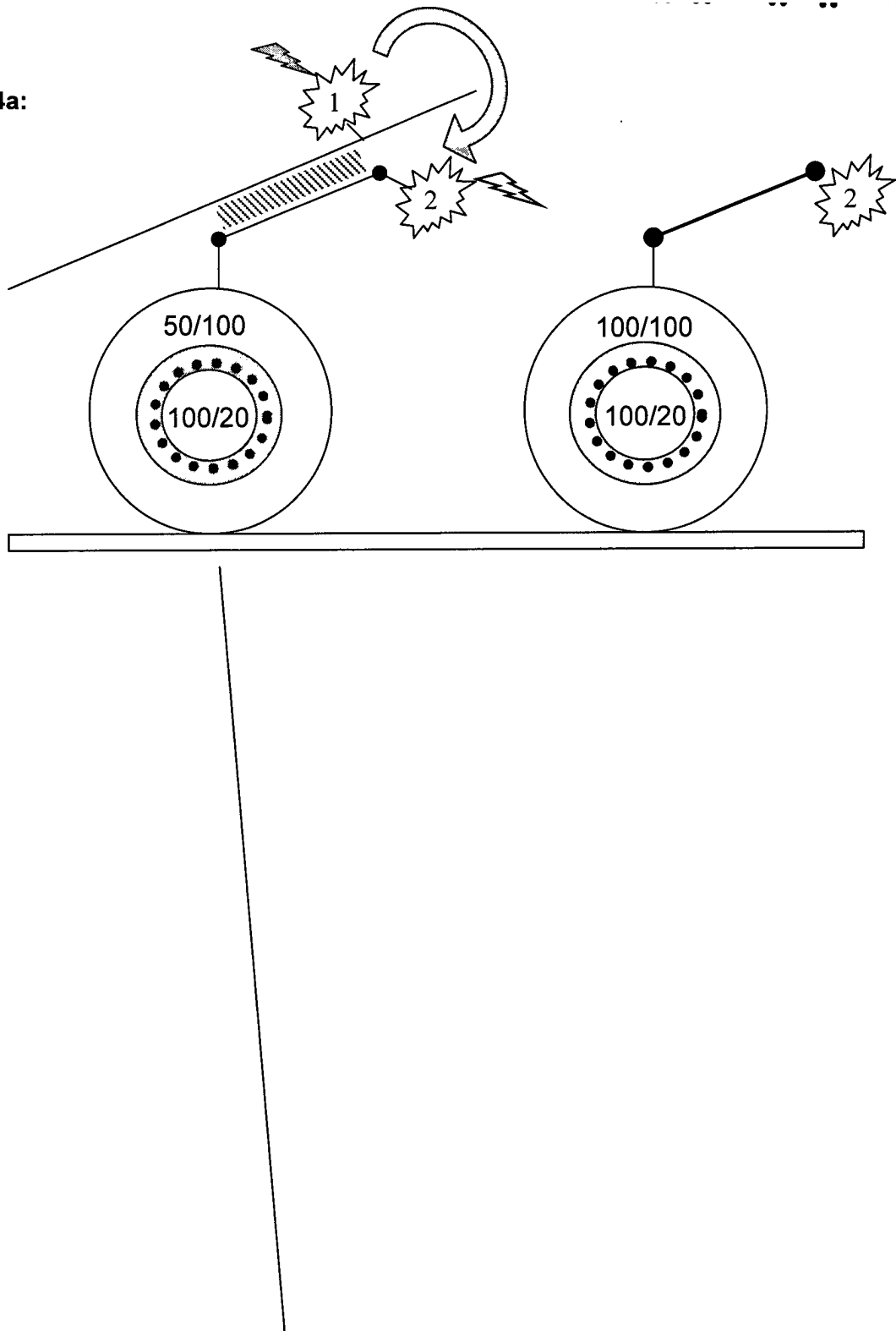


Fig. 4b

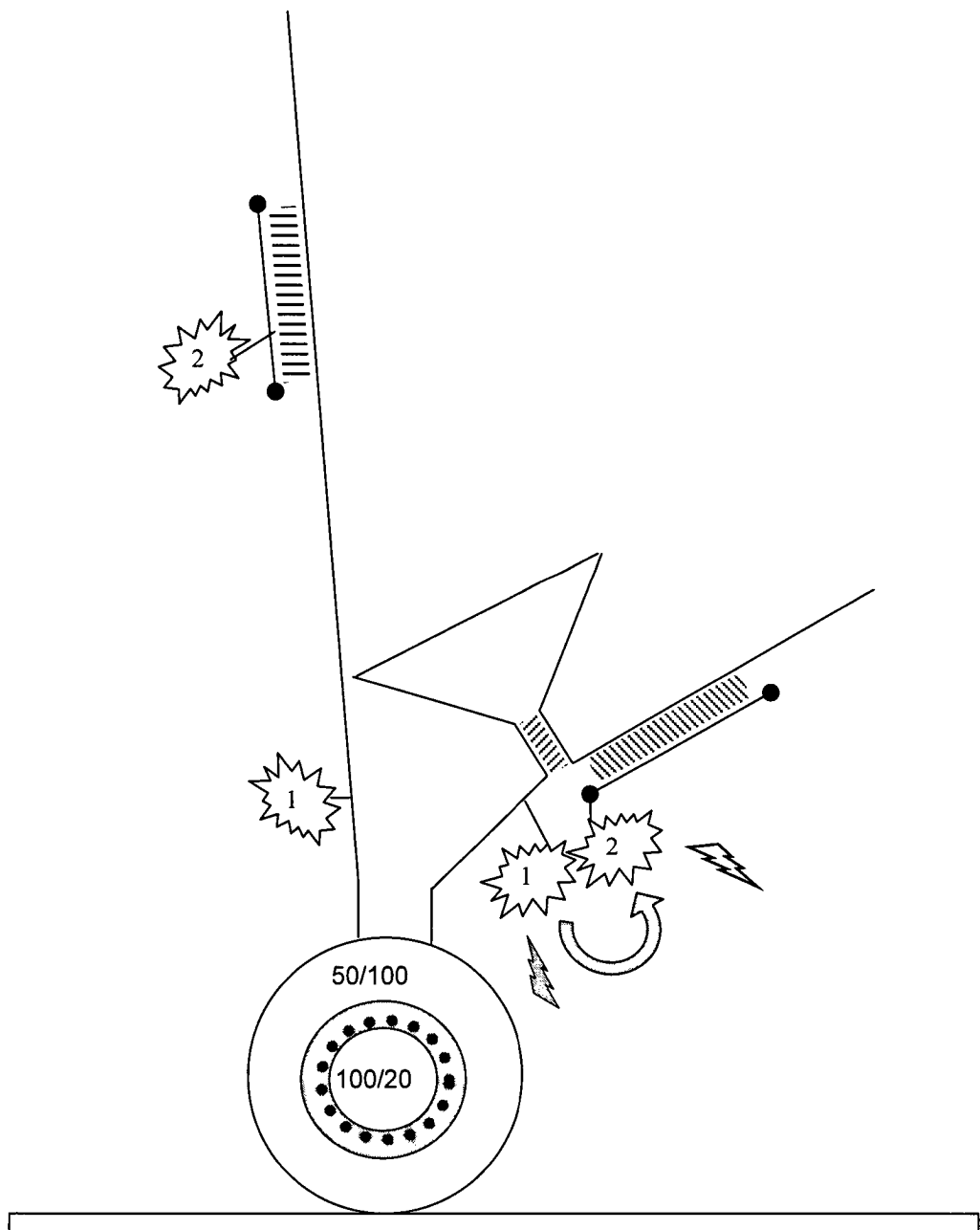


Fig. 5, A:

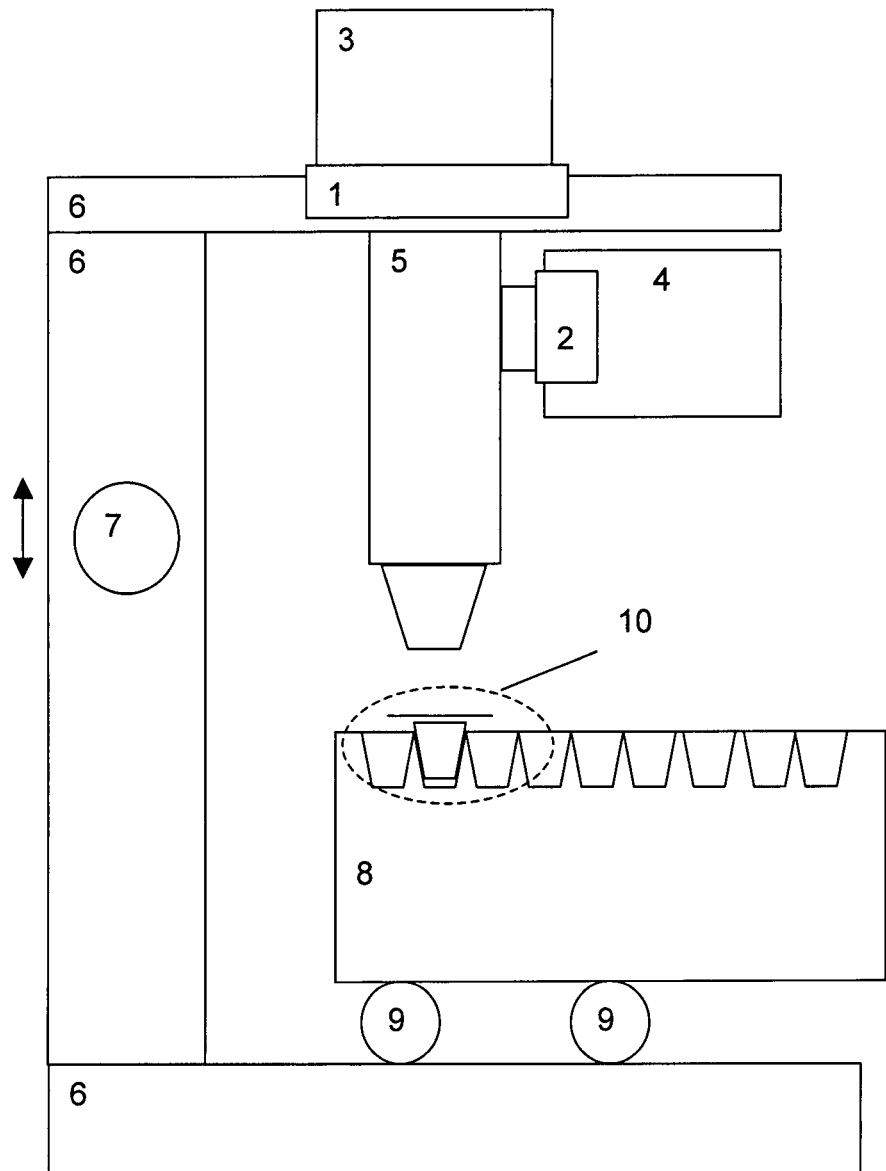


Fig. 5B: Ausschnitt aus 5A

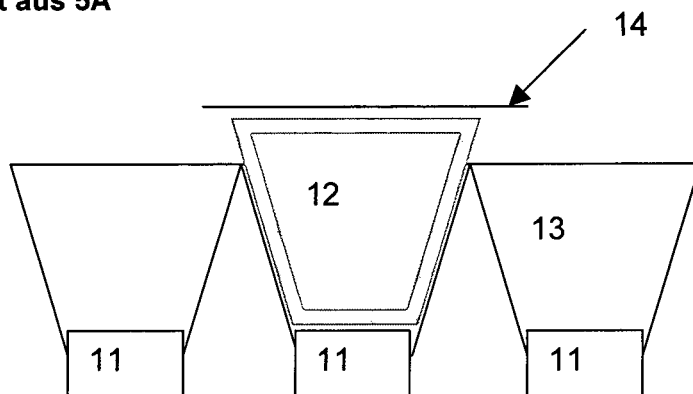


Fig. 5, C: Ausschnitt aus B

