(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Juli 2006 (27.07.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/076912 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
*C12Q 1/68* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2006/000113

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Januar 2006 (24.01.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2005 003 638.4 24. Januar 2005 (24.01.2005) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA** [DE/DE]; Fürstengraben 1, 07743 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **CLAUSSEN, Uwe** [DE/DE]; Schillbachstr. 9, 07743 Jena (DE). **HALBHUBER, Karl-Jürgen** [DE/DE]; Überm Anger 12, 07751 Isserstedt (DE). **LIEHR, Thomas** [DE/DE]; Schlehendornweg 10, 07751 Jena (DE). **WEISE, Anja** [DE/DE]; Leipziger Str. 72/321, 07743 Jena (DE).

(74) Anwalt: **BOCK, Gerhard**; Patentanwälte Bock & Bieber, Hans-Knöll-Strasse 1, 07745 Jena (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

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

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

WO 2006/076912 A2

(54) **Title:** METHOD FOR THE HYBRIDISATION OF NUCLEIC ACIDS

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR NUKLEINSÄUREHYBRIDISIERUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to the improvement of in-situ-hybridisation with nucleic acids and to shortening the hybridisation method.According to the invention, the method for the hybridisation of nucleic acids is carried out under the influence of microwaves at a hybridisation temperature of upto a maximum of 37 °C. Said invention is used, for example, for marking and evaluating nucleic acids probes.

(57) **Zusammenfassung:** Es sollen die in-situ-Hybridisierung mit Nukleinsäuren verbessert und das Hybridisierungsverfahren verkürzt werden. Erfindungsgemäß wird das Verfahren zur Nukleinsäurehybridisierung unter dem Einfluss von Mikrowellen bei einer Hybridisierungstemperatur von maximal 37 °C durchgeführt. Die Erfindung wird beispielsweise angewendet zur Markierung und Auswertung von Nukleinsäureproben.

# Verfahren zur Nukleinsäurehybridisierung

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur schnellen in-situ-Hybridisierung mit Nukleinsäuren, beispielsweise für die Markierung auszuwertender Nukleinsäureproben.
Anwendungsgebiete hierfür sind zum einen in-situ-Hybridisierungen die unter zeitlichem Druck stehen, wie z. B. in der Pränataldiagnostik oder schwer zu hybridisierende bzw. kleine Nukleinsäuresonden, die durch das Verfahren zuverlässiger hybridisieren.

In-situ-Hybridisierungen mit Nukleinsäuren sind an sich bekannt (z. B. Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization, Proc Natl Acad Sci U S A 83, 1986, 2934-2938). Diese werden bei festgelegten Temperaturen (meist 37 °C) vorgenommen und haben zum Ziel, dass Nukleinsäureproben (beispielsweise DNA-Proben bzw. Sonden), die zumeist in besonderer Form markiert sind (beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop nach entsprechender Anregung leuchten), an Zielsequenzen mit entsprechender Basenhomologie binden. Diese Zielsequenzen können sich in unterschiedlichen Formen befinden. Es können z. B. DNA-Sequenzen in Zellkernen, in Chromosomen oder generell in Geweben und Gewebsschnitten sein, aber auch bereits gebunden an besondere Oberflächen, wie Glas in Verbindung mit array-Techniken (Überblick z. B. Forster T, Roy D, Ghazal P: Experiments using microarray technology: limitations and standard operating procedures, J Endocrinol. 178, 2003, 195-204).

Die Zielsequenzen sind bekanntermaßen für die Probensequenzen vielfach schwer erreichbar (wie beispielsweise DNA-Sequenzen in chromosomalen Strukturen, Saitoh Y, Laemmli UK: Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold, Cell 76, 1994, 609-622).

Das Aufschmelzen der Zielsequenzen (Denaturieren z. B. der DNA) wird vor der Hybridisierung insbesondere durch Hitze erreicht. (Überblick in „FISH Technologies", Rautenstrauß und Liehr, 1. Auflage, Springer 2001).

Insgesamt muss angemerkt werden, dass in-situ-Hybridisierungen mit Nukleinsäuren relativ zeitaufwendig sind und mehrere Stunden an Reaktion bedürfen. Aus diesen Gründen verlaufen diese nicht selten bis in die Nacht oder bis in den nächsten Tag hinein, wovon natürlich die Weiterbehandlung der hybridisierten Präparate betroffen wird. In der Regel ist durch die langen Reaktionszeiten eine kontinuierliche Weiterverarbeitung nicht oder nur selten gegeben.
Zur Verbesserung der Hybridisierungseffizienz an chromosomaler DNA wurde bisher die Mikrowelle nicht eingesetzt. Über einen solchen spezifischen Einsatz von Mikrowellen ist auch in der Fachwelt bisher nichts bekannt geworden.

Mikrowellen wurden bislang nur für die Hybridisierungsverbesserung auf Gewebeschnitten in der Immunohistochemie eingesetzt. (z. B. Coates PJ, Hall PA, Butler MG, D'Ardenne AJ: Rapid technique of DNA-DNA in situ hybridisation on formalin fixed tissue sections using microwave irradiation, J Clin Pathol 40, 1987, 865-869: Bull JH, Harnden P: Efficient nuclear FISH on paraffin-embedded tissue sections using microwave pretreatment, Biotechniques. 26, 1999, 416-418, 422; Kobayashi K, Kitayama Y, Igarashi H, Yoshino G, Kobayashi T, Kazui T, Sugimura H: Intratumor heterogeneity of centromere numerical abnormality in multiple primary gastric cancers: application of fluorescence in situ hybridization with intermittent microwave irradiation on paraffin-embedded tissue, Jpn J Cancer Res 91, 2000, 1134-1141).

Weiterhin wurden Mikrowellen an chromosomaler DNA wie auch Gewebeschnitten lediglich vor dem Hybridisierungsprozess verwandt, um die Zielsequenzen (über einen Wärmeeffekt) von der Doppelstrangform in die Einstrangform zu überführen (Aufschmelzen des Doppelstrangs) und damit für eine Hybridisierung mit Proben-DNA

erst zugänglich zu machen (z. B. Ko E, Rademaker A, Martin R: Microwave decondensation and codenaturation: a new methodology to maximize FISH data from donors with very low concentrations of sperm, Cytogenet Cell Genet 95, 2001, 143-145). Dieser Effekt berührt die Verwendbarkeit der Zielsequenzen für die Hybridisierung an sich, jedoch nicht die Effizienz der nachfolgenden Hybridisierung.

Es besteht aber seitens der Fachwelt ein großes Interesse, die Hybridisierungszeiten zu verringern, da Standard Fluoreszenz in situ Protokolle im wesentlichen sechs Schritte beinhalten. Jeder dieser Schritte ist wichtig um ein Hybridisierungsergebnis zu erhalten (praktische Einzelheiten: Levy ER, Herrington CS: Non-isotopic methods in molecular biology:a practical approach, 1995 Oxford University Press; Choo KHA: Methods in Molecular Biology, Vol.33: In situ hybridisation Protocols, 1994, Humana Press Inc.; Totowa NJ, Wilkinson DG: In situ hybridization: a practical approach. 1992, Oxford University Press): 1. Zielsequenz präparieren (Fixierung und Vorverdau), 2. Sondenpräparation und Sondenmarkierung, 3. Zielsequenz und Sonde denaturieren, 4. Hybridisieren der Sonde auf die Zielsequenz, 5. Posthybridisierungswaschungen und 6. Detektion.
Der zeitaufwendigste Schritt ist mit Abstand Schritt 4, der je nach Sondentyp zwei bis vier Stunden (Zentromersonden) oder einen bis mehrere Tage (single copy und sehr kleine Sonden) dauert.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, die in-situ-Hybridisierung mit Nukleinsäuren zu verbessern und das Hybridisierungsverfahren zu verkürzen.

Erfindungsgemäß wird das Verfahren zur Nukleinsäurehybridisierung unter dem Einfluss von Mikrowellen durchgeführt.
Überraschend hat sich gezeigt, dass die Hybridisierung unter dem besagten Mikrowelleneinfluss wesentlich schneller verläuft als auf herkömmliche Weise. Der eingangs genannte und sonst übliche hohe zeitliche Aufwand für die Hybridisierung kann durch die Erfindung erheblich reduziert werden, so dass auch eine zeitlich problemlose Weiterbearbeitung der Präparate nach der Hybridisierung (beispielsweise

Auswertung unter dem Mikroskop) noch am selben Tag (und damit unmittelbar nach der Hybridisierung) vorgenommen werden kann, was bisher nicht selten problematisch war. Darüber hinaus hinterlassen die Hybridisierungsergebnisse im Ergebnis der vorgeschlagenen Mikrowellenbehandlung qualitativ einen deutlich besseren Eindruck, der sich über spezifischere Hybridisierungsignale vermittelt. Dies ist besonders entscheidend beim Einsatz kleiner und single copy Nukleinsäuresonden, deren konventionelle Hybridisierung oft zu hintergrundreichen nicht auswertbaren Ergebnissen führt.

Der erfindungsgemäße Mikrowelleneffekt ist auf den Hybridisierungsprozess selbst hingegen sehr weitgehend unabhängig von der Wärmebildung an den Zielsequenzen. Es ist vielmehr von einer Mikrowellen-vermittelten Anregung der Molekülbewegungen auszugehen, welche das Erreichen der Zielsequenzen durch die Probensequenzen sterisch erleichtert und verbessert.

Die Nukleinsäurehybridisierung unter dem Einfluss von Mikrowellen erfolgt vorzugsweise bei einer Hybridisierungstemperatur von maximal 37 °C. Dabei kann die Hybridisierungstemperatur vorteilhaft durch ein Kaltwasserbad geregelt werden, indem die Mikrowelleneinwirkungszeit anhand von Eichkurven entsprechend der Wassertemperatur und dem Wasservolumen des Kaltwasserbades so bestimmt wird, dass am Ende der Mikrowelleneinwirkungszeit eine Wassertemperatur von maximal 37°C erreicht wird.

Die Erfindung soll nachstehend anhand eines Ausführungsbeispiels (Vorschrift zur Herstellung von Präparaten menschlicher Metaphasechromosomen aus Lymphozyten zur Markierung und fluoreszenzmikroskopischen Analyse) näher erläutert werden.

Vorschrift:

Stelle Präparate von menschlichen Metaphasechromosomen aus Lymphozyten auf konventionelle Art her und denaturiere die chromosomale DNA ebenfalls auf konventionelle Art (über den Einsatz von Hitze).

Wähle eine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Sonde (beispielsweise einen menschlichen BAC-Klon) und denaturiere seine DNA auf konventionelle Weise (z. B. hitzevermittelt).

Überschichte die denaturierte Ziel-DNA mit der denaturierten Proben-DNA (z. B. auf dem Objektträger) und überführe beides zur Hybridisierung in ein kleines Wasserbad bei 37 °C.

Stelle das Wasserbad in einen Mikrowellenofen und führe in zeitlichen Abständen die Mikrowellenbehandlung in Form von kurzzeitigen Mikrowellenstößen durch (z. B. vier- bis sechsmal innerhalb einer halben Stunde bei 600 W für eine Minute).

Bereite den Objektträger danach für die fluoreszenzmikroskopische Analyse zu.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Nukleinsäurehybridisierung, beispielsweise für die Markierung auszuwertender Nukleinsäureproben auf chromosomaler DNA, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäurehybridisierung unter dem Einfluss von Mikrowellen erfolgt.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäurehybridisierung bei einer Hybridisierungstemperatur von maximal 37 °C durchgeführt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Hybridisierungstemperatur zu Beginn der Mikrowelleneinwirkung durch ein Kaltwasserbad reguliert wird, indem die Mikrowelleneinwirkungszeit entsprechend der Wassertemperatur und dem Wasservolumen des Kaltwasserbades so festgelegt wird, dass am Ende der Mikrowellen-Einwirkungszeit eine Wassertemperatur von maximal 37 °C erreicht wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäurehybridisierung unter einer Mikrowelleneinwirkung in Form kurzzeitiger Mikrowellenstöße, beispielsweise vier- bis sechsmalige Mikrowellenstöße innerhalb einer halben Stunde, durchgeführt wird.