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

(10) **DE 694 35 030 T2** 2008.06.12

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 505 160 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 35 030.3**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 020 089.1**
(96) Europäischer Anmeldetag: **06.06.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.02.2005**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **19.09.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.06.2008**

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

(30) Unionspriorität:
73384 **04.06.1993** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Third Wave Technologies, Inc., Madison, Wis., US

(74) Vertreter:
Glawe, Delfs, Moll, Patentanwälte, 80538 München

(72) Erfinder:
Dahlberg, James, Madison, WI 53705-1316, US; Lyamichev, Victor I., Madison, WI 53711, US; Brow, Mary Ann D., Madison, WI 53717, US

(54) Bezeichnung: **Methode zur Detektion eines DNA Zielmoleküls**

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

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung ist in den Ansprüchen definiert und betrifft Mittel für die Spaltung einer Nukleinsäurestruktur auf einer positionsspezifischer Art und Weise. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Spaltungsenzym, das eine 5'-Nukleaseaktivität ohne störender Nukleinsäuresynthesevermögen aufweist.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Der Nachweis von spezifischen Nukleinsäuresequenzen wurde verwendet, um das Vorhandensein viraler oder bakterieller Nukleinsäuresequenzen, die für eine Infektion indikativ sind, sowie das Vorhandensein von Varianten oder Allelen von Säugergenen in Verbindung mit einer Krankheit zu diagnostizieren, und die Identifizierung der Quelle von Nukleinsäuren zu ermöglichen, die in forensischen Proben gefunden werden, sowie beim Vaterschaftsnachweis.

[0003] Der Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen wird üblicherweise durch Hybridisierung erreicht. Die Hybridisierungsmethoden schließen die Anlagerung einer komplementären Sequenz an die Zielnukleinsäure (die nachzuweisende Sequenz) ein. Die Fähigkeit zweier Nukleinsäurepolymere, die komplementäre Sequenzen enthalten, einander zu finden und sich durch Basenpaarwechselwirkung aneinander anzulagern, ist ein gut bekanntes Phänomen. Die ursprünglichen Beobachtungen des „Hybridisierungs"-Prozesses durch Marmur und Lane, Proc. Natl. Acad Sci. USA 46:453 (1960) und Doty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:461 (1960) haben sich durch die Vervollkommnungen dieses Prozesses in ein wesentliches Werkzeug der modernen Biologie verwandelt.

[0004] Die ersten Hybridisierungsstudien, beispielsweise die von Hayashi et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 50:664 (1963), wurden in Lösung durchgeführt. Die weitere Entwicklung führte zu der Immobilisierung des Ziels DNA oder RNA auf festen Unterlagen. Mit der Entdeckung spezifischer Restriktionsendonukleasen durch Smith und Wilcox, J. Mol. Biol. 51:379 (1970), wurde es möglich diskrete DNA-Fragmente zu isolieren. Die Verwendung von Immobilisierungstechniken, beispielsweise solche, wie durch Southern beschrieben, J. Mol. Biol. 98:503 (1975), in Kombination mit Restriktionsenzymen, erlaubte es mittels Hybridisierung eine Einzelkopie eines Genes in einer Masse fraktionierter genomischer DNA zu identifizieren.

[0005] Obgleich ein Fortschritt in der Hybridisierungsmethodologie erreicht wurde, so haben eine Reihe von Problemen davon abgehalten, die Hybridisierung im großen Maßstab als Werkzeug in der Humandiagnostik einzusetzen. Unter den am erheblichsten Problemen sind: 1) die Ineffizienz der Hybridisierung; 2) die geringe Konzentration spezifischer Zielsequenzen in einer Mischung genomischer DNA und 3) die Hybridisierung von nur partiell komplementären Proben und Zielen.

[0006] Methoden zum Nachweis des Vorhandenseins eines spezifischen Ziel-DNA-Moleküls sind aus dem Stand der Technik bekannt. Lyamichev, V. et al; Science 1993, vol. 260, Seiten 778–783 offenbart eubakterielle thermostabile DNA-Polymerasen (DNAPs), zum Beispiel DNAP-Taq, welche eine 5'-Exonukleaseaktivität, und somit die Fähigkeit DNA-Haarnadelsubstrate zu spalten, hat. WO 92/02638 A offenbart ein Verfahren für den Nachweis einer Nukleinsäurezielsequenz, bei der eine DNA-Polymerase verwendet wird, die eine 5'-Nukleaseaktivität aufweist, was letztendlich zu der Freigabe von markierten Fragmenten führt. WO 91/17264 A offenbart ein Verfahren für den Nachweis von Nukleinsäuren, bei der Proben an die Zielnukleinsäure hybridisieren und ein „nukleolytisches Mittel" verwendet wird, welches die Probe abbaut, wenn diese mit der Zielsequenz hybridisiert. Das Abbauprodukt wird dann nachgewiesen, zum Beispiel mittels Chemilumineszenz, Fluoreszenz oder Radioaktivität. WO 89/10415 A offenbart ein Verfahren zum Nachweis einer Zielnukleinsäure, bei der ein erster Ziel-Proben-Komplex gebildet wird und ein nachfolgender Nicking-Schritt stattfindet, was zu der Einzelsträngigkeit der Probenfragmente und ihrer Fähigkeit mit anderen Proben zu hybridisieren führt, was anschließend nachgewiesen werden kann. WO 89/09284 A offenbart ein Nachweisverfahren für Nukleinsäuresequenzen, bei dem Zielsequenzen als Co-Faktoren für eine enzymatische Reaktion verwendet werden, wobei eine markierte Probe verwendet wird, um einen ersten Proben-Ziel-Komplex zu bilden, der gespalten wird, um die Zielsequenz intakt freizugeben.

1. Ineffiziente Hybridisierung

[0007] In Experimenten wurde beobachtet, dass sich in einer Hybridisierungsreaktion nur ein Teil der mögli-

chen Proben-Ziel-Komplexe ausbildet. Dies ist insbesondere bei kurzen Oligonukleotidproben (weniger als 100 Basen lang) der Fall.

[0008] Dafür gibt es drei wesentliche Gründe: a) die Hybridisierung kann nicht wegen sekundärer und tertiärer Strukturwechselwirkungen stattfinden; b) die DNA-Stränge, die die Zielsequenz enthalten, haben an ihren komplementären Strang rehybridisiert (zurück angelagert); und c) einige Zielmoleküle sind von der Hybridisierung ausgeschlossen, wenn sie in Hybridisierungsformaten verwendet werden, bei denen die Zielnukleinsäuren an einer festen Oberfläche immobilisiert sind.

[0009] Selbst in Fällen, bei denen die Probensequenz vollständig komplementär zu der Zielsequenz, das heißt, der Primärstruktur des Ziels, ist, muss die Zielsequenz für die Probe mittels Umbauten der höher geordneten Strukturen zugänglich gemacht werden. Diese höher geordneten strukturellen Umbauten können sowohl die Sekundärstruktur, als auch die Tertiärstruktur des Moleküls betreffen. Die Sekundärstruktur wird durch die intramolekulare Bindung bestimmt. Im Falle von DNA-/oder RNA-Zielen wird diese aus der Hybridisierung mit einem einzelnen, kontinuierlichen Basenstrang (im Unterschied zu der Hybridisierung zwischen zwei verschiedenen Strängen) gebildet. In Abhängigkeit von dem Ausmaß und der Lage der intramolekularen Bindung kann die Probe von der Zielsequenz verdrängt werden, was der Hybridisierung entgegenwirkt.

[0010] Die Hybridisierung von Oligonukleotidproben an denaturierte doppelsträngige DNA in Lösung wird des Weiteren dadurch erschwert, dass die langen komplementären Zielstränge renaturieren oder sich wieder aneinander anlagern können. Durch diesen Prozess werden die hybridisierten Proben wiederum verdrängt. Das Ergebnis ist ein geringer Ertrag an Hybridisierung (geringe „Abdeckung") in Bezug auf die Anfangskonzentrationen der Probe und des Ziels.

[0011] Die Immobilisierung von Zielnukleinsäuren an festen Oberflächen, beispielsweise Nylon oder Nitrocellulose, ist in der Molekularbiologie eine übliche Praxis. Die Immobilisierungsformate vermeiden, das Reassoziierungsproblem, das zwischen komplementären Strängen von Zielmolekülen auftreten kann, jedoch nicht die Probleme, die mit den Effekten der Sekundärstruktur in Verbindung stehen. Allerdings erfordern diese gemischten Phasenformate (das heißt, Southern-Hybridisierung oder dot-blot-Hybridisierung) zeitaufwendige Fixationsverfahren. Die Hybridisierungsreaktion selbst ist kinetisch um einiges langsamer, als eine Hybridisierungsreaktion in flüssiger Phase. Insgesamt erfordern die Fixations- und Hybridisierungsverfahren mindestens einige Stunden bis einige Tage für deren Ausführung. Des Weiteren sind die standardmäßigen Immobilisierungsverfahren häufig ineffizient und führen zu der Anlagerung von vielen der Zielmoleküle an viele Bereiche der festen Oberfläche, was es unmöglich macht, diese für weitere Hybridisationen mit Probenmolekülen zu verwenden. Insgesamt führen diese Effekte dazu, dass nur ein geringer Prozentsatz der ursprünglichen Zielmoleküle durch Proben in einer Hybridisierungsreaktion gebunden wird.

2. Geringe Zielsequenzkonzentrationen

[0012] Bei Laborexperimenten werden gereinigte Proben und Ziele verwendet. Die Konzentration in diesen Proben und Ziele können ferner in Bezug auf die erforderliche Sensitivität eingestellt werden. Im Unterschied dazu besteht das Ziel bei der Verwendung der Hybridisierung in der medizinischen Diagnostik in dem Nachweis einer Zielsequenz in einer Mischung genomischer DNA. Üblicherweise liegt das die Zielsequenz enthaltende DNA-Fragment in relativ geringer Menge in der genomischen DNA vor. Dies führt zu großen technischen Schwierigkeiten; da die meisten herkömmlichen Methoden, bei denen Oligonukleotidproben verwendet werden, nicht die Sensitivität aufweisen, wie sie notwendig ist, um die Hybridisierung auf so geringem Niveau nachzuweisen.

[0013] Ein Ansatz für die Lösung des Zielsequenzkonzentrationsproblems ist die Amplifizierung des Nachweissignals. Sehr häufig schließt das die Platzierung eines oder mehrerer Markierungen an einer Oligonukleotidprobe ein. Im Falle nicht-radioaktiver Markierungen wurden selbst Reagenzien mit höchster Affinität als ungeeignet für den Nachweis von Einzelgenkopien in genomischer DNA mit Oligonukleotidproben befunden. Siehe Wallace et al., Biochimie 67:755 (1985). Im Falle radioaktiver Oligonukleotidproben konnten nur für extrem hochspezifische Aktivitäten befriedigende Ergebnisse gefunden werden. Siehe Studencki und Wallace, DNA 3:1 (1984) und Studencki et al., Human Genetics 37:42 (1985).

[0014] Die Polymerasenkettenreaktions-(PCR)-Technologie stellt eine alternative Herangehensweise an die Probleme der geringen Zielsequenzkonzentration dar. PCR kann verwendet werden, um direkt die Konzentration des Ziels vor der Hybridisierung zu erhöhen. In den U. S. Patenten Nrn. 4,683,195 und 4,683,202, beschreiben Mullis et al. ein Verfahren zur Erhöhung der Konzentration eines Segments einer Zielsequenz in ei-

ner Mischung genomischer DNA ohne Klonierung oder Reinigung.

[0015] Dieser Prozess zur Amplifizierung der Zielsequenz besteht in der Einführung eines molaren Überschusses zweier Oligonukleotidprimer zu der DNA-Mischung, die die gewünschte Zielsequenz enthält. Die zwei Primer sind zu ihren entsprechenden Strängen der doppelsträngigen Sequenz komplementär. Die Mischung wird denaturiert und dann die Möglichkeit zur Hybridisierung gegeben. Nach der Hybridisierung werden die Primer mit Polymerase erstreckt, so dass sich komplementäre Stränge bilden. Die Schritte der Denaturierung, Hybridisierung, und Polymerasenerstreckung können so oft wiederholt werden, wie es notwendig ist, um relativ hohe Konzentrationen eines Segments der gewünschten Zielsequenz zu erhalten. Die Segmentlänge der gewünschten Zielsequenz definiert sich durch die relativen Positionen der Primer in Bezug auf einander, weshalb die Länge ein kontrollierbarer Parameter ist. Aufgrund des sich wiederholenden Aspekts dieses Prozesses wurde das Verfahren durch die Erfinder als „Polymerase-Ketten-Reaktion" (oder PCR) bezeichnet. Da die gewünschten Segmente der Zielsequenz die vorherrschenden Sequenzen (in Bezug auf die Konzentration) in der Mischung werden, werden sie als „PCR-amplifiziert" bezeichnet.

[0016] Jedoch ist der PCR-Prozess für die Herstellung von Nicht-Zielfragmenten während des Amplifikationsprozesses anfällig. Es können falsche Primerverlängerungen an partiell-komplementären Bereichen während der PCR Reaktionen stattfinden. Die Faktoren, die die Spezifizität des Amplifikationsprozesses beeinflussen, sind: a) die Konzentration der Zielsequenz in der DNA, die analysiert werden soll; b) die Konzentration des Mg^{++}, des Polymerasenenzyms und der Primer; c) die Zyklenanzahl der durchgeführten Amplifikation und d) die in den verschiedenen Schritten des Amplifikationsprozesses verwendeten Temperaturen und Zeiträume [PCR Technology-Principles and Applications for DNA Amplification (H. A. Erlich, Ed.), Stockton Presse, New York, Seiten 7–16 (1989)]. Wenn die spezifische Zielsequenz in geringer Konzentration in der DNA-Probe vorliegt, dann werden mehr Nicht-Zielfragmente produziert. Geringe Zielkonzentrationen sind häufig die Norm bei klinischen Proben, bei denen das Ziel als eine Einzelkopie in dem Genom vorliegen kann oder wo sehr geringe virale DNA vorliegt, wie beispielsweise bei HIV-Infektionen.

[0017] Da Amplifikationsprodukte gebildet werden, welche nicht die spezifische Zielsequenz, die nachgewiesen werden soll, repräsentieren, müssen die Produkte einer PCR Reaktion unter Verwendung einer Probe, die spezifisch für die Ziel-DNA ist, analysiert werden. Der Nachweis spezifischer Amplifikationsprodukte wird vollendet durch die Hybridisierung einer Probe, die spezifisch für die Zielsequenz ist, an die Reaktionsprodukte, die auf einer festen Oberfläche immobilisiert sind. Solch ein Nachweisverfahren ist mühsam und unterliegt denselben Problemen, wie sie mit dem Nachweis irgendeines Zielmoleküls mittels Hybridisierung verbunden sind, was oben bereits diskutiert wurde.

[0018] Ein Nachweisassay für spezifische PCR-Produkte, welches nicht auf einer Hybridisierung basiert, wurde von Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276 (1991) beschrieben. In diesem Nachweissystem wird die 5'-Nukleaseaktivität einer Wildtyp-DNA-Polymerase aus Thermus aquaticus („DNAP Taq") verwendet, um bei der Amplifikation begleitend ein spezifisch nachweisbares Produkt zu erhalten. Eine für die Ziel-DNA spezifische Oligonukleotidprobe wird an dem 5'-Ende markiert und zu der PCR-Reaktion zusammen mit den unmarkierten Primern, die für die Verlängerung des zu amplifizierenden Ziel verwendet werden, hinzugegeben. Die 5'-Nukleaseaktivität der DNAP Tag spaltet die an die Ziel-DNA angelagerte markierte Probe ab, bevor die Primerverlängerung vollendet ist, wobei ein kleineres Fragment der Probe gebildet wird. Dieses Nachweissystem erfordert, dass die Amplifikation an der Probe durchgeführt wird, um das spezifische Nachweisprodukt herzustellen. Dies ist langsam und erfordert eine aufwendige Ausstattung.

[0019] Ein Minimum an 100 Ausgangskopien (das heißt, eine Kopienanzahl vor der Amplifikation) der Ziel-DNA wurden in diesem Nachweissystem verwendet; es ist unklar, ob eine geringere Anzahl von Ausgangskopien der Ziel-DNA unter Verwendung dieser Methode zu nachweisbaren Ergebnissen führt. Sehr geringe Kopiezahlen können ein Problem für einige klinische Proben sein, bei denen sehr wenig DNA aufgrund der Beschränkungen der Probengröße (Blut von Neugeborenen oder Fötusen, forensischen Proben, etc.) erhalten wird.

[0020] Auch wenn solch ein Assay eine Verbesserung gegenüber früheren Hybridisierungsnachweismethoden ist, so erfordert es doch immer noch, dass eine PCR-Reaktion an der Probe durchgeführt wird und weist auch noch verschiedene inherente Probleme auf. Eines dieser Probleme besteht darin, dass es in diesem System erforderlich ist, dass die Nachweisprobe an die Ziel-DNA binden muss, bevor die Primerverlängerung stattfindet. Wenn die Verlängerung als erstes stattfindet, so wird die Probenbindungsstelle nicht zur Verfügung stehen und es findet kein Verdau der Probe statt, weshalb kein nachweisbares Signal produziert werden kann. Um dieses Problem zu lösen, muss der Anwender die relativen Mengen des Primers und der Probe variieren,

oder die Sequenz und Länge der Probe manipulieren. Die Notwendigkeit einer solchen Optimierung kann für klinische Laboratorien zu aufwendig sein.

3. Partielle Komplementarität

[0021] Die Hybridisierung, unabhängig von der verwendeten Methode, erfordert einen gewissen Grad an Komplementarität zwischen der zu untersuchenden Sequenz (die Zielsequenz) und dem Fragment der DNA, welches für die Durchführung der Untersuchung verwendet wird (die Probe). (Natürlich kann eine Bindung ohne jegliche Komplementarität erhalten werden, diese Bindung ist jedoch nicht spezifisch und soll vermieden werden.) Für viele diagnostische Anwendungen ist es nicht wichtig, festzustellen, ob die Hybridisierung eine vollständige oder partielle Komplementarität bedeutet. Beispielsweise, wenn es gewünscht ist, einfach nur die Anwesenheit oder Abwesenheit einer pathogenen DNA (zum Beispiel von einem Virus, Bakterium, Pilz, Mycoplasma, Protocoen) nachzuweisen, dann ist es nur wichtig, dass die Hybridisierungsmethode die Hybridisierung sicherstellt, wenn die relevante Sequenz vorliegt; es können Bedingungen ausgewählt werden, bei denen sowohl partiell-komplementäre Proben, als auch vollständig-komplementäre Proben hybridisieren. Andere diagnostische Anwendungen hingegen können erfordern, dass die Hybridisierungsmethode zwischen verschiedenen Zielsequenzen unterscheidet. Beispielsweise kann es von Interesse sein, dass eine bestimmte Allelvariante eines Pathogenes vorliegt. Diese normalen Sequenzen und Varianten der Sequenzen können sich in einer oder mehreren Basen unterscheiden.

[0022] Es gibt andere Anwendungen, die erfordern, dass die Hybridisierungsmethode zwischen partieller und vollständiger Komplementarität unterscheidet. Es kann von Interesse sein, genetische Polymorphismen nachzuweisen. Das humane Hemoglobin besteht in Teilen aus 4 Polypeptidketten. Zwei dieser Ketten sind identische Ketten aus 141 Aminosäuren (Alphaketten) und zwei dieser Ketten sind identische Ketten aus 146 Aminosäuren (Betaketten). Es ist bekannt, dass die die Betaketten codierenden Gene Polymorphismus zeigen. Das normale Allel codiert eine Betakette, welche Glutaminsäure in Position 6 hat. Das mutante Allel codiert einer Betakette, welche Valin an der 6. Position hat. Dieser Unterschied in den Aminosäuren hat einen starken (am stärksten, wenn das Individuum homozygot für das mutante Allel ist) physiologischen Effekt, der klinisch als Sichelzellenanemie bekannt ist. Es ist gut bekannt, dass die genetische Basis der Aminosäureänderung in einem Einzelbasenunterschied zwischen der normalen Allel-DNA-Sequenz und der mutanten-Allel-DNA-Sequenz bedingt ist.

[0023] Solange wie sie nicht mit anderen Techniken (zum Beispiel der Restriktionsenzymanalyse) kombiniert wird, sind Hybridisierungsmethoden, welche dasselbe Maß an Hybridisierung im Falle der partiellen, als auch der vollständigen Komplementarität erlauben, ungeeignet für solche Anwendungen; die Proben werden sowohl mit der normalen, als auch der Variante der Zielsequenz hybridisieren.

[0024] Es wurden Methoden ausgedacht, die die Unterscheidung zwischen partieller und vollständiger Komplementarität ermöglichen. Eine der Herangehensweisen ist, sich die Temperaturerfordernisse der untersuchten spezifischen Hybridisierung zum Nutzen zu machen. Bei typischen Schmelztemperaturexperimenten, beispielsweise solche, wie von Wallace et al., Nucl. Acids Res. 6:3543 (1979) und Nucl. Acids Res. 9:879 (1981) beschrieben, wird ein immobilisierter Proben-Ziel-Komplex bei ansteigenden Temperaturen unter ungleichen Bedingungen gewaschen. Es wurde beobachtet, dass partiell-komplementäre Proben-Ziel-Komplexe eine geringere thermische Stabilität im Vergleich zu vollständig-komplementären Proben-Ziel-Komplexen aufweisen. Dieser Unterschied kann deshalb verwendet werden, um festzustellen, ob die Probe an die partiell-komplementäre oder vollständig-komplementäre Zielsequenz hybridisiert hat.

[0025] Die herkömmlichen Methoden, bei denen die Temperatur Abhängigkeit der Hybridisierung verwendet werden, sind raffiniert. Die Verwendung dieser Methoden zur Unterscheidung von Einzelbasenmutationen in menschlichen genomischen Zielen ist beschränkt auf die Verwendung von kurzen Oligonukleotidproben, bei denen die Hybridisierungswechselwirkung mit der Zielsequenz in einem Großenbereich von 17 Basen bis 25 Basen in der Länge beschränkt ist. Die untere Längengrenze definiert sich durch die Zufallswahrscheinlichkeit ein Gegenstück zu der Probe in dem menschlichen Genom zu haben, welcher größer als eins für zufällige 16 Basenpaarwechselwirkungen, jedoch weniger als eins für 17 oder längere Basenwechselwirkungen ist. Die obere Grenze ist eine der Anwendbarkeit. Es ist schwierig, Einzelbasenfehlpaarungen auf der Basis von der thermischen Stabilität für Wechselwirkungen, die länger als 25 Basen sind, zu unterscheiden. Diese konventionellen Methoden sind leider ebenfalls zeitaufwendig. Die Probenkonzentrationen bei diesen Experimenten sind etwa $1–5 \times 10^{-10}$M. Diese Konzentrationen wurden empirisch ermittelt; sie minimieren die Verwendung der Probe und stellen gleichzeitig eine ausreichende Unterscheidbarkeit sicher, um Einzelkopiegene zu unterscheiden, wobei Proben in der Länge von etwa 20 Nukleotiden verwendet werden. Die Hybridisationszeit be-

trägt 2–10 Stunden bei diesen Konzentrationen. Nach der Hybridisierung werden verschiedene Waschungen verschiedener Strenge verwendet, um überflüssige Probe, nicht spezifisch-gebundene Probe, und Probe, welche an die partiell-komplementären Sequenzen in dem Zielgenom gebunden sind, zu entfernen. Eine genaue Kontrolle dieser Waschschritte ist erforderlich, da letztendlich das Signal-(die spezifisch-gebundene Probe)-zu-Rausch-(nicht spezifisch-gebundene Probe)-Verhältnis in dem Experiment durch die Waschschritte bestimmt wird.

[0026] Keine der vordem beschriebenen Nachweismethoden hat alle 3 oben diskutierten Probleme gelöst. Das PCR-Verfahren löst das Problem der geringen Zielkonzentration. Jedoch sind die spezifischen Nachweise der PCR-Produkte durch irgendeine Hybridisationsmethode Gegenstand derselben Probleme, wie sie mit dem Nachweis jeglicher Zielmoleküle verbunden sind. Ursprünglich war der Nachweis der Einzelbasenunterschiede zwischen PCR-Zielen begleitet durch die Verwendung einer Restriktionsenzymanalyse der Hybridisationsprodukte, die durch die Oligonukleotidproben und die PCR-Ziele gebildet wurden. Diese Technik ist dadurch beschränkt, dass nicht für alle Sequenzen Restriktionsenzyme vorhanden sind.

[0027] In jüngeren Untersuchungen wurde eine Unterscheidung ohne Restriktionsenzymen erreicht, jedoch wurde bei diesen Studien die ineffiziente Immobilisierung der Zielnukleinsäuren an einer festen Oberfläche verwendet [dot-blot-Hybridisierung; Saiki et al., Nature 324:163 (1986)].

[0028] Ein anderes Verfahren für den Nachweis allelspezifischer Varianten ist durch Kwok et al., Nucl. Acids Res. 18:999 (1990) offenbart. Diese Methode geht von der Tatsache aus, dass es für eine DNAP schwierig ist, einen DNA-Strang zu synthetisieren, wenn eine Fehlpaarung zwischen dem Vorlagenstrang und dem Primer vorliegt. Die Fehlpaarung unterdrückt die Verlängerung, womit die Amplifizierung der Ziel-DNA unterdrückt wird, die nicht perfekt-komplementär zu den Primern ist, die in der PCR-Reaktion verwendet werden. Obgleich eine allelspezifische Variante durch die Verwendung eines Primers der perfekt nur zu einem der möglichen Allele passt, nachgewiesen werden kann, ist diese Nachweismethode raffiniert und hat Beschränkungen. Besonders lästig ist die Tatsache, dass die Basenzusammensetzung der Fehlpaarung die Fähigkeit zur Verlängerungsunterdrückung entlang der Fehlpaarung beeinflusst. Verschiedene Fehlpaarungen unterdrücken die Verlängerung nicht oder haben nur einen minimalen Effekt.

[0029] Ein ideales Verfahren zur Nachweis spezifischer Ziel-DNA würde den Nachweis ermöglichen, ohne der Notwendigkeit, die DNA-Probe als erstes zu amplifizieren und würde den Nachweis von Zielsequenzen erlauben, welche in geringer Kopienanzahl in der DNA-Probe vorliegen. Dieses ideale Verfahren würde ebenfalls die Unterscheidung zwischen Varianten der Zielsequenz erlauben, so dass Einzelbasenvariationen zwischen Allelen von Säugergenen wahrnehmbar sind.

[0030] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Nachweisverfahren für spezifische Nukleinsäuresequenzen bereitzustellen, welches die oben benannten Probleme löst.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0031] Die vorliegende Erfindung ist in den Ansprüchen definiert und betrifft Mittel zum Spalten einer Nukleinsäurespaltungsstruktur auf eine positionsspezifische Art und Weise. Das Mittel zum Spalten ist ein Spaltungsenzym, das 5'-Nukleasen umfasst, welche aus thermostabilen DNA-Polymerasen abgeleitet sind. Diese Polymerasen bilden die Basis eines neuartigen Verfahrens für den Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen. Die vorliegende Erfindung zieht die Verwendung neuartiger Nachweisverfahren für verschiedene Anwendungen in Betracht, einschließlich, aber nicht ausschließlich, für Zwecke der klinischen Diagnose.

[0032] In einer Ausführungsform zieht die vorliegende Erfindung eine DNA-Sequenz in Betracht, die eine DNA-Polymerase kodiert, die in Bezug auf die natürliche Sequenz in der Sequenz geändert wurde (das heißt, eine „mutante" DNA-Polymerase), so dass sie gegenüber der natürlichen (das heißt, „Wildtyp") DNA-Polymerase eine veränderte DNA-synthetische-Aktivität zeigt. Es ist bevorzugt, dass die kodierte DNA-Polymerase so verändert wurde, dass sie gegenüber der natürlichen DNA-Polymerase eine reduzierte synthetische Aktivität zeigt. Auf diese Weise sind die in den Verfahren der Erfindung verwendeten Enzyme vorwiegend 5'-Nukleasen und in der Lage, Nukleinsäuren auf strukturspezifische Art und Weise in Abwesenheit störender synthetischer Aktivität zu spalten.

[0033] Wesentlich ist, dass die 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung in der Lage sind, lineare Duplexstrukturen zu spalten, um einzelne diskrete Spaltprodukte zu bilden. Diese linearen Strukturen sind entweder 1) durch Wildtypenzyme nicht spaltbar (in jeglichem signifikantem Maße), oder 2) sind durch Wildtypenzyme

spaltbar, so dass eine Vielzahl an Produkten gebildet wird. Diese Eigenschaft der 5'-Nukleasen erwies sich als einheitliche Eigenschaft von Enzymen, die auf diese Weise aus thermostabilen Polymerasen eubakterieller Thermophilearten gewonnen wurden.

[0034] Die Erfindung soll nicht durch die Art der erforderlichen Veränderung eingeschränkt werden, um die Polymerasesynthese defizient zu machen. Die Erfindung soll auch nicht vom Ausmaß der Defizient eingeschränkt werden und zieht verschiedene veränderte Strukturen (primäre, sekundäre, etc.), sowie native Strukturen, die durch Synthesehemmstoffe gehemmt werden können, in Betracht.

[0035] Wo die Polymerasestruktur geändert ist, soll es keine Beschränkung durch Mittel geben, durch welche die Struktur verändert wird. Die Veränderung der nativen DNA-Sequenz kann eine Veränderung in einem einzigen Nukleotid sein. Die Veränderung der nativen DNA-Sequenz kann eine Deletion von einem oder mehreren Nukleotiden sein. Die Veränderung der nativen DNA-Sequenz kann eine Insertion eines oder mehrerer Nukleotide sein. In jedem dieser Fälle kann die Veränderung der DNA-Sequenz selbst als Veränderung der Aminosäuresequenz manifestiert sein.

[0036] In den Verfahren der vorliegenden Erfindung können 5'-Nukleasen aus verschiedenen Quellen verwendet werden. Die bevorzugten 5'-Nukleasen sind thermostabil. Thermostabile 5'-Nukleasen werden als besonders geeignet erachtet, da sie bei Temperaturen arbeiten, bei denen eine Nukleinsäurehybridisierung äußerst spezifisch ist, was einen allelspezifischen Nachweis zulässt (einschließlich Einzelbasen-Fehlpaarungen). In einer Ausführungsform sind die thermostabilen 5'-Nukleasen aus der Gruppe, ausgewählt aus veränderten Polymerasen, die aus nativen Polymerasen von Thermus aquaticus, Thermus flavus und Thermus thermophilus abstammen.

[0037] Wie oben erwähnt, zieht die vorliegende Erfindung die Verwendung geänderter Polymerasen in einem Nachweisverfahren in Betracht. Die vorliegende Erfindung ist in den Ansprüchen definiert und bezieht sich auf ein Nachweisverfahren für spezifische Zielnukleinsäuremoleküle, umfassend: a) das Bereitstellen: i) eines Spaltungsmittels, ii) einer Zielnukleinsäure, iii) eines ersten Oligonukleotids, der komplementär zu einem ersten Anteil der Zielnukleinsäure ist, iv) einer ersten festen Unterlage mit einem zweiten Oligonukleotid, bei dem ein Bereich komplementär zu einem zweiten Anteil der Zielnukleinsäure ist, der nicht-komplementäre Bereich des zweiten Oligonukleotids einen einzelsträngigen Arm an seinem 5'-Ende aufweist, ein Teil des 5'-Arms ein erstes Signaloligonukleotid aufweist, v) eine Vielzahl an „ungespaltenen" zweiten festen Unterlagen, von denen jede ein drittes Oligonukleotid umfasst, mit einem Bereich, der komplementär zu dem ersten Signaloligonukleotid ist, wobei die nicht-komplementäre Region des dritten Oligonukleotids einen einzelsträngigen Arm an seinem 5'-Ende aufweist mit einem Anteil des 5'-Arms, der ein zweites Signaloligonukleotid aufweist, und vi) eine Vielzahl an „ungespaltenen" dritten festen Unterlagen, von denen jede ein viertes Oligonukleotid aufweist mit einem Bereich, welcher komplementär zu dem zweiten Signaloligonukleotid ist, wobei der nicht-komplementäre Bereich des vierten Oligonukleotids an seinem 5'-Ende einen einzelsträngigen Arm aufweist, mit einem Anteil des 5'-Arms, der das erste Signaloligonukleotid aufweist; b) das Mischen des Spaltungsmittels, der Zielnukleinsäure des ersten Oligonukleotids und des zweiten Oligonukleotids unter Bedingungen, bei denen das erste Oligonukleotid und 3'-Ende des zweiten Oligonukleotids an die Ziel-DNA-Sequenz binden, so dass eine erste Spaltungsstruktur geschaffen wird und die Spaltung der ersten Spaltungsstruktur zur Freigabe des ersten Signaloligonukleotids führt; d) das Reagieren des freigegebenen ersten Signaloligonukleotids mit einem der vielzähligen zweiten festen Unterlagen unter solchen Bedingungen, dass das erste Signaloligonukleotid mit der komplementären Region des dritten Oligonukleotids hybridisiert, um eine zweite Spaltungsstruktur zu bilden und die Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur zu der Freigabe des zweiten Signaloligonukleotids und einer „gespaltenen" zweiten festen Unterlage, führt; e) das Reagieren des freigegebenen zweiten Signaloligonukleotids mit einem der vielzähligen dritten festen Unterlagen unter solchen Bedingungen, dass das zweite Signaloligonukleotid mit der komplementären Region des vierten Oligonukleotids hybridisiert, um eine dritte Spaltungsstruktur zu bilden und die Spaltung der dritten Spaltungsstruktur zu der Freigabe eines zweiten Moleküls des ersten Signaloligonukleotids und einer „gespaltenen" dritten festen Unterlage führt und h) das Nachweisen der Anwesenheit des ersten und zweiten Signaloligonukleotids.

[0038] Es ist bevorzugt, dass nach der Hybridisierung des ersten Signaloligonukleotids und der Freigabe des zweiten Signaloligonukleotids, das erste Signaloligonukleotid selbst von der „gespaltenen" zweiten festen Unterlage freigegeben wird und mit einer der vielzähligen „ungespaltenen" zweiten festen Unterlagen reagiert. Ebenso ist bevorzugt, dass nach der Hybridisierung des zweiten Signaloligonukleotids und der Freigabe des zweiten Moleküls des ersten Signaloligonukleotids das zweite Signaloligonukleotid selbst von der „gespaltenen" dritten festen Unterlage freigegeben wird und mit einer der vielzähligen „ungespaltenen" dritten festen Unterlagen reagiert. Die Begriffe "gespalten" und „ungespalten" sind nicht so zu verstehen, dass sie darauf hin-

weisen, dass die feste Unterlage (zum Beispiel eine Kugel) physikalisch gespalten oder nicht gespalten wird. Stattdessen ist dies so zu verstehen, dass dies auf den Status der an die feste Unterlage befestigen Oligonukleotide hinweist.

[0039] Eine „feste Unterlage" ist nicht auf einzelne und diskrete Unterlagen beschränkt. Beispielsweise ist ein Design möglich, bei dem die Oligos auf derselben festen Unterlage vorliegen, wenn auch separat in verschiedenen Regionen. Die feste Unterlage kann eine Mikrotiterplatte sein, bei der die Oligos in verschiedenen Bereichen der Platte befestigt (zum Beispiel covalent) sind oder diese überziehen (zum Beispiel nicht covalent).

[0040] Die vorliegende Erfindung ist in den Ansprüchen definiert und bezieht sich auf ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit eines spezifischen Zielnukleinsäuremoleküls, umfassend: a) das Bereitstellen: i) einer Zielnukleinsäure, ii) eines ersten Oligonukleotids, das komplementär zu einem ersten Anteil der Zielnukleinsäure ist, und iii) eines zweiten Oligonukleotids mit einer Region, welche komplementär zu einem zweiten Anteil der Zielnukleinsäure ist, wobei die nicht-komplementäre Region des zweiten Oligonukleotids einen einzelsträngigen Arm an seinem 5'-Ende aufweist; b) das Mischen der Zielnukleinsäure, des ersten Oligonukleotids und des zweiten Oligonukleotids unter Bedingungen, bei denen das erste Oligonukleotid und das 3'-Ende des zweiten Oligonukleotids an die Ziel-DNA-Sequenz binden, sodass eine erste Spaltungsstruktur geschaffen wird; c) das Bereitstellen eines Spaltungsmittels unter Bedingungen, bei denen die Spaltung der ersten Spaltungsstruktur vorzugsweise an einer Stelle innerhalb des zweiten Oligonukleotids auf eine Art stattfindet, die abhängig ist von der Bindung des ersten und zweiten Oligonukleotids an die Zielnukleinsäure, wobei der einzelsträngige Arm des zweiten Oligonukleotids ein drittes Oligonukleotid erzeugt; d) das Bereitstellen einer ersten Haarnadelstruktur mit einem einzelsträngigen 3'-Arm und einem einzelsträngigen 5'-Arm unter Bedingungen, bei denen das dritte Oligonukleotid an den einzelsträngigen 3'-Arm der ersten Haarnadelstruktur bindet, wobei eine zweite Spaltungsstruktur gebildet wird; e) das Bereitstellen von Bedingungen, bei denen die Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur durch das Spaltungsmittel stattfindet, wobei der einzelsträngige 5'-Arm der zweiten Spaltungsstruktur freigegeben wird, um Reaktionsprodukte, umfassend ein viertes Oligonukleotid und ein erstes gespaltenes Haarnadeldetektionsmolekül, zu bilden; f) das Bereitstellen einer zweiten Haarnadelstruktur mit einem einzelsträngigen 3'-Arm und einem einzelsträngigen 5'-Arm unter Bedingungen, bei denen das vierte Oligonukleotid an dem einzelsträngigen 3'-Arm der zweiten Haarnadelstruktur bindet, wobei eine dritte Spaltungsstruktur gebildet wird; g) das Bereitstellen von Bedingungen, bei denen die Spaltung der dritten Spaltungsstruktur durch das Spaltungsmittel stattfindet, wobei der einzelsträngige 5'-Arm der dritten Spaltungsstruktur freigegeben wird, um Reaktionsprodukte, umfassend ein fünftes Oligonukleotid, das in der Sequenz identisch zu dem dritten Oligonukleotid ist, und ein zweites gespaltenes Haarnadeldetektionsmolekül, zu bilden; und h) das Nachweisen der Anwesenheit der ersten und zweiten gespaltenen Haarnadeldetektionsmoleküle.

[0041] Das Nachweisverfahren ermöglicht den Nachweis von spezifischen Zielnukleinsäuresequenzen, die in einer Probe vorhanden sind, ohne, dass die Anzahl der Zielkopien vor dem Nachweis amplifiziert werden muss. In diesem Verfahren werden die Schritte d) bis g) des Verfahrens mindestens einmal wiederholt.

[0042] Das Spaltungsmittel umfasst ein Spaltungsenzym, welches eine geänderte thermostabile DNA-Polymerase mit verringerter Synthesefähigkeit aufweist, das heißt, eine von einer thermostabilen DNA-Polymerase abgeleitete 5'-Nuklease. Obgleich ein völliges Fehlen der Synthese nicht erforderlich ist, ist es wünschenswert, dass die Spaltungsreaktionen in Abwesenheit von Polymeraseaktivität erfolgt, die auf einem Niveau liegt, die die für den Nachweis erforderlichen Unterscheidungsfähigkeit beeinträchtigen könnte.

[0043] Obgleich die Spaltung in dem Nachweisverfahren unabhängig von der Anlagerung der Oligonukleotide stattfinden kann, so ist es dennoch wünschenswert, dass die Spaltung primerabhängig erfolgt. Mit anderen Worten, es ist gewünscht, dass die Spaltungsreaktionen in den Schritten c), e) und g) nicht ohne die Anlagerung des entsprechenden ersten Oligonukleotids, dritten Oligonukleotids und vierten Oligonukleotids erfolgen.

[0044] Obgleich die Spaltung ortsspezifisch erfolgt, so ist die Spaltung an einer Vielzahl an Orten möglich. Die Spaltungsreaktion in Schritt c) kann innerhalb des angelagerten Teils des zweiten Oligonukleotids oder innerhalb des nicht angelagerten Teils des zweiten Oligonukleotids stattfinden.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0045] Fig. 1A zeigt ein Schema eines Nachweisverfahrens.

[0046] Fig. 1B zeigt ein Schema eines weiteren Nachweisverfahrens.

[0047] **Fig.** 2 ist ein Vergleich der Nukleotidstruktur des DNAP Genes, isoliert aus Thermus aquaticus, Thermus flavus und Thermus thermophilus; die Consensus-Sequenz ist oberhalb jeder Reihe dargestellt.

[0048] **Fig.** 3 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenz von DNAP, isoliert aus Thermus aquaticus, Thermus flavus und Thermus thermophilus; die Consensus-Sequenz ist oberhalb jeder Reihe dargestellt.

[0049] Die **Fig.** 4A–G sind eine Reihe von Diagrammen von Wildtyp und Synthese-Defizienten DNAP Taq-Genen.

[0050] **Fig.** 5A stellt das Wildtyp Thermus flavus-Polymerase-Gen dar.

[0051] **Fig.** 5B stellt ein Synthese-defizientes Thermus flavus-Polymerase-Gen dar.

[0052] Fig. 6 stellt eine Struktur dar, die nicht unter Verwendung von DNAP Taq amplifiziert werden kann.

[0053] Fig. 7 ist ein mit Ethidium-Bromid-gefärbtes Gel, welches die Versuche demonstriert, einen gegabelten Duplex unter Verwendung von DNAP Taq oder DNAPStf zu amplifizieren.

[0054] Fig. 8 ist ein Autoradiogramm eines Geles, welches die Spaltung eines gegabelten Duplexes durch DNAP Taq und das Fehlen einer Spaltung durch DNAPStf analysiert.

[0055] Die Fig. 9A–B sind eine Reihe von Autoradiogrammen von Gelen, welche die Spaltung oder das Fehlen der Spaltung nach Zugabe verschiedener Reaktionskomponenten und der Änderung der Inkubationstemperatur während der Versuche, einen gegabelten Duplex mit DNAP Taq zu spalten, analysieren.

[0056] Die Fig. 10A–B sind ein Autoradiogramm, welches zeitlich festgelegte Spaltungsreaktionen mit und ohne Primer darstellen.

[0057] Die Fig. 11A–B sind eine Reihe von Autoradiogrammen von Gelen, welche die Versuche, einen gegabelten Duplex (mit und ohne Primer) mit verschiedenen DNAPs zu spalten, darstellen.

[0058] Die Fig. 12A zeigen die Substrate und Oligonukleotide, welche verwendet wurden, um die spezifische Spaltung von Substrat DNAs, die durch Pilot-Oligonukleotide angezielt werden, zu untersuchen.

[0059] Fig. 12B zeigt ein Autoradiogramm eines Geles, welches die Ergebnisse von Spaltungsreaktionen unter Verwendung der Substrate und Oligonukleotide, die in Fig. 12A verwendet wurden, zeigt.

[0060] Fig. 13A zeigt die Substrate und Oligonukleotide, welche verwendet wurden, um die spezifische Spaltung einer Substrat RNA zu untersuchen, welche für Pilot-Oligonukleotide das Ziel ist.

[0061] Fig. 13B zeigt ein Autoradiogramm eines Geles, welches die Ergebnisse einer Spaltungsreaktion unter Verwendung der Substrate und Oligonukleotide, wie sie in Fig. 13A gezeigt sind, darstellt.

[0062] Fig. 14 ist ein Diagramm des Vektors pTTQ18.

[0063] Fig. 15 ist ein Diagramm des Vektors pET-3c.

[0064] **Fig.** 16A–E zeigt eine Reihe von Molekülen, welche geeignete Substrate für die Spaltung durch die 5'-Nukleaseaktivität von DNAPs sind.

[0065] Fig. 17 ist ein Autoradiogramm eines Geles, welches die Ergebnisse einer Spaltungsreaktion zeigt, welche mit Synthese-defizienten DNAPs durchgeführt wurde.

[0066] Fig. 18 ist ein Autoradiogramm eines PEI-Chromatogramms, welches die Produkte eines Assays auf synthetische Aktivität in Synthese-defizienten DNAP Taq-Klonen auflöst.

[0067] Fig. 19A zeigt das Substratmolekül, welches verwendet wurde, um die Fähigkeit von Synthese-defizienten DNAPs zur Spaltung kurzer Haarnadelstrukturen zu untersuchen.

[0068] Fig. 19B zeigt ein Autoradiogramm eines Gels, welches die Produkte einer Spaltungsreaktion auflöst,

welche unter Verwendung der in Fig. 19A gezeigten Substrate durchgeführt wurde.

[0069] Fig. 20A zeigt die A- und T-Haarnadelmoleküle, die in dem Trigger/Nachweis-Assay verwendet wurden.

[0070] Fig. 20B zeigt die Sequenz des Alpha-Primers, der in dem Trigger/Nachweis-Assay verwendet wurde.

[0071] Fig. 20C zeigt die Struktur der gespaltenen A- und T-Haarnadelmoleküle.

[0072] Fig. 20D zeigt die Komplementarität zwischen den A- und T-Haarnadelmolekülen.

[0073] Fig. 21 zeigt die vollständige 206-er Duplexsequenz, die als Substrat für die 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung verwendet wurden.

[0074] Die Fig. 22A und B zeigen die Spaltung von linearen Nukleinsäuresubstraten (basierend auf der 206-er aus Fig. 21) durch Wildtyp DNAPs und 5'-Nukleasen, die aus Thermus aquaticus und Thermus flavus isoliert wurden.

[0075] Fig. 23 zeigt ein detailliertes Schema, welches einem Nachweisverfahren entspricht.

[0076] Fig. 24 zeigt die Ausbreitung der Spaltung der linearen Duplexnukleinsäurestrukturen aus Fig. 23 durch die 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung.

[0077] Fig. 25A zeigt das „Knabber"-Phänomen, welches mit den DNAPs der vorliegenden Erfindung festzustellen ist.

[0078] Fig. 25B zeigt, dass das „Knabbern" in Fig. 25A eine 5'-nucleolytische Spaltung und keine Phosphatase-Spaltung ist.

[0079] **Fig.** 26 zeigt, dass das „Knabber"-Phänomen Duplexabhängig ist.

[0080] Fig. 27 ist ein Schema, welches zeigt, wie das „Knabbern" in einem Nachweisassay verwendet werden kann.

[0081] **Fig.** 28 zeigt, dass das „Knabbern" vom Ziel abhängig gemacht werden kann.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0082] Die vorliegende Erfindung ist in den Ansprüchen definiert und bezieht sich auf Mittel zur Spaltung einer Nukleinsäurespaltungsstruktur auf eine positionsspezifische Art und Weise. Insbesondere bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Spaltungsenzym, welches eine 5'-Nukleaseaktivität ohne störender Fähigkeit zur Nukleinsäuresynthese aufweist.

[0083] Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren bereit, bei denen aus thermostabilen DNA-Polymerasen abgeleitete 5'-Nukleasen verwendet werden können, welche eine veränderte DNS-synthetische Aktivität im Vergleich zu natürlichen thermostabilen DNA-Polymerasen aufweisen. Die 5'-Nukleaseaktivität der Polymerase ist erhalten, während die synthetische Aktivität verringert ist oder fehlt. Solche 5'-Nukleasen sind in der Lage, die strukturspezifische Spaltung von Nukleinsäuren in Abwesenheit von störender synthetischer Aktivität zu katalysieren. Das Fehlen der synthetischen Aktivität während der Spaltungsreaktion führt zu Nukleinsäurespaltungsprodukten von gleicher Größe.

[0084] Die Polymerasen können in einem Verfahren zu Feststellung spezifischer Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Dieses Verfahren basiert auf der Amplifikation der Nachweismoleküle, statt auf der Amplifikation der Zielsequenz selbst, wie dies bei den existierenden Verfahren zum Nachweis spezifischer Zielsequenzen der Fall ist.

[0085] DNA-Polymerasen (DNAPs), beispielsweise solche, die aus E. coli oder aus thermophilen Bakterien der Gattung Thermus isoliert wurden, sind Enzyme, welche neue DNA-Stränge synthetisieren. Verschiedene der bekannten DNAPs enthalten zusätzlich zu der synthetischen Aktivität des Enzyms assoziierte nuklease Aktivitäten.

[0086] Es ist bekannt, dass einige DNAPs Nukleotide von den 5'- und 3'-Enden der DNA-Stränge enfernen [Kornberg, DNA Replication, W. H. Freeman and Co., San Francisco, Seiten 127–139 (1980)]. Diese Nuklease-Aktivitäten werden üblicherweise entsprechend als 5'-Exonukleasen- und 3'-Exonukleasenaktivitäten bezeichnet. Beispielsweise nimmt die 5'-Exonukleaseaktivität, welche in der N-terminalen Domäne verschiedener DNAPs lokalisiert ist, an der Entfernung der RNA-Primer während der nacheilenden Strangsynthese, während der DNA-Replikation und der Entfernung geschädigter Nukleotide während der Reparatur, teil. Einige DNAPs, beispielsweise die E. coli DNA-Polymerase (DNAPEc1), haben ebenfalls eine 3'-Exonuklease-Aktivität, die für das Korrekturlesen während der DNA-Synthese verantwortlich ist (Kornberg, supra).

[0087] Eine aus Thermus aquaticus isolierte DNAP, die als Taq DNA-Polymerase (DNAP Taq) bezeichnet wird, hat eine 5'-Exonuklease-Aktivität, ihr fehlt jedoch eine funktionale 3'-exonucleolytische Domäne. [Tindall und Kunkell, Biochem. 27:6008 (1988)]. Die Derivate der DNAPEc1 und DNAP Taq, werden entsprechend als Klenow und Stoffel-Fragmente bezeichnet, denen 5'-Exonuklease-Domänen als Ergebnis einer enzymatischen oder genetischen Manipulation fehlen [Brutlag et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 37:982 (1969); Erlich et al., Science 252:1643 (1991); Setlow und Kornberg, J. Biol. Chem. 247:232 (1972)].

[0088] Für die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNAP Taq wurde beschrieben, dass sie eine gleichzeitige Synthese erfordert [Gelfand, PCR Technology-Principles and Applications for DNA Amplification (H. A. Erlich, Ed.), Stockton Press, New York, Seite 19 (1989)]. Obgleich überwiegend Mononukleotide unter den Produkten des Verdaus durch die 5'-Exonuklease der DNAP Taq und DNAPEc1 vorliegen, so können doch auch kürzere Oligonukleotide (≤ 12 Nukleotide) beobachtete werden, was impliziert, dass diese sog. 5'-Exonukleasen auch endonukleolytisch wirken können [Setlow, supra; Holland et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 88:7276 (1991)].

[0089] In der WO 92/06200 zeigten Gelfand et al., dass das bevorzugte Substrat der 5'-Exonuklease-Aktivität der thermostabilen DNA-Polymerase verlagerte einzelsträngige DNA ist. Es findet eine Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen zwischen der verlagerten einzelsträngigen DNA und der doppel-helikalen DNA statt, mit der bevorzugten Exonukleasespaltungsstelle an der Phosphodiesterbrücke in der doppel-helikalen Region. Demnach ist die 5'-Exonuklease-Aktivität, die gewöhnlich mit DNAPs assoziiert ist, eine strukturabhängige einzelsträngige Endonuklease und besser als 5'-Nuklease zu bezeichnen. Exonukleasen sind Enzyme, welche Nukleotidmoleküle von den Enden der Nukleinsäuremoleküle abspalten. Dem gegenüber sind Endonukleasen Enzyme, welche die Nukleinsäuremoleküle im Inneren, statt an den Enden, spalten. Die mit einigen thermostabilen DNA-Polymerasen verbundene Nukleaseaktivität spaltet endonukleolytisch, jedoch erfordert diese Spaltung Kontakt mit dem 5'-Ende des zu spaltenden Moleküls. Deshalb werden diese Nukleasen als 5'-Nukleasen bezeichnet.

[0090] Wenn eine 5'-Nuklease-Aktivität mit einer DNA-Polymerase des eubakteriellen Typen A verbunden ist, so konnte festgestellt werden, dass sie in der 1/3 N-terminalen Region des Proteins als unabhängige funktionale Domäne vorliegt. Die C-terminalen 2/3 des Moleküls bilden die Polymerisationsdomäne, welche für die Synthese der DNA verantwortlich ist. Einige DNA-Polymerasen des Typen A haben ebenfalls eine 3'-Exonuklease-Aktivität, die mit der 2/3 C-terminalen Region des Moleküls verbunden ist.

[0091] Die 5'-Exonuklease-Aktivität und die Polymerisationsaktivität der DNAPs wurde durch proteolytische Spaltung oder genetische Manipulationen des Polymerasenmoleküls voneinander getrennt. Bisher wurden thermostabile DNAPs modifiziert, um die Menge der 5'-Nuklease-Aktivität zu entfernen oder zu reduzieren, während die Polymeraseaktivität im Takt bleibt.

[0092] Das Klenow- oder große proteolytische Spaltfragment der DNAPEc1 enthält die Polymerase- und 3'-Exonuklease-Aktivität, jedoch fehlt die 5'-Nuklease-Aktivität. Dem Stoffel-Fragment der DNAP Taq fehlt die 5'-Nuklease-Aktivität wegen einer genetischen Manipulation, welche die N-terminalen 289 Aminosäuren des Polymerasenmoleküls entfernte [Erlich et al., Science 252:1643 (1991)]. WO 92/06200 beschreibt eine thermostabile DNAP mit einem geänderten Niveau an 5'- zu 3'-Exonuklease. Das U. S.-Patent Nr. 5,108,892 beschreibt eine Thermus aquaticus DNAP ohne einer 5'- zu 3'-Exonuklease. Jedoch fehlt der Molekularbiologie eine thermostabile DNA-Polymerase mit einem verminderten Maße an synthetischer Aktivität.

[0093] Es können 5'-Nukleasen, die von thermostabilen DNA-Polymerasen des Typen A abgeleitet sind, welchen die 5'-Nuklease-Aktivität erhalten ist, jedoch reduzierte oder fehlende synthetische Aktivität aufweisen, verwendet werden. Die Fähigkeit, die synthetische Aktivität des Enzyms von der 5'-Nukleasen-Aktivität abzukoppeln, beweist, dass die 5'-Nuklease-Aktivität keine parallele DNA-Synthese erfordert, wie es vorher beschrieben wurde (Gelfand, PCR Technology, supra).

[0094] Die Beschreibung der Erfindung ist unterteilt in: I. Nachweis von spezifischen Nukleinsäuresequenzen unter Verwendung von 5'-Nukleasen; II. Herstellung von 5'-Nukleasen, abgeleitet aus thermostabilen DNA-Polymerasen; III. Therapeutische Verwendungen von 5'-Nukleasen; und IV. Nachweis von Antigenen oder Nukleinsäurezielen durch ein Doppel-Fang-Assay. Zum leichteren Verständnis der Erfindung werden nachfolgend eine Reihe von Begriffen definiert.

[0095] Der Begriff „Gen" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die Steuerungs- und Kodierungssequenzen umfasst, die für die Herstellung eines Polypeptids oder eines Vorläufers notwendig sind. Das Polypeptid kann von einer Kodierungssequenz in voller Länge oder durch einen beliebigen Anteil der Kodierungssequenz kodiert sein, solange die gewünschte Enzymaktivität erhalten bleibt.

[0096] Der Begriff „Wildtyp" bezieht sich auf ein Gen oder ein Genprodukt, das die Eigenschaften dieses Gens oder Genproduktes aufweist, wenn es aus einer natürlich-vorkommenden Quelle isoliert wird. Im Unterschied dazu beziehen sich die Begriffe „modifiziert" oder „mutant" auf ein Gen oder Genprodukt, das im Vergleich zum Wildtyp-Gen oder Genprodukt veränderte Eigenschaften aufweist. Es ist erwähnenswert, dass natürlich-vorkommende Mutanten isoliert werden können; sie werden anhand der Tatsache identifiziert, dass sie veränderte Eigenschaften aufweisen, wenn sie mit dem Wildtyp-Gen oder Genprodukt verglichen werden.

[0097] Der Begriff „recombinanter DNA-Vektor", wie hierin verwendet, bezieht sich auf DNS-Sequenzen enthaltend eine gewünschte Kodierungssequenz und geeignete DNA-Sequenzen, die für die Expression der funktional verknüpften Kodierungssequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus erforderlich ist. Für die Expression in den Prokaryonten erforderlichen DNA-Sequenzen umfassen einen Promoter, optional eine Operator-Sequenz, eine Ribosomen-Bindungsstelle und gegebenenfalls weitere Sequenzen. Eucaryontische Zellen verwenden bekannterweise Promotoren, Polyadenlyierungssignale und Enhancer.

[0098] Der Begriff „Oligonukleotid", wie hierin verwendet, ist definiert als ein Molekül, das aus zwei oder mehreren Deoxyribonukleotiden oder Ribonukleotiden zusammengesetzt ist, vorzugsweise aus mehr als drei und üblicherweise mehr als 10. Die genaue Größe richtet sich nach vielen Faktoren, die ihrerseits wiederum von der letztendlichen Funktion oder Verwendung des Oligonukleotids abhängen. Das Oligonukleotid kann auf jede beliebige Weise hergestellt werden, einschließlich durch chemische Synthese, DNA-Replication, reverse Transkription oder eine Kombination davon.

[0099] Da Mononukleotide zur Herstellung von Oligonukleotiden auf eine Weise in Reaktion gebracht werden, dass das 5'-Phosphat eines Mononukleotidpentoserings an dem 3'-Sauerstoff seines Nachbarn in eine Richtung über eine Phosphodiesterverknüpfung angebracht wird, wird ein Ende eines Oligonukleotids als das „5'-Ende" bezeichnet, wenn sein 5'-Phosphat nicht mit dem 3'-Sauerstoff eines Mononukleotidpentoserings verknüpft ist, und als das „3'-Ende", wenn sein 3'-Sauerstoff nicht mit einem 5'-Phosphat eines nachfolgenden Mononukleotidpentoserings verknüpft ist. Wie hierin verwendet, kann auch eine Nukleinsäuresequenz, selbst wenn sie sich innerhalb eines größeren Oligonukleotids befindet, 5'- und 3'-Enden aufweisen.

[0100] Wenn zwei verschiedene, nicht-überlappende Oligonukleotide durch eine Anlagerung an verschiedene Bereiche derselben linearen komplementären Nukleinsäuresequenz gebunden werden und das 3'-Ende eines Oligonukleotids zum 5'-Ende des anderen zeigt, kann ersteres als das „stromaufwärts gelegene" Oligonukleotid und letzteres als „stromabwärts gelegenes" Oligonukleotid bezeichnet werden.

[0101] Der Begriff „Primer" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, das als Anfangspunkt einer Synthese dienen kann, wenn es unter Bedingungen platziert wird, in denen eine Primerverlängerung ausgelöst wird. Ein Oligonukleotid- „Primer" kann natürlicherweise auftreten, wie bei einem gereinigten Restriktionsverdau, oder kann synthetisch hergestellt werden.

[0102] Ein Primer wird ausgewählt, um „im Wesentlichen" zu einem Strang einer bestimmten Sequenz der Vorlage komplementär zu sein. Ein Primer muss ausreichend komplementär sein, um mit einem Vorlagestrang hybridisieren zu können, damit eine Primerverlängerung stattfindet. Eine Primersequenz braucht nicht die exakte Sequenz der Vorlage wiederzugeben. Beispielsweise kann ein nicht-komplementäres Nukleotidfragment an das 5'-Ende des Primers angebracht sein, wobei die übrige Primersequenz im Wesentlichen zu dem Strang komplementär ist. In dem Primer können nicht-komplementäre Basen oder längere Sequenzen eingestreut sein, vorausgesetzt, die Primersequenz weist ausreichende Komplementarität mit der Sequenz der Vorlage auf, um zu hybridisieren und dadurch einen Vorlage-Primer-Komplex zur Synthese des Verlängerungsproduktes des Primers auszubilden.

[0103] Das Gegenstück einer Nukleinsäuresequenz, wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Oligonukleotid, das sich, wenn es mit der Nukleinsäuresequenz derart ausgerichtet ist, dass das 5'-Ende einer Sequenz eine Paarung mit dem 3'-Ende der anderen Sequenz eingeht, in einer „antiparallelen Verbindung" befindet. In den Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung können bestimmte, bei natürlichen Nukleinsäuren selten vorkommende Basen vorhanden sein, und umfassen beispielsweise Inosin und 7-Deazaguanin. Die Komplementarität braucht nicht perfekt zu sein; stabile Doppelstränge können fehlgepaarte Basenpaare oder Basen ohne Paarung aufweisen. Ein Fachmann aus dem Bereich der Nukleinsäuretechnologie kann Doppelstrangstabilität empirisch ermitteln, indem er eine Reihe von variablen, einschließlich beispielsweise die Länge des Oligonukleotids, die Basenzusammensetzung und die Sequenz des Oligonukleotids, die Ionenstärke und die Inzidenz von Basenpaaren mit Fehlpaarung, berücksichtigt.

[0104] Die Stabilität eines Nukleinsäuredoppelstranges wird durch die Schmelztemperatur oder „T_m" gemessen. Die T_m eines bestimmten Nukleinsäuredoppelstranges unter spezifischen Bedingungen ist die Temperatur, bei der durchschnittlich die Hälfte der Basenpaare dissoziiert sind.

[0105] Der Begriff „Sonde", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein markiertes Oligonukleotid, welches mit einer Sequenz einer anderen Nukleinsäure eine Duplexstruktur wegen der Komplementarität von mindestens einer Sequenz in der Probe mit einer Sequenz in der anderen Nukleinsäure bildet.

[0106] Der Begriff „Marker", wie hierin verwendet, bezieht sich auf jedes Atom oder Molekül, das verwendet werden kann, um ein nachweisbares (vorzugsweise quantifizierbares) Signal bereitzustellen, das an eine Nukleinsäure oder ein Protein angebracht werden kann. Marker können Signale liefern, die durch Fluoreszenz, Radioaktivität, Kolorimetrie, Gravimetrie, Röntgenbeugung oder Absorbtion, Magnetismus, enzymatische Aktivität und dergleichen nachweisbar sind.

[0107] Der Begriff „Spaltungsstruktur", wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine Nukleinsäurestruktur, welche Substrat für die Spaltung durch die 5'-Nuklease-Aktivität der DNAP ist.

[0108] Der Begriff „Spaltungsmittel", wie hierin verwendet, bezieht sich auf jegliches Mittel, welches in der Lage ist, eine Spaltungsstruktur auf eine bestimmte Art und Weise zu spalten. Das Spaltungsmittel kann natürliche DNAPs mit 5'-Nuklease-Aktivität umfassen, und umfasst insbesondere modifizierte DNAPs mit 5'-Nuklease-Aktivität, denen jedoch synthetische Aktivität fehlt.

[0109] Der Begriff „freisetzend", wie hierin verwendet, bezieht sich auf die Freisetzung eines Nukleinsäurefragments von einem größeren Nukleinsäurefragment, wie beispielsweise eines Oligonukleotids, indem eine 5'-Nuklease derart wirkt, dass das freigesetzte Fragment nicht länger covalent an den Rest des Oligonukleotids gebunden ist.

[0110] Der Begriff „Substratstrang", wie hierin verwendet, bezeichnet den Strang der Nukleinsäure in einer Spaltungsstruktur, in dem die Spaltung, die durch die 5'-Nuklease-Aktivität vermittelt wird, stattfindet.

[0111] Der Begriff „Vorlagenstrang" wie hierin verwendet, bezeichnet den Nukleinsäurestrang einer Spaltungsstruktur, welcher zumindest partiell-komplementär zu dem Substratstrang ist und welcher an den Substratstrang bindet, um die Spaltungsstruktur zu bilden.

[0112] Der Begriff „K_m", wie hierin verwendet, bezieht sich auf die Michaelis-Menten-Konstante für ein Enzym und ist definiert als die Konzentration des spezifischen Substrates, bei der das Enzym in einer enzymkatalysierten Reaktion die Hälfte seiner maximalen Geschwindigkeit erreicht.

I. NACHWEIS SPEZIFISCHER NUKLEINSÄURESEQUENZEN MIT HILFE VON 5'-NUKLEASEN

[0113] 5'-Nukleasen können in Nachweisassays zur Identifizierung spezifischer Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Dieses Nachweissystem gibt Aufschluss über die Anwesenheit spezifischer Nukleinsäuresequenzen, in dem es die Anlagerung von zwei Oligonukleotidsonden an zwei Bereiche der Zielsequenz erfordert. Der Begriff „Zielsequenz" oder „Zielnukleinsäuresequenz", wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine spezifische Nukleinsäuresequenz mit einer Polynukleotidsequenz, wie beispielsweise genomische DNA oder RNA, welche nachgewiesen, gespalten, oder beides, werden soll.

[0114] Fig. 1A zeigt ein Schema der Nachweismethode. Die Zielsequenz wird durch zwei bestimmte Oligonukleotide in der Auslöser- oder Auslösungsreaktion erkannt. Es ist bevorzugt, dass einer dieser Oligonukleo-

tide auf einer festen Oberfläche bereitgestellt wird. Der Andere kann in freier Form bereitgestellt sein. In Fig. 1A ist der freie Oligo als „Primer" bezeichnet und der andere Oligo ist befestigt an einer Kugel und als Typ 1 bezeichnet, gezeigt. Die Zielnukleinsäure bindet die beiden Oligonukleotide für die spezifische Spaltung des 5'-Armes (des Oligos an der Kugel 1) mittels der DNAPs der vorliegenden Erfindung (in Fig. 1A nicht gezeigt).

[0115] Die Spaltstelle (angedeutet durch eine große fette Pfeilspitze) wird durch den Abstand zwischen dem 3'-Ende des „Primers" und der stromabwärts gelegenen Gabel des Oligos an der Kugel 1 kontrolliert. Letzterer ist mit einer nicht abspaltbaren Region (durch die Streifung angedeutet) designed. Auf diese Art und Weise ist keiner der Oligonukleotide bei nicht richtiger Anlagerung oder fehlender Befestigung an der Zielnukleinsäure einer Spaltung ausgesetzt.

[0116] Bei erfolgreicher Spaltung wird eine Einzelkopie freigegeben, die als Alphasignaloligo bezeichnet wird. Dieser Oligo kann eine nachweisbare Gruppe (zum Beispiel Fluorescin) enthalten. Andererseits kann er auch unmarkiert sein.

[0117] Es können zwei weitere Oligonukleotide auf festen Unterlagen bereitgestellt sein. Das in Fig. 1A an Kugel 2 dargestellte Oligonukleotid hat eine Region, die komplementär zu dem Alphasignaloligo (angedeutet als Alphaprime) ist und die Hybridisierung ermöglicht. Diese Struktur kann durch DNAPs der vorliegenden Erfindung gespalten werden, um den Betasignaloligo freizugeben. Der Betasignaloligo kann dann an die Typ 3 Kugeln mit einem Oligo, welcher eine komplementäre Region (angedeutet als Betaprime) aufweist, hybridisieren. Außerdem kann diese Struktur durch die DNAPs der vorliegenden Erfindung gespalten werden, um einen neuen Alphaoligo freizugeben.

[0118] An diesem Punkt ist die Amplifikation linear geworden. Um die Leistung des Verfahrens zu erhöhen, ist es wünschenswert, dass der Alphasignaloligo, der an die Kugel des Types 2 hybridisiert, nach der Freigabe des Betaoligo freigegeben wird, sodass er weitermachen kann, um mit anderen Oligos auf den Typ 2 Kugeln zu hybridisieren. In gleicher Weise ist es erwünscht, dass nach der Freigabe eines Alphaoligos von den Typ 3 Kugeln der Betaoligo freigegeben wird.

[0119] Die Freigabe von „gefangenen" Signaloligos kann mittels einer Reihe von Wegen erreicht werden. Erstens wurde herausgefunden, dass die DNAPs der vorliegenden Erfindung eine wirkliche 5'-Exonuklease haben, die in der Lage ist, das 5'-Ende des Alpha-(und Beta)-Primeoligos „anzuknabbern" (wird nachfolgend weiter unten detaillierter diskutiert). Das heißt, dass unter angemessenen Bedingungen die Hybridisierung durch Anknabbern mittels DNAP destabilisiert wird. Zweitens kann der Alpha-Alphaprime (genauso wie Beta-Betaprime)-Komplex durch Hitze (zum Beispiel periodische Wärmezufuhr) destabilisiert werden.

[0120] Durch die Freisetzung von Signaloligos mittels solcher Techniken führt jede Spaltung zu einer Verdoppelung der Anzahl der Signaloligos. Auf diese Art und Weise können schnell nachweisbare Signale erreicht werden.

[0121] Fig. 1B zeigt ein Schema eines anderen Nachweisverfahrens. Erneut wird die Zielsequenz durch zwei bestimmte Oligonukleotide in der auslösenden oder Auslösungsreaktion erkannt und die Zielnukleinsäure bindet sich an die beiden Oligonukleotide für die spezifische Spaltung des 5'-Arms mittels der DNAPs der vorliegenden Erfindung (nicht in der Fig. 1B gezeigt). Der erste Oligo ist vollständig-komplementär zu einem Teil der Zielsequenz. Der zweite Oligonukleotid ist teilweise-komplementär zu der Zielsequenz; das 3'-Ende des zweiten Oligonukleotids ist vollständig-komplementär zu der Zielsequenz, während das 5'-Ende nicht komplementär ist und einen einzelsträngigen Arm bildet. Das nicht komplementäre Ende des zweiten Oligonukleotids kann eine generische Sequenz sein, welche mit einer Reihe von Standardhaarnadelstrukturen (weiter unten beschrieben) verwendet werden kann. Der Nachweis verschiedener Zielsequenzen würde einzigartige Anteile von beiden Oligonukleotiden erfordern; das gesamte erste Oligonukleotid und das 3'-Ende des zweiten Oligonukleotids. Der 5'-Arm des zweiten Oligonukleotids kann unverändert oder eine generische Sequenz sein.

[0122] Die Anlagerung des ersten und zweiten Oligonukleotids aneinander entlang der Zielsequenz bildet eine gegabelte Spaltungsstruktur, welche ein Substrat für die 5'-Nuklease der DNA-Polymerasen ist. Die ungefähre Lokalisation des Spaltungsortes ist erneut durch einen großen fetten Pfeilkopf in Fig. 1B angedeutet.

[0123] Die 5'-Nukleasen der Erfindung sind in der Lage, diese Struktur zu spalten, sie sind jedoch nicht in der Lage, die Verlängerung des 3'-Endes des ersten Oligonukleotids zu polymerisieren. Das Fehlen der Polymerisationsaktivität ist vorteilhaft, da die Verlängerung des ersten Oligonukleotids zu einer Verlagerung der angelagerten Region des zweiten Oligonukleotids führt und den Spaltungsort entlang des zweiten Oligonukleotids

bewegt. Wenn eine Polymerisation in irgendeiner signifikanten Menge zugelassen wird, würden Spaltungsprodukte mit unterschiedlichen Längen gebildet werden. Es ist ein Spaltungsprodukt von gleicher Länge gewünscht, da dieses Spaltungsprodukt die Nachweisreaktion iniziiert.

[0124] Die Auslösungsreaktion kann unter Bedingungen stattfinden, die eine zyklische Wärmezufuhr erlauben. Eine zyklische Wärmezufuhr zu der Reaktion erlaubt eine logarithmische Erhöhung der Menge der Auslösungsoligonukleotide, die in der Reaktion freigegeben werden.

[0125] Der zweite Teil des Nachweisverfahrens ermöglicht die Anlagerung des Fragments des zweiten Oligonukleotids, das durch die Spaltung der ersten Spaltungsstruktur, die in der Auslösungsreaktion gebildet wurde (bezeichnet als Dritte oder Auslöseroligonukleotide), an eine erste Haarnadelstruktur. Die erste Haarnadelstruktur hat einen einzelsträngigen 5'-Arm und einen einzelsträngigen 3'-Arm. Das dritte Oligonukleotid löst die Spaltung dieser ersten Haarnadelstruktur durch Anlagerung an den 3'-Arm der Haarnadel aus, wobei ein Substrat für die Spaltung durch die 5'-Nuklease der vorliegenden Erfindung gebildet wird. Die Spaltung dieser ersten Haarnadelstruktur generiert zwei Reaktionsprodukte: 1) Den gespaltenen 5'-Arm der Haarnadel, der als viertes Oligonukleotid bezeichnet wird, und 2) Die gespaltene Haarnadelstruktur, welche jetzt nicht mehr den 5'-Arm aufweist und von der Größe her kleiner ist, als die ungespaltene Haarnadel. Diese gespaltene erste Haarnadel kann als Nachweismolekül verwendet werden, um darauf hinzuweisen, dass die Spaltung durch das Auslöser- oder dritte Oligonukleotid stattgefunden hat. Somit weist dies daraufhin, dass die ersten beiden Oligonukleotide die Zielsequenz gefunden und sich an diese angelagert haben, was auf die Anwesenheit der Zielsequenz in der Probe damit hinweist.

[0126] Die Nachweisprodukte werden durch die Anlagerung des vierten Oligonukleotids an die zweite Haarnadelstruktur amplifiziert. Diese Haarnadelstruktur hat einen 5'-einzelsträngigen Arm und einen 3'-einzelsträngigen Arm. Der durch die Spaltung der ersten Haarnadelstruktur gebildete vierte Oligonukleotid lagert sich an den 3'-Arm der zweiten Haarnadelstruktur an, wodurch eine dritte Spaltungsstruktur gebildet wird, die durch die 5'-Nuklease erkannt wird. Die Spaltung dieser zweiten Haarnadelstruktur generiert ebenfalls zwei Reaktionsprodukte: 1) den abgespaltenen 5'-Arm der Haarnadel, der als fünftes Oligonukleotid bezeichnet wird, welches ähnlich oder identisch zu der Sequenz des dritten Nukleotids ist, und 2) die gespaltene zweite Haarnadelstruktur, welcher nun der 5'-Arm fehlt und welche im Vergleich zu der ungespaltenen Haarnadel von der Größe her kleiner ist. Diese gespaltene zweite Haarnadel kann als Nachweismolekül fungieren und das durch die Spaltung der ersten Haarnadelstruktur generierte Signal amplifizieren. Gleichzeitig kann mit der Anlagerung des vierten Oligonukleotids das dritte Oligonukleotid von dem gespaltenen ersten Haarnadelmolekül dissoziieren, so dass es frei ist, um an eine neue Kopie der ersten Haarnadelstruktur zu binden. Die Dissoziation der Oligonukleotide von den Haarnadelstrukturen kann durch Erwärmung oder andere Mittel, die für die Zerstörung der Basenpaarungswechselwirkung geeignet sind, vervollkommnet werden.

[0127] Eine weitere Amplifizierung des Nachweissignals wird durch Anlagerung des fünften Oligonukleotids (ähnlich oder identisch zu der Sequenz des dritten Oligonukleotids) an ein anderes Molekül der ersten Haarnadelstruktur erreicht. Es findet dann eine Spaltung statt und das dann freigegebene Oligonukleotid lagert sich an ein anderes Molekül der zweiten Haarnadelstruktur an. Aufeinanderfolgende Runden der Anlagerung und Spaltung der ersten und zweiten Haarnadelstrukturen werden mehrere Male im Überschuß durchgeführt, um eine ausreichende Menge an gespaltenen Haarnadelprodukten, die nachgewiesen werden sollen, zu erhalten. Die Temperatur der Nachweisreaktion wird einfach unter und einfach oberhalb der Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide, die für die direkte Spaltung der Haarnadelstrukturen verwendet werden, zyklisch wiederholt, üblicherweise bei etwa 55°C bis 70°C. Die Anzahl der Spaltungen verdoppelt sich in jedem Zyklus, solange, bis die Menge der verbleibenden Haarnadelstrukturen unterhalb des Km für die Haarnadelstrukturen liegt. Dieser Punkt ist dann erreicht, wenn die Haarnadelstrukturen im Wesentlichen aufgebraucht sind. Wenn die Nachweisreaktion für quantitative Zwecke verwendet werden soll, dann werden die zyklischen Reaktionen gestoppt, bevor die sich ansammelnden gespaltenen Haarnadelnachweisprodukte ein Plateau erreichen.

[0128] Der Nachweis der gespaltenen Haarnadelstrukturen kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden. In einer Ausführungsform wird der Nachweis durch die Separierung in einem Agarose- oder Polyacrylamidgel, gefolgt von einer Färbung mit Ehidiumbromid, erreicht. In einer anderen Ausführungsform wird der Nachweis durch die Separierung der gespaltenen und ungespaltenen Haarnadelstrukturen in einem Gel erreicht, gefolgt von einer Autoradiographie, wobei die Haarnadelstrukturen zunächst mit einer radioaktiven Sonde markiert und in chromatographischen Säulen unter Verwendung der HPLC oder FPLC aufgetrennt werden, gefolgt von einem Nachweis der unterschiedlich große Fragmente mittels Absorbtion bei einem OD_{260}. Andere Nachweismittel schließen den Nachweis der Veränderungen der Fluoreszenzpolarisation ein, wenn der einzelsträngige 5'-Arm durch die Spaltung freigesetzt wird, ist der Anstieg der Fluoreszenz eines interkalierten Fluoreszenzin-

dikators erhöht sich, da die Menge der an die 3'-Arme der Haarnadelstrukturen angelagerten Primer erhöht. Es kommt zu der Bildung sich erhöhender Mengen an Duplex DNA (zwischen dem Primer und dem 3'-Arm der Haarnadel), wenn successive Spaltungsrunden stattfinden.

[0129] Die Haarnadelstrukturen können an eine feste Unterlage, zum Beispiel an Agarose, Styrol oder Magnetkugeln, mittels des 3'-Endes der Haarnadel befestigt sein. Ein Abstandshaltermolekül kann zwischen dem 3'-Ende der Haarnadel und der Kugel, sofern gewünscht, angeordnet werden. Der Vorteil der Befestigung der Haarnadelstrukturen an einer festen Unterlage besteht darin, dass dies vor der Hybridisierung der beiden Haarnadelstrukturen über komplementäre Regionen aneinander verhindert. Wenn die Haarnadelstrukturen aneinander binden, würde dies die Menge an Haarnadeln reduzieren, die für die Primer, die während der Spaltungsreaktionen freigesetzt werden, für die Hybridisierung zur Verfügung stehen. Wenn die Haarnadelstrukturen an eine feste Unterlage befestigt sind, können die weiteren Nachweisverfahren für die Produkte der Spaltungsreaktion angewendet werden. Diese Verfahren schließen die Messung des freigesetzten einzelsträngigen 5'-Armes ein, wenn der 5'-Arm eine Markierung an dem 5'-Ende aufweist, ohne darauf beschränkt zu sein. Diese Markierung kann eine radioaktive, fluoreszierende, biotinylierte, etc. sein. Wenn die Haarnadelstruktur nicht gespalten wird, bleibt die 5'-Markierung an der festen Unterlage befestigt. Wenn die Spaltung stattfindet, wird die 5'-Markierung von der festen Unterlage freigesetzt.

[0130] Das 3'-Ende des Haarnadelmoleküls kann durch die Verwendung von Dideoxynukleotiden blockiert sein. Ein 3'-Ende, welches ein Dideoxynukleotid enthält, ist für eine Teilnahme in Reaktionen mit verschiedenen DNA-modifizierenden Enzymen, beispielsweise die terminale Transferase, nicht zugänglich. Die Spaltung der Haarnadel mit einem 3'-terminalen Dideoxynukleotid erzeugt ein neues, nicht blockiertes 3'-Ende an dem Spaltungsort. Dieses neue 3'-Ende hat eine freie Hydroxylgruppe, welche mit der terminalen Transferase Wechselwirken kann und somit andere Mittel für den Nachweis der Spaltungsprodukte bereitstellt.

[0131] Die Haarnadelstrukturen werden so designed, dass ihre selbst-komplementären Regionen sehr kurz (üblicherweise in einem Bereich von 3–8 Basenpaaren) sind. Somit sind die Haarnadelstrukturen bei hohen Temperaturen, bei denen diese Reaktionen durchgeführt werden (üblicherweise in einem Bereich von 50–75°C) nicht stabil, es sei denn, die Haarnadel wird durch die Anwesenheit des angelagerten Oligonukleotides an dem 3'-Arm der Haarnadel stabilisiert. Diese Instabilität schützt die Polymerase vor der Spaltung der Haarnadelstruktur in Abwesenheit eines assoziierten Primers, wodurch falsch-positive Ergebnisse aufgrund nicht-oligonukleotidvermittelter Spaltung vermieden werden.

[0132] Wie oben diskutiert, ist die Verwendung von 5'-Nukleasen, welche eine reduzierte Polymerisationsaktivität aufweisen, in diesen Verfahren zur Feststellung spezifischer Nukleinsäuresequenzen vorteilhaft. Signifikante Mengen an Polymerisation während der Spaltungsreaktion würden den Spaltungsort auf unvorhersehbare Wege verschieben, was zu der Bildung einer Serie von gespaltenen Haarnadelstrukturen verschiedener Größe führen würde, statt zu einem einzelnen leicht quantifizierbaren Produkt. Des Weiteren würden die Primer, die in einer Runde der Spaltung verwendet wurden, wenn sie verlängert werden, für den nächsten Zyklus nicht mehr verwendbar sein, entweder durch die Ausbildung einer nicht korrekten Struktur oder, weil sie zu lang sind, um bei moderaten Temperaturzyklusbedingungen abgeschmolzen zu werden. In einem unverfälschten System (das heißt, in Abwesenheit von dNTPs) kann man nicht modifizierte Polymerase verwenden, jedoch kann die Anwesenheit von Nukleotiden (dNTPs) die Effizienz pro Zyklus soweit verringern, dass falsch-negative Ergebnisse erhalten werden. Wenn ein Rohextrakt (genomische DNA-Preparationen, rohe Zelllysate, etc.) verwendet werden, oder wenn eine DNA-Probe aus einer PCR-Reaktion verwendet wird oder irgendeine andere Probe, welche mit dNTPs kontaminiert sein kann, dann sind die 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung, die von thermostabilen Polymerasen abgeleitet sind, besonders nützlich.

II. Erzeugung von 5'-Nukleasen aus thermostabilen DNA-Polymerasen

[0133] Die Gene, die DNA-Polymerasen vom Typ A kodieren, teilen auf der Ebene der DNA-Sequenz untereinander eine Homologie von etwa 85%. Bevorzugte Beispiele thermostabiler Polymerasen umfassen die aus Thermus aquaticus, Thermus flavus und Thermus thermophilus isolierten. Es sind aber auch andere thermostabile Typ-A-Polymerasen mit 5'-Nuklease-Aktivität geeignet. Die **Fig.** 2 und 3 vergleichen die Nukleotid- und die Aminosäuresequenz der drei oben erwähnten Polymerasen. Die SEQ ID Nr.:1–3 zeigen die Nukleotidsequenzen und die SEQ ID Nr.:4–6 zeigen die Aminosäuresequenzen der drei Wildtyp-Polymerasen. Die SEQ ID Nr.:1 entspricht der Nukleinsäuresequenz des Wildtyp-Gens der DNA-Polymerase von Thermus aquaticus, isoliert aus dem Stamm YT-1 [Lawyer et al., J. BioL Chem. 264:6427 (1989)]. Die SEQ ID Nr.:2 entspricht der Nukleinsäuresequenz des Wildtyp-Gens der DNA-Polymerase von Thermus flavus [Akhmetzjanov and Vakhitov, Nucl. Acids Res. 20:5839 (1992)]. Die SEQ ID Nr.:3 entspricht der Nukleinsäuresequenz des Wildtyp-Gens

der DNA-Polymerase von Thermus thermophilus [Gelfand et al., WO 91/09950 (1991)]. Die SEQ ID Nr.:7–8 zeigen die Nukleotid- bzw. die Aminosäurekonsensussequenz für die obigen drei DNAPs (aufgezeigt in der obersten Zeile in den **Fig.** 2 und 3).

[0134] Die aus thermostabilen Polymerasen abgeleiteten erfindungsgemäßen 5'-Nukleasen haben reduzierte Synthesefähigkeit, aber behalten im Wesentlichen dieselbe 5'-exonuklease Aktivität bei, wie die natürliche DNA-Polymerase. Der Begriff „im Wesentlichen dieselbe 5'-Exonuklease-Aktivität", wie hierin verwendet, bedeutet, dass die 5'-Nuklease-Aktivität des modifizierten Enzyms die Fähigkeit behält, als eine strukturabhängige Einzelstrangendonuklease zu wirken, jedoch nicht zwingend mit derselben Spaltungsrate im Vergleich zum unmodifizierten Enzym. DNA-Polymerasen vom Typ A können auch derart modifiziert werden, dass sie ein Enzym produzieren, welches erhöhte 5'-Nuklease-Aktivität und gleichzeitig ein reduziertes Maß an Syntheseaktivität aufweist. Modifizierte Enzyme mit reduzierter Syntheseaktivität und 5'-Nuklease-Aktivität werden von der vorliegenden Erfindung ebenfalls in Betracht bezogen.

[0135] Mit dem Begriff „reduzierte Syntheseaktivität", wie hierin verwendet, ist gemeint, dass das modifizierte Enzym ein geringeres Maß an Syntheseaktivität aufweist, im Vergleich zu dem, wie es in dem unmodifizierten oder „natürlichen" Enzym gefunden wird. Das modifizierte Enzym kann keine Syntheseaktivität mehr aufweisen oder kann eine Syntheseaktivität in einem Ausmaß aufweisen, welches die Verwendung des modifizierten Enzyms in dem unten beschriebenen Nachweistest nicht beeinträchtigt. Die 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung sind in Situationen vorteilhaft, in denen die Spaltungsaktivität der Polymerase, aber nicht die Syntheseaktivität gewünscht ist (wie beispielsweise in dem erfindungsgemäßen Nachweistest).

[0136] Wie oben erwähnt, ist nicht beabsichtigt, dass die Erfindung durch die Art der Veränderung eingeschränkt ist, die erforderlich ist, um die Polymerasesynthese defizient zu machen. Die vorliegende Erfindung zieht verschiedene Verfahren in Betracht, einschließlich aber nicht ausschließlich: 1) die Proteolyse; 2) rekombinante Konstrukte (einschließlich Mutanten); und 3) physikalische und/oder chemische Modifizierung und/oder Inhibierung.

1. Proteolyse

[0137] Thermostabile DNA-Polymerasen, die ein reduziertes Maß an Syntheseaktivität aufweisen, werden hergestellt, indem das unmodifizierte Enzym von proteolytischen Enzymen physikalisch gespalten wird, um Fragmente des Enzyms hervorzubringen, die keine Syntheseaktivität aufweisen, aber noch über 5'-Nuklease-Aktivität verfügen. Nach dem proteolytischen Verdau werden die resultierenden Fragmente mittels Standardchromatographietechniken getrennt und hinsichtlich der Fähigkeit getestet, DNA zu synthetisieren und als 5'-Nuklease zu wirken. Die Assays zur Bestimmung der Syntheseaktivität und der 5'-Nuklease-Aktivität sind weiter unten beschrieben.

2. Rekombinante Konstrukte

[0138] Die weiter unten beschriebenen Beispiele beschreiben ein bevorzugtes Verfahren zum Erzeugen eines Konstruktes, das eine 5'-Nuklease kodiert, welche aus einer thermostabilen DNA-Polymerase abgeleitet ist. Da die DNA-Polymerasen vom Typ A eine ähnliche DNA-Sequenz aufweisen, sind die für die Polymerasen von Thermus aquaticus und flavus verwendeten Klonierungsstrategien auch für andere thermostabile Typ-A-Polymerasen anwendbar. Allgemein wird eine thermostabile DNA-Polymerase kloniert, indem genomische DNA mittels molekularbiologischer Verfahren aus einem Bakterium mit einer thermostabilen DNA-Polymerase vom Typ A isoliert wird. Diese genomische DNA wird Primern ausgesetzt, die das Polymerasegen durch PCR amplifizieren können.

[0139] Diese amplifizierte Polymerasesequenz wird dann einem Standard-Deletionsprozess unterzogen, um den Polymeraseanteil des Gens zu entfernen. Geeignete Deletionsprozesse sind unten in den Beispielen beschrieben.

[0140] Das Beispiel weiter unten erörtert die Strategie, die verwendet wird, um zu bestimmten, welche Anteile der DNAP Tag Polymerasendomänen entfernt werden können, ohne die 5'-Nuklease-Aktivität zu eliminieren. Die Deletion von Aminosäuren aus dem Protein kann entweder durch Deletion des kodierenden genetischen Materials, oder durch Einfügen eines Stopp-Codons für die Translation durch Mutation oder Verschiebung des Leserahmens erfolgen. Darüber hinaus kann eine proteolytische Behandlung des Proteinmoleküls durchgeführt werden, um Segmente des Proteins zu entfernen.

[0141] In den Beispielen weiter unten wurden folgende spezifische Veränderungen des Tag Gens vorgenommen: eine Deletion zwischen den Nukleotiden 1601 und 2502 (dem Ende des Kodierungsbereiches), eine Insertion von 4 Nukleotiden in Position 2043, und Deletionen zwischen den Nukleotiden 1614 und 1848, und zwischen den Nukleotiden 875 und 1778 (die Nummerierung entspricht der wie in SEQ ID Nr.:1). Diese modifizierten Sequenzen sind unten in den Beispielen und in den SEQ ID Nr.:9-12 beschrieben.

[0142] Der Fachmann des Standards der Technik versteht, dass einzelne Basenpaarveränderungen in Bezug auf die Enzymstruktur und -Funktion harmlos sein können. Entsprechend können kleine Additionen und Deletionen vorhanden sein, ohne die Exonuklease- oder Polymerase-Funktion dieser Enzyme wesentlich zu verändern.

[0143] Es sind auch andere Deletionen geeignet, um die 5'-Nukleasen zu erzeugen. Es ist bevorzugt, dass die Deletionen, die Polymerase-Aktivität der 5'-Nukleasen auf ein Maß reduziert, bei dem eine Syntheseaktivität nicht die Verwendung der 5'-Nuklease in dem Nachweistest der Erfindung beeinträchtigt. Am meisten ist bevorzugt, dass keine Syntheseaktivität vorhanden ist. Modifizierte Polymerasen werden wie in den unten beschriebenen Tests auf das Vorhandensein von Syntheseaktivität und 5'-Nuklease-Aktivität getestet. Die sorgfältige Ausarbeitung dieser Tests ermöglicht das Screening nach Kandidatenenzymen, deren Struktur bislang noch unbekannt ist. Mit anderen Worten, kann Konstrukt „X" nach dem unten beschriebenen Protokoll untersucht werden, um zu bestimmen, ob es ein Mitglied der Gattung von 5'-Nukleasen der vorliegenden Erfindung der Funktion nach, statt der Struktur nach, ist.

[0144] In dem Beispiel unten hat das PCR-Produkt der amplifizierten genomischen DNA von Thermus aquaticus nicht die identische Nukleotidsstruktur der natürlichen genomischen DNA und nicht dieselbe Synthesefähigkeit, wie der Ursprungsklon. Auch Basenpaarveränderungen, die aus der Ungenauigkeit der DNAP Taq während der PCR-Amplifizierung eines Polymerasegens resultieren, sind ein Verfahren, mit dem die Synthesefähigkeit eines Polymerasegens inaktiviert werden kann. Die Beispiele unten und die **Fig.** 4A und 5A weisen auf Bereiche in den nativen DNA-Polymerasen von Thermus aquaticus und flavus hin, die für die Syntheseefähigkeit wichtig sein können. Es gibt andere Basenpaarveränderungen und -Substitutionen, welche die Polymerase ebenfalls inaktivieren könnten.

[0145] Es ist jedoch nicht erforderlich, dass der Prozess der Herstellung einer 5'-Nuklease aus einer DNA-Polymerase mit einem solchen mutierten amplifizierten Produkt gestartet wird. Dies ist das Verfahren, nachdem die Beispiele unten durchgeführt wurden, um die Synthese-Defizienten DNAP Tag Mutanten herzustellen, der Fachmann des Standards der Technik versteht aber, dass eine DNA-Polymerase-Wildtypsequenz als Ausgangsmaterial für die Einführung von Deletionen, Insertionen und Substitutionen verwendet werden kann, um eine 5'-Nuklease herzustellen. Beispielsweise wurden zur Erzeugung der Synthese-Defizienten-DNAPTf1-Mutante, die in den SEQ ID Nr.:13–14 aufgeführten Primer verwendet, um das DNA-Polymerase-Wildtypgen von Thermus flavus, Stamm AT-62, zu amplifizieren. Das amplifizierte Polymerasegen wurde dann einem Verdau mit Restriktionsenzymen unterzogen, um einen großen Anteil der Domäne zu entfernen, welche die Syntheseaktivität kodiert.

[0146] Die vorliegende Erfindung zieht in Betracht, dass das Nukleinsäurekonstrukt der vorliegenden Erfindung in einem geeigneten Wirt expremiert werden kann. Der Fachmann kennt Verfahren zum Anbringen/Einbringen verschiedener Promotoren und 3'-Sequenzen an eine Genstruktur, um eine effiziente Expression zu erreichen. Die Beispiele unten beschreiben zwei geeignete Vektoren und 6 geeignete Vektorkonstrukte. Selbstverständlich gibt es auch andere Promotoren/Vektorkombinationen, die geeignet wären. Es ist nicht erforderlich, dass für die Expression eines erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes ein Wirtsorganismus verwendet wird. Beispielsweise kann die Expression des von einem Nukleinsäurekonstrukt kodierten Proteins durch Verwendung eines zellfreien in vitro-Transkriptions-/Translationssystems erreicht werden. Ein Beispiel für solch ein zellfreies System ist das kommerziell erhältliche TnT™-Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega Corporation, Madison, WI).

[0147] Sobald ein geeignetes Nukleinsäurekonstrukt hergestellt worden ist, kann die 5'-Nuklease aus dem Konstrukt hergestellt werden. Die Beispiele unten und Standardlehren aus der Molekularbiologie ermöglichen die Manipulation des Konstrukts anhand von verschieden geeigneten Verfahren.

[0148] Sobald die 5'-Nuklease expremiert wurde, wird die Polymerase hinsichtlich einer Synthese- und Nukleaseaktivität, wie unten beschrieben, getestet.

3. Physikalische und/oder chemische Modifizierung und/oder Inhibierung

[0149] Die Syntheseaktivität einer thermostabilen DNA-Polymerase lässt sich durch chemische und/oder physikalische Mittel reduzieren. In einer Ausführungsform wird die von der 5'-Nuklease-Aktivität der Polymerase katalysierte Spaltungsreaktion unter solchen Bedingungen durchgeführt, welche bevorzugt die Syntheseaktivität der Polymerase hemmen. Das Maß der Syntheseaktivität braucht nur auf das Maß an Aktivität reduziert zu werden, dass Spaltungsreaktionen, die keine wesentliche Syntheseaktivität erfordern, nicht beeinträchtigt werden.

[0150] Wie in den Beispielen unten gezeigt ist, hemmen Konzentrationen von Mg^{++} über 5 mM die Polymerisationsaktivität der natürlichen DNAP Tag. Die Fähigkeit der 5'-Nuklease, unter Bedingungen zu funktionieren, bei denen die Syntheseaktivität gehemmt ist, wird getestet, indem die unten beschriebenen Assays hinsichtlich der Synthese- und 5'-Nuklease-Aktivität in Gegenwart eines Mg^{++}-Konzentrationsbereiches durchgeführt werden (5 bis 10 mM). Der Effekt einer bestimmten Konzentration von Mg^{++} wird durch Quantifizierung der Menge an Synthese und Spaltung in der Testreaktion im Vergleich zu der Standardreaktion für jeden Test bestimmt.

[0151] Die inhibierende Wirkung anderer Ionen, Polyamine, Denaturierungsmittel, wie Harnstoff, Formamid, Dimethylsulfoxid, Glycerin und Nicht-ionische-Detergenzien (Triton X-100 und Tween-20), Nukleinsäure bindende Chemikalien, wie Actinomycin D, Ethidiumbromid und Psoralene, wird durch deren Zugabe zu den Standardreaktionspuffern für die Synthese und 5'-Nuklease-Tests untersucht. Die Verbindungen, die einen bevorzugten inhibitorischen Effekt auf die Syntheseaktivität einer thermostabilen Polymerase aufweisen, werden dann verwendet, um Reaktionsbedingungen zu schaffen, bei denen die 5'-Nuklease-Aktivität (Spaltung) erhalten bleibt, während die Syntheseaktivität reduziert oder beseitigt ist.

[0152] Physikalische Mittel können verwendet werden, um die Syntheseaktivität einer Polymerase bevorzugt zu inhibieren. Beispielsweise wird die Syntheseaktivität thermostabiler Polymerasen zerstört, wenn die Polymerase längere Zeit (20 Min. oder länger) extremer Wärme (typischerweise 96–100°C) ausgesetzt wird. Obgleich es in Bezug auf die spezifische Wärmetoleranz jedes Enzyms kleine Unterschiede gibt, lassen sich diese leicht bestimmen. Polymerasen werden unterschiedlich lange mit Wärme behandelt, und die Wirkung der Wärmebehandlung auf die Synthese- und 5'-Nuklease-Aktivität wird bestimmt.

III. Therapeutische Verwendung von 5'-Nukleasen

[0153] Die 5'-Nukleasen, die in den Verfahren der Erfindung verwendet werden, haben nicht nur die Möglichkeit zur Verwendung in den oben diskutierten diagnostischen Bereichen, sondern können des Weiteren therapeutisch für die Spaltung und Inaktivierung spezifischer mRNAs im Inneren infizierter Zellen verwendet werden. Die mRNAs pathogener Agenten, beispielsweise Viren oder Bakterien, sind das Ziel der Spaltung durch eine Synthese-defiziente DNA-Polymerase, in dem ein Oligonukleotid, das komplementär zu einer gegebenen mRNA ist, die durch den pathogenen Agenten produziert wird, in die infizierte Zelle zusammen mit der Synthesedefizienten Polymerase eingeführt wird. Durch dieses Verfahren kann jeglicher pathogene Agent das Ziel sein, vorausgesetzt, dass die Nukleotidsequenzinformation zur Verfügung steht, so dass ein geeigneter Oligonukleotid synthetisiert werden kann. Der synthetische Oligonukleotid lagert sich an die komplementäre mRNA an, wodurch eine Spaltungsstruktur gebildet wird, die durch das modifizierte Enzym erkannt wird. Die Fähigkeit der 5'-Nukleasen-Aktivität thermostabiler DNA-Polymerasen RNA-DNA-Hybride zu spalten, ist in Beispiel 1D gezeigt.

[0154] Liposomen sind ein geeignetes Verabreichungssystem. Die synthetischen Oligonukleotide können an die Nuklease konjugiert oder gebunden sein, um die Co-Auslieferung dieser Moleküle zu erlauben. Weitere Verabreichungssysteme können verwendet werden.

[0155] Die Inaktivierung von pathogener mRNAs unter Verwendung von antisense-Genregulation und Verwendung von Ribozymen ist beschrieben (Rossi, U. S. Patent Nr. 5,144,019). Diese beiden Verfahren haben Beschränkungen.

[0156] Die Verwendung von antisense RNA zur Abschwächung der Genexpression erfordert stoichiometrischen, und deshalb großen molaren, Überschuss an antisense RNA im Verhältnis zu der pathogenen RNA, um effektiv zu sein. Dem gegenüber ist die Ribozymtherapie katalytisch, weshalb das Problem der Notwendigkeit eines großen molaren Überschusses der therapeutischen Verbindung, wie sie bei antisense Verfahren zu finden ist, nicht auftritt. Jedoch erfordert die Spaltung einer gegebenen RNA mittels Ribozymen die Anwesenheit hochkonservierter Sequenzen, damit sich die katalytischaktive Spaltungsstruktur bilden kann. Dies erfor-

dert, dass die pathogene Ziel-mRNA die konservierten Sequenzen (GAAAC $(X)_n$ GU) enthält, wodurch die Anzahl der pathogenen mRNAs, die durch dieses Verfahren gespalten werden können, limitiert ist. Im Unterschied dazu ist die katalytische Spaltung der RNA bei Verwendung eines DNA-Oligonukleotids und einer 5'-Nuklease nur von der Struktur abhängig; somit kann nahezu jegliche pathogene RNA-Sequenz für das Design einer entsprechenden Spaltungsstruktur verwendet werden.

IV. Nachweis von Antigenen oder Nukleinsäurezielen mittels Doppel-Einfang-Assay

[0157] Die Fähigkeit 5'-Nukleasen aus thermostabilen DNA-Polymerasen herzustellen, stellt die Basis für den Nachweis der Anwesenheit von Antigenen oder Nukleinsäurezielen bereit. In diesem Doppel-Einfang-Assay sind die Polymerasedomänen, welche die synthetische Aktivität und die Nuklease-Aktivität kodieren, covalent an zwei separate und unterschiedliche Antikörper oder Oligonukleotide befestigt. Wenn sowohl die synthetische als auch die Nuklease-Domäne in derselben Reaktion vorliegen und dATP, dTTP und geringe Mengen an poly d(A-T) zur Verfügung stehen, wird eine große Menge an poly d(A-T) produziert. Die großen Mengen an poly d(A-T) entstehen in Ergebnis der Fähigkeit der 5'-Nuklease neu hergestellte poly d(A-T) zu spalten, um Primer zu generieren, welche ihrerseits durch die synthetische Domäne verwendet werden, um die Produktion von noch mehr poly d(A-T) zu katalysieren. Die 5'-Nuklease ist in der Lage, poly d(A-T) zu spalten, da poly d(A-T) selbst-komplementär ist und leicht alternierende Strukturen bei erhöhten Temperaturen bildet. Diese Strukturen werden durch 5'-Nuklease erkannt und dann gespalten, um mehr Primer für die Synthesereaktion zu bilden.

[0158] Das nachfolgende Beispiel ist ein Beispiel für den Doppel-Einfang-Assay zum Nachweis von Antigen(en): Es wird eine Probe bereitgestellt, die auf ein gegebenes Antigen (Antigene) zu analysieren ist. Die Probe kann eine Mischung von Zellen enthalten; beispielsweise Zellen, welche mit Viren infiziert sind, die vom Virus kodierte Antigene an ihrer Oberfläche zur Schau stellen. Wenn das nachzuweisende Antigen, bzw. die Antigene, in der Lösung vorliegen, dann werden sie als erstes an einer festen Unterlage, zum Beispiel der Wand einer Mikrotiterplatte oder einer Kugel, unter Verwendung herkömmlicher Verfahren befestigt. Die Probe wird dann gemischt mit 1) der synthetischen Domäne einer thermostabilen DNA-Polymerase, die an einen Antikörper konjugiert ist, welcher entweder ein erstes Antigen oder ein erstes Epitop an einem Antigen erkennt, und 2) der 5'-Nuklease-Domäne einer thermostabilen DNA-Polymerase, die an einem zweiten Antikörper konjugiert ist, welcher entweder ein zweites bestimmtes Antigen oder ein zweites Epitop auf demselben Antigen erkennt, wie es auch der Antikörper erkennt, welche an die synthetische Domäne konjugiert ist. Nach einem angemessenen Zeitraum, der die Wechselwirkung der Antikörper mit ihren verwandten Antigenen erlaubt (die Bedingungen variieren in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern; geeignete Bedingungen sind im Stand der Technik gut bekannt), wird die Probe dann gewaschen, um die ungebundenen Antikörper-Enzym-Domänkomplexe zu entfernen. dATP, dTTP und kleine Mengen an poly d(A-T) werden dann der gewaschenen Probe hinzugefügt und die Probe bei erhöhten Temperaturen (üblicherweise in einem Bereich von 60–80°C, besonders bevorzugt 70–75°C) inkubiert, um der thermostabilen synthetischen und 5'-Nukleasedomäne die Funktion zu ermöglichen. Wenn die Probe das Antigen (die Antigene) enthält, die durch die beiden separat konjugierten Domänen der Polymerase erkannt werden, dann findet eine exponentiale Erhöhung der poly d(A-T) Produktion statt. Wenn nur der an die synthetische Domäne der Polymerase konjugierte Antikörper in der Probe vorhanden ist, so dass keine 5'-Nuklease-Domäne in der gewaschenen Probe vorliegt, dann ist nur eine arithmetische Erhöhung an poly d(A-T) möglich. Die Reaktionsbedingungen können auf solche Art und Weise kontrolliert werden, dass eine arithmetische Erhöhung an poly d(A-T) unterhalb des Nachweisschwellenwertes liegt. Dies kann dadurch vollendet werden, dass die Reaktionszeitdauer kontrolliert wird, oder, dass so wenig poly d(A-T), welches als Vorlage wirkt, hinzugefügt wird, dass bei Abwesenheit einer Nuklease-Aktivität für die Herstellung neuer poly d(A-T)-Primer sehr wenig poly d(A-T) synthetisiert wird.

[0159] Es ist nicht notwendig für beide Domänen des Enzyms, dass sie an einem Antikörper konjugiert sind. Man kann die synthetische Domäne an einen Antikörper konjugieren und die 5'-Nuklease-Domäne in Lösung bereitstellen, oder umgekehrt. In einem solchen Fall wird die konjugierte Antikörper-Enzym-Domäne der Probe hinzugefügt, inkubiert und dann gewaschen. dATP, dTTP, poly d(A-T) und die verbleibende Enzym-Domäne in Lösung wird dann hinzugefügt.

[0160] Des Weiteren können die beiden Enzymdomänen so an die Oligonukleotide konjugiert sein, dass die Zielnukleinsäuresequenzen nachgewiesen werden können. Die Oligonukleotide, die an die zwei verschiedene Enzymdomänen konjugiert sind, können verschiedene Regionen auf denselben Nukleinsäurestrang erkennen, oder können zwei miteinander nicht in Beziehung stehende Zielnukleinsäuren erkennen.

[0161] Die Herstellung von poly d(A-T) kann auf verschiedenen Wegen nachgewiesen werden, einschließlich:

1) die Verwendung eines radioaktiven Markers entweder an dem dATP oder dTTP, die für die Synthese der poly d(A-T) zur Verfügung gestellt werden, gefolgt durch eine Größenseparierung der Reaktionsprodukte und eine Autoradiographie; 2) die Verwendung einer Fluoreszenzsonde an dem dATP und einer biotinylierten Sonde an dem dTTP, die für die Synthese der poly d(A-T) bereitgestellt werden, gefolgt von einem Durchlauf der Reaktionsprodukte über eine Avidin-Kugel, zum Beispiel magnetische Kugeln, die an Avidin konjugiert sind; die Anwesenheit der Fluoreszenzsonde an der Avidin-enthaltenen Kugel weist daraufhin, dass sich poly d(A-T) gebildet hat, da sich die Fluoreszenzsonde nur dann an die Avidin-Kugel anhängt, wenn das fluoreszenierte dATP in eine covalente Bindung mit dem biotinylierten dTTP eingebaut wurde; und 3) Änderungen der Fluoreszenzpolarisation weisen auf eine Größenerhöhung hin. Andere Mittel zum Nachweis der Anwesenheit von poly d(A-T) schließen die Verwendung von interkalierenden Fluoreszenzindikatoren ein, um die Erhöhung der Duplex-DNA-Bildung zu beobachten.

[0162] Die Vorteile des obigen Dualen-Einfang-Assays zum Nachweis von Antigenen oder Nukleinsäurezielen schließen ein:

1) Es ist keine zyklische Wärmezufuhr erforderlich. Die Polymerasedomänen und die dATP und dTTP werden bei einer festgelegten Temperatur (üblicherweise etwa 70°) inkubiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit sind bis zu 75% der hinzugefügten dNTPs in poly d(A-T) eingebaut. Das Fehlen einer zyklischen Wärmezufuhr macht dieses Assay für die Verwendung in klinischen Laboratorien besonders geeignet; es besteht keine Notwendigkeit, Geräte für die zyklische Wärmezufuhr zu kaufen und es muss keine genaue Temperaturkontrolle aufrechterhalten werden.

2) Die Reaktionsbedingungen sind einfach. Die Inkubation der gebundenen enzymatischen Domänen findet in einem Puffer statt, der 0,5 mM $MgCl_2$ (es können auch höhere Konzentrationen verwendet werden), 2–10 mM Tris-Cl, pH 8.5, etwa 50 µM dATP und dTTP enthält. Das Reaktionsvolumen beträgt 10–20 µl und die Reaktionsprodukte sind innerhalb von 10–20 Minuten nachweisbar.

3) Es ist keine Reaktion nachweisbar, solange keine synthetischen, als auch Nuklease-Aktivitäten vorliegen. Das heißt, ein positives Ergebnis weist daraufhin, dass beide Proben (Antikörper oder Oligonukleotid) ihre Ziele erkannt haben, wodurch die Erkennungsspezifizität erhöht wird, indem man zwei verschiedene, an das Ziel bindende, Proben hat.

[0163] Die Fähigkeit, die beiden enzymatischen Aktivitäten der DNAP zu separieren, erlaubt die exponentiale Erhöhung der poly d(A-T)-Produktion. Wenn eine DNAP verwendet wird, welche keine 5'-Nuklease-Aktivität aufweist, zum Beispiel das Klenow-Fragment der DNAPEc1, so ist nur eine lineare oder arithmetische Erhöhung der poly d(A-T)-Produktion möglich [Setlow et al., J. Biol. Chem. 247:224 (1972)]. Die Fähigkeit, ein Enzym bereitzustellen, welches eine 5'-Nuklease-Aktivität, jedoch keine synthetische Aktivität, aufweist, ist durch die Offenbarung dieser Erfindung möglich gemacht worden.

EXPERIMENTELLER TEIL

[0164] Die folgenden Beispiele dienen dazu, bestimmte bevorzugte Ausführungsformen und Aspekte der vorliegenden Erfindung zu veranschaulichen, und sind nicht als deren Umfang einschränkend zu betrachten.

[0165] In der folgenden Beschreibung gelten folgende Abkürzungen: °C (Grad Celsius); g (Gravitationsfeld); Vol (Volumen); Gew./Vol. (Gewicht je Volumen); Vol./Vol. (Volumen je Volumen); BSA (bovines Serumalbumin); CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid); HPLC (High Pressure Liquid Chromatography); DNA (Desoxyribonukleinsäure); p (Plasmid); µl (Mikroliter); ml (Milliliter); µg (Mikrogramm); pmol (Pikomol); mg (Milligramm); M (Molar); mM (Millimolar); µM (Mikromolar); nm (Nanometer); kDa (Kilodalton); OD (optische Dichte); EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure); FITC (Fluoreszeinisothiocyanat); SDS (Sodiumdodecylsulfat); $NaPO_4$ (Natriumphosphat); Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan); PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid); TBE (Tris-Borat-EDTA, d.h. Tris-Puffer titriert mit Borsäure anstatt HCl und EDTA enthaltend); PBS (phosphatgepufferte Salzlösung); PPBS (phosphatgepufferte Salzlösung mit 1 mM PMSF); PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese); Tween (Polyoxyethylensorbitan; Dynal (Dynal A.S., Oslo, Norwegen); Epicentre (Epicentre Technologies, Madison, WI); National Biosciences (Plymouth, MN); New England Biolabs (Beverly, MA); Novagen (Novagen, Inc., Madison, WI); Perkin Elmer (Norwalk, CT); Promega, Corp. (Madison, WI); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA; und USB (U.S. Biochemical, Cleveland, OH).

BEISPIEL 1

Eigenschaften nativer thermostabiler DNA-Polymerasen

A. 5'-Nuklease-Aktivität von DNAPTaq

[0166] Während der Polymerasekettenreaktion (PCR) [Saiki et al., Science 239: 487 (1988); Mullis und Faloona, Meth. Enzymol. 155: 335 (1987)] kann DNAPTaq viele, aber nicht alle, DNA-Sequenzen amplifizieren. Eine Sequenz, die sich nicht mit DNAPTaq amplifizieren lässt, ist in der Fig. 6 gezeigt (die Haarnadelstruktur ist Seq.-ID Nr. 15; die Primer sind die Seq.-ID Nr. 16–17). Diese DNA-Sequenz hat die Unterscheidungseigenschaft, dass sie sich ebenfalls auf sich selbst falten kann, so dass eine Haarnadel mit zwei einzelsträngigen Armen erhalten wird, die den in der PCR verwendeten Primern entsprechen.

[0167] Zur Untersuchung, ob dieses Versagen bei der Amplifikation aufgrund von 5'-Nukleaseaktivität des Enzyms beruht, wurden die Fähigkeiten von DNAPTaq und DNAPStf zur Amplifikation dieser DNA-Sequenz während 30 PCR-Zyklen verglichen. Die synthetischen Oligonukleotide wurden erhalten von The Biotechnology Center an der Universität von Wisconsin-Madison. Die DNAPTaq und DNAPStf wurden von Perkin Elmer erhalten (d.h. Amplitaq™ DNA-Polymerase und das Stoffelfragment der Amplitaq™ DNA-Polymerase). Die Substrat-DNA umfasste die in Fig. 6 gezeigte Haarnadelstruktur, die in einer doppelsträngigen Form in pUC19 kloniert ist. Die bei dieser Amplifikation verwendeten Primer sind in den Seq.-ID Nr. 16 bis 17 aufgeführt. Der Primer Seq.-ID Nr. 17 ist in der Fig. 6 an den 3'-Arm der Haarnadelstruktur hybridisiert gezeigt. Primer Seq.-ID Nr. 16 ist in Fig. 6 als die ersten 20 Nukleotide in Fett gedruckt auf dem 5'-Arm der Haarnadel gezeigt.

[0168] Die Polymeraskettenreaktionen umfassten 1 ng superhelikale Plasmid-Ziel-DNA, jeweils 5 pmol Primer, jeweils 40 µM dNTPs, und 2,5 Units DNAPTaq oder DNAPStf, in 50 µl Lösung aus 10 mM Tris-Cl mit einem pH-Wert von 8,3. Die DNAPTaq-Reaktionen enthielten 50 mM KCl und 1,5 mM $MgCl_2$. Das Temperaturprofil war 95°C für 30 s, 55°C für 1 min und 72°C für 1 min, über 30 Zyklen. 10 Prozent jeder Reaktion wurde durch Gelelektrophorese auf 6% Polyacrylamid (vernetzt 29:1) in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA analysiert.

[0169] Die Ergebnisse sind in Fig. 7 gezeigt. Das erwartete Produkt wurde durch DNAPStf (einfach angegeben als "S"), aber nicht durch DNAPTaq (angegeben als "T") hergestellt. Es wurde daraus geschlossen, dass die 5'-Nuklease-Aktivität der DNAPTaq für das Fehlen der Amplifikation dieser DNA-Sequenz verantwortlich ist.

[0170] Zur Untersuchung, ob die 5'-ungepaarten Nukleotide im Substratbereich dieser strukturierten DNA durch DNAPTaq entfernt wurden, wurde das Schicksal des endmarkierten 5'-Arms während vier PCR-Zyklen mit den gleichen zwei Polymerasen verglichen (Fig. 8). Die Haarnadelmatrizen, wie diejenige, die in der Fig. 6 beschrieben ist, wurden hergestellt mittels DNAPStf und einem ^{32}P-5'-endmarkierten Primer. Das 5'-Ende der DNA wurden als sehr große Fragmente durch DNAP-Taq, aber nicht durch DNAPStf freigesetzt. Die Größen dieser Fragmente (auf der Basis ihrer Mobilitäten) zeigen, dass sie einen Großteil oder den gesamten ungepaarten 5'-Arm der DNA enthalten. Somit erfolgt eine Spaltung an oder nahe der Basis des gegabelten Duplexes. Diese freigesetzten Fragmente enden mit 3'-OH-Gruppen, wie durch direkte Sequenzanalyse und die Fähigkeiten der Fragmente, durch terminale Desoxynukleotidyl-Transferase verlängert werden zu können, bewiesen wurde.

[0171] Die **Fig.** 9–11 zeigen die Ergebnisse der Experimente, die dazu ausgelegt sind, dass sie die durch DNAPTaq katalysierte Spaltungsreaktion charakterisieren sollen. Wenn nicht anders angegeben umfassten die Spaltungsreaktionen 0,01 pmol hitzedenaturierte endmarkierte Haarnadel-DNA (wobei der unmarkierte komplementäre Strang ebenfalls zugegen war), 1 pmol Primer (komplementär zum 3'-Arm) und 0,5 Units DNAPTaq (geschätzt auf 0,026 pmol) in einem Gesamtvolumen von 10 µl 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5, 50 mM KCl und 1,5 mM $MgCl_2$. Wie angezeigt, hatten einige Reaktionen verschiedene KCl-Konzentrationen, und die genauen Zeiten und Temperaturen, die in jedem Experiment verwendet werden, sind in einzelnen Figuren angegeben. Die Reaktionen, die einen Primer enthielten, verwendeten den in Fig. 6 gezeigten Primer (Seq.-ID Nr. 17). In einigen Fällen wurde der Primer zu der Verbindungsstelle verlängert, indem Polymerasen und ausgewählte Nukleotide bereitgestellt wurden.

[0172] Die Reaktionen wurden bei der endgültigen Reaktionstemperatur durch Zugabe von $MgCl_2$ oder Enzym gestartet. Die Reaktionen wurden bei ihren Inkubationstemperaturen durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen gestoppt. Die aufgeführten T_m-Berechnungen erfolgten mit

der Oligo™-Primer-Analyse-Software von National Biosciences, Inc.. Diese wurden bestimmt mit einer DNA-Konzentration von 0,25 µM, bei entweder 15 oder 65 mM Gesamt-Salz (den 1,5 mM $MgCl_2$ in sämtlichen Reaktionen wurde ein Wert von 15 mM Salz für diese Berechnungen gegeben).

[0173] **Fig.** 9 ist ein Autoradiogramm, das die Ergebnisse einer Reihe von Experimenten und Bedingungen an der Spaltstelle enthält. Fig. 9A ist eine Bestimmung der Reaktionskomponenten, die die Spaltung ermöglichen. Die Inkubation von 5'-endmarkierter Haarnadel-DNA erfolgte für 30 min bei 55°C mit den angegebenen Komponenten. Die Produkte wurden durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgelöst, und die Längen der Produkte in Nukleotiden sind angegeben. Fig. 9B beschreibt die Wirkung der Temperatur an der Spaltstelle in Abwesenheit von zugefügtem Primer. Die Reaktionen wurden in Abwesenheit von KCl für 10 min bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Die Längen der Produkte in Nukleotiden sind angegeben.

[0174] Überraschenderweise erfordert die Spaltung durch DNAPTaq weder einen Primer noch dNTPs (siehe Fig. 9A). Somit kann die 5'-Nuklease-Aktivität von der Polymerisation entkoppelt werden. Die Nuklease-Aktivität erfordert Magnesiumionen, obgleich sie gegen Manganionen ersetzt werden können, wenngleich mit potentiellen Änderungen in Spezifität und Aktivität. Weder Zink- noch Calciumionen unterstützen die Spaltungsreaktion. Die Reaktion erfolgt über einen breiten Temperaturenbereich von 25°C bis 85°C wobei die Spaltungsrate bei höheren Temperaturen ansteigt.

[0175] In der **Fig.** 9 wird der Primer nicht in Abwesenheit zugefügter dNTPs verlängert. Der Primer beeinflusst jedoch die Stelle und die Spaltrate der Haarnadel. Die Änderung in der Spaltstelle (Fig. 9A) beruht offensichtlich auf der Unterbrechung eines kurzen Doppelstrangs, der zwischen den Armen des DNA-Substrates gebildet wird. In Abwesenheit des Primers konnten sich die Sequenzen, die durch Unterstreichen in Fig. 6 angezeigt wurden, paaren und einen verlängerten Doppelstrang bilden. Die Spaltung an dem Ende des verlängerten Doppelstrangs setzt das 11 Nukleotide große Fragment frei, das in den Spuren von Fig. 9A gezeigt ist, ohne zugefügten Primer. Die Zugabe von Primer im Überschuss (Fig. 9A, Spuren 3 und 4) oder die Inkubation bei einer erhöhten Temperatur (Fig. 9B) unterbricht die kurze Extension des Doppelstrangs und führt zu einem längeren 5'-Arm und somit zu längeren Spaltprodukten.

[0176] Die Stelle des 3'-Endes des Primers kann die genaue Spaltstelle beeinflussen. Elektrophoreseanalyse ergab, dass in Abwesenheit von Primer (Fig. 9B) die Spaltung am Ende des Substrat-Doppelstrangs (je nach der Temperatur entweder die verlängerte oder verkürzte Form) zwischen den ersten und zweiten Basenpaaren erfolgt. Wird der Primer bis zur Basis des Doppelstrangs verlängert, erfolgt die Spaltung auch ein Nukleotid in den Doppelstrang hinein. Existiert jedoch eine Lücke von vier oder sechs Nukleotiden zwischen dem 3'-Ende des Primers und dem Substrat-Doppelstrang, wird die Spaltstelle vier bis sechs Nukleotide in 5'-Richtung verschoben.

[0177] **Fig.** 10 beschreibt die Kinetiken der Spaltung in der Gegenwart (Fig. 10A) oder Abwesenheit (Fig. 10b) eines Primer-Oligonukleotids. Die Reaktionen erfolgten bei 55°C entweder mit 50 mM KCl (Fig. 10A) oder 20 mM KCl (Fig. 10B). Die Reaktionsprodukte wurden durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgelöst, und die Längen der Produkte in Nukleotiden sind angegeben. "M" steht für Marker und ist ein 5'-endmarkiertes 19-nt-Oligonukleotid. Unter diesen Salzbedingungen zeigen die Fig. 10A und Fig. 10B, dass die Reaktion etwa zwanzig Mal schneller in Gegenwart der Primer abläuft als in Abwesenheit der Primer. Diese Auswirkung auf die Effizienz kann der richtigen Anlagerung und Stabilisierung des Enzyms an dem Substrat zugeordnet werden.

[0178] Der relative Einfluss des Primers auf die Spaltraten wird viel größer, wenn beide Reaktionen in 50 mM KCl erfolgen. In Anwesenheit von Primer steigt die Spaltrate mit der KCl-Konzentration auf etwa 50 mM. Die Hemmung dieser Reaktion in der Gegenwart von Primer ist jedoch bei 100 mM offensichtlich und bei 150 mM KCl beendet. In Abwesenheit von Primer ist dagegen die Rate durch eine KCl-Konzentration bis zu 20 mM erhöht, wird aber bei Konzentrationen über 30 mM reduziert. Bei 50 mM KCl wird die Reaktion fast vollständig gehemmt. Die Hemmung der Spaltung durch KCl in Abwesenheit von Primer wird durch die Temperatur beeinflusst und hat bei niedrigeren Temperaturen einen stärkeren Einfluss.

[0179] Die Erkennung des 5'-Endes des zu spaltenden Arms scheint eine wichtige Eigenschaft der Substraterkennung zu sein. Substrate, die kein freies 5'-Ende haben, wie zirkuläre M13-DNA, können unter keiner der untersuchten Bedingungen gespalten werden. Sogar mit Substraten mit definierten 5'-Armen wird die Spaltrate durch DNAPTaq durch die Länge des Arms beeinflusst. In der Gegenwart von Primer und 50 mM KCl ist die Spaltung der 27 Nukleotide langen 5'-Extension im wesentlichen in 2 min bei 55°C beendet. Die Spaltung von Molekülen mit 5'-Armen von 84 und 188 Nukleotiden sind nach 20 min dagegen nur etwa zu 90% und 40%

vollständig. Die Inkubation bei höheren Temperaturen reduziert die inhibitorischen Wirkungen der langen Extensionen, was zeigt, dass die Sekundärstruktur im 5'-Arm oder eine wärmelabile Struktur in dem Enzym die Reaktion hemmen kann. Ein Mischungsexperiment, das unter Bedingungen von Substratüberschuss abläuft, zeigt, dass Moleküle mit langen Armen das verfügbare Enzym nicht vorzugsweise in nicht-produktiven Komplexen bindet. Diese Ergebnisse können zeigen, dass die 5'-Nuklease-Domäne Zugang zur Spaltstelle am Ende des gegabelten Doppelstrangs erhält, indem der 5'-Arm von einem Ende zum anderen abwärts bewegt wird. Längere 5'-Arme haben erwartungsgemäß zufälligere Sekundärstrukturen (insbesondere bei hohen KCl-Konzentrationen), was wahrscheinlich diese Bewegung behindert.

[0180] Die Spaltung scheint nicht durch lange 3'-Arme des Substrat-Strang-Zielmoleküls oder der Pilot-Nukleinsäure gehemmt zu werden, jednfalls nicht bei bis zu mindestens 2 Kilobasen. Bei dem anderen Extrem können 3'-Arme der Pilot-Nukleinsäure mit nur 1 Nukleotid Länge die Spaltung in einer Primer-unabhängigen Reaktion unterstützen, wenn auch ineffizient. Vollständig gepaarte Oligonukleotide lösen keine Spaltung der DNA-Matrizen während der Primer-Extension aus.

[0181] Die Fähigkeit der DNAP Taq zur Spaltung der Moleküle, selbst wenn der Komplementärstrang nur ein ungepaartes 3'-Nukleotid enthält, kann bei der Optimierung der allelspezifischen PCR geeignet sein. PCR-Primer mit ungepaarten 3'-Enden wirken als Pilot-Oligonukleotide, die die selektive Spaltung ungewünschter Matrizen während der Präinkubation potentieller Matrize-Primer-Komplexe mit DNAPTaq in Abwesenheit von Nukleotid-Triphosphaten leiten.

B. 5'-Nuklease-Aktivitäten anderer DNAPs

[0182] Zur Bestimmung, ob andere 5'-Nukleasen in anderen DNAPs sich für die vorliegende Erfindung eignen, wurde eine Reihe von Enzymen, von denen mehrere der Literatur zufolge frei von offensichtlicher 5'-Nuklease-Aktivität waren, untersucht. Die Fähigkeit dieser anderen Enzyme zur Spaltung von Nukleinsäuren in einer strukturspezifischen Weise wurde mit dem in der Fig. 6 gezeigten Haarnadelsubstrat unter Bedingungen untersucht, die Berichten zufolge optimal für die Synthese durch jedes Enzym waren.

[0183] DNAPEc1 und DNAP-Klenow wurden von der Promega Corporation erhalten; die DNAP von Pyrococcus furiosus ["Pfu", Bargseid et al., Strategies 4: 34 (1991)] stammte von Stratagene; die DNAP von Thermococcus litoralis ["Til", Vent™ (Exo-), Perler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5577 (1992)] stammte von New England Biolabs; die DNAP von Thermus flavus ["Tfl", Kaledin et al., Biokhimiya 46: 1576 (1981)] stammte von Epicentre Technologies; und die DNAP von Thermus thermophilus ["Tth", Carballeira et al., Biotechniques, 9: 276 (1990); Myers et al., Biochem., 30: 7661 (1991)] stammte von US Biochemicals.

[0184] 0,5 Units jeder DNA-Polymerase wurden in einer 20 µl-Reaktion untersucht, wobei entweder die vom Hersteller gelieferten Puffer für die primerabhängigen Reaktionen verwendet wurden, oder 10 mM Tris·Cl, pH-Wert 8,5, 1,5 mM $MgCl_2$, und 20 mM KCl. Die Reaktionsgemische wurden bei 72°C gehalten, bevor Enzym zugegeben wurde.

[0185] **Fig.** 11 ist ein Autoradiogramm, das die Ergebnisse dieser Tests aufzeigt. Fig. 11A veranschaulicht die Reaktionen der Endonukleasen von DNAPs verschiedener thermophiler Bakterien. Die Reaktionen wurden für 10 min bei 55°C in Anwesenheit von Primer, oder für 30 min bei 72°C in Abwesenheit von Primer inkubiert, und die Produkte wurden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgelöst. Die Längen der Produkte, in Nukleotiden, sind angegeben. Die Fig. 11B veranschaulicht die endonukleolytische Spaltung durch die 5'-Nuklease von DNAPEc1. Die DNAPEc1- und DNAP-Klenow-Reaktionen wurden für 5 min bei 37°C inkubiert. Man beachte die leichte Bande der Spaltprodukte von 25 und 11 Nukleotiden in den DNAPEc1-Spuren (hergestellt in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von Primer. Die **Fig.** 7B zeigt auch die DNAPTaq-Reaktionen in Anwesenheit (+) oder in Abwesenheit (–) von Primer. Diese Reaktionen erfolgten in 50 mM bzw. 20 mM KCl und wurden für 10 min bei 55°C inkubiert.

[0186] Bezugnehmend auf Fig. 11A spalten die DNAPs aus den Eubakterien Thermus thermophilus und Thermus flavus das Substrat an der gleichen Stelle wie DNAPTaq, und zwar sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von Primer. DNAPs aus den Archaebakterien Pyrococcus furiosus und Thermococcus litoralis können dagegen das Substrat nicht endonukleolytisch spalten. Die DNAPs aus Pyrococcus furiosus und Thermococcus litoralis haben wenig Sequenzhomologie zu eubakteriellen Enzymen (Ito et al., Nucl. Acids Res. 19: 4045 (1991); Mathur et al., Nucl. Acids. Res. 19: 6952 (1991); siehe ebenfalls Perler et al.). Bezugnehmend auf Fig. 11B spaltet DNAPEc1 auch das Substrat, aber die erhaltenen Spaltprodukte sind schwer nachzuweisen, es sei denn, die 3'-Exonuklease wird gehemmt. Die Aminosäuresequenzen der 5'-Nuklease-Domänen

von DNAPEc1 und DNAPTaq sind zu etwa 38% homolog (Gelfand, siehe oben).

[0187] Die 5'-Nuklease-Domäne von DNAPTaq hat ebenfalls etwa 19% Homologie zu der 5'-Exonuklease, die von Gen 6 des Bakteriophagen T7 codiert wird [Dunn et al., J. Mol. Biol., 166: 477 (1983)]. Diese Nuklease, die nicht kovalent an eine DNA-Polymerisations-Domäne gebunden ist, kann DNA auch endonukleolytisch spalten, und zwar an einer Stelle ähnlich oder identisch zu der Stelle, die von den oben beschriebenen 5'-Nukleasen gespalten wird, in Abwesenheit zugefügter Primer.

C. Transspaltung

[0188] Die Fähigkeit einer 5'-Nuklease zur Leitung einer effizienten Spaltung an einer spezifischen Sequenz wurde im folgenden Experiment aufgezeigt. Ein partiell komplementäres Oligonukleotid mit der Bezeichnung "Pilot-Oligonukleotid" wurde an Sequenzen an der gewünschten Spaltstelle hybridisiert. Der nichtkovalente Teil des Pilot-Oligonukleotids ergab eine Struktur analog zum 3'-Arm der Matrize (siehe **Fig. 6**), wohingegen die 5'-Region des Substratstranges zum 5'-Arm wurde. Ein Primer wurde bereitgestellt durch Konstruieren des 3'-Bereichs des Pilot-Oligonukleotids, so dass er sich auf sich selbst falten und eine kurze Haarnadel mit einem stabilisierenden Tetra-Loop erzeugen würde [Antao et al., Nucl. Acids. Res. 19: 5901 (1991)]. Zwei Pilot-Oligonukleotide sind in der **Fig. 12A** gezeigt. Die Oligonukleotide 19-12 (Seq.-ID Nr. 18), 30-12 (Seq.-ID Nr. 19) und 30-0 (Seq.-ID Nr. 40) sind 31, 42 bzw. 30 Nukleotide lang. Die Oligonukleotide 19-12 (Seq.-ID Nr. 18) und 34-19 (Seq.-ID Nr. 19) haben nur 19 bzw. 30 Nukleotide, die komplementär zu verschiedenen Sequenzen im Substratstrang sind. Die Pilot-Oligonukleotide werden so berechnet, dass ihre komplementären Stränge bei etwa 50°C (19-12) und etwa 75°C (30-12) abschmelzen. Beide Pilot-Oligonukleotide haben 12 Nukleotide an ihren 3'-Enden, die als 3'-Arme wirken, wobei die basengepaarten Primer gebunden sind.

[0189] Zur Demonstration, dass die Spaltung von einem Pilot-Oligonukleotid erfolgen konnte, wurde eine einzelsträngige Ziel-DNA mit DNAPTaq in Anwesenheit von zwei potentiellen Pilot-Oligonukleotiden inkubiert. Die Transspaltungsreaktionen, wo die Ziel und Pilot-Nukleinsäuresequenzen nicht kovalent gebunden sind, umfassen 0,01 pmol einzelsträngige endmarkierte Substrat-DNA, 1 Unit DNAPTaq und 4 pmol Pilot-Oligonukleotid in einem Volumen von 20 µl der gleichen Puffer. Diese Komponenten wurden während einer 1-minütigen Inkubation bei 95°C vereinigt, so dass die PCR-erzeugte doppelsträngige Substrat-DNA denaturiert wurde, und die Temperaturen der Reaktionen wurden dann auf ihre endgültigen Inkubationstemperaturen reduziert. Die Oligonukleotide 30-12 und 19-12 können an Bereiche der Substrat-DNAs hybridisieren, welche 85 und 27 Nukleotide vom 5'-Ende des Zielstrangs entfernt sind.

[0190] Die **Fig. 21** zeigt die vollständige 206-mer-Sequenz (Seq.-ID Nr. 32). Das 206-mer wurde durch PCR erzeugt. Der M13/pUC-24-mer Umkehr-Sequenzierungs-Primer (-48) und der M13/pUC-Sequenzierungs-Primer (-47) von New England Biolabs (Katalog-Nr. 1233 und 1224) wurden verwendet (jeweils 50 pmol) mit dem pGEM3z(f+)-Plasmidvektor (Promega Corp.) als Matrize (10 ng), der die Zielsequenzen enthält. Die PCR-Bedingungen waren folgendermaßen: 50 µM von jedem dNTP und 2,5 Units Taq-DNA-Polymerase in 100 µl 20 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl mit 0,05% Tween-20 und 0,05% NP-40. Die Reaktionen erfolgten in 35 Zyklen bei 95°C für 45 sec, 63°C für 45 sec, dann 72°C für 75 sec. Nach den Zyklen wurden die Reaktionen abgeschlossen mit einer Inkubation bei 72°C für 5 min. Das resultierende Fragment wurde gereinigt durch Elektrophorese über ein 6%iges Polyacrylamidgel (29:1 Vernetzung) in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA, sichtbar gemacht durch Ethidiumbromid-Färbung oder Autoradiographie, aus dem Gel ausgeschnitten, durch passive Diffusion eluiert und durch Ethanol-Fällung aufkonzentriert.

[0191] Die Spaltung der Substrat-DNA erfolgte in Anwesenheit des Pilot-Oligonukleotids 19-12 bei 50°C (**Fig.** 128, Spuren 1 und 7), aber nicht bei 75°C (Spuren 4 und 10). In Anwesenheit von Oligonukleotid 30-12 wurde die Spaltung bei beiden Temperaturen beobachtet. Die Spaltung erfolgte nicht in Abwesenheit von zugefügten Oligonukleotiden (Spuren 3, 6 und 12) oder bei etwa 80°C, obschon bei 50°C zufällige Strukturen im Substrat eine primerunabhängige Spaltung in Abwesenheit von KCl ermöglichten (**Fig. 12B**, Spur 9). Ein nichtspezifisches Oligonukleotid ohne Komplementarität zur Substrat-DNA leitete bei 50°C in Anwesenheit oder in Abwesenheit von 50 mM KCl (Spuren 13 und 14) keine Spaltung. Somit kann die Spezifität der Spaltungsreaktionen durch das Ausmaß der Komplementarität zum Substrat und durch die Inkubationsbedingungen gesteuert werden.

D. Spaltung von RNA

[0192] Eine verkürzte RNA-Version der in den vorstehend erläuterten Transspaltungsexperimenten verwendeten Sequenz wurde auf ihre Fähigkeit untersucht, ob sie als Substrat in der Reaktion dienen kann. Die RNA

wird an der erwarteten Stelle gespalten, in einer Reaktion, die von der Anwesenheit des Pilot-Oligonukleotids abhängt. Das RNA-Substrat, hergestellt durch T7-RNA-Polymerase in Anwesenheit von [α-^{32}P]UTP, entspricht einer verkürzten Version des in der Fig. 12B verwendeten DNA-Substrates. Die Reaktionsbedingungen waren ähnlich denjenigen, die für die vorstehend beschriebenen DNA-Substrate verwendet wurden, mit 50 mM KCl; die Inkubation erfolgte für 40 min bei 55°C. Das verwendete Pilot-Oligonukleotid hat die Bezeichnung 30-0 (Seq.-ID Nr. 20) und ist in der Fig. 13A gezeigt.

[0193] Die Ergebnisse der Spaltreaktion sind in der Fig. 13B gezeigt. Die Reaktion erfolgte entweder in Anwesenheit oder in Abwesenheit von DNAPTaq oder Pilot-Oligonukleotid, wie in der Fig. 13B angegeben.

[0194] Bei der RNA-Spaltung ist überraschenderweise kein 3'-Arm für das Pilot-Oligonukleotid erforderlich. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass diese Spaltung auf der vorher beschriebenen RNaseH beruht, die Erwartungen zufolge die RNA an verschiedenen Stellen entlang des 30 Basenpaare langen RNA-DNA-Doppelstrangs spalten sollte. Die 5'-Nuklease der DNAPTaq ist eine strukturspezifische RNaseH, die die RNA an einer einzelnen Stelle nahe dem 5'-Ende des Heteroduplexbereichs spaltet.

[0195] Es ist überraschend, dass ein Oligonukleotid ohne 3'-Arm bei der Leitung der effizienten Spaltung eines RNA-Ziels als Pilot-Oligonukleotid wirken kann, da solche Oligonukleotide keine effiziente Spaltung von DNA-Zielen mit nativen DNAPs leiten können. Einige erfindungsgemäße 5'-Nukleasen (beispielsweise die Klone E, F und G in Fig. 4) können jedoch die DNA in Abwesenheit eines 3'-Arms spalten.

[0196] Mit anderen Worten ist eine nicht-verlängerbare Spaltstruktur zur spezifischen Spaltung mit einigen erfindungsgemäßen 5'-Nukleasen, die von thermostabilen DNA-Polymerasen hergeleitet sind, nicht erforderlich.

[0197] Wir testeten dann, ob die Spaltung einer RNA-Matrize durch DNAPTaq in Anwesenheit eines vollständig komplementären Primers erklären konnte, warum DNAPTaq ein DNA-Oligonukleotid auf einer RNA-Matrize nicht verlängern konnte, in einer Reaktion ähnlich wie bei der reversen Transkriptase. Eine weitere thermophile DNAP, DNAPTth, kann die RNA als Matrize verwenden, aber nur in Anwesenheit von Mn++, so wurde von uns vorhergesagt, dass dieses Enzym RNA in Anwesenheit dieses Kations nicht spalten kann. Folglich wurde ein RNA-Molekül mit einem geeigneten Pilot-Oligonukleotid in Anwesenheit von DNAPTaq oder DNAPTth in Puffer, der entweder Mg++ oder Mn++ enthielt, inkubiert. Erwartungsgemäß spalteten beide Enzyme die RNA in Anwesenheit von Mg++. DNAPTaq, jedoch nicht DNAPTth, bauten die RNA in Anwesenheit von Mn++ ab. Wir schlossen daraus, dass die 5'-Nuklease-Aktivitäten vieler DNAPs zu ihrer Unfähigkeit zur Verwendung von RNA als Matrizen beitragen können.

BEISPIEL 2

Erzeugung von 5'-Nukleasen aus thermostabilen DNA-Polymerasen

[0198] Thermostabile DNA-Polymerasen wurden erzeugt, welche eine reduzierte Syntheseaktivität aufwiesen, eine Aktivität, die eine ungewünschte Nebenreaktion bei der DNA-Spaltung in dem erfindungsgemäßen Nachweistest ist, aber dennoch eine thermostabile Nukleaseaktivität beibehielten. Das Ergebnis ist eine thermostabile Polymerase, die Nukleinsäure-DNA mit äußerster Spezifität spaltet.

[0199] Die DNA-Polymerasen vom Typ A aus Eubakterien der Gattung Thermus teilen eine extensive Proteinsequenz-Identität (90% in der Polymerisations-Domäne, wobei das Lipman-Pearson-Verfahren in der DNA-Analyse-Software von DNA-Star, WI verwendet wurde) und verhalten sich in Polymerisations- und Nuklease-Tests ähnlich. Daher werden die Gene für die DNA-Polymerase von Thermus aquaticus (DNAPTaq) und Thermus flavus (DNAPTfl) als Repräsentanten für diese Klasse verwendet. Polymerase-Gene von anderen eubakteriellen Organismen, wie zum Beispiel Thermus thermophilus, Thermus sp., Thermotoga maritima, Thermosipho africanus und Bacillus stearothermophilus sind gleichermaßen geeignet. Die DNA-Polymerasen von diesen thermophilen Organismen können überleben und bei erhöhten Temperaturen arbeiten und können somit in Reaktionen verwendet werden, bei denen die Temperatur als Selektion gegen nicht-spezifische Hybridisierung von Nukleinsäuresträngen verwendet wird.

[0200] Die für die nachstehend beschriebene Deletionsmutagenese verwendeten Restriktionsstellen wurden der Einfachheit halber ausgewählt. Verschiedene Stellen, die eine ähnliche Einfachheit aufweisen, sind im Thermus thermophilus-Gen zugänglich und können zur Herstellung ähnlicher Konstrukte mit anderen Typ-A-Polymerase-Genen von verwandten Organismen verwendet werden.

A. Herstellung von 5'-Nukleasekonstrukten

1. Modifizierte DNAPTaq-Gene

[0201] Der erste Schritt war das Platzieren eines modifizierten Gens für die Taq-DNA-Polamerase auf einem Plasmid unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Das modifizierte Taq-Polymerase-Gen wurde folgendermaßen isoliert: Das Taq-DNA-Polymerasegen wurde durch die Polymerasekettenreaktion aus der genomischen DNA von Thermus aquaticus, Stamm YT-1 (Lawyer et al., siehe oben) amplifiziert, wobei als Primer die in den Seq.-ID Nr. 13–14 beschriebenen Oligonukleotide verwendet wurden. Das resultierende DNA-Fragment hat eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI am 5'-Ende der codierenden Sequenz und eine BglII-Sequenz am 3'-Ende. Die Spaltung mit BglII ergibt einen 5'-Überhang oder ein "klebriges Ende", das mit dem Ende kompatibel ist, das von BamHI erzeugt wird. Die PCR-amplifizierte DNA wurde mit EcoRI und BamHI gespalten. Das 2512-Basenppaar-Fragment, das den codierenden Bereich für das Polymerase-Gen enthielt, wurde über Gel gereinigt und dann in ein Plasmid ligiert, das einen induzierbaren Promotor enthält.

[0202] Der pTTQ18-Vektor, der den Hybrid-trp-lac(tac)-Promotor enhält, wurde verwendet [M.J.R. Stark, Gene 5: 255 (1987)] und ist in der **Fig. 14** gezeigt. Der tac-Promotor steht unter der Kontrolle des E. coli-lac-Repressors. Die Repression ermöglicht, dass die Synthese des Genprodukts unterdrückt wird, bis das gewünschte Niveau des Bakterienwachstums erreicht wird, wobei an diesem Punkt die Repression durch Zugabe eines spezifischen Induktors, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) aufgehoben wird. Ein solches System ermöglicht die Expression von Fremdproteinen, die das Wachstum von Transformanten verlangsamen oder verhindern können.

[0203] Bakterielle Promotoren, wie z.B. tac, brauchen nicht angemessen unterdrückt zu werden, wenn sie auf einem Multi-Copy-Plasmid vorhanden sind. Wird ein hochtoxisches Protein unter die Kontrolle eines solchen Promotors platziert, kann eine kleine durchsickernde Expressionsmenge schädlich für die Bakterien sein. Bei einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform wurde eine weitere Option zur Unterdrückung der Synthese eines klonierten Genprodukts verwendet. Der nichtbakterielle Promotor aus dem Bakteriophagen T7, der sich in Plasmid-Vektor der Reihe pET-3 findet, wurde zum Exprimieren des klonierten mutierten Taq-Polymerase-Gene verwendet [**Fig. 15**; Studier und Moffatt, J. Mol. Biol., 189: 113 (1986)]. Dieser Promotor startet die Transkription nur durch T7-RNA-Polymerase. In einem geeigneten Stamm, wie z.B. BL21(DE3)pLYS befindet sich das Gen für diese RNA-Polymerase auf dem Bakteriengenom unter der Kontrolle des lac-Operators. Diese Anordnung hat den Vorteil, dass die Expression des Multi-Copy-Gens (auf dem Plasmid) vollständig von der Expression der T7-RNA-Polymerase abhängt, die leicht unterdrückt wird, weil sie in einer Einzelkopie vorliegt.

[0204] Zur Ligierung in den pTTQ18-Vektor (**Fig. 14**) wurde die PCR-Produkt-DNA, die den Taq-Polymerase-codierenden Bereich enthielt (mutTaq, Klon 4B, Seq.-ID Nr. 21) mit EcoRI und BglII verdaut, und dieses Fragment wurde unter Standard-Bedingungen für "klebrige Enden" [Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)] in die EcoRI- und BamHI-Stellen des Plasmid-Vektors pTTQ18 ligiert. Die Expression dieses Konstrukts ergibt ein Translationsfusionsprodukt, in dem die ersten beiden Reste des nativen Proteins (Met-Arg) durch drei aus dem Vektor (Met-Asn-Ser) ersetzt sind, aber der Rest des natürlichen Proteins ändert sich nicht. Das Konstrukt wurde in den E. coli JM109-Stamm transfomiert, und die Transformanten wurden unter unvollständigen Repressionsbedingungen plattiert, die kein Wachstum der Bakterien ermöglichen, die das native Protein exprimieren. Diese Plattierungsbedingungen ermöglichen die Isolation der Gene, die vorher existierende Mutationen enthalten, wie diejenigen, die aus der Ungenauigkeit der Taq-Polymerase während des Amplifikationsverfahrens hervorgehen.

[0205] Mit diesem Amplifikations-/Selektionsprotokoll wurde von uns ein Klon (gezeigt in der **Fig.** 4B), der ein mutiertes Taq-Polymerase-Gen enthielt (mutTaq, Klon 4B), isoliert. Die Mutante wurde zuerst durch ihren Phänotyp erfasst, bei dem die temperaturstabile 5'-Nuklease-Aktivität in einem rohen Zellextrakt normal war, aber die Polymerisationsaktivität fast fehlte (kleiner als ungefähr 1% der Wild-Typ-Taq-Polymerase-Aktivität).

[0206] Die DNA-Sequenzanalyse des rekombinanten Gens zeigte, dass es Änderungen in der Polymerase-Domäne aufwies, die zu zwei Aminosäure-Austauschen führten: ein A zu G-Austausch an Nukleotid-Position 1394 bewirkt einen Austausch von Glu nach Gly an der Aminosäure-Position 465 (nummeriert nach den natürlichen Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen Seq.-ID Nr. 1 und 4), und ein weiterer A zu G-Austausch an der Nukleotid-Position 2260 bewirkt eine Änderung von Gln zu Arg an der Aminosäure-Position 754. Da die Mutation von Gln nach Gly an einer nichtkonservierten Position erfolgte und da die Mutation von Glu nach Arg eine Aminosäure verändert, die nahezu in allen bekannten Polymerasen vom Typ A konserviert ist, ist diese

letztere Mutation höchstwahrscheinlich diejenige, die für das Einschränken der Syntheseaktivität dieses Proteins verantwortlich ist. Die Nukleotidsequenz für das Konstrukt von **Fig.** 4B ist in der Seq.-ID Nr. 21 gegeben.

[0207] Nachfolgende Derivate der DNAPTaq-Konstrukte wurden hergestellt aus dem mutTaq-Gen, somit tragen alle diese Aminosäure-Substitutionen neben ihren anderen Änderungen, sofern nicht diese bestimmten Bereiche deletiert wurden. Diese mutierten Stellen sind durch schwarze Kästen an diesen Stellen in den Diagrammen in **Fig. 4** hervorgehoben. Sämtliche Konstrukte außer denen in **Fig.** 4E, F und G gezeigten Genen wurden im pTTQ18-Vektor hergestellt.

[0208] Der für die Gene in den **Fig.** 4E und F verwendete Klonierungsvektor stammte von der vorstehend beschriebenen kommerziell erhältlichen pET-3-Reihe. Diese Vektor-Reihe hat zwar nur eine BamHI-Stelle zum Klonieren stromabwärts des T7-Promotors, jedoch enthält die Reihe Varianten, die eine Klonierung in jedem der drei Leseraster ermöglicht. Zur Klonierung des vorstehend beschriebenen PCR-Produktes wurde die als pET-3c bezeichnete Variante verwendet (**Fig. 15**). Der Vektor wurde mit BamHI gespalten, mit Kalbs-Intestinum-Phosphatase dephosphoryliert und die klebrigen Enden wurden mit Klenow-Fragment von DNAPEc1 und dNTPs aufgefüllt. Das Gen für die in **Fig.** 4B gezeigte mutierte TaqD-NAP (mutTaq, Klon 4B) wurde aus pTTQ18 durch Verdau mit EcoRI und SalI entfernt, und die "klebrigen Enden" wurde genauso wie beim Vektor aufgefüllt. Das Fragment wurde unter Standard-Bedingungen für stumpfe Enden an den Vektor ligiert (Sambrook et al., Molecular Cloning, siehe oben), das Konstrukt wurde in den BL21 (DE3)pLYS-Stamm von E. coli transformiert, und die Isolate wurden gescreent, um diejenigen zu identifizieren, die mit dem Gen in der richtigen Orientierung in Bezug auf den Promotor ligiert waren. Diese Konstruktion ergibt ein weiteres Translations-Fusionsprodukt, bei dem die ersten beiden Aminosäuren der DNAPTaq (Met-Arg) durch 13 aus dem Vektor plus zwei aus dem Primer (Met-Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly-Arg-Ile-Asn-Ser) (Seq.-ID Nr. 29) ersetzt sind.

[0209] Unser Ziel war die Erzeugung von Enzymen, denen die Fähigkeit zur Synthese von DNA fehlte, die aber die Fähigkeit zur Spaltung von Nukleinsäuren mit einer 5'-Nuklease-Aktivität behielten. Der Vorgang der geprimten Matrizen-Synthese von DNA ist tatsächlich eine koordinierte Serie von Ereignissen, so dass man die DNA-Synthese durch Unterbrechen eines Ereignisses abschalten kann, während zugleich die anderen nicht beeinträchtigt werden. Diese Schritte umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf, Primer-Erkennung und -Bindung, dNTP-Bindung und Katalyse der Inter-Nukleotid-Phosphodiester-Bindung. Einige der Aminosäuren in der Polymerisationsdomäne von DNAPEc1 wurden mit diesen Funktionen in Zusammenhang gebracht, aber die genauen Mechanismen sind bisher kaum definiert.

[0210] Ein Weg zur Zerstörung der Polymerisationsfähigkeit einer DNA-Polymerase ist die vollständige oder partielle Deletion des Gensegmentes, das diese Domäne für das Protein codiert, oder ansonsten das Unfähigmachen des Gens zur Herstellung einer vollständigen Polymerisations-Domäne. Einzelne mutierte Enzyme können sich hinsichtlich der Stabilität und Löslichkeit innerhalb und außerhalb der Zellen voneinander unterscheiden. Zum Beispiel wird im Gegensatz zur 5'-Nuklease-Domäne von DNAPEc1, das in einer aktiven Form aus der Polymerisations-Domäne durch sanfte Proteolyse freigesetzt werden kann [Setlow und Kornberg, J. BioL. Chem. 247: 232 (1972)], die Thermus-Nuklease-Domäne, wenn sie entsprechend behandelt wird, weniger löslich, und die Spaltungsaktivität geht oft verloren.

[0211] Mit dem in **Fig.** 4B gezeigten mutierten Gen als Ausgangsmaterial wurden verschiedene Deletions-Konstrukte erzeugt. Sämtliche Klonierungsverfahren waren Standard (Sambrook et al., siehe oben) und werden folgendermaßen kurz zusammengefasst:
Fig. 4C: Das mutTaq-Konstrukt wurde mit PstI verdaut, das einmal in der Polymerase-codierenden Region spaltet, wie angezeigt, und sofort stromabwärts des Gens in der Mehrfachklonierungsstelle des Vektors spaltet. Nach der Freisetzung des Fragmentes zwischen diesen beiden Stellen wurde der Vektor religiert, was eine 894-Nukleotid-Deletion erzeugt, und ein Stop-Codon 40 Nukleotide stromabwärts der Verbindungsstelle im Leseraster eingebracht. Die Nukleotidsequenz dieser 5'-Nuklease (Klon 4C) ist in der Seq.-ID Nr. 9 angegeben.
Fig. 4D: Das mutTaq-Konstrukt wurde mit NheI verdaut, das einmal in dem Gen an der Position 2047 spaltet. Die resultierenden vier Nukleotide großen 5'-überhängenden Enden wurden, wie vorstehend beschrieben, aufgefüllt, und die stumpfen Enden wurden religiert. Die resultierende vier Nukleotide große Insertion ändert das Leseraster und verursacht eine Termination der Translation zehn Aminosäuren stromabwärts der Mutation. Die Nukleotidsequenz dieser 5'-Nuklease (Klon 4D) ist in der Seq.-ID Nr. 10 angegeben.
Fig. 4E: Das gesamte mut Taq-Gen wurde aus pTTQ18 mit EcoRI und SalI ausgeschnitten und in pET-3c wie oben beschrieben kloniert. Dieser Klon wurde mit BstXI und XcmI an einzelnen Stellen gespalten, die sich an den in der **Fig.** 4E gezeigten Stellen befinden. Die DNA wurde mit dem Klenow-Fragment von DNAPEc1 und dNTPs behandelt, was zu 3'-überhängenden Enden an beiden Seiten führte, die auf stumpfe Enden geschnit-

ten wurden. Diese stumpfen Enden wurden miteinander ligiert, was zu einer Deletion von 1540 Nukleotiden ausserhalb des Leserasters führte. Ein im Raster befindliches Terminations-Codon erfolgt 18 Tripletts hinter der Verbindungsstelle. Die Nukleotidsequenz dieser 5'-Nuklease (Klon 4E) ist in der Seq.-ID Nr. 11 gegeben, wobei die geeignete Leitsequenz in Seq.-ID Nr. 30 angegeben ist. Diese wird auch als Cleavase™ BX bezeichnet.

Fig. 4F: Das gesamte mutTaq-Gen wurde aus pTTQ18 mit EcoRI und SalI geschnitten und in pET-3c kloniert, wie oben beschrieben. Dieser Klon wurde mit BstXI und BamHI an einzelnen Stellen gespalten, die sich an den im Diagramm gezeigten Stellen befinden. Die DNA wurde mit dem Klenow-Fragment von DNAPEc1 und dNTPs behandelt, was zu 3'-überhängenden Enden der BstXI-Stelle führte, die zu einem stumpfen Ende geschnitten wurden, wohingegen das 5'-überhängende Ende der BamHI-Stelle zur Erzeugung eines stumpfen Endes aufgefüllt wurde. Diese Enden wurden miteinander ligiert, was eine Deletion im Leseraster von 903 Nukleotiden ergab. Die Nukleotid-Sequenz der 5'-Nuklease (Klon 4F) ist in Seq.-ID Nr. 12 angegeben. Diese wird auch als Cleavase™ BB bezeichnet.

Fig. 4G: Diese Polymerase ist eine Variante von der in **Fig.** 4E gezeigten. Sie wurde in den Plasmidvektor pET-21 (Novagen) kloniert. Der in diesem Vektor befindliche nichtbakterielle Promotor as der Bakteriophage T7 startet die Transkription nur durch T7-RNA-Polymerase. Siehe Studier und Moffatt, siehe oben. In einem geeigneten Stamm, wie z.B. (DES)pLYS, befindet sich das Gen für diese RNA-Polymerase auf dem Bakterien-Genom unter der Kontrolle des lac-Operators. Diese Anordnung hat den Vorteil, dass die Expression des Multi-Copy-Gens (auf dem Plasmid) vollständig von der Expression der T7-RNA-Polymerase abhängt, die leicht unterdrückt wird, da sie in einer einzelnen Kopie vorliegt. Da die Expression dieser mutierten Gene unter diesem fest kontrollierten Promotor steht, sind potentielle Probleme bezüglich Toxizität der exprimierten Proteine für die Wirtszelle weniger bedeutend.

[0212] Der pET-21-Vektor hat auch einen "His·Tag", einen Bereich von sechs aufeinanderfolgenden Histidin-Resten, die am Carboxy-Terminus der exprimierten Proteine angefügt sind. Die resultierenden Proteine können dann in einem einzigen Schritt durch Metall-Chelatbildungs-Chromatographie gereinigt werden, wobei ein kommerziell erhältliches (Novagen) Säulenharz mit immobilisierten Ni^{++}-Ionen verwendet wird. Die 2,5-ml-Säulen sind wiederverwendbar und können bis zu 20 mg des Zielproteins unter nativen oder denaturierenden Bedingungen (Guanidin·HCl oder Harnstoff) binden.

[0213] E. coli (DES)pLYS-Zellen werden mit den vorstehend beschriebenen Konstrukten mittels Standard-Transformationstechniken transformiert und zum Animpfen eines Standard-Wachstums-Mediums (z.B. Luria-Bertani-Brühe) verwendet. Die Herstellung von T7-RNA-Polymerase wird während des Wachstums in der Log-Phase durch Zugabe von IPTG induziert, und es wird weitere 12 bis 17 Std. inkubiert. Aliquots der Kultur werden vor und nach der Induktion entnommen, und die Proteine werden durch SDS-PAGE untersucht. Das Färben mit Coomassie-Blau ermöglicht ein Sichtbarmachen der Fremdproteine, wenn sie etwa 3 bis 5% des Zellproteins ausmachen und nicht mit irgendeiner der Hauptproteinbanden mitwandern. Die Proteine, die mit dem Haupt-Wirtsprotein mitwandern, müssen als mehr als 10% des Gesamtproteins exprimiert werden, damit diese in dieser Analysestufe beobachtbar sind.

[0214] Einige mutierte Proteine werden durch die Zellen in Einschlusskörper sequestriert. Diese sind Granula, die sich im Cytoplasma bilden, wenn Bakterien veranlasst werden, hohe Spiegel von Fremdprotein zu exprimieren, und sie können aus einem rohen Lysat gereinigt werden, und durch SDS-PAGE analysiert werden, um ihren Proteingehalt zu bestimmen. Wird das klonierte Protein in den Einschlusskörpern gefunden, muss es freigesetzt werden, damit die Spaltungs- und Polymerase-Aktivitäten untersucht werden können. Verschiedene Solubilisierungsverfahren können für verschiedene Proteine geeignet sein, und eine Anzahl von Verfahren ist bekannt Siehe z.B. Builder & Ogez, US-Patent Nr. 4,511,502 (1985); Olson, US-Patent Nr. 4,518,526 (1985); Olson & Pai, US-Patent Nr. 4,511,503 (1985); und Jones et al., US-Patent Nr. 4,512,922 (1985).

[0215] Das solubilisierte Protein wird dann auf der Ni^{++}-Säule wie vorstehend beschrieben gereinigt, wobei die Angaben des Herstellers (Novagen) befolgt werden. Die gewaschenen Proteine werden aus der Säule durch eine Kombination von Imidazol-Kompetitor (1 M) und Hochsalz (0,5 M NaCl) eluiert und dialysiert, so dass der Puffer ausgetauscht wird und damit sich denaturierte Proteine zurückfalten können. Übliche Ausbeuten führen zu etwa 20 µg spezifisches Protein pro ml Ausgangskultur. Die DNAP-Mutante wird als Cleavase™ BN bezeichnet, und die Sequenz ist in der Seq.-ID Nr. 31 angegeben.

2. Modifiziertes DNAPTfl-Gen

[0216] Das DNA-Polymerase-Gen von Thermus flavus wurde isoliert aus dem "T. flavus" AT-62-Stamm, erhalten von der American Type Tissue-Collection (ATCC 33923). Dieser Stamm hat eine andere Restriktions-

karte als der T. flavus-Stamm, der zur Erzeugung der Sequenz verwendet wird, die von Akhmetzjanov und Vakhitov, siehe oben, veröffentlicht wurde. Die veröffentlichte Sequenz ist als Seq.-ID Nr. 2 aufgeführt. Keine Sequenzdaten wurden für das DNA-Polymerase-Gen aus dem AT-62-Stamm von T. flavus veröffentlicht.

[0217] Genomische DNA aus T. flavus wurde mit den gleichen Primern amplifiziert, die zur Amplifikation des T. aquaticus DNA-Polymerase-Gens (Seq.-ID Nr. 13–14) verwendet wurde. Das etwa 2500 Basenpaare PCR-Fragment wurde mit EcoRI und BamHI verdaut. Die überhängenden Enden wurden mit dem Klenow-Fragment von DNAPEc1 und dNTPs stumpfendig gemacht. Das resultierende etwa 1800 Basenpaare Fragment, das den codierenden Bereich für den N-Terminus enthielt, wurde in pET-3c, wie vorstehend beschrieben, ligiert. Diese Konstrukt, Klon 5B, ist in der **Fig.** 5B gezeigt. Das Wildtyp-T. flavus-DNA-Polymerase-Gen ist in der **Fig.** 5A gezeigt. Der 5B-Klon hat die gleiche Führungs-Aminosäuren wie die DNAP-Taq-Klone 4E und F, die in pET-3c kloniert wurden; es ist nicht genau bekannt, wo die Translationstermination erfolgt, aber der Vektor hat ein starkes Transkriptionsterminationssignal unmittelbar stromabwärts der Klonierungsstelle.

B. Wachstum und Induktion transformierter Zellen

[0218] Bakterienzellen wurden mit den vorstehend beschriebenen Konstrukten mittels Standard-Transformationstechniken transformiert und zum Animpfen von 2 ml Standard-Wachstumsmedium (beispielsweise Luria-Bertani-Brühe) verwendet. Die resultierenden Kulturen wurden wie für den jeweiligen verwendeten Stamm geeignet, inkubiert, und erforderlichenfalls für ein bestimmtes Expressionssystem induziert. Für sämtliche in den Fig. 4 und Fig. 5 gezeigte Konstrukte wurden die Kulturen bis zu einer optischen Dichte (bei 600 nm Wellenlänge) von 0,5 OD gezüchtet.

[0219] Zur Induktion der Expression der klonierten Gene wurden die Kulturen auf eine Endkonzentration von 0,4 mM IPTG gebracht, und die Inkubationen wurden für 12 bis 17 Std. fortgesetzt. 50 µl Aliquote jeder Kultur wurden vor und nach der Induktion entfernt und wurden mit 20 µl eines Standard-Gelbeladungspuffers für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) vereinigt. Nachfolgendes Färben mit Coomassie-Blau (Sambrook et al., siehe oben) ermöglicht die Sichtbarmachung der Fremdproteine, wenn sie etwa 3 bis 5% des Zellproteins ausmachen und nicht mit einer der Haupt-E. coli-Protein-Banden mitmigrieren. Proteine, die mit einem Haupt-Wirtsprotein mitmigrieren, müssen als mehr als 10% des Gesamtproteins exprimiert werden, damit sie sich in dieser Analysestufe beobachten lassen.

C. Wärmelyse und Fraktionierung

[0220] Exprimierte thermostabile Proteine, d.h. die 5'-Nukleasen, wurden isoliert durch Erwärmen von rohen Bakterien-Zellextrakten, so dass eine Denaturierung und Fällung der weniger stabilen E. coli-Proteine erfolgte. Die gefällten E. coli-Proteine wurden dann zusammen mit anderen Zelltrümmern durch Zentrifugation entfernt. Dann wurden 1,7 ml der Kultur durch Mikrozentrifugation bei 12000 bis 14000 U/min für 30 bis 60 Sekunden pelletiert. Nach der Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 400 µl Puffer A (50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9, 50 mM Dextrose, 1 mM EDTA)resuspendiert, erneut zentrifugiert und dann in 80 µl Puffer A mit 4 mg/ml Lysozym resuspendiert. Die Zellen wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit 80 µl Puffer B (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% Tween-20, 0,5% Nonidet-P40) vereinigt.

[0221] Das Gemisch wurde 1 Std. bei 75°C inkubiert, so dass die Wirtsproteine denaturiert und gefällt wurden. Dieses Zellextrakt wurde 15 Minuten bei 4°C und 14000 U/min zentrifugiert, und der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt. Ein Aliquot von 0,5 bis 1 µl dieses Überstands wurde direkt in jeder Testreaktion verwendet, und der Proteingehalt des Extraktes wurde bestimmt, in dem 7 µl einer Elektrophoreseanalyse unterworfen wurden, wie oben erwähnt. Die native rekombinante Taq-DNA-Polymerase [Engelke, Anal. Biochem 191: 396 (1990)] und das in der **Fig.** 4B gezeigte Protein mit der doppelten Punktmutation sind beide an dieser Stelle löslich und aktiv.

[0222] Das Fremdprotein kann nach den Wärmebehandlungen aufgrund der Sequestrierung von Fremdprotein durch die Zellen in Einschlusskörper nicht nachweisbar sein. Diese sind Granula, die sich im Cytoplasma bilden, wenn Bakterien veranlasst werden, hohe Spiegel eines Fremdproteins zu exprimieren, und sie können aus einem rohen Lysat gereinigt werden, und durch SDS-PAGE analysiert werden, um deren Proteingehalt zu bestimmen. Viele Verfahren wurden in der Literatur beschrieben, und ein Ansatz ist nachstehend beschrieben.

D. Isolation und Solubilisierung von Einschlusskörpern

[0223] Eine kleine Kultur wurde gezüchtet und wie oben beschrieben induziert. Ein 1,7 ml Aliquot wurde durch kurze Zentrifugation pelletiert, und die Bakterienzellen wurden in 100 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) resuspendiert. 2,5 µl 20 mM PMSF wurden auf eine Endkonzentration von 0,5 mM dazugegeben, und Lysozym wurde auf eine Konzentration von 1,0 mg/ml zugegeben. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert, Desoxycholsäure wurde auf 1 mg/ml (1 µl einer 100 mg/ml Lösung) zugegeben, und das Gemisch wurde weiter bei 37°C für etwa 15 Minuten inkubiert oder bis es viskos war. DNAse I wurde auf 10 µg/ml zugegeben, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für etwa 30 Minuten inkubiert oder solange, bis es nicht länger viskos war.

[0224] Aus diesem Gemisch wurden die Einschlusskörper durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 15 Minuten bei 4°C gesammelt, und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Lysepuffer mit 10 mM EDTA (pH-Wert 8,0) und 0,5% Triton X-100 resuspendiert. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Einschlusskörper wie zuvor pelletiert, und der überstand wurde zur späteren Analyse aufbewahrt. Die Einschlusskörper wurden in 50 µl destilliertem Wasser resuspendiert, und 5 µl wurden mit SDS-Gelbeladungspuffer (der die Einschlusskörper löst) vereinigt und zusammen mit einem Aliquot des Überstands elektrophoretisch analysiert.

[0225] Wenn das klonierte Protein in den Einschlusskörpern gefunden wird, kann es freigesetzt werden, damit man die Spaltungs- und Polymeraseaktivitäten untersuchen kann, und das Solubilisierungsverfahren muss mit der jeweiligen Aktivität kompatibel sein. Verschiedene Solubilisierungsverfahren können sich für verschiedene Proteine eignen und eine Anzahl von Verfahren sind in Molecular Cloning (Sambrook et al., siehe oben) erörtert. Es folgt eine Anpassung, die für verschiedene unserer Isolate verwendet wurde.

[0226] 20 µl der Einschlusskörper-Wasser-Suspension wurden durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 4 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert, und der Überstand wurde verworfen. Zum weiteren Waschen der Einschlusskörper wurde das Pellet in 20 µl Lysepuffer mit 2 M Harnstoff resuspendiert, und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Die gewaschenen Einschlusskörper wurden dann in 2 µl Lysepuffer mit 8 M Harnstoff resuspendiert; die Lösung klärte sich sichtbar als die Einschlusskörper sich lösten. Ungelöste Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 4 Minuten bei Raumtemperatur entfernt, und der Extrakt-Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt.

[0227] Zur Reduktion der Harnstoff-Konzentration wurde der Extrakt in KH_2PO_4 verdünnt. Ein frisches Röhrchen wurde hergestellt, das 180 µl 50 mM KH_2PO_4, pH-Wert 9,5, 1 mM EDTA und 50 mM NaCl enthielt. Ein 2 µl Aliquot des Extrakts wurden zugegeben und kurz im Vortexgerät gemischt. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis der gesamte Extrakt für insgesamt 10 Zugaben zugegeben wurde. Das Gemisch wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, während dieser Zeit bildet sich oft etwas Niederschlag. Die Niederschläge wurden durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 15 Minuten bei Raumtemperatur entfernt, und der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt. Zu den 200 µl Protein in der KE_2PO_4-Lösung wurden 140–200 µl gesättigtes $(NH_4)_2SO_4$ zugegeben, so dass das resultierende Gemisch etwa 41% bis 50% gesättigtes $(NH_4)_2SO_4$ enthielt. Das Gemisch wurde 30 Minuten auf Eis gekühlt, so dass das Protein gefällt werden konnte, und das Protein wurde dann durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 4 Minuten bei Raumtemperatur gesammelt. Der überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 20 µl Puffer C (20 mM HEPES, pH-Wert 7,9, 1 mM EDTA, 0,5% PMSF, 25 mM KCl und jeweils 0,5% von Tween-20 und Nonidet P 40) gelöst.

[0228] Die Protein-Lösung wurde wiederum für 4 Minuten zentrifugiert, um unlösliche Materialien zu pelletieren, und der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen entfernt. Der Proteingehalt der auf diese Weise hergestellten Extrakte wurde sichtbar gemacht durch Auflösen von 1–4 µl mittels SDS-PAGE; 0,5 bis 1 µl Extrakt wurden bei Spaltungs- und Polymerisationstests, wie beschrieben, untersucht.

E. Proteinanalyse auf die Anwesenheit von Nuklease- und Synthese-Aktivität

[0229] Die vorstehend beschriebenen und in den Fig. 4 und Fig. 5 gezeigten 5'-Nukleasen wurden durch die folgenden Verfahren analysiert.

1. Strukturspezifischer Nuklease-Test

[0230] Eine modifizierte Kandidaten-Polymerase wird durch Untersuchen ihrer Fähigkeit zur Katalyse strukturspezifischer Spaltungen auf 5'-Nukleaseaktivität getestet. Der hier verwendete Begriff "Spaltstruktur" steht

für eine Nukleinsäurestruktur, die ein Substrat für die Spaltung durch die 5'-Nuklease-Aktivität von DNAP ist.

[0231] Die Polymerase wird Testkomplexen ausgesetzt, die die in der Fig. 16 gezeigten Strukturen haben. Das Testen auf 5'-Nuklease-Aktivität beinhaltet 3 Reaktionen: 1) eine primergerichtete Spaltung (**Fig.** 16B) erfolgt, weil sie gegenüber Variationen der Salzkonzentration der Reaktion relativ unempfindlich ist, und kann daher in beliebigen Lösungsbedingungen durchgeführt werden, die das modifizierte Enzym für die Aktivität benötigt; dies sind gewöhnlich die gleichen Bedingungen, die für unmodifizierte Polymerasen bevorzugt sind; 2) eine ähnliche primergerichtete Spaltung erfolgt in einem Puffer, der eine primerunabhängige Spaltung ermöglicht, d.h. ein Niedrigsalzpuffer, so dass gezeigt wird, dass das Enzym unter diesen Bedingungen lebensfähig ist; und 3) eine primerunabhängige Spaltung (**Fig.** 16A) erfolgt im gleichen Niedrigsalzpuffer.

[0232] Der gegabelte Doppelstrang wird zwischen einem Substratstrang und einem Matrizenstrang wie in der Fig. 16 gezeigt gebildet. Der Begriff "Substratstrang", wie er hier verwendet wird, steht für den Nukleinsäure-Strang, in dem die durch 5'-Nuklease-Aktivität vermittelte Spaltung erfolgt. Der Substratstrang ist immer als der obere Strang in dem gegabelten Komplex angezeigt, der als Substrat für die 5'-Nuklease-Spaltung (Fig. 16) dient. Der Begriff "Matrizenstrang", wie er hier verwendet wird, steht für den Nukleinsaure-Strang, der zumindest partiell komplementär ist zum Substratstrang und der an den Substratstrang hybridisiert, so dass die Spaltstruktur erhalten wird. Der Matrizenstrang ist immer als der untere Strang der gegabelten Spaltstruktur angegeben (Fig. 16). Wird ein Primer (ein kurzes Oligonukleotid von 19 bis 30 Nukleotiden Länge) zu dem Komplex gegeben, wie wenn die primerabhängige Spaltung getestet wird, ist er so ausgelegt, dass er an den 3'-Arm des Matrizenstrangs hybridisiert (**Fig.** 16B). Ein solcher Primer wird am Matrizenstrang verlängert, wenn die in der Reaktion verwendete Polymerase Syntheseaktivität hat.

[0233] Die Spaltstruktur kann als einzelnes Haarnadelmolekül hergestellt werden, wobei das 3'-Ende des Ziels und das 5'-Ende des Pilots als Schleife, wie in der **Fig.** 16E gezeigt, verbunden sind. Ein Primer-Oligonukleotid, das zum 3'-Arm komplementär ist, wird ebenfalls für diese Tests benötigt, so dass die Empfindlichkeit des Enzyms auf die Anwesenheit eines Primers untersucht werden kann.

[0234] Nukleinsäuren, die zur Herstellung der Test-Spaltstrukturen verwendet werden, können chemisch synthetisiert werden oder können durch Standard-DNA-Rekombinations-Techniken erzeugt werden. Durch das letztere Verfahren kann der Haarnadel-Abschnitt des Moleküls erzeugt werden, indem Duplikatkopien eines kurzen DNA-Segmentes nebeneinander, jedoch in entgegengesetzter Orientierung, in einen Klonierungsvektor eingebracht werden. Das doppelsträngige Fragment, das diese Umkehrwiederholung umfasst und das genügend flankierende Sequenz aufweist, so dass kurze (etwa 20 Nukleotide) ungepaarte 5'- und 3'-Arme erhalten werden, kann dann aus dem Vektor durch Restriktionsenzymverdau freigesetzt werden, oder durch eine PCR, die mit einem Enzym durchgeführt wird, dem eine 5'-Exonuklease fehlt (beispielsweise das Stoffel-Fragment der Amplitaq™-DNA-Polymerase, Vent™-DNA-Polymerase).

[0235] Die Test-DNA kann an beiden Enden oder mittendrin markiert werden, und zwar entweder mit einem Radioisotop oder mit einer nichtisotopen Markierung. Unabhängig davon, ob die Haarnadel-DNA ein synthetischer Einzelstrang oder ein klonierter Doppelstrang ist, wird die DNA vor der Verwendung erwärmt, um sämtliche Doppelstränge zu schmelzen. Beim Kühlen auf Eis entsteht die in der **Fig.** 16E gezeigte Struktur und ist solange stabil, dass man diese Tests durchführen kann.

[0236] Zur Untersuchung auf primergerichtete Spaltung (Reaktion 1) wird eine nachweisbare Menge des Testmoleküls (gewöhnlich 1 bis 100 fmol ^{32}P-markiertes Haarnadelmolekül) und ein 10- bis 100fach molarer Überschuss von Primer in einem Puffer untergebracht, der bekanntlich mit dem Testenzym kompatibel ist. Für die Reaktion 2, bei der die primergerichtete Spaltung unter einer Bedingung erfolgt, bei der eine primerunabhängige Spaltung möglich ist, werden die gleichen Mengen der Moleküle in einer Lösung untergebacht, die dem in Reaktion 1 verwendeten Puffer in Bezug auf pH-Wert, Enzym-Stabilisatoren (beispielsweise Rinderserumalbumin, nichtionische Detergenzien, Gelatine) und Reduktionsmittel (beispielsweise Dithiothreitol, 2-Mercaptoethanol) entsprechen, die aber jedes einwertige Kationensalz mit 20 mM KCl ersetzen; 20 mM KCl ist das offensichtliche Optimum für eine primerunabhängige Spaltung. Puffer für Enzyme, wie DNAPEc1, die gewöhnlich in Abwesenheit von Salz arbeiten, werden nicht ergänzt, um diese Konzentration zu erzielen. Zur Untersuchung auf primerunabhängige Spaltung (Reaktion 3) werden die gleichen Mengen Testmolekül, aber ohne Primer, unter den gleichen Pufferbedingungen wie für Reaktion 2 vereinigt.

[0237] Alle drei Testreaktionen werden dann genug Enzym ausgesetzt, dass das molare Verhältnis von Enzym zu Testkomplex etwa 1:1 ist. Die Reaktionen werden in einem Temperaturenbereich bis zu, aber nicht größer als diejenige Temperatur, die entweder durch die Enzymstabilität oder Komplexstabilität ermöglicht wird,

die jedoch niedriger als bis zu 80°C für Enzyme aus Thermophilen ist, für eine hinreichende Zeit inkubiert, dass eine Spaltung ermöglicht wird (10 bis 60 Minuten). Die Produkte der Reaktionen 1, 2 und 3 werden durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgelöst, und durch Autoradiographie oder durch ein vergleichbares Verfahren sichtbar gemacht, das sich für das verwendete Markierungssystem eignet. Zusätzliche Markierungssysteme umfassen den Chemilumineszenz-Nachweis, Silber oder andere Färbungen, Blotting und Probing und dergleichen. Die Anwesenheit der Spaltprodukte wird durch die Anwesenheit von Molekülen angezeigt, die bei einem niedrigeren Molekulargewicht wandern als die ungespaltene Teststruktur. Diese Spaltprodukte zeigen an, dass die Kandidaten-Polymerase eine strukturspezifische 5'-Nukleaseaktivität aufweist.

[0238] Zur Bestimmung, ob eine modifizierte DNA-Polymerase im Wesentlichen die gleiche 5'-Nukleaseaktivität hat wie die native DNA-Polymerase, werden die Ergebnisse der vorstehend beschriebenen Tests mit den Ergebnissen verglichen, die aus diesen Tests erhalten wurden, die mit der nativen DNA-Polymerase durchgeführt wurden. Mit "im Wesentlichen die gleiche 5'-Nuklease-Aktivität" meinen wir, dass die modifizierte Polymerase und die native Polymerase die Testmoleküle auf die gleiche Weise spalten. Es ist nicht nötig, dass die modifizierte Polymerase mit der gleichen Rate spaltet, wie die native DNA-Polymerase.

[0239] Einige Enzyme oder Enzympräparate können andere assoziierte oder kontaminierende Aktivitäten aufweisen, die unter den vorstehend beschriebenen Spaltungsbedingungen funktionell sind, und die den 5'-Nuklease-Nachweis stören können. Die Reaktionsbedingungen können unter Berücksichtigung dieser anderen Aktivitäten modifiziert werden, damit die Zerstörung des Substrates vermieden wird, oder einer anderen Maskierung der 5'-Nuklease-Spaltung und ihrer Proqdukte. Zum Beispiel hat die DNA-Polymerase I von E. coli (Pol I) neben ihren Polymerase- und 5'-Nukleaseaktivitäten eine 3'-Exonuklease, die die DNA in eine 3' zu 5'-Richtung abbauen kann. Wenn das Molekül in der **Fig.** 16E dieser Polymerase unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen ausgesetzt wird, entfernt die 3'-Exonuklease folglich rasch den ungepaarten 3'-Arm, zerstört die gegabelte Struktur, die ein Substrat für die 5'-Exonukleas-Spaltung haben muss, und es wird keine Spaltung nachgewiesen. Die wahre Fähigkeit von Pol I zur Spaltung des Produkts kann enthüllt werden, wenn die 3'-Exonuklease durch eine Änderung von Bedingungen (beispielsweise pH-Wert), Mutation oder durch Zugabe eines Kompetitors für die Aktivität gehemmt wird. Die Zugabe von 500 pmol eines einzelsträngigen Kompetitor-Oligonukleotids, das nicht mit der in der **Fig.** 16E gezeigten Struktur verwandt ist, zu der Spaltungsreaktion mit Pol I hemmt effizient die Spaltung des 3'-Arms der Struktur von **Fig.** 16E, ohne dass die 5'-Exonuklease-Freisetzung des 5' Arms gestört wird. Die Konzentration des Kompetitors ist nicht entscheidend, jedoch sollte sie so hoch sein, dass die 3'-Exonuklease für die Dauer der Reaktion besetzt wird.

[0240] Eine ähnliche Zerstörung des Testmoleküls kann durch Kontaminationen in dem Kandidaten-Polymerase-Präparat verursacht werden. Mehrere Reihen von strukturspezifischen Nukleasereaktionen können durchgeführt werden, um die Reinheit der Kandidaten-Nuklease zu bestimmen und um das Fenster zwischen Unter- und Überexposition des Testmoleküls zum untersuchten Polymerase-Präparat zu finden.

[0241] Die vorstehend beschriebenen modifizierten Polymerasen wurden folgendermaßen auf 5'-Nukleaseaktivität untersucht: Die Reaktion 1 wurde in einem Puffer aus 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5 bei 20°C, 1,5 mM $MgCl_2$ und 50 mM KCl durchgeführt, und in der Reaktion 2 wurde die KCl-Konzentration auf 20 mM reduziert. In den Reaktionen 1 und 2 wurden 10 fmol des in der **Fig.** 16E gezeigten Testsubstratmoleküls mit 1 pmol des angegebenen Primers und 0,5 bis 1,0 µl des Extrakts vereinigt, der die modifizierte Polymerase (hergestellt wie oben beschrieben) enthält. Dieses Gemisch wurde dann 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Für sämtliche untersuchten mutierten Polymerasen reichten diese Bedingungen aus, dass eine vollständige Spaltung erhalten wurde. Wenn das in der **Fig.** 16E gezeigte Molekül am 5'-Ende markiert wurde, wurde das freigesetzte 5'-Fragment mit 25 Nukleotiden Länge in geeigneter Weise auf einem 20%igen Polyacrylamid-Gel (19:1 vernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer, der 45 mM Tris-Borat pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA enthielt, aufgelöst. Die Klone 4C-F, und 5B wiesen eine strukturspezifische Spaltung auf, die mit der der unmodifizierten DNA-Polymerase vergleichbar ist. Zudem haben die Klone 4E, 4F und 4G die zusätzliche Fähigkeit zur Spaltung von DNA in Abwesenheit eines 3'-Arms, wie oben erörtert. Veranschaulichende Spaltreaktionen sind in der Fig. 17 gezeigt.

[0242] Für die in der Fig. 17 gezeigten Reaktionen wurden die mutierten Polymerase-Klone 4E (Taq-Mutante) und 5B (Tf1-Mutante) auf ihre Fähigkeit zur Spaltung des in der **Fig.** 16E gezeigten Haarnadel-Substrats untersucht. Das Substratmolekül wurde am 5'-Ende mit ^{32}P markiert. 10 fmol hitzedenaturierte, endmarkierte Substrat-DNA und 0,5 Units DNAPTaq (Spur 1) oder 0,5 µl 4e oder 4b-Extrakt (Fig. 17, Spuren 2–7, Extrakt wurde hergestellt wie oben beschrieben) wurden in einem Puffer gemischt, der 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5, 50 mM KCl und 1,5 mM $MgCl_2$ enthielt. Das endgültige Reaktionsvolumen betrug 10 µl. Die in den Spuren 4 und 7 gezeigten Reaktionen enthalten zudem 50 µM von jedem dNTP. Die in den Spuren 3, 4, 6 und 7 gezeigten

Reaktionen enthalten 0,2 µM des Primer-Oligonukleotids (komplementär zu dem 3'-Arm des Substrats und in der **Fig.** 16E gezeigt). Die Reaktionen wurden für 4 Minuten bei 55°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 8 µl 95% Formamid gestoppt, das 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffe pro 10 µl Reaktionsvolumen enthielt. Die Proben wurden dann auf 12%ige denaturierende Acrylamidgele aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele autoradiographiert. Die Fig. 17 zeigt, dass die Klone 4E und 5B eine ähnliche Spaltungsaktivität aufweisen, wie die native DNAPTaq. Man beachte, dass eine gewisse Spaltung in diesen Reaktionen in Abwesenheit von Primer erfolgt. Werden lange Haarnadelstrukturen, wie die hier verwendeten (**Fig.** 16E) in den Spaltreaktionen verwendet, die in Puffern mit 50 mM KCl durchgeführt werden, wird ein geringes Ausmaß an primerunabhängiger Spaltung beobachtet. Höhere KCl-Konzentrationen unterdrücken die primerunabhängige Spaltung unter diesen Bedingungen, eliminieren diese aber nicht.

2. Test auf Synthese-Aktivität

[0243] Die Fähigkeit des modifizierten Enzyms oder der proteolytischen Fragmente wird untersucht durch das modifizierte Enzym auf ein Test-System, in dem ein Primer an eine Matrize hybridisiert wird, und die DNA-Synthese wird durch das zugefügte Enzym katalysiert. Viele Standard-Labor-Techniken setzen einen solchen Test ein. Eine Nick-Translation und Enzym-Sequenzierung beinhalten beispielsweise eine Verlängerung eines Primers an einer DNA-Matrize durch ein Polymerasemolekül.

[0244] In einem bevorzugten Test zur Bestimmung der Syntheseaktivität eines modifizierten Enzyms wird ein Oligonukleotid-Primer an eine einzelsträngige DNA-Matrize, beispielsweise Bakteriophagen-M13-DNA, hybridisiert, und der Doppelstrang aus Primer und Matrize wird in der Gegenwart der modifizierten fraglichen Polymerase, der Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und des Puffers und der Salze inkubiert, von denen bekannt ist, dass sie für das unmodifizierte oder native Enzym geeignet sind. Der Nachweis der Primer-Extension (durch denaturierende Gelelektrophorese) oder des dNTP-Einbaus (durch saure Fällung oder Chromatographie) zeigt eine aktive Polymerase an. Eine Markierung, die entweder isotopisch oder nicht-isotopisch ist, ist vorzugsweise entweder im Primer oder als dNTP vorhanden, so dass der Nachweis der Polymerisationsprodukte erleichtert wird. Die Syntheseaktivität wird als Menge an freiem Nukleotid quantifiziert, die in die wachsende DNA-Kette eingebaut wird, und ist ausgedrückt als Menge, die je Zeiteinheit unter spezifischen Reaktionsbedingungen eingebaut wird.

[0245] Repräsentative Ergebnisse eines Tests für die Synthese-Aktivität sind in der Fig. 18 gezeigt. Die Synthese-Aktivität der mutierten DNAPTaq-Klone 4B–F wurde folgendermaßen getestet: Ein Mastergemisch des folgenden Puffers wurde hergestellt: 1,2 × PCR-Puffer (1X PCR-Puffer enthält 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,5 und jeweils 0,05% Tween 20 und Nonidet P40), jeweils 50 µM von dGTP, dATP und dTTP, 5 µM dCTP und 0,125 µM α-^{32}P-dCTP bei 600 Ci/mmol. Vor dem Einstellen dieses Gemischs auf sein Endvolumen wurde es in zwei gleiche Aliquote unterteilt. Eins erhielt destilliertes Wasser bis zu einem Volumen von 50 µl, so dass die oben genannten Konzentrationen erhalten wurden. Das andere erhielt 5 µg einzelsträngige M13mp18-DNA (etwa 2,5 pmol oder 0,05 µM Endkonzentration) und 250 pmol des M13-Sequenzierungs-Primers (5 µM Endkonzentration) und destilliertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 50 µl. Jeder Cocktail wurde für 5 Minuten auf 75°C erwärmt und dann auf Raumtemperatur gekühlt. Dies gestattet, dass die Primer an die DNA in den DNA-haltigen Gemischen hybridisieren.

[0246] Für jeden Test wurden 4 µl des Cocktails mit der DNA mit 1 µl der mutierten Polymerase kombiniert, hergestellt wie beschrieben, oder 1 Unit DNAPTaq (Perkin Elmer) in 1 µl dH_2O. Eine Kontrolle "ohne DNA" erfolgte in der Gegenwart von DNAPTaq (Fig. 18, Spur 1) und eine Kontrolle "ohne Enzym" erfolgte mit Wasser anstelle von Enzym (Spur 2). Jede Reaktion wurde gemischt, dann bei Raumtemperatur (etwa 22°C) für 5 Minuten, dann bei 55°C für 2 Minuten, dann bei 72°C für 2 Minuten, inkubiert. Diese schrittweise Inkubation erfolgte zum Nachweisen der Polymerisation in jeglichen Mutanten, die optimale Temperaturen unter 72°C haben könnten. Nach der letzten Inkubation wurden die Röhrchen kurz zentrifugiert, so dass jegliche Kondensation aufgefangen wird, und wurden dann auf Eis gestellt. Ein µl jeder Reaktion wurde an einen Ursprung 1,5 cm vom unteren Rand einer Polyethylenimin-(PEI)-Cellulose-Dünnschicht-Chromatographieplatte punktförmig aufgetragen und trocknen gelassen. Die Chromatographieplatte wurde in 0,75 M NaH_2PO_4, pH-Wert 3,5, laufen gelassen, bis sich die Pufferfront etwa 9 cm vom Ursprung weg bewegt hatte. Die Platte wurde getrocknet, in Plastikfolie eingehüllt, mit Leuchtfarbe beschriftet und mit einem Röntgenfilm belegt. Der Einbau wurde nachgewiesen als Zählimpulse, die am ursprünglichen Auftragungsort zurückblieben, während die nicht eingebauten Nukleotide durch die Salzlösung vom Ursprung befördert wurden.

[0247] Der Vergleich der Stellen der Zählimpulse mit den beiden Kontrollspuren bestätigte das Fehlen der Polymerisationsaktivität in den Mutantenpräparaten. Unter den modifizierten DNAPTaq-Klonen behält nur Klon

4B jegliche restliche Syntheseaktivität bei, wie in Fig. 18 gezeigt.

BEISPIEL 3

5'-Nukleasen, abgeleitet von thermostabilen DNA-Polymerasen, können kurze Haarnadel-Strukturen mit Spezifität spalten

[0248] Die Fähigkeit der 5'-Nukleasen zur Spaltung der Haarnadelstrukturen zur Erzeugung einer gespaltenen Haarnadelstruktur, die sich als Nachweismolekül eignet, wurde untersucht. Die Struktur und die Sequenz des Haarnadel-Testmoleküls sind in der Fig. 19A (Seq.-ID Nr. 15) gezeigt. Das Oligonuklid (in den Fig. 19A als "Primer" bezeichnet, Seq.-ID Nr. 22) ist im hybridisierten Zustand an seine komplementäre Sequenz am 3'-Arm des Haarnadeltestmoleküls angelagert gezeigt. Das Haarnadel-Testmolekül wurde an einem Ende mit ^{32}P markiert, wobei ein markierter T7-Promotor-Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion verwendet wurde.

[0249] Die Markierung ist am 5'-Arm des Haarnadel-Testmoleküls zugegen, und ist in der Fig. 19A durch den Stern veranschaulicht.

[0250] Die Spaltungsreaktion erfolgte durch Zugabe von 10 fmol hitzedenaturiertem, endmarkiertem Haarnadeltestmolekül, 0,2 µM Primer-Oligonukleotid (komplementär zu dem 3'-Arm der Haarnadel), jeweils 50 µM von jedem dNTP und 0,5 Units DNAPTaq (Perkin Elmer) oder 0,5 µl Extrakt, das eine 5'-Nuklease (hergestellt wie vorstehend beschrieben) enthielt, in einem Gesamtvolumen von 10 µl in einem Puffer, der 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,5, 50 mM KCl und 1,5 mM $MgCl_2$ enthielt. Die in den Spuren 3, 5 und 7 gezeigten Reaktionen erfolgten in Abwesenheit von dNTPs.

[0251] Die Reaktionen wurden für 4 Minuten bei 55°C inkubiert. Die Reaktionen wurden bei 55°C durch die Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffe per 10 µl Reaktionsvolumen gestoppt. Die Proben wurden nicht erhitzt, bevor sie auf denatrierende Polyacrylamidgele (10% Polyacrylamid, 19:1 Vernetzung, 7 M Harnstoff, 89 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 2,8 mM EDTA) geladen wurden. Die Proben wurden nicht erhitzt, so dass die Auflösung einzelsträngiger und wieder doppelsträngig gemachter ungespaltener Haarnadel-Moleküle ermöglicht wurde.

[0252] Die Fig. 19B zeigt, dass veränderte Polymerasen, denen jegliche nachweisbare Syntheseaktivität fehlt, eine Haarnadelstruktur spalten, wenn ein Oligonukleotid an den einzelsträngigen 3'-Arm der Haarnadel hybridisiert wird, so dass eine einzelne Spezies Spaltprodukt erhalten wird (Fig. 19B, Spuren 3 und 4). 5'-Nukleasen, wie z.B. Klon 4D, gezeigt in den Spuren 3 und 4, erzeugen selbst in der Gegenwart von dNTPs ein einzelnes Spaltprodukt. 5'-Nukleasen, die eine restliche Menge Syntheseaktivität (weniger als 1% der Wild-Typ-Aktivität) aufrechterhalten, erzeugen mehrfache Spaltprodukte, da die Polymerase das Oligonukleotid verlängern kann, das an den 3'-Arm der Haarnadel hybridisiert ist, wodurch die Spaltstelle (Klon 4B, Spuren 5 und 6) bewegt wird. Native DNATaq erzeugt sogar noch mehr Spaltproduktspezies als Polymerasemutanten, die restliche Syntheseaktivität behalten und wandelt zusätzlich die Haarnadelstruktur in Anwesenheit von dNTPs in eine doppelsträngige Form um, und zwar aufgrund des hohen Spiegels der Syntheseaktivität in der nativen Polymerase (Fig. 19B, Spur 8)

BEISPIEL 4

Untersuchung des Trigger/Nachweis-Assays

[0253] Um die Fähigkeit eines Oligonukleotids, das in der Trigger-Reaktion des Trigger/Nachweisassays freigegeben wird, in der Nachweisreaktion des Assays nachgewiesen zu werden, zu untersuchen, wurden zwei in Fig. 20A dargestellte Haarnadelstrukturen unter Verwendung üblicher Standardtechniken synthetisiert. Die beiden Haarnadeln wurden als A-Haarnadel (SEQ ID Nr.:23) und T-Haarnadel (SEQ ID Nr.:24) bezeichnet. Die erwarteten Spaltungsorte in Anwesenheit entsprechend angelagerter Primer sind durch Pfeile kenntlich gemacht. Die A- und T-Haarnadeln wurden designed, um einer Falschfaltung innerhalb des Strangs vorzubeugen, indem die meisten der T-Reste in der A-Haarnadel und die meisten der A-Reste in der T-Haarnadel weggelassen wurden.

[0254] Um ein Fehl-Priming und Nachgeben zu vermeiden, wurden die Haarnadeln mit lokalen Varianten in dem Sequenzmotiv designed (zum Beispiel dazwischen schieben von T-Resten ein oder zwei Nukleotide dazwischen oder in Paaren). Die A- und T-Haarnadeln können sich aneinander lagern, um ein Duplex zu bilden, welcher entsprechende Enden für die direkte Klonierung in Vektoren des Types pUC aufweist; die Restriktions-

orte befinden sich in den Ringregionen des Duplex und können bei entsprechendem Wunsch die Stammregionen verlängern.

[0255] Die Sequenz des Test-/Trigger-Oligonukleotids ist in Fig. 20B gezeigt; dieses Oligonukleotid wird als Alphaprimer bezeichnet (SEQ ID Nm.:25). Der Alphaprimer ist komplementär zu dem 3'-Arm der T-Haarnadel, wie in Fig. 20A gezeigt. Wenn der Alphaprimer sich an die T-Haarnadel anlagert, wird eine Spaltstruktur gebildet, die durch die thermostabilen DNA-Polymerasen erkannt wird. Die Spaltung der T-Haarnadel setzt den 5'-einzelsträngigen Arm der T-Haarnadel frei, generiert den tau-Primer (SEQ ID Nr.:26) und eine gespaltene T-Haarnadel (Fig. 20B; SEQ ID Nr.:27). Der tau-Primer ist komplementär zu dem 3'-Arm der A-Haarnadel, wie in Fig. 20A gezeigt. Die Anlagerung des tau-Primers an die A-Haarnadel generiert eine weitere Spaltstruktur; die Spaltung dieser zweiten Spaltstruktur setzt den 5'-einzelsträngigen Arm der A-Haarnadel frei, generiert ein weiteres Molekül des Alphaprimers, welcher sich dann an ein weiteres Molekül der T-Haarnadel anlagert. Die zyklische Wärmezufuhr setzt die Primer frei, so dass diese in zusätzlichen Spaltungsreaktionen funktionieren können. Eine Vielzahl an Zyklen der Anlagerung und Spaltung werden ausgeführt. Die Produkte dieser Spaltungsreaktionen sind Primer und die verkürzten Haarnadelstrukturen, gezeigt in Fig. 20C. Die verkürzten, bzw. gespaltenen Haarnadelstrukturen, können von den ungespaltenen Haarnadeln durch Elektrophorese auf einem denaturierten Acrylamidgel aufgelöst werden.

[0256] Die Anlagerungs- und Spaltungsreaktionen wurden wie folgt durchgeführt: in ein 50 µl Reaktionsvolumen, enthaltend 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8.5, 1.0 $MgCl_2$, 75 mM KCl, 1 pmole der A-Haarnadel, 1 pmole der T-Haarnadel, der Alpha-Primer wurde in gleicher molarer Menge in Bezug auf die Haarnadelstrukturen (1 pmole) oder in Verdünnungen in einem Bereich von 10-10^6-fach und 0.5 µl des Extrakts enthaltend eine 5'-Nuklease (hergestellt wie oben beschrieben) hinzugefügt. Die vorhergesagte Schmelztemperatur für den Alpha oder Trigger-Primer ist in dem obigen Puffer 60°C. Die Anlagerung findet genau unterhalb dieser vorhergesagten Schmelztemperatur bei 55°C statt. Unter Verwendung eines Perkin Elmer DNA Thermal Cycler werden die Reaktionen für 30 Sekunden bei 55°C angelagert. Die Temperatur wird dann langsam über einen Zeitraum von 5 Minuten auf 72°C erhöht, um die Spaltung zu ermöglichen. Nach der Spaltung werden die Reaktionen schnell auf 55°C (1°C pro Sekunde) gebracht, um einen weiteren Zyklus der Anlagerung zu ermöglichen. Es wurden eine Reihe von Zyklen durchgeführt (20, 40 und 60 Zyklen) und die Reaktionsprodukte für jede dieser Zyklanzahl analysiert. Die Anzahl der Zyklen, welche darauf hinweist, dass die Ansammlung der gespaltenen Haarnadelprodukte das Plateau nicht erreicht hat, wurde dann für weitere Feststellungen verwendet, wann es wünschenswert ist, ein quantitatives Ergebnis zu erhalten.

[0257] Nach der gewünschten Anzahl von Zyklen wurden die Reaktionen bei 55°C durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0.05% Farbstoffmarker pro 10 µl Reaktionsvolumen gestoppt. Die Proben wurden nicht erhitzt, bevor sie auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (10% Polyacrylamid, 19:1 kreuzvernetzt, 7 M Harnstoff, 89 mM Tris-Borat, pH-Wert 8.3, 2.8 mM EDTA) geladen wurden. Die Proben wurden nicht erhitzt, um die Auflösung von einzelsträngigen und erneut doppelsträngigen ungespaltenen Haarnadelmolekülen zu ermöglichen.

[0258] Die Haarnadelmoleküle können an verschieden festen Unterlagenmolekülen befestigt werden, zum Beispiel Agarose, Styren oder Magnetkugeln, mittels des 3'-Endes jeder Haarnadel. Ein Spacer-Molekül kann zwischen das 3'-Ende der Haarnadel und die Kugel platziert werden, sofern dies gewünscht ist. Der Vorteil der Befestigung der Haarnadeln an einer festen Unterlage besteht darin, dass dies vor der Hybridisierung der A- und T-Haarnadeln aneinander während der Zyklen des Schmelzens und Anlagerns hindert. Die A- und T-Haarnadeln sind einander komplementär (wie in Fig. 20D gezeigt) und wenn eine Aneinanderlagerung über die gesamte Länge zugelassen wird, würde dies die Menge an Haarnadeln, welche für die Hybridisierung an die Alpha- und tau-Primer während der Nachweisreaktion zur Verfügung stehen, reduzieren.

[0259] Die 5'-Nukleasen wurden in diesem Assay verwendet, da ihnen signifikante synthetische Aktivität fehlt. Das Fehlen der synthetischen Aktivität führt zu der Produktion eines einzelnen gespaltenen Haarnadelproduktes (wie in Fig. 19B, Spur 4 gezeigt). Eine Vielzahl an Spaltprodukten kann generiert werden durch 1) die Anwesenheit von störender synthetischer Aktivität (siehe Fig. 19B, Spuren 6 und 8) oder 2) die Anwesenheit von Primer-unabhängiger Spaltung in der Reaktion. Die Anwesenheit einer Primer-unabhängigen Spaltung wird in dem Trigger/Nachweisassay durch die Anwesenheit verschiedener Produktgrößen an der Gabel der Spaltstruktur detektiert. Eine Primer-unabhängige Spaltung kann gedämpft oder unterdrückt werden, wenn diese vorliegt, durch die Verwendung unspaltbarer Nukleotide in der Gabelregion der Haarnadelmoleküle. Beispielsweise können thiolisierte Nukleotide verwendet werden, um verschiedene Nukleotide an der Gabelregion zu ersetzen, um Primer-unabhängige Spaltung zu verhindern.

BEISPIEL 5

Spaltung linearer Nukleinsäuresubstrate

[0260] Aus dem Vorstehenden geht hervor, dass native (d.h. "Wildtyp-") thermostabile DNA-Polymerasen Haarnadelstrukturen auf spezifische Weise spalten können, und dass diese Entdeckung mit Erfolg auf einen Nachweistest angewendet werden kann. In diesem Beispiel werden die erfindungsgemäßen DNAP-Mutanten gegen drei verschiedene Spaltstrukturen untersucht, die in der Fig. 22A gezeigt sind. Die Struktur 1 in Fig. 22A ist ein einfaches einzelsträngiges 206-mer (dessen Herstellung und Sequenz-Information weiter oben erörtert wurden). Die Strukturen 2 und 3 sind Doppelstränge; die Struktur 2 ist die gleiche Haarnadelstruktur wie in Fig. 12A gezeigt (unten), wohingegen bei der Struktur 3 der Haarnadelabschnitt der Struktur 2 entfernt ist.

[0261] Die Spaltreaktionen umfassten 0,01 pmol der resultierenden Substrat-DNA und 1 pmol des Pilot-Oligonukleotids in einem Gesamt-Volumen von 10 µl 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3, 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$. Die Reaktionen wurden für 30 Minuten bei 55°C inkubiert, und durch die Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen gestoppt. Die Proben wurden 2 Minuten auf 75°C erhitzt, unmittelbar vor der Elektrophorese durch ein 10% Polyacrylamid-Gel (19:1 Vernetzung) mit 7M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA.

[0262] Die Ergebnisse wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und sind wie in der Fig. 22B gezeigt, mit den folgendermaßen angegebenen Enzymen: I ist native Taq-DNAP, II ist native Tfl-DNAP; III ist die in der **Fig.** 4E gezeigte Cleavase™ BX; IV ist die in der **Fig.** 4F gezeigte Cleavase™ BB; V ist die in der **Fig.** 5B gezeigte Mutante; und VI ist die in der **Fig.** 4G gezeigte Cleavase™ BN.

[0263] Die Struktur 2 wurde zum "Normalisieren" des Vergleichs verwendet. Es wurde beispielsweise entdeckt, dass man 50 ng Taq-DNAP und 300 ng Cleavase™ BN benötigte, um ähnliche Mengen Spaltung von Struktur 2 in dreißig (30) Minuten zu erhalten. Unter diesen Bedingungen kann die native Taq-DNAP die Struktur 3 nicht in irgendeinem signifikanten Maße spalten. Die native Tfl-DNAP spaltet die Struktur 3 auf eine Weise, die eine Vilezahl an Produkten erzeugt.

[0264] Sämtliche untersuchte Mutanten spalten dagegen den linearen Doppelstrang von Struktur 3. Dieser Befund zeigt, dass diese Eigenschaft der mutierten DNA-Polymerasen mit thermostabilen Polymerasen über die thermophilen Spezies übereinstimmt.

[0265] Die hierin beschriebene Erkenntnis, dass die mutanten DNA-Polymerasen in der Lage sind, lineare Duplexstrukturen zu spalten, erlaubt die Anwendung eines geradlinigeren Testdesigns (Fig. 1A). Fig. 23 stellt ein detaillierteres Schema dar, welches dem Testdesign von Fig. 1A entspricht.

[0266] Die beiden 43-mere, die in Fig. 23 gezeigt sind, wurden durch Standardmethoden synthetisiert. Jedes schließt ein Fluorescein an dem 5'-Ende aus Nachweisgründen und ein Biotin an dem 3'-Ende ein, um die Befestigung an Streptavidin zu ermöglichen, welches paramagnetische Partikel überzieht (die Biotin-Avidin-Befestigung ist durch ein dargestellt).

[0267] Bevor die Trityl-Gruppen entfernt wurden, wurden die Oligos durch HPLC gereinigt, um verkürzte Nebenprodukte der Synthesereaktion zu entfernen. Aliquote von jedem 43-mer wurden an M-280 Dynakugeln (Dynal) in einer Dichte von 100 pmole pro mg Kugeln gebunden. Zwei (2) mg der Kugeln (200 µl) wurden zweimal in IX Wasch-/Bindungspuffer (1 M NaCl, 5 mM Tris-Cl, pH-Wert 7.5, 0.5 mM EDTA) mit 0.1% BSA, 200 µl pro Waschung gewaschen. Die Kugeln wurden magnetisch sedimentiert zwischen den Waschgängen, um eine Entfernung des Überstandes zu ermöglichen. Nach dem zweiten Waschgang wurden die Kugeln in 200 µl 2X Wasch-/Bindungspuffer (2 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 7.5 mit 1 mM EDTA) resuspendiert und in zwei 100 µl Aliquote geteilt. Jedes Aliquot erhielt 1 µl einer 100 µM Lösung von einem der beiden Oligonukleotide. Nach der Mischung wurden die Kugeln bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter gelegentlichem sanftem Mischen inkubiert. Die Kugeln wurden dann sedimentiert und die Analyse der Überstände zeigte lediglich Spuren von ungebundenem Oligonukleotid, was auf eine erfolgreiche Bindung hinweist. Jedes Aliquot der Kugeln wurde dann dreimal gewaschen mit 100 µl pro Waschung, mit 1 X Wasch-/Bindungspuffer, dann zweimal in einem Puffer von 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8.3 und 75 mM KCl. Die Kugeln wurden in einem Endvolumen von 100 µl Tris/KCl resuspendiert für eine Konzentration von 1 pmol an Oligo gebunden an 10 µg der Kugeln pro µl der Suspension. Die Kugeln wurden bei 4°C zwischen den Verwendungen gelagert.

[0268] Die Kugelarten entsprechen denen in Fig. 1A. Das heißt, die Typ 2 Kugeln enthielten den Oligo (SEQ

ID Nr.:33), der die komplementäre Sequenz (SEQ ID Nr.:34) für den Alphasignaloligo (SEQ ID Nr.:35) genauso wie den Betasignaloligo (SEQ ID Nr.:36) enthielt, welche dann als 24-mer freigegeben wurden. Dieser Oligo hat keinen „As" und ist „T"-reich. Typ 3 Kugeln enthalten den Oligo (SEQ ID Nr.:37), der die komplementäre Sequenz (SEQ ID Nr.:38) für den Betasignaloligo (SEQ ID Nr.:39) genauso wie den Alphasignaloligo (SEQ ID Nr.:35) enthält, welcher, wenn er freigegeben wird, ein 20-mer ist. Dieser Oligo hat keine „Ts" und ist „A"-reich.

[0269] Die Spaltungsreaktionen umfassten 1 µl der aufgezeigten Kugel, 10 pmol des unmarkierten Alphasignaloligos als „Pilot" (wenn darauf hingewiesen) und 500 ng der Cleavase™ BN in 20 µl 75 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$ und 10 µM CTAB. Alle Komponenten, mit Ausnahme des Enzymes, wurden zusammengefügt und mit leichtem Mineralöl überschichtet und auf 53°C erwärmt. Die Reaktionen wurden durch Hinzufügung von vorgewärmten Enzymen initiiert und bei dieser Temperatur für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktionen wurden bei der Temperatur durch Zugabe von 16 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0.05% Bromphenol-Blau und Xylen-Cyanol jeweils, gestoppt. Die Zugabe stoppt die Enzymaktivität und auf die Erhitzung hin zerstört es die Biotin-Avidin-Verbindung, was zu der Freigabe des größten Teils (größer als 95%) der Oligos von den Kugeln führt. Die Proben wurden für 2 Minuten auf 75°C erwärmt, unmittelbar bevor sie einer Elektrophorese durch ein 10% Polyacrylamidgel (19:1 kreuzvernetzt), mit 7 M Harnstoff, in einem Puffer 45 mM Tris-Borat, pH-Wert 8.3, 1.4 mM EDTA zugeführt wurden. Die Ergebnisse wurden durch Kontakttransfer der aufgelösten DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran und das Proben der geblockten Membran mit einem anti-Fluorescein-Antikörper, der an alkalische Phosphatase gebunden ist, sichtbar gemacht. Nach dem Waschen wurde das Signal durch Inkubation der Membran in Western Blue (Promega), welches ein purpurnes Precipitat ablagert, wenn der Antikörper gebunden ist, entwickelt.

[0270] Fig. 24 zeigt die Vermehrung der Spaltung der linearen Duplexnukleinsäurestrukturen von Fig. 23 durch die DNAP-Mutanten. Die beiden zentralen Spuren enthalten beide Arten von Kugeln. Wie oben festgestellt; ist der Betasignaloligo (SEQ ID Nr.:36), wenn er freigesetzt wird, ein 24-mer und der Alphasignaloligo (SEQ ID Nr.:35), wenn freigegeben, ein 20-mer. Die Ausbildung der beiden unteren Banden entspricht dem 24-mer und dem 20-mer und ist klar abhängig vom „Piloten".

BEISPIEL 6

5'-exonukleolytische Spaltung ("knabbern") durch thermostabile DNAPs

[0271] Es stellte sich heraus, dass thermostabile DNAPs eine wahre 5'-Exonuklease aufweisen, die zum knabbern des 5'-Endes linearer doppelsträngiger Nukleinsäurestrukturen fahig ist. In diesem Beispiel wird wiederum das 206 Basenpaar DNA-Doppelstrang-Substrat eingesetzt (siehe oben). In diesem Fall wurde es hergestellt durch die Verwendung von einem ^{32}P-markierten Primer und einem unmarkierten Primer in einer Polymerasekettenreaktion. Die Spaltungsreaktionen umfassten 0,01 pmol hitzedenaturierte endmarkierte Substrat-DNA (wobei auch der unmarkierte Strang zugegen war), 5 pmol Pilot-Oligonukleotid (siehe Pilot-Oligos in der Fig. 12A) und 0,5 Units DNAPTaq oder 0,5 µ Cleavase™ BB in dem E. coli-Extrakt (siehe oben), in einem Gesamtvolumen von 10 µl 10 mM Tris·Cl, pH-Wert 8,5, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$.

[0272] Die Reaktionen wurden bei 65°C durch die Zugabe von vorgewärmtem Enzym gestartet, dann auf die endgültige Inkubationstemperatur für 30 Minuten gebracht. Die Ergebnisse sind in der Fig. 25A gezeigt. Die Proben in den Spuren 1 bis 4 sind die Ergebnisse mit der nativen Taq-DNAP, wohingegen die Spuren 5 bis 8 die Ergebnisse mit Cleavase™ BB zeigen. Die Reaktionen für die Spuren 1, 2, 5 und 6 wurden durchgeführt bei 65°C, und die Reaktionen für die Spuren 3, 4, 7, und 8 wurden bei 50°C durchgeführt, und alle Reaktionen wurden bei der Temperatur durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffen gestoppt. Die Proben wurden 2 Minuten auf 75°C erwärmt, direkt vor der Elektrophorese durch ein 10% Acrylamidgel (19:1 kreuzvernetzt), mit 7 M Harnstoff in einem Puffer von 45 mM Tris·Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA. Das erwartete Produkt in den Reaktionen 1, 2, 5 und 6 ist 85 Nukleotide lang; in den Reaktionen 3 und 7 ist das erwartete Produkt 27 Nukleotide lang. Die Reaktionen 4 und 8 wurden ohne Pilot durchgeführt und sollten bei 206 Nukleotiden verbleiben. Die schwache Bande, die man bei 24 Nukleotiden beobachtet, ist restlicher endmarkierter Primer aus der PCR.

[0273] Das überraschende Ergebnis ist, dass Cleavase™ BB unter diesen Bedingungen bewirkt, dass sämtliche Markierung in sehr kleinen Spezies erscheint, was die Möglichkeit nahe legt, dass das Enzym das Substrat vollständig hydrolysierte. Zur Bestimmung der Zusammensetzung der am schnellsten laufenden Bande, die in den Spuren 5 bis 8 beobachtet wird (den Reaktionen, die mit der Deletionsmutante durchgeführt wurden), wurden die Proben des 206 Basenpaar Doppelstrangs entweder mit T7-Gen-6-Exonuklease (USB) oder mit alkalischer Phosphatase aus Kalbs-Intestinum (Promega) gemäß den Herstellerangaben behandelt, so

dass entweder markiertes Mononukleotid (Spur a von Fig. 25B) oder freies ^{32}P-markiertes anorganisches Phosphat (Spur b von Fig. 25B) erhalten wurde. Diese Produkte zusammen mit den Produkten in der Spur 7 von Feld A wurden durch kurze Elektrophorese durch ein 20% Acrylamidgel (19:1 kreuzvernetzt), mit 7 M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris·Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA, aufgelöst. Cleavase™ BB kann somit das Substrat in Mononukleotide umwandeln.

BEISPIEL 7

Das Knabbern ist Doppelstrang-abhängig

[0274] Das Knabbern durch Cleavase™ BB ist vom Doppelstrang abhängig. Bei diesem Beispiel werden intern markierte Einzelstränge des 206-mers produziert durch 15 Zyklen Primer-Verlängerung unter Einbau von α-^{32}P-markiertem dCTP, kombiniert mit allen vier unmarkierten dNTPs, wobei ein unmarkiertes 206 Basenpaar Fragment als Matrize verwendet wurde. Einzel- und doppelsträngige Produkte wurden durch Elektrophorese durch ein nicht-denaturierendes 6% Polyacrylamidgel (29:1 kreuzvernetzt) in einem Puffer aus 45 mM Tris·Borat, pH-Wert 8,3 1,4 mM EDTA, durch Autoradiographie sichtbar gemacht, aus dem Gel ausgeschnitten, durch passive Diffusion eluiert, und durch Ethanolfällung konzentriert.

[0275] Die Spaltreaktionen umfassten 0,04 pmol Substrat-DNA, und 2 µl Cleavase™ BB (in einem E. coli-Extrakt, wie oben beschrieben) in einem Gesamtvolumen von 40 µl 10 mM Tris·Cl, pH-Wert 8,5, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von vorgewärmtem Enzym gestartet; 10 µl Aliquots wurden bei 5, 10, 20 und 30 Minuten entnommen, und in präparierte Röhrchen überführt, die 8 µl 95% Formamid mit 30 mM EDTA und 0,05% Markerfarbstoffe enthielten. Die Proben wurden 2 Minuten auf 75°C unmittelbar vor der Elektrophorese durch ein 10% Acrylamidgel (19:1 kreuzvernetzt) mit 7 M Harnstoff in einem Puffer aus 45 mM Tris·Borat, pH-Wert 8,3, 1,4 mM EDTA erwärmt. Die Ergebnisse wurden durch Autoradiographie, wie in der **Fig.** 226 gezeigt, sichtbar gemacht. Es ist klar, die Spaltung durch Cleavase™ BB hängt von einer Doppelstrang-Struktur ab; keine Spaltung der Einzelstrangstruktur wird nachgewiesen, wohingegen die Spaltung des 206-mer-Doppelstrangs vollständig ist.

BEISPIEL 8

Das Knabbern kann zielgerichtet erfolgen

[0276] Die Knabber-Aktivität der DNAPs kann erfolgreich in einem Nachweis-Test eingesetzt werden. Ein solcher Test ist in der Fig. 27 gezeigt. In diesem Test wird ein markiertes Oligonukleotid eingesetzt, das für eine Zielsequenz spezifisch ist. Das Oligonukleotid ist gegenüber dem Ziel im Überschuss, so dass die Hybridisierung rasch verläuft. Das Oligo enthält zwei Fluorescein-Markierungen, deren Nähe auf dem Oligonukleotid bewirkt, dass ihre Emission gequencht wird. Wenn dem DNAP ermöglicht wird das Oligonukleotid anzuknabbern, trennen sich die Markierungen und sind nachweisbar. Der verkürzte Doppelstrang wird destabilisiert und dissoziiert. Von Bedeutung ist, dass das Ziel jetzt frei ist um mit einem intakten markierten Oligonukleotid zu reagieren. Die Reaktion kann so lang verlaufen, bis das gewünschte Maß an Nachweis erzielt ist. Ein analoger, jedoch unterschiedlicher Typ des Cycling-Tests wurde beschrieben, der Lambda-Exonuklease einsetzt. Siehe C.G. Copley und C. Boot, BioTechniques 13: 888 (1982).

[0277] Der Erfolg eines solchen Tests hängt von der Spezifität ab. Mit anderen Worten muss das Oligonukleotid an das spezifische Ziel hybridisieren. Es ist auch bevorzugt, dass der Test empfindlich ist; das Oligonukleotid sollte Idealerweise kleine Mengen des Ziels nachweisen. Die Fig. 28A zeigt einen am 5'-Ende ^{32}P-markierten Primer, der an eine Plasmid-Zielsequenz gebunden ist. In diesem Fall war das Plasmid pUC19 (kommerziell erhältlich), das hitzedenaturiert wurde durch zwei (2) Minuten Kochen und dann Blitzkühlen. Der Primer ist ein 21-mer (Seq.-ID Nr. 39). Das eingesetzte Enzym war Cleavase™ BX (eine Verdünnung, äquivalent zu 5×10^{-3} µl Extrakt) in 100 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,3, 2 mM $MnCl_2$. Die Reaktion erfolgte bei 55°C für sechzehn (16) Stunden mit oder ohne genomische Hintergrund-DNA (aus Hühnerblut). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 µl 95% Formamid mit 20 mM EDTA und Marker-Farbstoffen gestoppt.

[0278] Die Produkte der Reaktion wurden durch PAGE (10% Polyacylamid, 19:1 kreuzvernetzt, 1X TBE) aufgelöst, wie in der Fig. 28B ersichtlich ist. Die Spur "M" enthält das markierte 21-mer. Die Spuren 1 bis 3 enthalten kein spezifisches Ziel, obgleich die Spuren 2 und 3 100 ng und 200 ng genomische DNA enthalten. Die Spuren 4, 5 und 6 enthalten alle ein spezifisches Ziel mit entweder 0 ng, 100 ng oder 200 ng genomischer DNA. Es ist klar, dass die Umwandlung in Mononukleotide in den Spuren 4, 5 und 6 erfolgt, und zwar unabhängig von der Anwesenheit oder der Menge von Hintergrund-DNA. Somit kann das Knabbern zielgerichtet und spe-

zifisch sein.

BEISPIEL 9

Cleavase-Reinigung

[0279] Wie vorstehend erwähnt, wurden exprimierte thermostabile Proteine, d.h. die 5'-Nukleasen, durch rohe Bakterienzellextrakte isoliert. Die gefällten E. coli-Proteine wurden dann, zusammen mit anderen Zelltrümmern, durch Zentrifugation entfernt. In diesem Beispiel wurden die Zellen, die die BN-Klone exprimieren, gezüchtet und gesammelt (500 Gramm). Für jedes Gramm (Feuchtgewicht) E. coli wurden 3 ml Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 1 mM EDTA, 100 µM NaCl) zugegeben. Die Zellen wurden mit 200 ug/ml Lysozym bei Raumtemperatur für 20 Minuten lysiert. Danach wurde Desoxycholsäure zugegeben, so dass eine 0,2% Endkonzentration erhalten wurde, und das Gemisch wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

[0280] Das Lysat wurde für etwa 6 bis 8 Minuten bei 0°C mit Ultraschall behandelt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (39000 × g für 20 Minuten) entfernt. Es wurde Polyethylenimin (0,5%) zum Überstand zugegeben, und das Gemisch wurde für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde zentrifugiert (5000 × g für 15 Minuten) und der Überstand wurde erhalten. Dieser wurde für 30 Minuten bei 60°C erhitzt, und dann erneut zentrifugiert (5000 × g für 15 Minuten), und der Überstand wurde wieder behalten.

[0281] Der Überstand wurde mit 35% Ammoniumsulfat für 15 Minuten bei 4°C gefällt. Das Gemisch wurde dann zentrifugiert (5000 g für 15 Minuten) und der Überstand wurde entfernt. Das Präzipitat wurde dann in 0,25 M KCl, 20 Tris pH-Wert 7,6, 0,2% Tween und 0,1 EDTA) gelöst und dann gegen Bindungspuffer (8X Bindungspuffer umfasst: 40 mM Imidazol, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9) dialysiert.

[0282] Das solubilisierte Protein wird dann auf der Ni^{++}-Säule (Novagen) gereinigt. Der Bindungspuffer wird oben über das Säulenbett gespült, und dann wird die Säule mit dem präparierten Extrakt beladen. Eine Fließgeschwindigkeit von etwa 10 Säulenvolumen pro Stunde ist für eine effiziente Reinigung optimal. Ist die Fließgeschwindigkeit zu groß, kontaminieren mehr Verunreinigungen die eluierte Fraktion.

[0283] Die Säule wird dann mit 25 ml (10 Volumina) 1 × Bindungspuffer und dann mit 15 ml (6 Volumina) 1 × Waschpuffer (8 × Waschpuffer umfasst: 480 mM Imidazol, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9) gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 15 ml (6 Volumina) 1 × Elutionspuffer (4 × Elutionspuffer umfasst: 4 mM Imidazol, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9) eluiert. Das Protein wird dann mit 35 % Ammoniumsulfat, wie oben, gefällt. Das Präzipitat wurde dann gelöst und dialysiert gegen: 20 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM EDTA. Diese Lösung wurde auf jeweils 0,1% Tween 20 und NP-40 gebracht und bei 4°C aufbewahrt.

[0284] Von dem obigen ist verständlich, dass die vorliegende Erfindung neue Verfahren bereitstellt. Diese Verfahren erfordern nicht, dass die DNA-Probe vor dem Nachweis amplifiziert werden muss, und offeriert damit eine Verbesserung in der DNA-basierten Nachweistechnologie.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN

(i) ANMELDER: Dahlenberg, James E.
Lyamichev, Victor I.
Brow, Mary Ann D.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: 5'-Nukleasen, die von thermostabilen DNA-Polymerasen abgeleitet sind

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 40

(iv) KORRESPONDENZANSCHRIFT:

(A) EMPFÄNGER: Haverstock, Medlen & Carroll

(B) STRASSE: 220 Montgomery Street, Suite 2200
(C) STADT: San Francisco
(D) BUNDESSTAAT: Kalifornien
(E) LAND: Vereinigte Staaten von Amerika
(F) POSTLEITZAHL: 94104

(v) RECHNERLESBARE FORM:

(A) ART DES DATENTRÄGERS: Floppy-Diskette
(B) RECHNER: IBM PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: Patent ln Release 1.0, Version 1.25

(vi)DATEN DER AKTUELLEN ANMELDUNG:

(A) NUMMER DER ANMELDUNG: US
(B) EINREICHUNGSDATUM: 06-JUN-1994
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) DATEN ZU VORHERIGEN ANMELDUNGEN:

(A) NUMMER DER ANMELDUNG: US 08/073,384
(B) EINREICHUNGSDATUM: 06-JUN-1993

(vii) DATEN ZU VORHERIGEN ANMELDUNGEN:

(A) NUMMER DER ANMELDUNG: US 07/986,330
(B) EINREICHUNGSDATUM: 07-DEZ-1992

(viii) INFORMATIONEN ZUM ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Carroll, Peter G.
(B) ZULASSUNGSNUMMER: 32,837
(C) REFERENZ/DOCKET-NUMMER: FORS-01000

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATIONEN:

(A) TELEFON: (415) 705-8410
(B) TELEFAX: (415) 397-8338

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 1

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 2505 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

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

ATGAGGGGGA TGCTGCCCCT CTTTGAGCCC AAGGGCCGGG TCCTCCTGGT GGACGGCCAC 60
CACCTGGCCT ACCGCACCTT CCACGCCCTG AAGGGCCTCA CCACCAGCCG GGGGGAGCCG 120
GTGCAGGCGG TCTACGGCTT CGCCAAGAGC CTCCTCAAGG CCCTCAAGGA GGACGGGGAC 180

GCGGTGATCG TGGTCTTTGA CGCCAAGGCC CCCTCCTTCC GCCACGAGGC CTACGGGGGG 240

TACAAGGCGG GCCGGGCCCC CACGCCGGAG GACTTTCCCC GGCAACTCGC CCTCATCAAG 300

GAGCTGGTGG ACCTCCTGGG GCTGGCGCGC CTCGAGGTCC CGGGCTACGA GGCGGACGAC 360

GTCCTGGCCA GCCTGGCCAA GAAGGCGGAA AAGGAGGGCT ACGAGGTCCG CATCCTCACC 420

GCCGACAAAG ACCTTTACCA GCTCCTTTCC GACCGCATCC ACGTCCTCCA CCCCGAGGGG 480

TACCTCATCA CCCCGGCCTG GCTTTGGGAA AAGTACGGCC TGAGGCCCGA CCAGTGGGCC 540

GACTACCGGG CCCTGACCGG GGACGAGTCC GACAACCTTC CCGGGGTCAA GGGCATCGGG 600

GAGAAGACGG CGAGGAAGCT TCTGGAGGAG TGGGGGAGCC TGGAAGCCCT CCTCAAGAAC 660

CTGGACCGGC TGAAGCCCGC CATCCGGGAG AAGATCCTGG CCCACATGGA CGATCTGAAG 720

CTCTCCTGGG ACCTGGCCAA GGTGCGCACC GACCTGCCCC TGGAGGTGGA CTTCGCCAAA 780

AGGCGGGAGC CCGACCGGGA GAGGCTTAGG GCCTTTCTGG AGAGGCTTGA GTTTGGCAGC 840

CTCCTCCACG AGTTCGGCCT TCTGGAAAGC CCCAAGGCCC TGGAGGAGGC CCCCTGGCCC 900

CCGCCGGAAG GGGCCTTCGT GGGCTTTGTG CTTTCCCGCA AGGAGCCCAT GTGGGCCGAT 960

CTTCTGGCCC TGGCCGCCGC CAGGGGGGGC CGGGTCCACC GGGCCCCCGA GCCTTATAAA 1020

GCCCTCAGGG ACCTGAAGGA GGCGCGGGGG CTTCTCGCCA AAGACCTGAG CGTTCTGGCC 1080

CTGAGGGAAG GCCTTGGCCT CCCGCCCGGC GACGACCCCA TGCTCCTCGC CTACCTCCTG 1140

GACCCTTCCA ACACCACCCC CGAGGGGGTG GCCCGGCGCT ACGGCGGGGA GTGGACGGAG 1200

GAGGCGGGGG AGCGGGCCGC CCTTTCCGAG AGGCTCTTCG CCAACCTGTG GGGGAGGCTT 1260

GAGGGGGAGG AGAGGCTCCT TTGGCTTTAC CGGGAGGTGG AGAGGCCCCT TTCCGCTGTC 1320

CTGGCCCACA TGGAGGCCAC GGGGGTGCGC CTGGACGTGG CCTATCTCAG GGCCTTGTCC 1380

CTGGAGGTGG CCGAGGAGAT CGCCCGCCTC GAGGCCGAGG TCTTCCGCCT GGCCGGCCAC 1440

CCCTTCAACC TCAACTCCCG GGACCAGCTG GAAAGGGTCC TCTTTGACGA GCTAGGGCTT 1500

CCCGCCATCG GCAAGACGGA GAAGACCGGC AAGCGCTCCA CCAGCGCCGC CGTCCTGGAG 1560

GCCCTCCGCG AGGCCCACCC CATCGTGGAG AAGATCCTGC AGTACCGGGA GCTCACCAAG 1620

CTGAAGAGCA CCTACATTGA CCCCTTGCCG GACCTCATCC ACCCCAGGAC GGGCCGCCTC 1680

CACACCCGCT TCAACCAGAC GGCCACGGCC ACGGGCAGGC TAAGTAGCTC CGATCCCAAC 1740

CTCCAGAACA TCCCCGTCCG CACCCCGCTT GGGCAGAGGA TCCGCCGGGC CTTCATCGCC 1800

GAGGAGGGGT GGCTATTGGT GGCCCTGGAC TATAGCCAGA TAGAGCTCAG GGTGCTGGCC 1860

CACCTCTCCG GCGACGAGAA CCTGATCCGG GTCTTCCAGG AGGGGCGGGA CATCCACACG 1920

GAGACCGCCA GCTGGATGTT CGGCGTCCCC CGGGAGGCCG TGGACCCCCT GATGCGCCGG 1980

GCGGCCAAGA CCATCAACTT CGGGGTCCTC TACGGCATGT CGGCCCACCG CCTCTCCCAG 2040

GAGCTAGCCA TCCTTACGAG GAGGCCCAGG CCTTCATTGA GCGCTACTTT CAGAGCTTCC 2100

CCAAGGTGCG GGCCTGGATT GAGAAGACCC TGGAGGAGGG CAGGAGGCGG GGGTACGTGG 2160

AGACCCTCTT CGGCCGCCGC CGCTACGTGC CAGACCTAGA GGCCCGGGTG AAGAGCGTGC 2220

GGGAGGCGGC CGAGCGCATG GCCTTCAACA TGCCCGTCCA GGGCACCGCC GCCGACCTCA 2280

TGAAGCTGGC TATGGTGAAG CTCTTCCCCA GGCTGGAGGA AATGGGGGCC AGGATGCTCC 2340

TTCAGGTCCA CGACGAGCTG GTCCTCGAGG CCCCAAAAGA GAGGGCGGAG GCCGTGGCCC 2400

GGCTGGCCAA GGAGGTCATG GAGGGGGTGT ATCCCCTGGC CGTGCCCCTG GAGGTGGAGG 2460

TGGGGATAGG GGAGGACTGG CTCTCCGCCA AGGAGTGATA CCACC 2505

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 2

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 2496 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Doppelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 2

ATGGCGATGC TTCCCCTCTT TGAGCCCAAA GGCCGCGTGC TCCTGGTGGA CGGCCACCAC 60

CTGGCCTACC GCACCTTCTT TGCCCTCAAG GGCCTCACCA CCAGCCGCGG CGAACCCGTT 120

CAGGCGGTCT ACGGCTTCGC CAAAAGCCTC CTCAAGGCCC TGAAGGAGGA CGGGGACGTG 180

GTGGTGGTGG TCTTTGACGC CAAGGCCCCC TCCTTCCGCC ACGAGGCCTA CGAGGCCTAC 240

AAGGCGGGCC GGGCCCCCAC CCCGGAGGAC TTTCCCCGGC AGCTGGCCCT CATCAAGGAG 300

TTGGTGGACC TCCTAGGCCT TGTGCGGCTG GAGGTTCCCG GCTTTGAGGC GGACGACGTG 360

CTGGCCACCC TGGCCAAGCG GGCGGAAAAG GAGGGGTACG AGGTGCGCAT CCTCACTGCC 420

GACCGCGACC TCTACCAGCT CCTTTCGGAG CGCATCGCCA TCCTCCACCC TGAGGGGTAC 480

CTGATCACCC CGGCGTGGCT TTACGAGAAG TACGGCCTGC GCCCGGAGCA GTGGGTGGAC 540

TACCGGGCCC TGGCGGGGGA CCCCTCGGAT AACATCCCCG GGGTGAAGGG CATCGGGGAG 600

AAGACCGCCC AGAGGCTCAT CCGCGAGTGG GGGAGCCTGG AAAACCTCTT CCAGCACCTG 660

GACCAGGTGA AGCCCTCCTT GCGGGAGAAG CTCCAGGCGG GCATGGAGGC CCTGGCCCTT 720

TCCCGGAAGC TTTCCCAGGT GCACACTGAC CTGCCCCTGG AGGTGGACTT CGGGAGGCGC 780

CGCACACCCA ACCTGGAGGG TCTGCGGGCT TTTTTGGAGC GGTTGGAGTT TGGAAGCCTC 840

CTCCACGAGT TCGGCCTCCT GGAGGGGCCG AAGGCGGCAG AGGAGGCCCC CTGGCCCCCT 900

CCGGAAGGGG CTTTTTTGGG CTTTTCCTTT TCCCGTCCCG AGCCCATGTG GGCCGAGCTT 960

CTGGCCCTGG CTGGGGCGTG GGAGGGGCGC CTCCATCGGG CACAAGACCC CCTTAGGGGC 1020

CTGAGGGACC TTAAGGGGGT GCGGGGAATC CTGGCCAAGG ACCTGGCGGT TTTGGCCCTG 1080

CGGGAGGGCC TGGACCTCTT CCCAGAGGAC GACCCCATGC TCCTGGCCTA CCTTCTGGAC 1140

CCCTCCAACA CCACCCCTGA GGGGGTGGCC CGGCGTTACG GGGGGGAGTG GACGGAGGAT 1200

GCGGGGGAGA GGGCCCTCCT GGCCGAGCGC CTCTTCCAGA CCCTAAAGGA GCGCCTTAAG 1260

GGAGAAGAAC GCCTGCTTTG GCTTTACGAG GAGGTGGAGA AGCCGCTTTC CCGGGTGTTG 1320

GCCCGGATGG AGGCCACGGG GGTCCGGCTG GACGTGGCCT ACCTCCAGGC CCTCTCCCTG 1380

```
GAGGTGGAGG CGGAGGTGCG CCAGCTGGAG GAGGAGGTCT TCCGCCTGGC CGGCCACCCC   1440
TTCAACCTCA ACTCCCGCGA CCAGCTGGAG CGGGTGCTCT TTGACGAGCT GGGCCTGCCT   1500
GCCATCGGCA AGACGGAGAA GACGGGGAAA CGCTCCACCA GCGCTGCCGT GCTGGAGGCC   1560
CTGCGAGAGG CCCACCCCAT CGTGGACCGC ATCCTGCAGT ACCGGGAGCT CACCAAGCTC   1620
AAGAACACCT ACATAGACCC CCTGCCCGCC CTGGTCCACC CCAAGACCGG CCGGCTCCAC   1680
ACCCGCTTCA ACCAGACGGC CACCGCCACG GGCAGGCTTT CCAGCTCCGA CCCCAACCTG   1740
CAGAACATCC CCGTGCGCAC CCCTCTGGGC CAGCGCATCC GCCGAGCCTT CGTGGCCGAG   1800
GAGGGCTGGG TGCTGGTGGT CTTGGACTAC AGCCAGATTG AGCTTCGGGT CCTGGCCCAC   1860
CTCTCCGGGG ACGAGAACCT GATCCGGGTC TTTCAGGAGG GGAGGGACAT CCACACCCAG   1920
ACCGCCAGCT GGATGTTCGG CGTTTCCCCC GAAGGGGTAG ACCCTCTGAT GCGCCGGGCG   1980
GCCAAGACCA TCAACTTCGG GGTGCTCTAC GGCATGTCCG CCCACCGCCT CTCCGGGGAG   2040
CTTTCCATCC CCTACGAGGA GGCGGTGGCC TTCATTGAGC GCTACTTCCA GAGCTACCCC   2100
AAGGTGCGGG CCTGGATTGA GGGGACCCTC GAGGAGGGCC GCCGGCGGGG GTATGTGGAG   2160
ACCCTCTTCG GCCGCCGGCG CTATGTGCCC GACCTCAACG CCCGGGTGAA GAGCGTGCGC   2220
GAGGCGGCGG AGCGCATGGC CTTCAACATG CCGGTCCAGG GCACCGCCGC CGACCTCATG   2280
AAGCTGGCCA TGGTGCGGCT TTTCCCCCGG CTTCAGGAAC TGGGGGCGAG GATGCTTTTG   2340
CAGGTGCACG ACGAGCTGGT CCTCGAGGCC CCCAAGGACC GGGCGGAGAG GGTAGCCGCT   2400
TTGGCCAAGG AGGTCATGGA GGGGGTCTGG CCCCTGCAGG TGCCCCTGGA GGTGGAGGTG   2460
GGCCTGGGGG AGGACTGGCT CTCCGCCAAG GAGTAG                              2496
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 3

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 2504 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Doppelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 3

```
ATGGAGGCGA TGCTTCCGCT CTTTGAACCC AAAGGCCGGG TCCTCCTGGT GGACGGCCAC     60
CACCTGGCCT ACCGCACCTT CTTCGCCCTG AAGGGCCTCA CCACGAGCCG GGGCGAACCG    120
GTGCAGGCGG TCTACGGCTT CGCCAAGAGC CTCCTCAAGG CCCTGAAGGA GGACGGGTAC    180
AAGGCCGTCT TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGAG    240
GCCTACAAGG CGGGGAGGGC CCCGACCCCC GAGGACTTCC CCCGGCAGCT CGCCCTCATC    300
AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGTTTACC CGCCTCGAGG TCCCCGGCTA CGAGGCGGAC    360
GACGTTCTCG CCACCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GGTACGAGGT GCGCATCCTC    420
ACCGCCGACC GCGACCTCTA CCAACTCGTC TCCGACCGCG TCGCCGTCCT CCACCCCGAG    480
GGCCACCTCA TCACCCCGGA GTGGCTTTGG GAGAAGTACG GCCTCAGGCC GGAGCAGTGG    540
```

GTGGACTTCC GCGCCCTCGT GGGGGACCCC TCCGACAACC TCCCCGGGGT CAAGGGCATC 600

GGGGAGAAGA CCGCCCTCAA GCTCCTCAAG GAGTGGGGAA GCCTGGAAAA CCTCCTCAAG 660

AACCTGGACC GGGTAAAGCC AGAAAACGTC CGGGAGAAGA TCAAGGCCCA CCTGGAAGAC 720

CTCAGGCTCT CCTTGGAGCT CTCCCGGGTG CGCACCGACC TCCCCCTGGA GGTGGACCTC 780

GCCCAGGGGC GGGAGCCCGA CCGGGAGGGG CTTAGGGCCT TCCTGGAGAG GCTGGAGTTC 840

GGCAGCCTCC TCCACGAGTT CGGCCTCCTG GAGGCCCCCG CCCCCCTGGA GGAGGCCCCC 900

TGGCCCCCGC CGGAAGGGGC CTTCGTGGGC TTCGTCCTCT CCCGCCCCGA GCCCATGTGG 960

GCGGAGCTTA AAGCCCTGGC CGCCTGCAGG GACGGCCGGG TGCACCGGGC AGCAGACCCC 1020

TTGGCGGGGC TAAAGGACCT CAAGGAGGTC CGGGGCCTCC TCGCCAAGGA CCTCGCCGTC 1080

TTGGCCTCGA GGGAGGGGCT AGACCTCGTG CCCGGGGACG ACCCCATGCT CCTCGCCTAC 1140

CTCCTGGACC CCTCCAACAC CACCCCCGAG GGGGTGGCGC GGCGCTACGG GGGGGAGTGG 1200

ACGGAGGACG CCGCCCACCG GGCCCTCCTC TCGGAGAGGC TCCATCGGAA CCTCCTTAAG 1260

CGCCTCGAGG GGGAGGAGAA GCTCCTTTGG CTCTACCACG AGGTGGAAAA GCCCCTCTCC 1320

CGGGTCCTGG CCCACATGGA GGCCACCGGG GTACGGCTGG ACGTGGCCTA CCTTCAGGCC 1380

CTTTCCCTGG AGCTTGCGGA GGAGATCCGC CGCCTCGAGG AGGAGGTCTT CCGCTTGGCG 1440

GGCCACCCCT TCAACCTCAA CTCCCGGGAC CAGCTGGAAA GGGTGCTCTT TGACGAGCTT 1500

AGGCTTCCCG CCTTGGGGAA GACGCAAAAG ACAGGCAAGC GCTCCACCAG CGCCGCGGTG 1560

CTGGAGGCCC TACGGGAGGC CCACCCCATC GTGGAGAAGA TCCTCCAGCA CCGGGAGCTC 1620

ACCAAGCTCA AGAACACCTA CGTGGACCCC CTCCCAAGCC TCGTCCACCC GAGGACGGGC 1680

CGCCTCCACA CCCGCTTCAA CCAGACGGCC ACGGCCACGG GGAGGCTTAG TAGCTCCGAC 1740

CCCAACCTGC AGAACATCCC CGTCCGCACC CCCTTGGGCC AGAGGATCCG CCGGGCCTTC 1800

GTGGCCGAGG CGGGTTGGGC GTTGGTGGCC CTGGACTATA GCCAGATAGA GCTCCGCGTC 1860

CTCGCCCACC TCTCCGGGGA CGAAAACCTG ATCAGGGTCT TCCAGGAGGG GAAGGACATC 1920

CACACCCAGA CCGCAAGCTG GATGTTCGGC GTCCCCCCGG AGGCCGTGGA CCCCCTGATG 1980

CGCCGGGCGG CCAAGACGGT GAACTTCGGC GTCCTCTACG GCATGTCCGC CCATAGGCTC 2040

TCCCAGGAGC TTGCCATCCC CTACGAGGAG GCGGTGGCCT TTATAGAGGC TACTTCCAAA 2100

GCTTCCCCAA GGTGCGGGCC TGGATAGAAA AGACCCTGGA GGAGGGGAGG AAGCGGGGCT 2160

ACGTGGAAAC CCTCTTCGGA AGAAGGCGCT ACGTGCCCGA CCTCAACGCC CGGGTGAAGA 2220

GCGTCAGGGA GGCCGCGGAG CGCATGGCCT TCAACATGCC CGTCCAGGGC ACCGCCGCCG 2280

ACCTCATGAA GCTCGCCATG GTGAAGCTCT TCCCCCGCCT CCGGGAGATG GGGGCCCGCA 2340

TGCTCCTCCA GGTCCACGAC GAGCTCCTCC TGGAGGCCCC CCAAGCGCGG GCCGAGGAGG 2400

TGGCGGCTTT GGCCAAGGAG GCCATGGAGA AGGCCTATCC CCTCGCCGTG CCCCTGGAGG 2460

TGGAGGTGGG GATGGGGGAG GACTGGCTTT CCGCCAAGGG TTAG 2504

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 4

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 832 Aminosäuren

(B) Typ: Aminosäure

(C) Strängigkeit: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 4

```
Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1               5                  10                  15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
            20                  25                  30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
        35                  40                  45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
    50                  55                  60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65                  70                  75                  80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
                85                  90                  95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
            100                 105                 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
        115                 120                 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
    130                 135                 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145                 150                 155                 160

Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
                165                 170                 175

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
            180                 185                 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
        195                 200                 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
    210                 215                 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
225                 230                 235                 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
                245                 250                 255

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
            260                 265                 270

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
        275                 280                 285
```

```
Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
    290                 295                 300

Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
305                 310                 315                 320

Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
                325                 330                 335

Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
            340                 345                 350

Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
        355                 360                 365

Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
    370                 375                 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
385                 390                 395                 400

Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
                405                 410                 415

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
            420                 425                 430

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
        435                 440                 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
    450                 455                 460

Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
465                 470                 475                 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
                485                 490                 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
            500                 505                 510

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
        515                 520                 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
    530                 535                 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
545                 550                 555                 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
                565                 570                 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
            580                 585                 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
        595                 600                 605

Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
    610                 615                 620

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
625                 630                 635                 640
```

```
Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
                645                 650                 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
            660                 665                 670

Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
        675                 680                 685

Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
    690                 695                 700

Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val
705                 710                 715                 720

Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg
                725                 730                 735

Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
            740                 745                 750

Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
        755                 760                 765

Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His
    770                 775                 780

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785                 790                 795                 800

Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
                805                 810                 815

Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
            820                 825                 830
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 5

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 831 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 5

```
Met Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val
1               5                   10                  15

Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu
            20                  25                  30

Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys
        35                  40                  45

Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Val Val Val Val Val
    50                  55                  60

Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala
                85                  90                  95
```

```
Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val
            100                 105                 110

Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Arg Ala
        115                 120                 125

Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg Asp Leu
    130                 135                 140

Tyr Gln Leu Leu Ser Glu Arg Ile Ala Ile Leu His Pro Glu Gly Tyr
145                 150                 155                 160

Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Tyr Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro Glu
                165                 170                 175

Gln Trp Val Asp Tyr Arg Ala Leu Ala Gly Asp Pro Ser Asp Asn Ile
            180                 185                 190

Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Gln Arg Leu Ile Arg
        195                 200                 205

Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Phe Gln His Leu Asp Gln Val Lys
    210                 215                 220

Pro Ser Leu Arg Glu Lys Leu Gln Ala Gly Met Glu Ala Leu Ala Leu
225                 230                 235                 240

Ser Arg Lys Leu Ser Gln Val His Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp
                245                 250                 255

Phe Gly Arg Arg Arg Thr Pro Asn Leu Glu Gly Leu Arg Ala Phe Leu
            260                 265                 270

Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu
        275                 280                 285

Gly Pro Lys Ala Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly Ala
    290                 295                 300

Phe Leu Gly Phe Ser Phe Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu
305                 310                 315                 320

Leu Ala Leu Ala Gly Ala Trp Glu Gly Arg Leu His Arg Ala Gln Asp
                325                 330                 335

Pro Leu Arg Gly Leu Arg Asp Leu Lys Gly Val Arg Gly Ile Leu Ala
            340                 345                 350

Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp Leu Phe Pro
        355                 360                 365

Glu Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn Thr
    370                 375                 380

Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu Asp
385                 390                 395                 400

Ala Gly Glu Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Phe Gln Thr Leu Lys
                405                 410                 415

Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Glu Glu Val
            420                 425                 430

Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala Arg Met Glu Ala Thr Gly Val
        435                 440                 445
```

```
Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu Val Glu Ala
    450                 455                 460

Glu Val Arg Gln Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro
465                 470                 475                 480

Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu
                485                 490                 495

Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser
            500                 505                 510

Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val
        515                 520                 525

Asp Arg Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr Tyr
    530                 535                 540

Ile Asp Pro Leu Pro Ala Leu Val His Pro Lys Thr Gly Arg Leu His
545                 550                 555                 560

Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser
                565                 570                 575

Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg
            580                 585                 590

Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Glu Gly Trp Val Leu Val Val Leu
        595                 600                 605

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp
    610                 615                 620

Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr Gln
625                 630                 635                 640

Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Gly Val Asp Pro Leu
                645                 650                 655

Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met
            660                 665                 670

Ser Ala His Arg Leu Ser Gly Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala
        675                 680                 685

Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Tyr Pro Lys Val Arg Ala
    690                 695                 700

Trp Ile Glu Gly Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val Glu
705                 710                 715                 720

Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val
                725                 730                 735

Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val
            740                 745                 750

Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Arg Leu Phe
        755                 760                 765

Pro Arg Leu Gln Glu Leu Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp
    770                 775                 780

Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Asp Arg Ala Glu Arg Val Ala Ala
785                 790                 795                 800
```

```
Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Trp Pro Leu Gln Val Pro Leu
                805                 810                 815

Glu Val Glu Val Gly Leu Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
            820                 825                 830
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 6

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 834 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 6

```
Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1               5                  10                  15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly
            20                  25                  30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
        35                  40                  45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe
    50                  55                  60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu
65                  70                  75                  80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
                85                  90                  95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu
            100                 105                 110

Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys
        115                 120                 125

Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg
    130                 135                 140

Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu
145                 150                 155                 160

Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg
                165                 170                 175

Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp
            180                 185                 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu
        195                 200                 205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg
    210                 215                 220

Val Lys Pro Glu Asn Val Arg Glu Lys Ile Lys Ala His Leu Glu Asp
225                 230                 235                 240

Leu Arg Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu
                245                 250                 255
```

```
Glu Val Asp Leu Ala Gln Gly Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg
        260                 265                 270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly
    275                 280                 285

Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro
290                 295                 300

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp
305                 310                 315                 320

Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Arg Asp Gly Arg Val His Arg
                325                 330                 335

Ala Ala Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly
            340                 345                 350

Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Ser Arg Glu Gly Leu Asp
        355                 360                 365

Leu Val Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro
    370                 375                 380

Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp
385                 390                 395                 400

Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu His Arg
                405                 410                 415

Asn Leu Leu Lys Arg Leu Glu Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr
            420                 425                 430

His Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala
        435                 440                 445

Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu
    450                 455                 460

Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala
465                 470                 475                 480

Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu
                485                 490                 495

Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly
            500                 505                 510

Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His
        515                 520                 525

Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys
    530                 535                 540

Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Ser Leu Val His Pro Arg Thr Gly
545                 550                 555                 560

Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu
                565                 570                 575

Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu
            580                 585                 590

Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu
        595                 600                 605
```

```
Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu
    610                 615                 620

Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile
625                 630                 635                 640

His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val
                645                 650                 655

Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu
            660                 665                 670

Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr
        675                 680                 685

Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys
    690                 695                 700

Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly
705                 710                 715                 720

Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn
                725                 730                 735

Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn
            740                 745                 750

Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val
        755                 760                 765

Lys Leu Phe Pro Arg Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln
    770                 775                 780

Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu
785                 790                 795                 800

Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala
                805                 810                 815

Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala
            820                 825                 830

Lys Gly
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 7

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 2502 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 7

```
ATGNNGGCGA TGCTTCCCCT CTTTGAGCCC AAAGGCCGGG TCCTCCTGGT GGACGGCCAC    60

CACCTGGCCT ACCGCACCTT CTTCGCCCTG AAGGGCCTCA CCACCAGCCG GGGCGAACCG   120

GTGCAGGCGG TCTACGGCTT CGCCAAGAGC CTCCTCAAGG CCCTGAAGGA GGACGGGGAC   180

NNGGCGGTGN TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGAG   240

GCCTACAAGG CGGGCCGGGC CCCCACCCCG GAGGACTTTC CCCGGCAGCT CGCCCTCATC   300
```

AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGCTTGCG CGCCTCGAGG TCCCCGGCTA CGAGGCGGAC 360

GACGTNCTGG CCACCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GGTACGAGGT GCGCATCCTC 420

ACCGCCGACC GCGACCTCTA CCAGCTCCTT TCCGACCGCA TCGCCGTCCT CCACCCCGAG 480

GGGTACCTCA TCACCCCGGC GTGGCTTTGG GAGAAGTACG GCCTGAGGCC GGAGCAGTGG 540

GTGGACTACC GGGCCCTGGC GGGGGACCCC TCCGACAACC TCCCCGGGGT CAAGGGCATC 600

GGGGAGAAGA CCGCCCNGAA GCTCCTCNAG GAGTGGGGGA GCCTGGAAAA CCTCCTCAAG 660

AACCTGGACC GGGTGAAGCC CGCCNTCCGG GAGAAGATCC AGGCCCACAT GGANGACCTG 720

ANGCTCTCCT GGGAGCTNTC CCAGGTGCGC ACCGACCTGC CCCTGGAGGT GGACTTCGCC 780

AAGNGGCGGG AGCCCGACCG GGAGGGGCTT AGGGCCTTTC TGGAGAGGCT GGAGTTTGGC 840

AGCCTCCTCC ACGAGTTCGG CCTCCTGGAG GGCCCCAAGG CCCTGGAGGA GGCCCCCTGG 900

CCCCCGCCGG AAGGGGCCTT CGTGGGCTTT GTCCTTTCCC GCCCCGAGCC CATGTGGGCC 960

GAGCTTCTGG CCCTGGCCGC CGCCAGGGAG GGCCGGGTCC ACCGGGCACC AGACCCCTTT 1020

ANGGGCCTNA GGGACCTNAA GGAGGTGCGG GGNCTCCTCG CCAAGGACCT GGCCGTTTTG 1080

GCCCTGAGGG AGGGCCTNGA CCTCNTGCCC GGGGACGACC CCATGCTCCT CGCCTACCTC 1140

CTGGACCCCT CCAACACCAC CCCCGAGGGG GTGGCCCGGC GCTACGGGGG GGAGTGGACG 1200

GAGGANGCGG GGGAGCGGGC CCTCCTNTCC GAGAGGCTCT TCCNGAACCT NNNGCAGCGC 1260

CTTGAGGGGG AGGAGAGGCT CCTTTGGCTT TACCAGGAGG TGGAGAAGCC CCTTTCCCGG 1320

GTCCTGGCCC ACATGGAGGC CACGGGGGTN CGGCTGGACG TGGCCTACCT CCAGGCCCTN 1380

TCCCTGGAGG TGGCGGAGGA GATCCGCCGC CTCGAGGAGG AGGTCTTCCG CCTGGCCGGC 1440

CACCCCTTCA ACCTCAACTC CCGGGACCAG CTGGAAAGGG TGCTCTTTGA CGAGCTNGGG 1500

CTTCCCGCCA TCGGCAAGAC GGAGAAGACN GGCAAGCGCT CCACCAGCGC CGCCGTGCTG 1560

GAGGCCCTNC GNGAGGCCCA CCCCATCGTG GAGAAGATCC TGCAGTACCG GGAGCTCACC 1620

AAGCTCAAGA ACACCTACAT NGACCCCCTG CCNGNCCTCG TCCACCCCAG GACGGGCCGC 1680

CTCCACACCC GCTTCAACCA GACGGCCACG GCCACGGGCA GGCTTAGTAG CTCCGACCCC 1740

AACCTGCAGA ACATCCCCGT CCGCACCCCN CTGGGCCAGA GGATCCGCCG GGCCTTCGTG 1800

GCCGAGGAGG GNTGGGTGTT GGTGGCCCTG GACTATAGCC AGATAGAGCT CCGGGTCCTG 1860

GCCCACCTCT CCGGGGACGA GAACCTGATC CGGGTCTTCC AGGAGGGGAG GGACATCCAC 1920

ACCCAGACCG CCAGCTGGAT GTTCGGCGTC CCCCCGGAGG CCGTGGACCC CCTGATGCGC 1980

CGGGCGGCCA AGACCATCAA CTTCGGGGTC CTCTACGGCA TGTCCGCCCA CCGCCTCTCC 2040

CAGGAGCTTG CCATCCCCTA CGAGGAGGCG GTGGCCTTCA TTGAGCGCTA CTTCCAGAGC 2100

TTCCCCAAGG TGCGGGCCTG GATTGAGAAG ACCCTGGAGG AGGGCAGGAG GCGGGGGTAC 2160

GTGGAGACCC TCTTCGGCCG CCGGCGCTAC GTGCCCGACC TCAACGCCCG GGTGAAGAGC 2220

GTGCGGGAGG CGGCGGAGCG CATGGCCTTC AACATGCCCG TCCAGGGCAC CGCCGCCGAC 2280

CTCATGAAGC TGGCCATGGT GAAGCTCTTC CCCCGGCTNC AGGAAATGGG GGCCAGGATG 2340

```
CTCCTNCAGG TCCACGACGA GCTGGTCCTC GAGGCCCCCA AAGAGCGGGC GGAGGNGGTG    2400

GCCGCTTTGG CCAAGGAGGT CATGGAGGGG GTCTATCCCC TGGCCGTGCC CCTGGAGGTG    2460

GAGGTGGGGA TGGGGGAGGA CTGGCTCTCC GCCAAGGAGT AG                      2502
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 8

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 833 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: unbekannt

(ii) Molekültyp: Peptid
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 8

```
Met Xaa Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1               5                  10                  15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly
            20                  25                  30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
        35                  40                  45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Xaa Val
    50                  55                  60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala
65                  70                  75                  80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
                85                  90                  95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Xaa Arg Leu Glu
            100                 105                 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Lys
        115                 120                 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg Asp
    130                 135                 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile Ala Val Leu His Pro Glu Gly
145                 150                 155                 160

Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
                165                 170                 175

Glu Gln Trp Val Asp Tyr Arg Ala Leu Xaa Gly Asp Pro Ser Asp Asn
            180                 185                 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Xaa Lys Leu Leu
        195                 200                 205

Xaa Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Val
    210                 215                 220

Lys Pro Xaa Xaa Arg Glu Lys Ile Xaa Ala His Met Glu Asp Leu Xaa
225                 230                 235                 240

Leu Ser Xaa Xaa Leu Ser Xaa Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
                245                 250                 255
```

Asp Phe Ala Xaa Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg Ala Phe
260 265 270

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
275 280 285

Glu Xaa Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
290 295 300

Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu
305 310 315 320

Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Xaa Gly Arg Val His Arg Ala Xaa
325 330 335

Asp Pro Leu Xaa Gly Leu Arg Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly Leu Leu
340 345 350

Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp Leu Xaa
355 360 365

Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
370 375 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
385 390 395 400

Asp Ala Gly Glu Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu Phe Xaa Asn Leu
405 410 415

Xaa Xaa Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Xaa Glu
420 425 430

Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
435 440 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
450 455 460

Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
465 470 475 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
485 490 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
500 505 510

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr
530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Xaa Leu Val His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Glu Gly Trp Xaa Leu Val Ala
595 600 605

```
Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
    610                 615                 620

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
625                 630                 635                 640

Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val Asp Pro
                645                 650                 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
            660                 665                 670

Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
        675                 680                 685

Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
    690                 695                 700

Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val
705                 710                 715                 720

Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg
                725                 730                 735

Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
            740                 745                 750

Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
        755                 760                 765

Phe Pro Arg Leu Xaa Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His
    770                 775                 780

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Xaa Arg Ala Glu Xaa Val Ala
785                 790                 795                 800

Ala Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
                805                 810                 815

Leu Glu Val Glu Val Gly Xaa Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
            820                 825                 830

Xaa
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 9

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 1647 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Doppelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 9

```
ATGAATTCGG GGATGCTGCC CCTCTTTGAG CCCAAGGGCC GGGTCCTCCT GGTGGACGGC      60
CACCACCTGG CCTACCGCAC CTTCCACGCC CTGAAGGGCC TCACCACCAG CCGGGGGGAG     120
CCGGTGCAGG CGGTCTACGG CTTCGCCAAG AGCCTCCTCA AGGCCCTCAA GGAGGACGGG     180
GACGCGGTGA TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGGG     240
GGGTACAAGG CGGGCCGGGC CCCCACGCCG GAGGACTTTC CCCGGCAACT CGCCCTCATC     300
AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGCTGGCG CGCCTCGAGG TCCCGGGCTA CGAGGCGGAC     360

GACGTCCTGG CCAGCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GCTACGAGGT CCGCATCCTC     420
ACCGCCGACA AAGACCTTTA CCAGCTCCTT TCCGACCGCA TCCACGTCCT CCACCCCGAG     480
GGGTACCTCA TCACCCCGGC CTGGCTTTGG GAAAAGTACG GCCTGAGGCC CGACCAGTGG     540
GCCGACTACC GGGCCCTGAC CGGGGACGAG TCCGACAACC TTCCCGGGGT CAAGGGCATC     600
GGGGAGAAGA CGGCGAGGAA GCTTCTGGAG GAGTGGGGGA GCCTGGAAGC CCTCCTCAAG     660
AACCTGGACC GGCTGAAGCC CGCCATCCGG GAGAAGATCC TGGCCCACAT GGACGATCTG     720
AAGCTCTCCT GGGACCTGGC CAAGGTGCGC ACCGACCTGC CCCTGGAGGT GGACTTCGCC     780
AAAAGGCGGG AGCCCGACCG GGAGAGGCTT AGGGCCTTTC TGGAGAGGCT TGAGTTTGGC     840
AGCCTCCTCC ACGAGTTCGG CCTTCTGGAA AGCCCCAAGG CCCTGGAGGA GGCCCCCTGG     900
CCCCCGCCGG AAGGGGCCTT CGTGGGCTTT GTGCTTTCCC GCAAGGAGCC CATGTGGGCC     960
GATCTTCTGG CCCTGGCCGC CGCCAGGGGG GGCCGGGTCC ACCGGGCCCC CGAGCCTTAT    1020
AAAGCCCTCA GGGACCTGAA GGAGGCGCGG GGGCTTCTCG CCAAAGACCT GAGCGTTCTG    1080
GCCCTGAGGG AAGGCCTTGG CCTCCCGCCC GGCGACGACC CCATGCTCCT CGCCTACCTC    1140
CTGGACCCTT CCAACACCAC CCCCGAGGGG GTGGCCCGGC GCTACGGCGG GGAGTGGACG    1200
GAGGAGGCGG GGGAGCGGGC CGCCCTTTCC GAGAGGCTCT TCGCCAACCT GTGGGGGAGG    1260
CTTGAGGGGG AGGAGAGGCT CCTTTGGCTT TACCGGGAGG TGGAGAGGCC CCTTTCCGCT    1320
GTCCTGGCCC ACATGGAGGC CACGGGGGTG CGCCTGGACG TGGCCTATCT CAGGGCCTTG    1380
TCCCTGGAGG TGGCCGGGGA GATCGCCCGC CTCGAGGCCG AGGTCTTCCG CCTGGCCGGC    1440
CACCCCTTCA ACCTCAACTC CCGGGACCAG CTGGAAAGGG TCCTCTTTGA CGAGCTAGGG    1500
CTTCCCGCCA TCGGCAAGAC GGAGAAGACC GGCAAGCGCT CCACCAGCGC CGCCGTCCTG    1560
GAGGCCCTCC GCGAGGCCCA CCCCATCGTG GAGAAGATCC TGCAGGCATG CAAGCTTGGC    1620
ACTGGCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGA                                        1647
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 10

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 208A Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Doppelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 10

```
ATGAATTCGG GGATGCTGCC CCTCTTTGAG CCCAAGGGCC GGGTCCTCCT GGTGGACGGC      60

CACCACCTGG CCTACCGCAC CTTCCACGCC CTGAAGGGCC TCACCACCAG CCGGGGGGAG     120

CCGGTGCAGG CGGTCTACGG CTTCGCCAAG AGCCTCCTCA AGGCCCTCAA GGAGGACGGG     180

GACGCGGTGA TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGGG     240

GGGTACAAGG CGGGCCGGGC CCCCACGCCG GAGGACTTTC CCCGGCAACT CGCCCTCATC     300

AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGCTGGCG CGCCTCGAGG TCCCGGGCTA CGAGGCGGAC     360
```

GACGTCCTGG CCAGCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GCTACGAGGT CCGCATCCTC 420

ACCGCCGACA AAGACCTTTA CCAGCTCCTT TCCGACCGCA TCCACGTCCT CCACCCCGAG 480

GGGTACCTCA TCACCCCGGC CTGGCTTTGG GAAAAGTACG GCCTGAGGCC CGACCAGTGG 540

GCCGACTACC GGGCCCTGAC CGGGGACGAG TCCGACAACC TTCCCGGGGT CAAGGGCATC 600

GGGGAGAAGA CGGCGAGGAA GCTTCTGGAG GAGTGGGGGA GCCTGGAAGC CCTCCTCAAG 660

AACCTGGACC GGCTGAAGCC CGCCATCCGG GAGAAGATCC TGGCCCACAT GGACGATCTG 720

AAGCTCTCCT GGGACCTGGC CAAGGTGCGC ACCGACCTGC CCCTGGAGGT GGACTTCGCC 780

AAAAGGCGGG AGCCCGACCG GGAGAGGCTT AGGGCCTTTC TGGAGAGGCT TGAGTTTGGC 840

AGCCTCCTCC ACGAGTTCGG CCTTCTGGAA AGCCCCAAGG CCCTGGAGGA GGCCCCCTGG 900

CCCCCGCCGG AAGGGGCCTT CGTGGGCTTT GTGCTTTCCC GCAAGGAGCC CATGTGGGCC 960

GATCTTCTGG CCCTGGCCGC CGCCAGGGGG GGCCGGGTCC ACCGGGCCCC CGAGCCTTAT 1020

AAAGCCCTCA GGGACCTGAA GGAGGCGCGG GGGCTTCTCG CCAAAGACCT GAGCGTTCTG 1080

GCCCTGAGGG AAGGCCTTGG CCTCCCGCCC GGCGACGACC CCATGCTCCT CGCCTACCTC 1140

CTGGACCCTT CCAACACCAC CCCCGAGGGG GTGGCCCGGC GCTACGGCGG GGAGTGGACG 1200

GAGGAGGCGG GGGAGCGGGC CGCCCTTTCC GAGAGGCTCT TCGCCAACCT GTGGGGGAGG 1260

CTTGAGGGGG AGGAGAGGCT CCTTTGGCTT TACCGGGAGG TGGAGAGGCC CCTTTCCGCT 1320

GTCCTGGCCC ACATGGAGGC CACGGGGGTG CGCCTGGACG TGGCCTATCT CAGGGCCTTG 1380

TCCCTGGAGG TGGCCGGGGA GATCGCCCGC CTCGAGGCCG AGGTCTTCCG CCTGGCCGGC 1440

CACCCCTTCA ACCTCAACTC CCGGGACCAG CTGGAAAGGG TCCTCTTTGA CGAGCTAGGG 1500

CTTCCCGCCA TCGGCAAGAC GGAGAAGACC GGCAAGCGCT CCACCAGCGC CGCCGTCCTG 1560

GAGGCCCTCC GCGAGGCCCA CCCCATCGTG GAGAAGATCC TGCAGTACCG GGAGCTCACC 1620

AAGCTGAAGA GCACCTACAT TGACCCCTTG CCGGACCTCA TCCACCCCAG GACGGGCCGC 1680

CTCCACACCC GCTTCAACCA GACGGCCACG GCCACGGGCA GGCTAAGTAG CTCCGATCCC 1740

AACCTCCAGA ACATCCCCGT CCGCACCCCG CTTGGGCAGA GGATCCGCCG GGCCTTCATC 1800

GCCGAGGAGG GGTGGCTATT GGTGGCCCTG GACTATAGCC AGATAGAGCT CAGGGTGCTG 1860

GCCCACCTCT CCGGCGACGA GAACCTGATC CGGGTCTTCC AGGAGGGGCG GGACATCCAC 1920

ACGGAGACCG CCAGCTGGAT GTTCGGCGTC CCCCGGGAGG CCGTGGACCC CCTGATGCGC 1980

CGGGCGGCCA AGACCATCAA CTTCGGGGTC CTCTACGGCA TGTCGGCCCA CCGCCTCTCC 2040

CAGGAGCTAG CTAGCCATCC CTTACGAGGA GGCCCAGGCC TTCATTGA 2088

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 12

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 962 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 11

```
ATGAATTCGG GGATGCTGCC CCTCTTTGAG CCCAAGGGCC GGGTCCTCCT GGTGGACGGC     60
CACCACCTGG CCTACCGCAC CTTCCACGCC CTGAAGGGCC TCACCACCAG CCGGGGGGAG    120
CCGGTGCAGG CGGTCTACGG CTTCGCCAAG AGCCTCCTCA AGGCCCTCAA GGAGGACGGG    180
GACGCGGTGA TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGGG    240
GGGTACAAGG CGGGCCGGGC CCCCACGCCG GAGGACTTTC CCCGGCAACT CGCCCTCATC    300
AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGCTGGCG CGCCTCGAGG TCCCGGGCTA CGAGGCGGAC    360
GACGTCCTGG CCAGCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GCTACGAGGT CCGCATCCTC    420
ACCGCCGACA AAGACCTTTA CCAGCTTCTT TCCGACCGCA TCCACGTCCT CCACCCCGAG    480
GGGTACCTCA TCACCCCGGC CTGGCTTTGG GAAAAGTACG GCCTGAGGCC CGACCAGTGG    540
GCCGACTACC GGGCCCTGAC CGGGGACGAG TCCGACAACC TTCCCGGGGT CAAGGGCATC    600
GGGGAGAAGA CGGCGAGGAA GCTTCTGGAG GAGTGGGGGA GCCTGGAAGC CCTCCTCAAG    660
AACCTGGACC GGCTGAAGCC CGCCATCCGG GAGAAGATCC TGGCCCACAT GGACGATCTG    720
AAGCTCTCCT GGGACCTGGC CAAGGTGCGC ACCGACCTGC CCCTGGAGGT GGACTTCGCC    780
AAAAGGCGGG AGCCCGACCG GGAGAGGCTT AGGGCCTTTC TGGAGAGGCT TGAGTTTGGC    840
AGCCTCCTCC ACGAGTTCGG CCTTCTGGAA AGCCCCAAGT CATGGAGGGG GTGTATCCCC    900
TGGCCGTGCC CCTGGAGGTG GAGGTGGGGA TAGGGGAGGA CTGGCTCTCC GCCAAGGAGT    960
GA                                                                   962
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 12

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 1600 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Doppelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 12

```
ATGGAATTCG GGGATGCTGC CCCTCTTTGA GCCCAAGGGC CGGGTCCTCC TGGTGGACGG     60
CCACCACCTG GCCTACCGCA CCTTCCACGC CCTGAAGGGC CTCACCACCA GCCGGGGGGA    120
GCCGGTGCAG GCGGTCTACG GCTTCGCCAA GAGCCTCCTC AAGGCCCTCA AGGAGGACGG    180
GGACGCGGTG ATCGTGGTCT TTGACGCCAA GGCCCCCTCC TTCCGCCACG AGGCCTACGG    240
GGGGTACAAG GCGGGCCGGG CCCCCACGCC GGAGGACTTT CCCCGGCAAC TCGCCCTCAT    300
CAAGGAGCTG GTGGACCTCC TGGGGCTGGC GCGCCTCGAG GTCCCGGGCT ACGAGGCGGA    360
CGACGTCCTG GCCAGCCTGG CCAAGAAGGC GGAAAAGGAG GGCTACGAGG TCCGCATCCT    420
CACCGCCGAC AAAGACCTTT ACCAGCTCCT TTCCGACCGC ATCCACGTCC TCCACCCCGA    480
GGGGTACCTC ATCACCCCGG CCTGGCTTTG GGAAAAGTAC GGCCTGAGGC CCGACCAGTG    540
GGCCGACTAC CGGGCCCTGA CCGGGGACGA GTCCGACAAC CTTCCCGGGG TCAAGGGCAT    600
```

CGGGGAGAAG ACGGCGAGGA AGCTTCTGGA GGAGTGGGGG AGCCTGGAAG CCCTCCTCAA 660

GAACCTGGAC CGGCTGAAGC CCGCCATCCG GGAGAAGATC CTGGCCCACA TGGACGATCT 720

GAAGCTCTCC TGGGACCTGG CCAAGGTGCG CACCGACCTG CCCCTGGAGG TGGACTTCGC 780

CAAAAGGCGG GAGCCCGACC GGGAGAGGCT TAGGGCCTTT CTGGAGAGGC TTGAGTTTGG 840

CAGCCTCCTC CACGAGTTCG GCCTTCTGGA AAGCCCCAAG ATCCGCCGGG CCTTCATCGC 900

CGAGGAGGGG TGGCTATTGG TGGCCCTGGA CTATAGCCAG ATAGAGCTCA GGGTGCTGGC 960

CCACCTCTCC GGCGACGAGA ACCTGATCCG GGTCTTCCAG GAGGGGCGGG ACATCCACAC 1020

GGAGACCGCC AGCTGGATGT TCGGCGTCCC CCGGGAGGCC GTGGACCCCC TGATGCGCCG 1080

GGCGGCCAAG ACCATCAACT TCGGGGTCCT CTACGGCATG TCGGCCCACC GCCTCTCCCA 1140

GGAGCTAGCC ATCCCTTACG AGGAGGCCCA GGCCTTCATT GAGCGCTACT TTCAGAGCTT 1200

CCCCAAGGTG CGGGCCTGGA TTGAGAAGAC CCTGGAGGAG GGCAGGAGGC GGGGGTACGT 1260

GGAGACCCTC TTCGGCCGCC GCCGCTACGT GCCAGACCTA GAGGCCCGGG TGAAGAGCGT 1320

GCGGGAGGCG GCCGAGCGCA TGGCCTTCAA CATGCCCGTC CGGGGCACCG CCGCCGACCT 1380

CATGAAGCTG GCTATGGTGA AGCTCTTCCC CAGGCTGGAG GAAATGGGGG CCAGGATGCT 1440

CCTTCAGGTC CACGACGAGC TGGTCCTCGA GGCCCCAAAA GAGAGGGCGG AGGCCGTGGC 1500

CCGGCTGGCC AAGGAGGTCA TGGAGGGGGT GTATCCCCTG GCCGTGCCCC TGGAGGTGGA 1560

GGTGGGGATA GGGGAGGACT GGCTCTCCGC CAAGGAGTGA 1600

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 13

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 36 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 13
CACGAATTCG GGGATGCTGC CCCTCTTTGA GCCCAA 36

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 14

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 34 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 14
GTGAGATCTA TCACTCCTTG GCGGAGAGCC AGTC 34

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 15

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 91 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 15
TAATACGACT CACTATAGGG AGACCGGAAT TCGAGCTCGC CCGGGCGAGC TCGAATTCCG 60
TGTATTCTAT AGTGTCACCT AAATCGAATT C v91

2) Informationen für SEQ ID Nr.: 16

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 20 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 16
TAATACGACT CACTATAGGG 20

2) Informationen für SEQ ID Nr.: 17

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 27 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 17
GAATTCGATT TAGGTGACAC TATAGAA 27

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 18

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 31 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 18
GTAATCATGG TCATAGCTGG TAGCTTGCTA C 31

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 19
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 42 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 19
GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGCATGC CTACCTTGGT AG 42

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 20

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 30 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 20
GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGCATGC 30

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 21

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 2502 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Doppelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbechreibung: SEQ ID Nr.: 21

ATGAATTCGG GGATGCTGCC CCTCTTTGAG CCCAAGGGCC GGGTCCTCCT GGTGGACGGC 60
CACCACCTGG CCTACCGCAC CTTCCACGCC CTGAAGGGCC TCACCACCAG CCGGGGGGAG 120
CCGGTGCAGG CGGTCTACGG CTTCGCCAAG AGCCTCCTCA AGGCCCTCAA GGAGGACGGG 180
GACGCGGTGA TCGTGGTCTT TGACGCCAAG GCCCCCTCCT TCCGCCACGA GGCCTACGGG 240
GGGTACAAGG CGGGCCGGGC CCCCACGCCG GAGGACTTTC CCCGGCAACT CGCCCTCATC 300
AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGCTGGCG CGCCTCGAGG TCCCGGGCTA CGAGGCGGAC 360
GACGTCCTGG CCAGCCTGGC CAAGAAGGCG GAAAAGGAGG GCTACGAGGT CCGCATCCTC 420
ACCGCCGACA AAGACCTTTA CCAGCTCCTT TCCGACCGCA TCCACGTCCT CCACCCCGAG 480
GGGTACCTCA TCACCCCGGC CTGGCTTTGG GAAAAGTACG GCCTGAGGCC CGACCAGTGG 540
GCCGACTACC GGGCCCTGAC CGGGGACGAG TCCGACAACC TTCCCGGGGT CAAGGGCATC 600
GGGGAGAAGA CGGCGAGGAA GCTTCTGGAG GAGTGGGGGA GCCTGGAAGC CCTCCTCAAG 660
AACCTGGACC GGCTGAAGCC CGCCATCCGG GAGAAGATCC TGGCCCACAT GGACGATCTG 720
AAGCTCTCCT GGGACCTGGC CAAGGTGCGC ACCGACCTGC CCCTGGAGGT GGACTTCGCC 780
AAAAGGCGGG AGCCCGACCG GGAGAGGCTT AGGGCCTTTC TGGAGAGGCT TGAGTTTGGC 840
AGCCTCCTCC ACGAGTTCGG CCTTCTGGAA AGCCCCAAGG CCCTGGAGGA GGCCCCCTGG 900
CCCCCGCCGG AAGGGGCCTT CGTGGGCTTT GTGCTTTCCC GCAAGGAGCC CATGTGGGCC 960
GATCTTCTGG CCCTGGCCGC CGCCAGGGGG GGCCGGGTCC ACCGGGCCCC CGAGCCTTAT 1020
AAAGCCCTCA GGGACCTGAA GGAGGCGCGG GGGCTTCTCG CCAAAGACCT GAGCGTTCTG 1080
GCCCTGAGGG AAGGCCTTGG CCTCCCGCCC GGCGACGACC CCATGCTCCT CGCCTACCTC 1140

```
CTGGACCCTT CCAACACCAC CCCCGAGGGG GTGGCCCGGC GCTACGGCGG GGAGTGGACG    1200
GAGGAGGCGG GGGAGCGGGC CGCCCTTTCC GAGAGGCTCT TCGCCAACCT GTGGGGGAGG    1260
CTTGAGGGGG AGGAGAGGCT CCTTTGGCTT TACCGGGAGG TGGAGAGGCC CCTTTCCGCT    1320
GTCCTGGCCC ACATGGAGGC CACGGGGGTG CGCCTGGACG TGGCCTATCT CAGGGCCTTG    1380
TCCCTGGAGG TGGCCGGGGA GATCGCCCGC CTCGAGGCCG AGGTCTTCCG CCTGGCCGGC    1440
CACCCCTTCA ACCTCAACTC CCGGGACCAG CTGGAAAGGG TCCTCTTTGA CGAGCTAGGG    1500
CTTCCCGCCA TCGGCAAGAC GGAGAAGACC GGCAAGCGCT CCACCAGCGC CGCCGTCCTG    1560
GAGGCCCTCC GCGAGGCCCA CCCCATCGTG GAGAAGATCC TGCAGTACCG GGAGCTCACC    1620
AAGCTGAAGA GCACCTACAT TGACCCCTTG CCGGACCTCA TCCACCCCAG GACGGGCCGC    1680
CTCCACACCC GCTTCAACCA GACGGCCACG GCCACGGGCA GGCTAAGTAG CTCCGATCCC    1740
AACCTCCAGA ACATCCCCGT CCGCACCCCG CTTGGGCAGA GGATCCGCCG GGCCTTCATC    1800
GCCGAGGAGG GGTGGCTATT GGTGGCCCTG GACTATAGCC AGATAGAGCT CAGGGTGCTG    1860
GCCCACCTCT CCGGCGACGA GAACCTGATC CGGGTCTTCC AGGAGGGGCG GGACATCCAC    1920
ACGGAGACCG CCAGCTGGAT GTTCGGCGTC CCCCGGGAGG CCGTGGACCC CCTGATGCGC    1980
CGGGCGGCCA AGACCATCAA CTTCGGGGTC CTCTACGGCA TGTCGGCCCA CCGCCTCTCC    2040
CAGGAGCTAG CCATCCCTTA CGAGGAGGCC CAGGCCTTCA TTGAGCGCTA CTTTCAGAGC    2100
TTCCCCAAGG TGCGGGCCTG GATTGAGAAG ACCCTGGAGG AGGGCAGGAG GCGGGGGTAC    2160
GTGGAGACCC TCTTCGGCCG CCGCCGCTAC GTGCCAGACC TAGAGGCCCG GGTGAAGAGC    2220
GTGCGGGAGG CGGCCGAGCG CATGGCCTTC AACATGCCCG TCCGGGGCAC CGCCGCCGAC    2280
CTCATGAAGC TGGCTATGGT GAAGCTCTTC CCCAGGCTGG AGGAAATGGG GGCCAGGATG    2340
CTCCTTCAGG TCCACGACGA GCTGGTCCTC GAGGCCCCAA AAGAGAGGGC GGAGGCCGTG    2400
GCCCGGCTGG CCAAGGAGGT CATGGAGGGG GTGTATCCCC TGGCCGTGCC CCTGGAGGTG    2460
GAGGTGGGGA TAGGGGAGGA CTGGCTCTCC GCCAAGGAGT GA                       2502
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 22

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 19 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 22
GATTTAGGTG ACACTATAG 19

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 23

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 72 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 23

CGGACGAACA AGCGAGACAG CGACACAGGT ACCACATGGT ACAAGAGGCA AGAGAGACGA 60

CACAGCAGAA AC 72

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 24

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 70 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 24

GTTTCTGCTG TGTCGTCTCT CTTGCCTCTT GTACCATGTG GTACCTGTGT CGCTGTCTCG 60

CTTGTTCGTC 70

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 25

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 20 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 25
GACGAACAAG CGAGACAGCG 20

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 26

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 24 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 26
GTTTCTGCTG TGTCGTCTCT CTTG 24

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 27

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 46 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 27
CCTCTTGTAC CATGTGGTAC CTGTGTCGCT GTCTCGCTTG TTCGTC 46

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 28

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 50 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 28
ACACAGGTAC CACATGGTAC AAGAGGCAAG AGAGACGACA CAGCAGAAAC 50

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 29

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 15 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: unbekannt

(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 29

Met	Ala	Ser	Met	Thr	Gly	Gly	Gln	Gln	Met	Gly	Arg	Ile	Asn	Ser
1				5					10					15

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 30

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 969 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 30

```
ATGGCTAGCA TGACTGGTGG ACAGCAAATG GGTCGGATCA ATTCGGGGAT GCTGCCCCTC     60
TTTGAGCCCA AGGGCCGGGT CCTCCTGGTG GACGGCCACC ACCTGGCCTA CCGCACCTTC    120
CACGCCCTGA AGGGCCTCAC CACCAGCCGG GGGGAGCCGG TGCAGGCGGT CTACGGCTTC    180
GCCAAGAGCC TCCTCAAGGC CCTCAAGGAG GACGGGGACG CGGTGATCGT GGTCTTTGAC    240
GCCAAGGCCC CCTCCTTCCG CCACGAGGCC TACGGGGGGT ACAAGGCGGG CCGGGCCCCC    300
ACGCCGGAGG ACTTTCCCCG GCAACTCGCC CTCATCAAGG AGCTGGTGGA CCTCCTGGGG    360
CTGGCGCGCC TCGAGGTCCC GGGCTACGAG GCGGACGACG TCCTGGCCAG CCTGGCCAAG    420
AAGGCGGAAA AGGAGGGCTA CGAGGTCCGC ATCCTCACCG CCGACAAAGA CCTTTACCAG    480
CTTCTTTCCG ACCGCATCCA CGTCCTCCAC CCCGAGGGGT ACCTCATCAC CCCGGCCTGG    540
CTTTGGGAAA AGTACGGCCT GAGGCCCGAC CAGTGGGCCG ACTACCGGGC CCTGACCGGG    600
GACGAGTCCG ACAACCTTCC CGGGGTCAAG GGCATCGGGG AGAAGACGGC GAGGAAGCTT    660
CTGGAGGAGT GGGGGAGCCT GGAAGCCCTC CTCAAGAACC TGGACCGGCT GAAGCCCGCC    720
ATCCGGGAGA AGATCCTGGC CCACATGGAC GATCTGAAGC TCTCCTGGGA CCTGGCCAAG    780

GTGCGCACCG ACCTGCCCCT GGAGGTGGAC TTCGCCAAAA GGCGGGAGCC CGACCGGGAG    840
AGGCTTAGGG CCTTTCTGGA GAGGCTTGAG TTTGGCAGCC TCCTCCACGA GTTCGGCCTT    900
GTGGAAAGCC CCAAGTCATG GAGGGGGTGT ATCCCCTGGC CGTGCCCCTG GAGGTGGAGG    960
TGGGGATAG                                                            969
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 31

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 948 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 31

```
ATGGCTAGCA TGACTGGTGG ACAGCAAATG GGTCGGATCA ATTCGGGGAT GCTGCCCCTC      60
TTTGAGCCCA AGGGCCGGGT CCTCCTGGTG GACGGCCACC ACCTGGCCTA CCGCACCTTC     120
CACGCCCTGA AGGGCCTCAC CACCAGCCGG GGGGAGCCGG TGCAGGCGGT CTACGGCTTC     180
GCCAAGAGCC TCCTCAAGGC CCTCAAGGAG GACGGGGACG CGGTGATCGT GGTCTTTGAC     240
GCCAAGGCCC CCTCCTTCCG CCACGAGGCC TACGGGGGGT ACAAGGCGGG CCGGGCCCCC     300
ACGCCGGAGG ACTTTCCCCG GCAACTCGCC CTCATCAAGG AGCTGGTGGA CCTCCTGGGG     360
CTGGCGCGCC TCGAGGTCCC GGGCTACGAG GCGGACGACG TCCTGGCCAG CCTGGCCAAG     420
AAGGCGGAAA AGGAGGGCTA CGAGGTCCGC ATCCTCACCG CCGACAAAGA CCTTTACCAG     480
CTTCTTTCCG ACCGCATCCA CGTCCTCCAC CCCGAGGGGT ACCTCATCAC CCCGGCCTGG     540
CTTTGGGAAA AGTACGGCCT GAGGCCCGAC CAGTGGGCCG ACTACCGGGC CCTGACCGGG     600
GACGAGTCCG ACAACCTTCC CGGGGTCAAG GGCATCGGGG AGAAGACGGC GAGGAAGCTT     660
CTGGAGGAGT GGGGGAGCCT GGAAGCCCTC CTCAAGAACC TGGACCGGCT GAAGCCCGCC     720
ATCCGGGAGA AGATCCTGGC CCACATGGAC GATCTGAAGC TCTCCTGGGA CCTGGCCAAG     780
GTGCGCACCG ACCTGCCCCT GGAGGTGGAC TTCGCCAAAA GGCGGGAGCC CGACCGGGAG     840
AGGCTTAGGG CCTTTCTGGA GAGGCTTGAG TTTGGCAGCC TCCTCCACGA GTTCGGCCTT     900
CTGGAAAGCC CCAAGGCCGC ACTCGAGCAC CACCACCACC ACCACTGA                  948
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 32

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 206 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 32

```
CGCCAGGGTT TTCCCAGTCA CGACGTTGTA AAACGACGGC CAGTGAATTG TAATACGACT      60
CACTATAGGG CGAATTCGAG CTCGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGTCGAC CTGCAGGCAT     120

GCAAGCTTGA GTATTCTATA GTGTCACCTA AATAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG     180
TTTCCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCT                                          206
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 33

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 43 Bäsenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 33
TTCTGGGTTC TCTGCTCTCT GGTCGCTGTC TCGCTTGTTC GTC 43

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 34

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 19 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 34
GCTGTCTCGC TTGTTCGTC 19

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 35

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 20 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr: 35
GACGAACAAG CGAGACAGCG 20

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 36

(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 24 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 36
TTCTGGGTTC TCTGCTCTCT GGTC 24

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 37

(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 43 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 37
GACGAACAAG CGAGACAGCG ACCAGAGAGC AGAGAACCCA GAA 43

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 38

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 23 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 38
ACCAGAGAGC AGAGAACCCA GAA 23

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 39

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 21 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 39
AACAGCTATG ACCATGATTA C 21

(2) Informationen für SEQ ID Nr.: 40
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 30 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: DNS (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 40
GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGCATGC 30

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit eines spezifischen Ziel-DNA-Moleküls, umfassend:
a) das Bereitstellen:
i) einer Zielnukleinsäure mit einer 3'-Region stromabwärts zu und angrenzend an eine 5'-Region;
ii) eines ersten Oligonukleotids, umfassend einen Anteil, der zu der 3'-Region der Zielnukleinsäure komplementär ist, und
iii) eines zweiten Oligonukleotids, umfassend einen 3'-Anteil und einen 5'-Anteil; wobei der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids zu der 5'-Region der Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids nicht komplementär zu der Zielnukleinsäure ist, wodurch ein einzelsträngiger Arm am 5'-Ende des zweiten Oligonukleotids bereitgestellt wird;
b) das Mischen der Zielnukleinsäure, des ersten Oligonukleotids und des zweiten Oligonukleotids unter Bedingungen, bei denen das erste Oligonukleotid und der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids an die Zielnukleinsäure binden, so dass eine erste Spaltungsstruktur geschaffen wird;
c) das Bereitstellen eines Spaltungsmittels unter Bedingungen, bei denen die Spaltung der ersten Spaltungsstruktur vorzugsweise an einer Stelle innerhalb des zweiten Oligonukleotids auf eine Art stattfindet, die abhängig ist von der Bindung des ersten und zweiten Oligonukleotids an die Zielnukleinsäure, wobei der einzelsträngige Arm des zweiten Oligonukleotids, ein drittes Oligonukleotid erzeugend, freigegeben wird;
d) das Bereitstellen einer ersten Haarnadelstruktur mit einem einzelsträngigen 3'-Arm und einen einzelsträngigen 5'-Arm unter Bedingungen, bei denen das dritte Oligonukleotid an den einzelsträngigen 3'-Arm der ersten Haarnadelstruktur bindet, wobei eine zweite Spaltungsstruktur gebildet wird;
e) das Bereitstellen von Bedingungen, bei denen die Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur durch das Spaltungsmittel auf eine von der Bindung des dritten Oligonukleotids abhängige Art stattfindet, wobei der einzelsträngige 5'-Arm der zweiten Spaltungsstruktur freigegeben wird um Reaktionsprodukte, umfassend ein viertes Oligonukleotid und ein erstes gespaltenes Haarnadeldetektionsmolekül, zu bilden, und
f) das Nachweisen der Anwesenheit des vierten Oligonukleotids oder des ersten gespaltenen Haarnadeldetektionsmoleküls.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Spaltung in Schritt c) innerhalb des hybridisierten Anteils des

zweiten Oligonukleotids stattfindet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, des Weiteren umfassend nach Schritt e):
i) das Bereitstellen einer zweiten Haarnadelstruktur mit einem einzelsträngigen 3'-Arm und einem einzelsträngigen 5'-Arm unter Bedingungen, bei denen das vierte Oligonukleotid an den 3'-Arm der zweiten Haarnadel bindet, wobei eine dritte Spaltungsstruktur gebildet wird; und
ii) das Bereitstellen von Bedingungen, bei denen die Spaltung der dritten Spaltungsstruktur durch das Spaltungsmittel auf eine Art abhängig von der Bindung des vierten Oligonukleotids stattfindet, wobei der einzelsträngige 5'-Arm der dritten Spaltungsstruktur freigegeben wird um Reaktionsprodukte, umfassend ein fünftes Oligonukleotid, das in der Sequenz identisch zu dem dritten Oligonukleotid ist, und ein zweites gespaltenes Haarnadeldetektionsmolekül zu bilden; und wobei Schritt f) des Weiteren den Nachweis der Anwesenheit irgendeines der ersten oder zweiten gespaltenen Haarnadeldetektionsmoleküle umfasst.

4. Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit eines spezifischen Zielnukleinsäuremoleküls, umfassend:
a) das Bereitstellen:
i) eines Spaltungsmittels;
ii) einer Zielnukleinsäure mit einer 3'-Region stromabwärts zu und angrenzend an eine 5'-Region;
iii) eines ersten Oligonukleotids, umfassend einen Anteil, der zu der 3'-Region der Zielnukleinsäure komplementär ist;
iv) einer erste feste Unterlage mit einem zweiten Oligonukleotid, umfassend einen 3'-Anteil und einen 5'-Anteil, wobei der 3'-Anteil des zweiten Oligonukleotids zu der 5'-Region der Zielnukleinsäure komplementär ist, und wobei der 5'-Anteil des zweiten Oligonukleotids nicht komplementär zu der Zielnukleinsäure ist, wodurch ein einzelsträngiger Arm am 5'-Ende des zweiten Oligonukleotids bereitgestellt wird und ein Teil des 5'-Arms umfasst ein erstes Signaloligonukleotid;
v) einer Vielzahl an zweiten festen Unterlagen, von denen jede ein ungespaltenes drittes Oligonukleotid, umfassend einen 3'-Anteil und einen 5'-Anteil, wobei der 3'-Anteil des dritten Oligonukleotids zu dem ersten Signaloligonukleotid komplementär ist, aufweist, und wobei der 5'-Anteil des dritten Oligonukleotids nicht komplementär zu dem Signaloligo ist, wodurch ein einzelsträngiger Arm an dem 5'-Ende des dritten Oligonukleotids bereitgestellt wird und ein Teil des 5'-Arms des dritten Oligonukleotids umfasst ein zweites Signaloligonukleotid; und
vi) einer Vielzahl an dritten festen Unterlagen, von denen jede ein ungespaltenes viertes Oligonukleotid, umfassend einen 3'-Anteil und einen 5'-Anteil, wobei der 3'-Anteil des vierten Oligonukleotids zu dem zweiten Signaloligonukleotid komplementär ist, aufweist, und wobei der 5'-Anteil des dritten Oligonukleotids nicht komplementär zu dem Signaloligonukleotid ist, wodurch ein einzelsträngiger Arm an dem 5'-Ende des vierten Oligonukleotids bereitgestellt wird und ein Teil des 5'-Arms das erste Signaloligonukleotid umfasst;
b) das Mischen des Spaltungsmittels, der Zielnukleinsäure, des ersten Oligonukleotids und des zweiten Oligonukleotids unter Bedingungen, bei denen das erste Oligonukleotid und das 3'-Ende des zweiten Oligonukleotids an die Ziel-DNA-Sequenz binden, so dass eine erste Spaltungsstruktur geschaffen wird und die Spaltung der ersten Spaltungsstruktur zur Freigabe des ersten Signaloligonukleotids führt;
c) das Reagieren des freigegebenen ersten Signaloligonukleotids mit einem der vielzähligen zweiten festen Unterlagen unter solchen Bedingungen, dass das erste Signaloligonukleotid mit der komplementären Region des dritten Oligonukleotids hybridisiert um eine zweite Spaltungsstruktur zu bilden und die Spaltung der zweiten Spaltungsstruktur zu der Freigabe des zweiten Signaloligonukleotids und eines gespaltenen dritten Oligonukleotids führt;
d) das Reagieren des freigegebenen zweiten Signaloligonukleotids mit einem der vielzähligen dritten festen Unterlagen unter solchen Bedingungen, dass das zweite Signaloligonukleotid mit der komplementären Region des vierten Oligonukleotids hybridisiert um eine dritte Spaltungsstruktur zu bilden und die Spaltung der dritten Spaltungsstruktur zu der Freigabe eines zweiten Moleküls des ersten Signaloligonukleotids und eines gespaltenen vierten Oligonukleotids führt;
e) das Nachweisen der Anwesenheit irgendeines der ersten oder zweiten Signaloligonukleotide.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Spaltung in den Schritten c) und d) innerhalb des hybridisierten Anteils des dritten Oligonukleotids und des vierten Oligonukleotids entsprechend stattfindet.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 4, wobei die Spaltungsreaktion in Abwesenheit jeglicher signifikanter Polymeraseaktivität stattfindet.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 4, wobei das Spaltungsmittel eine thermostabile DNA-Polymerase mit einer 5'-Nukleaseaktivität aufweist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die thermostabile DNA-Polymerase von einem Organismus stammt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Thermus aquaticus, Thermus flavus und Thermus thermophilus.

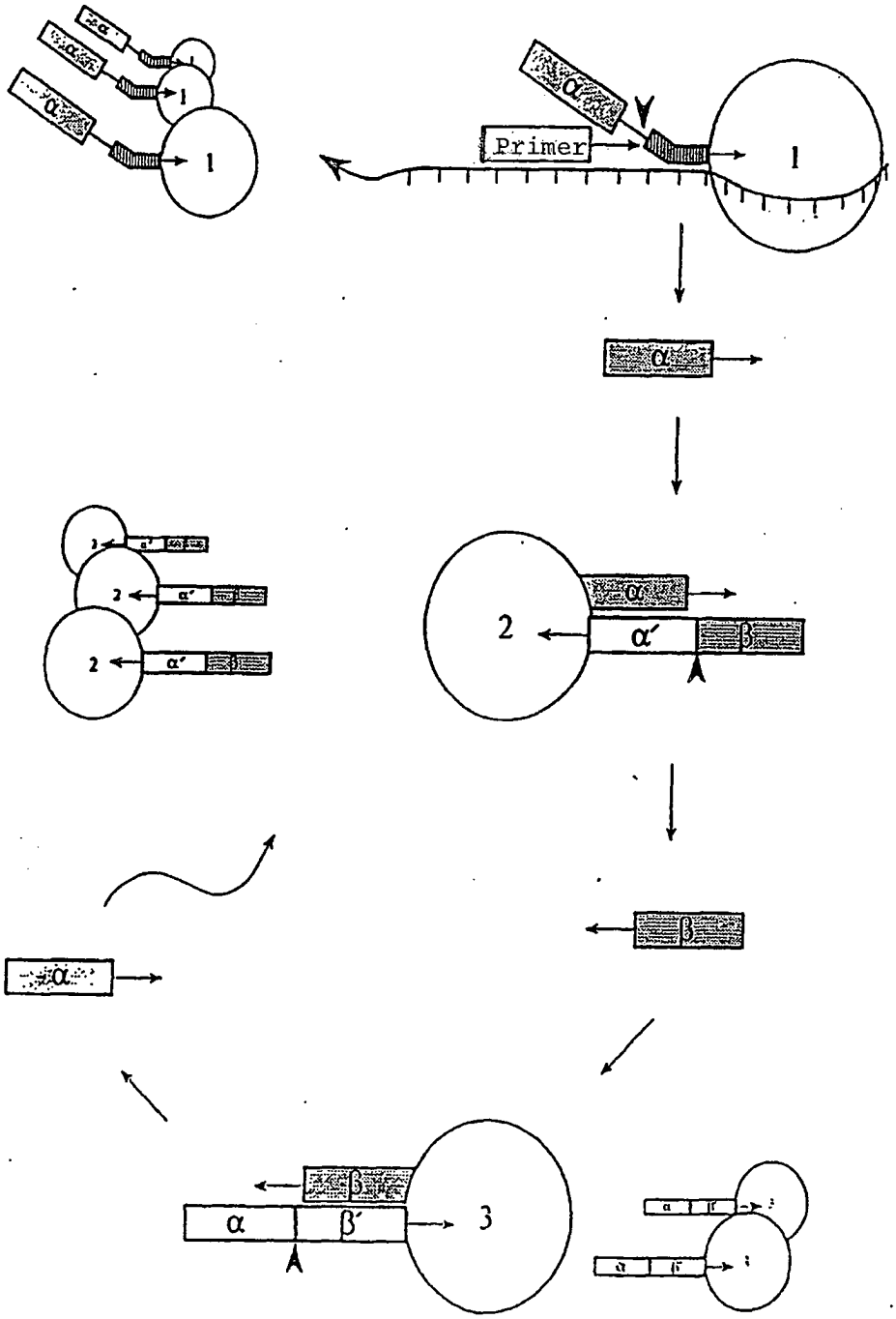
9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die thermostabile DNA-Polymerase derartig geändert wurde, dass sie eine reduzierte Syntheseaktivität gegenüber der nativen DNA-Polymerase aufweist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die thermostabile DNA-Polymerase durch eine DNA-Sequenz kodiert wird, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOS: 11, 30 und 31.

Es folgen 43 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1 A



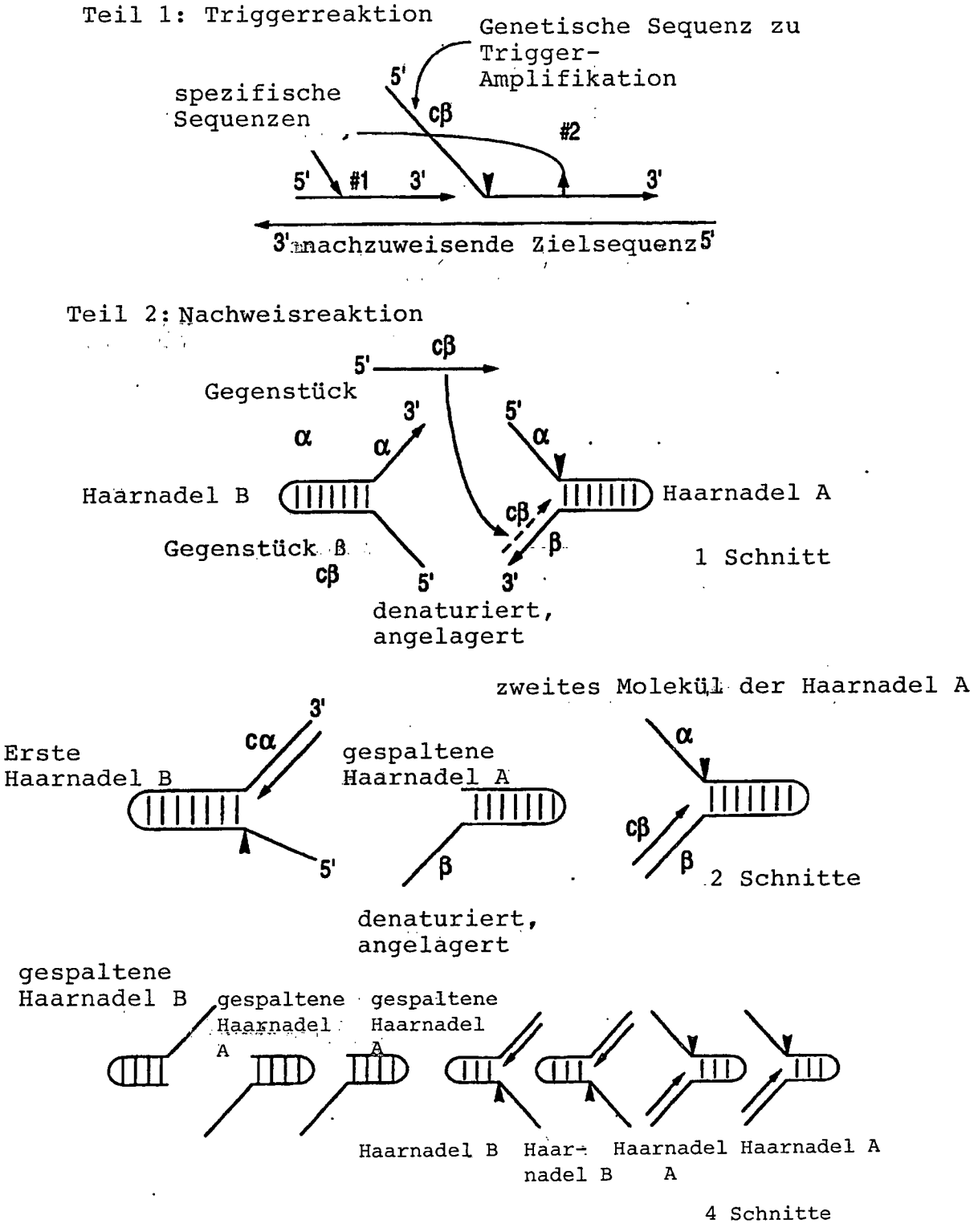

Teil 1: Triggerreaktion
Genetische Sequenz zu Trigger-Amplifikation
spezifische Sequenzen
5'
cβ
#2
5'
#1
3'
3'
3'
nachzuweisende Zielsequenz
5'
Teil 2: Nachweisreaktion
cβ
5'
Gegenstück
3'
α
α
5'
α
Haarnadel B
Haarnadel A
cβ
β
Gegenstück ß
cβ
5'
3'
1 Schnitt
denaturiert, angelagert
zweites Molekül der Haarnadel A
3'
cα
Erste Haarnadel B
5'
gespaltene Haarnadel A
β
α
cβ
β
2 Schnitte
denaturiert, angelagert
gespaltene Haarnadel B
gespaltene Haarnadel A
gespaltene Haarnadel A
Haarnadel B
Haar-nadel B
Haarnadel A
Haarnadel A
4 Schnitte

FIG. 1B

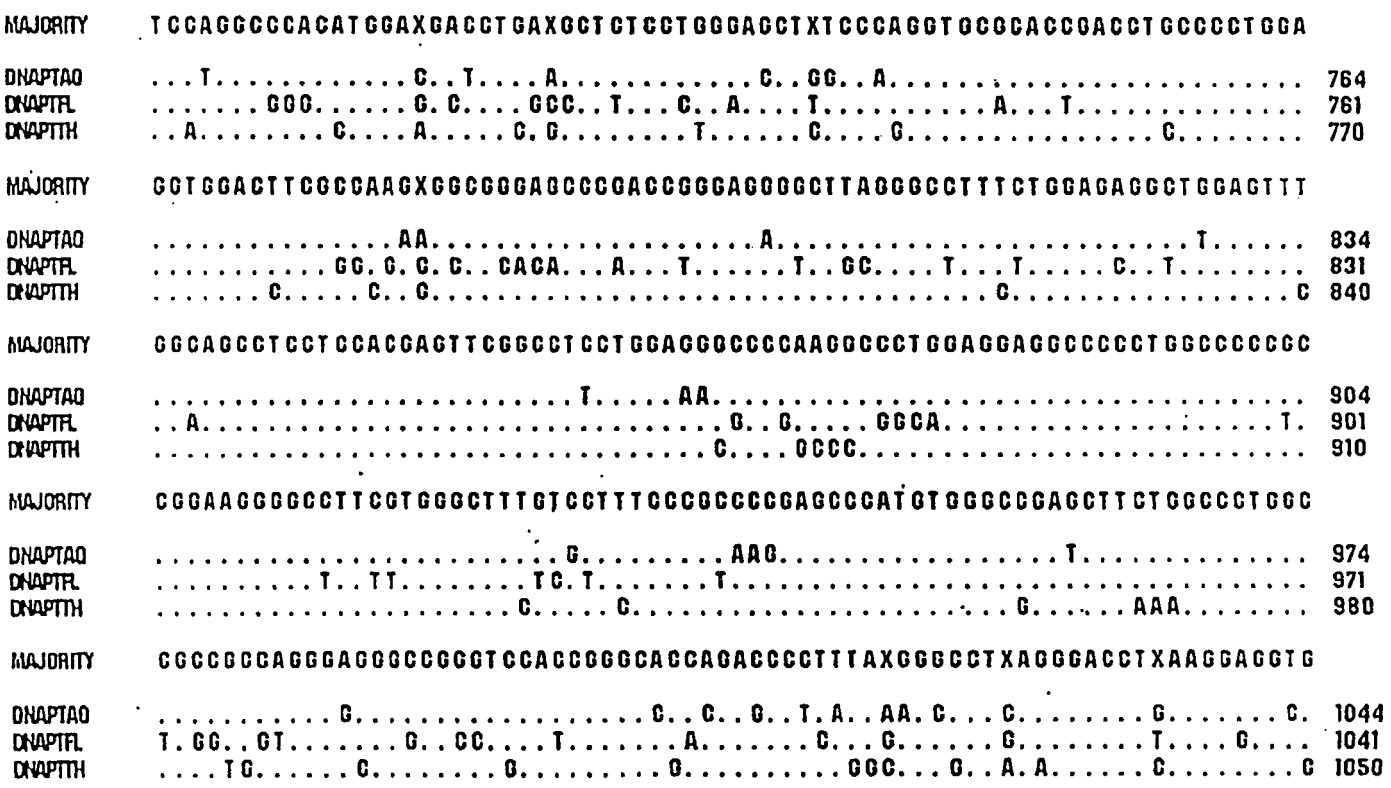
FIG. 2A


MAJORITY ATGXXGGCGATGCTTCCCCTCTTTGAGCCCAAAGGCCGGGTCCTCCTGGTGGACGGCCACCACCTGGCCT
DNAPTAQ ...AG..C.....G.....G..... 70
DNAPTFL .....C..G..... 67
DNAPTTH ...GA.....G.....A..... 70
MAJORITY ACCGCACCTTCTTCGCCCTGAAGGCCTCACCACCAGCCGGGGCGAACCGGTGCAGGCGGTCTACGGCTT
DNAPTAQ .....CA.....G..G..... 140
DNAPTFL .....T.....C.....C.....C..T..... 137
DNAPTTH .....G..... 140
MAJORITY CCCCAAGAGCCTCCTCAAGCCCCTGAAGGAGGACGGGGACXXGGCGGTGXTCGTGGTCTTTGACGCCAAG
DNAPTAQ .....C.....A..... 207
DNAPTFL .....A.....GT..T..... 204
DNAPTTH .....T..AA...C..CT..... 210
MAJORITY GCCCCCTCCTTCCGCCACGAGGCCTACGAGGCCTACAAGGCGGGCCGGCCCCCCACCCCGGAGGACTTTC
DNAPTAQ .....G..GC.....G..... 277
DNAPTFL 274
DNAPTTH .....GA.....G.....C.....C. 280
MAJORITY CCCGGCAGCTCGCCCTCATCAAGGAGCTGGTGGACCTCCTGGGGCTTGCGCGCCTCGAGGTCCCCGGCTA
DNAPTAQ .....A.....G.....G..... 347
DNAPTFL .....G.....T.....A..C....T...G..G.....T.....T 344
DNAPTTH .....T..A.C..... 350

FIG. 2B

```
MAJORITY   CGAGGCGGACGACGTXCTGGCCACCCTGGCCAAGAAGGCGGAAAAGGAGGGGTACGAGGTGCGCATCCTC

DNAPTAQ    ................C.......G.............................C........C.........  417
DNAPTFL    T...............G...................CG.................................  414
DNAPTTH    ................T..C.................................................  420

MAJORITY   ACCGCCGACCGCGACCTCTACCAGCTCCTTTCCGACCGCATCGCCGTCCTCCACCCCGAGGGGTACCTCA

DNAPTAQ    .........AAA.....T.........................CA...........................  487
DNAPTFL    ..T.............................G..G.........A..........T...........G.  484
DNAPTTH    .......................A...G.C.........G.......................CC......  490

MAJORITY   TCACCCCGGCGTGGCTTTGGGAGAAGTACGGCCTGAGGCCGGAGCAGTGGGTGGACTACCGGGCCCTGGC

DNAPTAQ    ..........C...........A.................C..C.......CC................A.  557
DNAPTFL    ...................AC...............C.C.................................  554
DNAPTTH    .........A.........................C.......................T...C.....C.T  560

MAJORITY   GGGGGACCCCTCCGACAACCTCCCCGGGGTCAAGGGCATCGGGGAGAAGACCGCCCXGAAGCTCCTCXAG

DNAPTAQ    C......GAG...........T.............................G..GAG......T..GG..  627
DNAPTFL    ............G..T...A..........G.........................A..G....A..CGC  624
DNAPTTH    ..................................................................TC.........A..  630

MAJORITY   GAGTGGGGGAGCCTGGAAAACCTCCTCAAGAACCTGGACCGGGTGAAGCCCGC---CXTCCGGGAGAAGA

DNAPTAQ    ...................GC.......................C.............A............  694
DNAPTFL    .........................T..C..C.........A..........T.....T.G.........C  691
DNAPTTH    ........A.................................A.....A.AAAA.G............  700
```

FIG. 2C



DE 694 35 030 T2 2008.06.12

FIG. 2D

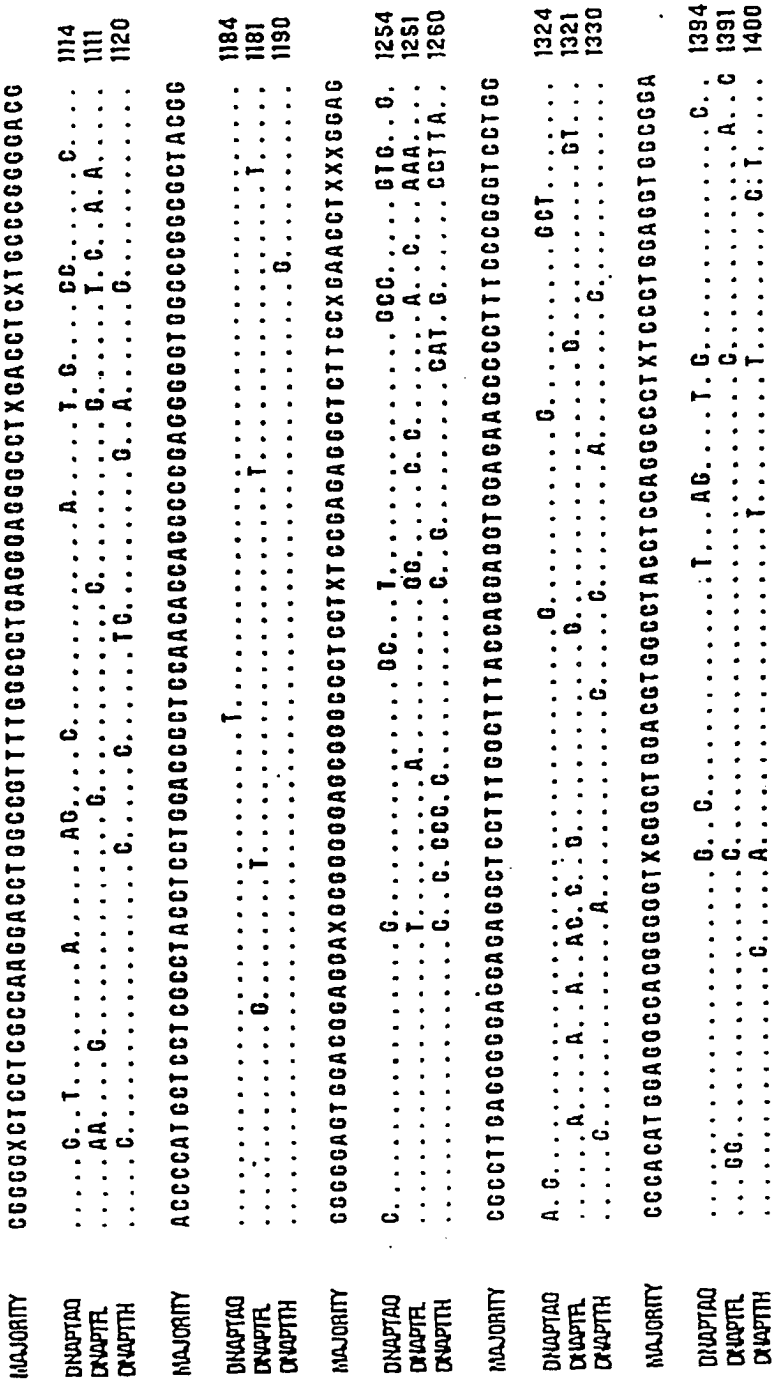

MAJORITY
DNAPTAQ
DNAPTFL
DNAPTTH
1114
1111
1120
1184
1181
1190
1254
1251
1260
1324
1321
1330
1394
1391
1400

FIG. 2E


MAJORITY GGAGATCCGCCGCCTCGAGGAGGAGGTCTTCCGCCTGGCCGGCCACCCCTTCAACCTCAACTCCCGGGAC
DNAPTAQ ..... GC..... CC..... 1464
DNAPTRL ....G.G....AC..G..... C... 1461
DNAPTTH ..... T....G..... 1470
MAJORITY CAGCTGGAAAGGGTGCTCTTTGACGAGCTXGGGCTTCCCGCCATCGGCAAGACGGAGAAGACXGGCAAGC
DNAPTAQ ..... C..... A..... C..... 1534
DNAPTRL ..... GC..... G..C..G..T..... G..G..A. 1531
DNAPTTH ..... TA..... T.G..G..... C.A..... A..... 1540
MAJORITY GCTCCACCAGCGCCGCCGTGCTGGAGGCCCTXCGXGAGGCCCACCCCATCGTGGAGAAGATCCTGCAGTA
DNAPTAQ ..... C..... C..C..... 1604
DNAPTRL .....T..... G..A..... CCGC..... 1601
DNAPTTH .....G..... A..G..... C...C. 1610
MAJORITY CCGGGAGCTCACCAAGCTCAAGAACACCTACATXGACCCCCTGCCXGXCCTCGTCCACCCCAGGACGGGC
DNAPTAQ .....G....G.....T.....T....G.A....A..... 1674
DNAPTRL .....A.....C.C...G.....A...C... 1671
DNAPTTH .....G.G.....C..AAG.....G..... 1680
MAJORITY CGCCTCCACACCCGCTTCAACCAGACGGCCACGGCCACGGGCAGGCTTAGTAGCTCCGACCCCAACCTGC
DNAPTAQ .....A.....T.....C. 1744
DNAPTRL ..G.....C.....TCC..... 1741
DNAPTTH .....G..... 1750

FIG. 2F

```
MAJORITY   AGAACATCCCCGTCCGCACCCCXCTGGGCCAGAGGATCCGCCGGGCCTTCGTGGCCGAGGAGGGXTGGGT

DNAPTAQ    .......................G..T..G.......................A.C...........G...C.  1814
DNAPTFL    ..............G........T.........C.C........A.....................C.....  1811
DNAPTTH    .......................CT.................................C...T....C  1820

MAJORITY   GTTCGTGGCCCTGGACTATAGCCAGATAGAGCTCCGGGTCCTGGCCCACCTCTCCGGGGACCAGAACCTG

DNAPTAQ    A...............................A....G.................C............  1884
DNAPTFL    .C......T.T.......C........T.....T.................................  1881
DNAPTTH    ...............................C.....C.....................A......  1890

MAJORITY   ATCCGGGTCTTCCAGGAGGGGAGGGACATCCACACCCAGACCGCCAGCTGGATGTTCGGCGTCCCCCCGG

DNAPTAQ    .......................C.............GG...............................G..  1954
DNAPTFL    ...........T.......................................................TT....C.  1951
DNAPTTH    ...A...................A.....................A.........................  1960

MAJORITY   AGGCCGTGGACCCCCTGATGCGCCGGGCGGCCAAGACCATCAACTTCGGGGTCCTCTACGGCATGTCCGC

DNAPTAQ    ...............................................................G..  2024
DNAPTFL    .A.GG..A.....T.....................................G.................  2021
DNAPTTH    ...................................GG.G........C.....................  2030

MAJORITY   CCACCGCCTCTCCCAGGAGCTTGCCATCCCCTACGAGGAGGCGGTGGCCTTCATTGAGCGCTACTTCCAG

DNAPTAQ    .......................A........T...........CCA.....................T...  2094
DNAPTFL    ..............GG.......T.......................................  2091
DNAPTTH    ...TA.G.............................................T..A..............A  2100
```

FIG. 2G

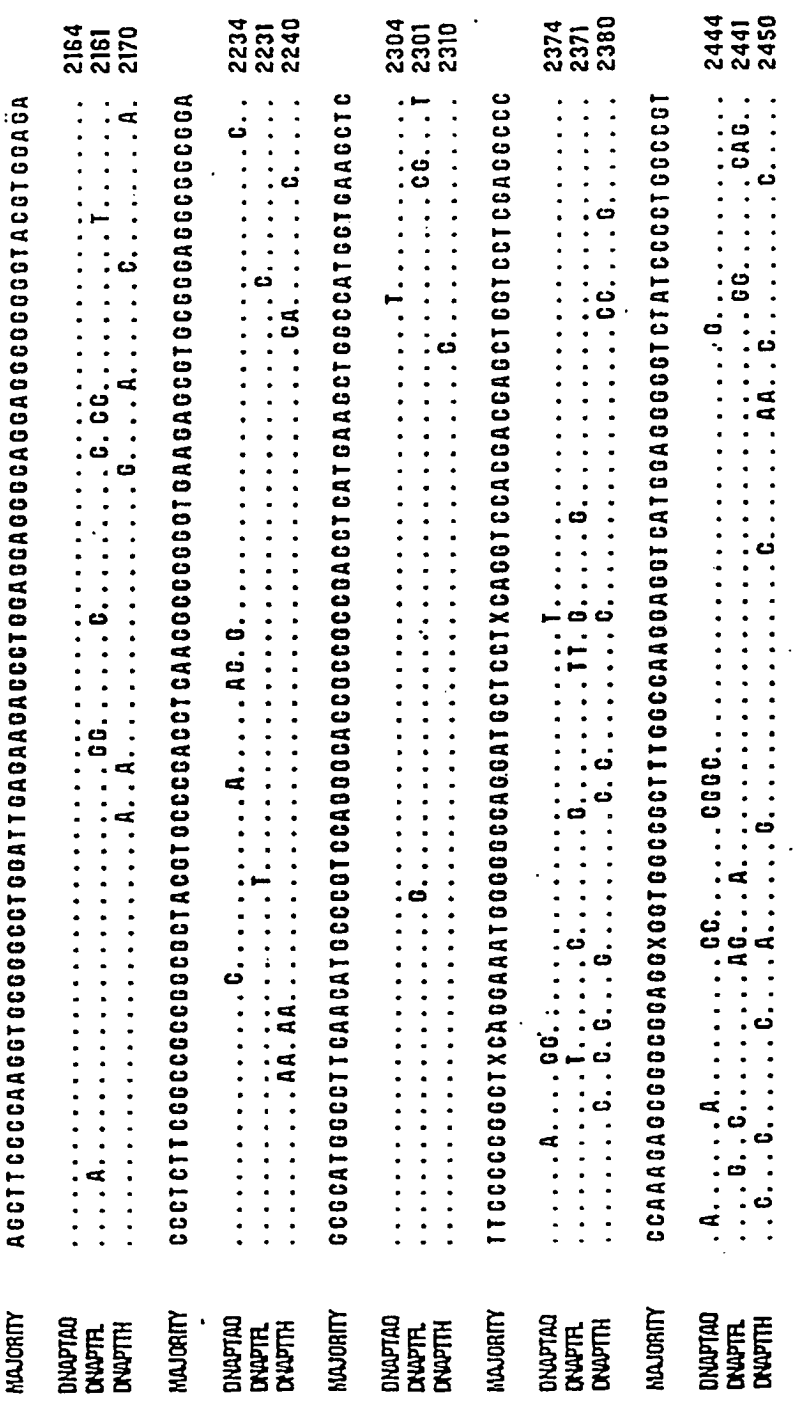

MAJORITY AGCTTCCCCAAGGTGCGGGCCTGGATTGAGAAGACCCTGGAGGAGGCAGGAGGCGGGGGTACGTGGAGA
DNAPTAQ 2164
DNAPTFL 2161
DNAPTTH 2170
MAJORITY CCCTCTTCGGCCGCGGCGCTACGTGCCCGACCTCAACGCCCGCGTGAAGAGCGTGCGGGAGGCGGCGGA
DNAPTAQ 2234
DNAPTFL 2231
DNAPTTH 2240
MAJORITY GCGCATGGCCTTCAACATGCCCGTCCAGGGCACCGCCGACCTCATGAAGCTGGCCATGGTCGAAGCTC
DNAPTAQ 2304
DNAPTFL 2301
DNAPTTH 2310
MAJORITY TTCCCCGCGCTXCAGGAAATGGGGGCCAGGATGCTCCTXCAGGTCCACGACGAGCTCGTCCTCGAGGCCC
DNAPTAQ 2374
DNAPTFL 2371
DNAPTTH 2380
MAJORITY CCAAAGAGCGGCGCGAGGXGGTGGCGCTTTGGCCAAGGAGGTCATGGAGGGGGTCTATCCCCTGCCCGT
DNAPTAQ 2444
DNAPTFL 2441
DNAPTTH 2450

FIG. 2H

```
MAJORITY   GCCCCTGGAGGTGGAGGTGGGGATGGGGGAGGACTGGCTCTCCGCCAAGGAGTAG

DNAPTAQ    ........................A.............................GA    2499
DNAPTFL    ......................CC.................................    2496
DNAPTTH    ........................................T..........GT...    2505
```

FIG. 3A


MAJORITY MXAML PLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEPVQAVYGFAKSLLKALKEDG· DAVXVVFDAK
TAQ PRO . RG. . . . . H. . . . . I. 69
TFL PRO . · . . . . . V. V. 68
TTH PRO . E. . . . . YK. . F. 70
MAJORITY APSFRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLXRLEVPGYEADDVLATLAKKAEKEGYEVRIL
TAQ PRO . . . . . GG. . . . . A. . . . . S. 139
TFL PRO . . . . . V. . . . . F. . . . . R. 138
TTH PRO . . . . . FT. 140
MAJORITY TADRDLYQLLSDRIAVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRPEQWVDYRALXGDPSDNLPGVKGIGEKTAXKLLX
TAQ PRO . . . K. . . . . H. . . . . D. . A. . . . . T. . E. . . . . R. . . E 209
TFL PRO . . . . . E. . . I. . . . . Y. . . . . A. . . . . I. . . . . QR. I R 208
TTH PRO . . . . . V. . . V. . . . . H. . . . E. . . . . F. . . V. . . . . L. . . K 210
MAJORITY EWGSLENLLKNLDRVKP· XXREKIXAHMEDLXLSXXLSXVRTDLPLEVDFAXRREPDREGLRAFLERLEF
TAQ PRO . . . . . A. . . . . L. . · AI. . . . L. . . D. . K. . WD. AK. . . . . K. . . . . R. 278
TFL PRO . . . . . FQH. . Q. . . · SL. . . LQ. G. . A. A. . RK. . Q. H. . . . . GR. . T. NL. 277
TTH PRO . . . . . ENV. . . . K. . L. . . R. . LE. . R. . . . . L. QG. 280
MAJORITY GSLLHEFGLLEXPKALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRPEPMWAELLALAAARXGRVHRAXDPLXGLRDLKEV
TAQ PRO . . . . . S. . . . . K. . . . . D. . . . . G. . . . . PE. YKA. . . . . A 348
TFL PRO . . . . . G. . . A. . . . . L. . SF. . . . . G. WE. . L. . . Q. . . R. . . . . G. 347
TTH PRO . . . . . A. AP. . . . . K. . . . C. D. . . . . A. . . A. . K. 350

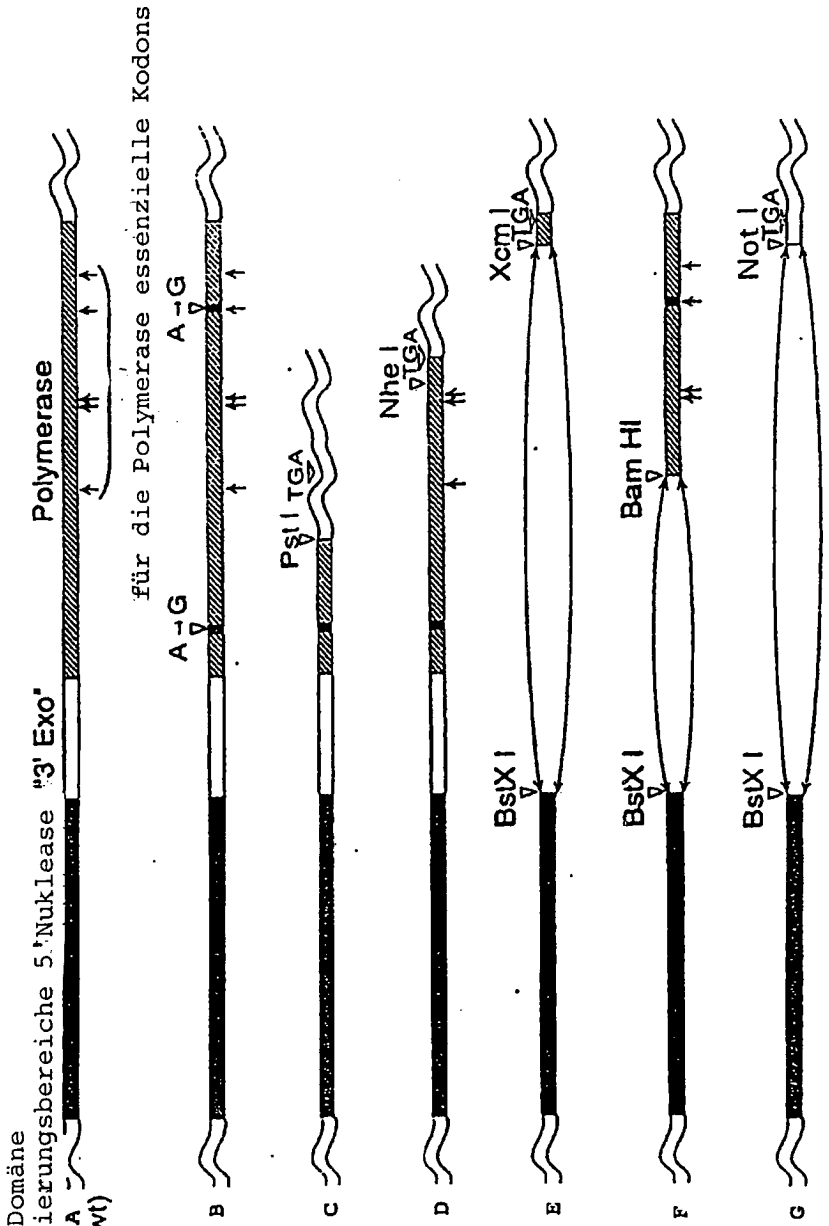
FIG. 3B

```
MAJORITY   RGLLAKDLAVLALREGLDLXPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEDAGERALLSERLFXNLXX

TAQ PRO    ........S........G.P.................................E.....A......A..WG  418
TFL PRO    ..I................F.E.................................A....QT.KE  417
TTH PRO    ............S......V.................................AH........HR..LK  420

MAJORITY   RLEGEERLLWLYXEVEKPLSRVLAHMEATGVRLDVAYLQALSLEVAEEIRRLEEEVFRLAGHPFNLNSRD

TAQ PRO    ............R...R...A.................R..........A...A...............  488
TFL PRO    ..K.........E...........R.....................EA.V.Q...................  487
TTH PRO    ......K.....H.............................L.........................  490

MAJORITY   QLERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKNTYIDPLPXLVHPRTG

TAQ PRO    ...................................................S.......D.I.....  558
TFL PRO    ...................................DR...................A....K..  557
TTH PRO    ..........R...L...Q.........................H..........V....S.......  560

MAJORITY   RLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFVAEEGWXLVALDYSQIELRVLAHLSGDENL

TAQ PRO    ........................................I.....L........................  628
TFL PRO    ...........................................V..V.......................  627
TTH PRO    ..........................................A..A........................  630

MAJORITY   IRVFQEGRDIHTQTASWMFGVPPEAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPYEEAVAFIERYFQ

TAQ PRO    ............E.........R.......................................Q........  698
TFL PRO    ....................S..G.........................G..S...............  697
TTH PRO    .......K.............................V.................................  700
```

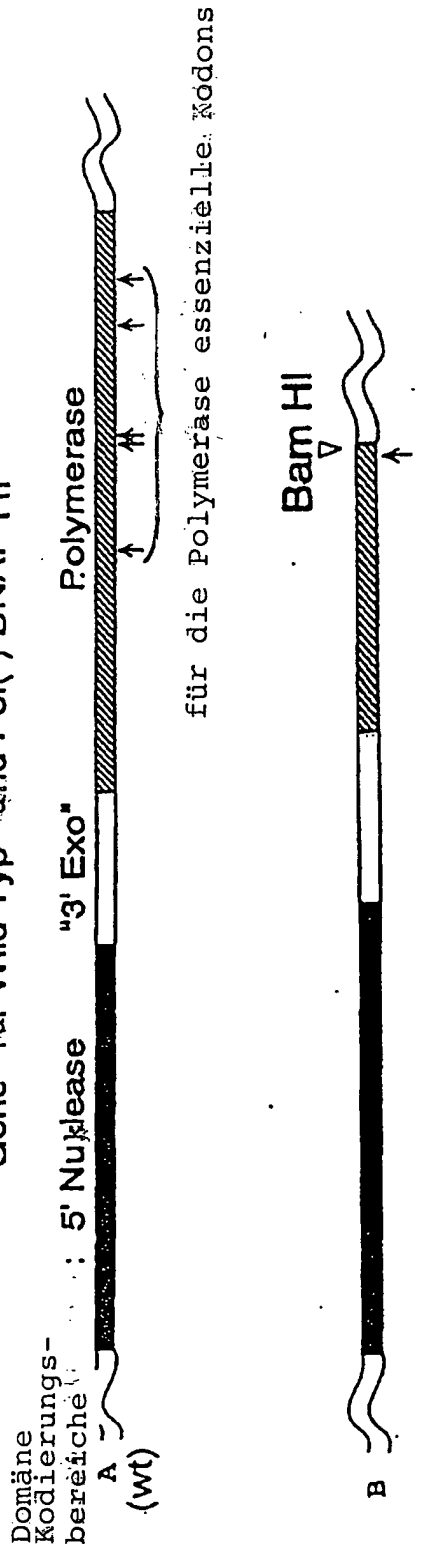
FIG. 3C

```
MAJORITY   SFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLNARVKSVREAAERMAFNMPVQGTAADLMKLAMVKL

TAQ PRO    ..................................E.................................... 768
TFL PRO    .Y........G.......................................................R.. 767
TTH PRO    ................K.................................................... 770

MAJORITY   FPRLXEMGARMLLQVHDELVLEAPKXRAEXVAALAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGXGEDWLSAKEX

TAQ PRO    ....E...................E...A..R.....................I.........      833
TFL PRO    ....Q.L..................D...R............W..Q........L.........      831
TTH PRO    ....R..............L....QA...E.......A..KA............M........G      835
```

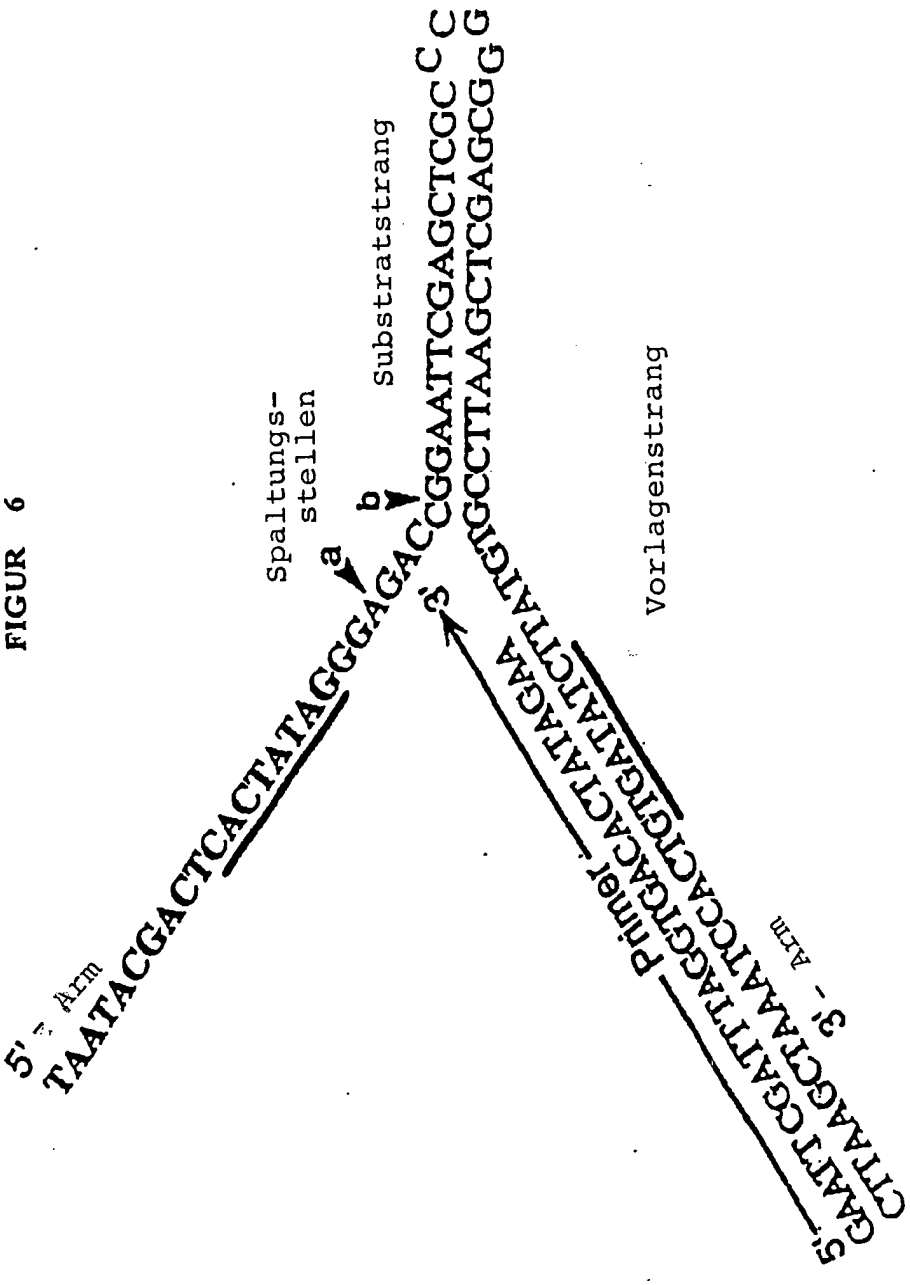
FIGUR 4


Domäne
Kodierungsbereiche 5'Nuklease "3' Exo" Polymerase
für die Polymerase essenzielle Kodons
A (wt)
B
C
D
E
F
G
A→G
A→G
Pst I TGA
Nhe I TGA
Xcm I TGA
Bam HI
Not I TGA
BstX I
BstX I
BstX I

FIGUR 5


Gene für Wild-Typ und Pol(-) DNAPTH
Domäne
Kodierungs-
bereiche
5' Nuklease
"3' Exo"
Polymerase
für die Polymerase essenzielle Kodons
Bam HI
A
(wt)
B

FIGUR 6


5' - Arm
TAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGAATTCGAGCTCGC C C
CTTAAGCTAAATCCACTGTGATATCTTATGTGCCTTAAGCTCGAGCGG G
Spaltungs-
stellen
a
b
Substratstrang
3'
Vorlagenstrang
Primer
5'
GAATTCGATTTAGGTGACACTATAGAA
CTTAAGCTAAATCCACTGTGATATCTTATGTGCCTTAAGCTCGAGCGG G
3' - Arm

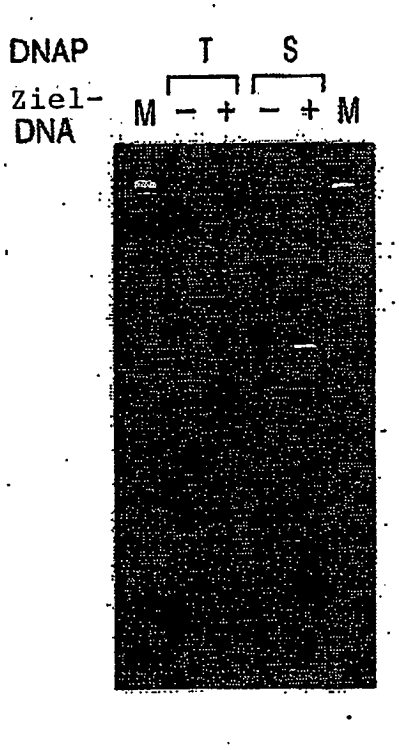


FIG. 7

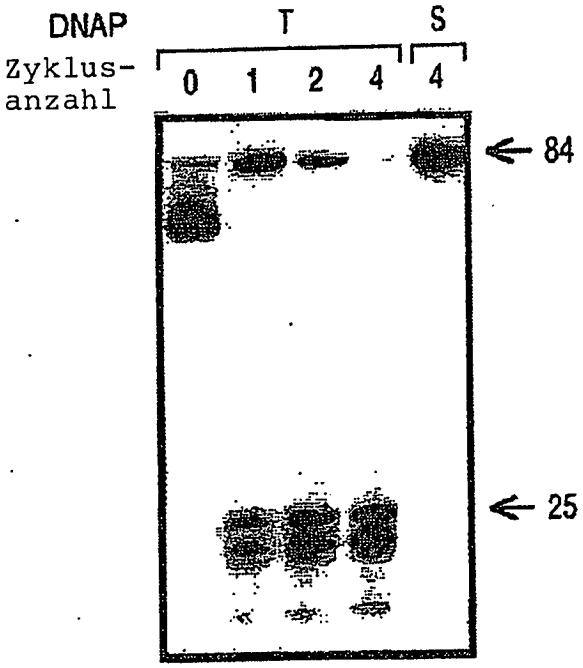


FIG. 8

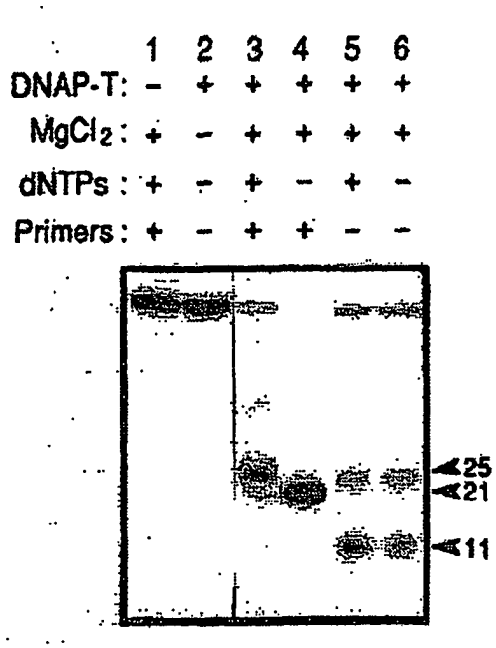


FIG. 9A

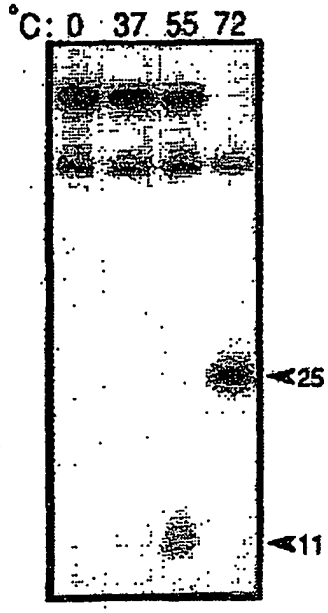


FIG. 9B

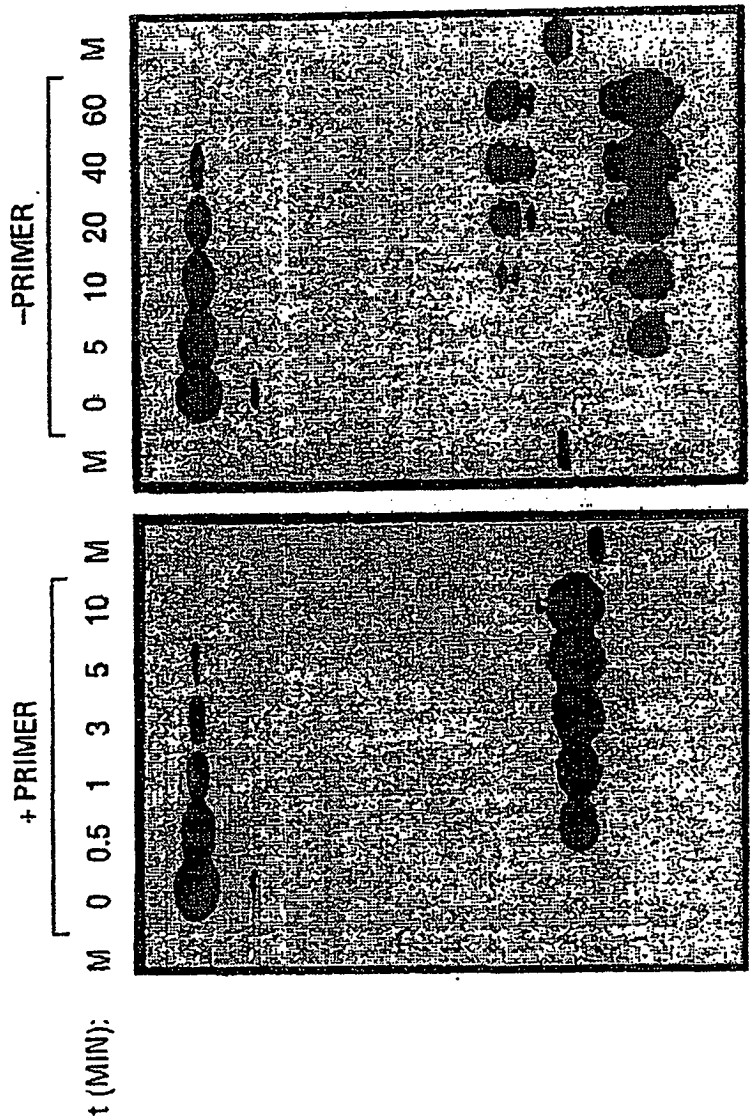


FIG. 10A

FIG. 10B

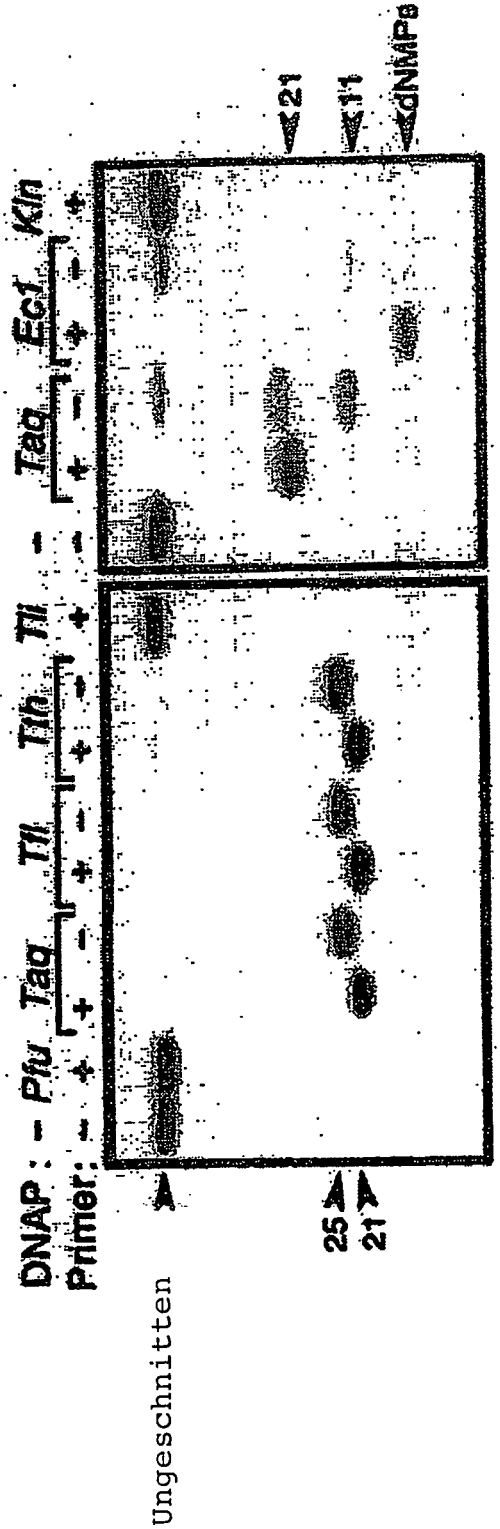


FIG. 11A

FIG. 11B

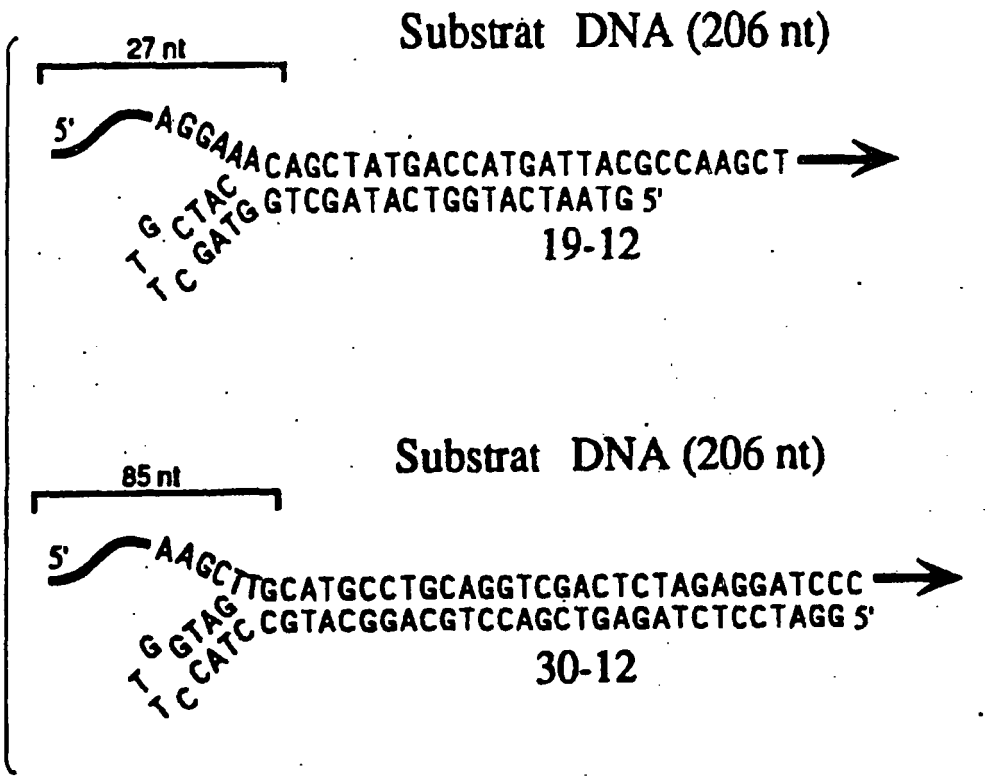


FIG. 12A

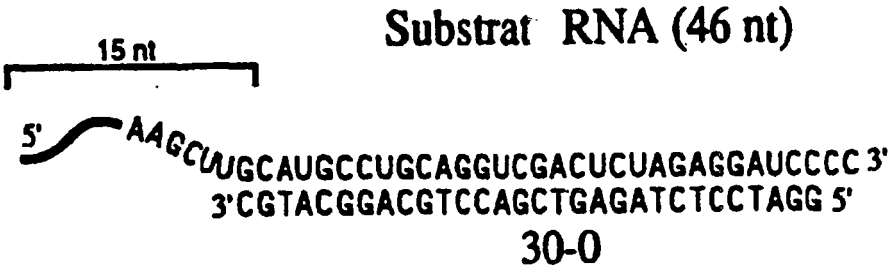


FIG. 13A

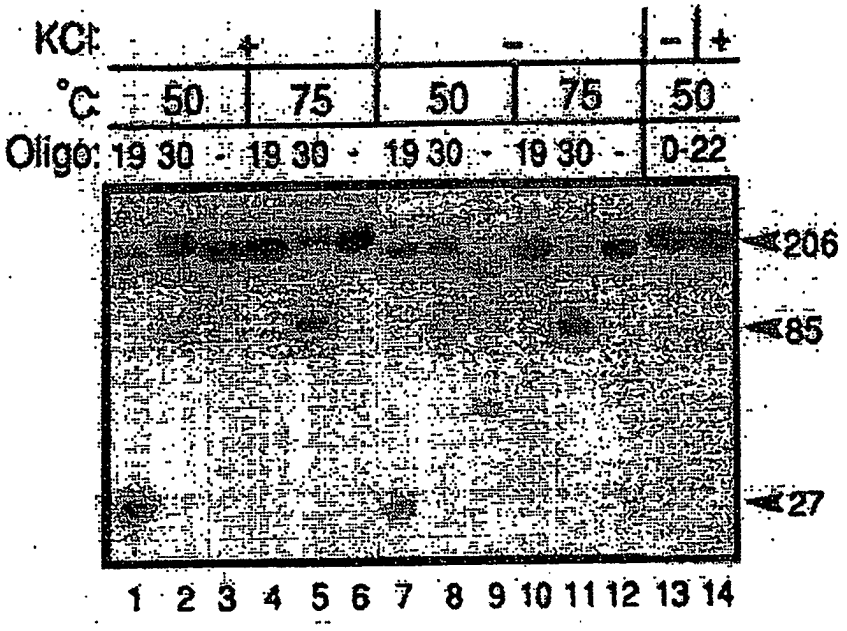


FIG. 12B

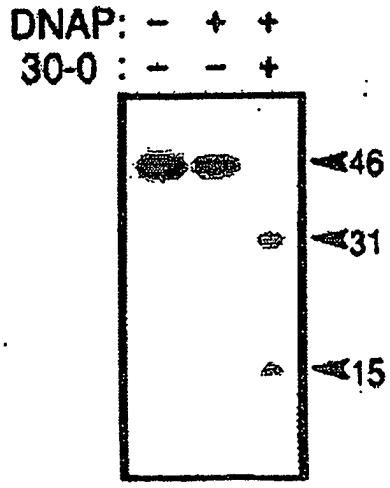
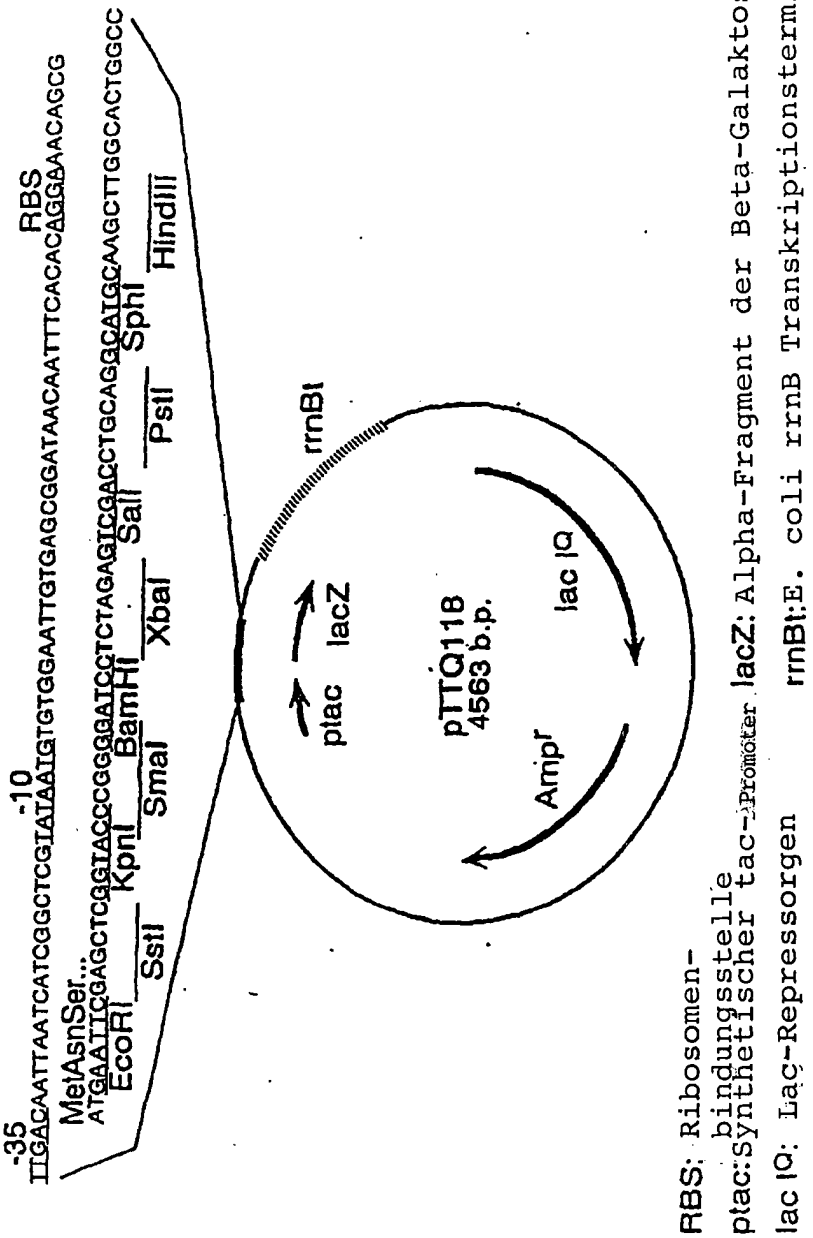


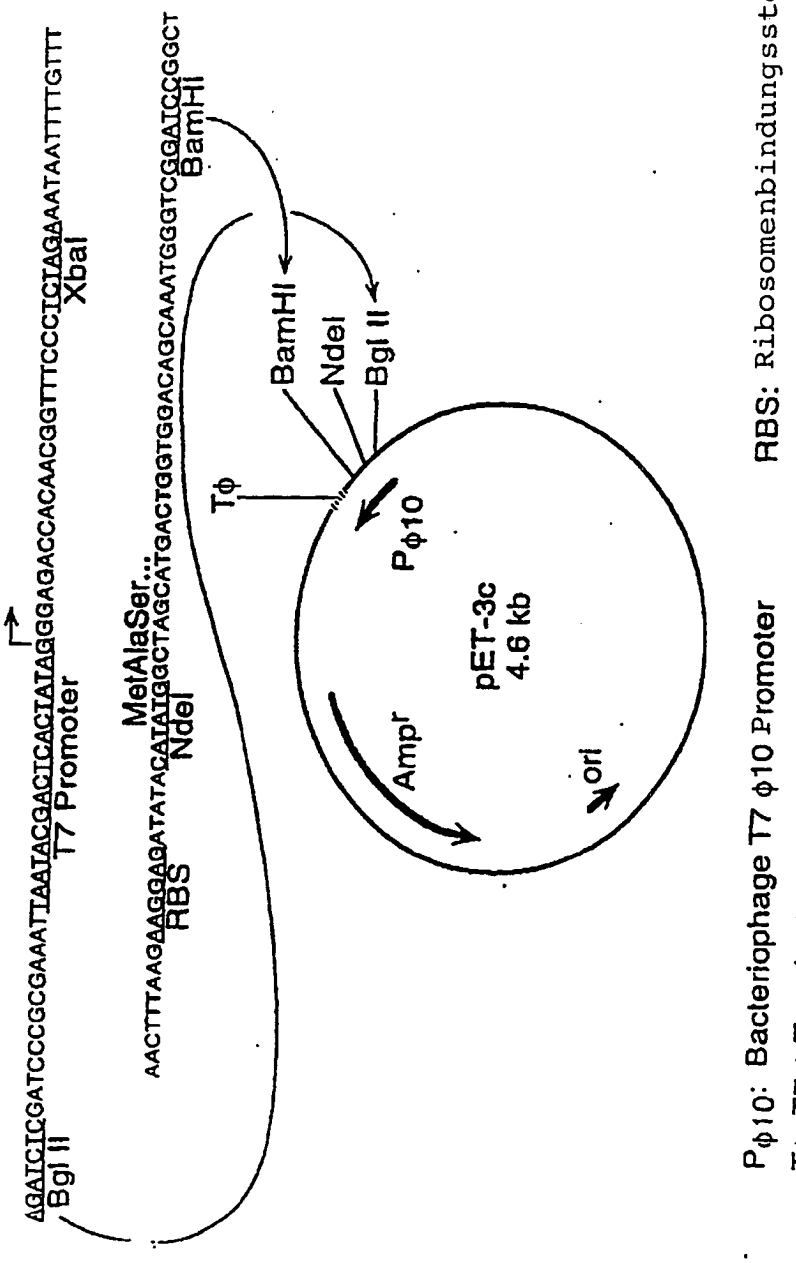
FIG. 13B

FIGUR 14



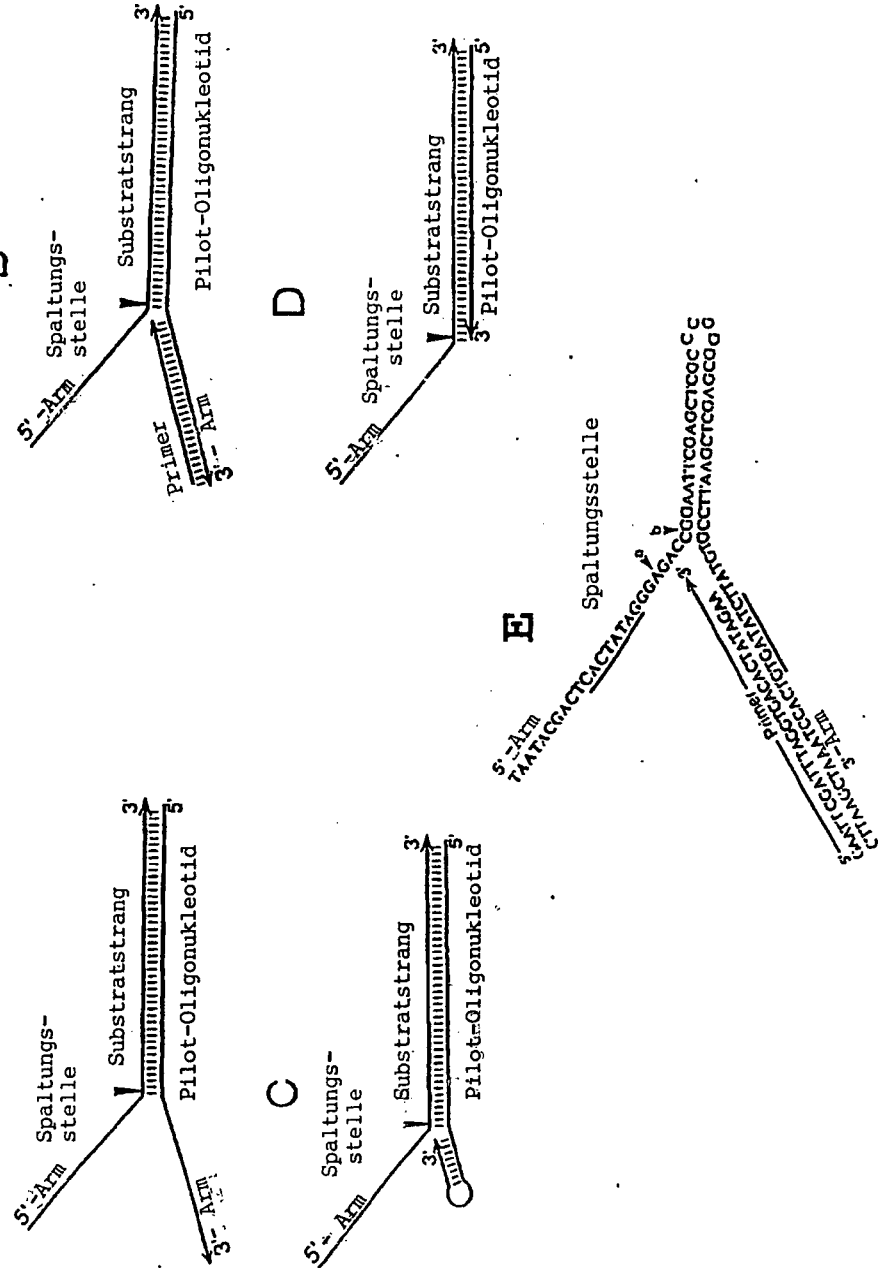
RBS: Ribosomen-bindungsstelle
ptac: synthetischer tac-Promoter
lacZ: Alpha-Fragment der Beta-Galaktosidase
lac IQ: Lac-Repressorgen
rrnBt: E. coli rrnB Transkriptionsterminator

FIGUR 15



Pϕ10: Bacteriophage T7 ϕ10 Promoter
Tϕ: T7 ϕ Terminator
RBS: Ribosomenbindungsstelle

FIGUR 16


A
Spaltungs-
stelle
Substratstrang
Pilot-Oligonukleotid
5'-Arm
3'-Arm
B
Spaltungs-
stelle
Substratstrang
Pilot-Oligonukleotid
5'-Arm
Primer
3'-Arm
C
Spaltungs-
stelle
Substratstrang
Pilot-Oligonukleotid
5'-Arm
D
Spaltungs-
stelle
Substratstrang
Pilot-Oligonukleotid
5'-Arm
E
Spaltungsstelle
5'-Arm

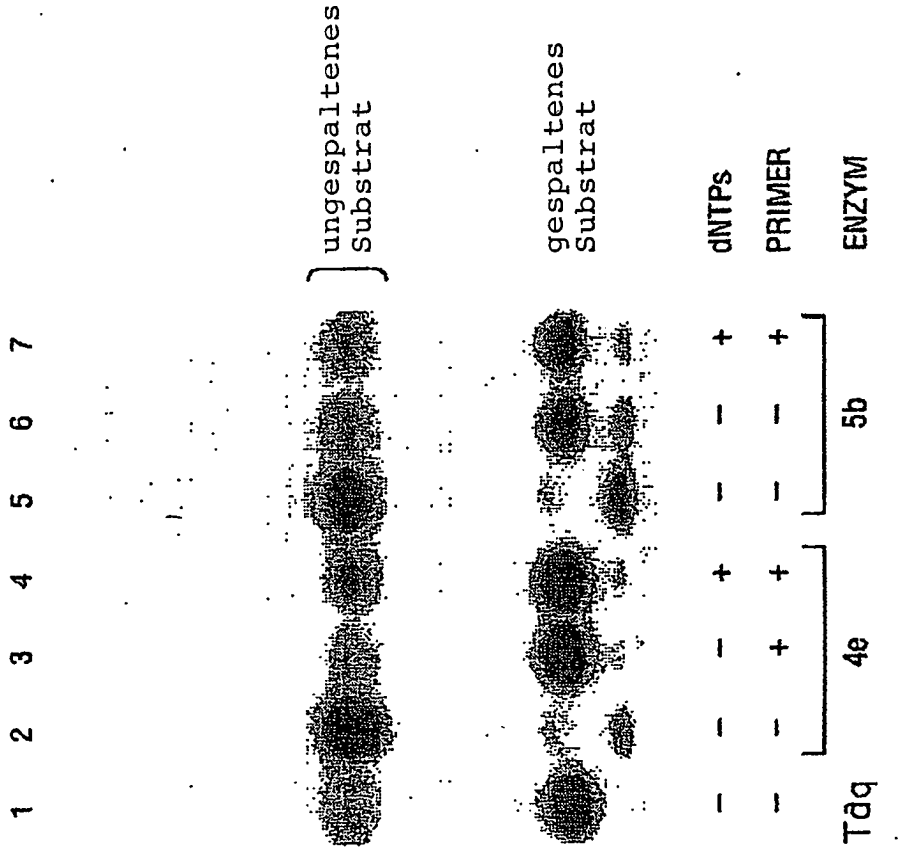

1 2 3 4 5 6 7
ungespaltenes Substrat
gespaltenes Substrat
dNTPs
PRIMER
ENZYM
Taq
4e
5b

FIG. 17

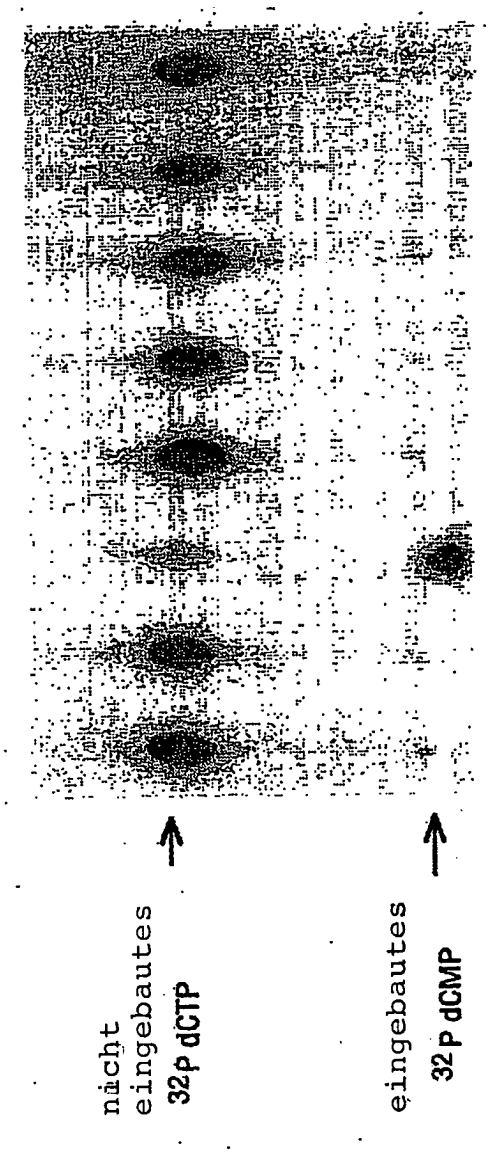

nicht eingebautes 32P dCTP
eingebautes 32P dCMP
ENZYM Taq – Taq 4b 4c 4d 4e 4f
PRIMED M13 – + + + + + +

FIG. 18

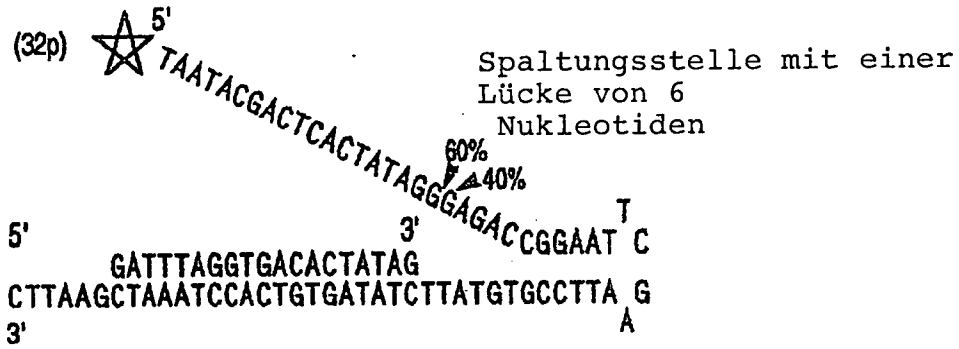

(32p)
5'
TAATACGACTCACTATAGGGAGAC
Spaltungsstelle mit einer Lücke von 6 Nukleotiden
60%
40%
5'
3'
GATTTAGGTGACACTATAG
CGGAAT
T
C
CTTAAGCTAAATCCACTGTGATATCTTATGTGCCTTA
G
A
3'

FIG. 19A

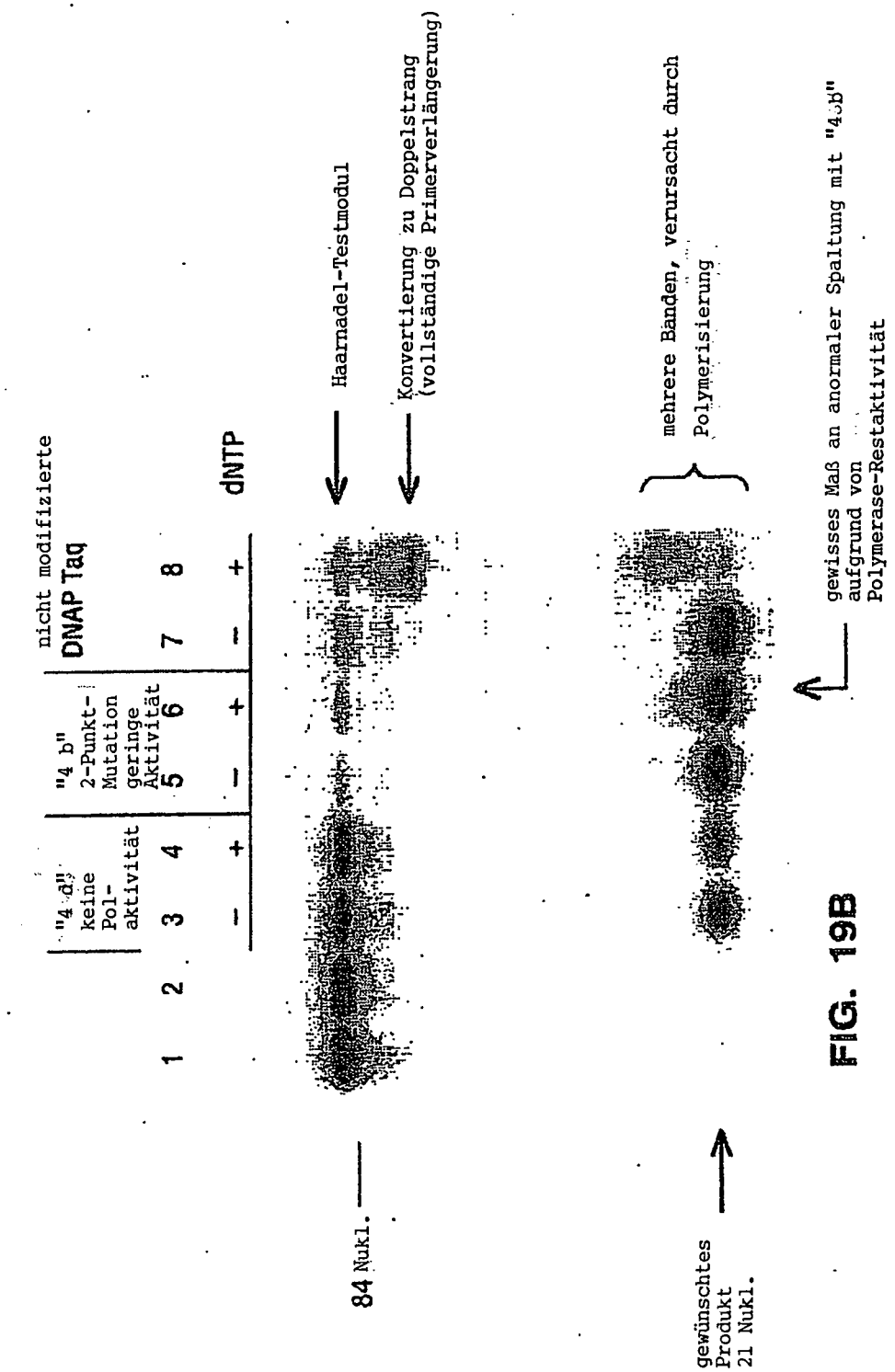

nicht modifizierte
DNAP Taq
"4 d"
keine
Pol-
aktivität
"4 b"
2-Punkt-
Mutation
geringe
Aktivität
dNTP
1 2 3 4 5 6 7 8
- + - + - +
Haarnadel-Testmodul
Konvertierung zu Doppelstrang
(vollständige Primerverlängerung)
84 Nukl.
mehrere Banden, verursacht durch
Polymerisierung
gewünschtes
Produkt
21 Nukl.
gewisses Maß an anormaler Spaltung mit "4b"
aufgrund von
Polymerase-Restaktivität

FIG. 19B

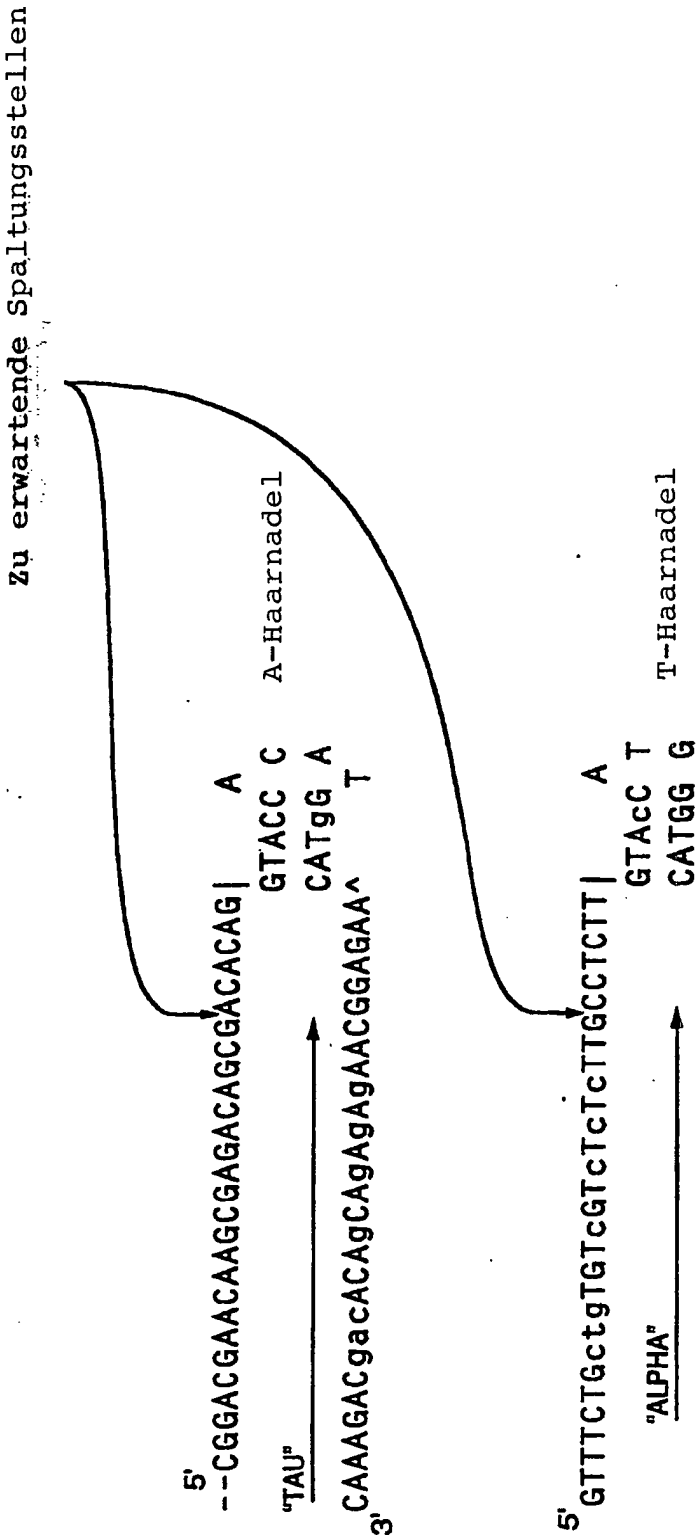
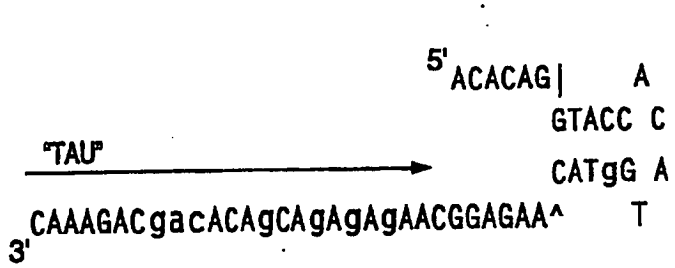

Zu erwartende Spaltungsstellen
5'
--CGGACGAACAAGCGAGACAGCGACACAG|
GTACC C
A-Haarnadel
A
"TAU"
CATgG A
CAAAGACgacACAgCAgAgAgAACGGAGAA^
T
3'
5'
GTTTCTGctgTGTcGTcTcTcTTGCCTCTT|
GTAcC T
T-Haarnadel
A
"ALPHA"
CATGG G
----CTGCTTGTTCGCTCTGTCGCTGTGTC^
T
3'

FIG. 20A

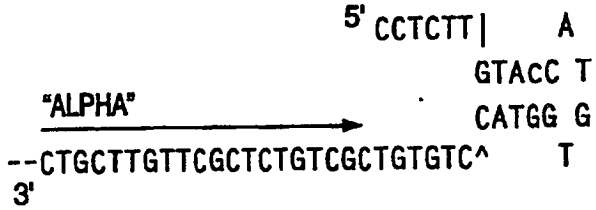
Sequenz des Alpha-Primers:

5' GAC GAA CAA GCG AGA CAG CG 3'

FIG. 20B



gespaltene Haarnadel A



gespaltene Haarnadel T

FIG. 20C

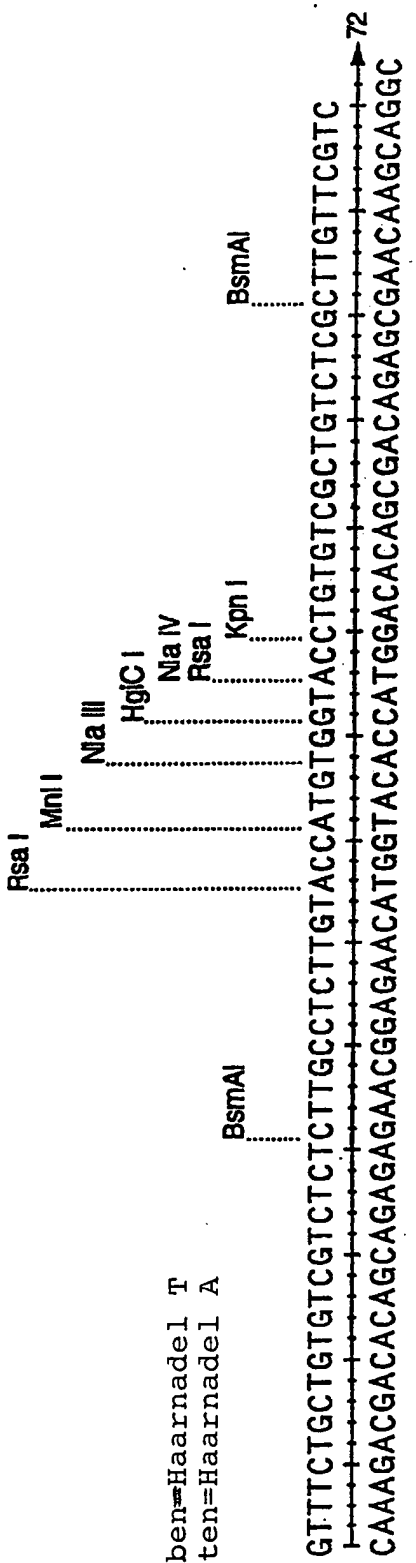
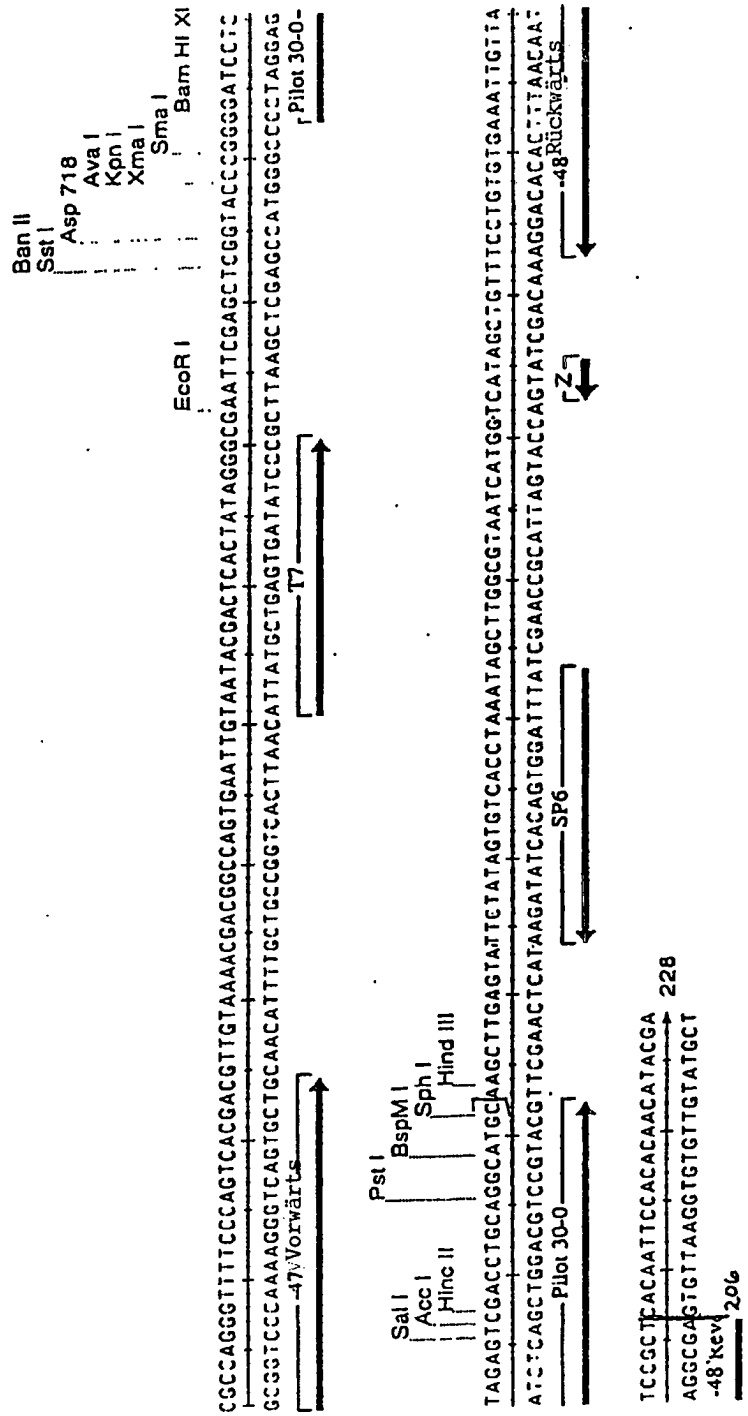
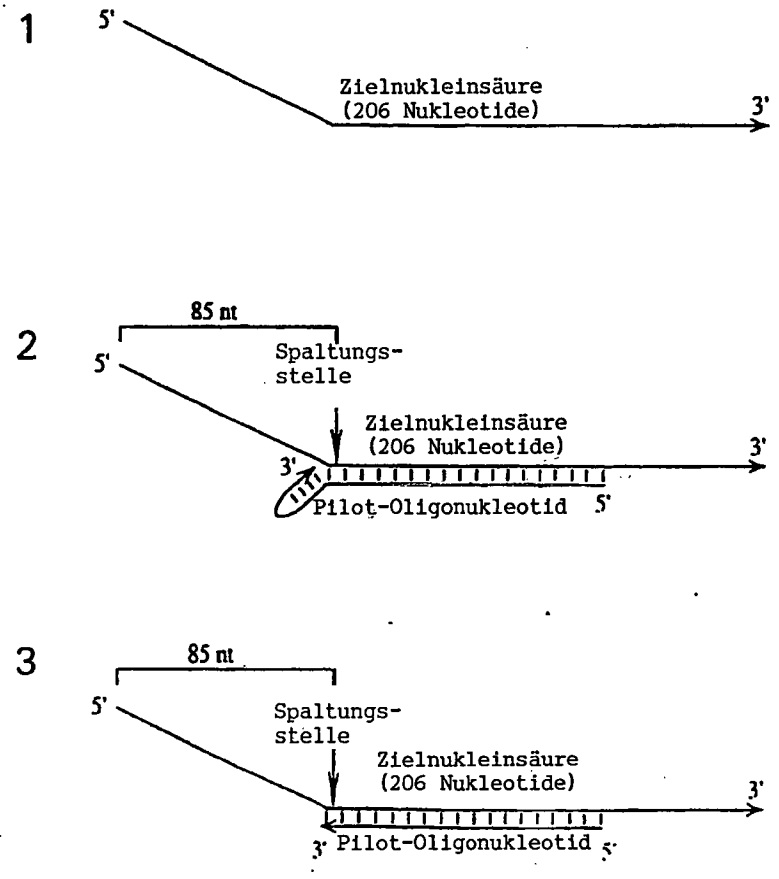

Rsa I
MnlI
Nla III
HgiC I
Nla IV
Rsa I
Kpn I
BsmAI
BsmAI
oben=Haarnadel T
unten=Haarnadel A
GTTCTGCTGTGTCGTCTCTCTTGCCTCTTGTACCATGTGGTACCTGTGTCGCTGTCTCGCTTGTTCGTC
CAAGACGACACAGCAGAGAGAACGGAGAACATGGTACACCATGGACACAGCGACAGAGCGAACAAGCAGGC
72

FIG. 20D

FIGUR 21


Ban II
Sst I
Asp 718
Ava I
Kpn I
Xma I
Sma I
Bam HI XI
EcoR I
Pilot 30-0-
T7
-47 Vorwärts
Pst I
BspM I
Sph I
Hind III
Sal I
Acc I
Hinc II
Z
-48 Rückwärts
SP6
Pilot 30-0
228
-48 Rev
206

FIGUR 22A


1
5'
Zielnukleinsäure
(206 Nukleotide)
3'
2
85 nt
5'
Spaltungs-
stelle
Zielnukleinsäure
(206 Nukleotide)
3'
3'
Pilot-Oligonukleotid
5'
3
85 nt
5'
Spaltungs-
stelle
Zielnukleinsäure
(206 Nukleotide)
3'
3'
Pilot-Oligonukleotid
5'

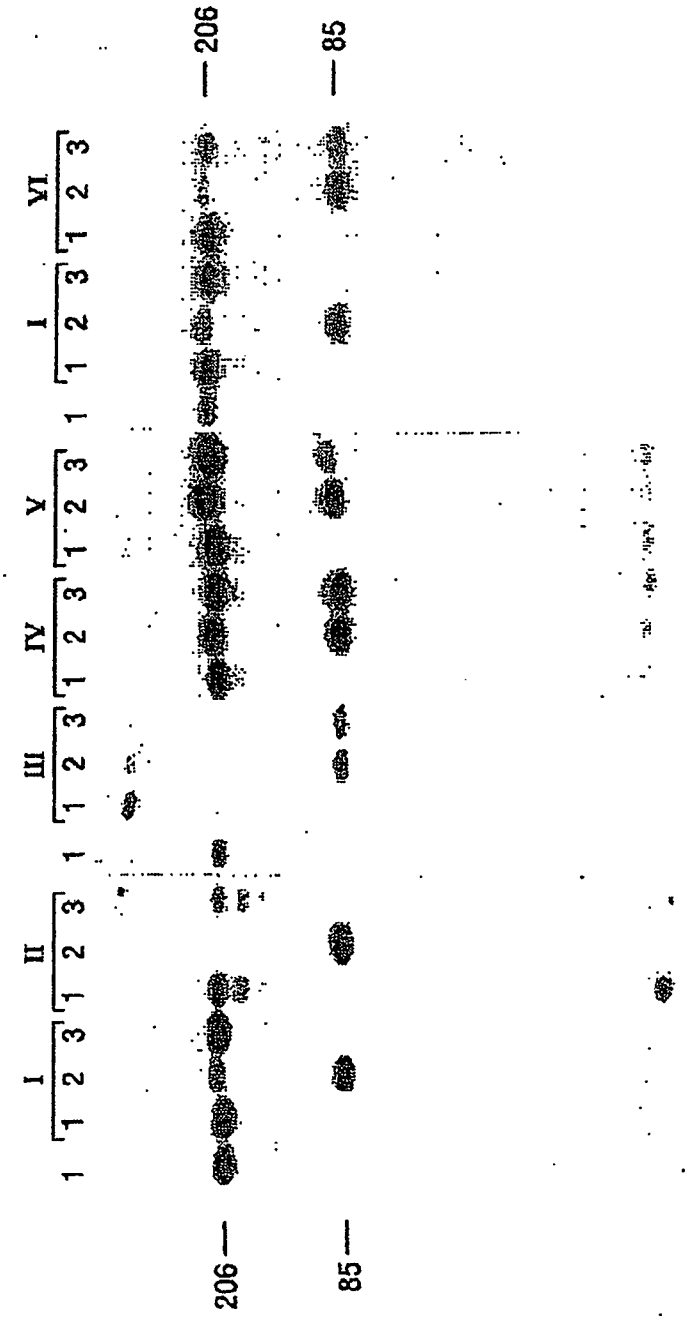
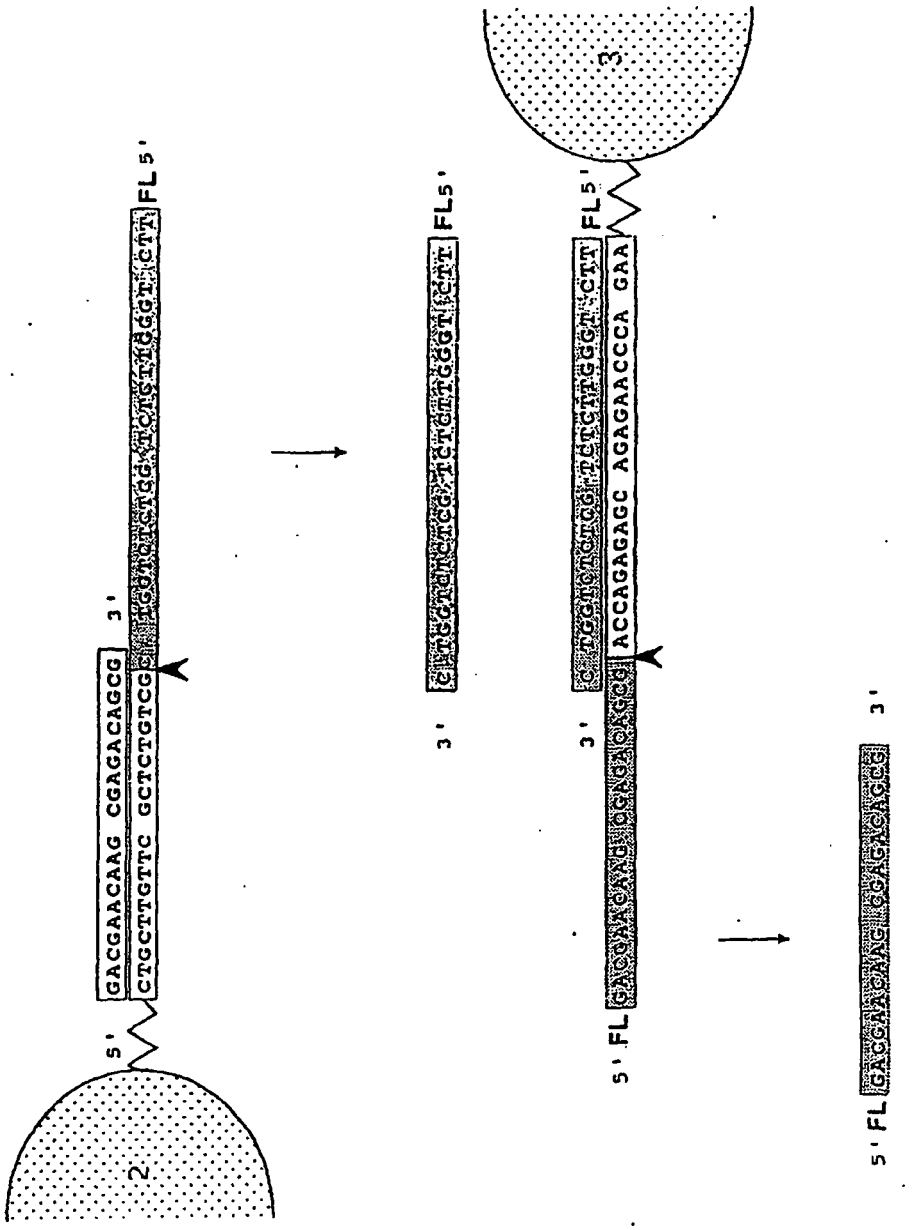


FIG. 22B

FIGUR 23


2
5'
GACGAACAAG CGAGACAGCG
CTGCTTGTTC GCTCTGTCGC
3'
FL 5'
3'
FL 5'
3'
5' FL
ACCAGAGAGC AGAGAACCCA GAA
FL 5'
3
5' FL
3'

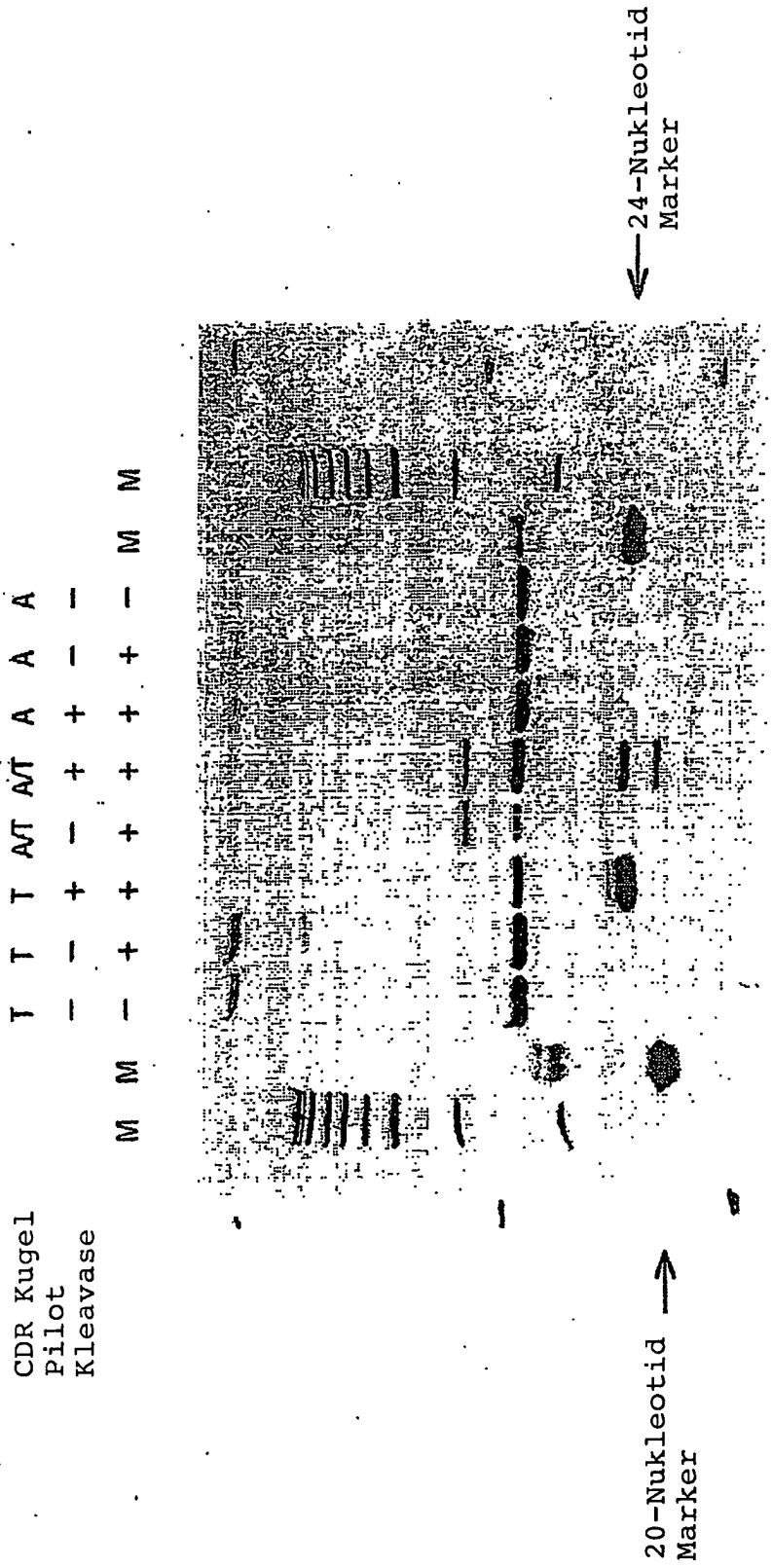

24-Nukleotid
Marker
CDR Kugel
Pilot
Kleavase
T T T A/T A/T A A A
– – + – + + – –
M M – + + + + + – M M
20-Nukleotid
Marker

FIG. 24



FIG. 25A

FIG. 25B

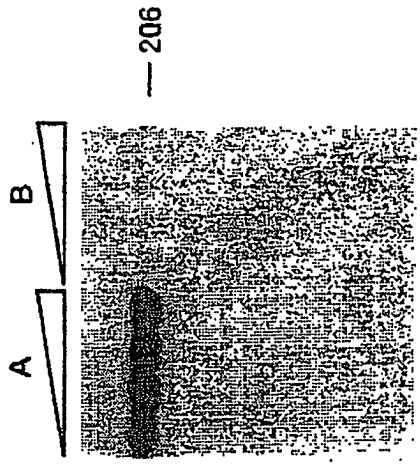


FIG. 26A

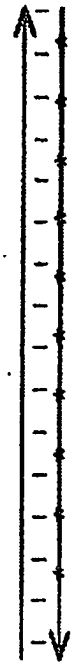
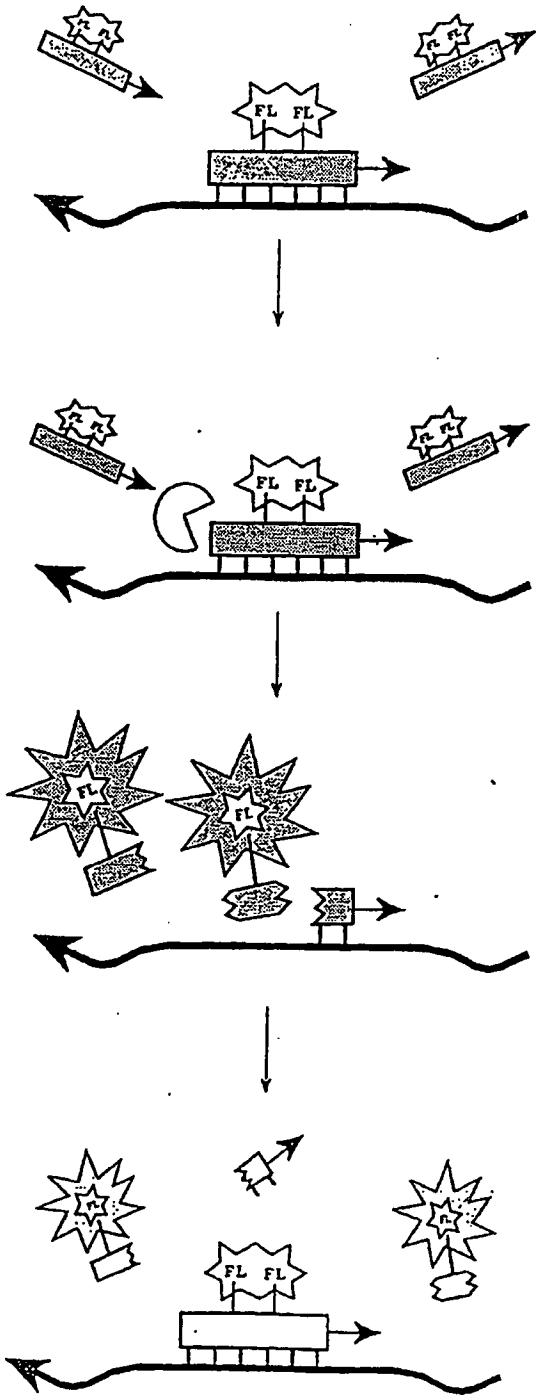


FIG. 26B

FIGUR 27



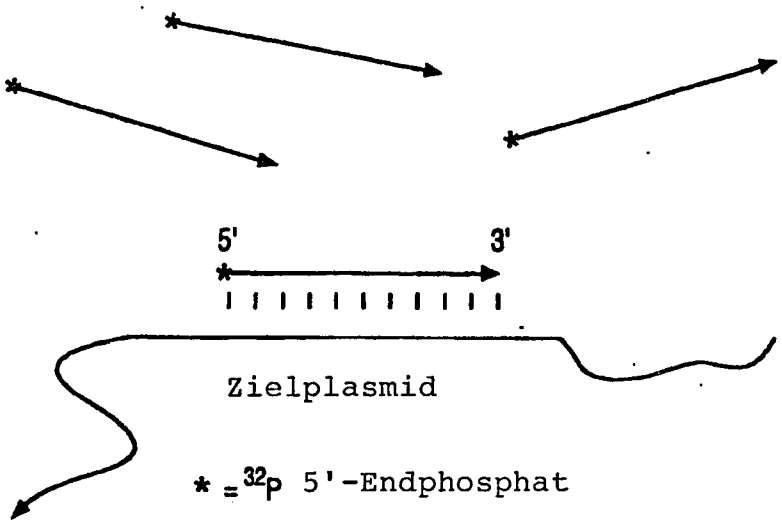


FIG. 28A

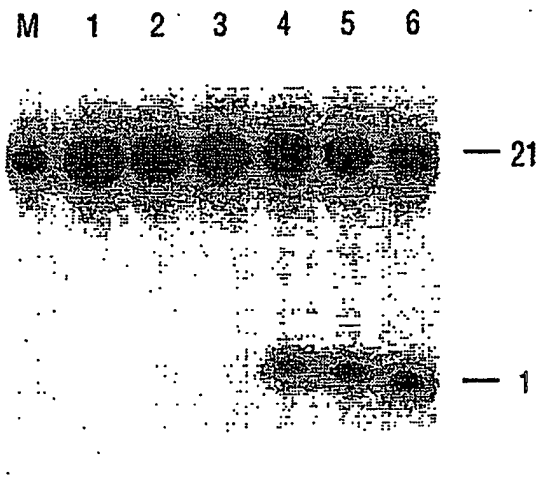


FIG. 28B