

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. August 2003 (14.08.2003)

PCT

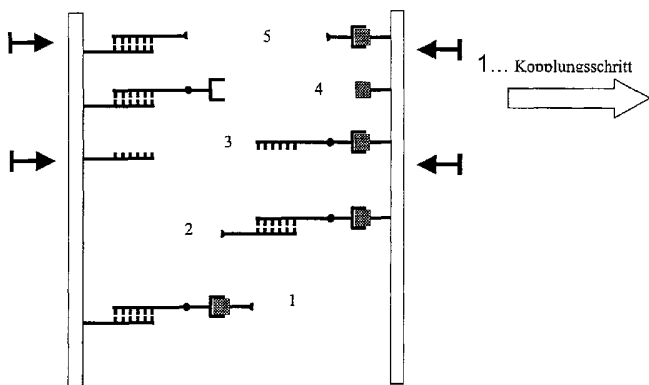
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/066896 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68** (71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **NANOTYPE GMBH** [DE/DE]; Lochhamer Schlag 12, 82166 Gräfelfing (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/01258
- (22) Internationales Anmeldedatum: 7. Februar 2003 (07.02.2003) (72) **Erfinder; und**
(75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **ALBRECHT, Christian** [DE/DE]; Thalkirchner Str. 143, 81371 München (DE). **OESTERHELT, Filipp** [DE/DE]; Am Dorpweiher 59, 42115 Wuppertal (DE). **STEIPE, Boris** [DE/CA]; 766 Crawford Street, Toronto, Ontario M6G 3K3 (CA). **GAUB, Hermann** [DE/DE]; Waldschmidtstrasse 19A, 83727 Neuhaus (DE). **CLAUSEN-SCHAUMANN, Hauke** [DE/DE]; Seewiesstrasse 14, 82340 Feldafing (DE). **CIEPLIK, Michael** [DE/DE]; Striebelhofweg 2, 89233 Neu-Ulm (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 05 419.3 9. Februar 2002 (09.02.2002) DE
102 07 918.8 23. Februar 2002 (23.02.2002) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF MUTATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON MUTATIONEN



(57) Abstract: A method for the detection of mutations in nucleic acids is disclosed, comprising a) a number of nucleic acid strands for analysis are brought into contact with at least two types of oligonucleotides, receptor oligos and probe oligos, under conditions which bring about hybridisation of the oligos with the DNA for analysis to give a sample complex and a reference complex in such a manner that a double-sided linkage of sample complex and reference complex is produced which is or may be immobilised, b) the linkage is then optionally immobilised, c) a tensile force is applied to the linkage until one of the complexes separates and d) whichever of the complexes has separated is determined.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zum Nachweis von Mutationen in einer Nucleinsäure beschrieben, das umfasst, dass a) eine Mehrzahl zu analysierender Nucleinsäure-Stränge mit mindestens zwei Arten von Oligonucleotiden, Rezeptoroligos und Sondenoligos, in Kontakt gebracht wird unter solchen Bedingungen, dass die Oligos mit der zu analysierenden DNA hybridisieren unter Bildung eines Probenkomplexes und eines Referenzkomplexes, so dass eine beidseitig immobilisierte oder immobilisierbare Verkettung von Probenkomplex und Referenzkomplex vorliegt, b) anschliessend gegebenenfalls die Verkettung immobilisiert, c) an die Verkettung eine Zugkraft angelegt wird, bis sich einer der Komplexe trennt und d) bestimmt wird, welcher der Komplexe getrennt wurde.

1... COUPLING STEP



WO 03/066896 A2



(74) **Anwalt: LEISSLER-GERSTL, Gabriele;** Eisenführ, Speiser & Partner, Arnulfstr. 25, 80335 München (DE).

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

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

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

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

Verfahren zum Nachweis von Mutationen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Mutationen bei einer Nucleinsäure.

Die Untersuchung von Variationen oder Mutationen einer genomischen Nucleinsäuresequenz wird zunehmend wichtiger und interessanter, da die Veränderungen Rückschlüsse zulassen, die für verschiedene Bereiche ausgenützt werden können.

Es gibt verschiedene Arten von Variationen und Mutationen, die alle unter dem Oberbegriff Polymorphismus zusammengefasst werden. Unter einem Polymorphismus versteht man eine Variation, einer genomischen Nucleinsäuresequenz, die häufig an der selben Stelle festgestellt werden kann. Es kann sich dabei sowohl um den Austausch einzelner Basen, eine so genannte Punktmutation, als auch kleine Deletionen, Insertionen und Inversionen aber auch um die Umorganisation großer Sequenzabschnitte handeln. In jedem Fall ist die Sequenz im Vergleich zum Wildtyp an einer oder mehreren Stellen verändert.

Erkenntnisse über Polymorphismen in einem Genom sind in verschiedenen Gebieten hilfreich. So werden in der Genetik Polymorphismen als Marker verwendet, um den Verwandtschaftsgrad zweier Organismen feststellen zu können, indem man die Vererbung der Polymorphismen verfolgt. Zu den wichtigsten genetischen Markern zählen Einzelbasenmutationen, bei denen eines der vier Nucleotide gegen ein anderes ausgetauscht wird und die auch SNP (Single Nucleotide Polymorphism) genannt werden.

In der Medizin dienen Polymorphismen einerseits zum Nachweis bestimmter Krankheiten, bei denen durch Einzelbasenmutationen Gene verändert werden und dadurch Krankheiten ausgelöst werden. Ein weiteres wichtiges Anwendungsfeld ist das so genannte HLA-Typing, das eingesetzt wird, um die Ähnlichkeit von Immunsystemen zweier Individuen anhand des Zustandes vieler Loci auf den HLA-Genen zu vergleichen. Das HLA-Typing wird vor allen Dingen verwendet, um bei Transplantationen festzustellen, ob ein Transplantat verträglich sein wird.

Ein weiteres Gebiet, auf dem der Nachweis von Polymorphismen wichtig wird, ist die Pharmakogenomik, bei der durch Nachweis bestimmter Polymorphismen die Medikamentenverträglichkeit bei Behandlung eines bestimmten Patienten vorhersagbar sein soll.

Zum Nachweis von Polymorphismen, insbesondere Einzelbasenpolymorphismen, wurden verschiedene Methoden^o entwickelt. Einen guten Überblick gibt Nollau et al. in *Clinical Chemistry* 43, Nr. 7 (1997), Seiten 1115-1128. Es wurden sowohl Methoden zur Identifikation neuer SNPs, als auch Methoden zum Nachweis von SNPs an bekannten Loci vorgestellt. Der Nachweis von bekannten Polymorphismen kann durch Hybridisierung erfolgen, wobei die Probe in der Regel durch PCR amplifiziert wird, durch Sequenzierung, durch Primerverlängerung, oder durch einen Oligonucleotidligierungsassay. Bei all diesen Verfahren sind in der Regel aufwendige Schritte notwendig, z.B. elektrophoretische Trennungen, die viel Zeit erfordern.

All diese Verfahren haben die Gemeinsamkeit, dass ein Homoduplex (beide Stränge haben gleichen Ursprung) gespalten wird und zumindest einer der Stränge mit einem „fremden“ Strang (einer Sonde) hybridisiert und einen Heteroduplex (Stränge unterschiedlicher Herkunft) ausbildet. Der Heteroduplex kann dann auf verschiedene Art und Weise für den Nachweis verwendet werden.

Man kann Screening-Methoden, die zur Identifikation unbekannter SNPs dienen von anderen Methoden unterscheiden, die zum Nachweis von Polymorphismen an bekannten Loci geeignet sind. Universal einsetzbar ist dagegen die DNA-Sequenzierung, die für routinediagnostische Tests jedoch sehr kostspielig ist.

Die reinen Screening-Methoden lassen sich entweder auf das Prinzip des unterschiedlichen Wanderverhaltens von Wildtyp- oder Mutanten-Heteroduplexen in Elektrophoresegelelen, oder auf den enzymatischen Verdau von Heteroduplexen zurück führen.

Auch bei den reinen Nachweis-Methoden wird ein Heteroduplex aus Proben-DNA und einer Oligonukleotidsonde gebildet. Die Diskriminierung zwischen Wildtyp und Mutante

- 4 -

kann dann entweder über die Anwendung stringenter Hybridisierungsbedingungen oder über enzymatische Reaktionen erreicht werden.

Bei der Diskriminierung durch stringente Hybridisierung werden Oligonukleotide eingesetzt, die unter für diese Sequenz spezifischen Puffer- und Temperaturbedingungen an den Wildtyp hybridisieren (Perfect Match) aber nicht an die Mutante (Mismatch). Das Problem bei diesem Vorgehen besteht darin, dass bei einer parallelen Ausführung solcher Tests in einem Ansatz keine Bedingungen einzustellen sind, die für alle Analyten gleichermaßen stringent sind.

Die Diskriminierung durch Enzym erfolgt entweder durch DNA-Polymerase oder DNA-Ligase. DNA-Polymerase kommt bei der PCR mit sequenzspezifischen Primern (SSP) und beim „Mini-Sequencing“ zum Einsatz. Das Prinzip der SSP beruht darauf, dass ein PCR-Primer, der einen Strang eines Heteroduplex darstellt, nur dann durch die Polymerase-Reaktion verlängert werden kann, wenn es sich um einen Perfect Match handelt. Bei einem Mismatch unterbleibt die Polymerase-Reaktion, weshalb kein PCR-Produkt nachgewiesen werden kann.

Beim Mini-Sequencing handelt es sich um eine Abwandlung der SSP-PCR. In diesem Fall wird ein Heteroduplex gebildet, der am 3'-Ende genau ein Nukleotid vor dem SNP-Locus endet. Dieser Primer kann durch die DNA-Polymerase mittels Einbau von Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP) verlängert werden, wobei es unmittelbar nach dem Einbau einer dieser Basen zu einem Strangabbruch kommt. Über eine individuelle Farbmarkierung der vier Didesoxynukleotide kann man nun bestimmen, welche Base eingebaut wurde, bzw. welche der entsprechenden komplementären Basen auf dem Probemolekül vorliegt.

Bei dem sogenannten Oligonucleotide Ligation Assay (OLA) verwendet man eine ähnliche Strategie. Zwei Oligos werden derart maßgeschneidert, dass sie direkt nebeneinander an der Stelle des SNP mit dem Probenmolekül hybridisieren. Das 5'-Ende des ersten Oligos ist mit einem Phosphat versehen und dem 3'-Ende des anderen Oligos zuge-

- 5 -

wandt. Beim Vorliegen eines Perfect-Match werden die Oligos nun durch die DNA-Ligase verbunden. Bei einem Mismatch unterbleibt diese Reaktion. Durch den Nachweis des Ligationsprodukt kann schließlich auf die Identität der Base an der SNP-Position geschlossen werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es nun, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Mutationen, insbesondere Polymorphismen nachgewiesen werden können, ohne dass aufwendige Trennungsschritte, wie Elektrophorese, notwendig sind. Weiterhin war es Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das die Möglichkeit zur Parallelisierung von Tests bietet.

Diese Aufgabe wird gelöst mit einem Verfahren zum Nachweis von Mutationen in einer Nucleinsäure, das umfasst, dass

- a) eine Mehrzahl zu analysierender Nucleinsäure-Stränge mit mindestens zwei Arten von Oligonucleotiden, Rezeptoroligos und Sondenoligos, in Kontakt gebracht wird unter solchen Bedingungen, dass die Oligos mit der zu analysierenden DNA hybridisieren unter Bildung eines Probenkomplexes und eines Referenzkomplexes, so dass eine beidseitig immobilisierte oder immobilisierbare Verkettung von Probenkomplex und Referenzkomplex vorliegt,
- b) anschließend gegebenenfalls die Verkettung immobilisiert wird,
- c) an die Verkettung eine Zugkraft angelegt wird, bis sich einer der Komplexe trennt und
- d) bestimmt wird, welcher der Komplexe getrennt wurde.

Gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zum Nachweis von Mutationen in Analytnucleinsäuren die Analytnucleinsäure mit zwei Arten von Oligonucleotiden, Rezeptoroligos und Sondenoligos, in Kontakt gebracht unter solchen Bedingungen, dass die Oligos mit der Analytnucleinsäure hybridisieren, wobei die Oligonucleotide immobilisiert oder immobilisierbar sind, und wobei gegebenenfalls die Oligonucleotide nach der Hybridisierung immobilisiert werden, so dass eine beidseitig immobilisierte oder immobilisierbare Verkettung von Rezeptoroligo - Analytnucleinsäure - Sondenoligo

- 6 -

vorliegt; an die Verkettung eine Zugkraft angelegt wird, so dass sich eine der Bindungen löst und bestimmt wird, welche der Bindungen gelöst wurde, wobei die Rezeptoroligonucleotide eine Sequenz aufweisen, die zu einem Sequenzabschnitt der Analytnucleinsäure im Wesentlichen komplementär ist, in dem eine Mutation oder Variation vermutet wird.

Für das Verfahren der vorliegenden Erfindung wird das Prinzip des differentiellen Krafttests ausgenutzt. Das allgemeine Prinzip des differentiellen Krafttests wird beschrieben in PCT/EP01/09206. Es wurde gefunden, dass die Anwendung des differentiellen Krafttests zuverlässig und in hohem Maße parallelisierbar und miniaturisierbar den Nachweis von Polymorphismen zulässt, wobei Punktmutationen (SNP) ebenso wie andere Veränderungen der Probensequenz nachgewiesen werden können, unter der Voraussetzung, dass sie zu einer Veränderung der Trennkraft des bei Hybridisierung mit dem zum Wildtyp komplementären Strang entstehenden Duplexes führen.

Kurz zusammengefasst soll ein Nukleinsäuremolekül in einer Probe, das im folgenden auch als Analytnucleinsäure bezeichnet wird, auf das Vorhandensein von Mutationen oder Variationen hin untersucht werden. Aus einem ersten und einem zweiten Bindungspartner wird ein Probenkomplex ausgebildet. Dabei enthält einer der beiden Bindungspartner – die Analytnucleinsäure - einen definierten Sequenzabschnitt (Probensequenz) eines Analytmoleküls. Der andere der beiden Bindungspartner enthält einen definierten Sequenzabschnitt (Rezeptorsequenz) eines Rezeptoroligos, der im wesentlichen komplementär zu dem interessierenden Abschnitt der Analytsequenz ist. Durch die Hybridisierung des ersten Bindungspartners mit dem zweiten Bindungspartner kommt es zur Ausbildung eines Probenkomplexes.

Ein dritter und ein vierter Bindungspartner bilden zusammen einen Referenzkomplex. Probenkomplex und Referenzkomplex werden seriell miteinander verkettet. Zwei der teilnehmenden Bindungspartner sind immobilisiert oder immobilisierbar, sodass nach der Reaktion auf die gebildete Verkettung eine Zugkraft ausgeübt werden kann.

- 7 -

An die Enden der Verkettung wird eine Zugkraft angelegt, bis einer der beiden Komplexe getrennt wird, und zwar entweder der erste vom zweiten Bindungspartner, d.h. der Probenkomplex, oder der dritte vom vierten Bindungspartner, d.h. der Referenzkomplex. So kommt es entweder zur Lösung des Probenkomplexes, falls dessen Trennkraft unter den Versuchsbedingungen kleiner ist als die des Referenzkomplexes oder zur Lösung des Referenzkomplexes, falls dessen Trennkraft unter den Versuchsbedingungen kleiner ist als die des Probenkomplexes.

Führt man dieses Experiment sehr oft durch, bevorzugt in Form vieler Verkettungen auf einem Spot und simultan, und summiert dabei die Anzahl der getrennten Probenkomplexe zu n_{Pro} und die Anzahl der geteilten Referenzkomplexe zu n_{Ref} , und setzt diese ins Verhältnis, so erhält man den Quotienten Q^* , der mit dem Verhältnis der mittleren Trennkraften (F^*) der Komplexe korreliert:

$$Q^* = n_{\text{Ref}} / n_{\text{Pro}} \text{ korreliert mit } F_{\text{Pro}}^* / F_{\text{Ref}}^*$$

Geht man von einer bestimmten Sequenz aus, die man als Wildtyp (WT) bezeichnet, so stellen alle Veränderungen dieser Sequenz eine Mutation (M) dar. Sobald eine Mutation der Wildtypsequenz zu einer Veränderung der mittleren Trennkraft des Probenkomplexes führt, kann sie mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen werden. Ein vergleichendes Experiment ergibt in diesem Fall:

$$F_{\text{Ref}}^* / F_{\text{Pro}}^*(\text{WT}) \neq F_{\text{Ref}}^* / F_{\text{Pro}}^*(\text{M})$$

$$\text{bzw. } Q^*(\text{WT}) \neq Q^*(\text{M})$$

Da Mutationen der Probesequenz in aller Regel zu einer Verminderung von F_{Pro}^* führen, gilt meistens auch:

$$F_{\text{Ref}}^* / F_{\text{Pro}}^*(\text{Wildtyp}) < F_{\text{Ref}}^* / F_{\text{Pro}}^*(\text{Mutante})$$

$$\text{bzw. } Q^*(\text{WT}) > Q^*(\text{M})$$

Die Diskriminierung von Mutationen gegenüber dem Wildtyp durch einen Kraftvergleich beruht also darauf, dass sich aufgrund der Veränderung von F_{Pro}^* auch das Verhältnis $F_{\text{Ref}}^* / F_{\text{Pro}}^*$ ändert.

- 8 -

Der Referenzkomplex ist in der Regel ebenfalls ein Nucleinsäureduplex, wobei der vierte Bindungspartner der Sondensequenz entspricht und Sondenoligo genannt wird. Bindungspartner 3 ist im wesentlichen komplementär zur oder entspricht der Referenzsequenz und ist bevorzugt Bestandteil des zu analysierenden Probenmoleküls.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird beschrieben zur Bestimmung einer Mutation, es ist jedoch genauso anwendbar zur Bestimmung von Variationen in einer Nucleinsäure. Wenn im folgenden daher der von "Mutationen" die Rede ist, sollen auch Variationen umfasst sein.

Erfindungsgemäß wird eine Analytnucleinsäure, auf der Mutationen nachgewiesen werden sollen, mit verschiedenen Oligonucleotiden so in Kontakt gebracht, dass sich mindestens zwei Nucleinsäureduplexe bilden, die so miteinander verbunden sind, dass sich eine Verkettung bildet, auf deren beide Enden Kraft ausgeübt werden kann. Weiterhin ist diese Verkettung so ausgebildet, dass sich dann, wenn auf diese Verkettung eine Kraft ausgeübt wird, einer der beiden hybridisierten Duplexe oder Komplexe trennt und zwar abhängig davon, welcher Duplex oder Komplex unter den gegebenen Bedingungen die kleinere Bindungskraft hat. Dies hängt bei nicht im Unzip-Modus hybridisierten Nucleinsäuresträngen vor allem von der Anzahl der gepaarten Basen, der Art der Basen, insbesondere dem GC-Gehalt, und der Anzahl der Fehlpaarungen (Mismatches) ab.

Für das erfindungsgemäße Verfahren gibt es verschiedene Ausführungsformen, die unten näher erläutert werden und im Folgenden kurz beschrieben werden. Kernpunkt der Erfindung ist es, dass die Bindungskraft zweier Duplexe miteinander verglichen wird, wobei an mindestens einem der beiden Duplexe die Analytnucleinsäure beteiligt ist. Durch Feststellen, welcher der beiden Duplexe sich gelöst hat, lassen sich Rückschlüsse darauf ziehen, welcher der beiden Duplexe die stärkere Bindungskraft hatte. Daraus lässt sich wiederum schließen, ob der von der Analytnucleinsäure gebildete Duplex Mismatches ausgebildet hatte.

Wenn von "einer Analytnucleinsäure" die Rede ist, so bedeutet dies selbstverständlich immer nur die Beschreibung eines Vertreters aus einer Vielzahl, so dass bei Durchfüh-

- 9 -

rung des erfindungsgemäßen Verfahrens normalerweise immer eine Vielzahl von Nucleinsäuren zur Reaktion kommen. Die Beschreibung bezieht sich der Einfachheit halber nur auf einen herausgegriffenen Vertreter.

Um auf die durch Hybridisierung der einzelnen Partner gebildete Verkettung eine Kraft ausüben zu können, muss die Verkettung an beiden Seiten an einem Träger immobilisiert sein. Daher werden für die Duplexe Stränge verwendet, die entweder bereits immobilisiert sind oder immobilisierbar sind. In einigen Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens werden bereits immobilisierte Nucleotide für die Hybridisierung eingesetzt, während in anderen Ausführungsformen zuerst die Hybridisierungen mit mobilen Nucleotiden durchgeführt werden und die Immobilisierung in einem nachgeschalteten Schritt erfolgt. In letzterem Fall muss natürlich für die Immobilisierung an den zu immobilisierenden Strängen eine Bindemöglichkeit vorgesehen werden.

Im Folgenden wird der Einfachheit halber von Stempel und Unterlage gesprochen, ohne dass damit eine Festlegung in bezug auf räumliche Lage, Beschaffenheit oder Funktion erfolgen soll, da der Stempel auch als Unterlage dienen kann und umgekehrt. Dieselben Ausführungen gelten auch, wenn statt makroskopischer Oberflächen die Immobilisierung an Beads oder Teilchen stattfindet.

In den einfachsten Varianten kommen drei Stränge zur Reaktion: die Analytnucleinsäure, ein Rezeptoroligonucleotid und ein Sondenoligonucleotid. In dieser Ausführungsform müssen Rezeptor- und Sondenoligonucleotid immobilisiert oder immobilisierbar sein. Es werden die drei Bestandteile miteinander so in Kontakt gebracht, dass sie miteinander hybridisieren können. Dazu kann z.B. das Rezeptoroligo auf einer der Einfachheit halber Unterlage genannten Oberfläche in an sich bekannter Weise immobilisiert werden, z.B. durch kovalente Bindung über auf der Unterlage befindliche funktionelle Gruppen. Die Immobilisierung soll dabei so erfolgen, dass bei der Hybridisierung ein Duplex entsteht, der bei Anwendung einer Zugkraft nicht reißverschlußartig aufgetrennt wird. Die Unterlage mit den gebundenen Rezeptoroligos wird dann mit der Analytnucleinsäure in Kontakt gebracht, so dass eine Hybridisierung stattfinden kann, wobei ein Probenkomplex gebildet wird. Das Sondenoligonucleotid kann dann entweder auch gleichzeitig mit der Analyt-

- 10 -

nucleinsäure oder anschließend zugegeben werden oder an einer als Stempel bezeichneten zweiten Oberfläche immobilisiert werden und dann mit den auf der Unterlage gebundenen Nucleinsäuren so in Kontakt gebracht werden, dass es zu einer Hybridisierung zwischen Sondenoligo und Analytnucleinsäure kommt, wobei ein Referenzkomplex gebildet wird. Auf diese Weise kann eine Verkettung gebildet werden, die aus immobilisiertem Referenzoligo, Analytnucleinsäure und immobilisiertem Sondenoligo besteht. Auf diese Verkettung kann über die Oberflächen oder Träger, an denen die Oligonucleotide immobilisiert sind, eine Zugkraft ausgeübt werden. Wenn eine Zugkraft ausgeübt wird, geht die schwächere der beiden Bindungen auf, d.h. entweder die Bindung zwischen Rezeptoroligo und Analytnucleinsäure oder zwischen Sondenoligo und Nucleinsäure. Die Reihenfolge ist hier nur beispielhaft beschrieben. Andere Reihenfolgen der Verkettung sind genauso möglich. Es wird dann nachgewiesen, welche der beiden Bindungen aufgegangen ist.

In einer anderen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Rezeptoroligonucleotid immobilisiert und mit der Probe, die die zu analysierende Nucleinsäure enthält, in Kontakt gebracht, so dass die Analytnucleinsäure mit dem Rezeptoroligo hybridisieren kann, wobei die Reihenfolge der Arbeitsschritte beliebig ist. Es wird ein Stempel vorbereitet, an dem das Sondenoligonucleotid immobilisiert ist. Weiterhin wird mit diesem Sondenoligonucleotid ein Referenznucleotid hybridisiert, das eine Basensequenz aufweist, die zu einer Sequenz der Analytnucleinsäure, die außerhalb des Bereichs, in dem Mutationen vermutet werden, liegt. Auch hier ist die Reihenfolge der Arbeitsschritte beliebig. Die Anzahl der miteinander hybridisierenden Basenpaare zwischen diesem Referenzstrang und der Analytnucleinsäure ist weitaus höher als die von zu bildendem Referenzkomplex und Probenkomplex und dient nur der zuverlässigen Verbindung der beiden zu überprüfenden Komplexe. Dieser zusätzliche Hybridisierungsstrang soll auf jeden Fall so viele miteinander bindende Basenpaare aufweisen, dass seine Trennkraft weitaus über der Trennkraft der beiden Komplexe liegt, so dass er in jedem Fall bestehen bleibt. Wie bei der vorhergehenden Variante wird auch hier anschließend eine Zugkraft auf die gebildete Verkettung ausgeübt und dann nachgewiesen, welche der beiden Komplexe sich gelöst hat.

In einer weiteren Variante (bei der wiederum die Reihenfolge der Arbeitsschritte, soweit sinnvoll, frei gewählt werden kann) wird die Analytnucleinsäure auf einer Unterlage immobilisiert. Die Unterlage mit immobilisierter Analytnucleinsäure wird mit dem Rezeptoroligonucleotid unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, dass eine Hybridisierung erfolgen kann. An einem Stempel wird ein Sondenoligonucleotid immobilisiert und mit einem Referenzstrang, wie in der vorhergehenden Variante ausgeführt, hybridisiert. Sowohl das Rezeptoroligonucleotid als auch der Referenzstrang weisen zueinander komplementäre Basen auf. Unterlage und Stempel werden dann so miteinander in Kontakt gebracht, dass die komplementären Basen von Referenzstrang und Rezeptoroligonucleotid miteinander hybridisieren können. Die Anzahl der miteinander hybridisierenden Basenpaare zwischen diesem Referenzstrang und dem Rezeptoroligonucleotid ist weitaus höher als die von zu bildendem Referenzkomplex und Probenkomplex und dient nur der zuverlässigen Verbindung der beiden zu überprüfenden Komplexe. Dieser zusätzliche Hybridisierungsstrang soll auf jeden Fall so viele miteinander bindende Basenpaare aufweisen, dass seine Trennkraft weitaus über der Trennkraft der beiden Komplexe liegt, so dass er in jedem Fall bestehen bleibt. Nach der Hybridisierung wird dann wiederum eine Zugkraft auf die gebildete Verkettung aus Analytnucleinsäure, Rezeptoroligonucleotid, Referenzstrang, Sondenoligonucleotid ausgeübt, wobei wiederum die Bindung sich löst, die die geringste Trennkraft aufweist.

Weitere Varianten dieser beschriebenen Verfahrensvarianten sind möglich und können vom Fachmann leicht aufgefunden werden. Wie ausgeführt, ist wesentliches Merkmal, dass zwei Duplexe in ihrer Bindungskraft miteinander verglichen werden können und daraus, welche Bindung sich löst, Rückschlüsse auf die Art der Hybridisierung gezogen werden können.

Für das erfindungsgemäße Verfahren wird eine zu untersuchende Nucleinsäure mit zwei verschiedenen Oligonucleotiden in Kontakt gebracht, von denen ein Oligonucleotid einen definierten Sequenzabschnitt aufweist, der komplementär ist zu dem Bereich der zu analysierenden Nucleinsäure, in dem die Variation oder Mutation vermutet wird. Dieses Oligonucleotid wird als Rezeptoroligo bezeichnet. Die zweite Art von Oligonucleotid, mit

dem die zu analysierende Nucleinsäure in Kontakt gebracht wird, hat einen definierten Sequenzabschnitt, der zu einem anderen Abschnitt komplementär ist. Dieses Oligonucleotid wird als Sondenoligo bezeichnet. Die Sequenz des Sondenoligos sollte nicht mit demselben Abschnitt, wie das Rezeptoroligo hybridisieren, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Außerdem sollten sich die Einzelstränge gegenseitig bei der Hybridisierung nicht behindern. In einer bevorzugten Ausführungsform kann das Sondenoligo aber die reverse Sequenz zu der Sequenz des Rezeptoroligos aufweisen. Dies hat mehrere Vorteile. Es vereinfacht die Herstellung der Oligonucleotide, es verhindert Kreuzreaktionen und es schafft Komplexe, die bezüglich der Bindungskraft vergleichbar sind.

Um jeweils nachweisen zu können, welche Bindungen sich gelöst haben, weist mindestens eine der eingesetzten Nucleinsäuren eine Markierung auf. Bevorzugt sind zwei der eingesetzten Nucleinsäuren mit einer Markierung versehen. Die Markierung kann den Molekülen oder Duplexen inhärent sein oder kann eingeführt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die zu analysierende Nucleinsäure mit einer Markierung versehen. Hierzu gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die Art der Markierung hängt unter anderem davon ab, auf welche Weise die zu untersuchende Nucleinsäure gewonnen wurde. So kann die Markierung direkt an die zu untersuchende Nucleinsäure gebunden werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Markierung eingeführt, indem die zu untersuchende Nucleinsäure unter Verwendung von PCR erzeugt wird, wobei der hierzu einzusetzende Primer eine Markierung aufweist, wobei das Primerpaar, das für die PCR eingesetzt wird, eine Sequenz hat, die die Stelle flankiert, die die mögliche Variation enthält, oder wobei die eingebauten Nucleotide eine Markierung aufweisen.

Als Markierung kann für das erfindungsgemäße Verfahren jede analytisch nachweisbare Gruppe oder Substanz verwendet werden. Unter Markierung wird im Rahmen der Erfindung dabei eine Eigenschaft verstanden, durch die sich einige Bindungspartner von anderen unterscheiden, und die nachweisbar ist. Bevorzugt werden physikalisch nachweisbare Parameter herangezogen. Die Markierung kann dem Molekül oder Komplex inhärent sein oder aber eingeführt oder gebunden werden. Insbesondere kommen für die Markierung radioaktive Atome oder Gruppen, die eine Änderung optischer oder elektri-

scher Eigenschaften bewirken, in Betracht. Alle dem Fachmann bekannten Reportergruppen sind hier geeignet. Beispiele sind radioaktive Marker wie ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , fluoreszierende, lumineszierende, chromophore Gruppierungen oder Farbstoffe, Halbleiterteilchen, Metalle oder leitfähige Gruppen aber auch Substrate von Enzymen oder Reporterenzyme. Bevorzugt werden fluoreszierende oder chromophore Gruppen als Markierung verwendet. Mindestens eines der Oligonucleotide weist eine Markierung auf.

Vorzugsweise handelt es sich bei der Markierung um einen Fluoreszenzfarbstoff, beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Fluorescein, Rhodamin, Tetramethylrhodamin-5-(und-6)-isothiocyanat (TRITC), Texas Red, Cyaninfarbstoffe (CY3 oder CY5) usw. Fluoreszenzfarbstoffe sind vorteilhaft, da sie in sehr geringer Menge nachgewiesen werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden pro Verkettung zwei Markierungen verwendet, die bevorzugt verschieden voneinander sind. Bei der Verwendung von verschiedenen fluoreszierenden Markierungen können solche verwendet werden, die jeweils durch Licht gleicher Wellenlänge oder durch Strahlung verschiedener Wellenlängen angeregt werden.

Die Markierung dient dazu, nachzuweisen, wo sich das Sondenoligo bzw. Referenzoligo befindet und gegebenenfalls, wo sich der mit der Analytnucleinsäure hybridisierbare Rezeptoroligonucleotid bzw. der Analyt nach Anwenden einer Zugkraft befindet (Beispiele finden sich in Figur 4). Aus diesen Informationen kann dann abgeleitet werden, welche Stränge sich jeweils verbunden und wieder voneinander getrennt haben. Daraus kann dann wiederum geschlossen werden, ob die Analytnucleinsäure Variationen oder Mutationen gegenüber dem Wildtyp aufweist. Die Doppelmarkierung gewährleistet, dass lediglich diejenigen Verkettungen ausgewertet werden, die auch gekoppelt hatten.

Die zu untersuchende Nucleinsäure kann genomische DNA, RNA, PNA oder Modifikationen sein. Es kann sich auch um c-DNA handeln. Für die Untersuchung kann die Nucleinsäure direkt aus Zellen gewonnen werden, und, falls genug Kopien von der interessie-

- 14 -

renden Sequenz in der Zelle vorhanden sind, diese Sequenz direkt für den Test eingesetzt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die zu untersuchende Nucleinsäure jedoch in einem ersten Schritt mit einer PCR amplifiziert und das amplifizierte Produkt dann für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet. Wenn eine PCR zur Amplifikation eingesetzt wird, so wird bevorzugt die Amplifikation mit einem markierten Primer durchgeführt, um auf diese Weise markierte Nucleinsäuresequenzen zu gewinnen. Die Primer werden in an sich bekannter Weise so ausgewählt, dass sie die interessierende Sequenz flankieren. Die Primer können dabei eine Länge von jeweils bis zu 30 Nucleotiden, bevorzugt 15 bis 20 Nucleotide haben.

Die Länge der verwendeten Nucleinsäure hängt unter anderem davon ab, ob eine Mutation oder Variation oder mehrere Variationen oder Mutationen nachgewiesen werden sollen und in welchem Bereich sich diese dann befinden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist besonders gut geeignet für Nucleinsäuresequenzen mit bis zu 100 Nucleotiden, insbesondere für solche Sequenzen, die 30 bis 50 Nucleotide aufweisen. Beim Nachweis bekannter Einzelbasenmutationen können auch noch kürzere Nucleinsäuresequenzen verwendet werden.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die markierte zu analysierende Nucleinsäure mit einem Rezeptoroligo und einem Sondenoligo in Kontakt gebracht. Der Rezeptoroligo ist eine Nucleinsäure, die zu einem Ende der zu analysierenden Nucleinsäure komplementär ist, während der Sondenoligo zum anderen Ende oder einem Referenzstrang komplementär ist. Der Rezeptoroligo hat eine Nucleotidsequenz, die entweder dem interessierenden Abschnitt der Wildtypsequenz der zu untersuchenden Nucleinsäure entspricht, oder eine Variation oder Mutation aufweist. Die der Wildtypnucleinsäure entsprechende Sequenz wird als Rezeptor_{WT}-Oligo bezeichnet, während solche Rezeptoroligos, die Variationen und Mutationen enthalten, als Rezeptor_M-Oligos bezeichnet werden.

- 15 -

Bei den Mutationen und Variationen kann es sich um den Austausch einer oder mehrerer Basen, bevorzugt einer Base, oder aber die Veränderung einer oder mehrerer Basen handeln, die zu einer Veränderung des Bindungsverhaltens führt. Dabei wird als Mutation oder Variation jede denkbare Veränderung in der chemischen Struktur des Nucleotids aufgefasst, die gegenüber einem ursprünglichen Zustand einen Trennkraftunterschied in einem Kraftvergleich bewirkt.

Der Sondenoligo dient dazu, mit einem weiteren Strang, der die Analytnucleinsäure oder aber ein Referenzstrang sein kann, einen Referenzkomplex zu bilden. Der Referenzkomplex sollte dem Probekomplex möglichst ähnlich sein, um die Differenzierung geringer Trennkraftunterschiede zwischen zwei Probekomplexen zu ermöglichen.

Bevorzugt wird als Sondenoligo eine Nucleotidsequenz eingesetzt, die zu einem Teil der zu analysierenden Nucleinsäure komplementär ist, in dem keine Mutation oder Variation vermutet wird. Außerdem wird die Sequenz des Sondenoligos bevorzugt so ausgewählt, dass es hier bei der Hybridisierung mit dem Referenzstrang bzw. der Referenzsequenz zu einem Perfect Match kommt. In besonderen Ausführungsformen kann es auch bevorzugt sein, eine vorbestimmte Anzahl an Mismatches vorzusehen, wenn beispielsweise bei der zu analysierenden Nucleinsäure mehr als eine Fehlbasenpaarung vermutet wird oder nachgewiesen werden soll.

Die Länge der hybridisierenden Sequenz des Sondenoligos wird bevorzugt so ausgewählt, dass die Kraft, die notwendig ist, den Referenzkomplex zu trennen, der Kraft, die notwendig ist, den Probenkomplex zu trennen, sehr nahe kommt. Wenn man für den Referenzkomplex eine Sequenz auswählt, die das gleiche GC-Verhältnis, wie der Probenkomplex hat, ist die Anzahl der Basenpaare bevorzugt im selben Bereich und unterscheidet sich bevorzugt nur um bis zu 2 Basenpaare. Wenn sich das GC-Verhältnis zwischen beiden Komplexen unterscheidet, kann die Länge der zu hybridisierenden Sequenz danach ausgewählt werden, dass die Trennungskraft sich der des Probenkomplexes annähert. Auch das Einfügen eines oder mehrerer Mismatches kann zur Einstellung des optimalen Referenzkomplexes dienen.

- 16 -

In einer Ausführungsform wird die zu analysierende Nucleinsäure mit Rezeptoroligos und Sondenoligos unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, dass eine Hybridisierung stattfinden kann. Dabei hybridisiert der Sondenoligo mit einem Ende der zu analysierenden DNA unter Bildung eines Perfect Match, während das andere Ende der zu untersuchenden DNA mit Rezeptoroligos hybridisiert, wobei es zu einem Perfect Match oder einem Mismatch kommt, je nachdem, ob die Sequenz des Rezeptors der zu untersuchenden DNA entspricht oder nicht.

Durch das In-Kontakt-Bringen mit den beiden Arten von Oligos bildet sich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren in der beschriebenen Ausführungsform eine Verkettung aus Rezeptoroligo - Analytnucleinsäure – Sondenoligo, wie beispielsweise in Figur 4 gezeigt. Zur weiteren Untersuchung der Bindungen, die die Analytnucleinsäure eingegangen ist, muss die Verkettung immobilisiert sein oder werden. Erfindungsgemäß werden daher die Oligonucleotide bzw. der Analyt entweder bereits in immobilisierter Form eingesetzt oder aber es werden immobilisierbare Oligonucleotide bzw. Analyten eingesetzt, die nach der Hybridisierung immobilisiert werden.

Eine Immobilisierung der Oligonucleotide kann in an sich bekannter Weise erfolgen, indem die Nucleotide über Spacer oder Brückenmoleküle an einen Träger oder eine Oberfläche gebunden werden. In jedem Fall muss der Träger oder die Oberfläche so ausgebildet sein, dass eine Zugkraft angelegt werden kann. Es kann sich hierbei um makroskopische Oberflächen, aber auch um andere Festkörper, wie Kügelchen, oder Moleküle handeln. Besonders bevorzugt erfolgt die Immobilisierung, indem die Rezeptoroligonucleotide an einer ersten Oberfläche immobilisiert sind oder werden, während die Sondenoligos an einer zweiten Oberfläche immobilisiert sind oder immobilisiert werden.

Wenn für die Immobilisierung Oberflächen verwendet werden, so kann das Material, aus dem die Oberflächen bestehen, gleich oder verschieden sein und eine der beiden oder beide Oberflächen können in geeigneter Weise beschichtet sein. Bevorzugt ist entweder eine Oberfläche aus einem steifen Material und die andere aus einem elastischen Material gebildet oder beide Oberflächen sind aus elastischem Material, sodass sich die jeweiligen Flächenabschnitte der ersten und zweiten Oberfläche beim Inkontaktbringen genau

aneinander anpassen können und damit ein optimaler Kontakt der einzelnen Nucleinsäurestränge und gegebenenfalls Bindepartner möglich ist. Die Oberflächen können beispielsweise aus Glas, Silicon, insbesondere Polydimethylsiloxan (PDMS), Nylon, Polystyrol oder anderen Kunststoffen gebildet werden. Bevorzugt wird mindestens eine der beiden Oberflächen aus einem elastischen Material hergestellt, bevorzugt einem elastischen Kunststoff. Besonders bevorzugt wird mindestens eine Oberfläche aus einem Siloxan, insbesondere Polydimethylsiloxan, gebildet. Es sind verschiedene andere flexible Materialien oder Mischungen davon möglich. Ein anderes mögliches Material ist Polyacrylamidgel, dessen elastische Eigenschaften durch das Molekulargewicht und den Vernetzungsgrad den experimentellen Bedürfnissen angepasst werden können. Die Oberfläche kann aus einem einzigen Material, einem Gemisch von Materialien oder auch einem System von Elementen aus einem oder verschiedenen Materialien aufgebaut sein.

Die Immobilisierung der Oligonucleotide oder Nucleinsäuren, kann in an sich bekannter Weise erfolgen, es kommen sowohl kovalente als auch nicht-kovalente Bindungen und Bindungen direkt an die Oberfläche oder über Brückenmoleküle in Betracht. Möglich ist auch die Immobilisierung über die Partner eines spezifisch bindenden Paares. Die Immobilisierung soll dabei jeweils so erfolgen, dass bei der Hybridisierung ein Duplex entsteht, der bei Anwendung einer Zugkraft nicht reiverschlussartig aufgetrennt wird. In letzterem Fall ist einer der beiden Partner des spezifisch bindenden Paares permanent immobilisiert und der andere an ein Nucleotid oder die Analytnucleinsäure gebunden, wobei unter permanenter Bindung hier eine Bindung verstanden wird, die vor dem Inkontaktbringen der Oberflächen im Wesentlichen stabil bleibt und sich auch durch Bindung des Bindungspartners an sein spezifisches Pendant nicht löst. Eine permanente Bindung kann z.B. über funktionelle Gruppen, die der Bindepartner aufweist oder die in das Molekül eingeführt wurden, an funktionelle Gruppen, die die Oberfläche bereitstellt, erfolgen.

Eine bevorzugte Methode besteht darin, einen Partner zu biotinylieren und über ein Streptavidinmolekül mit der ebenfalls biotinylierten Oberfläche zu verbinden. Monoklonale Antikörper können chemisch aktiviert werden, indem man bestimmte Gruppen ihrer Glycosylierungen zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese Aldehydgruppen können wiederum

Aminogruppen oder Hydrazidgruppen einer modifizierten Oberfläche binden (siehe Solomon et al., Journal of Chromatographie, 1990, Bd. 510, 321-329). Eine weitere Methode, die dem Fachmann geläufig ist, ist die Konjugation von Aminogruppen des Antikörpers mit Carboxygruppen einer Oberfläche durch den Einsatz von Ethyl-(Dimethylamino)-Carbodiimid/N-Hydroxy-Succinimid.

Die Immobilisierung der Oligonucleotide kann in an sich bekannter Weise über Spacer oder Brückenmoleküle erfolgen. Der Fachmann kennt Möglichkeiten, mit denen Nucleotide an Oberflächen gebunden werden können. Die Immobilisierung sollte dabei so erfolgen, dass die zu der zu analysierenden Nucleinsäure komplementäre Sequenz für die Hybridisierung zugänglich ist.

In einer weiteren Ausführungsform werden Oligonucleotide eingesetzt, die immobilisierbar sind und erst nach der Hybridisierung immobilisiert werden.

Erfindungsgemäß können dabei sowohl nur eine Art von Oligonucleotiden, als auch beide Arten von Nucleotiden immobilisierbar sein.

Als immobilisierbare Nucleotide werden solche verwendet, die an einem Ende einen Partner eines spezifisch bindenden Paares aufweisen, wobei der andere Partner des spezifisch bindenden Paares an einer Oberfläche kovalent gebunden ist. Beim Inkontakt-Bringen der Nucleotide mit der Oberfläche kommt es dann zur Bindung der spezifisch bindenden Partner, wodurch eine Immobilisierung erfolgt. Als spezifisch bindefähige Paare kommen die verschiedensten miteinander bindefähigen Partner in Betracht, wobei sich die Spezifität der Bindung sowohl auf einen speziellen Partner beziehen kann, wie z.B. Antigen-zugehöriger Antikörper oder Biotin-Avidin/Streptavidin, als auch auf eine Gruppe oder Klasse von Verbindungen, z.B. Antikörper-Protein A.

In einer Ausführungsform werden als Bindungspaar Antikörper und eine Substanz mit einem von diesem erkannten Epitop, wie Antigene, Haptene oder Anti-Idiotyp-Antikörper, verwendet. Unter dem Begriff "Antikörper" werden in der vorliegenden Beschreibung auch Antikörperfragmente oder Antikörperderivate, sowie funktionelle Fragmente von

Antikörpern oder Derivate davon, die das Epitop erkennen und binden können, verstanden. Die Antikörper können polyklonale oder monoklonale Antikörper sein, bevorzugt sind aber monoklonale Antikörper. Bekannte Fragmente und Derivate sind Fv-, Fab-, Fab'- oder F(ab')₂-Fragmente, "single-chain antibody fragments", bispezifische Antikörper, chimäre Antikörper, humanisierte Antikörper sowie Fragmente, die CDRs (complementarity determining regions) enthalten, die ein Epitop der Probe erkennen.

Die Auswahl des spezifisch bindenden Paares ist nicht kritisch. Wichtig ist nur, dass die zur Trennung des spezifisch bindenden Paares erforderliche Trennkraft größer ist als die zur Trennung der hybridisierten Stränge notwendige Trennkraft.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind verschiedene Varianten möglich, die je nach dem Anwendungszweck und den Gegebenheiten des jeweiligen Tests ausgewählt werden können. Im Folgenden werden einige Varianten der Reihenfolge und Art der Verkettung angegeben. In einer ersten Variante wird die zu analysierende DNA mit Rezeptoroligonucleotid und Sondenoligonucleotid unter Bedingungen, die eine Hybridisierung zulassen, umgesetzt und anschließend durch In-Kontakt-Bringen der hybridisierten Moleküle mit zwei Oberflächen, die jeweils spezifisch bindende Partner für die beiden Oligonucleotide bereitstellen, eine Immobilisierung herbeigeführt.

In einer zweiten Ausführungsform wird einer der beiden Oligonucleotide, entweder Rezeptoroligonucleotid oder Sondenoligonucleotid an einer Oberfläche immobilisiert, anschließend mit der anderen Art von Oligonucleotid und der zu analysierenden Nucleinsäure in Kontakt gebracht, so dass es zu einer Bindung von Rezeptoroligonucleotid - Analytnucleinsäure - Sondenoligonucleotid, immobilisiert an einer Oberfläche, kommt und anschließend wird die zweite Oberfläche mit dieser Verkettung in Kontakt gebracht, so dass ein an der zweiten Oberfläche gebundener Bindepartner eines spezifisch bindenden Paares mit dem an dem noch nicht immobilisierten mit einem Bindepartner versehenen Nucleotid binden kann.

In einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Rezeptoroligonucleotide an einer ersten Oberfläche immobilisiert, während Sondenoligonucleotide an einer

- 20 -

zweiten Oberfläche immobilisiert werden. Es wird dann entweder die erste Oberfläche oder die zweite Oberfläche mit der Analytnucleinsäure unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, dass eine Hybridisierung stattfindet und anschließend die andere Oberfläche mit der nun an ein Oligonucleotid gebundenen Analytnucleinsäure so in Kontakt gebracht, dass eine weitere Hybridisierung stattfinden kann, so dass sich wiederum eine Verkettung bildet.

Bei allen Varianten wird dann, wenn sich die Verkettung gebildet hat und die Immobilisierung der beiden Oligonucleotidarten stattgefunden hat, eine Trennung der beiden Oberflächen durchgeführt, so, dass eine der Bindungen sich löst.

Anschließend wird dann festgestellt, welche der Bindungen sich überwiegend gelöst hat, woraus dann Rückschlüsse darauf gezogen werden können, ob die zu analysierende Nucleinsäure dem Wildtyp entspricht oder eine Mutation oder Variation aufweist. Dazu wird überprüft, wo sich die Markierung befindet. Befindet sich die Markierung auf der Oberfläche, auf der das Sondenoligonucleotid gebunden ist, muss die Bindung bei der oben beschriebenen Ausführungsform zwischen Sondenoligo und Analytnucleinsäure stärker sein als die Bindung zwischen Rezeptoroligo und Analytnucleinsäure. Da es sich bei der Hybridisierung von Sondenoligonucleotid mit Analytnucleinsäure in der Regel um einen Perfect Match handelt, ist dies dann der Fall, wenn bei der Hybridisierung zwischen Rezeptoroligonucleotid und zu analysierender DNA mindestens eine Fehlpaarung vorliegt oder ein Nucleotid so verändert ist, dass die Bindung schwächer ist als bei einem "normalen" Nucleotid.

Aussagekräftige Ergebnisse erhält man dann, wenn die Trennung der Verkettungen gleichzeitig unter gleichen Bedingungen an vielen Komplexen durchgeführt wurde. Wenn man dann die Anzahl der getrennten Probenkomplexe und die Anzahl der getrennten Referenzkomplexe in Beziehung setzt, so erhält man ein Verhältnis, das Rückschlüsse auf die Art der Hybridisierung zulässt, wie oben bereits ausgeführt.

Damit kann man durch Auswahl des geeigneten Sondenoligonucleotids für jede gewünschte Analytnucleinsäure ein empfindliches Nachweisverfahren auf Variationen und

Mutationen durchführen, indem man die Analyt-DNA mit Rezeptoroligonucleotiden in Kontakt bringt, von denen einige dem Wildtyp entsprechen und andere mindestens eine Veränderung in der Sequenz aufweisen, so dass ein Vergleich zwischen Wildtyp und Veränderung möglich ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform können beispielsweise für den Nachweis eines SNP's vier verschiedene Rezeptoroligos eingesetzt werden, die sich an der für den SNP vermuteten Stelle in der Base unterscheiden, so dass jede Base an dieser Stelle einmal vorkommt. Führt man dann das erfindungsgemäße Verfahren mit den vier Rezeptoroligos gleichzeitig durch, und vergleicht danach die Häufigkeit, mit der sich Komplexe mit Rezeptoroligos getrennt haben, so ist zu erwarten, dass bei den drei Oligos, bei denen ein Mismatch zu erwarten ist, das Ergebnis sich von dem einen Oligo unterscheidet, bei dem ein Perfect Match entstanden ist. Diese Ausführungsform führt daher zu besonders aussagekräftigen Ergebnissen.

Erfindungsgemäß wird somit ein Verfahren zur Verfügung gestellt, mit dem Mutationen oder Variationen einer Nucleinsäuresequenz einfach und schnell nachgewiesen werden können. Der Kern der Erfindung besteht darin, dass gleichzeitig viele Hybridisierungen durchgeführt werden können und die Trennkraft der hybridisierten Stränge an vielen Molekülen gleichzeitig nachgewiesen werden kann.

In einer weiteren Ausführungsform wird das Verfahren noch aussagekräftiger durch Verwendung einer zweiten Markierung. Bei dieser Ausführungsform wird sowohl die zu analysierende Nucleinsäure mit einer Markierung versehen, als auch die Sondenoligonucleotide. Dies ist eine Ausführungsform, bei der die Sondenoligonucleotide immobilisierbar sind, bei der Umsetzung mit der nachzuweisenden DNA aber noch nicht immobilisiert sind. Die Sondenoligonucleotide werden mit einer Markierung versehen, die sich von der Markierung, mit der die zu analysierende DNA versehen ist, unterscheidet. Nach Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei dem wiederum die Analytnucleinsäure mit Rezeptoroligonucleotiden und Sondenoligonucleotiden in Kontakt gebracht wird, eine Hybridisierung und anschließend Immobilisierung herbeigeführt wird und dann an die Verkettung auf beiden Seiten eine Zugkraft angelegt wird, um eine der Bindungen der

- 22 -

Verkettung zu lösen. Anschließend wird eine Oberfläche analysiert daraufhin, wie viel von den Sondenoligonucleotiden an die Oberfläche gebunden hat und wie viel von der zu analysierenden DNA gebunden hat. Durch Ermittlung des Quotienten von gebundenen Sondenoligonucleotiden zu gebundenen Analytnucleinsäuren lässt sich noch genauer nachweisen, ob eine Variation oder Mutation vorliegt, da nur die Komplexe untersucht werden, bei denen tatsächlich eine Immobilisierung der Sondenoligonucleotide stattgefunden hat.

Bei den beschriebenen Ausführungsformen ist die Reihenfolge der Arbeitsschritte variabel. Es sollte allerdings darauf geachtet werden, dass zuerst die unmarkierten Komponenten immobilisiert werden und zuletzt die markierten.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist, wie bereits oben ausgeführt, gegenüber den Verfahren des Standes der Technik verschiedene Vorteile auf. So hat es gegenüber den bekannten enzymatischen Methoden den Vorteil, dass keine Enzyme eingesetzt werden müssen, was Kosten spart. Außerdem muss bei der Durchführung des Verfahrens und der Auswahl der Reaktanden, z.B. der Zusammenstellung des Puffers nicht auf die Enzyme Rücksicht genommen werden.

Im Gegensatz zu enzymatischen Methoden können auch Heteroduplexe verwendet werden, für die keine Enzyme verfügbar sind, wie z.B. bei DNA-RNA- oder DNA-PNA-Duplexe. Im Gegensatz zu SSP können viele Proben parallel getestet werden, ohne dass es zu einer Kreuzreaktion kommt, wie es bei vielen Primer-Pärchen im gleichen Ansatz der Fall ist.

Im Gegensatz zur stringenten Hybridisierung können viele verschiedene Probenkomplexe in einem Ansatz diskriminiert werden. Die Stringenz wird für jeden Probenkomplex quasi über die Trennkraft des Referenzkomplex vorgegeben. Außerdem sind, anders als bei der stringenten Hybridisierung, keine Waschungen mit Temperatur- oder Salzgradienten notwendig.

Die Erfindung wird durch die Figuren und folgenden Beispiele erläutert.

Fig. 1 zeigt dabei das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei auf eine beidseitig immobilisierte Verkettung aus Rezeptoroligonucleotid-Analytnucleinsäure und Sondenoligonucleotid eine Kraft ausgeübt wird. Die beiden Möglichkeiten für die Trennung des Komplexes sind gezeigt.

Fig. 2 zeigt zwei Beispiele für die Verkettung eines Wildtyprezeptors mit Analytnucleinsäure und Sondenoligonucleotid und eines eine Mutation aufweisenden Rezeptors mit Analytnucleinsäure und Sondenoligonucleotid.

Fig. 3 zeigt die verschiedenen Möglichkeiten für Kopplung der Komponenten Rezeptoroligonucleotid, Analytnucleinsäure und Sondenoligonucleotid.

Fig. 4 zeigt verschiedene Möglichkeiten der Kopplung und der Immobilisierung der Komponenten

Figur 5 zeigt den Fluoreszenzscan eines Spots, der auf einen Stempel übertragen wurde (Bsp.2)

Figur 6 zeigt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei zwei auf den Stempel übertragenen Spots. Mismatch (links) und Perfect Match (rechts). (Bsp. 3)

Figur 7 zeigt ein Histogramm der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten für Mismatch-Spots und Perfect-Match-Spots (Bsp.3).

Figur 8 zeigt das Hybridisierungsschema der bei Beispiel 4 verwendeten Oligonukleotide.

Figur 9 zeigt bei der Ausführungsform von Beispiel 4 oben den Übertrag eines PM-Spots und eines MM-Spots auf den Stempel; unten sind PM- und MM-Spot auf dem Objektträger nach dem Stempeln abgebildet; daneben sind die jeweiligen Histogramme zu sehen.

In Figur 3 sind die folgenden fünf Varianten dargestellt.

Bei Variante 1 ist das Rezeptoroligonucleotid an einer Unterlage immobilisiert. Es hybridisiert mit der Analytnucleinsäure. Die Analytnucleinsäure weist an ihrem anderen Ende eine spezifisch bindefähige Gruppierung auf, die mit dem entsprechenden Bindepartner umgesetzt wird. Der Bindepartner hat eine Bindungsstelle, die an einen Stempel binden kann. Durch den Kopplungsschritt wird der Bindepartner an dem Stempel immobilisiert, so dass sich eine Verkettung bildet, auf die eine Zugkraft ausgeübt werden kann.

In Variante 2 wird ein Bindepartner an einer Oberfläche immobilisiert und mit dem spezifisch damit bindenden Partner, der an einer Analytnucleinsäure vorhanden ist, umgesetzt. Die über das spezifisch bindende Paar an der Oberfläche immobilisierte Analytnucleinsäure wird mit einem Rezeptoroligonucleotid in Kontakt gebracht, das an seinem anderen Ende eine Gruppe aufweist, die an eine Oberfläche binden kann. Durch Bindung des Rezeptoroligonucleotids an die Oberfläche entsteht wiederum eine Verkettung, auf die eine Zugkraft ausgeübt werden kann.

In Variante 3 wird über ein spezifisch bindendes Paar eine Analytnucleinsäure gebunden. An einer zweiten Oberfläche wird ein Rezeptoroligonucleotid immobilisiert. Beide Oberflächen werden dann so miteinander in Kontakt gebracht, dass die komplementären Nucleotide von Rezeptoroligonucleotid und Analytnucleinsäure hybridisieren können. Auf die gebildete Verkettung kann dann wieder eine Kraft ausgeübt werden.

Bei Variante 4 wird ein Rezeptoroligonucleotid an einer Oberfläche immobilisiert und mit einer Analytnucleinsäure so in Kontakt gebracht, dass eine Hybridisierung stattfinden kann. Die Analytnucleinsäure weist an ihrem anderen Ende einen Partner eines spezifisch bindenden Paares auf. Der andere Partner dieses spezifisch bindenden Paares ist an einer zweiten Oberfläche immobilisiert. Die beiden Oberflächen werden dann so miteinander in Kontakt gebracht, dass es zur Bindung des spezifisch bindenden Paares kommt. Auf diese Weise entsteht wieder eine Verkettung, auf die dann eine Kraft ausgeübt werden kann.

In der letzten Variante Nr. 5 ist ein Rezeptoroligonucleotid an einer Oberfläche immobilisiert und wird mit der Analytnucleinsäure in Kontakt gebracht, so dass komplementäre Nucleotide miteinander hybridisieren können. An einer zweiten Oberfläche ist ein spezifisch bindendes Paar immobilisiert. Sowohl der nicht immobilisierte zweite Partner des spezifisch bindenden Paares als auch die Analytnucleinsäure weisen jeweils eine Bindungsstelle auf, die miteinander reagieren kann. Wenn diese beiden Gruppen miteinander reagiert haben, kommt wieder eine Verkettung zustande, auf die wiederum Zug ausgeübt werden kann.

Die beiden Partner des spezifisch bindenden Paares sind in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zwei komplementäre Nucleinsäurestränge, die einen Referenzkomplex bilden. Die Nucleinsäurestränge werden dabei so vorgesehen, dass sie sich bezüglich der freien Basenpaarungsenergie und der Anzahl der Mismatches in vorbestimmter Weise von dem Probenkomplex unterscheiden oder gegebenenfalls bezüglich der freien Basenpaarungsenergie und Anzahl der Mismatches identisch sind.

Es ist auch möglich, statt der Nucleinsäurestränge ein anderes spezifisch bindendes Paar als Referenzkomplex zu verwenden, wobei dieses spezifisch bindende Paar so ausgewählt wird, dass die Bindungskraft vorbestimmt ist und der Bindungskraft des Probenkomplexes möglichst nahe kommt. Verfahren zur Bestimmung der freien Basenpaarungsenergie oder der Bindungskraft eines spezifisch bindenden Paares sind bekannt und werden in der Literatur beschrieben.

Besonders bevorzugt werden Probe- und Referenzkomplex so ausgewählt, dass sich die freie Basenpaarungsenergie ΔG möglichst wenig unterscheidet. Eine zuverlässige Bestimmung ist nicht mehr möglich, wenn die freie Basenpaarungsenergie von Probenkomplex und Referenzkomplex sich um mehr als 40 kcal/mol unterscheidet. Bevorzugt unterscheidet sich die freie Basenpaarungsenergie von Probe- und Referenzkomplex um nicht mehr als 20 kcal/mol. Besonders gute Ergebnisse werden erhalten, wenn der Unterschied von Probe- und Referenzkomplex ≤ 4 kcal/mol ist. Proben zur Bestimmung der

freien Basenpaarungsenergie von Nucleinsäureduplices sind bekannt. Ein Verfahren wird beispielsweise in K.J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker und L.A. Markie "Predicting DNA Duplexes Stability From The Base Sequence", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 83, Seiten 3746-3750, 1986, beschrieben.

Die folgenden Definitionen werden bei der Beschreibung der Beispiele verwendet.

Rezeptoroligo: Oligo, der mit dem Analyten einen Probenkomplex ausbildet

Sondenoligo: Oligo, der mit dem Analyten oder dem Referenzstrang einen Referenzkomplex ausbildet

Analyt: Oligo, PCR-Produkt oder andere Nucleinsäuren, auf denen ein Polymorphismus oder eine Mutation nachgewiesen werden soll.

Probengemisch: Substanzgemisch, das den Analyten enthält

Fehlpaarung: Basenpaar in einem Duplex, das keine spezifische Basenpaarung ausbildet

Trennkraft: Kraft, die an einer Verkettung auftritt, unmittelbar bevor diese durch eine angelegte Zugkraft getrennt wird

Bindungspartner: Partner eines spezifisch bindenden Paares

Wildtyp: ursprünglicher, bzw. von Mutante abweichende Form der Probensequenz

Mutation: veränderte, bzw. vom Wildtyp abweichende Form der Probensequenz, die zu einer Veränderung der Trennkraft des Probekomplexes führt

Beispiel 1

Bei dem folgenden Ausführungsbeispiel handelt es sich um den Nachweis einer möglicherweise vorhandenen Einzelbasenvariation (G→C) an einer bekannten Basenposition auf genomischer DNA.

Von genomischer DNA wird durch PCR ein Amplikon (Probenmolekül entspricht Analytnucleinsäure) hergestellt. Dabei flankiert das Primerpaar (Primer jeweils mit 18 Nucleotiden) eine Sequenz von 30 Basenpaaren, die die Stelle mit dem möglichen Basenaus-

- 27 -

tausch enthält. Primer 1, der an den nicht-codogenen Strang der genomischen DNA hybridisiert und zur Kopie des codogenen Strangs verlängert wird, ist mit einem Cy3-Molekül markiert.

Auf einem mit kovalent angebundenem Streptavidin beschichteten Objektträger werden auf zwei getrennten Spots von je 1mm^2 jeweils ca. 100 femtoMol eines von zwei verschiedenen Rezeptoroligos angebunden.

Die die Spots umgebende frei gebliebenen Streptavidinfläche der Beschichtung wird mit einem biotinylierten Poly-A-Oligo von 15bp Länge abgesättigt.

Bei dem Wildtyp-Rezeptor (Rez_{WT}) handelt es sich um ein 28 Nukleotide langes DNA-Oligo, das am 5'-Ende mit Biotin modifiziert ist, womit es an die Streptavidinoberfläche angebunden wird. Die Basen 1-10 dienen als Poly-A-Spacer. Die Basen 11 –28 (Alle Basen in 5'- 3'-Richtung gezählt) stellen die Rezeptorsequenz von Rez_{WT} dar. Dieser Sequenzabschnitt ist komplementär zu den Basen 30 bis 48 des amplifizierten codogenen Strangs der genomischen DNA in der nicht-mutierten Form.

Bei dem Mutanten-Rezeptor (Rez_{M}) handelt es sich um ein 28 Nukleotide langes Oligo, das am 5'-Ende mit Biotin modifiziert ist, womit es an der Streptavidinoberfläche angebunden wird. Die Basen 1-10 dienen als Poly-A-Spacer. Die Basen 11 –28 stellen die Rezeptorsequenz von Rez_{M} dar. Dieser Sequenzabschnitt ist komplementär zu Basen 30 bis 48 des codogenen Strangs der mutierten Form der genomischen DNA, die sich von der nicht mutierten Form bei Base 19 unterscheidet, an der ein C gegen ein G ausgetauscht ist. Rez_{M} ist somit vollständig komplementär zu einer Mutanten-DNA, bei der bei Base 39 ein G gegen ein C ausgetauscht ist.

Die Probe mit den Cy3-markierten Probenmolekülen, die eine Kopie des codogenen Strang darstellen, wird durch Kochen denaturiert und durch Kühlen auf Eis am Rehybridisieren gehindert. Zum Probengemisch wird der Sondenoligo (Sonde) gegeben. Dabei handelt es sich um ein DNA-Oligo von 28bp Länge. Die Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit

einem Cy5-Molekül und an ihrem 3'-Ende mit einem Biotin markiert. Die Basen 1-18 stellen die Sondensequenz dar und sind komplementär zu den Basen 18-1 des Probenmoleküls, welche die Referenzsequenz darstellen.

Die mit der Sonde versetzte Probe wird nun in 5 x SSC-Puffer zur Hybridisierung auf die Rezeptor-Spots des geblockten Objektträger gegeben. Nach einer Inkubation von 30min bei RT wird mit 1 x SSC gewaschen und mit 1 x SSC überschichtet.

Durch die Hybridisierung kommt es zur Ausbildung von Probenkomplex und Referenzkomplex, wie in Figur2 dargestellt, wobei die Verkettung über den Rezeptor an den Objektträger angebunden ist..

Ein mit Streptavidin beschichteter, mikrostrukturierter PDMS-Stempel wird nun unter 100mM NaCl-Puffer auf den Bereich der Rezeptorspots mit den immobilisierten Verkettungen aufgedrückt. Dabei kommt es zur Anbindung der biotinylierten Sondenoligos an den Stempel, bzw. zur Kopplung der Verkettungen zwischen Stempel und Objektträger. Der Stempel wird nach 30min von dem Objektträger getrennt, wobei es zur Lösung der Verkettungen durch Trennung jeweils eines Komplexes kommt. Zu beachten ist, dass dieser Vorgang auf jedem Spot an sehr vielen (~100 fMol) Verkettungen simultan ausgeführt wird.

Der Stempel wird nun in einem Fluoreszenzscanner hinsichtlich der Marker Cy3 und Cy5 ausgewertet. Die auf den Stempel übertragenen Sondenoligos und Probenmoleküle können so quantifiziert werden. Die von den Spots auf eine bestimmte Fläche des Stempels übertragene Menge an Cy5 wird mit der auf die gleiche Fläche übertragenen Menge Cy3 ins Verhältnis gesetzt. Die für die beiden Spots erhaltenen Quotienten werden miteinander verglichen.

Entsprechend der Formel $Q = (n_{Kop} - n_{Pro-}) / n_{Pro-}$ (vgl. unten) erhält man:

Für den Spot von Rez_{WT} : $Q_{WT} = (n(Cy5_{WT}) - n(Cy3_{WT})) / n(Cy3_{WT})$

Für den Spot von Rez_M : $Q_M = (n(Cy5_M) - n(Cy3_M)) / n(Cy3_M)$

Anhand der von dem Stempel ermittelten Quotienten lassen sich nun zwei Fälle unterscheiden:

Fall 1)

Das Probemolekül liegt in Wildtyp-Form vor (kein Austausch von G nach C an Base 39).

Der Probenkomplex aus Rez_{WT} und dem Probenmolekül ist vollständig gepaart (Perfect Match = PM).

Der Probenkomplex aus Rez_{M} und dem Probenmolekül weist an Base 39 eine Einzelbasenfehlpaarung zwischen G und G auf (Mismatch = MM).

Die Trennkraft für den Probenkomplex von Rez_{WT} ist folglich größer als die Trennkraft für den Probenkomplex von Rez_{M} :

$$F_{\text{Pro}}^*(\text{Rez}_{\text{WT}}) > F_{\text{Pro}}^*(\text{Rez}_{\text{M}})$$

Man erhält $Q_{\text{WT}} > Q_{\text{M}}$

Bei $Q_{\text{WT}} > Q_{\text{M}}$ kann also auf den Wildtyp geschlossen werden

Fall 2)

Das Probemolekül liegt in der Mutanten-Form vor (An Base 39 wurde G nach C ausgetauscht).

Der Probenkomplex aus Rez_{WT} und dem Probenmolekül weist an Base 39 eine Einzelbasenfehlpaarung zwischen C und C auf (Mismatch = MM).

Der Probenkomplex aus Rez_{M} und dem Probenmolekül ist vollständig gepaart (Perfect Match = PM).

Die Trennkraft für den Probenkomplex von Rez_{WT} ist kleiner als die Trennkraft für den Probenkomplex von Rez_{M} :

$$F_{\text{Pro}}^*(\text{Rez}_{\text{WT}}) < F_{\text{Pro}}^*(\text{Rez}_{\text{M}})$$

Man erhält $Q_{\text{WT}} < Q_{\text{M}}$

Bei $Q_{\text{WT}} < Q_{\text{M}}$ kann also auf die Mutante geschlossen werden.

Beispiel 2

SNP-Typing auf Oligonukleotiden

Bei diesem Beispiel wurden zwei Probesequenzen mit Längen von 14 bzw. 16 Nukleotiden hinsichtlich eines Einzelbasenaustauschs untersucht.

Bei den Probemolekülen handelte es sich um Oligonukleotide, die von 5' nach 3' aus folgenden Sequenzbestandteilen aufgebaut waren:

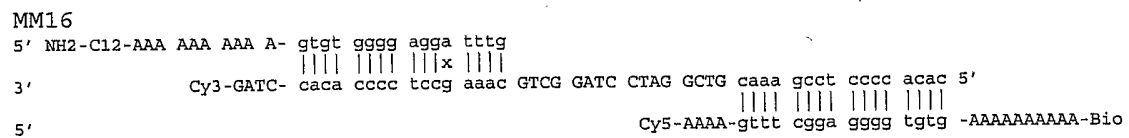
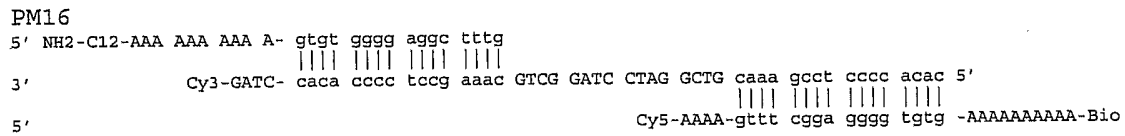
Einer Referenzsequenz von 16 bzw. 14 Nukleotiden, einer internen Spacersequenz von 16 bzw. 20 Nukleotiden, einer Probensequenz mit 16 bzw. 14 Nukleotiden und einer terminalen Spacersequenz von 4 Nukleotiden. Probesequenz und Referenzsequenz waren zueinander revers.

Die Rezeptoren bestanden aus einem am 5'-Ende konjugierten Amino-C12-Linker, einem Spacer aus 10 Nukleotiden ohne spezifische Bindungsfunktion (hier 10x Adenin) sowie aus einer ausgewählten Rezeptorsequenz mit einer Länge von 16 bzw. 14 Nukleotiden.

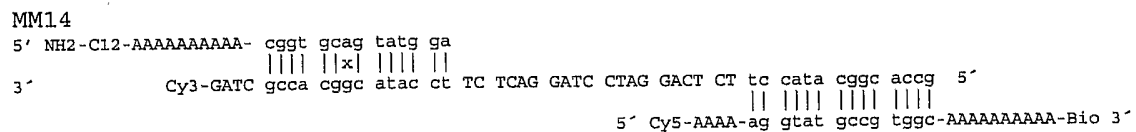
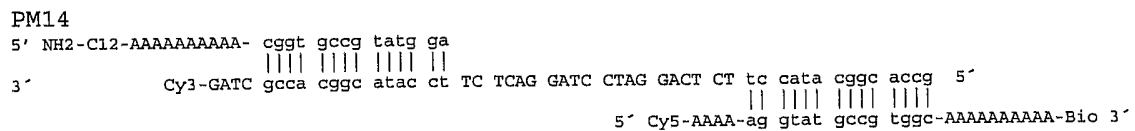
Passend zu zwei verschiedenen Wildtyp-Rezeptorsequenzen mit Längen von 14 und 16 Nukleotiden wurden Rezeptoren mit jeweils einem Basenaustausch zusammen gestellt. In der 14mer Probesequenz wurde das Cytosin an Position 7 durch Adenin ersetzt. In der 16mer-Probensequenz wurde Cytosin an Position 12 durch Adenin ersetzt.

Die Sondenoligos bestanden aus einem am 5'-Ende konjugierten Cy5-Molekül, einem Spacer aus 4 Nukleotiden ohne spezifische Bindungsfunktion (4x Adenin) sowie aus einer Sequenz, die zur Referenzsequenz komplementär war (16 bzw. 14 Nukleotide), sowie einem weiteren Spacer (10xAdenin) mit einer 3'-terminalen Biotingruppe.

Der Aufbau der Verkettungen des 16mer-Probemoleküls:



Der Aufbau der Verkettungen des 14mer-Probemoleküls:



Anbindung der Rezeptoroligonukleotide:

0,5 µl einer 10 µM Oligo-Lösung wurden in 0,1 M NaCl auf einen mit Epoxysilan beschichteten Objektträger gespottet und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird 2 x 5 Minuten in 1 x SSC-T (T ist Zusatz von 0,05 % Tween-20) und 2 x 2 Minuten in dest. Wasser gewaschen und mit einem Stickstoffstrom getrocknet.

Hybridisierung:

Die Spots der Wildtyp- und Mutanten-Rezeptoren wurden 30 Minuten mit einem Gemisch aus Cy3-markierten Probenmolekül und Cy5-markierten Sondenoligo in einer Konzentration von 0,5 µM in 5xSSC, 0,05 % Tween-20 inkubiert.

Durch die Hybridisierung kam es zur Ausbildung des Probenkomplexes und des Referenzkomplexes, wie oben dargestellt, wobei die Verkettung über den Rezeptor an den Objektträger angebunden ist. Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die Objektträ-

- 32 -

ger 2 x 2 Minuten mit 5 x SSC-T, 2 x 2 Minuten mit 1 x SSC-T und 2 x 2 Minuten mit 0,2 x SSC-T gewaschen, kurz gewässert und im Stickstoffstrom getrocknet.

Stempeln:

Es wurde ein mikrostrukturierter Stempel aus PDMS (Polydimethylsiloxan) gefertigt. Die Strukturen bestanden dabei aus Stempelfüßchen von ca. 100 x 100 µm, die durch Vertiefungen von ca. 25µm Breite und einem µm Tiefe getrennt wurden. Hierzu wurde ein Ansatz aus einer 1:10 Mischung von Vernetzungsreagenz und Silikonelastomer (Sylgard 184, Dow Corning) nach mehrfachem Entgasen auf einen entsprechend strukturierten Siliziumwafer gegossen und für 24h bei RT inkubiert. Nach der Polymerisierung wurde die strukturierte Oberfläche des Stempels bei 1mbar in einem Plasmaofen für 60s einem H₂O-Plasma ausgesetzt.

Die oxidierte Oberfläche wurde mit 3% Aminosilan (3-Aminopropyl-dimethyl-ethoxysilan; ABCR, Karlsruhe) in 10% H₂O und 87% Ethanol für 30min inkubiert. Die silanisierte Oberfläche wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. An die Aminogruppen des Silans wurde ein bifunktionales PEG angebunden, dessen eines Ende über eine durch NHS aktivierte Carboxygruppe, das andere über eine Biotin-Gruppe verfügte. 20µl einer Lösung mit 2mg/100µl NHS-PEG-Biotin (Shearwater, Huntsville) wurden unter einem Deckglas für 1h auf einem Stempel mit einer Fläche von 1cm² inkubiert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. Auf die nun biotinylierte Oberfläche wurde 0,1mg/ml Streptavidin (Sigma) in PBS gegeben und für 30min inkubiert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

Ein frisch präparierter Stempel und eine Unterlage wurden mit einer Lösung von 30mM NaCl unter einem Druck von 100g/cm² auf die Spots gepreßt. Nach 30min wurde der Stempel abgehoben. Objektträger und Stempel wurden mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

- 33 -

Messung:

Der Stempel wurde in einem Fluoreszenzscanner (Axon, Genepix 4000 B) mit einer Ortsauflösung von 5µm hinsichtlich der Intensitäten von Cy3 (Anregung bei 532nm) und Cy5 (Anregung bei 635nm) vermessen.

Auswertung:

Der Fluoreszenzscan eines Spots, der auf den Stempel übertragen wurde, ist in Fig. 5 dargestellt.

Die Intensitätsverteilungen für Cy3 und Cy5 der gesamten Spotfläche wurden ermittelt und in einem Histogramm dargestellt. In Fig 5 ist ein typisches Histogramm eines Spots für eine der beiden Markierungen abgebildet. Die Histogramme weisen zwei ausgeprägte Maxima auf. Das Maximum bei geringer Intensität entspricht dabei dem Fluoreszenzhintergrund (dunkles Gitter), das bei größerer Intensität dem eigentlichen Signal (helle Flächen).

Für jeden Spot und für jede Markierung wurde die Differenz aus Signal und Hintergrund berechnet.

Im Gegensatz zu Experimentbeispiel 1 wurde hier nicht

$Q = (n(\text{Cy5}) - n(\text{Cy3})) / n(\text{Cy3})$ berechnet, sondern das Verhältnis $V = n(\text{Cy5}) / n(\text{Cy3})$. Es gilt V_{MM} (Mismatch) < V_{PM} (Perfect Match), bzw. $V_{\text{MM}} / V_{\text{PM}} < 1$.

Das Verhältnis V für jeden der 15 gemessenen Spots ist in Tabelle 1 aufgelistet.

In Tabelle 2 wurden dann die Mittelwerte von V für 14- und 16-mer mit und ohne Mismatch berechnet. Schließlich wurden die Mittelwerte für Perfect Match und Mismatch (jeweils für 14- und 16-mer) miteinander ins Verhältnis gesetzt.

Für beide untersuchte Probenmoleküle (14- und 16-mer) findet man $V_{\text{MM}} / V_{\text{PM}} < 1$, was deutlich zeigt, dass sich PM und MM hier klar unterscheiden lassen.

- 34 -

Tabelle 1

Spot	V (Cy5/Cy3)
MM16-1	0,53
MM16-2	0,51
MM16-3	0,64
PM16-1	0,94
PM16-2	0,68
PM16-3	0,61
PM16-4	0,55
MM14-1	2,32
MM14-2	2,01
MM14-3	2,76
MM14-4	2,38
PM14-1	2,76
PM14-2	3,06
PM14-3	2,66
PM14-4	5,10

Tabelle 2

Mittelw. V(MM14)	2,37
Mittelw. V(PM14)	3,40
Mittelw. V(MM14) / Mittelw. V(PM14)	0,70
Mittelw. V(MM16)	0,56
Mittelw. V(PM16)	0,70
Mittelw. V(MM16) / Mittelw. V(PM16)	0,81

Beispiel 3

SNP-Typing auf Oligonukleotiden

Bei diesem Beispiel wurde eine Probesequenz von 16 Nukleotiden Länge hinsichtlich eines Einzelbasenaustauschs untersucht.

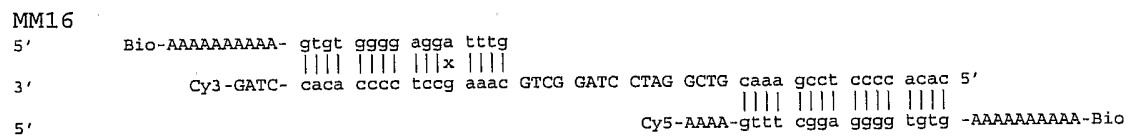
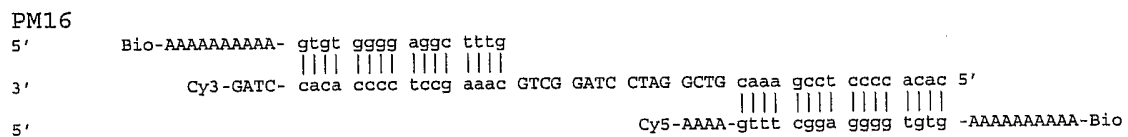
Bei dem Probemolekül handelte es sich um ein Oligonukleotid, das von 5' nach 3' aus folgenden Sequenzbestandteilen aufgebaut war:

Einer Referenzsequenz von 16 Nukleotiden, einer internen Spacersequenz von 16 Nukleotiden, einer Probensequenz mit 16 Nukleotiden und einer terminalen Spacersequenz von 4 Nukleotiden. Probesequenz und Referenzsequenz waren zueinander revers. Die Rezeptoren bestanden aus einer am 5'-Ende konjugierten Biotin-Gruppe, einem Spacer aus 10 Adeninen sowie aus einer ausgewählten Rezeptorsequenz mit einer Länge von 16 Nukleotiden.

Passend zur Wildtyp-Rezeptorsequenz mit einer Länge von 16 Nukleotiden wurde ein mutierter Rezeptor mit einem Basenaustausch abgeleitet, bei dem Cytosin an Position 12 durch Adenin ersetzt wurde.

Der Sondenoligo bestand aus einem am 5'-Ende konjugierten Cy5-Molekül, einem Spacer aus 4 Adeninen sowie aus einer Sequenz mit 16 Nukleotiden, die zur Referenzsequenz komplementär ist, sowie einem weiteren Spacer aus zehn Adeninen mit einer 3'-terminalen Biotingruppe.

Der Aufbau der Verkettungen des 16mer-Probemoleküls:



Anbindung der Rezeptoroligonukleotide:

Je 0,5 µl einer 1 µM SSC-Lösung der Rezeptoroligos wurden auf einen mit Streptavidin beschichteten Objektträger (Greiner Bio-One) gespottet und für 30min in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Objektträger wurde 2 x 5 Minuten in 1 x SSC-T (T ist Zusatz von 0,05 % Tween-20) gewaschen und verbleibende Tropfen mit einem Stickstoffstrom entfernt (nicht getrocknet).

Blocken:

Um die nach der Anbindung der Rezeptoroligos verbleibenden freien Streptavidinbindungsstellen mit Biotin abzusättigen, wurde der Objektträger mit einer 2µM Lösung eines biotinylierten DNA-Oligos (in 1x SSC, 1% Tween) bedeckt und 15min inkubiert. Es wurde

- 37 -

2 x 10 min mit 1 x SSC-T (T ist Zusatz von 0,05 % Tween-20) gewaschen und verbleibende Tropfen mit einem Stickstoffstrom entfernt (nicht getrocknet).

Hybridisierung:

Die Spots der Wildtyp- und Mutanten-Rezeptoren wurden 30 Minuten mit einem Gemisch aus Cy3-markiertem Probenmolekül (0,25 μ M) und Cy5-markiertem Sondenoligo (1 μ M) in 5xSSC inkubiert.

Durch die Hybridisierung kam es zur Ausbildung des Probenkomplexes und des Referenzkomplexes, wie oben dargestellt, wobei die Verkettung über den Rezeptoroligo an den Objektträger angebunden war. Es wurde 2 x 10 min mit 1 x SSC-T (T ist Zusatz von 0,05 % Tween-20) gewaschen und verbleibende Tropfen mit einem Stickstoffstrom entfernt (nicht getrocknet).

Stempeln:

Es wurde ein mikrostrukturierter Stempel aus PDMS (Polydimethylsiloxan) gefertigt. Die Strukturen bestanden dabei aus Stempelfüßchen von ca. 100 x 100 μ m, die durch Vertiefungen von ca. 25 μ m Breite und einem μ m Tiefe getrennt wurden. Hierzu wurde ein Ansatz aus einer 10:1 Mischung von Silikonelastomer (Sylgard 184, Dow Corning) und Vernetzungsreagenz nach mehrfachem Entgasen auf einen entsprechend strukturierten Siliziumwafer gegossen und für 24h bei RT inkubiert. Nach der Polymerisierung wurde die strukturierte Oberfläche des Stempel bei 1mbar in einem Plasmaofen für 60s einem H₂O-Plasma ausgesetzt.

Die oxidierte Oberfläche wurde mit 3% Aminosilan (3-Aminopropyl-dimethyl-ethoxysilan; ABCR, Karlsruhe) in 10% H₂O und 87% Ethanol für 30min inkubiert. Die silanisierte Oberfläche wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. An die Aminogruppen des Silans wurde ein bifunktionales PEG angebunden, dessen eines Ende über eine durch NHS aktivierte Carboxygruppe, das andere über eine Biotingruppe verfügte. 20 μ l einer Lösung mit 2mg/100 μ l NHS-PEG-Biotin (Shearwater Polymers, AL) wurden unter einem Deckglas für 1h auf einem Stempel mit einer Fläche von 1cm² inku-

biert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. Auf die nun biotinylierte Oberfläche wurde 0,1mg/ml Streptavidin (Sigma) in PBS gegeben und für 30min inkubiert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

Ein frisch präparierter Stempel und eine Unterlage wurden mit einer Lösung von 30mM NaCl unter einem Druck von 100g/cm² auf die Spots gepreßt. Nach 30min wurde der Stempel abgehoben. Objektträger und Stempel wurden mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

Messung:

Der Stempel wurde in einem Fluoreszenzscanner (Axon, Genepix 4000 B) mit einer Ortsauflösung von 5µm hinsichtlich der Intensitäten von Cy3 (Anregung bei 532nm) und Cy5 (Anregung bei 635nm) vermessen.

Auswertung:

Für beide Meßbilder wurde ein Fluoreszenzhintergrund ermittelt und subtrahiert. Die um den Hintergrund bereinigten Messbilder wurden weiterverarbeitet, indem durch Division für jeden Bildpunkt der Quotient der Fluoreszenzintensitäten (635nm/532nm) bestimmt wurde. Als Resultat wurde ein Quotienten-Bild der Fluoreszenzintensitäten erhalten, wie in Figur 6 für zwei Spots dargestellt.

Aus dem Quotientenbild wurden für die Flächen der Meßspots ein Histogramm der Intensitätsquotienten V' ($V' = \text{Intensität (Cy5)} / \text{Intensität (Cy3)}$) erstellt (Figur 7), wobei die Skalierung der Intensitätsquotienten willkürlich gewählt werden konnte.

Die niedrigen Peaks im Histogramm entsprachen dabei den Stempelflächen (dunkle Rechtecke in Figur 6), die hohen Peaks den Vertiefungen des Stempels, auf die keine Fluorophore übertragen wurden (helles Gitter in Figur 6).

- 39 -

Für alle Spots wurden die mittleren Intensitätsquotienten V (Maxima der niedrigen Peaks) bestimmt. Dann wurden V_{MM} (Mutante) und V_{PM} (Wildtyp) miteinander ins Verhältnis gesetzt.

Dabei war zu erwarten, dass: V_{MM} (Mutante) $<$ V_{PM} (Wildtyp), bzw. $V_{MM} / V_{PM} < 1$.

Für das vorliegende Beispiel wurde aus dem Histogramm (Figur 7) ermittelt:

$$V_{MM} / V_{PM} = 124/154 = 0,81.$$

Hiermit konnte der Unterschied von einer Einzelbasenfehlpaarung in einem Duplex von 16 Nukleotiden sicher nachgewiesen werden.

Beispiel 4

SNP-Typing auf Oligonukleotiden

Bei diesem Beispiel sollte eine Probesequenz von 20 Nukleotiden Länge auf einen möglichen Austausch eines einzelnen Guanins gegen ein Cytosin geprüft werden.

Bei dem Probemolekül (Analyt) handelte es sich um ein Oligonukleotid mit einem am 5'-Ende konjugierten Cy5-Molekül, das von 5' nach 3' aus folgenden Sequenzbestandteilen aufgebaut war:

Einer Referenzsequenz von 20 Nukleotiden, einer internen Spacersequenz von 11 Nukleotiden, einer Probensequenz von 20 Nukleotiden und einer terminalen Spacersequenz von 5 Nukleotiden (hier 5 x Adenin). Probesequenz und Referenzsequenz waren zueinander revers.

Die Rezeptoren bestanden aus einem am 5'-Ende konjugierten Amino-C6-Linker, einem Spacer aus 10 Nukleotiden ohne spezifische Bindungsfunktion (hier 10x Adenin) sowie aus einer ausgewählten Rezeptorsequenz mit einer Länge von 20 Nukleotiden. Passend zur Wildtyp-Rezeptorsequenz (Rezeptor-PM) mit einer Länge von 20 Nukleotiden wurde

- 40 -

ein mutierter Rezeptor (Rezeptor-MM) mit einem Basenaustausch abgeleitet, bei dem Guanin an Position 13 durch Cytosin ersetzt wurde.

Der Sondenoligo bestand (in 5' -> 3' Richtung) aus einem Spacer aus 5 Nukleotiden (hier 5x Adenin) ohne spezifische Bindungsfunktion sowie aus einer Sequenz, die zur Referenzsequenz komplementär war (20 Nukleotide), sowie einem weiteren Spacer (10xAdenin) mit einer 3'-terminalen Biotingruppe.

Figur 8 zeigt das Hybridisierungsschema der verwendeten Oligonukleotide.

Anbindung der Rezeptoroligonukleotide:

Zunächst wurde 18 mM Bis-NHS-PEG (MW 3000 Da, Rapp Polymere Tübingen; 54 mg/ml) in wasserfreiem DMF gelöst. 150 µl der Lösung wurden auf einen mit Aminogruppen funktionalisierten Objektträger (Quantifoil, Jena) pipettiert und durch einen zweiten Objektträger bedeckt. Nach einer Stunde Inkubation in einer mit DMF gesättigten Kammer wurden die Objektträger mit Aceton gereinigt.

Für den PM-Rezeptor wurden 5 µl einer 0,5 µM, für den MM-Rezeptor 5 µl einer 1 µM Oligo-Lösung 1:1 mit einer 100 mM EDC-Lösung (=> Endkonzentration 50 mM) versetzt. Von beiden Ansätzen wurden mit einer Handpipette abwechselnd je 1 µl auf den mit Bis-PEG-NHS₃₀₀₀ beschichteten Objektträger (Wasserdampfathmosphäre) gespottet. Inkubiert wurde bei Raumtemperatur für 1h in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde 2 x 20 Minuten in 1 x SSC/0,5% SDS gewaschen und kurz mit dest. Wasser abgespült.

Blocken:

Um unspezifische Anbindung zu vermeiden, wurde der Objektträger in einer 2%-igen BSA-Lösung (w/v in dest. Wasser) 1h bei Raumtemperatur geschwenkt. Danach wurde mit dest. Wasser 5 Minuten lang gewaschen und kurz abgespült.

- 41 -

Hybridisierung:

Die Spots der Wildtyp- und Mutanten-Rezeptoren wurden 1 Stunde mit einem Gemisch aus Cy5-markiertem Probenmolekül und unmarkiertem Sondenoligo in einer Konzentration von 0,1 μM in 5xSSC inkubiert.

Durch die Hybridisierung kam es zur Ausbildung des Probenkomplexes und des Referenzkomplexes, wie oben dargestellt, wobei die Verkettung über den Rezeptor an den Objektträger angebunden ist. Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die Objektträger je 10 Minuten mit SSC/0,1% SDS bzw. 1xSSC Minuten gewaschen und kurz im Stickstoffstrom trockengeblasen.

Herstellung der Stempel:

Es wurde ein mikrostrukturierter Stempel aus PDMS (Polydimethylsiloxan) gefertigt. Die Strukturen bestanden dabei aus Stempelfüßchen von ca. 100 x 100 μm , die durch Vertiefungen von 41 μm Breite und fünf μm Tiefe getrennt wurden.

Ein Ansatz aus einer 1:10 Mischung von Vernetzungsreagenz und Silikonelastomer (Sylgard 184, Dow Corning) wurde nach mehrfachem Entgasen auf einen entsprechend strukturierten Silikonwafer gegossen und für 24h bei RT inkubiert. Nach der Polymerisierung wurde das PDMS in einem EtOH/Wasser_{dest.} Gemisch (1:1) für 3 Minuten im Ultraschallbad gewaschen. Vor und nach der Aktivierung über Nacht in einer 12,5 %-igen HCl-Lösung wurde kurz mit dest. Wasser abgespült.

Die aktivierte Oberfläche wurde mit 3% Aminosilan (3-Aminopropyl-dimethyl-ethoxysilan; ABCR, Karlsruhe) in 10% H₂O und 87% Ethanol für 30min inkubiert. Die silanisierte Oberfläche wurde zunächst mit Ethanol und dann mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. An die Aminogruppen des Silans wurde ein bifunktionales PEG angebunden, dessen eines Ende über eine durch NHS aktivierte Carboxygruppe, das andere über eine Biotingruppe verfügte. Um die Dichte der Biotingruppen zu reduzieren, wurde das NHS-PEG-Biotin (6 mM; Shearwater, Huntsville) 1:20 mit 6 mM NHS-

- 42 -

methoxy-PEG₂₀₀₀ ausgedünnt. 20µl dieser Lösung wurden unter einem Deckglas für 1h auf einem Stempel mit einer Fläche von 1cm² inkubiert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen und mit 6 mM NHS-methoxy-PEG₂₀₀₀ 1h geblockt. Auf die nun biotinylierte Oberfläche wurde 0,2 mg/ml Streptavidin (Sigma) in PBS/1%BSA gegeben und für 1h inkubiert. Es wurde je 10 Minuten mit SSC/0,1% SDS bzw. 1xSSC Minuten gewaschen und kurz im Stickstoffstrom trockengeblasen.

Stempeln:

Ein frisch präparierter Stempel wurde in 1xSSC unter einem Druck von 125g/cm² auf die Spots der Unterlage (Objektträger) gepresst. Nach 10min wurde der Stempel abgehoben. Objektträger und Stempel wurden mit Stickstoff trocken geblasen.

Messung:

Der Stempel und der Objektträger wurden in einem Fluoreszenzscanner (Virtek, ChipReader™; 3µm) mit einer Ortsauflösung von 6µm hinsichtlich der Intensität von Cy5 (Anregung bei 635nm) vermessen. Da bei der Messung des Stempels eine höhere Photomultiplier-Spannung verwendet wurde als bei der Unterlage, fallen die gemessenen Intensitäten des Übertrags auf den Stempel („ÜBER“) größer aus als die der Hybridisierung auf dem Objektträger („VOR“). Da im vorliegenden Beispiel die Auswertung auf den Verhältnissen „ÜBER/VOR“ und nicht auf einem Vergleich von absoluten Messwerten basiert, konnte von einer Normalisierung der Intensitäten abgesehen werden.

Auswertung:

Die Scans sind in Abb. 9 dargestellt. In der oberen Hälfte erkennt man den Übertrag eines Mismatch-Spots (links) und den eines Perfect-Match-Spots (rechts). Bei beiden Spots wurde ein Muster von 5x5 Kästchen ausgewählt und deren Intensitäten in einem Histogramm dargestellt.

Unten erkennt man das zu dem Stempel komplementäre Bild der beiden Spots auf dem Objektträger. Hier wurde im Bereich der 5x5 Kästchen das verbleibende Gitter ausgewählt und für beide Spots im Histogramm dargestellt. Man erkennt deutlich, dass die Intensitätswerte der Hybridisierung ($PM_{VOR} = 14000$; $MM_{VOR} = 15500$) nur geringfügig, die

- 43 -

des Übertrags ($PM_{\text{ÜBER}} = 23100$; $MM_{\text{ÜBER}} = 39400$) jedoch deutlich voneinander abweichen.

Da hier im Unterschied zu den anderen Beispielen nur das Probemolekül, nicht aber das Sondenmolekül durch einen Fluorophor markiert wurde, erfolgt die Auswertung nur anhand des Verhältnisses aus übertragenem (ÜBER) zu angebotenen (VOR) Probemolekül.

Da man bei einem Mismatch im Probenduplex einen höheren Übertrag an Probemolekül auf den Stempel erwartet, als dies bei einem Perfect Match der Fall ist, gilt:

$$Q_{\text{ÜBER}} = PM_{\text{ÜBER}} / MM_{\text{ÜBER}} < 0$$

Dies gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, dass die Intensitäten der Hybridisierung für PM und MM gleich groß sind. Ist dies nicht gegeben, so verwendet man:

$$Q_{\text{ÜBERVOR}} = (PM_{\text{ÜBER}} / PM_{\text{VOR}}) / (MM_{\text{ÜBER}} / MM_{\text{VOR}}) < 0$$

Im vorliegenden Beispiel erhält man also:

$$Q_{\text{ÜBERVOR}} = (23100 / 14000) / (39400 / 15400) = 0,65$$

Das resultierende $Q_{\text{ÜBERVOR}} < 1$, zeigt deutlich, dass der Analyt mit Rezeptor-PM einen Perfect Match und mit dem Rezeptor MM einen Mismatch ausbildet. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Probe dem Wildtyp entspricht und auf Position 13 folglich G vorliegt.

Varianten der Ausführung

Für das beschriebene Verfahren sind viele Variationen möglich, die je nach der Situation ausgewählt werden können.

Anlegen der Zugkraft

Wie in der bevorzugten Ausführung beschrieben, wird der Kraftvergleich am einfachsten durch die Kopplung einer Verkettung zwischen zwei angenäherte Oberflächen und anschließendes Trennen der Oberflächen ausgeführt. Statt der Immobilisierung an Oberflächen kann die Immobilisierung der Bindepartner aber auch an anderen Festkörpern, z.B. Kügelchen, oder über Moleküle, an die eine Zugkraft angelegt werden kann, erfolgen.

Der Kopplungsschritt

Unter Kopplung versteht man den Schritt, durch den eine Verkettung mit den beiden Kraftangriffspunkten verbunden wird.

Beim Kopplungsschritt sind mehrere Fälle zu unterscheiden, die in Figur 3 illustriert sind: Fall 1 entspricht dem oben ausgeführten Beispiel, wobei der Kopplungsschritt der Ausbildung der Biotin-Streptavidin-Bindung zwischen Sondenoligo und dem Stempel entspricht.

Wie bei Fall 1 erfolgt auch bei Fall 2 der Kopplungsschritt erst nach der Ausbildung der Verkettung, d.h. erst nachdem Probenkomplex und Referenzkomplex bereits miteinander verbunden waren. Der Unterschied ist lediglich, dass bei Fall 1 auf der Seite des Referenzkomplexes und bei Fall 2 auf der Seite des Probenkomplexes gekoppelt wird.

Bei Fall 3, 4 und 5 erfolgt die Kopplung und die Ausbildung der Verkettung durch den gleichen Schritt. Bei Fall 3 erfolgt die Kopplung durch die Ausbildung des Probenkomplexes und bei Fall 4 durch die Ausbildung des Referenzkomplexes.

Bei Fall 5 liegen sind beide Komplexe bereits ausgebildet und mit den Kraftangriffspunkten (Oberflächen) verbunden, wenn es zur Kopplung zwischen den Komplexen kommt.

Position des Probenmoleküls in der Verkettung

Das obige Ausführungsbeispiel schildert einen Fall, bei dem die Analytnucleinsäure oder Probesequenz den zweiten Bindungspartner des Probenkomplexes darstellt und folglich unmittelbar mit Bindungspartner 3, der Referenzsequenz verbunden ist. Die Probensequenz nimmt hier eine „zentrale Position“ innerhalb der Verkettung ein.

Davon abweichend, kann die Probensequenz auch Bindungspartner 1 entsprechen. In diesem Fall nimmt sie eine „periphere Position“ in der Verkettung ein. Für diese Ausführungsform wird daher das Probenmolekül auf einer Oberfläche immobilisiert. Dies wird in Figur 4 veranschaulicht. Fall A und B zeigen einen Aufbau, bei dem die Probe zentral plaziert ist (Fall A entspricht dem obigen Ausführungsbeispiel). Bezüglich der Kopplung kann man A mit Fall 1 von Figur 3 vergleichen und B mit Fall 5 in Figur 3. Bei C ist das Probenmolekül hingegen peripher plaziert und auf der Unterlage immobilisiert. Bezüglich der Kopplung ist C mit Fall 5 von Figur 3 vergleichbar.

Die Immobilisierung des Probenmoleküls kann dadurch erfolgen, dass man in einen der PCR-Primer, die zur Amplifikation des Probenmoleküls verwendet werden, ein Biotin einführt. Die Anbindung erfolgt dann über die Bindung dieses Biotins an die Streptavidinbeschichtung der Unterlage.

Alternativ kann die Immobilisierung auch über die Hybridisierung mit einem Capture-Oligo erfolgen. Das Captureoligo wird hierfür terminal an die Unterlage gebunden und bildet mit dem Probenmolekül einen Komplex aus, der kraftstabiler ist als Referenz- oder Probenkomplex. Bei Fall C wird das Probenmolekül nicht markiert.

Die Auswertung von Fall B und C erfolgt, indem die Menge an Markierung 1, die auf den Stempel übertragen wird und die Menge an Markierung 2, die auf die Unterlage übertragen wird, bestimmt wird. Es gilt: $Q^* = n_{\text{Ref.}} / n_{\text{Pro.}} \cong Q = \text{Marker 2 (Stempel)} / \text{Marker 1 (Unterlage)}$

Der Referenzkomplex

Der Referenzkomplex kann aus einem Duplex von Nukleinsäuren oder auch aus einem Komplex beliebiger anderer Bindungspartner, z.B. Partnern eines spezifisch bindenden Paares aufgebaut sein.

Es ist von Vorteil, einen Referenzkomplex zu wählen, der unter den gegebenen Versuchsbedingungen einen dem Probenkomplex ähnliche Trennkraft aufweist. Deshalb werden bevorzugt Referenzkomplexe gewählt, die dem Probenkomplex in der Chemie, Basenzusammensetzung und im GC-Gehalt ähnlich sind. Es können jedoch auch Referenzkomplexe verwendet werden, die gegenüber dem Probenkomplex in der Länge, der Basenzusammensetzung abweichen, wobei die oben angegebenen Bedingungen bezüglich der freien Basenpaarungsenergie dann beachtet werden sollten.

Die Referenzsequenz

In dem obigen Ausführungsbeispiel ist die Referenzsequenz ein Bestandteil des Probenmoleküls. Bei einer peripheren Position des Probenmoleküls wäre dies jedoch nicht der Fall.

Im Fall des Ausführungsbeispiels entspricht die Referenzsequenz Primer 2 der Amplifikation bzw. der ursprünglichen Sequenz der genomischen DNA. Die Referenzsequenz kann jedoch ebenso aus einer Sequenz bestehen, die so nicht auf der genomischen DNA enthalten war und erst durch einen degenerierten Primer bei der Amplifikation eingefügt wurde.

Detektion

Die Ermittlung von $Q^* = n_{\text{Ref-}} / n_{\text{Pro-}}$ (s.u.) kann entweder über den Nachweis getrennter Bindungspartner eines getrennten Komplexes oder durch den Nachweis noch intakter Komplexe erfolgen.

Der Nachweis der Bindungspartner erfolgt über die Markierung. Abhängig von der verwendeten Markierung wird daher die zu bestimmende Eigenschaft des Detektormoleküls

bestimmt. Dies geschieht in der Regel durch Auswertung optischer oder elektrischer Parameter. Auch der Einsatz von Massenspektroskopie ist möglich.

Ermittlung von Q

Da es in der Praxis sehr schwierig ist das Verhältnis der mittleren Trennkkräfte exakt zu bestimmen, wird statt dem idealen $Q^* = n_{\text{Ref.}} / n_{\text{Pro.}} \approx F_{\text{Ref.}}^* / F_{\text{Pro.}}^*$ näherungsweise Quotient Q bestimmt, d.h. $Q \approx Q^*$.

Unter idealen Bedingungen kann man das Verhältnis von getrennten Probenkomplexen zu den getrennten Referenzkomplexen einfach aus der Verteilung des Probenmoleküls zwischen den beiden Oberflächen ermitteln. Im Ausführungsbeispiel würde das bedeuten, nur den Cy3-Marker am Probenmolekül einzusetzen. $Q^* = n_{\text{Ref.}} / n_{\text{Pro.}}$ entspräche in diesem Fall näherungsweise dem Verhältnis von Cy3, das auf den Stempel übertragen wurde zu Cy3, das auf dem Objektträger verblieben ist.

Dies setzt jedoch voraus, dass die Kopplung, also das Verbinden beider Oberflächen durch die Verkettungen bei jedem Experiment reproduzierbar effizient ist. Dies ist nicht immer der Fall und daher werden bevorzugt zwei Markierungen eingesetzt.

Das folgende Beispiel soll verdeutlichen, warum eine zweite Markierung häufig sinnvoll ist: Ein Experiment, bei dem Referenzkomplex und Probenkomplex gleiche Trennkkräfte aufweisen, wird zweimal durchgeführt. Beim Experiment 1 werden alle der 100 Verkettungen gekoppelt ($n_{\text{Kop}} = 100$). Nach der Trennung sind 50 Probenmoleküle auf dem Stempel und 50 auf der Unterlage zu finden. Bei Experiment 2 werden von 100 Verkettungen nur 50 gekoppelt. Nach der Trennung sind 25 Probenmoleküle auf dem Stempel und 75 auf der Unterlage zu finden. Für Experiment 1 mißt man $Q = n_{\text{Ref.}} / n_{\text{Pro.}} = 50/50 = 1$. Für Experiment 2 mißt man $Q = n_{\text{Ref.}} / n_{\text{Pro.}} = 75/25 = 3$. Tatsächlich handelt es sich jedoch um $n_{\text{Ref.}} = 25$ und $n_{\text{Pro.}} = 25$ sowie um 50 Verkettungen, die nicht gekoppelt und getrennt wurden.

- 48 -

Die unterschiedliche Kopplungseffizienz, die z.B. durch Qualitätsschwankungen der Stempeloberfläche verursacht werden kann, führt also zu einem abweichenden Ergebnis. Bei der bevorzugten Ausführungsform kommt deshalb ein zweiter Marker zum Einsatz, der an der Sonde befestigt ist und zur Bestimmung der Menge der gekoppelten Verkettungen (n_{Kop}) dient.

In diesem Fall erhält man aus $n_{\text{Kop}} = n_{\text{Ref.}} + n_{\text{Pro.}}$ und $Q^* = n_{\text{Ref.}} / n_{\text{Pro.}}$ das Verhältnis der Trennkräfte: $Q^* = (n_{\text{Kop}} - n_{\text{Pro.}}) / n_{\text{Pro.}}$

Bei der Auswertung des Stempels setzt man die Menge des auf eine bestimmte Fläche des Stempels übertragenen Sonden-Markers mit dem auf die gleiche Fläche übertragenen Proben-Markers ins Verhältnis. Die Menge des Sondenmarkers entspricht dabei der Menge der Kopplungen (n_{Kop}):

$$n(\text{Sonden-Marker}) / n(\text{Proben-Marker}) = n_{\text{Kop}} / n_{\text{Pro.}}$$

Für das obige Beispiel gilt also:

$$\text{Experiment 1: } Q = (n_{\text{Kop}} - n_{\text{Pro.}}) / n_{\text{Pro.}} = (100 - 50) / 50 = 1$$

$$\text{Experiment 2: } Q = (n_{\text{Kop}} - n_{\text{Pro.}}) / n_{\text{Pro.}} = (50 - 25) / 25 = 1$$

Durch Einbeziehen der Kopplungszahl n_{Kop} erhält man also auch für nicht reproduzierbare Kopplungseffizienz den richtigen Quotienten.

- 49 -

Das Rezeptoroligo

Das Rezeptoroligonukleotid kann aus DNA, RNA, PNA, oder anderen künstlichen Nukleotidbausteinen bestehen. In der Regel hat es eine Länge zwischen 15 und 25 Basenpaaren.

Die Diskriminierung

Die Diskriminierung einer Mutation gegenüber einem Wildtyp erfolgt in der Regel über einen Unterschied im Quotienten Q . Im Ausführungsbeispiel werden zwei Q -Werte bestimmt und miteinander verglichen (Referenzexperiment). Alternativ könnte man auch auf das Referenzexperiment verzichten, wenn z.B. der Quotient für den Wildtyp (Q_{WT}) bereits bekannt ist. Eine signifikante Veränderung gegenüber Q_{WT} würde dann auf eine Mutation hinweisen. Dies ist jedoch nur sinnvoll, wenn eine sehr gute Reproduzierbarkeit aller Versuchsparameter (z.B. gleichbleibende Qualität der Marker) gewährleistet ist, was nicht immer der Fall ist.

Das Probenmolekül

Bei dem Probenmolekül oder der Analytnucleinsäure kann es sich sowohl um DNA als auch RNA als auch synthetische NA unterschiedlichster Herkunft handeln. Ob eine Amplifizierung notwendig ist, hängt dabei immer von der Menge des verfügbaren Probenmaterials ab. Bevorzugt wird das Probenmaterial durch PCR amplifiziert, um eine ausreichende Menge zur Verfügung zu haben.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Mutationen in einer Nucleinsäure umfassend, dass
 - a) eine Mehrzahl zu analysierender Nucleinsäure-Stränge mit mindestens zwei Arten von Oligonucleotiden, Rezeptoroligos und Sondenoligos, in Kontakt gebracht wird unter solchen Bedingungen, dass die Oligos mit der zu analysierenden DNA hybridisieren unter Bildung eines Probenkomplexes und eines Referenzkomplexes, so dass eine beidseitig immobilisierte oder immobilisierbare Verkettung von Probenkomplex und Referenzkomplex vorliegt,
 - b) anschließend gegebenenfalls die Verkettung immobilisiert wird,
 - c) an die Verkettung eine Zugkraft angelegt wird, bis sich einer der Komplexe trennt und
 - d) bestimmt wird, welcher der Komplexe getrennt wurde.

2. Verfahren zum Nachweis von Mutationen in Analytnucleinsäuren, bei dem die Analytnucleinsäure mit mindestens zwei Arten von Oligonucleotiden, Rezeptoroligos und Sondenoligos, in Kontakt gebracht wird unter solchen Bedingungen, dass die Oligos mit der Analytnucleinsäure hybridisieren unter Bildung eines Probenkomplexes und eines Referenzkomplexes, wobei die Oligonucleotide immobilisiert oder immobilisierbar sind, und wobei gegebenenfalls die Oligonucleotide nach der Hybridisierung immobilisiert werden, so dass eine beidseitig immobilisierte Verkettung von Rezeptoroligo - Analytnucleinsäure - Sondenoligo entsteht; an die Verkettung eine Zugkraft angelegt wird, so dass sich einer der gebildeten Komplexe löst und bestimmt wird, welcher der Komplexe gelöst wurde, wobei die Rezeptoroligonucleotide eine Sequenz aufweisen, die zu einem Sequenzabschnitt des Wildtyps der Analytnucleinsäure komplementär ist, in dem eine Mutation oder Variation vermutet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung von Analytnucleinsäure und Sondenoligo über eine Kopplungssequenz erfolgt.

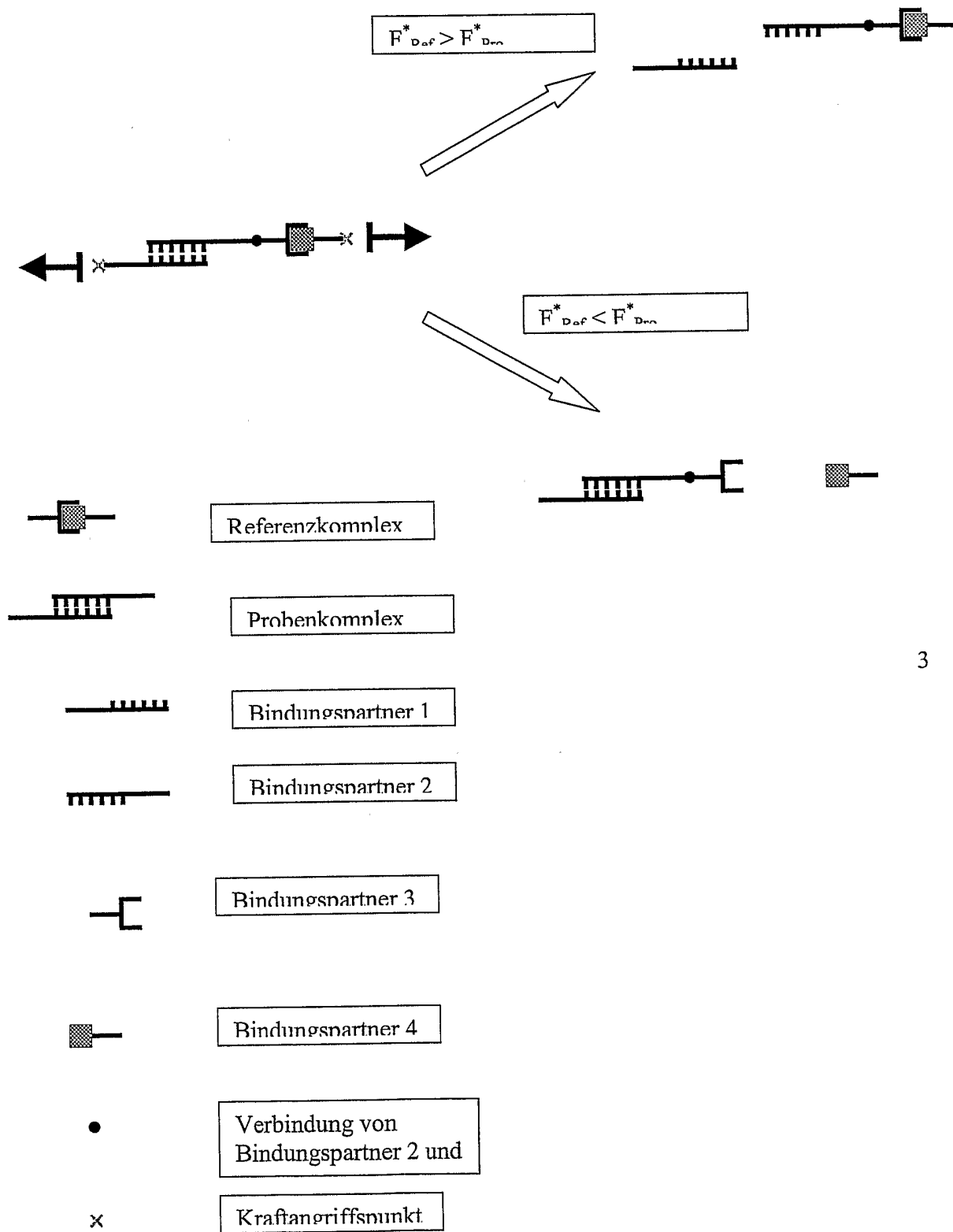
4. Verfahren zum Nachweis von Mutationen in Analytnucleinsäuren, bei dem aus Analytnucleinsäure, zwei Arten von Oligonucleotiden, Rezeptoroligos und Sondenoligos, und gegebenenfalls einer Kopplungssequenz durch Hybridisierung Probenkomplexe und Referenzkomplexe in solcher Weise gebildet werden, dass die beiden Komplexe jeweils miteinander verkettet sind; auf die gebildeten Verkettungen eine Zugkraft ausgeübt wird, wobei sich jeweils einer der Komplexe trennt und dann bestimmt wird, welcher der Komplexe sich jeweils getrennt hat.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für Probenkomplex und Referenzkomplex solche Nucleinsäuren ausgewählt werden, dass sich die freie Basenpaarungsenergie ΔG der hybridisierten Komplexe um ≤ 40 kcal/mol unterscheidet.
6. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass sich die freie Basenpaarungsenergie ΔG von Probe- und Referenzkomplex um weniger als 20 kcal/mol unterscheidet.
7. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass sich die freie Basenpaarungsenergie ΔG von Probe- und Referenzkomplex um weniger als 4 kcal/mol unterscheidet.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sich bei Probe- und Referenzkomplex die Anzahl der hybridisierenden Paare bei gleichem GC-Gehalt um höchstens zwei Basen Länge unterscheiden.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sich bei Probe- und Referenzkomplex die Anzahl der hybridisierenden Paare bei gleichem GC-Gehalt um eine Base Länge unterscheiden.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl der Mismatches bei Probe- und Referenzkomplex sich nur um einen Mismatch unterscheidet.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren gleichzeitig und parallel an einer Vielzahl von Analytnucleinsäuren durchgeführt wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Analytnucleinsäuren durch PCR erhalten wurden.
13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Analytnucleinsäure markiert wird, indem für die PCR Primer, die eine Markierung tragen, eingesetzt werden.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Rezeptoroligo und/oder Sondenoligo an einem Ende einen Partner eines spezifisch bindenden Paares aufweisen, wobei der andere Partner des spezifisch bindenden Paares an einer Oberfläche gebunden ist.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Rezeptoroligo und/oder Sondenoligo an einer Oberfläche gebunden sind.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass Analyt und Sondenoligo an einer Oberfläche gebunden sind.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Rezeptoroligo und Sondenoligo an einer Oberfläche immobilisiert werden und anschließend mit der Analytnucleinsäure hybridisiert werden.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Rezeptoroligo und/oder Sondenoligo zuerst mit der Analytnucleinsäure in Kontakt gebracht werden unter solchen Bedingungen, dass eine Hybridisierung stattfindet, und anschließend immobilisiert werden.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine der beiden Oberflächen, die zur Immobilisierung verwendet werden, aus einem elastischen Material besteht bzw. mit einem elastischen Material beschichtet ist.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine der beiden Oberflächen mit Polydimethylsiloxan oder einem Derivat davon beschichtet ist.
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Rezeptoroligo und/oder Sondenoligo entweder direkt kovalent, über ein Brückenmolekül und/oder über ein spezifisch bindendes Paar an einer Oberfläche immobilisiert ist.
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die komplementären Nucleinsäurestränge DNA-, RNA- und/oder LNA - Stränge sind.
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Partner des spezifisch bindenden Paares Biotin und Streptavidin bzw. Antibiotin-Antikörper sind.
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Markierung eine Gruppe verwendet wird, die optisch und/oder elektrisch nachweisbar ist.

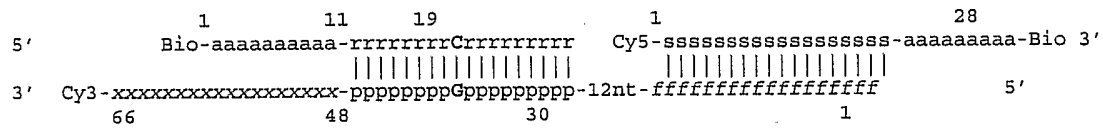
25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Markierung eine radioaktive, fluoreszierende, lumineszierende, chromophore Markierung oder ein Farbstoff oder eine leitfähige Gruppe verwendet wird.
26. Verfahren nach Anspruch 25 dadurch gekennzeichnet, dass als Markierung eine fluoreszierende Gruppe verwendet wird.
27. Verfahren nach Anspruch 26 dadurch gekennzeichnet, dass als Markierung Fluoresceinisothiocyanat, Fluorescein, Rhodamin, Tetramethylrhodamin-5-(und-6)-isothiocyanat, Texas Red oder ein Cyaninfarbstoff verwendet wird.
28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zwei Markierungen verwendet werden, die an Analytnucleinsäure und Sondenoligo bzw. Referenzstrang gebunden sind.
29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zwei Markierungen verwendet werden, die an Rezeptoroligo und Referenzstrang gebunden sind.
30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die unmarkierten Komponenten immobilisiert werden und die markierten Komponenten zuletzt zu der Reaktionsmischung zugegeben werden.

Figur 1



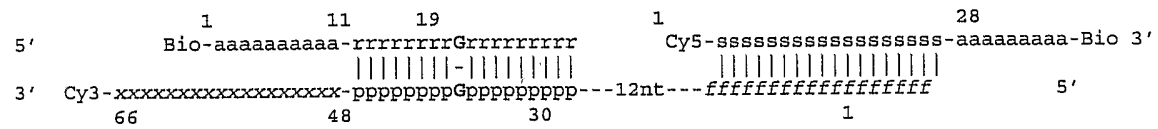
Figur 2

Verkettung von Rezeptor RezWT, der Wildtyp-Probe und der Sonde



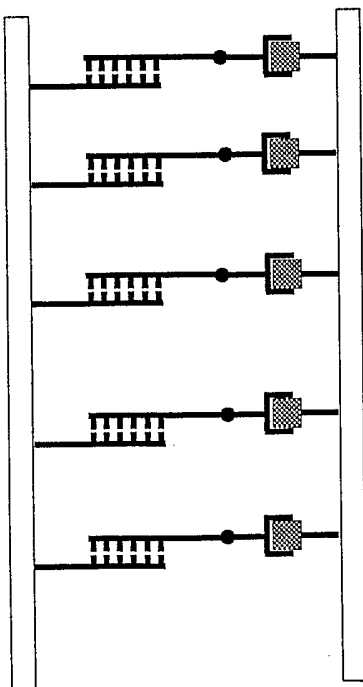
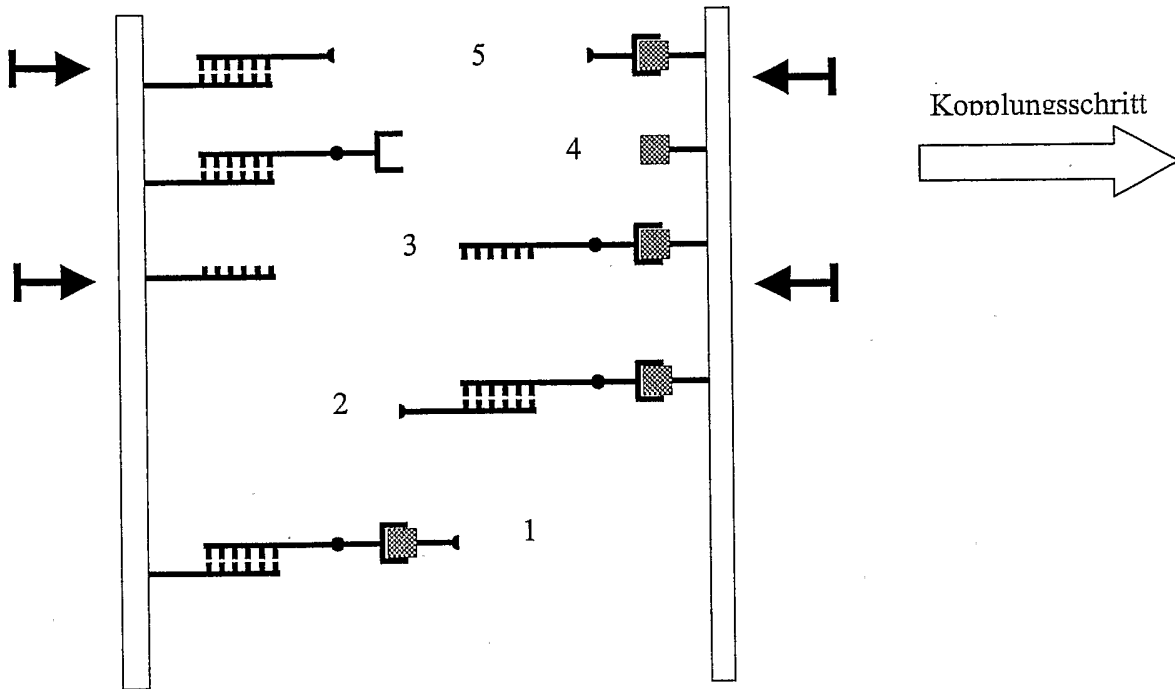
a= Spacer r= Rezeptorsequenz x= Primer 1 p = Probensequenz
 f= Referenzsequenz = komplementär zu Primer 2 s= Sondensequenz

Verkettung von Rezeptor RezM, der Wildtyp-Probe und der Sonde

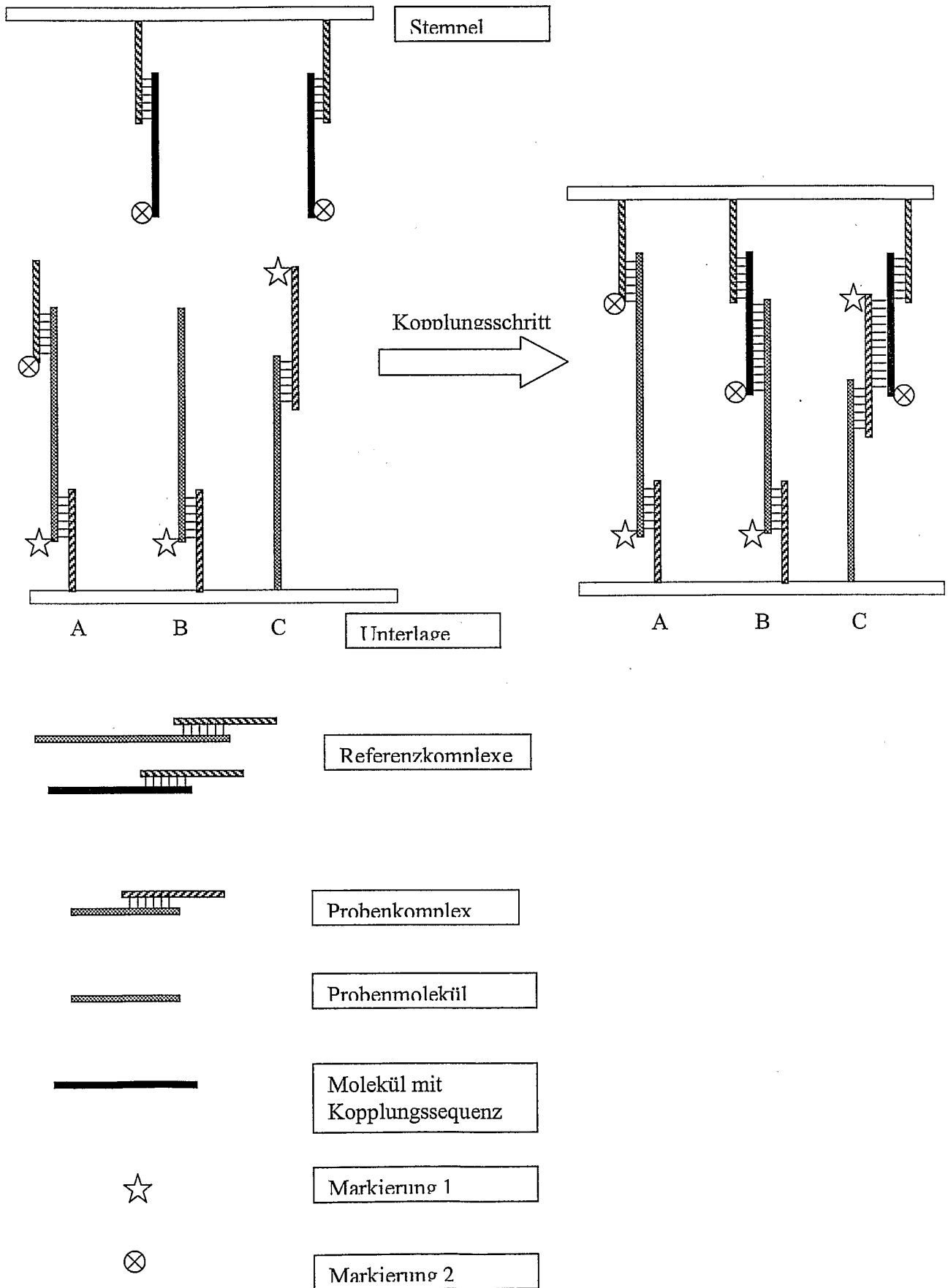


a= Spacer r= Rezeptorsequenz x= Primer 1 p = Probensequenz
 f= Referenzsequenz = komplementär zu Primer 2 s= Sondensequenz

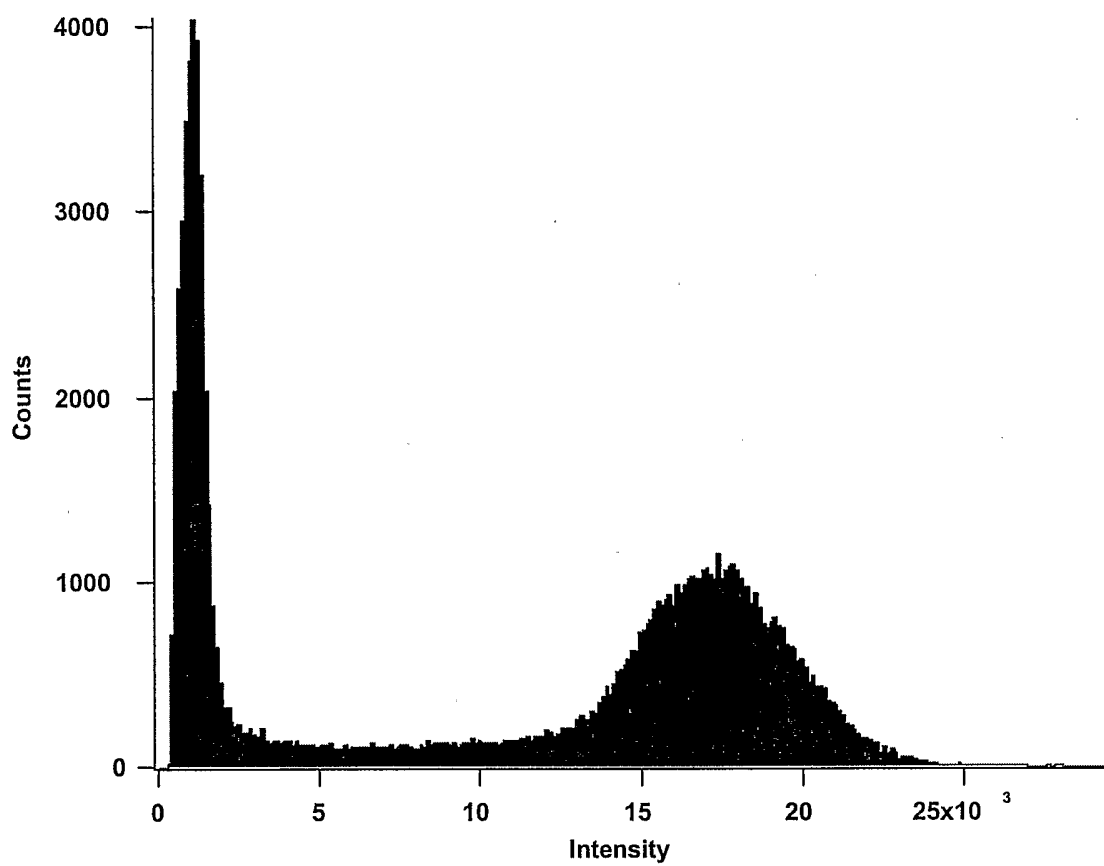
Figur 3



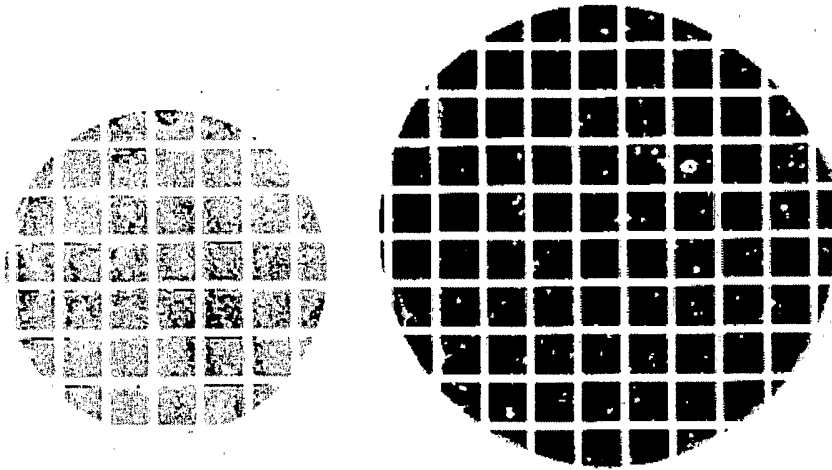
Figur 4



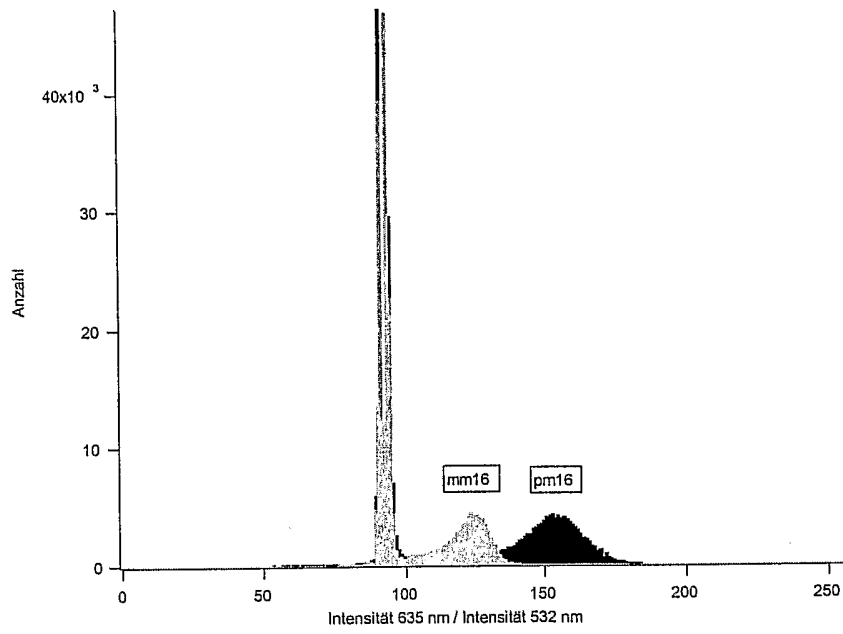
Figur 5



Figur 6



Figur 7



Figur 8

Hybridisierungsschema der verwendeten Oligonukleotide

Perfect Match					
20PM - 20PM					
Rezeptor-PM	NH2	AAAAAAAAAA	TACGAGTCCATGGGATCTGA		
Probe	-		ATGCTCAGGTACCCTAGACTGGTCA	AAAAAA	ACTGGTCAGATCCCATGGACTCGTA
Sonde	-			AAAAA	AGTCTAGGGTACCTGAGCAT
					AAAAAAAAAA
					Bio
					Cy5
					-
Mismatch					
20MM - 20PM					
Rezeptor-MM	NH2	AAAAAAAAAA	TACGAGTCCATGGGATCTGA		
Probe	-		ATGCTCAGGTACCCTAGACTGGTCA	AAAAAA	ACTGGTCAGATCCCATGGACTCGTA
Sonde	-			AAAAA	AGTCTAGGGTACCTGAGCAT
					AAAAAAAAAA
					Bio
					Cy5
					-

Figur 9

