



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 30 234 T2** 2004.08.19

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 868 529 B1**

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/68**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 30 234.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NO96/00271**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 939 373.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/019191**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.11.1996**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **29.05.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.10.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **01.10.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.08.2004**

(30) Unionspriorität:

954667 17.11.1995 NO

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Nordias AS, Bergen, NO

(72) Erfinder:

**Ogreid, Dagfinn, 5062 Bones, NO; Ulvik, Arve,
5037 Solheimsvik, NO; Koornstra, Jan Jacob, 7511
LM Enschede, NL**

(74) Vertreter:

Wenzel & Kalkoff, 22143 Hamburg

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BESTIMUNG VON KI-RAS MUTATIONEN UND DIESES LEISTENDER TEST-SATZ**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Erkennen von Mutationen in Gewebe- und Stuhlproben durch PCR-Amplifikation unter Verwendung von spezifischen Oligoprimern und eine Ausstattung, um das Verfahren durchzuführen.

[0002] Eine zunehmende Menge an Beweisen läßt darauf schließen, daß somatische Mutationen kausal für die Herbeiführung von menschlichen Krebskrankheiten bedeutend sind. Diese somatischen Mutationen können sich in den Genomen von bislang normalen Zellen ansammeln, von denen manche dann die Phänotypen zeigen können, die mit bösartigem Wachstum assoziiert sind. Solche onkogenen Mutationen können eine Anzahl von verschiedenen Arten von Veränderungen in der DNS-Struktur umfassen, einschließlich Zerstörungen, Translokationen und Änderungen von einzelnen Nukleotiden. Letztere, auch als Punktmutationen bekannt, können bei der Karzinogenese häufig insofern eingreifen, als eine Vielfalt von mutagenen Chemikalien solche Mutationen hervorrufen. Zusätzlich können solche Mutationen spontan als Ergebnis von Fehlern bei der DNS-Replikation auftreten.

[0003] Fortschritte in der rekombinanten DNS-Technologie haben zur Entdeckung von normalen zellularen Genen (Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen) geführt, die Wachstum, Entwicklung und Differenzierung steuern. Unter bestimmten Umständen wird die Regulierung dieser Gene verändert, und sie bewirken, daß normale Zellen neoplastisches Wachstumsverhalten annehmen. Es gibt bisher über 100 bekannte Protoonkogene und Suppressorgene, die abhängig von ihren funktionalen Merkmalen in verschiedene Kategorien fallen. Diese umfassen (1) Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren, (2) Boten der intrazellulären Signalübertragungswege, zum Beispiel zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus, und (3) regulierende Proteine, die Genexpression und DNS-Replikation beeinflussen.

[0004] Punktmutationen sind direkt mit der Verursachung von vielen menschlichen Tumoren in Verbindung gebracht worden. Manche Tumoren tragen Onkogene der ras-Genfamilie, die sich von ihren normalen zellulären Gegenstück-Protoonkogenen durch die Anwesenheit einer Punktmutation an einer von einer begrenzten Anzahl Stellen in diesen Genen unterscheiden.

[0005] Auf ähnliche Weise werden Punktmutationen in kritischen Bereichen der Tumorsuppressorgene, wie z. B. p53, oft in Tumorzellen erkannt. Diese Mutationen repräsentieren qualitative Änderungen im Tumorgenom, die diese Zellen von normalen Zellen unterscheiden und für eine Grundlage für die Diagnose des genetischen Ursprungs eines der Untersuchung unterzogenen Tumors sorgen. Die Identifizierung der Mutationen, die aktive Onkogene erzeugt haben, kann für wichtige diagnostische und prognostische Hinweise für die Tumorentwicklung sorgen. Zum Beispiel wurde gefunden, daß eine Anzahl Mutationen den 12. Kodon der ras-Onkogene verändert, wodurch das Ersetzen eines normalerweise vorhandenen Glycins durch ein beliebiges aus einer Anzahl alternativer Aminosäurereste bewirkt wird. Solche Aminosäuresubstitutionen erzeugen ein starkes transformierendes Allel. Daher kann das Vorhandensein einer bestimmten Nukleotidsubstitution ein starker bestimmender Faktor für das Verhalten der Tumorzelle sein (z. B. seine Wachstumsrate, Invasivität etc.). Als Ergebnis sind DNS-Proben von onkogenen Mutationen als diagnostische Reagentien in der klinischen Onkologie vielversprechend.

[0006] Unter den verschiedenen Arten von Neoplasmen ist eine Anzahl von denen, die im gastrointestinalen Trakt gefunden werden, mit onkogenen Mutationen assoziiert. Diese Assoziation ist insbesondere für Pankreas- und kolorektalen Krebs bedeutsam. Kolorektaler Krebs ist mit über 700 000 für 1996 neu erwarteten Fällen die dritthäufigste Malignität auf der Welt. Allein in den Vereinigten Staaten werden im gleichen Jahr mehr als 70 000 Menschen an koloraktem Krebs sterben. Während Patienten mit fortgeschrittener Krankheit eine sehr schlechte Prognose haben, können kolorektale Tumoren, die in einem Stadium vor der Metastase diagnostiziert werden, üblicherweise durch operative oder koloskopische Entfernung geheilt werden. Ein Verfahren zur Erkennung von operativ resektablen Tumoren könnte daher die Todesfälle aufgrund dieser Krankheit bedeutend verringern (Winawer et al., J. National Cancer Institute, 83: 243, 1991).

[0007] Ein Verfahren, um Säugetier-Nukleinsäure in Stuhl zu erkennen, ist aus WO93/20235 bekannt (Vogelstein, B. & Kinzler, K.). Dieses Verfahren umfaßt die Reinigung von Kot und zwei verschiedene Verfahren zur Amplifikation von mutierten ras-Genen. Verfahren 1 basiert auf der PCR-Amplifikation von Ki-ras und nachfolgendem Klonen der amplifizierten Ki-ras in einen bakteriellen Phagen, Anlegen einer Kultur des Phagen und Plaquehybridisieren mit Oligonukleotidproben, die für die einzelnen Mutationen in Ki-ras spezifisch sind. Verfahren 2 basiert auf PCR-Amplifikation, gefolgt von Gelelektrophorese des PCR-Produkts, Hybridisierung des Produkts zum Nylonfilter und allelspezifische Hybridisierung mit isotoopenmarkierten Testern, spezifisch für jede Mutation. Beide Verfahren sind empfindlich und spezifisch. Leider sind die Verfahren sowohl langwierig als auch arbeitsintensiv, weil alle Mutationen in Ki-ras nicht durch ein Verfahren erkannt werden. Es sind bereits mehr als 10 Mutationen von Ki-ras in Exon I beschrieben. Die obigen Verfahren verwenden Genproben, die für jede dieser Mutationen spezifisch sind. Wenn eine Stuhlprobe überprüft/gescreent werden soll und es vorher nicht bekannt ist, welche Mutation vorhanden ist, muß in jeder Probe eine große Zahl verschiedener Sonden/Tester verwendet werden, und zusätzlich muß jeder Tester isotoopenmarkiert werden.

[0008] PCR-Amplifikation von DNS aus Stuhl ist auch von Smith-Ravin et al. bekannt (Gut, 35, 81–86, (1995)). In diesem Verfahren werden 10–50 g Stuhl verwendet, und es wurde DNS extrahiert, dann wurde gereinigte DNS unter Verwendung von mitochondrischen Primern amplifiziert und unter Verwendung eines allelspezifischen Fehlpaarungs(Mismatch)verfahrens auf ras-Mutationen analysiert. Die Gesamterkennungsrate war 9 von 22, das Verfahren verwendete große Mengen Stuhl und war nicht zum Screening geeignet, weil es nötig war, spezifische mutationsallelspezifische Amplifikations(MASA)-Tester zu verwenden, um die Mutationen zu erkennen.

[0009] In einem Artikel in Oncogene, 10, 1441–45, (1995) haben Hasegawa et al. DNS von 15 Patienten von 19 amplifiziert und unter Verwendung der Standard-MASA-Methode 3 Mutationen identifiziert. Nachfolgend wurde eine besondere MASA-Methode durchgeführt, die in erkannten Mutationen in 10 Patienten resultierte. Das Problem bei diesem Verfahren ist eine geringe Erkennungsrate und, daß für jede Mutation ein spezifischer Tester verwendet werden muß. Daher ist das Verfahren nicht zur Screeninganalyse geeignet.

[0010] Suzuki, Y. et al. (Oncogene, 5 (7): 1037–43, 1990) beschreiben die Erkennung von ras-Genmutationen in menschlichen Lungenkrebsen durch Einzelstrangkonnformationspolymorphismus(SSCP)-Analyse von Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-Produkten. Dieses Verfahren gab jedoch nicht die Sequenzen der Mutationen an.

[0011] Es sind die Ziele der vorliegenden Erfindung, ein Überprüfungs-, Durchleuchtungs- bzw. Screeningverfahren zur Erkennung von Ki-ras-Mutationen in Gewebe und Stuhl mit angemessener Spezifität und Einfachheit in der Ausführung unter Verwendung kleiner Substratmengen zu schaffen.

[0012] Diese Ziele werden durch die vorliegende Erfindung erreicht, die durch die beigefügten Ansprüche gekennzeichnet ist.

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Überprüfungs- bzw. Screeningverfahren zur Erkennung von Ki-ras-Mutationen in kleinen Gewebe- oder Stuhlproben, in denen spezifische Primer gemäß der Erfindung verwendet werden, um ein PCR-Produkt von 221 Basenpaaren zu erzeugen. Dieses Produkt zeigt einzigartige Einzelstrangkonnformationspolymorphismus(SSCP)-Muster, in denen unter Verwendung von SSCP-Analysen, die auf 20%ig homogenen Polyacrylamidgelen (Phast-Gele, Pharmacia) durchgeführt werden, jede Mutation erkannt und identifiziert wird.

[0014] Um die Menge des PCR-Produkts zu erhöhen, ist es möglich, nachfolgend eine sogenannte semi-nested PCR durchzuführen, in der im 5'-Ende ein zusätzliches Oligonukleotid verwendet wurde, während der spezifische Oligoprimmer des ersten Schritts im 3'-Ende verwendet wurde. Im nächsten PCR-Zyklus wurden beide Oligoprimmer aus dem ersten Schritt verwendet, was im PCR-Produkt mit 221 Basenpaaren resultierte. In diesem Produkt wurden die Mutationen wie oben mit Phast-Gel-SSCP erkannt.

[0015] Eine weitere Erhöhung der Empfindlichkeit gemäß der Erfindung wird in einem dritten Schritt unter Verwendung von allelspezifischer Amplifikation oder mutationsspezifischer Primerextension erreicht. Dieser Schritt beinhaltet die Verwendung von Testern, die eine Fehlpaarung (Mismatch) gegen das Wildtypgen auf der letzten Base im 3'-Ende und eine zusätzliche Fehlpaarung auf Base Nr. 2 oder 3 vom 3'-Ende enthalten. Überraschenderweise erhöhte diese Strategie die Empfindlichkeit des Verfahrens. Daher wurden unter Verwendung des Verfahrens gemäß der Erfindung Ki-ras-Mutationen in 8 von 12 Patienten erkannt, indem Doppel-PCR verwendet wurde, und in einer weiteren Studie wurden durch den ersten Schritt 6 Patienten mit Mutationen in Ki-ras von 7 Patienten erkannt, während die 7 mit Mutationen durch Kombination von Schritt 1 und 2 erkannt wurden. Daher betrug die Erkennungsrate 90% mit Einzel-PCR und 100% mit kombinierter PCR.

[0016] Im Folgenden wird die Erfindung gemeinsam mit Beispielen und Figuren detailliert offenbart.

[0017] **Fig. 1** zeigt SSCP-Analysen von Ki-ras Exon 1. Bahn 1: Wildtyp (die Wildtypsequenz von Kodons 12 und 13 ist GGT bzw. GGC). Bahn 2 bis 7: Für Wildtyp und die Kodon-12-Mutationen heterozygote Proben: 2: AGT, 3: CGT, 4: TGT, 5: GAT, 6: GCT und 7: GTT. Bahn 8: Eine für Wildtyp heterozygote Probe und die Kodon-13-Mutation GAC. Bahn 9: Eine für Wildtyp heterozygote Probe und eine seltene Doppelmutation von Kodon 12: TTT.

[0018] **Fig. 2** zeigt die PCR-SSCP-Analyse von Exon I des Ki-ras-Gens aus chirurgischen Proben. Außer der Probe in Bahn 1 waren alle Proben heterozygot. Wildtypkodon 12 ist GGT und Kodon 13 GGC. Die Elektrophorese wurde auf PhastGel homogen 20 ausgeführt.

[0019] Kodon-12-Mutationen sind in den folgenden Bahnen gezeigt: 1: AGT (Wildtypallel fehlt); Bahn 2: CGT, Bahn 3: TGT; Bahn 4: GAT; Bahn 5: GCT; Bahn 6: GTT; Bahn 8: TTT. Bahn 7 zeigt eine Kodon-13-Mutation: GAC.

[0020] **Fig. 3** zeigt Häufigkeiten der in den Tumoren gefundenen verschiedenen Mutationen.

[0021] **Fig. 4** zeigt die Sequenzanalyse von Adenom 1 von Patient C-05. Die DNS-Sequenzanalyse von Exon 1 von Ki-ras zeigt zwei G-zu-T-Übergänge in Kodon 12 (Pfeil).

[0022] **Fig. 5** zeigt die Gelelektrophorese von PCR-Produkten aus ASA-Analyse (diskriminierende PCR) von aus Kot purifizierter DNS. Die Signale zeigten positive GTT-Mutation. 1 und 2: Patient CO₄, 3 und 4: Patient C-23, 5 und 6: positive Kontrolle, 7: positive Kontrolle, 1 : 100 verdünnt, 8 und 9: negative Kontrolle (Kot von Patienten mit einer anderen als der untersuchten Mutation), 12: negative Kontrolle (keine DNS zugefügt).

[0023] Von besonderer Bedeutung ist bei der vorliegenden Erfindung die Erkennung des mutanten Ki-ras-Onkogens.

[0024] Um gemäß der Erfindung Stuhlproben zu analysieren, ist es notwendig, die in der Probe vorhandene Säugetiernukleinsäure abzutrennen. Mit der Präparation von Säugetier-Nukleinsäure aus Stuhl sind zwei Hauptprobleme verbunden. Zum einen muß die Säugetier-Nukleinsäure aus den Säugetierzellen freigesetzt und von bakteriellen Zellen getrennt werden. Dieser Schritt wird weiterhin dadurch kompliziert, daß es wünschenswert ist, die Freisetzung von Nukleinsäure aus den bakteriellen Zellen zu vermeiden, da es in der Stuhlprobe einen solch riesigen Überschuß von bakterieller Nukleinsäure im Vergleich mit eukaryotischer Nukleinsäure gibt. Zum zweiten kann die Säugetiernukleinsäure, wenn sie einmal freigesetzt ist, von der relativ hohen Konzentration an Nukleasen geschützt werden, die im Stuhl vorhanden sind und die die freigesetzte Säugetier-Nukleinsäure abbauen und dadurch ihre Analyse verhindern könnten. In der vorliegenden Erfindung wurde gefunden, daß diese strengen Kriterien erfüllt werden können, indem der Stuhl mit einem kommerziell erhältlichen Lysepuffer inkubiert wird, der bei einem pH von mindestens etwa 8,0 eine hohe Pufferkonzentration von mindestens etwa 500 mM enthaltend einen Chelatbildner wie z. B. EDTA und eine relativ niedrige Salzkonzentration, vorzugsweise weniger als 10 mM, enthält.

[0025] Der Stuhl-Lysepuffer minimiert durch den pH und die chelatbildenden Eigenschaften den Nukleinabbau, löst eukaryotische, aber nicht bakterielle Zellen auf und ist für die weitere Verarbeitung geeignet, um die eukaryotische Nukleinsäure zu reinigen und/oder aufzukonzentrieren. Nach der Behandlung mit Lysepuffer wird die Probe verarbeitet (z. B. durch Zentrifugation), um Bakterien und andere ungewünschte Rückstände zu entfernen. Die nichtpartikuläre Fraktion des Lysats wird dann mit einer Proteinase (wie z. B. 0,5 µg/ml Proteinase K) in SDS (1%) inkubiert, um Nukleasen und andere Proteine abzubauen. Die Nukleinsäure in der Probe kann durch chemische Mittel weiter abgetrennt werden, wie z. B. Binden der negativ geladenen Nukleinsäure an eisenausgetauschte Säulen, und danach kann Eluieren von gereinigter/konzentrierter und/oder Konzentrieren der DNS durch Ausfällen mit Ethanol durchgeführt werden.

[0026] Zusätzlich wurde gefunden, daß Stuhl auch Inhibitoren enthält, die vorzugsweise entfernt werden, wenn die im Stuhl vorhandene Mutationsnukleotidsequenz amplifiziert werden soll, wie z. B. durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Einer dieser Inhibitoren stört die DNS-Amplifikation durch Taq-Polymerase. Dieser Inhibitor kann entfernt werden, indem die Stuhlnukleinsäure in der Gegenwart von chaotropen Salzen, wie z. B. 6,0 M Natriumjodid oder Natriumperchlorat, an eine stationäre Matrix gebunden wird. Überraschenderweise wurde gefunden, daß Glas zu diesem Zweck die bevorzugte Matrix ist. Besonders bevorzugte kommerzielle Typen von Glas sind Prep-A-gene™ (Bio-Rad) und Spin-Bind™ (FMC).

[0027] Der andere im Stuhl vorhandene Inhibitor verhindert das Binden von Nukleinsäure an Glas. Es wurde gefunden, daß dieser zweite Inhibitor entfernt werden kann, indem der Inhibitor in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen wie z. B. mindestens etwa 1,0 M an ein modifiziertes Ionenaustauschharz (z. B. Qiagen) gebunden wird. Fachleute können sich verschiedene Arten vorstellen, auf die der oben beschriebene Prozeß zum Konzentrieren und/oder Reinigen von Säugetier-DNS aus Stuhlproben modifiziert werden kann, wenn man einmal erkannt hat, daß Säugetier-Nukleinsäure selektiv aus Stuhlproben erhalten werden kann. Wahlweise können Fachleute nun, da bekannt ist, daß solche Verfahren für Stuhlproben praktikabel sind, ohne übermäßiges Experimentieren alternative Reagenzien und Bedingungen ermitteln, die den hier beschriebenen funktional äquivalent sind. Solche Modifikationen und funktionale Äquivalente werden durch die vorliegende Erfindung erfaßt.

[0028] Die hier erwähnten Aminosäuren können gemäß den folgenden Dreibuchstaben- oder Einbuchstabenabkürzungen identifiziert werden:

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

[0029] Wenn es gewünscht ist, die Mutationsnukleotidsequenz vor der Erkennung zu amplifizieren, kann dies unter Verwendung von Oligonukleotid(en) erreicht werden, das/die Primer für die Amplifikation ist/sind. Diese einzigartigen Oligonukleotidprimer basieren auf der Identifikation der flankierenden Bereiche, die an die Mutationsnukleotidsequenz angrenzen. Im Fall von Ki-ras umfassen diese Oligonukleotidprimer zum Beispiel Sequenzen, die in der Lage sind, mit dem flankierenden Nukleotidsequenz 5'-GGTGGAGTATTTGATAGTG-TATTAACCTTATGT-3' (Seq. Id. Nr. 1) und/oder 5'-AATGGTCCTGCACCAAGTAAT-3' (Seq. Id. Nr. 2) und dazu komplementären Sequenzen zu hybridisieren.

[0030] Die Primer, die gemäß dem Verfahren der Erfindung verwendet werden können, schließen Oligonukleotide von ausreichender Länge und angemessener Sequenz sein, um für das Initiieren der Polymerisation einer bedeutenden Anzahl von Nukleinsäuremolekülen, die die Zielnukleinsäure enthalten, zu sorgen. Auf diese Weise ist es möglich, die spezifische Zielnukleinsäuresequenz zu amplifizieren, die die interessierende Nukleinsäure enthält. Insbesondere bezeichnet der Ausdruck "Primer", wie er hier verwendet wird, eine Sequenz, die zwei oder mehrere Desoxyribonukleotide oder Ribonukleotide enthält, vorzugsweise mindestens acht, wobei diese Sequenz in der Lage ist, die Synthese eines Primerextensionsprodukt zu initiieren, das im wesentlichen komplementär zu einem Zielnukleinsäurestrang ist. Der Oligonukleotidprimer enthält typischerweise 15–22 oder mehr Nukleotide, obwohl er weniger Nukleotide enthalten kann.

[0031] Experimentelle Bedingungen, die der Synthese zuträglich sind, umfassen die Anwesenheit von Nukleotidtriphosphaten und eines Agens zur Polymerisation, wie z. B. DNS-Polymerase, sowie geeignete Temperatur und pH. Der Primer ist vorzugsweise einzelsträngig. Wenn er doppelsträngig ist, wird der Primer zunächst behandelt, um seine Stränge zu trennen, bevor er zum Präparieren von Extensionsprodukten verwendet wird. Der Primer ist bevorzugt ein Oligodesoxyribonukleotid. Der Primer muß ausreichend lang sein, um die Synthese von Extensionsprodukten in Anwesenheit des Induzieragens zur Polymerisation zu primen. Die genaue Primärlänge hängt von vielen Faktoren ab, einschließlich Temperatur, Puffer und Nukleotidzusammensetzung.

[0032] Gemäß dem Verfahren der Erfindung verwendete Primer sind so ausgestaltet, daß sie "im wesentlichen" komplementär zu jedem Strang der zu amplifizierenden Mutationsnukleotidsequenz sind. Im wesentlichen komplementär bedeutet, daß die Primer ausreichend komplementär sein müssen, um mit ihren jeweiligen Strängen unter Konditionen zu hybridisieren, die es gestatten, daß das Agens zur Polymerisation funktioniert. Mit anderen Worten sollten die Primer ausreichende Komplementarität mit den flankierenden Sequenzen aufweisen, um damit zu hybridisieren und die Amplifikation der Mutationsnukleotidsequenz zu erlauben. Vorzugsweise weist das Ende des Primers, das extendiert wird, mit dem komplementären flankierenden Strang eine perfekt basengepaarte Komplementarität auf.

[0033] Gemäß der Erfindung verwendete Oligonukleotidprimer werden in jeglichem Amplifikationsprozeß eingesetzt, der erhöhte Mengen der Zielnukleinsäure erzeugt. Typischerweise ist ein Primer komplementär zum negativen (–) Strang der Mutationsnukleotidsequenz, und der andere ist komplementär zum positiven (+)

Strang. Erhitzen der Primer zur denaturierten Nukleinsäure, gefolgt von Extension mit einem Enzym, wie z. B. der thermostabilen oder Taq-DNS-Polymerase und Nukleotiden oder Ligasen, resultiert in frisch synthetisierten + und – Strängen, die die Zielnukleinsäure enthalten. Weil diese frisch synthetisierten Nukleinsäuren auch Template sind, resultieren wiederholte Zyklen der Denaturierung, Primererhitzung und Extension in exponentiellen Produkten der vom Primer definierten Region (d. h. der Zielmutationsnukleotidsequenz). Das Produkt der Amplifikationsreaktion ist ein diskretes Nukleinsäuredoppel mit Enden, die den Enden der spezifischen eingesetzten Primern entsprechen. Fachleute werden andere Amplifikationsmethodiken kennen, die auch benutzt werden können, um die Kopienzahl der Zielnukleinsäure zu erhöhen.

[0034] Eine nützliche Art, die Zahl der Kopien des beschriebenen PCR-Produkts zu erhöhen, ist, das semi-nested PCR genannte Verfahren einzusetzen. Unter Verwendung dieses Ansatzes wird einer der ursprünglichen Primer als neuer Primer verwendet, z. B. markiert er die 3'-Region des ersten PCR-Produkts. Ein weiterer stromaufwärtiger Primer, z. B. 5'-AACTTATGTGTGACATGTTCTAAT-3' (Seq. Id. Nr. 3) kann dann in der entgegengesetzten Markierungsregion verwendet werden, um ein neues, kleineres PCR-Produkt zu erzeugen, das die positive mutierte Region innerhalb des frisch gebildeten PCR-Produkts enthält.

[0035] Die Oligonukleotidprimer zur Verwendung in der Erfindung können präpariert werden, indem ein beliebiges geeignetes Verfahren verwendet wird, wie z. B. herkömmliche Phosphotriester- und Phosphodiester-Verfahren oder automatisierte Ausführungsformen davon. In einer solchen automatisierten Ausführungsform werden Diethylphosphoramidite als Ausgangsmaterialien verwendet und können, wie durch Beaucage et al. beschrieben, synthetisiert werden (Tetrahedron Letters, 22: 1859–1862, 1981). Ein Verfahren zum Synthetisieren von Oligonukleotiden auf einem modifizierten festen Träger ist in US-Patent Nr. 4,458,066 beschrieben. Ein Amplifikationsverfahren, das gemäß dieser Erfindung verwendet werden kann, ist die in US-Patenten Nr. 4,683,202 und 4,683,195 beschriebene Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

[0036] Jegliche Stuhlproben-nukleinsäure in gereinigter oder nichtgereinigter Form kann als Startnukleinsäure oder -säuren verwendet werden, vorausgesetzt, daß sie die spezifische, die Zielnukleinsäure enthaltende Nukleinsäuresequenz enthält oder vermutet wird, daß sie sie enthält. Daher kann das Verfahren zum Beispiel DNS oder RNS, einschließlich Boten-RNS, einsetzen, wobei DNS oder RNS einzelsträngig oder doppelsträngig sein können. Falls RNS als Templat verwendet werden soll, würde man Enzyme und/oder Konditionen benutzen, die optimal zur reversen Transkription des Templates auf DNS sind. Zusätzlich kann ein DNS-RNS-Hybrid benutzt werden, das von jedem einen Strang enthält. Es kann auch eine Mischung aus Nukleinsäuren eingesetzt werden, oder die hier in einer vorherigen Amplifikationsreaktion erzeugten Nukleinsäuren können unter Verwendung der gleichen oder anderer Primer so verwendet werden. Die zu amplifizierende Mutationsnukleotidsequenz kann eine Fraktion eines größeren Moleküls sein oder kann anfänglich als diskretes Molekül vorliegen, so daß die spezifische Sequenz die gesamte Nukleinsäure darstellt. Es ist nicht nötig, daß die zu amplifizierende Sequenz anfänglich in reiner Form vorliegt; sie kann auch eine kleine Fraktion einer komplexen Mischung sein, wie z. B. in der gesamten menschlichen DNS enthalten.

[0037] Wenn die Zielmutationsnukleotidsequenz der Probe zwei Stränge enthält, ist es notwendig, die Stränge der Nukleinsäure zu trennen, bevor sie als Templat verwendet werden kann. Strangtrennung kann entweder als separater Schritt oder gleichzeitig mit der Synthese der Primerextensionsprodukte bewirkt werden. Diese Strangtrennung kann unter Verwendung verschiedener geeigneter Denaturierungsbedingungen erreicht werden, einschließlich physikalischer, chemischer oder enzymatischer Mittel; das Wort "Denaturieren" umfaßt alle solche Mittel. Ein physikalisches Verfahren zum Trennen von Nukleinsäuresträngen umfaßt das Erhitzen der Nukleinsäure, bis sie denaturiert ist. Eine typische Wärmedenaturierung kann Temperaturen, die zwischen etwa 80° und 105°C liegen, für Zeiten, die zwischen etwa 1 und 10 Minuten liegen, umfassen. Strangtrennung kann auch durch ein Enzym aus der Klasse der als Helikase bekannten Enzyme oder durch das Enzym RecA bewirkt werden, das Helicaseaktivität aufweist und von dem bekannt ist, daß es in Anwesenheit von riboATP DNS denaturiert. Die zur Strangtrennung von Nukleinsäuren mit Helicasen geeigneten Reaktionsbedingungen sind von Kuhn Hoffmann-Berling beschrieben (CSH-Quantitative Biology, 43: 63, 1978), und über Methoden zur Verwendung von RecA wird bei C. Radding ein Überblick gegeben (Ann. Rev. Genetics, 16: 405–437, 1982).

[0038] Wenn die die Zielnukleinsäure enthaltende und zu amplifizierende Nukleinsäure einzelsträngig ist, wird ihr Komplementäres synthetisiert, indem ein oder zwei Oligonukleotidprimer zugefügt werden. Bei Einsatz eines einzelnen Primers wird ein Primerextensionsprodukt in Anwesenheit des Primers, eines Agens zur Polymerisation und der vier unten beschriebenen Nukleosidtriphosphate synthetisiert. Das Produkt ist zur einzelsträngigen Nukleinsäure komplementär und hybridisiert mit einer einzelsträngigen Nukleinsäure, um ein Doppel mit Strängen von ungleicher Länge zu bilden, das dann in einzelne Stränge getrennt werden kann, um zwei einzelne getrennte komplementäre Stränge zu erzeugen. Wahlweise können zwei Primer der einzelsträngigen Nukleinsäure hinzugefügt und die Reaktion wie beschrieben ausgeführt werden.

[0039] Wenn komplementäre Stränge von Nukleinsäure oder -säuren getrennt werden, und zwar ungeachtet dessen, ob die Nukleinsäure anfänglich doppel- oder einzelsträngig war, sind die getrennten Stränge zur Verwendung als Templat für die Synthese von zusätzlichen Nukleinsäuresträngen bereit. Diese Synthese wird un-

ter Bedingungen durchgeführt, die erlauben, daß die Hybridisierung von Primern zu Templaten stattfindet. Allgemein findet die Synthese in einer gepufferten wäßrigen Lösung statt, bevorzugt bei einem pH von 7–9, am meisten bevorzugt von B. Bevorzugt wird ein molarer Überschoß (für genomische Nukleinsäure üblicherweise 10^8 : 1 Primer : Templat) der beiden Oligonukleotidprimer dem Puffer hinzugefügt, der die getrennten Templatstränge enthält. Es versteht sich jedoch, daß die Menge des komplementären Strangs eventuell nicht bekannt ist, wenn der Prozeß der Erfindung für diagnostische Anwendungen verwendet wird, so daß die Primermenge relativ zur Menge des komplementären Strangs nicht mit Sicherheit bestimmt werden kann. Als praktische Maßnahme wird jedoch die zugefügte Primermenge allgemein in molarem Überschoß gegenüber der Menge des komplementären Strangs (Templat) vorliegen, wenn die zu amplifizierende Sequenz in einer Mischung von komplizierten langkettigen Nukleinsäuresträngen enthalten ist. Ein großer molarer Überschoß ist bevorzugt, um die Effizienz des Prozesses zu verbessern.

[0040] In manchen Amplifikationsausführungsformen werden die Substrate, zum Beispiel die Desoxyribonukleotid-Triphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP entweder getrennt oder gemeinsam mit den Primern in angemessener Menge der Synthesemischung hinzugefügt, und die resultierende Lösung wird für etwa 10 Minuten, bevorzugt zwischen 1 und 4 Minuten, auf etwa 90°–100°C erwärmt. Nach dieser Erwärmungsperiode läßt man die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen, was für die Primerhybridisierung bevorzugt ist. Der abgekühlten Mischung wird ein geeignetes Agens zum Bewirken der Primerextensionsreaktion hinzugefügt (hier "Agens zur Polymerisation" genannt), und man läßt die Reaktion unter im Stand der Technik bekannten Bedingungen stattfinden. Das Agens zur Polymerisation kann auch zusammen mit den anderen Reagentien zugefügt werden, wenn es wärmostabil ist. Diese Synthese-(oder Amplifikations-)Reaktion kann bei Raumtemperatur bis zu einer Temperatur stattfinden, oberhalb deren das Agens zur Polymerisation nicht mehr funktioniert. Wenn zum Beispiel DNS-Polymerase als das Agens verwendet wird, ist die Temperatur allgemein nicht höher als etwa 40°C. Am zweckmäßigsten findet die Reaktion bei Raumtemperatur statt.

[0041] Das Agens zur Polymerisation kann jegliche Verbindung oder jegliches System sein, der bzw. das funktioniert, um die Synthese von Primerextensionsprodukten, einschließlich Enzymen, zu erreichen. Geeignete Enzyme zu diesem Zweck umfassen zum Beispiel E.coli-DNS-Polymerase I, Taq-Polymerase, Klenow-Fragment der E.coli-Polymerase I, T4-DNS-Polymerase, andere verfügbare DNS-Polymerasen, Polymerase-Mutein-Reverstranskriptase, Ligase und andere Enzyme, einschließlich wärmostabiler Enzyme (d. h. solcher Enzyme, die die Primerextension ausführen, nachdem sie Temperaturen ausgesetzt wurden, die ausreichend erhöht sind, um die Denaturierung zu bewirken). Geeignete Enzyme erleichtern die Kombination der Nukleotide in geeigneter Weise, um die Primerextensionsprodukte zu bilden, die zu jedem Mutationsnukleotidstrang komplementär sind. Allgemein wird die Synthese am 3'-Ende jedes Primers ausgelöst und schreitet in der 5'-Richtung entlang dem Templatstrang fort, bis die Synthese endet, wobei Moleküle verschiedener Längen erzeugt werden. Es kann jedoch Agentien zur Polymerisation geben, die die Synthese am 5'-Ende auslösen und in der anderen Richtung fortschreiten, wobei der gleiche Prozeß wie oben beschrieben verwendet wird. Auf jeden Fall ist das Verfahren der Erfindung nicht auf die hier beschriebenen Ausführungsformen der Amplifikation beschränkt.

[0042] Der frisch synthetisierte Mutationsnukleotidstrang und sein komplementärer Nukleinsäurestrang bilden unter den oben beschriebenen Hybridisierungsbedingungen ein doppelsträngiges Molekül, und dieses Hybrid wird in nachfolgenden Schritten des Prozesses verwendet. Im nächsten Schritt wird das frisch synthetisierte doppelsträngige Molekül unter Verwendung beliebiger oben beschriebener Verfahren Denaturierungsbedingungen ausgesetzt, um einzelsträngige Moleküle bereitzustellen.

[0043] Der obige Prozeß wird mit den einzelsträngigen Molekülen wiederholt. Ein zusätzliches Agens zur Polymerisation, Nukleotide und Primer können, wenn erforderlich, hinzugefügt werden, damit die Reaktion unter den oben vorgeschriebenen Bedingungen abläuft. Die Synthese wird wieder an einem Ende jedes Oligonukleotidprimers ausgelöst und schreitet entlang der Einzelstränge des Templates voran, um zusätzliche Nukleinsäure zu erzeugen. Nach diesem Schritt besteht die Hälfte des Extensionsprodukts aus der spezifischen Nukleinsäuresequenz, die durch die beiden Primer begrenzt ist.

[0044] Die Schritte des Denaturierungs und der Extensionsproduktsynthese können so oft wie nötig wiederholt werden, um die Zielmutationsnukleotidsequenz auf das zur Erkennung notwendige Ausmaß zu amplifizieren. Die Menge der erzeugten Mutationsnukleotidsequenz häuft sich in exponentieller Weise an.

[0045] Das amplifizierte Produkt kann erkannt und identifiziert werden, indem es durch Einzelstrangkonnformationspolymorphismus unter Verwendung des Pharmacia-Phast-Systems zur automatischen temperaturgesteuerten Elektrophorese und Silberfärbung analysiert wird. In einem solchen Prozeß wird zum Beispiel eine kleine Probe amplifizierter DNS der Denaturierung unterzogen und danach auf einem vorgegossenen Phast-Gel, zum Beispiel auf den von Pharmacia gelieferten, elektrophoresiert. Auf einem Gel wie diesem wandert ein einzelsträngiges DNS-Fragment abhängig von seiner Konformation. Die Konformation hängt von der Primersequenz der Nukleotide ab, und Sequenzen, die um ein oder mehrere Nukleotide variieren, enthalten eine spezifische einzigartige Konformation.

[0046] In einer Ausführungsform der Erfindung werden Nukleotidfragmente aus Stuhl- nach Amplifikation

durch Gelelektrophorese auf Pharmacia-Phast-Gelen in Fragmente von unterschiedlicher Konformation getrennt. Nach der Elektrophorese werden die Gele einer Silber enthaltenden Mischung ausgesetzt, um die verschiedenen Nukleotidfragmente zu färben, wodurch die verschiedenen Arten der Mutationsnukleotidfragmente erkannt und identifiziert werden.

Beispiel 1

Erkennung und Identifikation von Mutationen von Ki-ras Exon 1 durch Minigel-Einzelstrangkonnformationspolymorphismus

[0047] Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (SSCP) ist ein zweckmäßiges Verfahren zum Erkennung von Mutationen (40). Das Verfahren beruht auf der Tatsache, daß die Konformation, die von einem Einzelstrang-DNS-Fragment unter nicht-denaturierenden Bedingungen eingenommen wird, und damit seine Mobilität in der Elektrophorese von seiner genauen Basensequenz abhängt. Bei SSCP muß die Mutation normalerweise noch identifiziert werden, nachdem sie erkannt wurde. Im Fall des Onkogens Ki-ras gibt es jedoch eine begrenzte Anzahl gemeldeter Mutationen, deren Mehrheit auf Kodons 12 und 13 des Exon 1 begrenzt sind. Unter der Voraussetzung, daß jede Mutationsvariante ein charakteristisches SSCP-Muster aufweist, gibt es daher eine Basis für die Identifizierung. Dies wurde in einigen früheren Artikeln über Ki-ras angedeutet (18, 41, 42).

[0048] Diese Studie beschreibt ein SSCP-Protokoll, in dem alle üblicherweise gemeldeten Mutationsvarianten von Ki-ras Exon 1 erkennbar und identifizierbar sind. Darüberhinaus wurden auch zwei weitere Varianten erkannt, die unseres Wissens bisher in chirurgischem Biopsiematerial nicht gemeldet worden sind. Das Protokoll benutzt vorgegossene Polyacrylamidgele und ein automatisches Elektrophorese- und Färbungsinstrument (Phast System, Pharmacia, Schweden). Es ist dabei keine Isotopenmarkierung von DNS beteiligt.

[0049] Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurden auf einem Perkin Elmer TC 1 Thermocycler unter Verwendung eines Zweischnittprofils ausgeführt: 94°C, 15 Sek., 58°C, 30 Sek., abhängig von der Templatmenge 30–40 Zyklen lang. Diesem Profil gingen 2 Min. bei 94°C voran, und es wurde nach 5 Min. bei 72°C beendet. Die verwendeten Primer waren: 5'-AACCTTATGTGTGACATGTTCTAAT-3' (Seq. Id. Nr. 5) (stromaufwärts) und 5'-AATGGTCCTGCACCAAGTAAT-3' (Seq. Id. Nr. 2) (stromabwärts). Die PCR-Reaktionsmischung bestand aus 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% (Gew./Vol.) Gelatine, 0,1% Triton, 125 µM von jeder dNTP, 0,2 µM von jedem Primer und 0,2 µM Taq-Polymerase (Supertag, HT Biotechnology Ltd., UK) in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Die Produktgröße war 221 bp.

[0050] SSCP-Protokoll: 4 µl des PCR-Produkts wurden durch Mischen mit einem gleichen Volumen des ionisierten Formamids und kurzes Erwärmen auf 80°C denaturiert. Anschließendes schnelles Abkühlen auf Eis war nicht notwendig, um die DNS in einem denaturierten Zustand zu halten. Die Proben wurden auf ein 20%iges homogenes Polyacrylamidgel (Phast-Gel) mit Pufferstreifen enthaltend 0,88 M L-Alanin, 0,25 M Tris pH 8,8 aufgetragen und mit folgendem Programm laufen gelassen: Vorablauf: 400 V, 10 mA, 2,5 W, 15°C, 100 Vh, Laden: 400 V, 1 mA, 2,5 W, 15°C, 3 Vh, Trennung: 400 V, 10 mA, 2,5 W, 15°C, 300 Vh. Nach Elektrophorese wurden die Gele gemäß den Herstelleranweisungen silbergefärbt. Unter Verwendung dieses Verfahrens konnten 24 Proben in zwei Stunden analysiert werden.

[0051] Alle der sieben am häufigsten gemeldeten Mutationen von Ki-ras Exon 1 (7) und eine ungewöhnliche Doppelmutation (Kodon 12: GGT zu TTT) stellen sich als durch das vorgestellte Verfahren erkennbar und identifizierbar heraus (**Fig. 1**). Alle Mutationen wurden beim Screening einer Anzahl von Lungen-, Kolon- und Pankreastumoriopsien gefunden (n > 400). Die Identität der Mutationen wurde durch Sequenzieren von mindestens zwei Proben festgestellt, die eine individuelle An des Bandenmusters wiedergeben. Zusätzlich wurden weitere Proben mit der Methode der allelspezifischen Amplifikation (ASA) (20) als Kontrolle analysiert. In jedem Fall erschienen die Mutationen als zwei Banden (oder aufgrund sekundärer Banden, die vermutlich metastabile Konformationen wiedergeben, manchmal mehr) zusätzlich zu den Wildtypbanden. Dies wurde so interpretiert, daß beide mutierte Einzelstränge unterschiedlich von den Wildtyp-Einzelsträngen wandern. Es war daher möglich, zwischen verschiedenen Mutationsvarianten und gelegentlichen PCR-erzeugten unspezifischen Banden relativ zu zwei wildtypspezifischen Banden zu unterscheiden. Dies wurde als Erfordernis für eine verlässliche Identifizierung betrachtet.

[0052] Das minimale Verhältnis von mutierter zu normaler DNS, das zur Erkennbarkeit der Mutation erforderlich war, wurde folgendermaßen getestet: Genomische DNS mit einer homozygoten AGT-Mutation wurde mit normaler genomischer DNS in den Verhältnissen 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 und 1 : 160 gemischt, wobei die kombinierten Mengen konstant und gleich 250 ng gehalten wurden. Diese Mischungen wurden dann als Template in einer PCR-Reaktion von 35 Zyklen verwendet. Danach wurden SSCP-Analysen der PCR-Produkte durchgeführt. Das Mutationssignal war in allen Proben erkennbar, aber beim Mischverhältnis (mutierte/normale DNS) 1 : 160 nur mit Mühe (Ergebnisse nicht gezeigt).

[0053] Zusätzlich zu den vorgenannten Mutationen war auch eine Mutation in der letzten Base von Kodon 19:

TTG zu TTT, gefunden in einer Kolonkrebsbiopsie, erkennbar und von den anderen Mutationen unterscheidbar (nicht gezeigt).

[0054] Es sei davor gewarnt, daß die Verwendung von SSCP zur Identifizierung von Mutationen nur in besonderen Fällen möglich ist, bei denen berichtet wird, daß ein begrenztes Spektrum von spezifischen Mutationen auftritt. Im vorgelegten Fall erleichterte die gezeigte Heterogenität der SSCP-Muster eine schnelle, einfache und empfindliche Erkennung und Identifizierung von Mutationen von Ki-ras Exon 1 allein durch SSCP.

Beispiel 2

Erkennung von Ki-ras-Mutationen im Kot von Patienten mit kolorektalen Tumoren unter Verwendung von PCR

II Materialien und Verfahren

Patientenauswahl

[0055] 25 Patienten, die zwischen August und November 1994 in die chirurgische Abteilung des Universitäts-hospitals von Bergen (Haukeland Hospital), Norwegen, aufgenommen wurden, beteiligten sich an der Studie. Wir entschieden uns, zwei verschiedene Gruppen einzubeziehen, was uns ermöglichen würde, die Empfindlichkeit des von uns verwendeten Verfahrens zu beurteilen. Die erste Gruppe (A) wurde aus 10 Patienten gebildet, die sich einer koloskopischen Untersuchung von vermutetem kolorektalen Tumoren unterzogen und bei denen anschließend entweder ein bösartiger kolorektaler Tumor (Karzinom) oder ein gutartiger Tumor (Adenom) mit einer Größe von mehr als 1 cm gefunden wurde. Die andere Gruppe (B), bestehend aus 15 Patienten, umfaßte Patienten, die sich einer chirurgischen Resektion von kolorektalen Karzinomen oder Adenomen mit einer Größe von mehr als 1 cm unterzogen. Die Patienten (10 Männer, 15 Frauen) waren zur Zeit der Tumorexstirpation im Alter von 49 bis 90 Jahren (Durchschnittsalter 70).

Sammlung von Tumoren und Kot

[0056] Von jedem Patienten wurden Tumorgewebeproben gesammelt, in den meisten Fällen direkt nach Operation und Koloskopie. Im letzteren Fall wurden die Gewebeproben durch Biopsie oder Polypektomie erhalten. Von 5 Patienten wurden von der Pathologieabteilung des Haukeland-Hospitals in Paraffin gebettete Gewebeproben zur Verfügung gestellt. Insgesamt erhielt man 27 kolorektale Tumorproben von 25 Patienten. Von zwei Patienten erhielten wir insgesamt vier verschiedene Tumore, die unsere Kriterien erfüllten; diese Tumore wurden begleitend in den chirurgisch resektierten Proben gefunden. Von diesen 27 Tumoren waren gemäß dem Pathologiebericht 15 Karzinome und 12 Adenome.

[0057] Stuhlproben wurden entweder während der Koloskopie durch Sammlung der Waschflüssigkeit oder vor der Operation erhalten. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

DNS-Präparation aus Tumorproben

[0058] Genomische DNS wurde aus Tumorproben unter Verwendung der folgenden Standardverfahren extrahiert¹⁰.

[0059] Etwa 25 mg Tumorgewebe wurde in einem 1,5 ml-Eppendorfröhrchen gesammelt. Zum Zweck der Zell-Lyse wurde die Probe in 300 μl TE-Puffer (10 mM TrisHCl pH 8,0 und 1 mM EDTA), 30 μl Proteinase XIV (10 mg/ml), 30 μl 10% SDS (Natriumdodecylsulfat) und 30 μl THE-Puffer (100 mM TrisHCl pH 8,0, 1,5 M NaCl und 100 mM EDTA pH 8,0) gelöst. Die Proben wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

[0060] Um Protein und Verunreinigungen aus den Proben zu entfernen, wurden Phenol/ Chloroform-Extraktionen durchgeführt: Jeder Probe wurde 1 Volumen Phenol hinzugefügt, durch Vortexen gemischt, und es wurde bei 4°C 13000 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde die obere Schicht in ein neues Röhrchen überführt, wonach 1 Volumen Chloroform zugefügt wurde, die Lösung durch Vortexen gemischt und 5 Minuten lang zentrifugiert wurde. Die obere wäßrige Schicht wurde in ein neues Röhrchen überführt, und es wurden 2,5 Volumen 96% Ethanol hinzugefügt. Nach mindestens einstündigem Ausfällen bei -20°C wurde die Probe 10 Minuten lang zentrifugiert, wonach der Überstand vorsichtig verworfen wurde. Das Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen und dann luftgetrocknet. Schließlich wurde die DNS in 100 μl TE-Puffer resuspendiert.

[0061] Es wurde DNS aus in Paraffin eingebetteten Gewebeproben unter Verwendung eines kürzlich beschriebenen Verfahrens¹¹ extrahiert.

[0062] Vom Gewebepblock wurde ein Teil von 20 μm abgeschnitten. Der Schnitt wurde in 10 mM TrisHCl pH 9,0, enthaltend 5% Chelex-100-Harz (Bio Rad Laboratories, Hercules, California, USA), suspendiert und 10 Minuten lang gekocht.

Polymerase-Kettenreaktionsverfahren

[0063] Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hat sich als eine der umfassendst verwendeten Methoden der Molekularbiologie etabliert. Die Gründe sind die folgenden: Es ist ein schnelles, billiges und einfaches Mittel zum Erzeugen von Mikrogrammengen von DNS aus winzigen Mengen an Ausgangsmaterial. Die PCR-Methode beruht auf der Bekanntheit von wenigstens einem Teil der DNS-Sequenz um den interessierenden Bereich. Wir werden zunächst die grundlegenden Prinzipien der PCR kurz beschreiben, bevor wir uns den Verfahren zuwenden, die in dieser Studie durchgeführt werden.

[0064] In der PCR wird das doppelsträngige DNS-Fragment, das amplifiziert werden soll, (Templat) mit zwei kurzen einzelsträngigen DNS-Molekülen (Primern) gemischt, die zu Sequenzen an beiden Enden der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind. Die Reaktionsmischung enthält ebenfalls eine wärmestabile DNS-Polymerase und die vier zur DNS-Synthese erforderlichen Nukleotide.

[0065] Die Mischung wird auf etwa 95°C erwärmt, um das doppelsträngige Templat in einzelne Stränge zu denaturieren, und dann auf etwa 60°C abgekühlt, um jedem Primer zu gestatten, mit seiner komplementären Sequenz auf den einzelsträngigen Templaten zu annelieren. Die Temperatur wird dann auf 72°C eingestellt, die optimale Temperatur für die Polymerase, um mittels Extension jedes Primers durch sukzessive Additionen von Nukleotiden neue Stränge zu synthetisieren. Jeder frisch synthetisierte DNS-Strang enthält eine Bindungsstelle für den anderen Primer, wodurch er als zusätzliches Templat im nächsten Zyklus dient. Der Zyklus wird eine Anzahl von Malen wiederholt, wobei die Produktmenge jedes Mal verdoppelt wird. Um einen Eindruck von der Amplifikationskraft der PCR zu geben: 20 Zyklen erzeugen eine Million Kopien von einem DNS Molekül¹²⁻¹³.

[0066] Exon 1 von Ki-ras wurde durch PCR unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: 2 µl gelöster DNS wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl, enthaltend 10 mM Tris-HCl (pH 9,0 bei 25°C), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% (Gew./Vol.) Gelatine, 0,1% Triton X-100, 125 µM jedes Desoxynukleotidtriphosphats und 0,5 µM jedes Primers, gelöst. 0,2 Einheiten Taq-DNS-Polymerase wurden zugefügt. Die Taq-Polymerase (Super-taq) wurde von HT Biotechnology Ltd. (Cambridge, England) erworben.

[0067] Die Reaktionen wurden auf einem DNS-Thermocycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) unter Verwendung eines Zweischnittprofils durchgeführt: 94°C 15 Sekunden lang (denaturieren), 60°C 30 Sekunden lang (annelieren/extendieren), 40 Zyklen lang. Diesem Profil gingen 2 Minuten bei 94°C (einzelner Denaturierungsschritt) voran, und es gab einen abschließenden Extensionsschritt von 4 Minuten bei 72°C. Die Oligonukleotidprimer waren die folgenden: Stromaufwärts: 5'AAC CTT ATG TGT GAC ATG TTC TAA T-3' (Seq. Id. Nr. 5) (als R1 bezeichnet) und stromabwärts: 5'-AAT GGT CCT GCA CCA GTA AT-3' (Seq. Id. Nr. 2) (R2). Die Primer ergaben ein Produkt mit einer Länge von 221 Basenpaaren (bp).

Identifikation von Ki-ras-Mutationen in Tumorproben

[0068] Es existieren mehrere Verfahren zum Bestimmen, ob eine Einzelbasenänderung in amplifizierter DNS existiert⁽¹⁴⁻²¹⁾. Aus diesen wählten wir ein Verfahren, von dem sich gezeigt hat, daß es sowohl schnell als auch empfindlich ist, nämlich Einzelstrangkonnformationspolymorphismusanalyse (SSCP)²²⁻²⁴.

[0069] Da DNS ein negativ geladenes Heteropolymer ist, bewegt es sich zum positiven Pol, wenn es in ein elektrisches Feld gebracht wird. Dies wird Elektrophorese genannt.

[0070] Im Labor wird häufig das Prinzip des molekularen Siebens angewandt. Mit diesem Verfahren ist man in der Lage, eine Auswahl verschiedener Moleküle, z. B. verschiedener DNS-Fragmente, zu trennen, indem man sie zwingt, sich in einem Netzwerk hydrierter organischer Polymere, Gel genannt, zu bewegen. Die Bewegungsgeschwindigkeiten der DNS-Fragmente wird entsprechend ihrer Größe und/oder Form verlangsamt.

[0071] Die Methode der SSCP nutzt eine bestimmte Eigenschaft von kleinen (100–400 bp) einzelsträngigen DNS-Fragmenten von gleicher Größe: Wenn ihnen gestattet wird, sich auf sich selbst aufzufalten, bilden sie ausgeprägte Strukturen (Konformationen). Diese Konformationen werden durch intramolekulare Wechselwirkungen und daher durch die Sequenz bestimmt. Deshalb wird eine Punktmutation als eine geänderte Konformation widerspiegelt, die unter günstigen Pufferkonditionen und Gelporengröße in einer geänderten Mobilität während der Elektrophorese resultiert. Da komplementäre Stränge verschiedene Konformationen zeigen, erscheinen DNS-Fragmente vom Wildtyp (normal, unverändert) im Gel als zwei Banden. Eine Punktmutation führt zu zwei zusätzlichen Banden²⁵. In der Praxis erscheinen oft zusätzliche Banden aufgrund von alternativen Konformationen. In dieser Studie wurde die Elektrophorese von PCR-Produkten unter Verwendung des Pharmacia Phast Systems (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) auf vorgegossenen Polyacrylamid-Minigelen (PhastGelen) durchgeführt.

[0072] SSCP-Protokoll: Die PCR-Produkte wurden durch Mischen mit Formamid und Erwärmen auf 80°C für 1 Minute denaturiert. Die Proben wurden dann auf ein 20%iges homogenes Polyacrylamidgel mit nativen Phastgel-Pufferstreifen, enthaltend 0,88 M L-Alanin, 0,25 M Tris pH 8,8, aufgebracht und mit dem folgenden Programm laufen gelassen: Vorablauf: 400 V, 10 mA, 2,5 W, 100 Vh; Laden: 400 V, 1 mA, 2,5 W, 3 Vh; Trennung: 400 V, 10 mA, 2,5 W, 300 Vh. Nach der Elektrophorese wurden die Gele gemäß den Empfehlungen des

Herstellers silbergefärbt und getrocknet.

[0073] Unter Verwendung des beschriebenen Verfahrens zeigte jede Mutation in Kodon 12 und 13 von Ki-ras ein deutliches Bandenmuster auf dem Phast-Gel. Die Identität jeder Mutation wurde vorher durch direktes Sequenzieren und mutationsspezifische Primerextension (MSPE, wird später erörtert)²⁶ festgestellt. In dieser Studie wurden diese Muster als Referenzen verwendet, um die An der Mutation in den Tumorseiten festzustellen.

[0074] Alle Tumorseiten wurden auf die Anwesenheit von Mutationen in Exon 1 des Ki-ras analysiert. Als nächstes analysierten wir die Stuhlproben von den Patienten, deren Tumore eine Mutation enthielten.

DNS-Präparation aus Stuhlproben

[0075] Genomische DNS aus Stuhl wurde unter Verwendung der Qiagen-Zellkultur-DNS-Ausstattung (Qiagen Inc., Chatsworth CA, USA) gereinigt.

[0076] Etwa 10 mg Stuhl wurden mit 1 ml des G2-Puffers gemischt. Aus einer koloskopischen Waschung nahmen wir 500 µl und fügten eine gleiche Menge G2-Puffer zu. Dieser Puffer löst die Nuklei und denaturiert alle Arten von Protein. Die Stuhllysepuffermischung wurde durch Zentrifugation bei 13 000 g und 4°C 10 Minuten lang gevortext und geklärt. Der Überstand wurde dann in ein neues Röhrchen überführt, wonach 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugefügt wurden. Die Proteinase verdaut die denaturierten Proteine in kleinere Fragmente. Dann werden alle gebundenen Proteine von der DNS entfernt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 50°C wurden Genomic Tips von Qiagen über einem Abfalltablett platziert und mit 1 ml des Äquilibriumspuffers QBT äquilibriert. Dann wurden die Proben auf die äquilibrierten Genomic Tips aufgetragen, wonach die Säule mit 4 × 1 ml des QC-Waschpuffers gewaschen wurde. Die Säulen wurden dann auf saubere Sammelröhrchen gesetzt, und es wurde ein angemessenes Volumen des Elutionspuffers QF zugefügt. Die DNS wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol ausgefällt, manuell gemischt, 10 Minuten lang bei 4°C und 13 000 g zentrifugiert, und der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Die DNS wurde mit Ethanol 70% gewaschen und durch Zentrifugation wieder pelletisiert. Die Proben wurden 10 Minuten lang luftgetrocknet, und schließlich wurde das Pellet in 50 µl TE-Puffer wieder aufgelöst.

Erkennung von Ki-ras-Mutationen in Stuhlproben

[0077] Um die erwartete Mutation in Kodon 12 oder 13 des Ki-ras-Gens zu prüfen, verwendeten wir mutationsspezifische Primerextension (MSPE), auch allelspezifische Amplifikation (ASA)²⁷⁻³⁰ genannt.

[0078] Das Verfahren der MSPE hängt von der Gestaltung eines Primers ab, der bei der PCR vorzugsweise eine Sequenz gegenüber einer anderen amplifiziert, selbst wenn die Sequenzen sich nur um eine Base unterscheiden. Dies wird realisiert, wenn der Primer am oder nahe dem 3'-Ende vollständig zur gewünschten (eine Mutation enthaltenden) Sequenz paßt, aber nicht zu der anderen Sequenz (die keine Mutation trägt) paßt. Die Fehlpaarung zwischen dem normalen (nicht mutierten) DNS-Templat und dem Oligonukleotid resultiert in schlechter Amplifikation dieses normalen Fragments.

[0079] Eine größere Verlässlichkeit bezüglich der Spezifität der MSPE kann erreicht werden, wenn der mutationsspezifische Primer durch zusätzliche absichtliche Fehlpaarungen nahe dem 3'-Ende auf solche Weise destabilisiert wird, daß die Wahrscheinlichkeit der Verlängerung (und dadurch der Amplifikation) trotz der Fehlpaarung noch weiter verringert wird³¹.

[0080] Fehlgepaarte Primer wurden mit Hilfe eines kommerziellen Computerprogramms (Oligo 4.0, National Biosciences Inc, USA) ausgewählt, und zwar einschließlich einer zusätzlichen Fehlpaarung ein paar Basenpaare vom 3'-Ende entfernt. Alle in dieser Studie verwendeten Primer wurden erworben.

[0081] Für die MSPE verwendeten wir (semi-)nested PCR-Verfahren und AmpliWax-Gems.

[0082] In der nested PCR sind Empfindlichkeit und Spezifität der DNS-Amplifikation erheblich verbessert³²⁻³⁴. Das Verfahren beinhaltet zwei aufeinanderfolgende PCRs. Die erste PCR enthält ein Paar externe Primer, während die zweite zwei nested Primer enthält, die intern zum ersten Primerpaar sind (nested PCR), oder einen der ersten Primer und einen einzelnen nested Primer (semi-nested). Das von der ersten Reaktion erzeugte größere Fragment wird als Templat für die zweite PCR verwendet.

[0083] PCR-Ampliwax-Gems (Perkin Elmer) erleichtern die Verwendung der "Warmstart"-Technik. Diese Technik verhindert das vollständige Mischen des PCR-Reaktanden, bis die Reaktion eine Temperatur erreicht hat, die nichtspezifisches Anheften des Primer an Nicht-Ziel-DNS minimiert. Als Ergebnis werden Spezifität und Empfindlichkeit des PCR-Prozesses erhöht, und das Risiko der Primerdimerisation (Primer-Primer-Annehlung) wird verringert^{35,36}.

PCR-Verfahren

[0084] In der ersten Runde wurden 5 µl gelöster DNS in der gleichen Reaktionsmischung wie die Tumorseiten mit Primerkonzentrationen von 0,2 µM amplifiziert. Die Sequenz des stromaufwärtigen Primers war

5'-GGT GGA GTA TTT GAT AGT GTA TTA ACC TTA TGT-3' (R3) (Seq. Id. Nr. 1). Der stromabwärtige Primer war R2 (Seq. Id. Nr. 2). Diese Primer ergaben Fragmente einer Länge von 244 bp. Nach zweiminütiger Denaturierung bei 94°C wurde 16 Zyklen lang eine PCR durchgeführt (94°C für 15 s, 60°C für 15 s).

[0085] Die Amplifikationsfähigkeit des Templates in jeder Probe wurde geprüft, bevor MSPE durchgeführt wurde.

[0086] 1 µl des PCR-Produkts aus der ersten Runde wurde durch PCR unter Verwendung der Primer R1 (Seq. Id. Nr. 5) und R2 (Seq. Id. Nr. 2) (0,5 µM) 40 Zyklen lang (94°C für 15 s, 60°C für 30 s) reamplifiziert. Aliquots von 15 µl wurden durch Elektrophorese auf einem 3 %igen NuSieve GTG (FMC BioProducts) Agarosegel analysiert. Die Proben aus der ersten Runde, die sich als amplifizierbar herausstellten, wurden der MSPE unterzogen.

[0087] Wir bezogen AmpliWax-Gems und die Warmstarttechnik in die zweite PCR-Runde ein. 1 µl des PCR-Produkts aus der ersten Runde wurde mit der Kombination aus Primer R3 (0,2 µM) und dem mutations-spezifischen fehlgepaarten Primer reamplifiziert. Die fehlgepaarten Primer wiesen die folgenden Sequenzen auf

GCT: 5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA G-3' (R4); (Seq. Id. Nr. 11);

GTT: 5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA A-3' (R5) (Seq. Id. Nr. 6);

GAT: 5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA T-3' (R6) (Seq. Id. Nr. 7);

GAC: 5'-CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC CT-3' (R7) (Seq. Id. Nr. 8);

AGT: 5'-AGG CAC TCT TGC CTA CGC TAT T-3' (R8) (Seq. Id. Nr. 9);

TGT: 5'-GCA CTC TTG CCT ACG CCA TA-3' (R9) (Seq. Id. Nr. 10);

[0088] Die Kombinationen aus R3 (Seq. Id. Nr. 1) mit den fehlgepaarten Primern ergaben Produkte von 143 (TGT) bis 150 (AGT) bp. PCR wurde 40 Zyklen lang (94°C für 15 s, 60°C für 30 s) mit Primerkonzentrationen von 0,2 µM (R4, R5) (Seq. Id. Nr. 11; Seq. Id. Nr. 6) oder 0,4 µM (R6–R9) (Seq. Id. Nr. 7–10) durchgeführt. Um die TTT-Mutation zu prüfen, die wir in einem Tumor fanden, führten wir an der Kotprobe sowohl eine GTT- als auch eine TGT-Fehlpaarung durch; nur wenn beide Serien positive Ergebnisse erbrachten, konnten wir annehmen, daß im Kot eine Tumorzellen enthaltende TTT-Mutation vorhanden war.

[0089] Als negative Kontrollen verwendeten wir DNS aus Kot von Patienten mit kolorektalen Tumoren ohne Mutation in Kodons 12 und 13 von Ki-ras. Es wurden die Proben mit der besten Amplifikationsfähigkeit ausgewählt, um die Wahrscheinlichkeit von falschpositiven Ergebnissen zu minimieren. Als positive Kontrollen verwendeten wir DNS aus Tumoren, bei denen die Art der Mutation in Ki-ras durch SSCP festgestellt und durch Sequenzieren bestätigt wurde. MSPE-Produkte wurden einer Elektrophorese in einem 3%igen NuSieve-Agarosegel unterzogen. Die Benennung eines Signals als positiv erforderte ein deutliches intensives Signal stärker als die negativen Kontrollen.

Ergebnisse

[0090] Es wurde ein experimenteller Zweischrittansatz entworfen. Zuerst analysierten wir kolorektale Tumoren auf die Anwesenheit von Ki-ras-Mutationen. Wenn diese vorhanden waren, analysierten wir den Kot dieser Patienten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1.

Merkmale der Patienten und Tumore, die auf Mutationen in Ki-ras untersucht wurden.

Patient	Ge- schlecht /Alter	Tumorort	Tumorart/ Stadium#	Tumormutation	Mutant in Kot##
C-01	M/79	Rektum	Karzinom/B	GGT → GCT (Ala)	I/II: +
C-04	W/69	absteigendes Kolon	Adenom	GGT → GTT (Val)	I: +
C-05	W/90	transverses Kolon	Adenom 1	GGT → TTT (Phe)	II: -
		aufsteigendes Kolon	Adenom 2	GGT → GAT (Asp)	
C-09	W/63	aufsteigendes Kolon	Karzinom/C	GGT → GAT (Asp)	II: +
C-12	W/80	Rektum	Adenom	GGT → GAT (Asp)	I: +
C-14	M/71	Sigma	Karzinom/B	GGT → GAC (Asp)	II: +
C-16	W/75	Sigma	Karzinom/C	GGT → GAT (Asp)	II: -
C-17	M/87	Sigma	Karzinom/C	GGT → AGT (Ser)	II: -
C-18	W/77	Sigma	Karzinom/B	GGT → GTT (Val)	I: +
C-23	M/80	Sigma	Karzinom/B	GGT → GTT (Val)	II: +
C-24	W/68	Rektum	Karzinom/B	GGT → GAT (Asp)	II: -
C-25	W/49	Rektum	Karzinom/C	GGT → GCT (Ala)	II: +

*Tumore wurden gemäß Dukes' klassischem Dreistadiensystem¹¹ von CRC klassifiziert (A: Tumor begrenzt auf Muskularis Propria, B: Erstreckung durch die Muskularis Propria, aber auf das Kolon beschränkt, C: Metastase zu regionalen Lymphknoten).

**Kotproben wurden während der Koloskopie (I) oder vor der Operation (II) gesammelt. Von Patient C-01 wurde sowohl Kotprobe I als auch II analysiert. Tumormutationen wurden durch Einzelstrangkonnformationspolymorphismus und Elektrophorese auf PhastGelen bestimmt. Mutationen in Kotproben wurden mit mutationsspezifischer Primerextension ermittelt.

[0091] Genomische DNS aus 27 Tumoren wurden durch die PCR-SSCP-Methode auf die Anwesenheit von Mutationen am 12. und 13. Kodon des Ki-ras-Gens analysiert. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung wurden unter Verwendung des PhastSystems durchgeführt. Bandenmuster sind in **Fig. 2** gezeigt.

[0092] Wir erkannten Punktmutationen in 13 Tumorproben (48%), die wir von 12 Patienten erhalten hatten (4 aus Gruppe A, 8 aus Gruppe B). Mutationen wurden in 4 von 12 Adenomen (33%, alle vom zottigen Typ) und 9 von 15 Karzinomen (60%) erkannt. Die Mehrheit der Mutationen wurde im Sigma und Rektum lokalisiert.

[0093] Von den 15 weiblichen Patienten, die sich an der Studie beteiligten, hatten 8 (53%) eine Mutation in Ki-ras, wohingegen 4 von 10 Männern (40%) betroffen waren. Bei einem Patienten (C-05) fanden wir, daß die aus zwei verschiedenen Adenomen erhaltenen Proben verschiedene Mutationen enthielten.

[0094] Das Mutationsspektrum der Tumore ist in **Fig. 3** gezeigt. Die häufigste Mutation war GGT zu GAT (Glycin zu Asparaginsäure) in Kodon 12, beobachtet in 5 Fällen. Die anderen im gleichen Kodon gefundenen Mutationen waren GGT zu GTT (Glycin zu Valin, 3 Fälle), GGT zu GCT (Glycin zu Alanin, 2 Fälle) und GGT zu AGT (Glycin zu Serin, 1 Fall). Wir fanden einen Fall einer Mutation in Kodon 13, nämlich GGC zu GAC (Glycin zu Asparaginsäure).

[0095] Ein Tumor (C-05, Adenom 1) erzeugte ein unübliches Bandenmuster, das einem vorher mit einer doppelten Mutation in Kodon 12 (GGT zu TTT) assoziierten Muster ähnelte. Die Sequenzanalyse des PCR-Produkts bestätigte diese doppelte Mutation (**Fig. 4**).

[0096] Als nächstes analysierten wir Kotproben der 12 Patienten, deren Tumore eine Mutation enthielten. Ein Patient aus Gruppe A (C-01) wurde bald nach der Koloskopie operiert, so daß wir zusätzlich zur Koloskopieprobe eine voroperative Probe erhielten.

[0097] Nach der Reinigung der DNS aus Kot wurde Exon 1 von Ki-ras PCR-amplifiziert. Es wurde bald deutlich, daß die Koloskopieproben mehr menschliche DNS als die voroperativen Proben enthielten. Der mechanische Effekt des Waschens einer Flüssigkeit um den Tumor herum während der Koloskopie rief offenbar die

Freisetzung von Zellen in das Lumen hervor. Daher waren allgemein in den während der Kolonskopie erhaltenen Proben sowohl die gesamte Zellmenge als auch die aus dem Tumor gewonnene Zellfraktion höher.

[0098] Eine Einschnitt-PCR mit 40 Zyklen, die normalerweise für jegliche Menge an Ausgangsmaterial ausreichend ist, war offensichtlich für mehrere der Kotproben nicht ausreichend, möglicherweise aufgrund von "inhibitierenden Faktoren" im Kot. Wir hofften, die Effizienz der PCR durch Verwässern dieser Faktoren zu erhöhen, indem nested PCR durchgeführt wurde. Dies würde auch die Templatmenge für MSPE erhöhen.

[0099] Es stellte sich heraus, daß mit dieser Zweischritt-PCR-Strategie alle Kotproben sowohl aus Gruppe A als auch aus Gruppe B amplifizierbar und daher für MSPE geeignet waren. Das Templat für MSPE war 1 µl des PCR-Produkts aus der ersten Runde. AmpliWax-Gems und die Warmstarttechnik wurden einbezogen. Es waren positive und negative Kontrollen enthalten.

[0100] Auf diese Weise bestätigten wir die in den jeweiligen Tumoren gefundenen Mutationen in allen 4 Kotproben aus Gruppe A. In den von Gruppe B erhaltenen Kotproben (plus Fall C-01) identifizierten wir die Mutation in 5 der 9 Fälle. Proximale wie auch distale Tumoren (Patient C-09, aufsteigendes Kolon) ergaben positive Ergebnisse. Es wurden vier verschiedene Typen von Mutationen erkannt: GCT, GTT, GAT und GAC.

[0101] Für optimale Ergebnisse maßte die Konzentration der mutationsspezifischen Primer auf Werte eingestellt werden, die zwischen 0,2 und 0,4 µM variierten.

[0102] Repräsentative Ergebnisse der Erkennung von Mutationen in Ki-ras in Kot mit MSPE sind in **Fig. 5** gezeigt.

Diskussion

[0103] In dieser Studie untersuchten wir die Möglichkeit, Ki-ras-Mutationen im Kot von Patienten mit kolorektalen Tumoren zu erkennen. In 27 Tumoren (12 Adenome und 15 Karzinome) wurden Ki-ras-Mutationen in 13 Tumoren gefunden, 4 in Adenomen (33%) und 9 in Karzinomen (60%). Diese Häufigkeiten stimmen mit früheren Berichten^{4,5} überein. Dieses Ergebnis bestätigt die potentielle Rolle von Ki-ras-Mutationen als relativ früher Marker von kolorektalen Neoplasien.

[0104] Vor kurzem wurde beobachtet, daß Frauen eine höhere Häufigkeit von Ki-ras-Mutationen in kolorektalem Krebs als Männer haben⁸. Es wurde vorgeschlagen, daß dieser Unterschied mit der Zeit des Kontaktes mit und der Konzentration von bestimmten Karzinogenen im Kot verbunden ist. Es wird berichtet, daß sowohl Darmdurchgangszeit als auch Verstopfungshäufigkeit bei Frauen deutlich höher sind³⁸. Eine Reflektion dieses Geschlechtsunterschieds ist in unserem Material erkennbar, in dem gefunden wurde, daß 53 % der Tumore bei Frauen und 40% der Tumore bei Männern eine Mutation beherbergen.

[0105] Wir fanden, daß die Mehrheit der Mutationen (12 von 14, wenn TTT als zwei Mutationen betrachtet wird) an Position 2 von Kodons 12 und 13 auftritt. Dies ist ebenfalls früher erkannt worden^{2,3,6}.

[0106] Obwohl die Zahl der in dieser Studie untersuchten Tumore klein ist, liegt die Gesamthäufigkeit der drei Mutationen, die als häufigste angesehen werden (CAC, GAT und GTT), der in größeren Serien gefundenen erstaunlich nahe^{7,8}.

[0107] Einige Punktmutationen sind mit distinkten anatomischen Orten in Verbindung gebracht worden⁴⁰. In dieser Beziehung stimmen unsere Ergebnisse mit der GCT-Mutation mit der Beobachtung überein, daß diese Mutation auf das Rektum begrenzt zu sein scheint.

[0108] Die Korrelation von bestimmten Arten von Ki-ras-Mutationen mit dem klinischen Stadium, wie z. B. der kürzlich beschriebenen Begrenzung der GAT-Mutation auf Tumore der Dukes-Stufe B⁹, konnte im Material unserer Patienten nicht erkannt werden. Tatsächlich wurden von den fünf Tumoren mit einer GAT-Mutation zwei als Dukes C klassifiziert.

[0109] Wir haben die Kotproben der 12 Patienten (von einem Patient sowohl eine Koloskopie- als auch eine voroperative Probe), deren Tumore eine Ki-ras-Mutation enthielten, analysiert. Wir konnten die entsprechende Ki-ras-Mutation in 9 von 13 (4 Koloskopie- und 9 voroperative) Stuhlproben identifizieren. Die Identifizierung wurde in allen 4 koloskopischen Proben und in 5 von 9 der voroperativen Proben erreicht. Nur die letzteren Proben sind von diagnostischem Wert. Die Koloskopieproben stellten nur wertvolle Informationen bei Bewertungen des Verfahrens zur Verfügung.

[0110] Obwohl die Amplifikationsfähigkeit aller Kotproben festgestellt worden war, ergab MSPE nicht in jeder Probe positive Ergebnisse. Als mögliche Erklärung ist eine Anzahl Probleme erkennbar. Zuerst unterscheiden sich Kotproben, wie früher erwähnt, bezogen sowohl auf den gesamten Mucosalzellgehalt als auch auf die aus dem Tumor gewonnene Zellfraktion stark. Als zweites wird die Reinigung von menschlichen Zellen aus Kot wahrscheinlich durch die Anwesenheit von bakteriellen Zellen behindert. Ein weiteres Problem betrifft die Tatsache, daß menschliche Zellen im Kot einer relativ hohen Konzentration an abbauenden Enzymen ausgesetzt sind. Zusätzlich ist gefunden worden, daß Kot bestimmte Inhibitoren enthält, die die DNS-Amplifikation in PCR stören¹. Indem die DNS an ein modifiziertes Ionenaustauschharz gebunden wird (z. B. Qiagen, in dieser Studie verwendet), können diese Inhibitoren möglicherweise zumindest teilweise entfernt werden.

[0111] Das MSPE-Verfahren als solches scheint für die Erkennung von Ki-ras-Mutationen in Kot sehr gut ge-

eignet zu sein. Die Analyse von Kotproben erforderte die Erkennung von mutierten Ki-ras-Sequenzen, die unter einer Fülle von Wildtyp-Ki-ras aus normalen Zellen aus den Tumorzellen hergeleitet wurden. Experimente zur Feststellung der Empfindlichkeit des Verfahrens zeigten, daß MSPE mindestens 0,01% mutierte Zellen in einer heterogenen Zellpopulation erkennen konnte (unveröffentlichte Daten). Ein weiteres Merkmal von MSPE ist, daß das Verfahren relativ unempfindlich auf "luftgetragene", vor der PCR vorhandene Verunreinigungen ist (z. B. menschliche DNS, die aus Haar, Haut etc. freigesetzt wird).

[0112] Es werden weitere Studien benötigt, um die Effizienz des Verfahrens zu verbessern, zum Beispiel durch Bemühungen, die Ausgangsmenge des Templates für MSPE anzugleichen. Neuere Experimente in unserem Labor weisen darauf hin, daß dies mit einem Dreirunden-PCR-Aufbau erreicht werden könnte. Eine weitere Verbesserung könnte durch "Anreichern" der Probe mit mutanten Zellen vor der Analyse erreicht werden, zum Beispiel durch bevorzugte Reinigung von mutanten gegenüber Wildtypzellen.

[0113] Screening auf mehrere Mutationen in einer Analyse könnte durch die gleichzeitige Verwendung einer Anzahl von fehlgepaarten Primern möglich sein. Eine zusätzliche Untersuchung einer sogenannten "Multiplex-PCR"-Prüfung wäre wertvoll. Schließlich wird eine weitere Bewertung einer möglichen Anwendung der Methode in einem Screeningtest benötigt. Ein solcher Test, wahrscheinlich mit hoher Spezifität, würde einen positiven voraussagenden Wert ergeben, der den der Erkennung von Blut im Kot bei weitem übertrifft.

[0114] Kürzlich sind Ki-ras-Mutationen auch im Kot von Patienten mit einem Pankreas-Adenokarzinomen und seinen vermuteten Vorläufergewebsverletzungen³⁹ identifiziert worden. Dieser Fund erweitert den potentiellen Umfang der Ki-ras-Analyse in Kot noch mehr. Daher könnte Ki-ras-Erkennung in Kot eine schnelle und nichtinvasive Screeningstrategie nicht nur zur Früherkennung von kolorektalem Krebs, sondern auch für andere gastrointestinale und Pankreas-Malignitäten sein.

Beispiel 3

Ki-ras-Onkogenanalyse in der genauen Diagnose von bösartigen Gewebeveränderungen in der Pankreas

[0115] Die Aktivierung des Ki-ras-Onkogens durch spezifische Punktmutationen an Kodon 12 tritt in Pankreasleiter-Adenokarzinomen mit bemerkenswert hoher Häufigkeit auf und ist wahrscheinlich ein wichtiges Ereignis in der Pathogenese dieses Krebses. Ki-ras-Onkogenmutationen sind auch in Pankreassaft von Patienten mit bösartigen Gewebsveränderungen erkennbar. Diese spezifische Genaktivierung kann daher bei der Diagnose von Pankreas-Malignitäten sowie in der differentiellen Diagnose gegen chronische Pankreatitis helfen und auch dabei, gutartige von bösartigen zystischen Krankheiten der Pankreas zu trennen.

[0116] Wir haben kürzlich ein schnelles nichtradioaktives SSCP-Instrument für die Erkennung und Identifizierung von Ki-ras-Mutationen mit einer Empfindlichkeitsgrenze (Zellen mit einem mutierten Allel/normale Zellen) von 0,02 entwickelt. Wir haben diese Technik auf verschiedene Proben von dreißig Patienten angewendet, die wegen bösartiger Gewebsveränderungen der Pankreas operiert wurden. Alle dreißig Patienten beherbergten eine Kodon-12-Mutation im Tumor. Pankreassaft, der von zwölf Patienten gesammelt wurde, zeigte in neun Fällen die Anwesenheit von Mutation. Drei Patienten mit zystischen Pankreaskrankheiten, die ursprünglich als nicht-bösartig klassifiziert worden waren, zeigten Ki-ras-Mutation in Zystenflüssigkeit und Zystenwändenbiopsien, und nach der Operation wurde eine bösartige Histologie bestätigt. Von drei Patienten gesammelte peritoneale Flüssigkeit zeigte die Anwesenheit der gleichen Mutation, die im Tumor gefunden wurde.

[0117] Die Anwesenheit der Mutationen GAT und GTT scheint mit einer besseren Prognose nach der Operation verbunden zu sein als eine Anwesenheit aller anderer Mutationen. Wir schließen, daß Analyse nach Ki-ras-Mutationen in Pankreas-Gewebsveränderungen sowohl diagnostisch als auch prognostisch hilfreich sein und zu einer früheren Diagnose für diese verheerende Krankheit führen kann, deren einzige Überlebenshoffnung eine frühe Diagnose und radikale Operation ist.

Beispiel 4

Assoziation von spezifischen Ki-ras-Genmutationen mit verbessertem Überleben der Patienten in Pankreas-Adenokarzinomen

[0118] Pankreas-Adenokarzinome sind für ihre große Häufigkeit von Ki-ras-Genmutationen bekannt. In der vorliegenden Studie wurde mit Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Tumormaterial von 73 Patienten mit primären Adenokarzinomen unter Verwendung eines auf Einzelstrangkonnformationspolymorphismus basierenden Verfahrens auf die Anwesenheit von aktivierenden Punktmutationen in Exon 1 von Ki-ras untersucht. 49 (72%) der 68 Karzinome, die erfolgreich amplifiziert wurden, beherbergten eine oder mehrere Punktmutationen.

[0119] Die Überlebensanalyse zeigte keine Korrelation zwischen der Abwesenheit oder Anwesenheit von Ki-ras-Mutation und dem Überleben des Patienten, und es wurde kein Unterschied zwischen Fällen mit einer

oder mehreren Mutationen beobachtet. Die Anwesenheit von zwei spezifischen Mutationen (GTT- und GAT-Triplets in Kodon 12) war jedoch beim Vergleich mit allen anderen Arten von Mutationen oder der Abwesenheit von Mutation erheblich mit einem verbessertem Überleben des Patientenverbunden ($p = 0,0038$). In einer multivariaten Überlebensanalyse (Cox-Verfahren), die zusätzlich das Patientenalter zur Zeit der Diagnose, Tumordurchmesser und Tumorlokalisierung beinhaltet, zeigte die Art der Ki-ras-Mutation eine starke und unabhängige prognostische Bedeutung ($p = 0,03$).

[0120] Daher definiert die Anwesenheit von GTT- und GAT-Mutationen in Exon 1 von Kiras eine Untergruppe von Patienten mit Pankreas-Adenokarzinomen, bei denen die Prognose bedeutend verbessert ist. Molekulare Analyse von Ki-ras könnte ein hilfreicher Marker sein, um Patienten auszuwählen, die eher von ausgedehnter chirurgischer Behandlung profitieren.

REFERENZEN

1. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumours. *Science* 1992; 256: 102–105.
2. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293–297.
3. Forrester K, Almoguera C, Han K, et al. Detection of high incidence of Ki-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987; 327: 298–303.
4. Bos JL, Ras. oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* 1989; 49: 4682–4689.
5. Burmer GC, Rabinovitch PS, Loeb LA. Analysis of c-Ki-ras mutations in human colon carcinoma by cell sorting, polymerase chain reaction, and DNA sequencing. *Cancer Res.* 1989; 49: 2141–2146.
6. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal tumour development. *N. Eng. J. Med.* 1988; 319: 525–532.
7. Capella G, Cronauer-Mitra S, Peinado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-Ki-ras gene in human tumours. *Environ. Health Perspect.* 1991; 93: 125–131.
8. Breivik J., Meling GJ, Spurrkland A, Rognum TO, Gaudernack G. Ki-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br. J. Cancer* 1994; 69: 367–371.
9. Moerkerk P, Arends JW, van Driel M, de Bruine A, de Goeij A, ten Kate J. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1994; 54: 3376–3378.
10. Davis LG, Battery J, Digner MD. Basic methods in molecular biology. New York: Elsevier, 1986: 320–323.
11. Sepp R, Szabo I, Uda H, Sakamoto H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J. Clin. Pathology* 1994; 47: 518–523.
12. Tylor GR. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: McPherson MJ, Quirke P, Taylor OR, eds. PCR: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1992: 1–14.
13. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I. PCR: Clinical diagnostics and research. Berlin, Springer-Verlag, 1992: 1–22.
14. Myers RM, Lumelsky N, Lerman L, Maniatis T. Detection of single-base substitutions in total genomic DNA. *Nature* 1985; 313: 495–498.
15. Winter B, Yamamoto F, Almoguera C, Perucho M. A method to detect and characterize point mutations in transcribed genes: amplification and overexpression of mutant c-Ki-ras allele in human tumour cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82: 7575–7579.
16. Verlaan-de Vries M, Bogaard ME, van den Elst H, van Boom JH, van der Eb AJ, Bos JL. A dot-blot screening procedure for mutated ras oncogenes using synthetic oligodeoxynucleotides. *Gene* 1986; 50: 313–320.
17. Ehlen T, Dubeau L. Detection of ras point mutations by polymerase chain reaction using mutation-specific, inosine-containing oligonucleotide primers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1989; 160: 441–447.
18. Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 1990; 5: 1037–1043.
19. Rossiter BJF, Caskey CT. Molecular scanning methods of mutation detection. *J. Bio. Chem.* 1990; 265: 12753–12756.
20. Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R, et al. Multiple Ki-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res.* 1991; 51: 3497–3502.
21. Pellegata NS, Losekoot M, Fodde R, et al. Detection of Ki-ras mutations by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): A study on pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 1992; 12: 1731–1736.
22. Orita M, Suzuki Y, Hayashi K. A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874–879.
23. Orita M, Iwahana H, Kamazawa K, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis.

resis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Aca. Sci.* 1989; 86: 2766–2770.

24. Hayashi K. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1991; 1: 34–38.

25. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I. PCR: Clinical diagnostics and research. Berlin: Springer-Verlag 1992: 163–167.

26. Ulvik A. Rapid detection and identification of mutations in exon 1 of Ki-ras by SSCP on the Pharmacia Phast System (manuscript submitted).

27. Sommer SS, Cassady JD, Sobell JL, Bottema CDK. A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria. *Mayo Clin. Proc.* 1989; 64: 1361–1372.

28. Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB. Allele-specific amplification of β -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 2757–2760.

29. Sommer SS, Groszbach AR, Bottema CDK. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base mutations. *BioTechniques* 1992; 12: 82–87.

30. Bottema CDK, Sommer SS. PCR amplification of specific alleles: Rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutation Res.* 1993; 288: 93–102.

31. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl. Acids Res.* 1989; 17: 2503–2516.

32. Porter-Jordan K, Rosenberg EI, Keiser JF, et al. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. *J. Med. Virol.* 1990; 30: 85–91.

33. Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJL. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low numbers. *J. Virol.* 1990; 64: 864–872.

34. Porter-Jordan K, Garrett CT. Source of contamination in polymerase chain reaction assay. *Lancet* 1990; 19: 335.

35. D'Aquila RT, Bechtel LJ, Videler JA, Eron JJ, Gorzyca P, Kaplan JC. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 3749.

36. Chou Q, Russel M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 1717–1723.

37. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J. Pathol. Bacteriol* 1932; 35: 323–332.

38. Lampe JW, Fredstrom SB, Slavin JL, Potter JD. Sex differences in colonic function: a randomised trial. *Gut* 1993; 34: 531–536.

39. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of Ki-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res.* 1994; 54: 3568–3573.

40. Hayashi K. (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9, 73–79.

41. Takahashi-Fujii, Ishino A, Shimada A and Kato I. (1993) *PCR Methods Appl.* 2, 323–327.

42. Trumper LH, Burger B, von-Bonin F, Hintze A, von-Blohn G, Pfreundschuh M, and Daus H. (1994) *Br. J. Cancer.* 80, 278–284.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Feststellen/Erkennen von Ki-ras-Mutationen im Exon I Kodon 12 bis 13 in Proben von Gewebe, Tumorgewebe, Gewebesecretionen, Exkretionen, Expektoraten, wobei das Verfahren umfaßt:

(a) Reinigen und Trennen von DNS aus der Probe;

(b) Ausführen mindestens einer PCR-Amplifikation unter Verwendung eines stromaufwärtigen flankierenden Oligoprimers 5'-AAC CTT ATG TGT GAC ATG TTC TAA T-3' (R1) (Seq. Id. Nr. 5) und eines stromabwärtigen flankierenden Oligoprimers 5'-AAT GGT CCT GCA CCA GTA AT-3' (R2) (Seq. Id. Nr. 2) zur Erzeugung eines spezifischen PCR-Erzeugnisses umfassend die Mutationen; und (c) Ausführen eines Identifizierungsschrittes umfassend eine Phast-Gel®-SSCP, wobei als Ergebnis der Verwendung einer spezifischen Kombination von Oligoprimern zur PCR-Amplifikation eine direkte Ermittlung der Mutationen als Banden auf dem Phast-Gel® erreicht wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen Schritt (a) und Schritt (b) eine weitere PCR-Amplifikation unter Verwendung des stromaufwärtigen flankierenden Oligoprimers 5'-GGT GGA GTA TTT GAT AGT GTA TTA ACC TTA TGT-3' (R3) (Seq. Id. Nr. 1) und des stromabwärtigen flankierenden Oligoprimers 5'-AAT GGT CCT GCA CCA GTA AT-3' (R2) (Seq. Id. Nr. 2) durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, das weiterhin einen spezifischen PCR-Amplifikationsschritt, der nach

Schritt (b) ausgeführt wird, umfaßt, und zwar unter Verwendung eines Oligoprimer 5' GGT GGA GTA TTT GAT AGT GTA TTA ACC TTA TGT-3' (R3) (Seq. Id. Nr. 1) in Kombination mit mindestens einem mutationsspezifischen fehlgepaarten Primer, ausgewählt aus

GCT: 5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA G-3' (R4) (Seq. Id. Nr. 11);

GTT: 5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA A-3' (R5) (Seq. Id. Nr. 6);

GAT: 5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA T-3' (R6) (Seq. Id. Nr. 7);

GAC: 5'-CGT CAA GGC ACT CCT GCC TAC CT-3' (R7) (Seq. Id. Nr. 8);

AGT: 5'-AGG CAC TCT TGC CTA CGC TAT T-3' (R8) (Seq. Id. Nr. 9);

TGT: 5'-GCA CTC TTG CCT ACG CCA TA-3' (R9) (Seq. Id. Nr. 10).

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe aus dem Kolon, dem Rektum, der Lunge und der Pankreas entnommen wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in dem Verfahren verwendeten Proben frisch, gefroren oder in Paraffin eingebettet sind.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe Stuhl, Pankreasflüssigkeit, zystische Flüssigkeit aus der Pankreas, Biopsien vom Kolon und Rektum umfaßt.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge des als Startmaterial bei dem Verfahren verwendeten Stuhls von 5–100 mg reicht, vorzugsweise 10 mg beträgt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge des als Startmaterial bei dem Verfahren verwendeten Tumorgewebes im Bereich von 2–50 mg, vorzugsweise bei 25 mg liegt.

9. Ausstattung zum Durchführen des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es Chemikalien zum Durchführen der PCR-Reaktionen, einen Oligoprimmer mit der Sequenz 5'-AAC CTT ATG TGT GAC ATG TTC TAA T-3' (R1) (Seq. Id. Nr. 5), einen Oligoprimmer mit der Sequenz 5'-AAT GGT CCT GCA CCA GTA AT-3' (R2) (Seq. Id. Nr. 2) und geeignete Gele sowie Erkennungssysteme zum Analysieren des PCR-Erzeugnisses enthält.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Fig 1

1 2 3 4 5 6 7 8

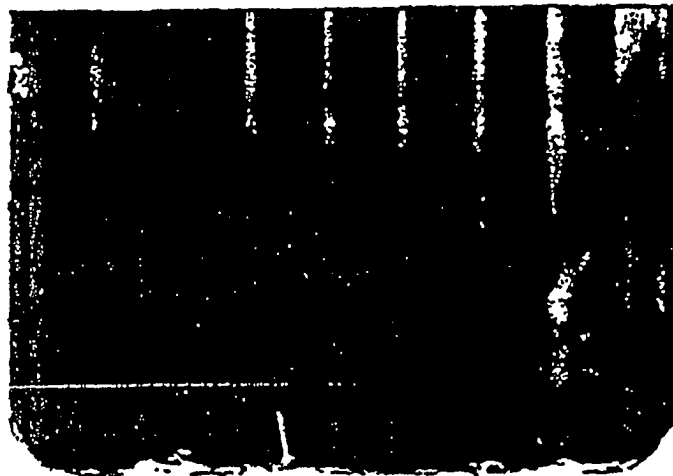


Fig 2

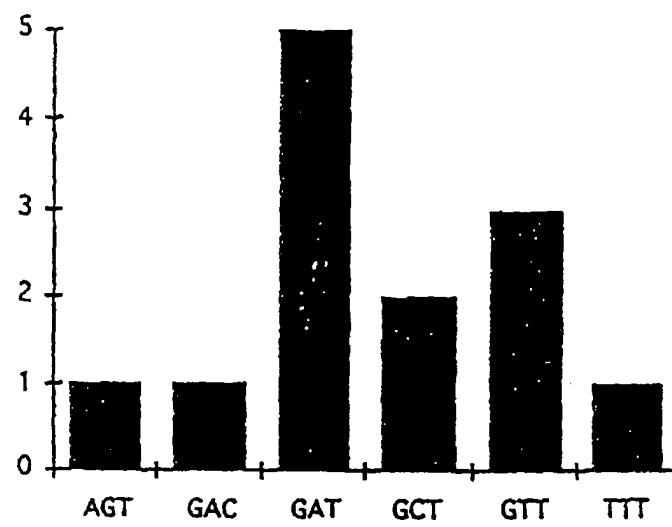


Fig 3

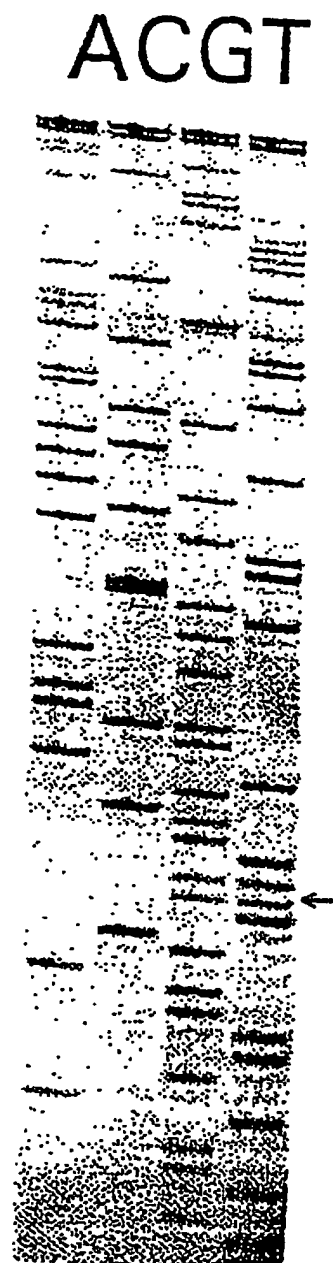


Fig 4

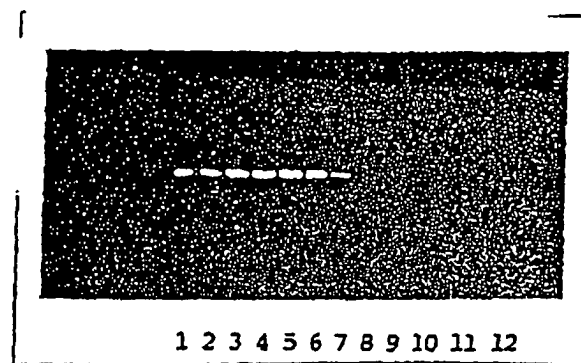


Fig 5