



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 22 541 T2** 2006.06.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 238 100 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 22 541.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/20034**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 948 890.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/007661**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.07.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.02.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.09.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **07.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

145432 P 23.07.1999 US

(73) Patentinhaber:

Gen-Probe Inc., San Diego, Calif., US

(74) Vertreter:

Viering, Jentschura & Partner, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

Nunomura, Kiyotada, Tokyo 188-0013, JP

(54) Bezeichnung: **POLYNUKLEOTID- AMPLIFIKATIONSVERFAHREN**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Zusammensetzungen, welche zum Verbessern der Präzision und quantitativen Kapazität von Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen, die für gewöhnlich in Laboratorien für Molekulargenetik durchgeführt werden, verwendbar sind.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Enzymgestützte Methoden zum Amplifizieren von Polynukleotiden sind nun gängige Hilfsmittel für diagnostisches, Umwelt und forensisches Testen. Der Markt für die DNA-Sonden-Diagnostik in klinischen Laboratorien macht mittlerweile jedes Jahr mehrere hundert Millionen Dollar aus. Man erwartet, dass das Geschäft mit klinisch diagnostischen Sonden wachsen wird, wobei das virale Screening und die Bestimmung der viralen Beladung Hauptgebiete der aktiven Marktexpansion darstellen. Angesichts des kommerziellen Wertes dieser Technologie sind bedeutende Leistungen in die Forschung und die Entwicklung von verbesserten Amplifizierungsmethoden (siehe Genetic Engineering News 17: 6 (1997)) investiert worden.

[0003] Vor kurzem entwickelte Techniken zum Amplifizieren von Polynukleotidanalyten haben brauchbare Alternativen zu Verfahren bereitgestellt, die auf dem ursprünglichen Protokoll zur Polymerase Kettenreaktion (PCR) basieren. Entsprechend einer Technik werden DNA-Amplifikationsreaktionen auf Festphasensubstraten, die wahlweise aus Glas, Plastik, einem Halbleiterchip oder einem phaseroptischen Array hergestellt sind, durchgeführt. Markierte Ziel-DNA wird als molekulare Brücke zwischen Oligonukleotidprimerpaaren, die auf dem festen Substrat immobilisiert sind, so dass die Amplifikationsprodukte am festen Substrat angebunden bleiben, synthetisiert. Das U.S. Patent Nr. 5,399,491 offenbart eine andere Technik, wobei ein Ziel-Polynukleotid autokatalytisch unter Bedingungen von im Wesentlichen konstanter Temperatur, Ionenstärke und pH amplifiziert wird. Dieses Verfahren, dass transkriptionsvermittelte Amplifikation (TMA) genannt wird, erlaubt die Synthese von mehreren RNA-Kopien der Ziel-Sequenz. Sich in der Zukunft wahrscheinlich entwickelnde neue Verfahren werden fortfahren den Bereich von Anwendungen, die durch Polynukleotid-Amplifikationstechniken angegangen werden können, zu erweitern.

[0004] Quantitative Amplifikationsassays repräsentieren eine Untermenge von Assays, die allen Aspekten der Methode stringente Anforderungen, einschließlich der Matrizenisolierung und Standardisierung der Amplifikationswirksamkeit, auferlegen. Ansätze, die interne Standards verwenden, die an den Amplifikationsreaktionen teilhaben, sollen die Reaktionswirksamkeit vereinheitlichen, weisen jedoch die variablen Mengen des Input-Polynukleotidanalyten in der Reaktion nicht nach. Verwandte Verfahren, die einen Polynukleotidanalyten und Kontroll-Polynukleotide, die von konstitutiv exprimierten konstitutiven Genen abstammen, gleichzeitig amplifizieren, sind ebenfalls nicht perfekt, da mehrere Primersätze erforderlich sind, um die Amplifikationsreaktion durchzuführen.

[0005] Ein Beispiel für Verfahren, die auf der Verwendung von internen Standards bei quantitativen PCR-Amplifikationen beruhen, ist im U.S. Patent Nr. 5,219,727 offenbart. Gemäß dem in diesem Patent offenbarten Verfahren ist der interne Standard in der Amplifikationsreaktion eingeschlossen und ist so ausgestaltet, dass er sich mit vergleichbarer Wirksamkeit wie das Ziel-Polynukleotid amplifizieren wird. Wie Verfahren, die konstitutiv exprimierte Genprodukte für die Verwendung als interne Standards co-amplifizieren, erfordert das im U.S. Patent Nr. 5,219,727 offenbarte Verfahren das Detektieren und Quantifizieren des vom internen Standard abstammenden Amplikons, um den Polynukleotidanalyten zu quantifizieren. Demnach sind immer noch mehrere Schritte erforderlich, um die Polynukleotidanalyten zu quantifizieren, wenn ein interner Standard detektiert und quantifiziert werden muss.

[0006] Ein anderes Beispiel ist das in WO-A-9502067 (Akzo Nobel, 1995) offenbarte Verfahren, dass das Quantifizieren eines Polynukleotidanalyten durch das In-Bezug-setzen der vorgegebenen Menge eines Pseudoziels zur Menge des Polynukleotidanalyten ermöglicht.

[0007] Ein weiteres Beispiel ist das Verfahren, dass in US-A-5710029 (Ryder et al., 1998) exemplarisch dargestellt wird, dass das Verringern eines nichtspezifischen Hintergrundes in einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion durch Coamplifizieren einer vorgegebenen Menge eines Pseudoziels und anschließendem Analysieren und Quantifizieren des Polynukleotidanalyten in einer Probe durch in-Beziehungsetzen beider Mengen ermöglicht.

[0008] Die Tatsache, dass amplifizierte Polynukleotide ("Amplikons") in gewöhnlichen PCR und TMA-Methoden als frei in Lösung vorliegende Moleküle synthetisiert werden, stellt eine andere Quelle für Ungenauigkeiten bei der Analytdetektion dar. Diese Amplikons können einfach zwischen Proben übertragen werden, so dass Falsch Positive in den kontaminierten Reaktionsansätzen hergestellt werden. Standardvorsichtsmaßnahmen zum Minimieren von falsch positiven Ergebnissen in Folge einer Kontamination durch übertragene DNA-Matrizen, schließen die ultraviolette Bestrahlung von Pipettiervorrichtungen, die Verwendung von Einwegglas- und Plastikgegenständen, das Nutzen von unterschiedlichen Laboratorien oder Laborabschnitten für die Durchführung von Amplifikationsreaktionen und die Verhinderung der Aerosolbildung ein. Ein aufwendiger Ansatz, um sicherzustellen, dass PCR-Produkte in aufeinander folgenden Reaktionen nicht reamplifiziert werden können, schließt eine Serie von Schritten unter Verwendung spezieller Reagenzien ein, um die Produkte von vorherigen PCR-Amplifikationen abzubauen. Jedoch ist dieses Verfahren etwas kompliziert und schließt das Ersetzen von dUTP für dTTP in der PCR-Mischung und dann die Vorbehandlung aller folgenden PCR-Mischungen mit einem Uracil N-Glycosylase (UNG)-Enzym vor der PCR-Amplifikation ein. Produkte von vorherigen PCR-Amplifikationen werden dann durch das Ausschneiden der Uracilreste mittels UNG und das Abbauen des sich daraus ergebenden basischen Polynukleotids (Longo, et al., Gene 93: 125 (1990)) eliminiert. Offensichtlich eignen sich diese Verfahren nicht für Assays mit hoher Durchsatzleistung.

[0009] Dementsprechend besteht ein fortwährender Bedarf an Techniken, die verwendet werden können, um die Präzision von Polynukleotid-Amplifikationsmethoden zu steigern. Des Weiteren besteht ein Bedarf an Techniken, die verwendet werden können, um das Auftreten von falsch positiven Ergebnissen, die die Folge einer positiven Übertragungskontamination sind, zu verringern. Die vorliegende Erfindung nimmt sich beider Bedürfnisse an.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Quantifizierung von Polynukleotidanalyten, die in einer Testprobe vorhanden sind. Das Verfahren schließt Schritte ein für: (1) Das Kombinieren einer vorgegebenen Menge einer Testprobe, die eine unbekannte Menge eines Polynukleotidanalyten enthält, mit einer vorgegebenen Menge eines Pseudoziels; (2) das Co-Amplifizieren des Polynukleotidanalyten und des Pseudoziels in einer Polynukleotid-Amplifikationsreaktion, um eine Sammlung von Amplifikationsprodukten herzustellen, die sowohl ein Analyt-Amplikon einschließt, wenn die Probe den Polynukleotidanalyten enthält, als auch ein Pseudoziel-Amplikon; und (3) das Quantifizieren des Analyt-Amplikons ohne von einer Information in Bezug auf die Menge des in der Reaktion hergestellten Pseudoziel-Amplikons abzuhängen, wobei die Menge des Analyt-Amplikons in einer Dosisabhängigen Weise zur unbekannten Menge des Polynukleotidanalyten, der in der ursprünglichen Testprobe vorhanden war, in Beziehung steht. Wahlweise kann es einen zusätzlichen Schritt zum Detektieren des Pseudoziel-Amplikons geben. Dieser wahlweise Schritt kann zum Beispiel als Positivkontrolle für die Amplifikationsreaktion nützlich sein. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung schließt der Schritt zum Quantifizieren des Analyt-Amplikons als erstes das Hybridisieren der Sammlung von Amplifikationsprodukten aus dem Co-Amplifizierungsschritt mit einer markierten Sonde, die für das Analyt-Amplikon spezifisch ist jedoch nicht für das Pseudoziel-Amplikon, und dann das Detektieren aller markierten Sonden, die mit dem Analyt-Amplikon spezifisch hybridisierten, ein. Selbstverständlich wird angenommen, dass die Analyt-Amplikon spezifische Sonde eine Sonde sein kann, die den Polynukleotidanalyten oder einen dazu komplementären Nukleinsäurestrang bindet. In anderen Ausführungsformen kann die Polynukleotid-Amplifikationsreaktion im Co-Amplifizierungsschritt jedwede transkriptionsvermittelte Amplifikations (TMA)-Reaktion, eine NASBA-Reaktion oder einer Polymerasekettenreaktion sein, wobei die TMA-Reaktion eine stark bevorzugte Ausführungsform der Erfindung darstellt. Unabhängig vom Typ der Amplifikationsreaktion, die verwendet wird, kann der Schritt zum Erhalten als erstes das Sammeln einer biologischen Einzelprobe und dann das Freilassen von Nukleinsäuren, die in der Probe enthalten sind, einschließen, um eine Probe zu ergeben, welche die unbekannte Menge des Polynukleotidanalyten enthält. Für alle Typen von Amplifikationsreaktionen liegt die Menge des Pseudoziels im Kombinierungsschritt bevorzugt zwischen 1×10^3 und 2×10^8 Molekülen, noch bevorzugter zwischen 1×10^4 und 2×10^8 Molekülen und am meisten bevorzugt zwischen 1×10^5 und 2×10^8 Molekülen. Wahlweise kann es einen zusätzlichen Schritt zum Einfangen des Polynukleotidanalyten auf einer festen Phase vor dem Co-Amplifizierungsschritt geben. In Ausführungsformen des erfundenen Verfahrens, die den zusätzlichen Schritt zum Einfangen anwenden, reicht die Menge des verwendeten Pseudoziels im Kombinierungsschritt bevorzugt von zwischen 1×10^3 und 2×10^8 Molekülen, noch bevorzugter zwischen 1×10^4 und 2×10^8 Molekülen und am meisten bevorzugt zwischen 1×10^5 und 2×10^8 Molekülen. Ein bevorzugtes Trägermaterial ist ein Kügelchen, das mit einem synthetischen Polynukleotid derivatisiert ist. Die in der Methode verwendete biologische Einzelprobe kann eine Blutprobe oder eine Plasmaprobe sein, und die in der Einzelprobe enthaltenen Nukleinsäuren können virale Nukleinsäure beinhalten. In einer Ausführungsform der Erfindung ist der in der Methode verwendete Polynukleotidanalyt eine Nukleinsäure, die von

HIV-Virionen freigesetzt wird. Wenn die im erfundenen Verfahren verwendete Polynukleotid-Amplifikationsreaktion die TMA-Reaktion ist, kann ein weiterer Schritt zum Isolieren des Polynukleotidanalyten und des Pseudoziels nach dem Kombinierungsschritt und vor dem Co-Amplifizierungsschritt im Verfahren eingeschlossen sein. In Ausführungsformen des erfundenen Verfahrens, in dem die transkriptionsvermittelte Amplifikationsreaktion angewendet wird, liegt die in der Reaktion verwendete Menge des Pseudoziels bevorzugt zwischen 1×10^3 und 2×10^8 Molekülen, noch bevorzugter zwischen 1×10^4 und 2×10^8 Molekülen und am meisten bevorzugt zwischen 1×10^5 und 2×10^8 Molekülen. Wenn der Schritt des quantitativen Detektierens das Hybridisieren einer markierten Sonde einschließt, die für das Analyt-Amplikon spezifisch ist, kann die markierte Sonde mit einem Acridiniumester markiert sein, wobei in dem Fall der Schritt zum quantitativen Detektieren das Durchführen einer Luminometrie einschließen kann. In Ausführungsformen der Erfindung, in denen der erste Schritt das Freisetzen von Nukleinsäuren, die in einer biologischen Einzelprobe enthalten sind, einschließt, kann der Polynukleotidanalyt ein virales Polynukleotid sein. Im Allgemeinen kann das erfundene Verfahren den weiteren Schritt des Hinzuziehens einer Standardkurve, die die Mengen an Polynukleotidanalyt vor und die Menge an Analyt-Amplikon nach der Amplifikation in Beziehung setzt. Dieser Schritt des Hinzuziehens einer Standardkurve ist ebenso anwendbar, wenn die Luminometrie angewendet wird, um die Hybridisation von mit Acridiniumester markierten Sonden zu messen oder wenn die Amplifikationsreaktion bevorzugt eine transkriptionsvermittelte Amplifikationsreaktion ist. In noch anderen bevorzugten Ausführungsformen, die die transkriptionsvermittelte Amplifikationsreaktion anwenden, kann ein gepaarter Satz von Oligonukleotidprimern mit den Sequenzen der SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 zum Durchführen der Reaktion verwendet werden, und das Pseudoziel kann eine Polynukleotidsequenz aufweisen, die ausgewählt wird aus der Gruppe, die aus SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 9 besteht.

[0011] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren für das in-Beziehung-setzen der Mengen an Polynukleotidanalyten vor mit den Mengen an Analyt-Amplikon nach der Amplifikation. Dieses Verfahren beinhaltet Schritte für: (1) Das Erhalten einer Vielzahl von Kontrollproben, die unterschiedliche vorgegebene Mengen eines Polynukleotidanalyten enthalten; (2) das Kombinieren irgendeiner aus der Vielzahl von Proben mit einer konstanten Menge eines Pseudoziels, um eine Vielzahl von gemischten Proben zu erhalten; (3) das Co-Amplifizieren sowohl des Pseudoziels als auch aller Polynukleotidanalyten, die in allen aus der Vielzahl von gemischten Proben vorhanden ist, in einer Vielzahl von Amplifikationsreaktionen, um Amplifikationsprodukte herzustellen, wobei die Amplifikationsprodukte sowohl ein Pseudoziel-Amplikon für irgendeine aus der Vielzahl von vermischten Proben und ein Analyt-Amplikon für alle der Vielzahl von gemischten Proben, die den Polynukleotidanalyten enthalten, einschließt; (4) das Quantifizieren des Analyt-Amplikons für irgendeine aus der Vielzahl von Amplifikationsreaktionen, ohne Bezug zur Menge des Pseudoziel-Amplikons, das in der Sammlung von Amplifikationsprodukten vorhanden ist; und (5) das Erstellen einer Standardkurve, wobei die unterschiedlichen vorgegebenen Mengen des Polynukleotidanalyten gegen die quantifizierten Mengen des Analyt-Amplikons für irgendeine aus der Vielzahl von Amplifikationsreaktionen aufgetragen werden, wodurch die Mengen des Polynukleotidanalyten vor der Amplifikation, die in allen aus der Vielzahl von Kontrollproben vorhanden sind, mit den Mengen des Analyt-Amplikons nach der Amplifikation, die in allen Amplifikationsreaktionen synthetisiert werden, in Beziehung gesetzt werden. Wahlweise kann es einen zusätzlichen Schritt zum Detektieren des Pseudoziel-Amplikons geben. Dieser wahlweise Schritt kann zum Beispiel als Positivkontrolle für die Amplifikationsreaktion nützlich sein. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Polynukleotidanalyt ein virales Polynukleotid, wie zum Beispiel ein HIV-Polynukleotid. Im Allgemeinen kann die konstante vorgegebene Menge des Pseudoziels von zwischen 1×10^3 und 2×10^8 Molekülen, noch bevorzugter von zwischen 1×10^4 und 2×10^8 und am meisten bevorzugt von zwischen 1×10^5 und 2×10^8 Molekülen reichen. Gemäß anderen Ausführungsformen des erfundenen Verfahrens kann die Vielzahl der Amplifikationsreaktionen im Co-Amplifizierungsschritt jede aus einer Vielzahl von transkriptionsvermittelten Amplifikationsreaktionen, einer Vielzahl von NASBA-Reaktionen und einer Vielzahl von PCR-Reaktionen sein. In einer Sammlung von stark bevorzugten Ausführungsformen sind die Amplifikationsreaktionen im Co-Amplifizierungsschritt transkriptionsvermittelte Amplifikationsreaktionen. Unabhängig von der Art der Amplifikationsreaktionen die angewendet werden, kann der Quantifizierungsschritt als erstes das Hybridisieren der Amplifikationsprodukte aus dem Co-Amplifizierungsschritt mit einer markierten Sonde, die für das Analyt-Amplikon spezifisch ist jedoch nicht für das Pseudoziel-Amplikon und danach das quantitative Detektieren jeder markierten Sonde, die spezifisch hybridisierte, einschließen. In bestimmten Fällen ist die markierte Sonde mit einem Acridiniumester markiert.

[0012] In noch anderen bevorzugten Ausführungsformen, in denen der Quantifizierungsschritt die Hybridisation mit einer markierten Analyt-Amplikon spezifischen Sonde einschließt, kann es einen zusätzlichen Schritt zum Einfangen des Polynukleotidanalyten auf einem Trägermaterial vor dem Co-Amplifizierungsschritt geben.

[0013] Ebenfalls offenbart sind Kits, die für das Durchführen von Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen entsprechend dem beschriebenen Verfahren unter Verwendung von Polynukleotidanalytmatrizen verwendet wer-

den können. Beispielhafte Kits können beinhalten: ein Pseudoziel; mindestens ein Oligonukleotidprimerpaar zum Co-Amplifizieren des Pseudoziels und des Polynukleotidanalyten; Reagenzien zum Ausführen der Polynukleotid-Amplifikationsreaktion, einschließlich Desoxynukleotidtriphosphate und ein DNA polymerisierendes Enzym; und gedruckte Instruktionen mit Anweisungen dafür, dass zuerst die Amplifikationsreaktion ausgeführt wird und dann nur die Analyt-Amplikons, die in der Amplifikationsreaktion hergestellt worden sind, detektiert werden. In einer Ausführungsform kann das erfundene Kit auch eine markierte Sonde zum Detektieren aller Analyt-Amplikons, die in der Amplifikationsreaktion hergestellt worden sind, beinhalten. Gemäß einer anderen Ausführungsform schließt das erfundene Kit des Weiteren Nukleotidtriphosphate und ein RNA polymerisierendes Enzym ein. Das in den Kits enthaltene DNA polymerisierende Enzym kann eine reverse Transkriptase sein. In einer sehr bevorzugten Ausführungsform wird keine RNase H zusätzlich zu der durch die reverse Transkriptase bereitgestellten im Kit verwendet.

[0014] Ein noch anderer Aspekt der Erfindung betrifft ein qualitatives Verfahren zum Bestimmen, ob eine biologische Probe einen Polynukleotidanalyten enthält. Dieses Verfahren beinhaltet Schritte für: (1) Das Kombinieren einer biologischen Probe mit einem Pseudoziel, um eine gemischte Probe zu erhalten; (2) das Isolieren von Nukleinsäuren aus der gemischten Probe, wobei eine Sammlung von Molekülen erhalten wird, die das Pseudoziel und alle Polynukleotidanalyten, die in der biologischen Probe vorhanden sind, einschließt; (3) das Durchführen einer Polynukleotid-Amplifikationsreaktion, um das Pseudoziel und alle Polynukleotidanalyten, die in der Sammlung von Molekülen enthalten sind, zu co-amplifizieren, um Amplifikationsprodukte herzustellen, wobei Pseudoziel-Amplikons gebildet werden und wobei Analyt-Amplikons gebildet werden, wenn die Sammlung der Moleküle den Polynukleotidanalyten enthielt; (4) das Detektieren aller Analyt-Amplikons in den Amplifikationsprodukten ohne das Detektieren der Pseudoziel-Amplikons; und (5) das Bestimmen, dass die biologische Probe den Polynukleotidanalyten enthält, wenn die Analyt-Amplikons unter den Amplifikationsprodukten detektiert werden. In den bestimmten Ausführungsformen ist die Amplifikationsreaktion irgendeine transkriptionsvermittelte Amplifikationsreaktion, eine NASBA-Reaktion und eine PCR-Reaktion. In bestimmten stark bevorzugten Ausführungsformen ist die Amplifikationsreaktion eine transkriptionsvermittelte Amplifikationsreaktion. Unabhängig vom der Art der verwendeten Amplifikationsreaktion, kann der Detektionsschritt als erstes das Hybridisieren einer markierten Polynukleotidsonde mit einer Bindungsspezifität für die Analyt-Amplikons und danach das Messen des Ausmaßes der spezifischen Bindung der markierten Polynukleotidsonde einschließen. Wenn der Detektionsschritt das Hybridisieren einer markierten, Analyt-Amplikon spezifischen Sonde einschließt, kann der Isolationsschritt das Immobilisieren des Pseudoziels und des Polynukleotidanalyten auf einem Trägermaterial einschließen. Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform schließt der Detektionsschritt das Detektieren durch Luminometrie ein. In einer noch anderen bevorzugten Ausführungsform stammt der Polynukleotidanalyt von HIV-Virionen ab. Wenn dies der Fall ist, kann das Pseudoziel eine Sequenz aufweisen, die entweder SEC ID NO: 4 oder SEC ID NO: 9 ist.

Definitionen

[0015] Wie hier verwendet, haben die folgenden Begriffe die folgende Bedeutung, wenn nicht ausdrücklich etwas Gegenteiliges gesagt wird.

[0016] Ein "Polynukleotid" kann, soweit nicht anders spezifiziert, entweder RNA oder DNA sein.

[0017] Ein "Oligonukleotid" ist ein Polynukleotidmolekül mit einer Länge von 10 bis 100 Nukleotiden und noch bevorzugter 10 bis 50 Nukleotiden. Gewöhnlich werden Oligonukleotide durch organisch chemische Verfahren synthetisiert und sind einzelsträngig, soweit nicht anders spezifiziert. Oligonukleotide können mit einem detektierbaren Marker markiert sein.

[0018] Ein "Amplikon" ist ein Polynukleotidprodukt, das in einer Amplifikationsreaktion hergestellt wird.

[0019] Ein "Analyt-Amplikon" ist ein Polynukleotidprodukt einer Amplifikationsreaktion, wobei ein Polynukleotidanalyt als Matrize für die Synthese von Polynukleotidkopien oder Amplifikationsprodukten diene.

[0020] Ein "Polynukleotidanalyt" ist ein Ziel-Polynukleotid, das durch einen Nukleinsäureamplifikationsverfahren, wie zum Beispiel dem TMA-Protokoll, repliziert wird, jedoch von einem Pseudoziel-Polynukleotid strukturell unterscheidbar ist. Die zwei Polynukleotide können zum Beispiel aufgrund des Vorhandenseins oder der Abwesenheit einer Restriktionsenzym-Spaltstelle oder einem internen Sequenzunterschied, der durch eine Hybridisationssonde unterschieden werden kann, unterscheidbar sein.

[0021] Ein "Ziel-Polynukleotid" weist eine zu replizierende Zielsequenz auf, kann entweder einzelsträngig

oder doppelsträngig sein und kann neben der Zielsequenz weitere Sequenzen einschließen, wobei die zusätzlichen Sequenzen nicht amplifiziert werden müssen.

[0022] Eine "Zielsequenz" betrifft die bestimmte Nukleotidsequenz des Ziel-Polynukleotids, das amplifiziert werden soll. Die Zielsequenz schließt die Komplexierungssequenzen ein, an die die Oligonukleotidprimer, die in der Amplifikationsreaktion verwendbar sind, vor der Verlängerung durch eine DNA-Polymerase hybridisieren können. Wenn das Ziel-Polynukleotid ursprünglich einzelsträngig ist, betrifft der Begriff "Zielsequenz" auch die Sequenz, die zum Ziel-Polynukleotid komplementär ist. Wenn das Ziel-Polynukleotid ursprünglich doppelsträngig ist, betrifft der Begriff "Zielsequenz" sowohl den (+)- als auch den (-)-Strang, die komplementär zueinander sind.

[0023] Ein "Pseudoziel" ist ein Polynukleotid, das mit dem Polynukleotidanalyten in einer einzelnen Amplifikationsreaktion co-amplifiziert werden kann. Das Pseudoziel und der Polynukleotidanalyt werden mittels des gleichen Satzes an Oligonukleotidprimern amplifiziert. Das Pseudoziel und der Polynukleotidanalyt werden nicht identische Moleküle sein, so dass der Polynukleotidanalyt und das Pseudoziel voneinander unterschieden werden können.

[0024] Ein "Pseudoziel-Amplikon" ist ein Polynukleotidprodukt einer Amplifikationsreaktion, wobei ein Pseudoziel als Matrize für die Synthese der Polynukleotidkopien oder Amplifikationsprodukte diene.

[0025] Eine "Polynukleotid-Amplifikationsreaktion" ist eine matrizenabhängige, in vitro enzymkatalysierte Reaktion, um die Anzahl der Ziel-Polynukleotide zu erhöhen.

[0026] Im Kontext der Erfindung betrifft das "quantitative Detektieren" oder das "Quantifizieren" ein Verfahren zum Bestimmen des Ausmaßes der Polynukleotid- oder Amplikonherstellung.

[0027] Eine "markierte Sonde" ist ein Nukleotidpolymer, das einen detektierbaren Rest enthält und das sich mit einer komplementären einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäuresequenz verbinden kann, um ein doppelsträngiges Hybrid zu bilden. Der Begriff schließt auch Analoga von natürlich auftretenden Nukleotiden ein und schließt besonders Analoga mit einer Methoxy-Gruppe in der 2' Position der Ribose (OMe) ein. Der detektierbare Rest kann an das/die Ende(n) der Sonde befestigt sein oder kann intern innerhalb der Sequenz der Sonde positioniert sein. Im Allgemeinen werden markierte Sonden etwa 10 bis etwa 100 Nukleotide lang sein, können jedoch länger als 100 oder kürzer als 10 Nukleotide sein.

[0028] Ein "detektierbarer Rest" ist ein Molekül, das angebunden ist an eine markierte Sonde oder als Teil einer markierten Sonde synthetisiert wird. Dieses Molekül sollte einzigartige detektierbar sein, und wird es der Sonde ermöglichen, in Folge davon detektiert zu werden. Diese detektierbaren Reste sind häufig Radioisotope, chemilumineszierende Moleküle, Enzyme, Haptene oder auch einzigartige Oligonukleotidsequenzen.

[0029] Eine "für ein Analyt-Amplikon spezifische markierte Sonde" ist eine markierte Sonde mit einer Polynukleotidsequenz, die mit einem Polynukleotidprodukt, das in einer Amplifikationsreaktion synthetisiert worden ist, komplementär ist, wobei ein Polynukleotidanalyt als Matrize für die Synthese der Amplifikationsprodukte diene. Da ein Amplikon ein in einer Amplifikationsreaktion hergestelltes Polynukleotidprodukt ist, kann die markierte Sonde, die für das Analyt-Amplikon spezifisch ist, komplementär zu jedem Polynukleotidstrang sein, der in der Reaktion hergestellt worden ist. Wenn daher ein Polynukleotidanalyt ein einzelsträngiges Molekül ist, dass eine Zielsequenz enthält, und wenn Kopien der Zielsequenz und seines Komplements in der Amplifikationsreaktion erzeugt werden, dann kann die markierte Sonde, die für das Analyt-Amplikon spezifisch ist, zur Zielsequenz oder seinem Komplement komplementär sein.

[0030] Wie hierin verwendet, betrifft "Co-Amplifizieren" das Verfahren des Amplifizierens mehr als einer Art eines Ziel-Polynukleotids in einer Polynukleotid-Amplifikationsreaktion. Zum Beispiel soll das "Co-Amplifizieren eines Polynukleotidanalyten und eines Pseudoziels" das Verfahren des gleichzeitigen Amplifizierens der zwei Polynukleotide betreffen, um zur Bildung von Analyt-Amplikons bzw. von Pseudoziel-Amplikons zu führen.

[0031] Wie hierin verwendet, kann das "Erhalten" einer Probe, die einen Polynukleotidanalyten enthält oder enthalten kann, entweder das Erhalten aus einem biologischen Subjekt, wie z.B. einem Menschen, oder das Erhalten aus einem Reagenz-Aufbewahrungsort, wie zum Beispiel von einem kommerziellen Händler, bedeuten. Wenn eine Probe von einem Tier oder von einem Menschen erhalten wird, versteht es sich, dass alle geeigneten Mittel, die dem Fachmann vertraut sind, verwendet werden können. Wenn zum Beispiel eine Blutpro-

be erhalten wird, kann sie entweder durch Aufziehen von Blut durch eine Venenpunktur erhalten werden, kann aber auch als forensische Probe erhalten werden.

[0032] Wie hierin verwendet, bedeutet der Satz "ohne Bezug zur Menge des Pseudoziel-Amplikons", dass eine quantitative Information in Bezug auf die Menge des Pseudoziel-Amplikons, das in einer Amplifikationsreaktion synthetisiert wird, nicht erforderlich ist, um eine Bestimmung bezüglich eines anderen Parameters in einem Amplifikationssystem zu machen. Zum Beispiel kann die synthetisierte Menge eines Analyt-Amplikons in einem Amplifikationssystem oder die Menge eines Polynukleotidanalyten, der zur Bildung dieser Menge des Amplikons geführt hätte, gemäß den hier offenbarten Verfahren ohne quantitative Information über die Bildung des Pseudoziel-Amplikons in der gleichen Reaktion bestimmt werden. Es ist in der Tat nicht einmal notwendig, das Pseudoziel-Amplikon für den Erfolg des hierin beschriebenen quantitativen Verfahrens zu detektieren. Die vorliegende Erfindung stellt einen Ansatz für das in-Beziehung-setzen der Menge des Polynukleotidanalyten vor der Amplifikation zur Menge des Analyt-Amplikons nach der Amplifikation bereit. Diese Beziehung kann ermittelt werden, ohne von der Menge des Pseudoziel-Amplikons, das mit dem Analyt-Amplikon in einer Amplifikationsreaktion co-amplifiziert wird, abzuhängen, oder auch nur davon zu wissen. Auch wenn daher das Pseudoziel-Amplikon in einer experimentellen Methode detektiert oder quantifiziert wird, ist es nicht notwendig, diese Information zu verwenden, wenn die Menge eines Polynukleotidanalyten vor der Amplifikation und die Menge des korrespondierenden Analyt-Amplikons nach der Amplifikation in Beziehung gesetzt werden.

[0033] Wie hierin verwendet, ist die "Standardkurve" eine Darstellung, die die Menge eines Polynukleotids vor der Amplifikation mit der Menge eines korrespondierenden Amplikons nach der Amplifikation in Beziehung setzt. Zum Beispiel kann eine Standardkurve ein Graph sein, der bekannte Zahlen von Input-Matrizenmolekülen auf der x-Achse und entweder RLU-Werte oder Picomol des Amplikonproduktes, die auf der y-Achse dargestellt sind, aufweist. Standardkurven werden üblicherweise mittels Kontroll-Polynukleotidstandards hergestellt, die bekannte Zahlen an Polynukleotid Matrizen aufweisen. Standardkurven können in elektronischer Form gespeichert werden oder können graphisch dargestellt werden.

[0034] Eine "biologische Probe" ist eine Materialprobe, die von einem Organismus abstammt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0035] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung von elektrophoretisch getrennten TMA-Reaktionsprodukten, die unter Verwendung unterschiedlicher Mengen an Input-Ziel-Polynukleotidmatrize synthetisiert worden sind. Die mit "NEG" markierte Spur repräsentiert eine Reaktion, die anfangs keine Matrize enthielt. Die verbleibenden Spuren repräsentieren Reaktionen, die unter Verwendung steigender Mengen des Input-Ziel-Polynukleotids durchgeführt worden sind. Die Position des spezifischen Amplifikationsproduktes, das vom Ziel-Polynukleotid abstammt, auf dem Gel ist durch einen Pfeil markiert.

[0036] Die [Fig. 2a–Fig. 2c](#) illustrieren schematisch drei unterschiedliche Reaktionsbedingungen für eine TMA-Reaktion. Wenn andere Variablen, wie z.B. Enzym-, Primer- und NTP-Konzentrationen, unter der Bedingung niedriger Anfangsmengen des Polynukleotidanalyten ([Fig. 2a](#)) konstant gehalten werden, ist die Mehrzahl des Reaktionsproduktes ein Matrizen unabhängiges nichtspezifisches Produkt (NP), während das Analyt-Amplikon oder spezifische Produkt (SP) nur einen unbedeutenden Bestandteil des gesamten Reaktionsproduktes darstellt. Unter Bedingungen von hohen Anfangsmengen des Polynukleotidanalyten ([Fig. 2b](#)) stellt das Analyt-Amplikon (SP) eine Mehrheit des gesamten Reaktionsproduktes dar, während das nichtspezifische Produkt (MP) ein unbedeutender Bestandteil ist. Unter Bedingungen, in denen die Menge des Input-Polynukleotidanalyten niedrig ist, die Menge des Pseudoziels jedoch hoch ist ([Fig. 2c](#)) geht die Pseudoziel-Spezifische-Produkt (PTSP)-Bildung auf Kosten der nichtspezifischen Produktbildung.

[0037] Die [Fig. 3a–Fig. 3b](#) sind schematische Darstellungen, die zeigen, wie das Einschließen von Pseudozielen in idealisierten Reaktionen, die keine nichtspezifischen Amplifikationsprodukte erzeugen, qualitative Assays in quantitative Assays umwandeln können. [Fig. 3a](#) zeigt wie niedrige oder hohe Anfangsmengen des Polynukleotidanalyten (TA) als Matrizen für die Konversion von Reaktanden (R) in vergleichbare Mengen an Analyt-spezifische Produkte (SP) dienen. [Fig. 3b](#) zeigt, dass das Einschließen von Pseudozielen (PsT) in Amplifikationsreaktionen mit niedrigen oder hohen Anfangsmengen des Polynukleotidanalyten eine quantitativen Beziehungen zwischen den Mengen an Analyt-spezifischen Produkten, die in den Reaktionen synthetisiert wurden, und den Anfangsmengen der Matrizen ergibt. Das Diagramm zeigt, dass Pseudoziele als Matrizen in der Reaktion für die Synthese der Pseudoziel-spezifischen Produkte (PTsP) dienen, während Polynukleotidanalyte als Matrizen für die Synthese von Analyt-spezifischen Produkten dienen.

[0038] Die [Fig. 4a–Fig. 4d](#) sind idealisierte Graphen, die illustrieren, wie der dynamische Bereich und die Präzision der Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen verbessert werden, wenn die Reaktionen Pseudoziele enthalten. [Fig. 4a](#) zeigt Ergebnisse, die für eine hypothetische Amplifikationsreaktion, die nur Analyt-spezifische Amplikons erzeugt, erwartet werden. [Fig. 4b](#) zeigt Ergebnisse, die für Amplifikationsreaktionen erwartet werden, die geringe Mengen an nichtspezifischen Amplifikationsprodukten, die zum Polynukleotidanalyten in keiner Beziehung stehen, spontan erzeugen. [Fig. 4c](#) zeigt Ergebnisse, die für Amplifikationsreaktionen erwartet werden, die große Mengen an nichtspezifischen Amplifikationsprodukten, die zum Polynukleotidanalyten in keiner Beziehung stehen, spontan erzeugen. [Fig. 4d](#) zeigt idealisierte Ergebnisse, die bei Reaktionen erwartet werden, die Pseudoziele enthalten.

[0039] [Fig. 5](#) ist ein schematisches Diagramm, das illustriert, wie die Variabilität bei der Wirksamkeit des Wiedergewinnens einer Sammlung von Polynukleotiden, die einen Polynukleotidanalyten und ein Pseudoziel enthalten, vergleichbare Mengen des Amplikons in Folge einer Amplifikationsreaktion erzielen können. Der Polynukleotidanalyt und das Pseudoziel werden am oberen Ende des Diagramms in einem festgelegten Anfangsverhältnis dargestellt. Ob nun 100% oder 50% der Polynukleotidprobe als Anfangsmenge für die Amplifikationsreaktion dienen, die Endmengen des Amplikonproduktes sind die gleichen.

[0040] [Fig. 6](#) ist ein Liniendiagramm, das zeigt, wie ein Pseudoziel verwendet werden kann, um die Amplikonsynthese in Amplifikationsreaktionen, denen unterschiedliche Mengen des Polynukleotidanalyten vorgegeben wurden, zu vereinheitlichen. Die drei in dem Diagramm präsentierten Zustände sind: kein Pseudoziel (◆); konstante Menge des Pseudoziels (■); und konstantes Verhältnis des Pseudoziels und des Polynukleotidanalyten (□).

[0041] [Fig. 7](#) ist ein Liniendiagramm, das zeigt, wie ein Pseudoziel verwendet werden kann, um die Produktion des Analyt-Amplikons zu kontrollieren. Die zwei im Diagramm präsentierten Zustände sind: kein Pseudoziel (●); und 2×10^6 Kopien des Pseudoziels pro Reaktion (■).

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsform

[0042] Ich offenbare hierin, dass Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen, die ein Pseudoziel beinhalten, auf vorteilhafte Weise eine verbesserte Präzision in Bezug auf die Menge des synthetisierten Analyt-Amplikons zeigen. Zusätzlich können qualitative Amplifikationsreaktionen durch Einschließen von Pseudozielen in die Reaktionen und anschließendem quantitativen Messen der Menge des Analyt-Amplikons, das synthetisiert wurde, in quantitative Assays umgewandelt werden. Es ist auch ein neues Verfahren zur Einzelprobenverarbeitung offenbart worden, das auf vorteilhafte Weise die Herstellung eines vorher vorgegebenen Verhältnisses von Pseudoziel- und Analyt-Amplikons in einer nachfolgenden Amplifikationsreaktion, unabhängig von der Wirksamkeit, mit der die Nukleinsäuren aus der Einzelprobe isoliert wurden, sicherstellt. Gemäß diesem Verfahren werden Pseudoziele vor der Isolation von Nukleinsäuren aus der Einzelprobe zu einer biologischen Einzelprobe hinzugefügt. Assays, die in einem qualitativen Format, dass eine Pseudoziel-Amplifikation verwendet, durchgeführt werden, und die semiquantitative Informationen über die Menge des Polynukleotidanalyten in einer Testprobe bereitstellen, werden ebenfalls beschrieben.

Einführung und Überblick

[0043] Eine Beobachtung, die zur Entwicklung der Erfindung führte, betraf ein inhärentes Merkmal der Standard-TMA-Reaktion. Spezieller noch, es wurde beobachtet, dass die enzymatische Synthese von nichtspezifischen Amplifikationsprodukten einen wesentlichen Anteil des Reaktionsproduktes darstellte, wenn die Reaktion nur unter Verwendung sehr geringer Mengen des Ziel-Polynukleotids gestartet wurde. Wenn sie nach der Elektrophorese sichtbar gemacht wurden, erschienen die nichtspezifischen Amplifikationsprodukte als Schmier, der sich über einen ausgedehnten Größenbereich erstreckte. Dieses Ergebnis wird schematisch in [Fig. 1](#) dargestellt.

[0044] Wichtig war auch, dass beobachtet wurde, dass unter Verwendung erhöhter Mengen an Ziel-Polynukleotidmatrizen durchgeführte TMA-Reaktionen zu verringerten relativen Beiträgen der nichtspezifischen Produkte führen. Dieses Ergebnis wird ebenfalls in [Fig. 1](#) dargestellt. Reaktionen, die unter Verwendung von höheren Konzentrationen der Ziel-Polynukleotide initiiert wurden, führten zur Bildung von größeren Mengen an spezifischen Produkten und nur zu kleinen Mengen an nichtspezifischen Produkten. Diese umgekehrte Beziehung führte zur Vermutung, dass die Bildung des nichtspezifischen Reaktionsproduktes durch das Einschließen einer amplifizierbaren Matrize in die Reaktionsmischung, zum Zeitpunkt da die Reaktion initiiert wurde, unterdrückt werden könnte.

[0045] Während es nicht erwünscht ist, durch eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, könnte diese umgekehrte Beziehung in autokatalytischen Reaktionen, wie z.B. der TMA-Reaktion, doch besonders beachtlich sein, da, sofern nicht frühzeitig unterbrochen, es die Natur der Reaktion ist, bis zu einem Endpunkt voranzuschreiten, an dem die Zufuhr von verfügbaren Reaktanden erschöpft ist und keine weitere Synthese stattfinden kann. Eine TMA-Reaktion, die in Abwesenheit eines Ziel-Polynukleotids unendlich voranschreitet, wird nichtspezifische Produkte erzeugen, bis die Reaktanden aufgebraucht sind und keine zusätzliche Synthese stattfindet. Bei einer unendlich ausgeführten PCR-Reaktion erwartet man ebenfalls, dass sie bis zu einem Punkt voranschreitet, an dem die Reaktanden erschöpft sind und die Amplikonherstellung endet, und dass sie ebenfalls nichtspezifische Amplifikationsprodukte (zum Beispiel, siehe D. Persing in *Diagnostic Molecular Microbiology*; Kap. 3, S. 58 (1993)) herstellen kann.

[0046] Da das hierin offenbarte Verfahren für gewöhnlich angewendet wird, wird die Detektion des Analyt-Amplikons verwendet, um die Gegenwart von Polynukleotidanalyten in einer Population von Nukleinsäuremolekülen anzuzeigen. Zum Beispiel könnte eine Methode zum Beobachten der Mengen an humanem Immunschwächevirus (HIV)-Virionen im Serum das Amplifizieren eines Teils des HIV-Genoms und dann das Detektieren und Quantifizieren des Amplifikationsproduktes einschließen. Wenn die Methode des Weiteren das Amplifizieren eines Pseudoziels beinhaltet, dann wäre die Detektion des Pseudoziel-Amplikons ein optionaler Schritt, der für den Erfolg des Assays nicht erforderlich wäre. Die Detektion des Pseudoziel-Amplikons könnte als positive Kontrollmethode verwendet werden, um Anzuzeigen, dass eine Amplifikationsreaktion stattgefunden hat (d.h. eine interne Amplifikationskontrolle). Jedoch hängt die quantitative Charakterisierung der Menge des Analyt-Amplikons, das in einer Amplifikationsreaktion synthetisiert worden ist, oder die Quantität der Polynukleotidanalytmatrix, die zur Bildung der Menge des Analyt-Amplikons geführt haben würde, nicht von dem Wissen über die Menge des Pseudoziel-Amplikons, das in der Amplifikationsreaktion synthetisiert worden ist, ab. Daher kann das Analyt-Amplikon gemäß der hierin offenbarten Verfahren ohne Bezug zur Menge des Pseudoziel-Amplikons, das in einer Amplifikationsreaktion synthetisiert wurde, quantifiziert werden. Ein kritisches Merkmal des hierin offenbarten Verfahrens ist, dass das Analyt-Amplikon vom Pseudoziel-Amplikon unterscheidbar sein muss. Es muss besonders möglich sein, das Analyt-Amplikon zu detektieren, ohne auch das Pseudoziel-Amplikon zu detektieren. In einer bevorzugten Ausführungsform binden das Analyt-Amplikon und das Pseudoziel-Amplikon mindestens eine Hybridisationssonde unterschiedlich, so dass die zwei Amplikonspezies unabhängig voneinander detektiert werden können.

[0047] Ein Punkt, der besonders für klinische Methoden, die Amplifikationsprotokolle verwenden, relevant ist, bezieht sich auf die Variabilität der Wiedergewinnung von Polynukleotidmatrizen aus unterschiedlichen biologischen Einzelproben. Zum Beispiel ist es üblich, dass eine Variabilität bei der Anzahl der Moleküle eines bestimmten Polynukleotids, das aus unterschiedlichen Gewebeproben infolge der variablen Probengrößen und der Komplexität der unterschiedlichen Handhabungsmethoden für die Probe, festgestellt wird. Nukleinsäuren können nichtspezifisch an Glas, Kunststoff und chromatographischen Medien, wie z.B. vernetzte Polyacrylamide und Dextrane, binden, wodurch die Wirksamkeit der Probenwiedergewinnung während der komplexen Verarbeitung reduziert wird. Zusätzlich kann aus einer biologischen Einzelprobe gewonnene RNA zu einem gewissen Grad infolge von chemischer- oder enzymatischer Hydrolyse abgebaut worden sein. Die enzymatische Hydrolyse ist besonders offenkundig in biologischen Proben, die hohe Konzentrationen an Ribonuklease enthalten.

Quantitative Polynukleotid-Amplifikationsassays

[0048] Das Einbauen eines Pseudoziels in eine Polynukleotid-Amplifikationsreaktion kann nicht nur die Amplifikationsvariabilität von Probe zu Probe verringern, sondern kann sogar auch ein vollständig optimiertes qualitatives Assay in ein quantitatives Assay umformen. Im Falle eines Polynukleotid-Amplifikationssystems, in dem nur spezifische Amplifikationsprodukte synthetisiert werden (bedeutet, dass nichtspezifische Zielprodukte nicht hergestellt werden), würde die Menge des von einem Input-Ziel-Polynukleotid amplifizierten Produktes, unabhängig von der Anfangsmenge des Ziel-Polynukleotids, dass in der Reaktion enthalten ist, konstant sein. Dies ist zutreffend, wenn autokatalytische Amplifikationsreaktionen, wie z.B. die TMA-Reaktion, bis zu dem Punkt voranschreiten, an dem einer der Reaktanden im wesentlichen aufgebraucht ist, so dass die Reaktion endet. Die Gesamtmenge des Endproduktes, das in dieser Situation synthetisiert wurde, wird größtenteils durch die Anfangskonzentrationen der in der Reaktion eingeschlossenen Reaktanden bestimmt. Solch ein optimiertes Polynukleotid-Amplifikationssystem ist qualitativ jedoch nicht quantitativ, wenn die Reaktion bis zu dem Punkt ausgeführt wird, an dem die Konzentration eines Reaktanden begrenzend wird. Dies deswegen, da die Menge des in der Reaktion hergestellten Endproduktes von den Input-Reaktandenkonzentrationen abhängt und nicht von der anfänglichen Menge des Ziel-Polynukleotids.

[0049] Wenn ein Pseudoziel in einer Amplifikationsreaktion, wie z.B. einer TMA-Reaktion, eingeschlossen ist, wird das Pseudoziel bevorzugt in einer höheren Kopienzahl relativ zum Ziel-Polynukleotid vorhanden sein. Die Amplifikationsreaktion stoppt, wenn die Menge des Produkts, die vom Ziel-Polynukleotid und dem Pseudoziel amplifiziert worden ist, ausreichend groß ist, dass einer der Reaktanden aufgebraucht worden ist. Da das Pseudoziel für gewöhnlich die dominante Amplifikationsspezies darstellen wird, wird das Ausmaß der Amplifikation des Ziel-Polynukleotids durch die anfängliche Menge an Pseudoziel und nicht durch die anfängliche Menge an Ziel-Polynukleotid bestimmt. Daher kann durch Kontrollieren der Menge des Pseudoziels in der Amplifikationsreaktion das Ausmaß der Ziel-Polynukleotid-Amplifikation kontrolliert werden, unabhängig von der Anfangsmenge des Ziel-Polynukleotids in der Reaktion. Während die kombinierte Menge der Amplifikationsprodukte konstant bleiben wird, wenn die Reaktandenkonzentrationen stabil gehalten werden, wird die Menge des in der Reaktion hergestellten Analyt-Amplikons im wesentlichen das Anfangsverhältnis des Polynukleotid-analyten relativ zur Anfangsmenge des Pseudoziels wiedergeben. Auf diese Weise kann ein Polynukleotid-Amplifikationsassay zu einem quantitativen Assay gemacht werden, da das Ziel-Polynukleotid sich in einem vorher bestimmten Ausmaß amplifizieren wird. Dies wird schematisch in den **Fig. 2–4** dargestellt.

[0050] Im Allgemeinen sind die Verfahren zum Konvertieren von qualitativen Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen in quantitative Reaktionen durch Einschließen eines Pseudoziel-Polynukleotids in die Reaktionen auf alle bekannten Polynukleotid-Amplifikationssysteme, einschließlich PCR, NASBA (Nukleinsäuresequenzgestützte Amplifikation), SDA (Strangverdrängungsamplifikation), und Amplifikationsverfahren mittels selbst replizierender Polynukleotidmoleküle und Replikationsenzyme, wie MDV-1 RNA und Q-beta Enzym, anwendbar. Verfahren zum Ausführen dieser zahlreichen entsprechenden Amplifikationstechniken können im U.S. Patent Nr. 4,965,188; der veröffentlichten Europäischen Patentanmeldung EP 0 525 882, U.S. Patent Nr. 5,455,166; U.S. Patent Nr. 5,472,840 und bei Lizardi et al., BioTechnology 6: 1197 (1988) gefunden werden.

Quantitative Aspekte der Amplifikationsreaktionen, die Pseudoziele enthalten

[0051] Man ist sich auf dem Gebiet des Nukleinsäure-Testens bewusst, dass die Polynukleotid-Amplifikation ein exponentieller Prozess ist, und dass kleinere Unterschiede in irgendeiner der Variablen, die die Reaktionsrate beeinflussen, zu dramatischen Veränderungen bei der Ausbeute von Analyt-spezifischen Amplikons führen können. Hierin offenbart ist der neue Befund, dass nichtspezifische Amplifikationsprodukte, die in Amplifikationsreaktionen erzeugt wurden, wesentlich zur gesamten Amplikonherstellung beitragen können und Reaktanden aufbrauchen können, die ansonsten verwendet werden würden, um Analyt-spezifische Amplifikationsprodukte zu synthetisieren. Der Beitrag nichtspezifischer Produkte am Pool der Amplifikationsprodukte ist bedeutend genug, so dass kleine Veränderungen in den Mengen nichtspezifischer Amplifikationsprodukte die Größenordnung der Analyt-Amplikonherstellung stark beeinflussen können. Daher fand man während der Entwicklung der vorliegenden Erfindung heraus, dass das Reduzieren der Menge der nichtspezifischen Produkte, die in einer Amplifikationsreaktion gebildet werden, die Präzision der Analyt-Amplikonherstellung auf vorteilhafte Weise verbesserte und qualitative Amplifikationsassays in quantitative Assays umformte.

[0052] Der bevorzugte Ansatz zum Verringern der Bildung von nichtspezifischen Produkten erfordert das Einschließen eines Pseudoziels in die Amplifikationsreaktion und dann das quantitative Detektieren von Analyt-Amplikons, die in der Reaktion synthetisiert wurden. Auf diese Weise kann die Analyt-Amplikonherstellung in einer Dosis-abhängigen Weise zur Menge des Polynukleotidanalyten, der zum Zeitpunkt der Initiierung der Amplifikationsreaktion vorhanden war, in Beziehung gesetzt werden. Zusätzlich ist es in Übereinstimmung mit den erfundenen Verfahren unnötig, die Pseudoziel-Amplikons zu detektieren, um die Anzahl der in einer Testprobe vorhandenen Polynukleotidanalyte zu quantifizieren.

[0053] Daher ist hierin ein Verfahren zum Quantifizieren von Polynukleotidanalyten offenbart, dass nicht von der Detektion der Amplifikationsprodukte, die sich aus irgendeinem internen Standard ergeben, abhängt. Die Entwicklung dieses Ansatzes wurde durch das Erkennen der Ursache des Problems möglich, dass die Variabilität bei der Analyt-Amplikonherstellung unterliegt, und das durch das Einschließen eines Pseudoziels in die Amplifikationsreaktion kontrolliert werden kann. Auch wenn das Pseudoziel als Matrize in der Amplifikationsreaktion dient, ist die Detektion der Pseudoziel-Amplikons für die Quantifizierung der Polynukleotidanalyten unnötig. Da es nicht eingängig erscheint, dass die Präzision einer Amplifikationsreaktion durch Zugabe einer Matrize zur Reaktion, die mit dem Polynukleotidanalyten um Reagenzien konkurriert, die für die Synthese von Amplikons erforderlich sind, verbessert werden könnte, machen die unten stehenden Ergebnisse den Wert dieser Methode klar deutlich. Einfach gesagt stellen die hierin offenbarten Verfahren eine Methode zum Kontrollieren der ansonsten stark variablen Herstellung von nichtspezifischen Amplifikationsprodukten durch Einbringen von Matrizen-Polynukleotiden, die amplifiziert werden, die jedoch nicht notwendigerweise detektiert oder quantifiziert werden, in das System bereit.

[0054] Die [Fig. 3a–Fig. 3b](#) illustrieren, wie Pseudoziele eine qualitative Polynukleotid-Amplifikationsreaktion in ein quantitatives Assay umwandeln können. [Fig. 3a](#) zeigt, wie eine optimierte Reaktion einen Pool von Reaktanden (im Diagramm dargestellt durch ein Achteck) unter Verwendung von Ziel-Polynukleotidanalyten (TA) als Matrizen in spezifische Amplifikationsprodukte (SP) umwandelt. In Abwesenheit eines Pseudoziels ist das Assay qualitativ, da die Menge des in der Reaktion hergestellten Analyt-Amplikons mit der Anfangsmenge des Ziel-Polynukleotidanalyten nicht quantitativ in Beziehung steht. Ob die Anfangsmenge des Polynukleotidanalyten niedrig oder hoch ist, verändert nicht die Menge des Analyt-Amplikons, das in der Reaktion synthetisiert wird. Stattdessen wird die Menge des Analyt-Amplikons, das in der Reaktion hergestellt werden kann, durch den anfänglichen Reaktandenpool und nicht durch die Anfangsmenge des Polynukleotidanalyten definiert. Daher wird eine konstante Menge des Amplikons hergestellt, wenn die Amplifikationsreaktion bis zu dem Punkt durchgeführt wird, an dem der Reaktand aufgebraucht ist. Umgekehrt zeigt [Fig. 3b](#), wie Amplifikationsreaktionen, die in Gegenwart von Pseudozielen durchgeführt werden, Analyt-spezifische Produkte im Verhältnis zur Anfangsmenge des Polynukleotidanalyten synthetisieren, wenn parallele Reaktionen ein Pseudoziel enthalten. Besonders wenn Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen ein Pseudoziel enthalten, wird die Endmenge des Analyt-Amplikons in einer Dosis-abhängigen Weise mit der Anfangsmenge des Polynukleotidanalyten, der als Matrize in der Reaktion diente, in Beziehung gesetzt. Daher ist es nur erforderlich, dass Analyt-Amplikon (und nicht das Pseudoziel-Amplikon) zu quantifizieren, um Informationen über die Anfangsmenge des Polynukleotidanalyten in der Reaktion zu gewinnen. Dieses Verfahren zum Quantifizieren von Polynukleotiden umgeht auf vorteilhafte Weise den Bedarf für das Detektieren von anderen Amplikons als dem Analyt-Amplikon oder für das Anwenden unterschiedlicher Sonden, um unterschiedliche Amplikonspezies zu unterscheiden. Zusätzlich kann der gleiche gepaarte Satz von Oligonukleotidprimern verwendet werden, um sowohl den Polynukleotidanalyten als auch das Pseudoziel zu amplifizieren, da die beiden Produkte der Amplifikationsreaktion mittels einer Analyt-spezifischen Hybridisationssonde unterscheidbar sein werden.

[0055] Die [Fig. 4a–Fig. 4d](#) veranschaulichen, wie die Analyt-Amplikonsynthese die anfängliche Polynukleotidmenge über einen ausgedehnten Bereich widerspiegelt, wenn zwei miteinander konkurrierende Amplifikationsreaktionen gleichzeitig auftreten. [Fig. 4a](#) zeigt Ergebnisse, die bei einer idealisierten Amplifikationsreaktion erwartet würden, die in Abwesenheit einer nichtspezifischen Produktbildung stattfindet. Eine konstante Menge der Analyt-Amplikonbildung wird bei allen Input-Mengen des Polynukleotidanalyten erwartet. Dieser Fall spiegelt die Reaktion wieder, die in [Fig. 3a](#) dargestellt wird. [Fig. 4b](#) zeigt Ergebnisse, die für die Amplifikationsreaktion erwartet würde, die spontan nichtspezifische Produkte in niedrigen Mengen herstellen. Es gibt einen schmalen Bereich der Dosisabhängigkeit nur bei sehr niedrigen Input-Mengen des Polynukleotidanalyten. [Fig. 4c](#) zeigt Ergebnisse, die für Amplifikationsreaktionen erwartet würden, die spontan große Mengen an nichtspezifischen Amplifikationsprodukten erzeugen. In diesem Fall stellten Amplifikationsreaktionen, die bei jeder vorgegebenen Input-Menge des Polynukleotidanalyten durchgeführt werden, Mengen an Amplikon her, die innerhalb eines Bereiches fallen, wie er auf der y-Achse des Diagramms angedeutet wird. Der wichtigere Beitrag der nichtspezifischen Produktbildung unterscheidet die Ergebnisse, die in den [Fig. 4b](#) und [Fig. 4c](#) dargestellt werden. Die Breite der Linien, die die Input-Mengen des Polynukleotidanalyten mit der Analyt-Amplikonsynthese in Beziehung setzt, spiegelt die geringe Präzision der Analyt-Amplikonbildung wieder und ist der Tatsache zuzurechnen, dass die spontane Bildung der nichtspezifischen Amplifikationsprodukte sehr unterschiedlich sein kann. [Fig. 4d](#) zeigt Ergebnisse, die für eine idealisierte Amplifikationsreaktion erwartet würden, die ein Pseudoziel enthält. Die Menge des in der Reaktion hergestellten Analyt-Amplikons macht sowohl die verbesserte Präzision als auch die Dosis-abhängige Beziehung über einen ausgedehnten Bereich der Input-Polynukleotidanalytmengen deutlich. Dieser Fall spiegelt die idealisierte Reaktion, die in [Fig. 3b](#) dargestellt wird, wieder.

[0056] Daher werden die Präzision und quantitativen Aspekte der Amplifikationsreaktionen, die gemäß dem erfundenen Verfahren durchgeführt werden, über die Existenz und Kontrollfähigkeit von konkurrierenden Reaktionen miteinander verknüpft, wobei Polynukleotidanalyten und nicht Polynukleotidanalyten co-amplifiziert werden und um Reaktanden konkurrieren werden. Ein verbesserter dynamischer Bereich ergibt sich, wenn eine zweite Amplifikationsreaktion mit der Analyt-spezifischen Reaktion um Reaktanden konkurriert. Die verbesserte Präzision bezüglich der Menge der Analyt-Amplikonsynthese ergibt sich, wenn die zweite Reaktion durch das Einschließen von Pseudozielen in die Amplifikationsreaktion bei einer Menge von 1×10^3 – 2×10^8 Molekülen pro Reaktion stark kontrollierbar gemacht wird, wobei eine typische Reaktion ein Volumen von 100 μ l aufweist.

Verwendung einer Standardkurve – Quantifizieren von Mengen des Polynukleotidanalyten vor der Amplifikation

[0057] Da Amplifikationsreaktionen, die Pseudoziele enthalten, zweckmäßigerweise quantitative Beziehungen zwischen der Input-Anzahl der Polynukleotidanalyten in der Reaktion und der Anzahl der synthetisierten Analyt-Amplikons aufweisen, kann die Anzahl der Polynukleotidanalyten, die in einer Testprobe vorhanden sind, mittels einer Standardkurve bestimmt werden. Es können besonders eine Vielzahl von Amplifikationsreaktionen, die konstante Mengen des Pseudoziels und bekannte Mengen des Polynukleotidanalytstandards enthalten, parallel mit einer Amplifikationsreaktion durchgeführt werden, die mittels einer Testprobe, die eine unbekannte Anzahl von Polynukleotidanalyten enthält, hergestellt wurde. Alternativ dazu kann eine Standardkurve bereits im Vorfeld hergestellt werden, so dass es unnötig ist jedes Mal bei einer analytischen Methode, die ausgeführt wird, eine Gerade zu erstellen. Solch eine im Vorfeld erstellte Gerade kann auch in einer Speichervorrichtung eines Testinstruments elektronisch gespeichert werden. Bevorzugte Amplifikationsverfahren schließen transkriptionsvermittelte Amplifikationsreaktionen, NASBA-Reaktionen und Polymerasekettenreaktionen ein. Die transkriptionsvermittelte Amplifikation wird stark bevorzugt. Die Mengen des verwendeten Pseudoziels sollten für jede Reaktion die gleichen sein und bevorzugt in den Bereich von 10^3 bis 2×10^8 , von 10^4 bis 2×10^8 , von 10^5 bis 2×10^8 oder von 10^7 und 2×10^8 Pseudozielmolekülen pro Reaktion fallen. Reaktionen, die Pseudoziele enthalten, könne gemäß dem hierin beschriebenen Verfahren durchgeführt werden, wobei die Anzahl der in jeder Reaktion synthetisierten Analyt-Amplikons durch Standardhybridisierungs- und Detektionsmethoden quantifiziert werden. Obwohl die Detektion der Pseudoziel-Amplikons für die Quantifizierung der Mengen des Polynukleotidanalyten in der Testprobe vor der Amplifikation unnötig ist, kann die Detektion der Pseudoziel-Amplikons wahlweise verwendet werden, um den Erfolg der Amplifikationsreaktionen zu bestätigen. Auf diese Weise dient die Detektion der Pseudoziel-Amplikons als eine interne Amplifikationskontrolle. Dann wird eine Standardkurve, welche die Mengen des Polynukleotidanalytstandards vor der Amplifikation auf einer ersten Achse und die entsprechende Mengen des Analyt-Amplikons nach der Amplifikation auf einer zweiten Achse aufweist, erstellt. Die Menge des Analyt-Amplikons nach der Amplifikation, die für die Testreaktion gemessen wird, wird dann auf der Achse für "nach der Amplifikation" der Standardkurve aufgetragen. Der entsprechende Wert auf der anderen Achse der Kurve stellt die Menge des Polynukleotidanalyten vor der Amplifikation dar, der in der Testreaktion vorhanden war. Daher wird die Bestimmung der Anzahl der Moleküle des Polynukleotidanalyten, der in der Testprobe vorhanden ist, durch das Heranziehen der Standardkurve oder noch eher durch Vergleichen der quantitativen Ergebnisse, die für die Testprobe mit der Standardkurve erhalten wurden, eine Methode, die dem Fachmann vertraut sein wird, erreicht.

[0058] Die hierin beschriebenen Methoden können auf einfache Weise verwendet werden, um in einer Testprobe vorhandene Polynukleotidanalyten zu quantifizieren. In der Tat wird es dann möglich, wenn eine Vielzahl von Pseudoziel enthaltenden Kontrollamplifikationsreaktionen unter Verwendung einer bekannten Anzahl von Molekülen eines Polynukleotidanalytstandards initiiert werden, und wenn eine Testreaktion, die das Pseudoziel enthält, unter Verwendung einer unbekannten Anzahl von Polynukleotidanalytmolekülen initiiert wird, nach Quantifizierung der Anzahl der Analyt-Amplikons in jeder Reaktion, die Anzahl der Polynukleotidanalytmoleküle zu bestimmen, die in der Testprobe vorhanden gewesen sein müssen. Wenn zum Beispiel Standardreaktionen, die 500, 1000 beziehungsweise 1500 Moleküle des Polynukleotidanalytstandards enthalten, nach einem Analytspezifischen sondenabhängigen Hybridisationsverfahren Analyt-Amplikon-Signale von 1x, 2x und 3x erzeugen, und wenn die Testprobe ein Analyt-Amplikon-Signal dem 1,5x entsprechend erzeugt, dann muss die Testprobe 750 Polynukleotidanalytmoleküle enthalten haben. In diesem beispielhaften Fall gibt es eine lineare Beziehung zwischen dem durch die Amplikons erzeugten Signal, das sich aus dem Polynukleotidanalytstandard im Bereich von 500 bis 1500 Molekülen ergibt. Die Beziehung zwischen den Input-Polynukleotidanalytmolekülen in den Standardamplifikationsreaktionen und der Amplikonspezifischen Signalstärke wird am einfachsten mittels eines Diagramms ermittelt. Die Bestimmung der Anzahl der Polynukleotidanalytmoleküle, die in einer Testprobe vorhanden sind, ist einfach eine Sache der Bestimmung der Anzahl der Polynukleotidanalytmoleküle, die mit einer gemessenen Analyt-Amplikonsignalstärke übereinstimmt, aus dem Standarddiagramm. Dies illustriert, wie Polynukleotidanalytstandards in Verbindung mit Pseudozielen in Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen verwendet werden können, um die Mengen des in der Testprobe enthaltenen Polynukleotidanalyten vor der Amplifikation zu quantifizieren.

Strukturelle Eigenschaften verwendbarer Pseudoziel-Polynukleotide

[0059] Die folgende Information kann verwendet werden, um Pseudoziel-Polynukleotide für die Verwendung in Verbindung mit den hierin offenbarten Verfahren zu entwerfen. Angesichts dieser Information können verwendbare Pseudoziele, die irgendeiner Zahl von Polynukleotidanalyten entsprechen, die detektiert und quantifiziert werden sollen, hergestellt werden. Beispielanwendungen in denen Pseudoziele in Verbindung mit Po-

lynukleotid-Amplifikationsmethoden verwendet werden können, schließen ein, sind jedoch nicht begrenzt auf: (1) Das detektieren eines bakteriellen oder viralen Pathogens; (2) das Quantifizieren von Polynukleotiden, wobei diese Quantifizierung als Indikator eines Erkrankungsvorganges, wie zum Beispiel dem Fortschreiten einer HIV-Erkrankung, verwendbar ist; und (3) zahlreiche andere Anwendungen, einschließlich forensischer Analysen, Umwelt- und Nahrungsmitteluntersuchungen.

[0060] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind das Pseudoziel und der Polynukleotidanalyt mittels des gleichen Satzes zweier Oligonukleotidprimer amplifizierbar. In diesem Fall wird ein einzelner Oligonukleotidprimer, der eine komplementäre Bindungsstelle auf dem Pseudoziel hat, auch eine komplementäre Bindungsstelle auf dem Polynukleotidanalyten haben.

[0061] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform amplifizieren sich das Pseudoziel und der Polynukleotidanalyt, die als Matrizen in einer Amplifikationsreaktion dienen sollen, mit im Wesentlichen gleicher Wirksamkeit. Daher werden, egal ob die Amplifikation mittels TMA, PCR oder einer anderen Methode, wie zum Beispiel der SDA (Strangverdrängungsamplifikation) oder Verfahren, die selbst replizierende Polynukleotidmoleküle und replizierende Enzyme, wie MDV-1-RNA und Q-Beta-Enzyme verwenden, durchgeführt wird, das Pseudoziel und die Polynukleotidanalyten bevorzugt gleiche Amplifikationswirksamkeiten aufweisen.

[0062] Ein Weg um sicherzustellen, dass die Pseudoziel- und Polynukleotidanalytmatrizen vergleichbare Amplifikationswirksamkeiten aufweisen, ist darauf zu bestehen, dass die zwei Matrizen nahe verwandte jedoch nicht identische Polynukleotidsequenzen über die gesamte Breite der Sequenz, die in dem Verfahren amplifiziert wird, besitzen. Zum Beispiel kann ein Pseudoziel-Polynukleotid durch Scrambeln eines internen Teils der Sequenz eines Polynukleotidanalyten erzeugt werden, wobei die gescrambelte Sequenz dem Teil des Polynukleotidanalyten entspricht, der als der Teil des Moleküls dient, der durch eine Sonde, die für den Polynukleotidanalyten spezifisch ist, hybridisiert wird. Die Länge des Pseudoziel-Polynukleotids ist für seine Funktion bei der Anwendung der hierin offenbarten Verfahren nicht entscheidend.

[0063] Es ist essentiell, dass das Pseudoziel und der Polynukleotidanalyt in einer einzelnen Reaktion coamplifizierbar sind und dass die entstehenden zwei Amplikonspezies unabhängig voneinander detektiert werden können. Es ist besonders wichtig, dass die Pseudoziel- und Polynukleotidanalyt-Amplifikationsprodukte Polynukleotidsequenzen besitzen, die sich voneinander unterscheiden, so dass die zwei Produkte durch ihre Länge, durch ihre Fähigkeit mit einer Detektionssonde zu hybridisieren oder durch andere Verfahren voneinander unterscheidbar sind. Da die in den Amplifikationsreaktionen amplifizierten Polynukleotidmatrizen für gewöhnlich eine substantielle Anzahl von Nukleotidbasen, die zwischen den Bereichen eingefügt werden, die homolog oder komplementär zu den der Ausführung der Amplifikationsreaktion dienenden Primerbindungsstellen sind, enthalten, können diese eingefügten Sequenzen als Bereiche dienen, an die ausgewählte Hybridisationssonden binden können. Sinnvolle Kriterien für die Auswahl der Hybridisations- und Detektionssonden sind dem Fachmann vertraut. Sonden, die in Verbindung mit der Erfindung verwendbar sind, schließen sowohl markierte Polynukleotide als auch Oligonukleotide ein, die als Primer in darauf folgenden Amplifikationsreaktionen verwendbar sind.

[0064] Wenn das Pseudoziel zu einer Zeit zu einer biologischen Einzelprobe gegeben wird, bevor der Polynukleotidanalyt aus der Probe isoliert wird, zum Beispiel als Hilfe für die Probenverarbeitung, ist es wichtig, dass das Pseudoziel und das Polynukleotid durch die gleiche Probenverarbeitungsmethode aus der Einzelprobe gewonnen werden können. Wenn zum Beispiel der Polynukleotidanalyt unter starken basischen Bedingungen, die DNA denaturieren und RNA hydrolisieren, gewonnen werden kann, dann sollte es auch richtig sein, dass das Pseudoziel unter den gleichen Bedingungen als ein strukturell intaktes Molekül gewonnen werden kann. Wenn daher basische Pufferbedingungen verwendet werden, um Polynukleotidanalyte in Gegenwart von zugegebenen Pseudoziel-Polynukleotiden zu isolieren, dann wären weder der Analyt noch das Pseudoziel ein RNA-Molekül, dass während des Isolationsverfahrens abgebaut würde. Vergleichbar sollten, wenn das Pseudoziel und der Polynukleotidanalyt präzipitiert werden sollen, zum Beispiel durch Zugabe eines Alkohols, wie zum Beispiel Ethanol, dann das Pseudoziel und der Polynukleotidanalyt bei im Wesentlichen gleicher Wirksamkeit präzipitieren.

Beziehung zwischen Pseudoziel und Polynukleotidanalytsequenzen

[0065] Es wird im Wesentlichen bevorzugt, es ist jedoch für das Pseudoziel und den Polynukleotidanalyten nicht essentiell, dass sie mittels des gleichen Satzes zweier Oligonukleotidprimer co-amplifiziert werden können. Ganz besonders können qualitative Polynukleotid-Amplifikationsassays zur Detektion eines Polynukleotidanalyten mittels eines gepaarten Satzes von Analyt-spezifischen Primern durch das weitere Einschließen

eines Pseudoziel und eines Satzes von Primern zur Amplifikation des Pseudoziels in der Reaktion in quantitative Assays umgewandelt werden. In einer Ausführungsform des erfundenen Verfahrens sind der Polynukleotidanalyt und das Pseudoziel bei Verwendung der gleichen zwei Primer co-amplifizierbar.

[0066] Es ist auch möglich, ein "universelles Pseudoziel" und einen Satz von Pseudoziel-spezifischen Primern zu verwenden, um quantitative Amplifikationsreaktionen herzustellen. In einer Ausführungsform der Erfindung, können die Primer, die für das Amplifizieren des universellen Pseudoziels verwendet werden, die gleichen Primer sein, die für das Amplifizieren des Polynukleotidanalyten verwendet werden. Das universelle Pseudoziel muss nicht mit der Struktur des Polynukleotidanalyten ähnlich sein und muss nicht mit dem Polynukleotidanalyten mit vergleichbarer Amplifikationswirksamkeit co-amplifizieren. Amplifikationsreaktionen, die unter Verwendung von geringen oder hohen Anfangsmengen des Polynukleotidanalyten durchgeführt werden, werden Analyt-Amplikons auf eine Art und Weise synthetisieren, die Dosis-abhängig von den Anfangsmengen des Polynukleotidanalyten, die bei der Initiierung der Amplifikationsreaktionen vorhanden waren, ist. Unter Verwendung dieser Methode können zwei oder mehr Amplifikationsreaktionen für die Produktion von Analyt-Amplikons eingesetzt werden, wobei die Analyt-Amplikonmengen mit den Anfangsmengen des Polynukleotidanalyten in allen Proben auf eine Dosisabhängig Weise zusammenhängt.

[0067] Während unter Verwendung von Pseudozielen und assoziierten Primern, die zum Polynukleotidanalyten in keiner Beziehung stehen, gute Ergebnisse erzielt werden können, werden bevorzugt Pseudoziele verwendet, die mittels des gleichen Satzes an Primern mit dem Polynukleotidanalyten co-amplifizieren. Dieser bevorzugte Ansatz verringert auf vorteilhafte Weise die Variabilität in der Zusammensetzung des Reagenzpool, der als Ressource für synthetisierende Amplikons in der Amplifikationsreaktion verwendet wird. Jedoch verwenden die hierin zur Beschreibung der Erfindung dargestellten illustrativen Beispiele Pseudoziele, und exemplarisch Polynukleotidanalyten, die mittels bekannter Sätze von Oligonukleotidprimern co-amplifizieren werden.

Auswählen einer Pseudozielmenge, die in einer Amplifikationsreaktion eingeschlossen sein soll

[0068] Im Allgemeinen ist der positive Nutzen, der durch das Einschließen von Pseudozielen in Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen erreicht wird, über einen sehr ausgedehnten Bereich von Pseudozielkonzentrationen erreichbar. Das Einschließen von Pseudozielen in Amplifikationsreaktionen, wie zum Beispiel TMA-Reaktionen, in Mengen, die über einen Bereich von 1×10^3 – 2×10^8 Molekülen reichen, ergibt besonders: (1) eine höhere Amplifikationspräzision, (2) eine verringerte Wahrscheinlichkeit einer positiven Übertragung und (3) eine Vereinheitlichung der Variabilität bei der Zielgewinnung, alles wie hierin offenbart. Innerhalb praktischer Begrenzungen werden höhere Anfangsmengen des Pseudoziels in einer Amplifikationsreaktion eine größere Verbesserung der drei oben genannten Parameter ergeben.

[0069] Da die Pseudoziel-Amplikons unter Verwendung von Nukleotidtriphosphat-Reaktanden synthetisiert werden, die ansonsten zur Synthetisierung von Analyt-Amplikons verwendet werden könnten, wird die Gegenwart eines Pseudoziels in einer Amplifikationsreaktion zu einer Verringerung der Analyt-Amplikonsynthese führen. Dies deswegen, da sowohl die Analyt-Amplikons als auch die Pseudoziel-Amplikons aus einem begrenzten Reaktandenpool heraus synthetisiert werden. Dementsprechend werden steigende hohe Anfangsmengen des Pseudoziels zu verringerten Mengen des Analyt-Amplikons führen, das in der Amplifikationsreaktion hergestellt wird. Das heißt, dass die obere Grenze der anfänglichen Pseudozielkonzentration in einer Amplifikationsreaktion eine praktische Angelegenheit sein wird, die von der Sensitivität der zur Detektion des Analyt-Amplikons verwendeten Methode abhängen wird.

[0070] Die obere Grenzmenge oder -Konzentration eines Pseudoziels, das in einer Amplifikationsreaktion eingeschlossen werden kann und das Mengen an Analyt-Amplikons ergeben wird, die für die Detektion angemessen sind, ist am einfachsten durch Routineversuche zu bestimmen. Es wird wiederum für den Fachmann leicht ersichtlich sein, dass größere Mengen des Pseudoziels in einer Amplifikationsreaktion, die bis zum Punkt des Reagenzverbrauchs durchgeführt wird, zu geringeren Mengen eines in der Reaktion hergestellten Analyt-Amplikons führen wird. Dies deswegen, da Pseudoziel-Amplikons auf Kosten der Analyt-Amplikons in der Amplifikationsreaktion synthetisiert werden. Das bedeutet, dass Amplifikationsreaktionen, die sehr große Mengen eines Pseudoziels enthalten, zur Produktion von geringen Mengen des Analyt-Amplikons führen werden. Hochsensitive Assays zur Detektion von Analyt-Amplikons werden besonders zur Detektion dieser geringeren Mengen des Analyt-Amplikons verwendbar sein. Umgekehrt werden weniger empfindliche Assays, die größere Mengen des Analyt-Amplikons für ein positives Detektionssignal erfordern, zur Detektion größerer Mengen des Analyt-Amplikons, die sich aus Amplifikationsreaktionen ergeben, die nur geringe Anfangsmengen des Pseudoziels einschlossen und die größere Mengen des Analyt-Amplikons ergaben, verwendbar sein. Das heißt,

dass die obere Grenze der Pseudozielmenge, die für das Durchführen einer Amplifikationsreaktion verwendet werden kann, von der Empfindlichkeit des Assays abhängt, das schließlich für das Detektieren der Analyt-Amplikons verwendet werden soll, und nicht von der Amplifikationsreaktion selber.

[0071] Da es im Allgemeinen richtig ist, dass große Mengen des Input-Pseudoziels einen erhöhten Abbau von nichtspezifischen Amplifikationsprodukten in Reaktionen, wie zum Beispiel TMA-Reaktion, ermöglichen, folgt daraus, dass die Menge des in einer Amplifikationsreaktion eingeschlossenen Pseudoziels bevorzugt so hoch wie möglich sein sollte. Die größte Menge des Pseudoziels, das in den Beispielen, die folgen werden, offenbart ist, lag bei 2×10^8 Molekülen in einer 100 μ l Reaktion. Natürlich muss das Detektionssystem, das für das Detektieren der Analyt-Amplikons verwendet wird, empfindlich genug sein, um ein positives Signal zu erzeugen, wenn die Polynukleotidanalyten in der Anfangsprobe vorhanden sind, so dass die Analyt-Amplikons in der Amplifikationsreaktion synthetisiert werden. In der Praxis kann ein Bereich von Pseudozielkonzentrationen getestet werden, um die optimale Menge zu bestimmen, die, gemessen an der Detektierbarkeit von Analyt-Amplikons mittels eines Detektionssystems, dass eine bestimmte Empfindlichkeit für die Detektion von Analyt-Amplikons aufweist, bei der Amplifikationsreaktion gute Ergebnisse ergibt. Für gewöhnlich sind Positiv- und Negativkontrollen in dieser Methode eingeschlossen, um die Ergebnisse anzuzeigen, die für Amplifikationsreaktionen erwartet würden, die die Polynukleotidanalyten enthalten beziehungsweise nicht enthalten.

[0072] Die Menge des Pseudoziels, die für die Durchführung einer Amplifikationsreaktion ausgewählt wird, kann durch die Amplifikationsgrößenordnung, die Anfangszahl der Polynukleotidanalyten in der Reaktion und die Empfindlichkeit des Detektionssystems, das zur Detektion der Analyt-Amplikons verwendet wird, beeinflusst werden. Standard TMA-Reaktionen vervielfältigen für gewöhnlich anfängliche Polynukleotidmenge um das 10^{12} – 10^{13} -fache. Ein beispielhaftes Polynukleotid-Detektionssystem kann etwa 6×10^7 Moleküle in einem Hybridisationsassay detektieren. Um 100 Moleküle eines Polynukleotidanalyten in einer Probe zu detektieren, die als Matrizenquelle in einer Amplifikationsreaktion dient, wäre es erforderlich eine Vervielfältigung von etwa dem 6×10^5 -fachen (6×10^7 geteilt durch 100) zu erreichen. Um eine mindestens 6×10^5 -fache Vervielfältigung der 100 Polynukleotidanalytmoleküle zu erreichen, sollte die Amplifikationsreaktion nicht mehr als 1×10^7 Pseudoziel-Moleküle enthalten. Dies deswegen, da 6×10^{12} (als ein Beispielwert im Bereich vom 10^{12} – 10^{13} -fachen, wie oben angegeben) geteilt durch 1×10^7 einer 6×10^5 -fachen Steigerung entspricht. Das Einschließen einer größeren Anzahl von Pseudoziel-Molekülen würde die mehrfache Vervielfältigung auf weniger als den akzeptierbaren Wert von 6×10^5 verringern. Wenn stattdessen ein PCR-Protokoll, das zu einer 1×10^9 -fachen Vervielfältigung führt, verwendet würde, wäre die maximal akzeptierbare Pseudozielmenge in der Amplifikationsreaktion 1×10^9 geteilt durch 6×10^5 oder $1,7 \times 10^3$ Moleküle. Deswegen sollte deutlich werden, dass: (1) Ein ausgedehnter Bereich von Pseudozielkonzentrationen in der Praxis des hierin offenbarten Verfahrens hilfreich sein wird und (2) die optimale Menge eines Pseudoziels empirisch bestimmt werden kann, wenn die Anzahl der Polynukleotidanalyten in einer Probe, die in einem Amplifikationsprotokoll getestet werden, unbekannt ist.

[0073] Bevorzugte Mengen eines Pseudoziels, die für das Durchführen der Amplifikationsreaktionen hilfreich sind, bewegen sich zwischen 10^3 und 10^9 Molekülen pro Reaktion, wobei eine typische Reaktion in einem Volumen von 100 μ l durchgeführt wird. Zum Beispiel kann ein Assay zur Detektion von HIV-Polynukleotiden in einer Serumprobe, die von einem mit HIV infizierten Menschen isoliert wurde, unter Verwendung von zwischen 10^3 und 2×10^8 , zwischen 10^4 und 2×10^8 , oder zwischen 10^5 und 2×10^8 oder zwischen 10^7 und 2×10^8 Pseudoziel-Molekülen pro Reaktion durchgeführt werden. In einer stark bevorzugten Ausführungsform ist die Amplifikationsreaktion eine TMA-Reaktion, und das HPA ("homogenes Schutzassay")-Verfahren wird zur Detektion von Analyt-Amplikons, die in einer Amplifikationsreaktionen hergestellt wurden, die unter Verwendung dieser Mengen des Pseudoziels durchgeführt wurde, verwendet. Wie in den folgenden Beispielen gezeigt wird, sind breite Bereiche an Pseudozielkonzentrationen getestet worden, und es zeigte sich, dass sie gute Ergebnisse ergaben.

Kits zur Durchführung des erfundenen Verfahrens der Polynukleotid-Amplifikation

[0074] Kits, die zur Durchführung der hierin beschriebenen Polynukleotid-Amplifikationsverfahren verwendbar sind, werden enthalten: (1) Ein Pseudoziel, (2) Oligonukleotidprimer für das Co-Amplifizieren des Pseudoziels und des Polynukleotidanalyten, (3) Reagenzien für die Durchführung der Polynukleotid-Amplifikationsreaktion, und (4) gedruckte Instruktionen für die Durchführung einer Amplifikationsreaktion und für die spezifische Detektion nur von Analyt-Amplikons, die in der Reaktion hergestellt wurden. Wahlweise kann das Kit eine markierte Sonde zum Detektieren der Analyt-Amplikons enthalten. Reagenzien, die im Kit eingeschlossen sind, werden Desoxiribonukleotidtriphosphate und ein DNAPolymerisierendes Enzym, das eine reverse Transkriptase sein kann, umfassen. Nukleotidtriphosphate und eine RNA-Polymerase sind optionale Reagenzien,

die im Kit eingeschlossen sein können.

[0075] Unter Berücksichtigung dieses Hintergrundes werden drei bestimmte Aspekte der Erfindung jetzt detaillierter beschrieben werden.

I. Verbessern der Präzision der Polynukleotidanalyt-Amplifikation

[0076] Amplifikationstechniken, sowohl quantitative als auch qualitative, stellen leistungsstarke Werkzeuge zur Detektion und zum Messen sogar von Spuren Mengen spezifischer Ziel-Polynukleotide dar. Jedoch bedeuten Schwierigkeiten beim Erhalt einer einheitlichen Amplifikationswirksamkeit zwischen verschiedenen Reaktionen, dass die Variabilität beim Umfang der Amplifikation die Präzision der Quantifizierung und die Fähigkeit geringe Mengen des Ziels zu detektieren beeinträchtigt. Ich dachte daran, Verfahren zu entwickeln, die die Bildung von nichtspezifischen Produkten minimieren, die Präzision bei der Menge der Analyt-Amplifikations synthese steigern und die Leichtigkeit, mit der die quantitativen Amplifikationsreaktionen durchgeführt werden könnten, maximieren können.

[0077] Die Variabilität beim Umfang der Amplifikation scheint zum Teil der enzymatischen Synthese der nichtspezifischen Reaktionsprodukte zuzurechnen sein. Die Bildung dieser nichtspezifischen Produkte war am auffälligsten, wenn die Reaktionen nur sehr geringe Anfangsmengen der Ziel-Polynukleotide, die als Amplifikationsmatrizen dienten, enthielten. Bei größeren Mengen des Ziel-Polynukleotids war die Bildung der nichtspezifischen Reaktionsprodukte weniger signifikant und stellte nur einen geringen Anteil des Gesamtprodukts der Reaktion dar. Daher war es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Reaktionsbedingungen zu simulieren, die durch hohe Ziel-Polynukleotidkonzentrationen charakterisiert waren, auch wenn die Anfangsmengen der Polynukleotidanalyten in den Reaktionsmischungen sehr gering waren. Es war besonders wünschenswert, günstige Reaktionsbedingungen zu simulieren, die die Bildung von nichtspezifischen Produkten, wie in **Fig. 2** dargestellt, minimieren würde.

[0078] Amplifikationsreaktionen, die mit Pseudoziel-Polynukleotiden, die mit dem Polynukleotidanalyten co-amplifizieren, versetzt waren, stellten die gewünschten Reaktionsbedingungen bereit, um diese Ziele zu erreichen. Dies erlaubte es der Amplifikationsreaktion sich so zu verhalten, als ob große Mengen des Analyten vorhanden wären, auch wenn die wahre Menge des Analyten in der Amplifikationsreaktion gering war. Wie durch experimentelle Ergebnisse, die weiter unten dargestellt werden, gezeigt wird, verbesserte die Zugabe von mehr als 10^5 Kopien des Pseudoziel-Polynukleotids die Amplifikationspräzision, wie es durch einen verbesserten Variabilitätskoeffizienten (CV%) und den relativen Lichteinheiten (RLU's), wobei die RLU's einen messbaren Indikator für die Quantität der hybridisierten Sonde darstellen, gemessen wurde. Im vorliegenden Kontext ist CV% ein statistischer Wert, der durch Teilen der Standardabweichung (SD) für eine Sammlung von Daten durch den Nettodurchschnitt für diese Sammlung und anschließendes Multiplizieren des Ergebnisses mit 100 berechnet wird. Niedrigere CV%-Werte spiegeln eine geringere Streubreite unter den Datenpunkten wieder und werden als Indikatoren für die höhere experimentelle Präzision verstanden. Das heißt, dass das hierin beschriebene Verfahren einen Weg zum Verbessern der Präzision darstellt, mit dem der Polynukleotidanalyt amplifiziert wird, während die Bildung von nichtspezifischen Reaktionsprodukten variabler Größe verringert wird.

[0079] Die hierin offenbarten Verfahren stellen zusätzlich einen Mechanismus zum Standardisieren der Ergebnisse der Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen bereit, unabhängig von der Anfangsmenge des Polynukleotidanalyten, solange wie der Polynukleotidanalyt in einer Kopienzahl unter der Kopienzahl des Pseudoziels vorhanden war. In einer weiter unten beschriebenen exemplarischen Methode war der Polynukleotidanalyt in einem Satz von Amplifikationsreaktionsmischungen mit Anfangsmengen von 10^1 – 10^5 Molekülen vorhanden, während das Pseudoziel in allen Mischungen mit 10^6 Molekülen vorhanden war. Das bedeutete, dass alle Amplifikationsreaktionen von im Wesentlichen 10^6 Polynukleotidmatrizen initiiert wurden, da der Beitrag der Polynukleotidanalyte an der Gesamtzahl der Matrizen in allen Mischungen minimal war. Daher verhielten sich alle Amplifikationsreaktionen als ob sie ungefähr 10^6 Matrizen enthielten, obwohl die Zahl der Polynukleotidanalyten stark schwankte. Dies standardisierte die Amplifikationsreaktionen wirksam bei 10^6 Polynukleotidmatrizen, unabhängig von der derzeitigen Analytmenge.

II. Kontrollieren der Amplikonherstellung

[0080] Es wurde weiterhin herausgefunden, dass Pseudoziele verwendet werden können, um Hindernisse zu überwinden, die mit der "Überproduktion" von Analyt-Amplikons in Verbindung stehen, die zu einer ungenauen Quantifizierung von großen Mengen an Input-Ziel-Polynukleotid führen. Wenn überschüssige Mengen des Amplikons in einer Amplifikationsreaktion hergestellt werden und wenn diese Amplikons durch Hybridisieren mit

einer Detektionssonde bis zur Sättigung quantifiziert werden sollen, dann werden notwendigerweise große Mengen der Detektionssonde im Detektionsschritt des Assays verbraucht werden. Wenn umgekehrt verringerte Mengen des Amplikons hergestellt werden, dann wird weniger von der Detektionssonde benötigt, um den Detektionsschritt durchzuführen. Ein anderer Vorteil zum Reduzieren der Menge des in einer Amplifikationsreaktion hergestellten Amplikons betrifft noch den anderen Aspekt der für die Detektion des Amplikons verwendeten Detektionsvorrichtung. Da Detektionsmittel, wie zum Beispiel Luminometer, häufig lineare Reaktionsbereiche aufweisen werden, die bei hohen Signalmengen abgesättigt werden können, ist es ein Vorteil Amplifikationsreaktionen durchzuführen zu können, so dass das in einem Detektionsschritt erzeugte Signal innerhalb des linearen Reaktionsbereiches für die Detektionsvorrichtung fällt. Daher ist die Fähigkeit, die Amplikonsynthese zu kontrollieren, in Bezug auf die nachfolgenden Detektionsschritte eindeutig von Vorteil.

[0081] Die Menge des in der Amplifikationsreaktion erzeugten Analyt-Amplikons kann durch das Einschließen eines Pseudoziels in die Amplifikationsreaktion kontrolliert werden, um mit dem Ziel-Polynukleotid um die Amplikonsynthese zu konkurrieren. Wenn das Pseudoziel vorhanden ist, werden Reaktanden in der Amplifikationsreaktionsmischung verwendet, um sowohl Analyt-Amplikons als auch Pseudoziel-Amplikons zu synthetisieren. Wenn die Amplifikationsreaktion bis zur Reagenzerschöpfung voranschreitet und wenn höhere Anzahlen an Pseudoziel-Amplikons auf Kosten der Analyt-Amplikons hergestellt werden, dann kann der relative Anteil der Analyt-Amplikons durch Erhöhen der Anfangsmenge des Pseudoziels in der Amplifikationsreaktion verringert werden. Eine angemessene Menge des in der Amplifikationsreaktion einzuschließenden Pseudoziels kann durch einfache Routineversuche bestimmt werden.

[0082] Ein alternativer Ansatz zum Reduzieren der Analyt-Amplikonproduktion in einer Polynukleotid-Amplifikationsreaktion, wie zum Beispiel der TMA-Reaktion, wäre es, die Reaktion unter weniger guten Bedingungen, wie zum Beispiel denen im U.S. Patent Nr. 5,705,365 und 5,710,029 beschriebenen, durchzuführen. Diese Alternative könnte bei Zeiten weniger wünschenswert sein als der oben beschriebene Ansatz, da unterschiedliche Bedingungen erforderlich sein könnten, um die Reaktion für unterschiedliche zu detektierende Analyten zu "deoptimieren". Im Gegensatz dazu ermöglicht es das Verringern der Menge des in einer Reaktion hergestellten Analyt-Amplikons durch Einschließen eines Pseudoziels alle Reaktionen unter optimalen Bedingungen durchzuführen.

[0083] Daher stellt das Einbringen eines Pseudoziels in einer Amplifikationsreaktion durch das Konkurrieren großer Zielmengen mit noch größeren Mengen des Pseudoziels ein Mittel zum "Tuning" einer quantitativen Amplifikationsreaktion dar.

III. Einzelprobenverarbeitung in Gegenwart von zugegebenen Pseudozielen

[0084] Die einheitliche Gewinnung von Ziel-Polynukleotiden aus unterschiedlichen biologischen Proben ist für viele quantitative Assays sehr wichtig. Zum Beispiel könnten Assays zum Bestimmen der Mengen an HIV-Virionen im Plasma sehr einfach zu einer ungenauen Abschätzung der Virionenmengen im Plasma führen, wenn die Präzision der Ziel-Polynukleotidgewinnung niedrig ist. Hier wird ein alternativer Ansatz beschrieben, der bezüglich der Variabilität bei der Input-Menge der Polynukleotidanalyten relativ tolerant ist.

[0085] Mehr noch als das Bestreben nach quantitativer Gewinnung der Polynukleotide, die als Matrizen in einer Amplifikationsreaktion dienen werden, ist ein Aspekt der Erfindung auf ein Verfahren zum Vereinheitlichen der Variabilität der Ziel-Polynukleotidgewinnung im Einzelproben-Verarbeitungsschritt gerichtet. Gemäß diesem Ansatz wird die Endmenge des Ziel-Polynukleotid-Amplifikationsproduktes einfach zu kontrollieren sein, wenn die Menge eines Pseudoziels ausreichend groß ist, so dass die Pseudoziel-Amplifikation mit der richtigen Ziel-Amplifikation konkurriert, und wenn das Pseudoziel und der Polynukleotidanalyt bei vergleichbarer Amplifikationswirksamkeit co-amplifizierbar sind. In diesem Bereich ist die Menge des Analyt-Amplikons umgekehrt proportional zur Input-Menge des Pseudoziels. Wenn zum Beispiel die Input-Menge des Pseudoziels um das x-fache erhöht wird, dann wird das Analyt-Amplikon um $1/X$ verringert. Wenn das Pseudoziel in Einzelproben-Verarbeitungsschritten vorhanden ist, werden das Pseudoziel und das richtige Ziel mit vergleichbarer Wirksamkeit gewonnen. Wenn daher die Wirksamkeit bei der Gewinnung für den Polynukleotidanalyten bei K% liegt, dann wird das Pseudoziel auch mit einer Wirksamkeit von K% gewonnen.

[0086] Unter ansonsten identischen Bedingungen werden die Reaktionsansätze eine relativ konstante Menge des Amplikons herstellen. Daher hält die Zugabe des Pseudoziels die Reaktionsbestandteile von der Herstellung des nichtspezifischen Amplikons ab und stellt sicher, dass tatsächlich alle in der Reaktion produzierten Amplikons entweder Pseudoziel-Amplikons oder Analyt-Amplikons sind, die das Amplifikationsprodukt eines Polynukleotidanalyten darstellen. Das Pseudoziel-Amplikon und das Analyt-Amplikon werden im gleichen Ver-

hältnis hergestellt, wie das Verhältnis des Pseudoziels und des Polynukleotidanalyten zum dem Zeitpunkt an dem die Amplifikationsreaktion initiiert wurde.

[0087] Wenn die Polynukleotidanalyten und die Pseudoziele coisoliert werden und dann zu einer Amplifikationsreaktion zugegeben werden, die bis zum Reaktandenverbrauch voranschreitet, wird das relative Verhältnis der sich daraus ergebenden Analyt- und Pseudoziel-Amplikons gleich dem relativen Verhältnis von Polynukleotidanalyten und Pseudoziel-Polynukleotiden in der Probe, die aus der biologischen Einzelprobe isoliert worden ist, sein. Dies bedeutet, dass unabhängig von der Wirksamkeit der Polynukleotidgewinnung bei der Einzelproben-Verarbeitung, die Menge des Analyt-Amplikons, das in einer Amplifikationsreaktion synthetisiert wird, gleich der Menge sein wird, die synthetisiert worden wäre, wenn 100% des Polynukleotidanalyten und des Pseudoziels im Einzelproben-Verarbeitungsschritt gewonnen worden wären. Daher wird durch Zugabe eines Pseudoziels zu einer biologischen Einzelprobe zum Zeitpunkt der Verarbeitung, an dem Polynukleotide für die nachfolgende Amplifikation isoliert werden, die Wirksamkeit der Zielgewinnung im nachfolgenden Amplifikationsschritt vereinheitlicht werden.

Pseudoziel enthaltende Amplifikationsreaktionen

[0088] Zwei zweckmäßige Formate können zur Durchführung der TMA-Reaktionen, die in den weiter unten beschriebenen Beispielen verwendet wurde, verwendet werden. Im ersten Format sind alle Materialien zu jedem Zeitpunkt im flüssigen Zustand. Zum Beispiel werden Lösungen von Reagenzien, Matrizen und Enzymen in einem Reaktionsgefäß kombiniert und dann lässt man die Amplifikation voranschreiten. Dies ist sehr zweckmäßig, wenn das Ziel-Polynukleotid in einem gereinigten oder halbgereinigtem Zustand verfügbar ist. Im zweiten Format wird die in der TMA-Reaktion zu amplifizierende Polynukleotidmatrize zuerst auf einer festen Phase (wie zum Beispiel einem Kügelchen) gesammelt, und der Komplex, der die feste Phase und die Matrize enthält, dann mit anderen Reagenzien in der Amplifikationsreaktion kombiniert. Verwendbare Festphasenträger schließen ein, sind jedoch nicht begrenzt auf Nitrocellulose, Nylon, Glas beschichtete Magnetpartikel, Polyacrylamid, Polystyren und derivatisierte Polymere, wie zum Beispiel Epoxidharze. Dieses zweite Format ist besonders zweckmäßig, wenn die Polynukleotidmatrize in begrenzten Mengen verfügbar ist. Der Fachmann wird erkennen, dass das Manipulieren kleiner Proben von Polynukleotiden auf einfache Weise durch das Manipulieren von Suspensionen der größeren und besser handhabbaren Kügelchen ersetzt werden kann. Darüber hinaus können die Kügelchen einen Bestandteil in einem Schema zum Reinigen der Matrize darstellen. Zum Beispiel können Kügelchen, die ein darauf aufgelagertes Oligo(dT)-Polynukleotid aufweisen mit einem Zelllysat vermischt werden, so dass Poly(A)⁺-mRNA auf den Kügelchen immobilisiert wird. Daher kann der Komplex, der die Kügelchen und die immobilisierte mRNA enthält, mit Reagenzien und Enzymen kombiniert werden, so dass eine TMA-Reaktion unter Verwendung der mit den Kügelchen als Matrize für die Amplifikation verbundenen RNA durchgeführt werden kann. Unter diesen Bedingungen können die Kügelchen direkt zum Reaktionsgefäß zugegeben werden. Wenn anstelle eines Oligo(dT)-Polynukleotids ein Polynukleotid mit einer anderen Sequenz auf den Kügelchen immobilisiert wird, kann diese andere Sequenz verwendet werden, um einen komplementären Polynukleotidanalyten oder ein Pseudoziel aus einer Sammlung von Polynukleotiden einzufangen. Dieses Verfahren zum Immobilisieren eines bestimmten Polynukleotids auf ein Trägermaterial kann ein Mittel zum Isolieren bestimmter Polynukleotide aus einer komplexen Mischung von Polynukleotiden bereitstellen. Andere Verfahren zum Isolieren von Polynukleotiden können Standardverfahren einschließen, wie zum Beispiel die Extraktion mit organischen Reagenzien, wie zum Beispiel Mischungen aus Phenol und Chloroform, wahlweise einschließlich Alkoholpräzipitationsschritte.

[0089] Die folgenden Beispiele machen deutlich, dass die Gegenwart der Pseudoziele die Variabilität der Amplikonherstellung in TMA-Reaktionen, die mit Oligo(dT) derivatisierte magnetische Kügelchen einschließen, auf vorteilhafte Weise verringerte. Diese verringerte Variabilität kann alternativ als Zunahme der "Präzision" der Amplifikation ausgedrückt werden. Besonders die weiter unten dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass unterschiedliche Reaktionen, die mittels im Wesentlichen identischer Mengen der anfänglichen Polynukleotidmatrizen durchgeführt wurden, auf vorteilhafter Weise mehr reproduzierbare Ergebnisse ergaben, wenn die Variabilität von Probe zu Probe verringert wurde.

[0090] Auch wenn viele verschiedene Verfahren zum Detektieren amplifizierter Polynukleotide in Verbindung mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, stellt das "Hybridisationsschutzassay" (HPA) im U.S. Patent Nr. 5,639,604 ein besonders gut verwendbares Verfahren dar. In einer Ausführungsform schließt das HPA-Detektionsverfahren das Hybridisieren amplifizierter Polynukleotide mit einer komplementären Polynukleotidsonde, die mit einem chemilumineszierenden Acridiniumester markiert ist, ein. Der Acridiniumester wird, wenn er in einer Duplexstruktur hybridisiert wird, vor dem Abbau unter milden Hydrolysebedingungen geschützt. Ein Acridiniumester in unhybridisierten Sondenmolekülen ist anfällig für einen solchen Abbau und wird

durch geeignete chemische Behandlung selektiv zerstört. Das Bestimmen der Menge des nicht abgebauten Acridiniumesters zeigt die Menge der Sonde, die mit komplementären Polynukleotiden hybridisiert worden ist. Dieser Bestimmungsschritt schließt das Zugabe von Wasserstoffperoxid zur Mischung und das Messen der Menge des Lichts, das während einer nachfolgenden basenkatalysierten Chemilumineszenzreaktion emittiert wird, ein. Das HPA-Verfahren zum Quantifizieren der Amplikonsynthese wird bevorzugt, da es keinen Bedarf für langwierige und zeitraubende Schritte zum Entfernen von überschüssiger, unhybridisierter Sonde gibt, die ansonsten zu großen Hintergrundhybridisationsmengen führen würden. Jedoch können andere Verfahren zum Detektieren und Quantifizieren von Amplikons, wie zum Beispiel Methoden, die Radioaktivität, Fluoreszenz oder enzymmarkierte Sonden verwenden, oder andere Detektionsverfahren, die Trennungsverfahren verwenden, die beinhalten, jedoch nicht begrenzend sind auf Festphasenträgerformate, HPLC und Elektrophorese, bei der praktischen Arbeit zum erfundenen Verfahren mit vergleichbar guten Ergebnissen verwendet werden. In der Tat wird nicht erwartet, dass das zum Detektieren der Amplikons verwendete Verfahren, die Qualität der Ergebnisse, die in den nachfolgenden Methoden erhalten würden, beeinflusst.

Bevorzugte Polynukleotidanalyten

[0091] Wie hierin beschrieben, können quantitative Verfahren, die Pseudoziele verwenden, zum Durchführen von Amplifikationsreaktionen verwendet werden, unabhängig vom Ursprung des Polynukleotidanalyten. Bevorzugte Polynukleotidanalyte schließen Nukleinsäuren von Organismen, die Krankheiten verursachen, einschließlich Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen, ein. Beispiele für stark bevorzugte Polynukleotidanalyten von Viren sind Nukleinsäuren vom humanes Immunschwächevirus (HIV-1 und HIV-2), dem Hepatitis-B-Virus (HBV) und dem Hepatitis-C-Virus (HCV). Bevorzugte Polynukleotidanalyten aus Bakterien, Pilzen und Protozoen, die gemäß dem hierin offenbarten Verfahren quantifiziert werden können, schließen ribosomale RNA's (rRNA) ein. Beispiele für Bakterien, die als Quelle für Polynukleotidanalyten stark bevorzugt werden, beinhalten *Chlamydia trachomatis* (gramnegative Zellen, die obligate, intrazelluläre Organismen sind), Mitglieder der Gattung *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lariidis*), Mitglieder der Gattung *Enterococcus* (*E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus*, und *E. raffinosus*), *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, Gruppe B Streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*. Beispiele für Pilze, die als Quellen für Polynukleotidanalyte stark bevorzugt werden, schließen ein: *Blastomyces dermatitidis*, Mitglieder der Gattung *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. diversus*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*), *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*. Beispiele für Protozoen, die als Quelle für Polynukleotidanalyten stark bevorzugt werden schließen Blut und Gewebeprototozoen, wie zum Beispiel Mitglieder der Gattung *Plasmodium* (*P. malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax*) als auch Protozoen, die den Gastrointestinaltrakt infizieren, wie zum Beispiel *Giardia lamblia* und *Cryptosporidium parvum*, ein.

[0092] Das erfundene Verfahren kann ebenso zum Quantifizieren von Nukleinsäuren, die menschlichen Ursprungs sind, wie zum Beispiel mRNA's, die bei Krankheitszuständen überexprimiert oder unterexprimiert sind, einschließlich Krebs, verwendet werden. Ein Beispiel für ein Gen, das in einer erhöhten Kopienzahl bei Brust- und Ovarienadenokarzinomen vorhanden ist, ist das HER-2/neu-Oncogen, das für eine Tyrosinkinase kodiert, die bestimmte Eigenschaften mit dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) gemeinsam hat. U.S. Patent Nr. 4,968,603 beschreibt den Wert der Messung der erhöhten Kopienzahl des HER-2/neu-Gens oder der HER-2/neu-mRNA als Werkzeug zum Bestimmen des Zustandes des Tumorleidens. Daher kann zum Beispiel das hierin beschriebene Verfahren in quantitativen Nukleinsäure-Amplifikationsprotokollen verwendet werden, wobei der Zellgehalt an HER-2/neu-Polynukleotiden bestimmt wird.

[0093] In der Tat ist das hierin beschriebene Polynukleotid-Amplifikationsverfahren auf zahlreiche Nukleinsäureziele allgemein anwendbar und ist einfach auf Methoden zum Quantifizieren eines gegebenen Polynukleotidanalyten in einer Testprobe erweiterbar.

[0094] Auch wenn andere Materialien und Verfahren, die mit denen vergleichbar oder äquivalent sind, die hierin beschrieben werden, bei der praktischen Ausführung oder beim Testen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden die bevorzugten Verfahren und Materialien jetzt beschrieben. Allgemeine Bezüge zu Verfahren, die verwendet werden können, um die zahlreichen Nukleinsäuremanipulationen und Methoden, die hierin beschrieben werden, durchzuführen, können in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al. Hrsg., Cold Spring Harbor Lab Publ. 1989) und *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, et al. Hrsg., Greene Publishing Associates und Wiley-Interscience 1987) gefunden werden. Verfahren zum Durchführen der TMA-Reaktion werden im U.S. Patent Nr. 5,399,491 offenbart. Verbesserungen für das TMA-Reaktionsprotokoll, wie zum Beispiel das im U.S. Patent Nr. 5,786,183 offenbarte, liegen innerhalb des

Schutzumfangs der transkriptionsvermittelten Amplifikation für den Zweck der vorliegenden Offenbarung. Verfahren zur Herstellung und Verwendung von Acridiniumester markierten Sonden werden bei Arnold et al. im U.S. Paten Nr. 5,639,604 aufgeführt. Eine Beschreibung der Versuche und Ergebnisse, die zur Erschaffung der vorliegenden Erfindung geführt haben, werden nun folgen.

[0095] Beispiel 1 beschreibt Verfahren, die deutlich machten, dass Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen, die ein Pseudoziel enthielten, eine verringerte Variabilität bei der Amplikonherstellung zeigten.

Beispiel 1

Pseudoziel-Amplifikation verringert die Variabilität in der Amplikonmenge, die in einer TMA hergestellt wird

[0096] Eine Serie von TMA-Reaktionsansätzen wurde unter Verwendung von Primern, die für ein Segment des HIV-pol-Transkripts spezifisch sind, vorbereitet. Alle Reaktionsansätze wurden in achtfacher Ausführung durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz erhielt: 50 µl, die 60 Kopien an RNA-Transkripten des vollständigen HIV-Genoms enthielten, das im Einzelprobenpuffer, der aus 10 mM HEPES (pH 7,5) und 1 mM EDTA besteht, verdünnt wurde. Das RNA-Transkript wurde unter Verwendung des Plasmids BH10 als Matrize synthetisiert. In dieser Methode wurde die BH10-RNA als Beispiel für einen Polynukleotidanalyten verwendet. Die Polynukleotidsequenz der BH10-RNA wird durch die Sequenz der SEQ ID NO: 3 wiedergegeben. Die Reaktionsansätze schließen auch entweder 0, 10⁵, 10⁶, oder 10⁷ Kopien der IAC-Ascr-Pseudoziel-RNA mit der Sequenz der SEQ ID NO: 4 ein. Es wurden 25 µl des Amplifikationsreagenzes zugegeben, das 10 pmol eines T7A(-)4190-Primers mit der Sequenz AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTGTATGTCTGTTGCTAT-TATGTCTA (SEQ ID NO: 1); 10 pmol des (+)4108-Primers mit der Sequenz ACAGCAGTACAAATGGCAG (SEQ ID NO: 2); 160 mM Tris-Puffer (pH 7,5); 16 mM jeweils von ATP, CTP, GTP und UTP; 4 mM jeweils von dATP, dCTP, dGTP, und dTTP; 100 mM MgCl₂; 70 mM KCl; 20% Glycerol; 0,6 mM Zinkacetat und 20% Polyvinylpyrrolidon enthält. Die Proben wurden dann mit 200 µl Mineralöl überschichtet, zuerst für 10 Minuten bei 65°C inkubiert, um das Primer-Ziel-Anbinden (annealing) zu ermöglichen, und dann für 5 Minuten bei 42°C inkubiert. Danach erhielt jeder Reaktionsansatz ein 25 µl Aliquot einer Enzymmischung, die 2000 GP-Einheiten der MMLV reversen Transkriptase; 2000 GP-Einheiten der T7 RNA-Polymerase; 140 mM Tris-Puffer (pH 8,0); 100 mM N-Acetyl-Cystein als reduzierendes Agens; 20% Glycerol; 70 mM KCl; 80 mM Trehalose; 8 mM HEPES; 1,04 mM EDTA; 10% Triton X-102 und 0,01% Phenolrot enthielt. Eine GP-Einheit der reversen Transkriptase entspricht der Menge des Enzyms, das 5,75 fmol cDNA ausgehend von einer RNA-Matrize in 15 Minuten bei 37°C synthetisiert. Eine GP-Einheit der RNA-Polymerase ist definiert als die Menge des Enzyms, die 5 fmol RNA-Transkript ausgehend von einer doppelsträngigen DNA-Matrize, die eine Promotersequenz enthält, in einem Zeitraum von 20 Minuten bei 37°C synthetisiert. Die Reaktionsansätze wurden bei 42°C für zusätzliche 60 Minuten inkubiert. Danach wurden 100 µl der Proben der Reaktionsmischungen mit einem entsprechenden Volumen der HIV-spezifischen AE(+)4134-Sonde, die einen Acridiniumesterrest als Marker trägt, und die Sequenz CCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGG (SEQ ID NO: 5) aufweist, kombiniert. Diese markierte Polynukleotidsonde wurde hergestellt und im Wesentlichen gemäß dem Verfahren verwendet, das im U.S. Patent Nr. 5,639,604 offenbart ist, und in einer Lösung dispergiert, die 100 mM Lithiumsuccinat-Puffer (pH 4,7), 2% (w/v) Lithiumlaurylsulfat, 1,2 M Lithiumchlorid, 15 mM Ardrithiol-2, 20 mM EDTA, 20 mM EGTA und 3% Ethanol enthält. Die gesamte Ionenstärke für die Förderung der Hybridisationsreaktion wurde im Wesentlichen durch die 600 mM Lithiumchlorid und 1% Lithiumlaurylsulfat Bestandteile der fertigen Hybridisationslösung bereitgestellt. Wichtig ist, dass die Sequenz der AE(+)4134-Sonde die Hybridisation durch komplementäre Basenpaarung mit dem Analyt-Amplikon und nicht mit dem Pseudoziel-Amplikon ermöglichte. Nach dem Hybridisieren der Mischung bei 60°C für 15 Minuten wurden 300 µl eines Selektionsreagenzes, das 600 mM Natriumborat (pH 8,5) und 1% Triton X-100 enthielt, zugegeben und die Mischung bei 60°C inkubiert, um die nicht hybridisierte Sonde zu inaktivieren. Am Ende wurden die Mischungen auf Raumtemperatur abgekühlt, in einem Luminometer angeordnet und die Menge des Analyt-Amplikons durch Messen des Lichts, das aufgrund einer Chemilumineszenzreaktion (in RLU's) emittiert wurde, quantifiziert. Das Detektionsreagenz I schloss Wasserstoffperoxidlösung in 0,001 N Salpetersäure ein. Das Detektionsreagenz II beinhaltete eine 1 N NaOH-Lösung. Jedem Reaktionsröhrchen wurde zuerst das Detektionsreagenz I und dann das Detektionsreagenz II eingespritzt, um die Lichtemission zu stimulieren. Die Sonden, die zum Detektieren und Quantifizieren des Analyt-Amplikons verwendet wurden, waren namentlich die Folgenden: Reaktionsansätze, die das Pseudoziel nicht erhielten wurden mit 100 fmol der markierten AE(+)4134-Sonde (SEQ ID NO: 5) und 3,9 pmol ummarkiertem 2'Methoxyribonukleotid (2'OMe)(+)4134 sondiert; Reaktionen die 10⁵ Kopien des Pseudoziels enthielten wurden mit 100 fmol der markierten Sonde und 3,9 pmol unmarkiertem 2'OMe(+)4134 sondiert; Reaktionen die 10⁶ Kopien des Pseudoziels enthielten, wurden mit 100 fmol der markierten Sonde und 0,2 pmol unmarkiertem 2'OMe(+)4134 sondiert; Reaktionen, die 10⁷ Kopien des Pseudoziels enthielten, wurden mit 100 fmol der markierten Sonde alleine sondiert. Namentlich hat 2'OMe einen Methoxyrest gegen einen Hydroxyl-

rest in der 2' Position der Ribose in der RNA substituiert. Es soll angemerkt werden, dass das (+)4134-Polynukleotid die gleiche Basensequenz aufwies wie das AE(+)4134-Polynukleotid jedoch nicht den N-Acridinmestermarker enthielt. Die unterschiedlichen Sonden-spezifischen Aktivitäten wurden verwendet, um das luminometrische Auslesen in einem linearen Detektionsbereich zu ermöglichen.

[0097] Die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass Amplifikationsreaktionen, die ein Pseudoziel einschlossen, auf vorteilhafte Weise einheitlichere Ergebnisse mit geringerer Variabilität innerhalb der Proben-sammlung ergaben. Tabelle 1 zeigt die Kopienanzahl des IAC-Ascr-Pseudoziels und des BH10-RNA-Polynukleotidanalyten, der in jedem Reaktionsansatz eingeschlossen war. Dargestellt sind auch die Rohdaten, welche die Lichtemission der Reaktionsansätze (in RLU's) und die Nettoemission, die korrigiert worden ist, um die Hintergrundemission abzuziehen, die in Negativkontrollreaktionen gemessen wurde, darstellen. Die mit "Korrigiert auf einheitliche sp. Akt." markierte Spalte, zeigt den Wert der Netto RLU's, die erhalten werden würden, wenn alle HPA-Assays unter Verwendung der gleichen Sonde hoher spezifischer Aktivität durchgeführt worden wären. Dieser Wert wurde in die Analyse eingeschlossen, so dass die unterschiedlichen Reaktionsansätze direkt miteinander verglichen werden konnten. Die Nettodurchschnittswerte für alle Bestimmungen einer bestimmten Reaktionsbedingung werden auch zusammen mit den berechneten Werten für die Standardabweichung (SD) und den Variabilitätskoeffizienten (CV%) dargestellt. Die letzte Säule in der Tabelle zeigt, dass die CV%-Werte sich verringerten, während sich die Anzahl der Kopien des Pseudoziels in den Reaktionsansätzen erhöhte. Dieses Ergebnis zeigte auf quantitativ Weise, dass die Variabilität in der Menge des Amplikons, dass in unterschiedlichen Reaktionsansätzen hergestellt wurde, sich verringerte, während die Menge des Pseudoziels erhöht wurde.

Tabelle 1

Pseudoziel-Amplifikation und Analyt-Amplikonsynthese mit löslichen Polynukleotiden (Pure System)

IAC-Ascr (Kopien)	BH10- RNA	RLU 's	net. RLU 's	korrigiert auf Einheitliche sp. Akt.	net. Durchs.	Standard- abweichung (SD)	Variabilitäts- koeffizient (CV%)
keine	60	60758	55366	2214640	2340305	1465936	62.6
		100316	94924	3796960			
		116898	111506	4460240			
		80682	73500	3012000			
		78084	72692	2907680			
		31443	26051	1042040			
		29419	24027	961080			
		13587	8195	327800			
	keine	5392	0	0	0		
1.0 x 10 ⁵	60	85700	78257	3130280	3029790	1891104	62.4
		64487	57044	2281760			
		54852	47409	1896360			
		41357	33914	1356560			
		51353	43910	1756400			
		93974	86531	3461240			
		190926	183483	7339320			
		82853	75410	3016400			
	keine	7443	0	0	0		
1.0 x 10 ⁶	60	580816	572789	1718367	1036444	323123	31.2
		401651	393624	1180872			
		302690	294663	883989			
		222165	214138	642414			
		275810	267783	803349			
		322421	314394	943182			
		349792	341765	1025295			
		372722	364695	1094085			
	keine	8027	0	0	0		
1.0 x 10 ⁷	60	155174	146863	146863	134795	30825	22.9
		138647	130336	130336			
		102893	94582	94582			
		157291	148980	148980			
		166824	158513	158513			
		149727	141416	141416			
		181812	173501	173501			
		92482	84171	84171			
	keine	8311	0	0	0		

[0098] Beispiel 2 beschreibt die Verfahren, die verwendet werden, um deutlich zu machen, dass eine erhöhte Präzision bei der Amplikonherstellung ein generelles Merkmal der Reaktionsansätze war, die ein Pseudoziel enthielten. Die folgenden Methoden zeigen besonders, dass ein zweites exemplarisches Pseudoziel, genannt IAC-Bscr, ebenfalls die Variabilität der Amplikonherstellung in einer exemplarischen TMA-Reaktion verringerte.

Beispiel 2

Verringerte Variabilität bei der Produktion der Analyt-Amplikons durch TMA ist ein allgemeines Merkmal der Reaktionen, die ein Pseudoziel enthalten

[0099] 30 µl, die 60 Moleküle der BH10-RNA enthalten, die in einem Einzelprobenpuffer (1 mM EDTA, 10 mM

HEPES) verdünnt wurden, wurden zu einer Reihe von Reaktionsröhrchen gegeben. 20 µl, die 0, 10⁵, 10⁶, 10⁷ oder 10⁸ IAC-Bscr Pseudoziel-RNA-Moleküle (SEQ ID NO: 9) im Einzelprobenpuffer enthalten, wurden in geeignete Röhrchen gegeben. Nach dem Vortexen erhält jedes Röhrchen ein 25 µl Aliquot des in Beispiel 1 beschriebenen Amplifikationsreagenzes, mit der Ausnahme, dass die Konzentrationen der T7A(-)4190 und (+)4108-Primer, die verwendet werden, jeweils bei 5 pmol anstelle von 10 pmol liegen. Die flüssigen Bestandteile jedes Röhrchen wurden dann mit 200 µl Öl überschichtet, um die Verdunstung zu verhindern. Die Röhrchen wurden für 10 Minuten bei 65°C und dann für 5 Minuten bei 42°C inkubiert. Ein 25 µl Aliquot des in Beispiel 1 beschriebenen Enzymreagenzes wurde danach zu jedem Röhrchen gegeben. Die Inhalte aller Röhrchen wurden jeweils vermischt und die Reaktionsansätze für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Am Ende des Reaktionszeitraums wurden alle Proben durch das Standard-HPA einer Analyse unterzogen. Dementsprechend wurden 100 µl einer Lösung der mit Acridinium markierten 2'Methoxy AE(+)4134-Sonde zu jedem Röhrchen gegeben. Unterschiedliche spezifische Aktivitäten der Sonde wurden verwendet, um Analyt-Amplikons in Proben zu detektieren, die unter Verwendung unterschiedlicher Mengen des IAC-Bscr Pseudoziels hergestellt wurden. Dies stellte sicher, dass Lichtemissionsauslesungen in der Detektionsmethode innerhalb des linearen Bereiches des Luminometers, das zum Quantifizieren der Analyt-Amplikons verwendet wurde, fallen würden. Sonden, die verwendet wurden, um das Analyt-Amplikon zu detektieren und quantifizieren, sahen wie folgt aus: Reaktionen, die das Pseudoziel nicht erhielten, wurden mit 100 fmol der markierten 2'OMe(+)4134-Sonde und 20 pmol der unmarkierten Sonde sondiert; Reaktionen, die 10⁵ Kopien des Pseudoziels einschlossen, wurden mit 100 fmol der markierten Sonde und 3,0 pmol der unmarkierten Sonde sondiert; Reaktionen, die 10⁶ Kopien des Pseudoziels einschlossen, wurden mit 100 fmol der markierten Sonde und 0,4 pmol der unmarkierten Sonde sondiert; Reaktionen, die 10⁷ oder 10⁸ Kopien des Pseudoziels einschlossen, wurden mit 100 fmol der markierten Sonde alleine sondiert. Mischungen der Amplifikationsprodukte und der Sonde wurden bei 60°C für 15 Minuten inkubiert, mit 300 µl des Selektionsreagenzes vermischt und dann bei 60°C für zusätzliche 10 Minuten inkubiert. Die Mischungen wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und die Chemilumineszenz wurde nach Zugabe der Detektionsreagenzien I und II ausgelesen.

[0100] Die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse bestätigten, dass Amplifikationsreaktionen, die ein Pseudoziel einschlossen, auf vorteilhafte Weise einheitlichere Mengen des Analyt-Amplikons mit geringerer Variabilität innerhalb der Sammlung von Probenauslesungen herstellten. Tabelle 2 zeigt die Kopienanzahl des IAC-Bscr-Pseudoziels und des BH10-RNA-Polynukleotidanalyten, die in allen Reaktionsansätzen der 8 Wiederholungsversuche für die Amplifikation, die für jede Input-Menge an Pseudoziel durchgeführt wurden, eingeschlossen waren. Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse, die die durchschnittlichen Nettolichtemissionsauslesungen aus allen HPA-Reaktionsansätzen darstellen. Hintergrundemissionswerte, die bei Reaktionen gemessen wurden, die das Pseudoziel einschlossen, ohne den Modell-Polynukleotidanalyten einzuschließen, wurden abgezogen, um die Nettoergebnisse zu erhalten. Die Durchschnittsmengen des Analyt-Amplikons, die für jede Reaktionsbedingung ("Amplikon") hergestellt wurde, werden so dargestellt, dass die Produkte aus unterschiedlichen HPA-Reaktionsansätzen, die mit Sonden hybridisierten, die unterschiedliche spezifische Aktivitäten aufwiesen, direkt verglichen werden konnten. Es werden auch Werte für die Standardabweichung (SD) und den Variabilitätskoeffizienten (CV%) dargestellt, die für alle luminometrischen Bestimmungen für eine bestimmte Reaktionsbedingung berechnet wurden. Die Ergebnisse bestätigten, dass die Mengen des Analyt-Amplikons, das in den Reaktionen, die ein Pseudoziel einschlossen, synthetisiert wurde, mit größerer Präzision hergestellt wurde als in Reaktionen, die kein Pseudoziel einschlossen. Besonders Reaktionen, die unter Verwendung von mehr als 1 × 10⁵ Pseudoziel-Molekülen durchgeführt worden sind, erreichten CV%-Werte, die niedriger waren als der CV%-Wert, der für den Datensatz erhalten wurde, der aus Reaktionsansätzen hergestellt wurde, die in Abwesenheit eines Pseudoziels durchgeführt wurden. In der Tat war der statistische "p"-Wert geringer als 0,05 für Reaktionsansätze in unserem Datensatz, die unter Verwendung von mindestens 10⁶ Molekülen des Pseudoziels durchgeführt wurden. Dies bestätigte quantitativ, dass die Variabilität in der Menge des in unterschiedlichen Reaktionen hergestellten Amplikons sich verringerte, wenn das Pseudoziel vorhanden war.

Tabelle 2

Pseudoziel-Amplifikation und Analyt-Amplikonsynthese

IAC-Bscr (Kopien)	BH10-RNA (Kopien)	net. Durchs. (RLU)	Amplikon (pmol)	Standard- abweichung	Variabilitäts- koeffizient (CV%)
Keine	60	165085	1,84	103009	62,4
1x10 ⁵	60	193642	0,29	134671	69,5
1x10 ⁶	60	164908	0,039	46096	28,0
1x10 ⁷	60	96749	0,0029	30116	31,1
1x10 ⁸	60	10199	0,0003	2475	24,3

[0101] Beispiel 3 beschreibt Verfahren, die verwendet worden sind, um zu untersuchen, ob die Amplifikationspräzision auch für Reaktionsansätze gesteigert würde, die in Gegenwart von derivatisierten Magnetkügelchen durchgeführt werden. Bei dieser Methode wurden die Kügelchen gemäß einer Einzelproben-Standardbearbeitungsmethode bearbeitet, die ein synthetisches "Ziel-Polynukleotid zum Einfangen" einschloss.

Beispiel 3

Die Präzision der Amplikonsynthese verbesserte sich bei Reaktionsansätzen, die in Gegenwart von bearbeiteten Magnetkügelchen durchgeführt wurden

[0102] 100 µl eines Reagenzes zum Einfangen des Zieles wurden mit einem entsprechenden Volumen an HIV serologisch negativem Plasma kombiniert. Das Reagenz zum Einfangen des Zieles schloss 17% Lithiumlaurylsulfat; 190 mM Bersteinsäure; 250 mM Lithiumhydroxid; 3 mM EDTA; 3 mM EGTA; 3,5 nM der Desoxy(-)3737-Sonde zum Einfangen, welche die Sequenz CCCTGTTTCTGCTGGAATAACTTCTGCTTCTATATT-TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 6) aufweist, und 3,5 nM der 2'Methoxy(-)4258 A30-Sonde zum Einfangen, welche die Sequenz TCTGCTGTCCTGTAATAAACCCGTT-TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 7) aufweist, ein. Die Mischung wurde bei 60°C für 20 Minuten inkubiert, dann mit 20 µl der Kügelchensuspension, die 120 µg der magnetischen Kügelchen enthält, die mit Oligo(dT) (Novagen; Madison, WI) derivatisiert wurden, zusammengegeben. Die Reaktionsansätze wurden dann für 15 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Hybridisation der Sonde zum Einfangen und des immobilisierten Oligo(dT) zu ermöglichen. Die Kügelchen wurden für 15 Minuten nach Platzieren in einer Halterung mit Magneten an der Gefäßinnenwand gesammelt, und der Überstand wurde verworfen. Die Kügelchen wurden dreimal unter Verwendung von 1 ml Aliquots des Waschreagenzes gewaschen und in einer TMA-Reaktion verwendet, wie im Beispiel 1 beschrieben, mit der Ausnahme, dass 100 Kopien der BH10-RNA und 0, 10³, 10⁴ oder 10⁵ Kopien des IAC-Ascr-Pseudoziels verwendet wurden. Das HPA wurde unter Verwendung von 100 fmol der markierten AE(+)-4134-Sonde und 200 fmol der unmarkierten (+)-4134 gemäß der weiter oben beschriebenen Methode durchgeführt.

[0103] Die in Tabelle 3 dargestellten Ergebnisse bestätigten, dass die Amplifikationsreaktionen, die ein Pseudoziel einschlossen, auf vorteilhafte Weise eine einheitlichere Herstellung des Analyt-Amplikons erreichten. Diese Ergebnisse, die auf Wiederholungsversuchen von 8 Amplifikationsreaktionen bezogen sind, zeigten wiederum besonders, dass die CV%-Werte sich bei Versuchen verringerten, die in Gegenwart steigender Mengen des Pseudoziels durchgeführt wurden. Namentlich ergaben Mengen von mehr als 10⁴ Kopien des Pseudoziels pro Reaktion die statistisch signifikanteste Verbesserung bei der Präzision der Analyt-Amplikonsynthese.

Tabelle 3

Pseudoziel-Amplifikation und Analyt-Amplikonsynthese in Gegenwart von derivatisierten Magnetkügelchen

IAC-Ascr (Kopien)	BH10-RNA (Kopien)	net. Durchs. (RLU)	Standard- abweichung (SD)	Variabilitäts- koeffizient (CV%)
keine	100	97105	37798	39,0
$1,0 \times 10^3$	100	152313	38630	25,4
$1,0 \times 10^4$	100	155062	67377	43,5
$1,0 \times 10^5$	100	12385	19655	15,9

[0104] Die im folgenden Beispiel dargestellten Ergebnisse bestätigten, dass TMA-Reaktionen, die ein Pseudoziel einschlossen und die Polynukleotidanalyten, die auf einem immobilisierten Träger eingefangen waren, verwendeten, eine erhöhte Präzision in Bezug auf die Menge des Analyt-Amplikons, das in der Amplifikationsreaktion synthetisiert wurde, zeigten. Während die in Beispiel 3 beschriebenen Methoden belegten, dass die Gegenwart eines Festphasensubstrates zum Einfangen die TMA-Reaktion nicht nachteilig beeinflusst, kommen die unten dargestellten Methoden diagnostischen Testmethoden näher, die in Übereinstimmung mit der Erfindung ausgeführt werden. Besonders die im folgenden Beispiel verwendeten Methoden verwenden eingefangene HIV-RNA als Amplifikationsmatrizen. Die Variabilität, die sich aus einer inkonsistenten Zielgewinnung in diesen Methoden ergibt, wurde vereinheitlicht, damit die Präzision der Amplifikation unabhängig untersucht werden konnte. Noch genauer, die HIV-RNA wurde zuerst gemäß einem Einzelproben-Standardverarbeitungsprotokoll auf Magnetkügelchen gesammelt und dann zusammengefasst und neu auf individuelle Röhrchen verteilt, so dass alle Amplifikationsreaktionen mit gleichen Mengen an HIV-RNA aber mit unterschiedlichen Mengen des Pseudoziels initiiert werden konnten. Beispiel 4 beschreibt die Verfahren, die verwendet wurden, um deutlich zu machen, dass TMA-Reaktionen, die unter Verwendung von Pseudozielen und auf festen Substraten eingefangenen Polynukleotidanalytmatrizen durchgeführt wurden, eine gesteigerte Präzision der Amplikonherstellung in Amplifikationsreaktionen ergaben.

Beispiel 4

Pseudoziele erhöhen die Präzision von Amplifikationsreaktionen, die eingefangene Polynukleotidanalyten als Matrizen verwenden

[0105] 100 µl Aliquots des Reagenzes zum Einfangen des Ziels und der HIV-Virionensuspension, die in serologisch negativem Plasma verdünnt wurden, das entweder 0 oder 200 Kopieäquivalente der HIV-RNA/100 µl an Plasma enthielt, wurden in individuellen Reaktionsröhrchen zusammengeführt. Das Reagenz zum Einfangen des Ziels enthielt die folgenden Reagenzien in den spezifizierten Konzentrationen: 3 mM Di-Natrium-EDTA; 3 mM EGTA; 17% Lithiumlaurylsulfat; 190 mM Bernsteinsäure (eingestellt auf einen End-pH von 5,1); 250 mM Lithiumhydroxid; 3,5 nM an Desoxy-HIV(-)3837 A30 (SEQ ID NO: 6); und 3,5 nM an 2'Methoxy-HIV(-)4258 A30 (SEQ ID NO: 7). Die Proben wurden bei 60°C für 20 Minuten inkubiert, um die HIV-RNA aus den Virionen freizusetzen, um alle Polynukleotide zu denaturieren und die Hybridisation der Sonde zum Einfangen an die Ziel-pol-Sequenz zu ermöglichen. 20 µl Aliquots der Oligo(dT)-Kügelchensuspension, die 120 µg der Oligo(dT)-derivatisierten Kügelchen enthielten, wurden dann zu jedem Reaktionsröhrchen zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben für 15 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Hybridisation des Oligo(dA)-Schwanzes der Sonde zum Einfangen und den auf den Kügelchen immobilisierten Oligo(dT)'s zu ermöglichen, wobei der Polynukleotidanalyt an das Magnetkügelchen über ein überbrückendes Polynukleotid verbunden werden. Die Kügelchen und die darauf immobilisierten Polynukleotide wurden aus dem Plasma und den freien Polynukleotiden durch Anordnen der Röhrchen in einer Halterung mit Magneten für einen Zeitraum von 5 Minuten isoliert, wobei während dieser Zeit die Kügelchen an der Innenseite jedes Röhrchens gesammelt wurden. Die Überstände wurden verworfen und die isolierten Kügelchen dreimal unter Verwendung von 1 ml Aliquots des Waschreagenzes (0,1% SDS, 10 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, mit einer magnetischen Isolation der Kügelchen zwischen jedem Schritt, gewaschen. Die Kügelchen wurden als nächstes mit 40 µl des Einzelprobenpuffers (1 mM EDTA, 10 mM HEPES zusammengegeben, vermischt und zusammengefasst. 40 µl der Aliquots der zusammengefassten Kügelchensuspension wurden dann auf frische

Reaktionsröhrchen verteilt, so dass alle Proben im Wesentlichen identische Mengen der auf Kügelchen eingefangenen Polynukleotidanalyten enthielten. 10 µl Aliquots des Pseudoziels, die im Einzelprobenpuffer (1 mM EDTA, 10 mM HEPES) verdünnt wurden, wurden auf entsprechende Röhrchen verteilt. Jedes Aliquot enthielt entweder 0, 2×10^6 , 2×10^7 oder 2×10^8 Moleküle der IAC-Ascr- oder IAC-Bscr-Pseudoziel-RNA. Die TMA-Amplifikationsreaktionen wurden, wie in Beispiel 2 weiter oben beschrieben, durchgeführt. Analyt-Amplikons wurden mittels einer modifizierten Version der HPA-Methode, "Addukt geförderte Hydrolyse" (Adduct Promoted Hydrolysis) (APH) genannt, durchgeführt. Nach den Amplifikationsreaktionen erhielt jedes Röhrchen ein 100 µl Aliquot der mit Acridinium markierten 2'OMe(+)4134-Sonde. Sonden mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten wurden bei dieser Methode verwendet, so dass Amplifikationsreaktionen, die unter Verwendung unterschiedlicher Mengen des Pseudoziels, ob IAC-Ascr oder IAC-Bscr, durchgeführt wurden, Lichtemissionsauslesungen ergeben würden, die in einen Linearitätsbereich für die Luminometrie fallen würden. Diese unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten wurden durch das Vermischen von markierten und unmarkierten Sonden erreicht. Sonden, die verwendet wurden, um das Analyt-Amplikon zu detektieren und quantifizieren, lagen wie folgt vor: Reaktionen, die kein Pseudoziel einschlossen, wurden mit 1,0 pmol der markierten 2'OMe(+)4134-Sonde und 100,0 pmol der unmarkierten Sonde sondiert; Reaktionen, die 10^6 , 10^7 oder 10^8 Kopien des Pseudoziels einschlossen, wurden mit 1,0 pmol der markierten Sonde und 1,0 pmol der unmarkierten Sonde sondiert. Die Reaktionen wurden für 15 Minuten bei 60°C inkubiert, mit 300 µl des Natriummetaarsenit-enthaltenden Selektionsreagenzes vermischt und für 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Mischungen wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und die Chemilumineszenz wurde nach Zugabe der Detektionsreagenzien I und II ausgelesen.

[0106] Die Ergebnisse in den Tabellen 4 und 5 bestätigten, dass Amplifikationsreaktionen, die ein Pseudoziel enthielten, auf vorteilhafte Weise Analyt-Amplikons in einheitlicheren Mengen und mit einer geringeren Variabilität innerhalb der Sammlung der Probenauslesungen herstellten. Die Tabellen zeigen, dass jede Reaktion unter Verwendung entweder von 0 oder 200 RNA-Äquivalenten des HIV-Virions (Stamm HIV IIIb) als Polynukleotidanalyt und einem von sieben Zuständen für das Pseudoziel gestartet wurde. Im ersten Zustand lag eine Negativkontrolle vor, in der die Reaktionen in Abwesenheit des Pseudoziels durchgeführt wurden. In den verbleibenden Zuständen wurden entweder das IAC-Ascr (Tabelle 4) oder das IAC-Bscr (Tabelle 5)-Pseudoziel in einer von drei Mengen verwendet. Die zusammengefassten Daten in beiden Tabellen stellen die Ergebnisse von 8 Wiederholungsversuchen dar, die für jede Input-Menge an Pseudoziel durchgeführt wurden. Hintergrundemissionswerte, die in Reaktionen erzeugt wurden, die das Pseudoziel einschlossen, ohne die Modell-Polynukleotidanalytmatrix einzuschließen, wurden abgezogen um die Nettoergebnisse zu erhalten. Wie erwartet, zeigten die Ergebnisse deutlich, dass die Menge des in den Reaktionen erzeugten Amplikons sich verringerte, wenn die Anzahl der Pseudoziel-Moleküle in der Reaktion zunahm. Alle Amplifikationsreaktionen, die ein Pseudoziel einschlossen, führten zur Herstellung von einheitlicheren Mengen des Analyt-Amplikons. Besonders die CV%-Werte waren im Vergleich zur Negativkontrolle, die in Abwesenheit eines Pseudoziels durchgeführt wurde, bei allen Datensätzen, die von Reaktionsansätzen stammten, die Pseudoziele enthielten, niedriger. Diese Ergebnisse unterstützen die Schlussfolgerung, dass die Präzision bei der Menge des Analyt-Amplikons, das in einer Amplifikationsreaktion hergestellt wird, durch das Einbeziehen eines Pseudoziels in den Reaktionsansatz verbessert werden kann. Die Tatsache, dass zwei unterschiedliche Pseudoziele vergleichbar gute Ergebnisse ergaben, zeigte, dass die verbesserte Präzision nicht von einer bestimmten Sequenz des Pseudoziels abhing. Diese Ergebnisse zeigten weiterhin, wie die Präzision bei der Menge des Analyt-Amplikons, das in einer Amplifikationsreaktion hergestellt wird, durch das Einschließen von Pseudozielen in Reaktionen, die Polynukleotidanalyten verwendeten, die durch einen festen Träger, wie zum Beispiel einem magnetischen Kügelchen, als Matrizen für die Amplifikationsreaktion eingefangen wurden, verbessert werden kann.

Tabelle 4

Unterschiedliche Pseudoziele verbessern die Präzision der Analyt-Amplikonherstellung

IAC-Ascr-Pseudoziel (Kopien)	HIV-Virion (Kopien)	net. Durchs. (RLU)	Amplikon (pmol)	Standardabweichung (SD)	Variabilitätskoeffizient (CV%)
keine	200	69858	0,95	57195	81,9
2×10^6	200	166824	0,03	62799	37,6
2×10^7	200	26733	0,0041	13616	50,9
2×10^8	200	3043	0,0005	585	19,2

Tabelle 5

Verbesserte Präzision der Analyt-Amplikonherstellung unter Verwendung von unterschiedlichen Pseudozielen

IAC-Bscr-Pseudoziel (Kopien)	HIV-Virion (Kopien)	net. Durchs. (RLU)	Amplikon (pmol)	Standardabweichung (SD)	Variabilitätskoeffizient (CV%)
keine	200	69858	0,95	57195	81,9
2×10^6	200	109125	0,0166	37519	34,4
2×10^7	200	14904	0,0023	10669	71,6
2×10^8	200	1492	0,0002	697	46,8

[0107] Ein noch weiterer Vorteil für das Durchführen von Amplifikationsreaktionen in Gegenwart eines Pseudoziels, betrifft das Vereinheitlichen der Menge des Amplikons, das hergestellt wird, wenn der Input-Polynukleotidanalyt aus einer biologischen Probe mit weniger als einer quantitativen Ausbeute gewonnen wird. Die Grundlage für diesen Vorteil, der in [Fig. 5](#) dargestellt ist, ist weiter oben angesprochen worden. Das folgende Beispiel wurde verwendet, um Situationen zu entwerfen, in denen die Gewinnung der Polynukleotidanalyten aus einer biologischen Probe sich wesentlich unterscheidet. Die untersuchten Zustände reichten besonders von gleichbedeutend mit 100 bis 25% Gewinnung. Solche Unterschiede in der Wirksamkeit der Polynukleotidanalytgewinnung konnten aufgrund von Gründen auftreten, die die variable Gewinnung aus Phenolextraktionsmethoden, Ethanolpräzipitationsmethoden, schwierigen Einzelprobensammlungen oder Extraktionszuständen oder auch ein Verschütten im Labor, das zum Probenverlust führt, einschließen. In jedem Fall wäre die Menge des gewonnen Polynukleotidanalyten weniger als eine quantitative Gewinnung.

[0108] Wie weiter unten beschrieben, wurde die variable Wirksamkeit der Polynukleotidanalytgewinnung bei der Durchführung von Amplifikationsreaktionen in drei unterschiedlichen Zuständen modelliert. Im ersten Zustand wurden die Reaktionen mittels dreier unterschiedlicher Input-Mengen des Polynukleotidanalyten ohne Pseudoziel durchgeführt. Im zweiten Zustand wurden Reaktionen eingeschlossen, die mittels der gleichen drei unterschiedlichen Input-Mengen an Polynukleotidanalyten und einer konstanten Menge des Pseudoziels durchgeführt wurden. Zuletzt wurden beim dritten Reaktionszustand die gleichen drei unterschiedlichen Input-Mengen an Polynukleotidanalyten verwendet, wobei das Mengenverhältnis des Polynukleotidanalyten und des Pseudoziels konstant waren. Es wird deutlich werden, dass diese dritte Bedingung einen Fall darstellt, der sich ergeben würde, wenn das Pseudoziel zu einer biologischen Probe zugegeben wird, die den Polynukleotidanalyten jeweils vor der Isolation von Nukleinsäuren aus der Probe enthält. Unter diesen Umständen würde der Verlust eines Teils der Probe während der Verarbeitungsschritte zu identischen prozentualen Verlusten sowohl des Polynukleotidanalyten als auch des Pseudoziels führen, dennoch würde das Verhältnis der zwei Spezies unverändert bleiben. Wie anhand der noch folgenden Ergebnisse deutlich werden wird, führten Amplifikationsreaktionen, die ein konstantes Verhältnis des Pseudoziels und des Polynukleotidanalyten einschlossen,

zu einer verbesserten Synthese der Analyt-Amplikons. Daher verhielten sich auch Reaktionsansätze mit einer begrenzten Anzahl an Input-Polynukleotidanalyten so, als ob die Anfangsanzahl an Matrizen größer gewesen wäre.

[0109] Die Ergebnisse, die in den folgenden Beispiel erhalten wurden, stellten die Grundlage für das verbesserte Verfahren der biologischen Einzelprobenverarbeitung bereit, dass die Zugabe der Pseudoziele zur Einzelprobe vor der Isolation der Nukleinsäuren einschließt. Ein Verfahren zum Vereinheitlichen der Mengen des Analyt-Amplikons, dass in einer Amplifikationsreaktion erzeugt wird, schließt als erstes die Zugabe des Pseudoziels zu einer biologischen Einzelprobe, dann das Isolieren der Polynukleotide aus der Einzelprobe und danach die Verwendung der Polynukleotide, die auf diese Weise isoliert worden sind, um die Amplifikationsreaktionen durchzuführen, ein.

[0110] Beispiel 5 beschreibt die Verfahren, die verwendet worden sind, um Amplifikationsreaktionen darzustellen, die unter Verwendung variabler Mengen des Polynukleotidanalyten initiiert wurden. Die Reaktionen wurden insbesondere so durchgeführt, dass die Mengen des Polynukleotidanalyten "100%", "50%" und "25%" -Werte darstellen.

Beispiel 5

Vereinheitlichen der Amplikonsynthese in Amplifikationsreaktionen, die mit variablen Mengen des Polynukleotidanalyten geprimert wurden

[0111] Amplifikationsreaktionen wurden gemäß dem Verfahren des Beispiels 1 mit den folgenden Änderungen vorbereitet. Als erstes wurden zehn Wiederholungsreaktionen anstelle von acht Wiederholungen für jeden Zustand vorbereitet. Als zweites wurden die Primermengen, die in den Reaktionen verwendet wurden, auf jeweils 5 pmol anstelle von 10 pmol verringert. Als drittes wurden 20% Polyvinylpyrrolidon durch 10% Trehalose ersetzt. Als viertes waren die Mengen des Polynukleotidanalyten und des Pseudoziels die in Tabelle 6 dargestellten. Als erstes wurden in unseren Methoden die in dieser Tabelle angegebenen Polynukleotidmischungen zusammengegeben, dann mit anderen Reagenzien in der Reaktionsmischung vermischt und am Ende mit den zwei Polymeraseenzymen vermischt, um die TMA-Reaktion zu initiieren.

Tabelle 6

Mischungen des Polynukleotidanalyten und des Pseudoziels

Zustand	BH10-RNA (Kopien)	IAC-Ascr (Kopien)
kein Pseudoziel	500	0
	1000	0
	2000	0
Pseudoziel konstant	500	6×10^6
	1000	6×10^6
	2000	6×10^6
Verhältnis aus Pseudoziel und Polynukleotidanalyt konstant	500	$1,5 \times 10^6$
	1000	$3,0 \times 10^6$
	2000	$6,0 \times 10^6$

[0112] Nach Abschluss der Amplifikationsreaktionen wurden alle Reaktionsmischungen gemäß dem weiter oben in Beispiel 4 beschriebenen APH-Protokoll sondiert, um die Analyt-Amplikons zu detektieren und quantifizieren. Die AE-markierte HIV(+)-4134b-Sonde mit der Sequenz CCACAATTTTAAAAGAAAAGGG (SEQ ID NO: 8) mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten wurde in dieser Methode verwendet, so dass die Amplifikationsreaktionen, die unter Verwendung verschiedener Mengen des Pseudoziels durchgeführt wurden, Lichtemissionsauslesungen ergeben würden, die innerhalb eines Linearitätsbereiches des Luminometers fallen.

Diese unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten wurden wiederum durch Vermischen unterschiedlicher Mengen der markierten und unmarkierten Sonden erreicht. Sonden die verwendet wurden, um das Analyt-Amplikon zu delektieren und zu quantifizieren lagen wie folgt vor: Reaktionsansätze, die das Pseudoziel nicht erhielten, wurden mit 1,3 pmol der markierten Sonde und 400 pmol der unmarkierten Sonde sondiert; Reaktionsansätze, die $1,5 \times 10^6$, 3×10^6 oder 6×10^6 Kopien des Pseudoziels enthielten wurden mit 1,3 pmol der markierten und 8,7 pmol der unmarkierten Sonde sondiert.

[0113] Die in den Tabellen 7–9 und in [Fig. 6](#) dargestellten quantitativen Ergebnisse zeigen deutlich, dass Reaktionsansätze, in denen das Verhältnis des Pseudoziels zum Polynukleotidanalyten konstant gehalten wurde, im Wesentlichen geringere Unterschiede bei der Menge des Analyt-Amplikons, das ausgehend von variablen Input-Mengen des Polynukleotidanalyten synthetisiert wurde, ergaben. Alle Ergebnisse basierten auf zehn Wiederholungsversuchen, die für alle Input-Mengen der Polynukleotidanalytmatrix durchgeführt wurden. In [Fig. 6](#) wurden 100% der Input-Polynukleotidanalyten durch 2000 Kopien an BH10-RNA dargestellt. In Abwesenheit des Pseudoziels fällt die Steigung der Geraden, welche die Menge des Analyt-Amplikons darstellt, das bei fallenden Mengen des Input-Polynukleotidanalyten hergestellt wurde, scharf ab, da die Anzahl dieser Matrix von 2000 auf 500 abfiel. Ein ähnliches Ergebnis wurde in den Versuchen erhalten, die eine konstante Menge des Pseudoziels enthielten. Daher hatten Methoden, die lediglich das Zugabe des Pseudoziels zu einer Probe einschlossen, die eine geringe Menge der Input-Polynukleotidanalyten aufwies, im Wesentlichen keine Wirkung auf die Zunahme der Menge des Analyt-Amplikons, das synthetisiert wurde. Jedoch ergaben die Amplifikationsreaktionen, die unter Verwendung eines konstanten molaren Verhältnisses von Pseudoziel zu Polynukleotidanalyten durchgeführt wurden, geringere Unterschiede in den Mengen des Analyt-Amplikons, das aus variablen Mengen des Input-Polynukleotidanalyten synthetisiert wurde. Zum Beispiel besagen die in der Figur gezeigten Ergebnisse, dass bei 500 Kopien an Input-BH10-RNA die Ausbeute der Analyt-Amplikons (gemessen in RLU) bei etwa 68% des Wertes lag, der bei Verwendung von 2000 Kopien der Matrix erhalten wurde, während die entsprechenden Ergebnisse, die in Abwesenheit des Pseudoziels erhalten wurden oder wenn das Pseudoziel konstant gehalten wurde, nur bei etwa 22% lagen. Das Durchführen von Amplifikationsreaktionen unter Verwendung eines konstanten Verhältnisses von Pseudoziel und Polynukleotidanalyt neigte dazu, die Menge des Analyt-Amplikons, das in der Amplifikationsreaktion synthetisiert wurde, zu vereinheitlichen. Auch kann das Verhältnis ein wenig variiert werden, abhängig von der Input-Menge und der gewünschten Genauigkeit bei der Quantifizierung. Signifikante, im Wesentlichen ähnliche Ergebnisse erhielt man, wenn die Reaktionen in Gegenwart von Magnetkugeln und einem Reagenz zum Einfangen, wie in Beispiel 3 und 4 beschrieben, durchgeführt wurde. Darüber hinaus zeigen die in den Tabellen 7–9 dargestellten Daten, dass die Präzision der Amplifikationsreaktionen durch Aufnehmen eines Pseudoziels in die Amplifikationsreaktion verbessert wurde.

Tabelle 7

TMA-Reaktionen, die in Abwesenheit des Pseudoziels durchgeführt wurden

BH10-RNA (Kopien)	net. Durchs. (RLU)	% von 2000	Standard- abweichung (SD)	Variabilitäts- koeffizient (CV%)
keine	0	0	k.A.	k.A.
500	35279	22,4	10033	28,4
1000	70202	44,7	36070	51,4
2000	157176	100	26792	17,0

Tabelle 8

TMA-Reaktionen mit konstanten Pseudozielmengen

BH10-RNA (Kopien)	net. Durchs. (RLU)	% von 2000	Standard- abweichung (SD)	Variabilitäts- koeffizient (CV%)
keine	0	0	k.A.	k.A.
500	96434	22,2	23442	24,3
1000	224493	51,6	49903	22,2
2000	434899	100	30382	7,0

Tabelle 9

TMA-Reaktionen mit einem konstanten Verhältnis des Polynukleotidanalyten und Pseudoziels

BH10-RNA (Kopien)	net. Durchs. (RLU)	% von 2000	Standard- abweichung (SD)	Variabilitäts- koeffizient (CV%)
keine	0	0	k.A.	k.A.
500	294660	67,8	43197	14,7
1000	340594	78,3	72128	21,2
2000	434899	100	30382	7,0

[0114] Das folgende Beispiel beschreibt Experimente, die ausgeführt wurden, um zu zeigen, wie das Einbauen eines Pseudoziels in eine Amplifikationsreaktion verwendet werden kann, um die Menge des in der Reaktion erzeugten Amplikons zu kontrollieren. Das Verringern der Menge des in einer Reaktion erzeugten Amplikons, wie oben gezeigt: (1) verringert die Wahrscheinlichkeit einer positiven Übertragungs-Kontamination; (2) ermöglicht die wirksamere Verwendung der markierten Sonden; und (3) kann verwendet werden, um die Signalstärke zu "tunen", damit sie in den linearen Bereich der Detektionsvorrichtung, wie zum Beispiel einem Luminometer, fällt, auf vorteilhafte Weise. In Bezug auf diesen zweiten Punkt wird es möglich, mit einer verringerten Anzahl an Produktamplikons, die in einer Reaktion erzeugt wurden, Sonden mit einer sehr hohen spezifischen Aktivität in Mengen zu verwenden, die ausreichend sind, um einen Sondenüberschuss bereitzustellen. Der Fachmann wird erkennen, dass sich die spezifische Aktivität einer Hybridisationssonde auf die Menge an detektierbaren Marker pro Sondenmolekül bezieht. Hochspezifische, aktive Sonden sind gut zur Detektion exakter Mengen an komplementären Polynukleotiden verwendbar. Wenn jedoch die Sonde in ihrer Herstellung teuer ist oder mit einem radioaktiven Marker markiert ist, der eine spezielle Handhabung und Vorsichtsmaßnahmen für die Entsorgung erforderlich macht, mag es unerwünscht sein, hochspezifische, aktive Sonden in größeren Mengen, die erforderlich wären, um quantitative Hybridisationen im Zustand des Sondenüberschusses durchzuführen, zu verwenden. Daher kann das Verringern der Menge des in einer Amplifikationsreaktion hergestellten Analyt-Amplikons auf vorteilhafte Weise die wirksame Verwendung von Sonden, die zum Detektieren der Amplikons verwendet werden, erleichtern.

[0115] Beispiel 6 beschreibt Verfahren, die verwendet wurden, um zu zeigen, wie Pseudoziele verwendet werden können, um die Menge des in einer Amplifikationsreaktion hergestellten Analyt-Amplikons zu kontrollieren.

Verwenden von Pseudozielen zum Kontrollieren der Herstellung von Analyt-Amplikons

[0116] 100 µl des Reagenzes zu Einfangen des Ziels (17% Lithiumlaurylsulfat; 190 mM Bernsteinsäure; 250 mM Lithiumhydroxid; 3 mM EDTA; 3 mM EGTA; 3,5 nM der 2'Methoxy(-)3837 A30-Sonde zum Einfangen (SEQ ID NO: 6) und 3,5 nM der 2'Methoxy(-)4258 A30-Sonde zum Einfangen (SEQ ID NO: 7) wurden mit 100 µl des HIV-Virions, das in HIV serologisch negativem Plasma verdünnt wurde, zusammengegeben. Die Proben enthielten entweder keine HIV-RNA; 200; 2.000; 20.000; 200.000 oder 2.000.000 RNA Äquivalente/ml an Plasma. Die Mischungen wurden bei 60°C für 20 Minuten inkubiert, damit die Sonde zum Einfangen mit den pol-Gensequenzen, die in den Ziel-Polynukleotiden vorhanden sind, hybridisieren kann, und dann mit 20 µl einer Oligo(dT)-Kügelchensuspension (120 µg an Oligo(dT) Kügelchen/20 µl) zusammengegeben werden kann. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben über einen Zeitraum von 15 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Hybridisation des Oligo(dA)'s der Sonde zum Einfangen mit den auf den Kügelchen immobilisierten Oligo(dT)'s zu ermöglichen, wobei die pol-Gensequenz und die magnetischen Kügelchen miteinander verbunden werden. Die Kügelchen wurden mittels eines Gestells mit Magneten an den Seiten des Röhrchens gesammelt und der Überstand verworfen. Die Kügelchen wurden dreimal mit einem 1 ml Volumen an Waschreagenz (0,1% SDS; 10 mM HEPES (pH 7,5); 150 mM NaCl) gewaschen. 50 µl Aliquots des Einzelprobenpuffers (10 mM HEPES; 1 mM EDTA) wurden zu den Röhrchen zugegeben, die kein Pseudoziel erhielten. 50 µl des im Einzelprobenpuffer verdünnten Pseudoziels wurden zu Röhrchen zugegeben, die das Pseudoziel erhalten haben. Nach dem Mischen erhielt jede Probe ein 25 µl Aliquot des Amplifikationsreagenzes, das enthält: 5 pmol eines T7A(-)4190-Primers; 5 pmol des(+)4108-Primers; 160 mM Tris-Puffer (pH 7,5); jeweils 16 mM ATP, CTP, GTP und UTP; jeweils 4 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP; 100 mM MgCl₂, 70 mM KCl; 20% Glycerol; 0,6 mM Zinkacetat und 10% Trehalose. Die Proben wurden mit 200 µl Mineralöl überschichtet und dann für 10 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Amplifikationsreaktionen wurden durch Zugabe von 25 µl Aliquots des Enzymreagenzes, das 2000 GP-Einheiten der MMLV reversen Transkriptase; 2000 GP-Einheiten der T7-RNA-Polymerase; 140 mM Tris-Puffer (pH 8,0); 100 mM N-Acetyl-Cystein als reduzierendes Agens; 20% Glycerol; 70 mM KCl; 80 mM Trehalose; 8 mM HEPES; 1,04 mM EDTA; 10% TRITON X-102 und 0,01% Phenolrot enthält, initiiert. Alle Reaktanden wurden vermischt und man liess sie für 1 Stunde bei 42°C inkubieren.

[0117] Am Ende des Reaktionszeitraums wurden die Analyt-Amplikons mit der oben beschriebenen APH-Methode quantifiziert. Ein 100 µl Aliquot einer Lösung einer mit Acridinium markierten Sonde AE(+)4134b wurde zu jeder Probe zugegeben. Proben, die Reaktionsansätzen entsprachen, die das Pseudoziel enthielten, erhielten 1,3 pmol der markierten Sonde und 38,7 pmol der unmarkierten Sonde, während Proben, die Reaktionsansätzen entsprachen, die das Pseudoziel nicht enthielten, 1,3 pmol der markierten Sonde und 400 pmol der unmarkierten Sonde erhielten. Die Mischungen wurden für 15 Minuten bei 60°C inkubiert, und dann zusammengegeben und mit 300 µl des APH-Selektionsreagenzes, das Natriummetaarsenid enthält, vermischt. Die Reaktionsmischungen wurden für 20 Minuten bei 60°C inkubiert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Chemilumineszenz wurde nach Zugabe der Detektionsreagenzien I und II ausgelesen.

[0118] Es wurden besonders vorausgehende Experimente durchgeführt, in denen Routine APH-Methoden mit einer Auswahl von spezifischen Aktivitäten durchgeführt wurden, um Bedingungen zu bestimmen, die Ergebnisse ergeben würden, die innerhalb des linearen Detektionsbereiches des in unseren Experimenten verwendeten Luminometers fallen. Der Fachmann wird erkennen, dass viele Sorten von Detektionsvorrichtungen, ob nun ein Luminometer oder ein Röntgenfilm, einen Bereich aufweisen, innerhalb dessen die Intensität eines Signals und die Menge des Materials, dass das Signal erzeugte, in linearer oder exponentieller Beziehung zueinander stehen. Oberhalb dieses Bereiches gilt diese Übereinstimmung nicht. Demnach ist das Bestimmen dieser linearen Bereiche für den Fachmann eine Sache von Routineversuchen.

[0119] Die Sondenmischungen, die zum Detektieren der Analyt-Amplikons in unseren Methoden verwendet wurden, sahen wie folgt aus: 401,3 pmol der Sonde, die aus 1,3 pmol der markierten Sonde und 400 pmol der unmarkierten Sonde bestand, für die Reaktion, die in Abwesenheit eines Pseudoziels durchgeführt wird; und 40 pmol der Sonde, die aus 1,3 pmol der markierten Sonde und 38,7 pmol der unmarkierten Sonde bestand, für die Reaktion, die das Pseudoziel enthält. Um die Ergebnisse des Assays zu vereinheitlichen, wurden die Lichtintensitätsmessdaten (gemessen in RLU's) durch Multiplizieren der durchschnittlichen Netto RLU-Werte mit einem Konversionsfaktor in pmol an Amplikon im Hybridisierungsschritt konvertiert. Dieser Umwandlungsfaktor wurde durch Hybridisieren, in parallelen Reaktionen, bekannter Mengen des Ziel-Polynukleotids und Überschussmengen der markierten Sonde und anschließend Bestimmen der Lichtausbeute, die durch die bekannte Menge des Ziels erzeugt wurde, ermittelt. Dies ermöglichte die Korrelation der Lichtausbeute mit der Menge des mit der Sonde hybridisierten Amplikons.

[0120] Die in den Tabellen 10 und 11 und in [Fig. 7](#) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Gegenwart eines Pseudoziels in einer Amplifikationsreaktion nicht die Korrelation zwischen der Menge des Input-Polynukleotid-analyten und der Menge des Analyt-Amplikons, das in den Amplifikationsreaktionen erzeugt wurde, beeinträchtigt. Alle Ergebnisse basierten auf fünf Wiederholungsversuchen, die für alle Mengen an Input-HIV-II-Ib-RNA, die in der Methode verwendet wurden, durchgeführt wurden. Die in [Fig. 7](#) gezeigte logarithmische Darstellung zeigt deutlich eine starke Beziehung zwischen der Menge des HIV-II-Ib-RNA-Äquivalenten-Inputs in eine Reaktion und der Menge des erzeugten Analyt-Amplikons. Diese gleiche, starke, lineare Beziehung herrscht deutlich vor, wenn die Amplifikationsreaktionen zusätzlich das Pseudoziel enthielten. Die Abwärtsverlagerung, die für die Gerade beobachtet wurde, welche die Analyt-Amplikons darstellt, die in Reaktionsansätzen, die Pseudoziele enthielten, hergestellt wurden, zeigen, dass weniger Moleküle erzeugt wurden, als im Vergleich zu Reaktionsansätzen, die keine Pseudoziele enthielten. Zum Beispiel zeigen die in Tabelle 10 gezeigten Ergebnisse, dass etwa 520 pmol des Analyt-Amplikons im Reaktionsansatz hergestellt wurden, der 200.000 HIV-RNA-Äquivalente enthielt und dass diese Zahl um etwa das Zehnfache reduziert wurde, wenn das Pseudoziel in der Reaktion enthalten war. Daher wurde die Anzahl der Analyt-Amplikons, die in der Amplifikationsreaktion hergestellt wurden, durch das Einbringen eines Pseudoziels in die Reaktion verringert.

Tabelle 10

Kontrollieren der Analyt-Amplikonherstellung mittels Pseudozielen

HIV IIIb-RNA Äquivalente/ Reaktionsansatz	keine Pseudoziele		
	Durchs. net. (RLU)	Amplikon (pmol)	Standard- abweichung (SD)
keine	0	0	k.A.
20	47878	2,5	55529
200	137756	7,2	143360
2.000	794621	41,7	174616
20.000	4762815	250	609171
200.000	9908427	520	639895

Tabelle 11

Kontrollieren der Analyt-Amplikonherstellung mittels Pseudozielen

HIV IIIb-RNA Äquivalente/ Reaktionsansatz	2x10 ⁶ Pseudozielmoleküle (IAC-Ascr)		
	Durchs. net. (RLU)	Amplikon (pmol)	Standard- abweichung (SD)
keine	0	0	k.A.
20	1623	0,01	2224
200	10473	0,067	8000
2.000	84435	0,54	8449
20.000	802975	5,1	189079
200.000	8083585	51,5	1567615

[0121] Obwohl die vorhergehende Beschreibung sich auf quantitative Assays bezieht, beziehen sich andere verwendbare Methoden, die Pseudoziele in Amplifikationsreaktionen verwenden, auf qualitative Assays, die Informationen über die Anwesenheit oder Abwesenheit eines Polynukleotidanalyten in einer Testprobe geben. Qualitative Tests können ebenso dafür verwendet werden, um anzuzeigen, ob ein Polynukleotidanalyt in einer Testprobe in einer Menge vorhanden ist, die in einen bestimmten Bereich fällt, oder ob er es nicht ist. Diese Assays könnten zum Beispiel verwendet werden, um die Reaktion eines Patienten auf die Arzneimitteltherapie zu überwachen. Zum Beispiel kann ein Patient, der mit einem hämatogenen Virus infiziert ist, nach der therapeutischen Arzneimittelbehandlung eine Veränderung im Plasmatiter erfahren. Ein Arzt kann beobachten, ob der Virustiter des Patienten sich in Bezug auf einen bestimmten Grenzwert bei Verwendung eines qualitativen Assays, das eine Pseudoziel-Amplifikation einschließt, erhöht oder erniedrigt. Es soll deutlich werden, dass ein qualitatives Testformat nur die Detektion eines Signals einschließt und deshalb nicht notwendigerweise eine quantitative Messung des Signals, oder Herstellung oder Verwendung einer Standardkurve durch den Endverbraucher eines diagnostischen Assays erfordern würde.

[0122] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung werden qualitative Assays durchgeführt, um zu zeigen, ob eine biologische Probe einen Polynukleotidanalyten enthält. In anderen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung können Assays nur qualitative Ergebnisse (d.h., ein Ergebnis ist entweder positiv oder negativ) erzeugen, können jedoch semiquantitative Informationen über einen Polynukleotidanalyten in einer Probe bereitstellen.

[0123] Qualitative Assays, die Polynukleotidanalyten und Pseudoziele co-amplifizieren, sind besonders vielseitig, wenn sie mit Detektionsprotokollen, die festgelegte Detektionsgrenzwerte aufweisen, kombiniert werden. Diese Grenzwerte können durch Anpassen der spezifischen Aktivität einer Hybridisationssonde oder durch Kalibrieren der Detektionsvorrichtung verändert werden, um ein negatives Ergebnis unter einem bestimmten numerischen Wert oder ein positives Ergebnis über einem bestimmten Wert zu spezifizieren. Zum Beispiel kann ein Luminometer so eingestellt werden, um ein positives Ergebnis für RLU-Werte anzuzeigen, die größer sind als ein bestimmtes Grenzwertniveau. Alternativ dazu kann die Menge des Pseudoziels, das in der Amplifikationsreaktion enthalten ist, erhöht oder erniedrigt werden, so dass bestimmte Mengen des Analyt-Amplikons detektierbare Signale erzeugen, die entweder über oder dem Detektionsgrenze für eine bestimmte Vorrichtung liegen. Daher kann die Menge des Input-Pseudoziels in einer Amplifikationsreaktion für ein diagnostisches Assay angepasst oder durch Routineversuch "getunt" werden, so dass ein Detektionssignal das innerhalb eines gewünschten Bereiches fällt, erzeugt wird.

[0124] Wenn ein Polynukleotidanalyt und ein Pseudoziel gemäß den oben beschriebenen Methoden co-amplifiziert werden, wird die Menge des in der Reaktion synthetisierten Analyt-Amplikons naturgemäß zur Menge eines Polynukleotidanalyten, der Eingang in die Reaktion fand, in Beziehung gesetzt werden. Da die Größenordnung eines Hybridisationssignals durch eine der oben beschriebenen Methoden getunt werden kann, da die Amplifikationsreaktionen, die Pseudoziele enthalten, auf vorteilhafte Weise durch erhöhte Präzision charakterisiert sind, und da es möglich ist, eine diagnostische Reaktion zu tunen, so dass eine bestimmte Menge des Input-Polynukleotidanalyten ein Hybridisierungssignal erzeugt, das über oder unter einem Detektionsgrenzwert für eine Testvorrichtung liegt, ist es möglich, qualitative Assays zu erzeugen, die auch quantitative Informationen bereitstellen.

[0125] Das folgende Beispiel verdeutlicht, wie semiquantitative Informationen über die Menge eines Polynukleotidanalyten in einer Testprobe mit einem qualitativen Assay, das nur positive oder negative Ergebnisse bereitstellt, erhalten werden können. Für darstellerische Zwecke dient das HIV-Polynukleotid als Polynukleotidanalyt und der initiierte Titerbereich basiert auf Ergebnissen, die in den vorherigen Beispielen präsentiert worden sind. Natürlich können andere Polynukleotidanalyte und unterschiedliche Grenzwertbereiche ebenfalls in diesem qualitativen Testformat verwendet werden. Ebenso kann die Detektion durch Luminometrie, durch Fluoreszenz oder andere optische oder elektrochemische Detektionsverfahren ersetzt werden. Das Pseudoziel kann mit einer biologischen Probe und danach isolierten Nukleinsäuren zusammengegeben werden oder einfach mit vorher isolierten Polynukleotidanalyten vor dem Co-Amplifizierungsschritt zusammengebracht werden. In diesem Beispiel beinhaltet das Detektionssystem eine Detektionsvorrichtung (Luminometer) und eine markierte Hybridisationssonde, die durch die Detektionsvorrichtung detektiert werden kann. Basierend auf der vorhergehenden Beschreibung sollte deutlich geworden sein, dass die spezifische Aktivität der markierten Sonde und die Menge des Pseudoziels, die im Co-Amplifizierungsschritt enthalten ist, beides Variablen sind, die verändert werden können, um den Grenzwert der Detektion im Detektionssystem zu kontrollieren.

[0126] Beispiel 7 beschreibt wie Amplifikationsreaktionen, die Pseudoziele enthalten, in einem qualitativen Assayformat verwendet werden können, um semiquantitative Informationen über Mengen eines Polynukleotidanalyten vor der Amplifikation zu erhalten.

Beispiel 7

Qualitative Assayformate

[0127] Ein Arzt, der einen Patienten behandelt, der mit HIV infiziert ist, wünscht die Wirksamkeit eines Arzneimittelbehandlungsprotokolls zu beobachten. Der Arzt wünscht besonders zu wissen, wann der Plasmatiser des Patienten von einer hohen Anfangsmenge auf eine niedrigere Menge, die unter etwa 200 RNA-Äquivalenten in 100 µl Plasma entspricht, absinkt.

[0128] Erste und zweite Plasmaproben werden von dem Patienten zu Zeitpunkten vor und nach der beginnenden Arzneimitteltherapie erhalten. Die Proben werden vorbereitet und für Amplifikationsreaktion verwendet, wie sie im Wesentlichen in Beispiel 6 beschrieben werden. Einzelne 100 µl Aliquots der Plasmaproben werden mit 100 µl Aliquots des Reagenzes zum Einfangen des Zieles vermischt und die Mixturen dann inkubiert, mit Oligo(dT)-Kügelchensuspensionen zusammengegeben, wiederum vermischt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Kügelchen werden gesammelt, gewaschen und dann mit 50 µl Aliquots, die 2×10^6 Kopien des in Einzelprobenpuffer verdünnten Pseudoziels enthalten, zusammengegeben. Nach dem Mischen erhält jede Probe ein 25 µl Aliquot des Amplifikationsreagenzes, das Primer und Nukleotidreaktanden enthält. Die Proben werden mit 200 µl Mineralöl überschichtet und dann für 10 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Amplifikationsreaktionen werden durch Zugabe von 25 µl Aliquots des Enzymreagenzes, das 2000 GP-Einheiten der MMLV reversen Transkriptase und 2000 GP-Einheiten der T7 RNA-Polymerase in einer gepufferten Lösung enthält, initiiert. Alle Reaktanden werden vermischt und man lässt sie für 1 Stunde bei 42°C inkubieren. Amplifizierte Proben werden dann einer APH-Detektmethode unterzogen. Eine Lösung der mit Acridinium markierten Sonde AE(+)-4134b wird zu jeder Probe zugegeben. Jede Probe erhält 1,3 pmol der markierten Sonde und 38,7 pmol der unmarkierten Sonde, wobei alle Sonden für authentische HIV-Amplikons jedoch nicht Pseudoziel-Amplikons spezifisch sind. Diese Sondenmengen stellen absättigende Hybridisationsmengen dar, so dass Analyt-Amplikons quantitativ detektiert werden. Die Mischungen werden für 15 Minuten bei 60°C inkubiert und dann zusammengegeben und mit 300 µl des APH-Selektionsreagenzes, das Natriummetaarsenid enthält, vermischt. Die Reaktionsmischungen werden für 20 Minuten bei 60°C inkubiert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Chemilumineszenz wird nach Zugabe der Detektionsreagenzien I und II mittels eines Lumino-meters, das so programmiert wurde, um ein positives Ergebnis für RLU-Werte von 10.000 und größer und ein negatives Ergebnis für RLU-Werte von weniger als 10.000 anzuzeigen, ausgelesen. Plasmaproben von vor der Behandlung ergaben ein positives Ergebnis, wobei eine Menge von mindestens 200 RNA-Äquivalenten angezeigt wurde. Umgekehrt ergaben Plasmaproben von nach der Behandlung ein negatives Ergebnis, wobei eine Menge von weniger als 200 RNA-Äquivalenten in der 100 µl-Probe angezeigt wurde. Der Arzt schließt daraus, dass die Arzneimittelbehandlung bei der Verringerung der viralen Ladung wirksam ist.

[0129] Diese Erfindung ist in Bezug auf eine Anzahl von spezifischen Beispielen und Ausführungsformen davon beschrieben worden. Selbstverständlich wird eine Anzahl von unterschiedlichen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dem Fachmann nach der Bewertung der vorhergehenden detaillierten Beschreibung nahe gelegt.

[0130] Deshalb soll der wahre Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung unter Berücksichtigung der angehängten Ansprüche bestimmt werden.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> GEN-PROBE INCORPORATED

<120> POLYNUKLEOTID AMPLIFIKATIONSVERFAHREN

<130> GP104-PCT

<160> 9

<170> FastSEQ für Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 55

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer T7A(-)4190

<400> 1

aatttaataac gactcactat agggagaggtt tgtatgtctg ttgctattat gtcca

55

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer (+)4108

<400> 2

acagcagtag aaatggcag

19

<210> 3

<211> 8933

<212> RNA

<213> Humaner Immunodefizienz Virus

<220>

<221> Quelle

<222> (1)...(8933)

<223> Sequenz der durch das BH10 Plasmid hergestellten
Transkripte

<400> 3

gagcucucuc	gacgcaggac	ucggcuugcu	gaagcgcgca	cggcaagagg	cgaggggagg	60
cgacugguga	guacgccaaa	aauuuugacu	agcggaggcu	agaaggagag	agaugggugc	120
gagagcgua	guauuaagcg	ggggagaaau	agaucgaugg	gaaaaaauuc	gguaaaggcc	180
agggggaaag	aaaaaaauua	aauuaaaaa	uauaguaugg	gcaagcaggg	agcuagaacg	240
auucgcaguu	aauccuggcc	uguuagaaac	aucagaaggc	uguagacaaa	uacugggaca	300
gcuacaacca	ucccuucaga	caggauucaga	agaacuuaga	ucauuauua	auacaguagc	360
aaaccucua	ugugugcauc	aaaggauaga	gauaaaagac	accaagggaag	cuuagacaa	420
gauagaggaa	gagcaaaaca	aaaguaagaa	aaaagcacag	caagcagcag	cugacacagg	480
acacagcagu	caggucagcc	aaaauuaccc	uauagugcag	aacaucagg	ggcaaauggu	540
acaucaggcc	auaucaccua	gaacuuuaaa	ugcaugggua	aaaguaguag	aagagaaggc	600
uuucagccca	gaaguaauac	ccauguuuuc	agcauuauca	gaaggagcca	ccccacaaga	660
uuuaaacacc	augcuaaaca	cagugggggg	acaucaagca	gccaugcaaa	uguuaaaaaga	720
gaccaucaau	gaggaaagcug	cagaauugga	uagaguacau	ccagugcaug	cagggccuau	780
ugcaccaggc	cagaugagag	aaccaagggg	aagugacaua	gcaggaaacua	cuaguacccu	840
ucaggaacaa	auaggauugga	ugacaaaaua	uccaccuau	ccaguaggag	aaaauuaaa	900
aagauggaua	auccugggau	uaauuaaaau	aguaaagaug	uauagccua	ccagcauuc	960
ggacauaaga	caaggaccaa	aagaaccuuu	uagagacuau	guagaccggu	ucuauaaaac	1020
ucuaagagcc	gagcaagcuu	cacaggaggu	aaaaaaauug	augacagaaa	ccuuguuggu	1080
ccaaaauagc	aaccagauu	guaagacuau	uuuaaaagca	uugggaccag	cggcuacacu	1140

agaagaaau	augacagcau	gucaggagau	aggaggagccc	ggccauaagg	caagaguuuu	1200
ggcugaagca	augagccaag	uaacaaauac	agcuaccuau	augaugcaga	gaggcaauuu	1260
uaggaaacca	agaagauagg	uuuaguuuu	caauuguggc	aaagaaagggc	acacagccag	1320
aaauugcagg	gccccuagg	aaaaggggcug	uuggaaauugu	ggaaagggaag	gacaccaau	1380
gaaagauugu	acugagagac	aggcuauuuu	uuuagggaag	aucuggccuu	ccuacaagg	1440
aaggccagg	aaauuuucuc	aggagcagacc	ggagccaaaca	gccccaccu	uuuuucagag	1500
cagaccagag	ccaacagccc	caccagaaaga	gagcuucagg	ucugggguag	agacaacaac	1560
ucccccucag	aagcaggagc	cgaugagacaa	ggaaucuguau	ccuuuaacuu	cccucagau	1620
acucuuuggc	aacgaccccu	cguacacaua	aaagauagggg	ggcaacuaaa	ggaagcuua	1680
uuagauacag	gagcagauga	uacaguuuaa	guuugccagg	guuugccagg	aagauaggaa	1740
ccaaaauga	uagggggauu	uggagguuuu	aucaaaagaa	gacagauaga	ucagauacuc	1800
auagaaauuc	guggacauaa	agcuauagggu	acaguuuag	uaggaccuac	accugucaac	1860
auaaauugga	gaaauucuguu	gacucagauu	gguugccauu	uaaaauuuuc	cauuagcccu	1920
auugagacug	aacagcuaaa	auuaaaagcca	ggaauggaag	gccccaaagu	uaaacaauug	1980
ccauugacag	aagaaaaauu	aaaagcauua	guagaaauuu	guacagaaau	ggaaaaaggaa	2040
gggaaaauuu	caaaaaauugg	gcccugagaa	ccauacaaua	cuccaguuuu	ugccauaaag	2100
aaaaaagaca	guacuuaauu	gagaaaaaua	guagauuuca	gagaacuuua	uaagagaacu	2160
caagacuuuc	ggcaguuuc	uuaaggaaua	ccacaucccg	caggguuaaa	aaagaaaaaa	2220
ucagaaacag	ucugggauugu	gggugaugca	uaauuuucag	uucccuuaga	ugaagacuuc	2280
aggaaguuua	cugcauuuac	cauaccuagu	uaaaacaauu	agacaccagg	gauuagauau	2340
caguacaauu	ugcuuccaca	gggugggaaa	ggauaccacc	caauuuucca	aaguagcaug	2400
acaaaaauuc	uagagccuuu	uuaaaacaa	aaucagagca	uaguuuauca	ucaauacauu	2460
gauuauuuu	auugaggauu	ugacuuaaga	auaggggcag	auagaaacaa	aaauagaggag	2520
cugagacaa	aucuguuug	guggggacuu	accacaccag	acaaaaaaca	ucagaaagaa	2580
ccuccauuuc	uuugggaggg	uuauagaacuc	cauccugaua	aauggacagu	acagccuuaa	2640
gugcugccag	aaaagagcag	cuggacuguc	aaugacauac	agaaguuagu	ggggaaaauug	2700
aaauugggcaa	gucagauuuu	cccagggaau	aaaguaaggc	aaauauguaa	acuccuuaga	2760
ggaaaccaag	cacuaacaga	aguuaaucca	cuacacagaag	aaagcagagcu	agaacuggca	2820
gaaacacag	agauucuuaa	agaaccagua	cauggagugu	auuaugaccc	aucaaaagac	2880
uuauuagcag	aaauacagaa	gcaggggcaa	ggccaaugga	cauaucaauu	uuaucaagag	2940
ccauuuuaaaa	auucgaaaac	aggaaaauuu	gcaagaauga	ggggugccca	cacuaauugu	3000
guaaaaacaa	uaacagaggg	agugcuaaaa	auaaccacag	aaagcauagu	aaauaggggg	3060
aagacuccua	aaauuaaacu	accuaacaa	aaaggaaacu	gggaaacauu	guggacagag	3120
uauuggcag	ccaccugguu	uccugagugg	gaguuuuguu	uaacccucc	uuuagugaaa	3180
uuauugguacc	aguuaagagaa	agaacccaua	guaggagcag	aaaccuuuca	uguagauugg	3240
gcagcuuaa	gggagacuaa	auuaggaaaa	gcaggauauu	uuacuaacaa	aggaaagcaa	3300
aaggguuucc	cccuuaacua	cacaacaaau	cagaaaacug	aguuacaagc	aauuuauca	3360
gcuuuugcag	auucaggauu	acagguuaac	auaguaacag	acucacaaua	ugcauuaggga	3420
aucauucaag	cacaaaccaga	uaaaagugaa	ucagaguuag	ucaaucaauu	aaugagagcag	3480
uuauuaaaaa	aggaaaagggu	cuauucuggca	uugguuaccag	cacacaaagg	aaauuggaggga	3540
aaugaacaag	uagauaaauu	agucagugcu	ggaaucaggga	aaauacuaau	uuuagauugga	3600
auagauaaagg	cccaagagaa	acauagagaa	uaucacagaa	auuggagagc	aauggcuagu	3660
gauuuuaacc	ugccaccuguu	aguagcaaaa	gaaauaguag	ccagcuugga	uaaaugucag	3720
cuaaaaaggag	aagccauugca	uggacaagaa	gacuguaugc	caggaaauug	gcaacuagau	3780
uguacacauu	uagaaggaaa	aguuauccug	guagcaguuu	auguaagccag	uggauauua	3840
gaagcagagag	uuauuccagc	caggaaacagg	caggaaacag	cauuuuuucu	uuuaaaauua	3900
gcagggaagau	ggccaguaaa	aaacauacau	acagacaaug	gcagcauuuu	caccagugcu	3960
acggguuaagg	ccgcuguvug	guggggcgga	aucaagcagg	aaauugggaa	ucccuacaau	4020
ccccaaaguc	aaggaguuagu	agaauucuaug	aaauaagaa	uaaagaaaau	uaauaggacag	4080
guaaagagau	aggcugazca	ucuuuaagaca	gcaguuacaa	uggcaguuuu	cauccacaau	4140
uuuaaaagaa	aaggggggggu	uggggggguac	agugcagggg	aaagaaauagu	agacauaaua	4200
gcaacagaca	uacaaacuaa	agaauuacaa	aaacaaauua	caaaaaauuca	aaauuuucgg	4260
guuuuuuaca	gggacagcag	aaauccacuu	uggaaaaggac	cagcaaaagcu	ccucuggaaa	4320
ggugaagggg	caguaguuuu	acaagauaa	agugacauaa	aaugaugucc	aagaagaaa	4380
gcaaaagauca	uuagggaauu	uggaaaacag	auggcagguu	augauuuguu	ggcaaguaga	4440
caggaaugagg	auuaagaaau	ggaaaguuuu	aguuaaaacac	cauauguauu	uuucagggaa	4500
agcuaggggg	ugguuuuuua	gacauucacua	ugaaaggcccu	cauccaaaggaa	uaaguuacaga	4560
aguacacau	ccacuagggg	augcuagauu	gguaauaaca	acauauuggg	gucugcauac	4620
aggagaaaga	gacuggcuuu	uggguccagg	agucuccaua	gaauaggagg	aaaagagaua	4680
uagcacacaa	guagaccuug	aaauagcaga	ccaaucgaa	caucuguaau	acuuugacug	4740
uuuuucagac	ucugcuauaa	gaaaggccuu	auuaggacac	auaguuaggcc	cuagguguga	4800
auaucaagca	ggacauaaca	agguaggauu	ucuaacauac	uuggcacuag	cagcauuuuu	4860
aaacacaaaa	aagauuaagc	caccuuugcc	uaguguuacg	aaacugacag	aggauagauu	4920
gaacaaagccc	cagaagagcca	agggccacag	agggagccac	acaauagaaug	gacacuaagag	4980
cuuuuagagg	agcuuaagaa	uagagcuugu	agacauuuuc	cuaggauuuu	gcuccauggc	5040
uuagggcaac	auaucuaua	aacuuuaggg	gauacuuggg	caggagugga	agccauaaua	5100

agaaauucugc	aacaaacugcu	guuuaucacau	uuucagaaau	ggguugucgac	auagcagaau	5160
agggcguaacu	cgacagagga	gagcaagaaa	ugggagccagu	agauccuaga	cuagagcccu	5220
ggaaagcauuc	aggaagucag	ccuaaaacug	cuuguaacca	uugcuauugu	aaaaaguguu	5280
gcuuucuuug	ccaauguuug	uucauaacaa	agcccuuagg	caucuccuau	ggcaggaaga	5340
agcggagaca	gcgacgaaga	ccuccucag	gcagucagac	ucaucaaguu	ucucuaucua	5400
agcaguaagu	agucacugua	augcaaccua	uacaaauagc	aauguaagca	uuaguaugua	5460
caauaauaau	agcaauaguu	guugugucca	uaguaaucau	agaauauagg	aaaaauuuua	5520
gacaaagaaa	aaugacaggg	uuauuugaua	gacuaauaga	aaagcagaaa	gacaguggca	5580
auagagugua	aggagaaaua	ucagcacuug	uggagauugg	gguggagau	gggacccaug	5640
cuccuugggg	ugugugaugu	ucgaaaguu	acagaaauuu	ugugggucac	agucuaauuu	5700
gggguaaccug	uguggaagga	agcaaacacc	acucuaauuu	gugcaucaga	ugcuaaagca	5760
uaugauacag	agguaacaua	uguuuugggc	acacauggcu	guguaaccac	agaccccaac	5820
ccacagagag	uaguuuuggu	aaauugugca	gaaauuuuu	acauugggaa	aaauagcaug	5880
guagaaacag	ugcaugagga	uaauaucagu	uuaugggaur	aaagccuaaa	gccauugua	5940
aaauuaaccc	cacucugugu	uaguuuaaag	ugcacugauu	ugaagaaua	uaauaauacc	6000
aaugauagua	gcccggagaa	gaaauugag	aaaggagaga	uaaaaaacug	cucuuucaa	6060
aucagacaaa	gcavaagagg	uaaggugcag	aaagaaauug	cauuuuuuua	uaaacaugau	6120
auaauaccaa	uagauaaua	uacuaaccag	uaauacguua	caauguuaa	caccucaguc	6180
auuacacagg	ccuguccaaa	gguaucuuuu	gagccaaauu	ccauacauua	uuugcccccg	6240
gcugguuuug	cgauucuaaa	auguaauaau	aagacguuca	auggaacagg	accuaguaa	6300
aaugucagca	caguaacaua	uacacauugg	auuaggccag	uaguaucac	uccacugcug	6360
uuaaauggca	gucuggcaga	agaagagguu	guauuuagau	cugccaaauu	cacagacaa	6420
gcuaaaacca	uaauaguaca	gcuagaacca	ucuguagaaa	uuauuugua	aagacccaac	6480
aaacaauaca	gaauaaguu	ccguauccag	agaggaccag	ggagagcauu	uguuacaaau	6540
ggaaaaauag	gaaauaugag	acaagcacau	uguuacauua	guagagcaaa	auggaauaac	6600
acuuuaaaac	agauagauag	caaaauaaga	gaacaaauug	gaaauaauaa	aaacaauaac	6660
uuuaagcagu	ccucaggagg	ggacccagaa	auuguaacgc	acaguuuuua	uuugggagg	6720
gaaauuuuuc	acuguaauuc	aaacaacacg	uuuaauagua	cuugguuuua	uagucuuug	6780
aguacuaaag	ggucaaauua	cacugaagga	agugacacaa	ucacccuccc	augcagaaua	6840
aaacaaauua	uaaacauug	gcaggaagua	ggaaaagcaa	uguaugcccc	ucccaucagu	6900
ggcaaaauua	gaguuucauc	aaauaauaca	ggcgucguau	uaacaagaga	uggugguuau	6960
agcaacaaua	aguccgagau	cucagaccu	ggagggagg	auaugaggga	caauuggaga	7020
agugaaauua	auaaauuaa	aguaauaaua	auugaaacca	uaggagugc	acccaccaag	7080
gcaaaagaaa	gaguguguca	gagagaaaaa	agagcagug	gaauaggagc	uuuguuuccu	7140
ggguuucuu	gagcagcagg	aaagcacuag	ggcgacgcgu	caauagcgu	gacgguaac	7200
gccagacaa	uaugugucgg	uaauugucag	cagcagaaca	auuugcugag	ggcuauugag	7260
ggcgaacagc	auucugucag	acucacaguc	uggggcauca	agcagcucca	ggcagaauac	7320
cuggcugug	aaagauaccu	aaaggaucac	cagcuccug	ggauuuuggg	uugcucugga	7380
aaacucuuuu	gcacccacug	ugugccuuug	aaugcuaguu	ggaguaauaa	aucucugga	7440
cagauuuug	auaaacauag	cuggauggg	ugggacagag	aaauuaacaa	uuacacagc	7500
uaauuaacac	ccuaauuuga	agaaucgca	aaccagcaag	aaaagaaua	acaagaauua	7560
uuagaaauag	auaaauuggg	aauguuugug	aaauuguuua	acauaacaau	uuugcugug	7620
uaauuaaaau	uaaucauaau	gauaguuagg	ggcuugguag	guuuuaagau	aguuuuugcu	7680
guacuuucug	uagugaaaua	aguuaggcag	ggauauucac	cauuuacguu	ucagaccac	7740
cucccaauuc	cgaggggacc	cgaagggccc	gaaggaaaua	aaagaagagg	uggagagaga	7800
gacagagaca	gauccauuug	auuagugaac	ggauccuuag	cacuuuucug	ggacgaucug	7860
cggagccug	gcuucucag	cuaaccaccg	uugagagacu	uacucuuugu	uguaacgagg	7920
auuguggaac	uucugggagc	caggggggug	gaagccucca	aaauuuggu	gaauuccua	7980
caguauugga	gucagggacu	aaagaaauag	gcuguuagcu	ugcucaauug	cacagcuua	8040
gcaguagcug	aggggacaga	uaggguuua	gauguaguc	aaaggagcuu	uagagcuauu	8100
cgccacauac	cuagaagaa	aaagacgggc	uuggaaagg	uuuugcuua	agauugggug	8160
caagugguca	aaagauagug	ugguuuggaug	gcccugcuua	agggaaagaa	ugagacgagc	8220
ugagccagca	gcagaugggg	ugggagcagc	aucucgagac	cuagaaaaac	auggagcaau	8280
cacaaguagc	aacacagcag	cuaacaaugc	ugauuuggcc	uggcuagaa	cacaagagga	8340
ggaggaggu	gguuuuuccag	ucacaccuca	gguaacuuua	agaccaaua	cuuacaaggc	8400
agcuguaag	cuaagccacu	uuuuuaaaga	aaagggggga	cuggaaagggc	uaauucacuc	8460
ccaaagaaag	caagauuucc	uuuauucug	gaucuuaccac	acacaaaggcu	acuuuccuga	8520
uuagcagaac	uacacaccag	ggccaggga	cagauuacca	cugaccuuug	gaugguugcu	8580
caagcuagva	ccaguuagagc	cagagaaguu	agaagaagcc	aaacaaaggag	agaaacaccag	8640
cuuuuuacac	ccugugagcc	ugcauggaau	ggauagcccg	gagagagaa	uguuagagug	8700
gagguuugac	agccgcucag	cauuucauca	caugggcccg	gagcugcauc	cgagugacu	8760
caaagaacug	ugacauccag	cugucuaaca	gggacuuucc	gcuugggacu	uuccagggag	8820
gcugggccug	ggcgggacug	gggaguggg	agccucacag	uccugcauu	aagcagcugc	8880
uuuuugccug	uacugggucu	cucugguuag	accagaucug	agccugggag	cuc	8933

<210> 4
 <211> 8933
 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> Sequenz des IAC-Ascr Pseudoziels:

<221> Mutation
 <222> (4135)...(4155)
 <223> Mutierte Positionen: 4135, 4140-1, 4145, 4150,
 4152-3, 4155

<400> 4

gagcucucuc	gacgcaggac	ucggcuugcu	gaagcgcgca	cggcaagagg	cgaggggagg	60
cgacuggguga	guacgccaaa	aauiuuugacu	agcggaggcu	agaaggagag	agauggguuc	120
gagagcguca	guauuaagcg	gggggagaau	agaucgaug	gaaaaauuc	gguaaggcc	180
aggggggaaag	aaaaaaauua	aauiuaaaaca	uauguaug	gcaagcagg	agcuagaacg	240
auucgcaguu	aaucugggcc	uguuagaaac	aucagaaggc	uguagacaaa	uacugggaca	300
gcuacaacca	uccuucaga	caggauacaga	agaacuuaga	ucauuauaa	uaacaguagc	360
aacccucua	ugugugcauc	aaaggauaga	gauaaaagac	accaaggag	cuuagacaa	420
gauagaggaa	gagcaaaaca	aaaguaagaa	aaaagcacag	caagcagcag	cugacacagg	480
acacagcagu	caggucagcc	aaaauuacc	uaugugcag	aacauccagg	ggcaaauggu	540
acaucaggcc	auaucaccua	gaacuuuaaa	ugcaugggua	aaaguaguag	aagagaaggc	600
uuucagccca	gaaguaauac	ccauuuuuuc	agcauuauca	gaaggagcca	ccccacaaga	660
uuuaaaacac	augcuuaaca	cagugggggg	acaucaagca	gccaugcaca	uguuuaaaga	720
gaccuacau	gaggaagcug	caacuauggg	uagaguacau	ccagugcaug	cagggccuau	780
ugcaccaggc	cagaugagag	aaccaggggg	aaguagacaua	gcagggaacua	cuaguaccu	840
ucagggaacaa	auaggauugga	ugacaaaaua	uccaccuau	ccaguaggag	aauiuuauaa	900
aagauggaua	auccugggau	uaauuaaaau	aguaagaau	uaugcccu	ccagcauuc	960
ggacauaaga	caaggaccua	aagaaccuuu	uagagacuau	guagaccggu	ucuaaaaaac	1020
ucuaagagcc	gagcaagcuu	ccaggaggu	aaaaaaauug	augacagaaa	ccuuguggu	1080
ccaaaaugcg	aaaccagauu	guaaagacu	uuuaaaagca	uugggaccag	cgguacacu	1140
agaagaaug	augacagcau	guccaggaggu	aggaggacc	ggccauaagg	caagaguuuu	1200
ggcugaagca	augagccaa	uaacaaauac	agcuaccua	augaugcaga	gaggcauuu	1260
uaggaaccua	agaaagauug	uuaguguuu	caauuguggc	aaagaagggc	acacagccag	1320
aaauugcagg	gccccuagga	aaaaggcg	uuaggaaugu	ggaaaggga	gacaccaaau	1380
gaaagauugu	acugagagac	aggcuauuuu	uuuagggaag	aucuggccu	ccuacaagg	1440
aaggccagg	aauiuuuuu	agagcagacc	agagccaca	gccccaccu	uuuuucagag	1500
cagaccagag	ccaaagcc	caccagaaga	gagcuucagg	ucuggggguag	agacaacaac	1560
uccccucag	aagcaggagc	cgaugacaa	ggaaucugau	ccuuuaacu	cccucagau	1620
acucuuuggc	aacgacccu	cguacaaaua	aagauagggg	ggcaacuuaa	ggagcucua	1680
uuagauacag	gagcagaua	uacaguuua	gaagaaaua	guuugccagg	aagauggaaa	1740
ccaaaaaua	uagggggauu	uggagguuuu	aucaaaaua	gacagaua	ucagauacuc	1800
auagaaauu	guaggacaua	agcuauaggu	acaguuuag	uaggaccuac	accugucaac	1860
auaaauugga	gaaauucugu	gacucagauu	ggugucacuu	uaauuuuuc	cauuagccu	1920
auugagacug	uaccaguaaa	auuaaaggcc	ggaauggaug	gcccuaaagu	uaaaacaugg	1980
ccauugacag	aagaaaaau	aaagcauu	guagaaauu	guacagaaau	ggaaaaggaa	2040
gggaaaaauu	caaaaauug	gcccagagau	ccauacaaua	cuccaguuu	ugccaauaag	2100
aaaaaagaca	guacuaaaug	gagaaaaaua	guagauuuca	gagaacuuua	uaagagaaau	2160
caagacuuc	gggaaguuca	auuaggaua	ccacaucccg	caggguuaa	aaagaaaaaa	2220
ucaguaacag	uacuggaugu	ggguagauca	uauiuuucag	uucccuuaga	ugaagacuuc	2280
aggaaguuu	cugcauuuac	cauaccuagu	auaaacaau	agacaccagg	gauuagauu	2340
caguacaau	ugcuuucca	gggauggaaa	ggauaccag	caauuuucca	aaguagcaug	2400
acaaaaauu	uagagccuuu	uaaaaaacaa	aauccagaca	uaguuauua	ucaauucaug	2460
gaugauuuu	auguaggau	ugacuuaaga	auagggcagc	auagaacaaa	aaagaggag	2520
cugagacaac	aucuguuag	gugggggacu	accacaccag	acaaaaaaca	ucagaaagaa	2580
ccuccauucc	uuuggauggg	uuuugaacuc	cauuccugau	aauggacagu	acagccuua	2640
gugcugccag	aaaaagacag	cuggacuguc	aaugacauac	agaaguuagu	ggggaaaauu	2700
aauggggcaa	gucagauuu	cccagggaau	aaaguaaggc	aauiuuuua	acuccuua	2760
ggaaaccag	acuaacaga	aguaauacca	cuacagaa	aagcagagcu	agaaucggca	2820
gaaacacag	agauucuaaa	agaaccagua	caugggagugu	auuauagccc	aucaaaagac	2880
uuauuagcag	aaauacagaa	gcagggggcaa	ggccaaugga	cauaucaau	uuaucaagag	2940
ccauuuuaaa	aucugaaaa	aggaaaauu	gcaagaauga	ggggugccca	cacuaaugau	3000
guaaaaacaa	uaacagaggg	agugcaaaaa	auaacacac	aaagcauagu	aaauugggga	3060
aagacuccua	aauiuaaacu	accuauacaa	aaggaaacau	gggaaacau	guggacagag	3120

uauuggcaag	ccaccuggau	uccugagugg	gaguuugua	auacccucc	uuuagugaaa	3180
uuauugguacc	aguuaagaga	agaacccaua	guaggagcag	aaacccuua	uguagauggg	3240
gcagcuacca	gggagagcuaa	auuaggaaaa	gcaggauaug	uuacuaacca	aggaagacaa	3300
aaggguugucc	cccuaacuaa	cacaacaaau	cagaaaacug	aguuaacaagc	aauuuauua	3360
gcuuugcagg	auucaggauu	agaaguaaac	auaguaacag	acucacaaau	ugcauuaggga	3420
aucauucacag	cacaaccaga	uaaaagugaa	ucagaguuag	ucaucaaaau	aaugagcgag	3480
uuauuaaaaa	aggaaaagggu	cuauucuggca	uggguaccag	cacacaaagg	aaugggagga	3540
aaugaaccaag	uagauaabaau	agucagugcu	ggaauucagga	aaauacuauu	uuuagauugga	3600
auagauaagg	cccagaaguga	acauagaaaa	uaucacagua	auuggagagc	aauggcuagu	3660
gauuuuaacc	ugccaccuguu	aguagcaaaa	gaaauaguag	ccagcuguga	uaaaugucag	3720
cuaaaaggag	aagccaucga	uggaacaagua	gacuguaugc	caggaaauag	gcaacuagau	3780
uguacacauu	uagaaggaaa	aguuauccug	guagcaguuc	auguagccag	uggauauuaa	3840
gaagcaggaag	uuauuuccagc	agaaaacagg	caggaaacag	cauauuuucu	uuuaaaauua	3900
gcagggaagau	ggccaguaaa	aaacaaucav	acagacaauu	gcagcaauuu	caccagugcu	3960
acggguuaagg	ccgcuugug	uggggaggga	aucaaacagc	aaauuggaa	uccuacaaau	4020
ccccaaaguc	aaggagugau	agaauucuaug	aaauaaagaa	uaaagaaaa	uauaggacag	4080
guaaagagauc	aggcuagaaca	ucuuaaagaca	gcagucacaa	uggcaguauu	caucuaacaag	4140
cuuagaagau	agagaggggu	uggggggguac	agugcagggg	aaagaauagu	agacauaaua	4200
gcacacagca	aucaaacuaa	agaaauacaa	aaacaaauua	caaaaaauca	aaauuuucgg	4260
guuuauuaca	gggacagcag	aaauccacuu	uggaaaggac	cagcaaaagcu	ccucuggaaa	4320
ggugaagggg	caguaguaau	acaagauaau	agugacauaa	aaguagugcc	aaagaagaaa	4380
gcdaagauca	uuaggggauua	uggaaaacag	auggcagguu	augauugugu	ggcaaguaga	4440
caggauuagg	ucuaagacau	ggaaaaguuu	aguaaaacac	cauauguauu	uuucagggaa	4500
agcuaggggga	ugguuuuava	gacauacuaa	ugaaaggccu	cauccaagaa	uaaguuacaga	4560
aguacacauu	ccacuaagggg	augcuagauu	gguauuaaca	acauauuggg	gucugcauac	4620
aggagaaaga	gacuggcavuu	ugggucaggg	agucuccaua	gaauggagga	aaaagagaua	4680
uagcacacaa	guagcacccu	aaauagcaga	ccaaucuaau	caucuguaau	acuuugacug	4740
uuuuucagac	ucugcuauaa	gaaaggccuu	auuaggacac	auaguuagcc	cuagguguga	4800
auaucaagca	ggacauaaca	agguaggauc	ucuaacaaua	uugggcacua	cagcauuaua	4860
aaacacaaaa	aaagauaaagc	caccuuugcc	uaguguuacg	aaacugacag	aggauagauu	4920
gaacaaagccc	cagaagaccg	agggccacag	agggagccac	acaauagaug	gacacuaagag	4980
cuuuuaaggg	agcuuaagaa	ugaagcuguu	agacuuuuu	cuaggauuug	gcuccauggc	5040
uuaggggcaac	auauucuauga	aacuuauugg	gauacuuggg	caggagugga	agccauaaua	5100
agaauuucugc	aaacacugcu	guuuauuccau	uuucagaauu	ggguugucgac	auagcagaau	5160
aggcguuacu	cgacagaggga	gagcaagaaa	ugggagccagu	agauccuaga	cuagagcccu	5220
ggaaagcaucc	aggaaagucag	ccuaaaacug	cuuuagccaa	uugcuauugu	aaaaaguguu	5280
gcuuucauug	ccaaguuugu	uucauaacaa	aaagccuuagg	caucuccuau	ggcagggaaga	5340
agcggagagca	gagagcgaaga	ccuccucuaag	gcagucagac	ucaucaaguu	ucucuaacaa	5400
agcaguaagu	aguacaugua	augcaaccua	uacaaaagc	aaauaguagca	uuaguaguag	5460
caauaaauau	agcaauaagu	guguggucca	uagaaucua	agaaauuagg	aaaauauuaa	5520
gacaaagaa	aaauagcagg	uuauuugava	gacuaauaga	aaagagcaga	gacaguggca	5580
augagaguga	aggagaaaua	ucagcacuuu	uggagauugg	gguggagauu	gggacaccag	5640
cuccuuuggga	uguuagauau	cuguaugcu	acagaaaaau	uuggggucac	agucuaauua	5700
gggguaaccug	uguggaaggga	agcaaacacc	cuuuauuuu	gugcaucaga	ugcuuaagca	5760
uauugauacag	agguaacuaa	uguuuggggc	acacauggcu	guuagccac	agaccccaac	5820
ccacaaggaag	uaguauuugu	aaauugugac	gaaauuuua	acaugugga	aaagacauu	5880
guagaacaga	ugcaugaggga	uaauaauag	uuauugggac	aaagccuaaa	gccaugugua	5940
aaauuaaccc	cacucugugu	uaguuuaaag	ugcacugauu	ugaagaauu	uacuaauacc	6000
aaauaguaua	gaggggagaa	gauaauggag	aaaggagaga	uaaaaaacug	cucuuucaau	6060
aucagcacaa	gcauaagagg	uaaggugcag	aaagaauaug	cauuuuuuua	uaaacuuugau	6120
auaaauacca	uagauaauu	uacuaccagc	uaucguuga	caaguuguaa	caccucaguc	6180
auuacacag	ccuguccaaa	gguaucuuu	gagccaauc	ccauacauua	uugugcccg	6240
gcugguuuuu	cgaauucuaa	auguaauau	aaagcguuca	auggaacagg	accauguaa	6300
aaugucagca	caguacaauu	uacacauuga	auuaggccag	uaguaucaac	ucaacugcug	6360
uuauuuggca	gucuggcaga	agaagaggua	guauuagau	cugccaaauu	cacagacaa	6420
gcuaaaaacca	uaauaguaca	gcugaaccac	ucuguaagaa	uuauuugua	aaagcccaac	6480
aaacauacaa	gaaauaagau	ccguauccag	agaggaccag	ggagagcauu	uguuacaaau	6540
ggaaaaauag	gaaauuagag	acaaagcaca	uguaacauua	guagagcaaa	auggaauaac	6600
acuuuaaaac	agauagauag	caaaauaaga	gaacaaauu	gaaauaaua	aaacauaau	6660
uuuaagcagu	ccucagggagg	ggacccagaa	auuuaaacg	acaguuuuaa	uuguggagg	6720
gaaauuuucu	acuguaauuc	aaacaaaguc	uuuaauagua	cuuugguuua	uaguacuuug	6780
aguacuuaag	ggucacaaau	cacugaaggga	agugacacaa	ucacccuccc	augcagaaua	6840
aaacaaauua	uaaacauug	gcagggaagua	ggaaagcaca	uguauugccc	ucccaucagu	6900
ggacaaauua	gauguucauc	aaauauuaca	gggucugcuu	uaacaaagaga	uggugguuau	6960
agcaacaaug	aguccagagau	cuuacagccu	ggaggaggag	auuugaggga	caauugggaga	7020
agugaauuau	auaaauuaaa	aguaagaaaa	auugaaccau	uaggagugagc	accacccaa	7080

```

gcaaagagaa gaguggugca gagagaaaaa agagcagugg gaauaggagc uuuguuccuu 7140
ggguucuuvg gagcagcagg aagcacuauvg ggcgcagcgu caaugacgcu gacgguacag 7200
gccagacaau uauugucugg uauagugcag cagcagaaca auuugcugag ggcuaauvgag 7260
gcgcaacagc aucugugugca acucacaguc ugggggcauca agcagcucca ggcaagaau 7320
cuggcugugg aaagauaccu aaaggaucaa cagcuccugg ggauuuugggg uugcucugga 7380
aaacucuuuu gcaccacugc ugugccuugg aaugcuaguu ggaguaauaa aucucuggaa 7440
cagauuuuga auaacauagc cuggaugggag ugggacagag aaauuaacaa uuacacaagc 7500
uuauuacacu ccuuauuuga agaaucgcaa aaccagcaag aaaagaauga acaagaauua 7560
uuggaauuag auaaaugggc aaguuuugug aaauugguuu acauaacaaa uuggcugugg 7620
uauauaaaau uauucauaua gaaugugagg ggcuuugugag guuaaagaau aguuuuugcu 7680
guacuucug uagugaauag aguuaggcag ggauauucac cauuauugcu ucagaccac 7740
cucccaaucc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaaug aagaagaagg uggagagaga 7800
gacagagaca gauccauucg auuagugaac ggauccuug cacuuuucug ggacgacug 7860
cggagccugu gccucvucag cuaccaccgc uugagagacu uacucuuug uguaacgagg 7920
auuguggaac uucugggacg cagggggugg gaagcccucca aaauuuggug gaucuccua 7980
caguauugga gucaggagcu aaagaaugu gcuuguvagc ugcucauugc cacagcuaua 8040
gcaguagcug aggggacaga uaggguuaua gaaguaguc aaggagcuua uagagcuauu 8100
cgccacauac cuagaagaau aagacagggc uuggaaagga uuugcuaua agauuggugg 8160
caagugguga aaaagugaug ugguuuggaug gccugcugua agggaaagaa ugagacgagc 8220
ugagccagca gcagauuggg ugggagcagc aucucgagac cuagaaaaac auggagcaau 8280
cacaagugag aacacagcag cuacaagugc ugaauugucc uggcuagaag cacaagagga 8340
ggaggaggug gguuuuccag ucacaccuca gguaccuuua agaccaauga cuuacaaggc 8400
agcugugau cuuagccacu uuuaaaaaga aaagggggga cuggaagggc uauuucacuc 8460
ccaacgaaga caagauuucc uugaucugug gaucuaccac acacaaggcu acuuuccuga 8520
uuagcagAAC uacacaccag ggcagggaug cagauuucca cugaccuuug gauggugcuu 8580
caagcuagua ccaguugagc cagagaaguu agaagaagcc aacaaggag agaacaccag 8640
cuuguuacac cuugugagcc ugcauggaau ggaugacccg gagagagaag uguuagagug 8700
gagguuugac agccgcuag cauuaucua caugggccga gagcugcauc cggaguacuu 8760
caagaacugc ugacacagc cuugcuacaa gggacuucc gcuggggacu uuccagggag 8820
gcguggccug ggcgggacug gggaguggcg agcccucaga uccugcauuu aagcagcugc 8880
uuuuugccug uacugggucu cucugguuag accagauug agccugggag cuc 8933

```

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> HIV

<220>
<221> Quelle
<222> (1)...(30)
<223> Sequenz der AE(+)4134 HIV-spezifischen Sonde

```

<400> 5
ccacaatttt aaaagaaaag gggggattgg 30

```

<210> 6
<211> 67
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Sequenz der (-)3837 A30 Sonde zum Einfangen

```

<400> 6
ccctgtttct gctggaataa cttctgcttc tatatttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
aaaaaaa 67

```

<210> 7
<211> 57
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Sequenz der (-)4258 A30 Sonde zum Einfangen


```

<400> 7
cctgctgtcc ctgtaataaa cccgttttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 57

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> HIV

<220>
<221> Quelle
<222> (0)...(0)
<223> Sequenz der AE(+)4134b Sonde

<400> 8
ccacaatttt aaaagaaaag gg 22

<210> 9
<211> 8933
<212> RNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Sequenz des IAC-Bscr Pseudoziels

<221> Mutation
<222> (4140)...(4159)
<223> Mutierte Positionen: 4140-42, 4145-47, 4152,
4156-57, 4159

<400> 9
gagcucucuc gacgcaggac ucggcuugcu gaagcgcgca cggcaagagg cgagggggcgg 60
cgacuggguga guacgccaaa aaauuugacu agcggaggcu agaaggagag agaugggugc 120
gagagcgcuca guauuaagcg gggggagaau agaucgaugg gaaaaaaauu gguaaaggcc 180
aggggggaaag aaaaaauuaa aauiuaaaaca uauaguaugg gcaagcaggg agcuagaacg 240
auucgcaguu aaucucggcc uguuagaaac aucagaaggc uguagacaaa uacugggaca 300
guacaacca ucccuucaga caggauucaga agaacuuaa ucauuauua auacaguagc 360
aaccucucua ugugugcauc aaaggauaga guaaaaagac accaaggag cuuagacaa 420
gauagaggaa gagcaaaaca aaaguaagaa aaaagcacag caagcagcag cugacacagg 480
acacagcagu caggucagcc aaaauuaccc uauagugcag acauuccagg ggcaauuggu 540
acaucaggcc auauaccua gaacuuuaaa ugcaugggua aaaguaguag aagagaaggc 600
uuucagccca gaaguaauac ccauguuuuc agcauuuua gaaggagcca ccccaaaaga 660
uuuaaaacac augcuuaaca cagugggggg acaucaagca gccaugcaaa uguuaaaaga 720
gaccucaauu gaggaagcug cagaauugga uagaguacau ccagugcag caggggccuau 780
ugcaccaggc cagauagag aaccaagggg aagugacaua gcagggaacua cuaguacccu 840
ucagggaacaa auaggauagg ugacaaauaa uccaccuauu ccaguaggag aaaaaauuaa 900
aagauaggua auccugggav uaaauuaaaau aguaagaaug uauagcccuu ccagcauuu 960
ggacauaaga caaggaccaa aagaaccuuu uagagacuau guagaccggu ucuauaaac 1020
ucuaagagcc gagcaagcuu cacaggaggu aaaaaauugg augacagaaa ccuuguggu 1080
ccaaaaugcg aaccagauu guaaagacuau uuuuaaagca uugggaccag cggcuacacu 1140
agaagaaaug augacagcau gucaggggagu agggaggacc gcccauaagg caagaguuuu 1200
ggcuagaagca augagccaag uaacaaauac agcuaccua augaugcaga gaggcauuu 1260
uaggaaacca agaaagauug uuaaguguuu caauuguggc aaagaagggc acacagccag 1320
aaaauugcag gcccuaagga aaaagggcug uuggaaaugu ggaaggaag gacacaaau 1380
gaaagauugu acugagagac aggcuaauuu uuaggggaag aucuggccuu ccuacaaggg 1440
aaggccaggg aauiuuuuc agagcagacc agagccaaca gccccaccu uucuuacagag 1500
cagaccagag ccaacagccc caccagaaga gagcuucagg ucuggggua agacaacaac 1560
uccccucucag aagcaggagc egauagacaa ggaacugua ccuuuaacuu cccucagau 1620
acucuuuggc aacgaccccu cgucacaua aagauagggg ggcaacuua ggaagcucua 1680
uuagauacag gagcagauga uacaguauua gaagaaauga guuugccagg aagauggaaa 1740
ccaaaaauga uagggggaa uggaggguuu aucaaguaa gacaguaua ucagauacuc 1800
auagaaauuc guagacuaaa agcuauaggg acaguauuag uaggaccuac accugucaac 1860
auaaauugga gaaauucugu gacucagauu gguugcacuu uaaaauuucc cauuagcccu 1920
auugagacug uaccaguaaa auuaaagcca ggaauuggau gcccuaaagu uaaacaaugg 1980
ccauugacag aagaaaaauu aaaaagcaua guagaaauuu guacagaaau ggaagaggaa 2040
gggaaaauuu caaaaauugg gccugagaau ccuacaaaua cuccaguauu ugccauaaag 2100
aaaaaagaca guacuauaag gagaaaaaua guagauuua gagaacuuua uaagagaacu 2160

```

caagacuucu	gggagguuca	auuaggaaua	ccacaucccg	caggguuaaa	aaagaaaaaa	2220
ucaguaacag	uacuggaugc	gggugaugca	uuuuuuucag	uucccuuaga	ugaagacuuc	2280
aggaaguuua	cugcauuuac	cauaccuagu	auaaacaaug	agacaccagg	gauuagauau	2340
caguacaauug	ugcuuccaca	gggauuggaaa	ggauccaccag	caauauucca	aaguagcaug	2400
acaaaaauucu	uagagccuuu	uaaaaaacaa	auuccagaca	uaguuaucua	ucaauacaug	2460
gaugauuuug	auguaggauc	ugacuuaagaa	auagggcagc	auagaaacaa	aaauaggagag	2520
cugagacaaa	aucuugugag	guggggacuu	accacaccag	acaaaaacaa	ucagaaagaa	2580
ccuccauuuc	uuuggauggg	uuauagaacuc	cauccugaua	aauggacagu	acagccuaua	2640
gugcugccag	aaaagagacag	cuggacuguc	aaugacauac	agaaguuagu	ggggaaaauug	2700
aaauugggcaa	gucagauuuu	cccagggauu	aaaguaaggc	aaauauugua	acuccuuaga	2760
gggaaccaaa	cacuuaacaga	aguuaauacca	cuaacagaaag	aaagcagagcu	agaacugggca	2820
gaaaacacag	agauuucuaaa	agaaccagua	cauggaguguu	auuauagccc	aucaaaagac	2880
uuauuagcag	aaauuacagaa	gcaggggcaa	ggccaaugga	cauaucaaa	uuaucaagag	2940
ccauuuaaaa	uagcuaaaac	aggaaaauau	gcaaggaaua	ggggugccca	cacuaaugau	3000
guaaaaacaa	uaacagaggc	agugcaaaaa	auaacacacag	aaagcauagu	aaauuggggga	3060
aagacuccua	aaauuuaaaacu	acccauacaa	aaaggaaacau	gggaaacau	guggacagag	3120
uuuuggcaag	ccaccugggau	uccugaguggg	gaguuuugua	auacccucc	uuuagugaaa	3180
uuauugguacc	aguuagagaga	uccagccaua	guaggagcag	aaaccuucua	uguuaguggg	3240
ggagcuuaaca	gggagagcuua	auuaggaaaa	gcaggauauug	uuacuaacaa	aggaaagacaa	3300
aagguuugucc	cccuuaacuaa	cacaacaaau	cagaaaacug	aguuacaagc	aauuuauucua	3360
gcuuugcagg	auucagggaau	agaaguaaac	auaguaacag	acucacaaau	ugcauuaggga	3420
aucauucagg	cacaaccaga	ucaaagugaa	ucagaguuag	ucaaucaaa	aaauagagcag	3480
uuauuaaaaa	aggaaaagggu	cuauucuggca	uggguuaccag	cacacaaagg	aaugggagga	3540
aaugaacaa	uagauaaaau	agucagugcu	ggauucaggga	aaauacuaau	uuuagauugga	3600
auagauaagg	cccaagauga	acaugagaaa	uauccacagua	auuggagagc	aaugggcuagu	3660
gauuuuaacc	agccaccugt	uguaagcaaaa	gaaauaguag	ccagcuguga	uaaaugucag	3720
cuaaaaggag	aaagccaugca	uggacaagaa	gacugauugc	caggaaauug	gcaacuagau	3780
uguaacacau	uagaaggaaa	aguuauccug	guagcaguuu	auguagccag	uggauauaua	3840
gaagcagaag	uuauuccagc	agaaacaggg	caggaaacag	cauauuuucu	uuuaaaauua	3900
gcaggaaagau	ggccaguuua	aacaauacau	acagacaaug	gcagcaauuu	caccagugcu	3960
acgguuuaagg	ccggccuguv	gugggcgggga	aucaagcagg	aaauugggaau	ucccuacaa	4020
ccccaaaguc	aaaggaugau	agaauucuaug	aaauaagaa	uaaagaaaau	uuagggacag	4080
guaaagaguc	aggcuagaaca	ucuuuaagaca	gcaguaacaa	uggcaguauu	cauccageaa	4140
aatatttgaa	agggggaagct	tggggggguac	agugcagggg	aaagaaauag	agacauaaau	4200
gcaacagaca	uacaaacuaa	agaauuacaa	aaacaaauua	caaaaaauuca	aaauuuucgg	4260
guuuuuuaca	gggacagcag	aaauccacuu	uggaaaggac	cagcaaaagcu	ccucuggaaa	4320
ggugaagggg	caguauuaau	acaagauaa	agugacauaa	aaugauggcc	aaagagaaaa	4380
gcaaagauca	uuagggaauu	augggcaggug	augauuguguu	augauuguguu	ggcaaguaga	4440
caggauaggg	auuagaaacau	gggaaaguuu	aguaaaacac	cauauuguaug	uuucagggaa	4500
agcuaggggga	ugguuuuuaa	gacauacua	ugaagggccu	cauccaagaa	uaaguuacaga	4560
aguaacacau	ccacuagggg	augcuagauu	gguaauaaca	acauauuggg	gucugcauac	4620
aggagaaaga	gacugggcau	uggguccagg	agucuccaua	gaauaggagga	aaaagagaua	4680
uagcacacaa	guaggcccu	aaauagcaga	ccaacuaauu	caucuguaau	acuuugacug	4740
uuuuucagac	ucugcuauaa	gaaaggccuu	auuaggacac	auaguuaggcc	cuagguguga	4800
auaucaagca	ggacauaaca	agguaggauu	ucuaacauac	uuggcacuag	cagcauuauu	4860
aacaccaaaa	aaagauaaag	cccuuugcc	uaguguaacg	aaacugacag	aggauagau	4920
gaacaaggcc	cagaagacca	agggccacag	agggagccac	acaauagaaug	gacacuagag	4980
cuuuuagagg	agcuuaagaa	ugaagcuguu	agacauuuuc	cuaggauuug	gcuccauggc	5040
uuaggggcaac	auaucuaua	aaauuaggg	gauacuuggg	caggagugga	agccauaaua	5100
agaauucugc	aacaacugcu	guuuauccau	uuucagaaau	gggugucgac	auagcagaau	5160
aggcgguacu	cagacagagga	gagcaagaaa	uggagccagu	agauccuaga	cuagagcccu	5220
ggaaagcaucc	aggaaagucag	ccuaaaaacug	cuuguaccaa	uugcuauugu	aaaaaguguu	5280
gcuuucuuug	ccaauguuug	uucauaacaa	aagccuuagg	caucuccuau	ggcaggaaaga	5340
agcgagagaca	gcgacgaaga	ccuccucaag	gacugacagc	ucaucaaguu	ucucuaucaa	5400
agcaguaagu	aguacauua	augcaaccua	uacaaauagc	aaauaguagca	uuaguagug	5460
caauaaauau	agcaauuaguu	guguggucca	uaguaaucau	agaauauagg	aaaaauuaa	5520
gacaaagaaa	aaauagacagg	uuauuugaua	gacuaauaga	aaagagcagaa	gacagugggca	5580
augagaguga	aggagaaaua	ucagcacuug	uggagauugg	gguggagau	gggacccaug	5640
cuccuuggga	uguuagauau	cuguagugcu	acagaaaaau	ugugggucac	agucuaauau	5700
gggguaccug	uguggaaggga	agcaaccacc	acucuaauuu	gugcauacaga	ugcuuaagca	5760
uuugauacag	agguaacuaa	uguuuggggc	acacauvgccu	guguaaccac	agaccccaac	5820
ccacaagaa	uaguauuggu	aaauuggaca	gaaaauuua	acauguggaa	aaauagacau	5880
guagaaacaga	ugcuugaggga	uaauaucagu	uuauugggac	aaagccuaaa	gccauugua	5940
aaauuaaccc	cacucugugu	uaguuuaaag	ugcacugauu	ugaaagaauga	uacuaauacc	6000
aaauaguagua	gagggaagaa	gaaauuggag	aaaggagaga	uaaaaaacug	cucuucacau	6060
aucagcacia	gcuaaaggag	uaaggugcag	aaagaaauag	cauuuuuuua	uaaacuuagau	6120

auaaauacca	uagauaau	uacuaaccagc	uauacguuga	caeguuguaa	caccucaguc	6180
auuacacacagg	ccuguccaaa	gguaucuuu	gagccaauc	ccauacauua	uugugccccg	6240
gucgguuuuug	cgauuucuaaa	auguaauaa	aagacguuca	auggaacagg	accauguaca	6300
aaugucagca	caguacaaug	uacacauvga	auuagggccag	vaguaucaac	ucaacugcug	6360
uuaaauggca	gucuggcaga	agaagagcgua	guaaauagau	cugccaauiu	cacagacaa	6420
gcuaaaacca	uaauaguaca	gcugaacca	ucuguagaaa	uuauuugac	aagacccaac	6480
aaccaauacaa	gaaaaaguuu	ccguuaccag	agaggaccag	ggagagcauu	uguuacaaua	6540
ggaaaaauag	gaaauaugag	acaagcacau	uguacaaaua	guagagcaaa	auggaauaac	6600
acuuuaaaac	agauagauag	caaaauaaga	gaacaauiug	gaaauaauaa	aacaaauaac	6660
uuuaagcagu	ccucaggagg	ggaccagaa	auuguuacgc	acaguuuuaa	uuguggagg	6720
gaauiuuuuc	acuguaauuc	aacacaacug	uuuaauagua	cuugguuuaa	uaguacuug	6780
aguacuaaag	ggucaauuaa	cacugaagge	agugacacaa	ucacccuccc	augcagaaua	6840
aaacaaauua	uaaacaugug	gcaggaaqua	ggaaaagcaa	uguaugcccc	ucccaucagu	6900
ggacaaauua	auguucuauc	aaauuuuaca	gggcuvcuau	uaacaagaga	ugguvguaau	6960
agcaacaauu	gugccgaug	cuucagaccu	ggaggaggag	auaugaggga	caauvggaga	7020
agugaauuuu	auaaauuaa	aguaguaaaa	auugaaccu	uaggaguagc	accacccaag	7080
gcaaaagagaa	gaguguguca	gagagaaaaa	agagcagug	gaaugaggagc	uuuuguccu	7140
ggguuucuuug	gagcagcagg	aagcacuau	ggcgagcgu	caaugacgc	gacgguaacag	7200
gccagacaau	uaugugucag	uaagugcag	cagcagaaca	auuugcugag	ggcuauugag	7260
gcgcaacagc	aucuguuuca	acucacaguc	uggggcauca	agcagcucca	ggcaagaauc	7320
cuggcugug	aaagauaccu	aaaggaucaa	cagcuccug	ggauuuuggg	uugcucugga	7380
aaacucuuu	gcaccacugc	ugugccuug	auugcuaguu	ggaguuaaua	aucucuggaa	7440
cagauuuuga	auaacaugag	cuggauaggag	uuggacagag	aaauuaacaa	uuacacaagc	7500
uuauuacacu	ccuuuauuga	agaauccgaa	aaccagcaa	aaaagaaua	acaagaauua	7560
uuggaauiag	auaaaauggc	aaguuuug	aaugguuua	acauaacaaa	uuggcugug	7620
uaauuaaaa	uaucuaaua	gauagagga	ggcuugguag	guuaagaa	aguuuuugcu	7680
guacuucug	uagugaauag	aguuaaggag	ggauuuuac	cauuuucguu	ucagacccac	7740
cucccaaucc	cgaggggagc	cgacaggccc	gaaggaaug	aagaagagg	uggagagaga	7800
gacagagaca	gauccauucg	auuagugaac	ggauccuag	cacuuuucug	ggacgaucug	7860
cggagccug	gccucucag	cuaccaccgc	uugagagacu	uacucuuug	uguaacgagg	7920
auuguggaac	uucugggagc	cagggggug	gaagcccuca	aaauuuggug	gaauuccua	7980
caguauugga	gucagggagc	aaagaauagu	gcuguuagcu	ugcucauugc	cacagcuaua	8040
gcagugagc	aggggacaga	uaggguuaa	gaaguaguac	aaggagcuua	uagagcuauu	8100
cgcacauac	cuaagaagaa	aagacagggc	uugaaagga	uuuugcuua	agaugggug	8160
caagugguca	aaaaguagug	ugguuuggag	gccugcugua	agggaaagaa	ugagacgagc	8220
ugagccagca	gcagaugggg	ugggagcagc	aucucgagac	cuaaaaaac	auggagcaau	8280
cacaaguagc	aacacagcag	cuaacaauuc	ugauuugucc	uggcuagaag	cacaagaggga	8340
ggagagagg	gguuuuccag	ucaaccucca	gguaacuuua	agaccaaua	cuuacaaggc	8400
agcugugau	cuuagccacu	uuuuuaaaga	aaagggggga	cuggaagggc	uaauucacuc	8460
ccaacgaaga	caagaauucc	uugaucugug	gaucuaccac	acacaaggcu	acuuuccuga	8520
uuagcagaac	uacacaccag	ggccaggga	cagaauucca	cugaccuuug	gauggugcu	8580
caagcuagua	ccaguugagc	cagagaaguu	agaagaagcc	aacaaaggag	agaacaccag	8640
cuuguuacac	ccugugagcc	ugcauggaa	ggauagccc	gagagagaag	uguuagagug	8700
gagguuugac	agccgcccug	cauuuacua	cauggccoga	gagcugcauc	cggaguacuu	8760
caagaacugc	ugacaucgag	cugcuacaa	gggacuuucc	gcuggggacu	uuccagggag	8820
gcguggccug	ggcgggacug	gggaguggcg	agccucaga	uccugcauu	aagcagcugc	8880
uuuuugccug	uacugggucu	cucugguuag	accagaucug	agccugggag	cuc	8933

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zum Quantifizieren eines in einer Testprobe vorhandenen Polynukleotidanalyten, das die Schritte umfasst:

Kombinieren einer vorgegebenen Menge einer Testprobe mit einer vorgegebenen Menge eines Pseudoziels, wobei die Testprobe eine unbekannte Menge an Polynukleotidanalyten enthält;

Co-Amplifizieren des Pseudoziels und jedes der Polynukleotidanalyten, die in der Testprobe enthalten sind, in einer Polynukleotid-Amplifikationsreaktion, um eine Sammlung von Amplifizierungsprodukten zu erzeugen, wobei die Sammlung sowohl ein Analyt-Amplikon, wenn die Testprobe den Polynukleotidanalyten enthielt, als auch ein Pseudoziel-Amplikon einschließt; und

Quantifizieren des Analyt-Amplikons ohne Bezug auf die Pseudoziel-Amplikonmenge, wobei die Menge an Analyt-Amplikon in einer Dosis-abhängigen Weise von der unbekannten Menge des Polynukleotidanalyten, der in der Testprobe enthalten ist, abhängig ist.

2. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei der Quantifizierungsschritt das Hybridisieren der Sammlung von Amplifizierungsprodukten aus dem Co-Amplifizierungsschritt an eine markierten Probe, die für das Analyt-Amplikon, aber nicht für das Pseudoziel-Amplikon spezifisch ist, und das folgende Detektieren jeder markierten Probe, die spezifisch an das Analyt-Amplikon hybridisiert, umfasst.

3. Das Verfahren gemäß Anspruch 2, wobei die Polynukleotid-Amplifikationsreaktion im Co-Amplifizierungsschritt aus der Gruppe, die aus einer transkriptionsvermittelten Amplifikationsreaktion, einer NASBA-Reaktion und einer Polymerase-Kettenreaktion besteht, ausgewählt wird.

4. Das Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei die Polynukleotid-Amplifikationsreaktion eine transkripti-

onsvermittelte Amplifikationsreaktion ist.

5. Das Verfahren gemäß entweder Anspruch 3 oder 4, das des Weiteren einen Schritt für das Freisetzen der Nukleinsäuren, die in der Testprobe enthalten sind, umfasst, wobei der Freisetzungsschritt vor dem Kombinierungsschritt durchgeführt wird.

6. Das Verfahren gemäß Anspruch 5, das des Weiteren einen Schritt für das Einfangen von dem Polynukleotidanalyten auf einem festen Träger vor dem Co-Amplifizierungsschritt umfasst.

7. Das Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei der feste Träger ein Kügelchen ist, das mit einem synthetischen Polynukleotid derivatisiert ist.

8. Das Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei die vorgegebene Menge von dem Pseudoziel in dem Kombinierungsschritt in dem Bereich zwischen $1,0 \times 10^3$ und 2×10^8 Molekülen, vorzugsweise zwischen $1,0 \times 10^4$ und 2×10^8 Molekülen, und noch bevorzugter zwischen $1,0 \times 10^5$ und 2×10^8 Molekülen liegt.

9. Das Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei die biologische Probe eine Blutprobe oder eine Plasmaprobe ist, und wobei die Nukleinsäuren virale Nukleinsäuren umfassen.

10. Das Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das Polynukleotidanalyt von HIV-Virionen freigesetzt wird.

11. Das Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei die vorgegebene Menge von Pseudoziel in dem Kombinierungsschritt zwischen $1,0 \times 10^3$ und 2×10^8 Molekülen, vorzugsweise zwischen $1,0 \times 10^4$ und 2×10^8 Molekülen und noch bevorzugter zwischen $1,0 \times 10^5$ und 2×10^8 Molekülen liegt.

12. Das Verfahren gemäß Anspruch 4, das des Weiteren einen Schritt zum Isolieren von dem Polynukleotidanalyten und dem Pseudoziel nach dem Kombinierungsschritt und vor dem Co-Amplifizierungsschritt beinhaltet.

13. Das Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die vorgegebene Menge des Pseudoziels zwischen $1,0 \times 10^3$ und 2×10^8 Molekülen, vorzugsweise zwischen $1,0 \times 10^4$ und 2×10^8 Molekülen, noch bevorzugter zwischen $1,0 \times 10^5$ und 2×10^8 Molekülen liegt.

14. Das Verfahren gemäß Anspruch 2, wobei die markierte Probe mit einem Acridiniumester markiert ist.

15. Das Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei der Quantifizierungsschritt das Messen der Probe, die mit Acridiniumester markiert ist und spezifisch an das Analyt-Amplikon hybridisiert, über Luminometrie umfasst.

16. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, das des Weiteren einen Schritt für das Hinzuziehen einer Standardkurve, die die Mengen an Polynukleotidanalyt vor und die Mengen an Analyt-Amplikon nach der Amplifikation in Beziehung setzt, umfasst.

17. Das Verfahren gemäß Anspruch 4, das des Weiteren einen Schritt für das Hinzuziehens einer Standardkurve, die die Mengen an Polynukleotidanalyt vor und die Mengen an Analyt-Amplikon nach der Amplifikation in Beziehung setzt, umfasst.

18. Das Verfahren gemäß Anspruch 15, das des Weiteren einen Schritt für das Hinzuziehens einer Standardkurve, die die Mengen an Polynukleotidanalyt vor und die Mengen an Analyt-Amplikon nach der Amplifikation in Beziehung setzt, umfasst.

19. Das Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die transkriptionsvermittelte Amplifikationsreaktion einen gepaarten Satz von Oligonukleotidprimern verwendet, die die Sequenzen von SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 besitzen.

20. Das Verfahren gemäß Anspruch 19, wobei das Pseudoziel eine Polynukleotidsequenz besitzt, die aus der Gruppe, die aus SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 9 besteht, ausgewählt wird.

21. Ein Verfahren zum In-Beziehung-setzen der Präamplifikationsmenge an Polynukleotidanalyt und der Postamplifikationsmenge an Analyt-Amplikon, wobei die Methode die Schritte umfasst:
Erhalten einer Vielzahl von Kontrollproben, wobei jede der Kontrollproben eine unterschiedliche vorgegebene

Menge eines Polynukleotidanalyten besitzt;

Kombinieren von jeder von der Vielzahl von Kontrollproben mit einer konstanten vorgegebenen Menge eines Pseudoziels, um zu einer Vielzahl von gemischten Kontrollproben zu führen;

Co-Amplifizieren sowohl des Pseudoziel als auch des Polynukleotidanalyt, das in jeder von der Vielzahl von gemischten Kontrollproben enthalten ist, in einer Vielzahl von Amplifikationsreaktionen, um eine Sammlung von Amplifizierungsprodukten zu erzeugen, die ein Pseudoziel-Amplikon und ein Analyt-Amplikon einschließen;

Quantifizieren des Analyt-Amplikons für jede von der Vielzahl von Amplifikationsreaktionen ohne Bezug auf die Menge an Pseudoziel-Amplikon, die in der Sammlung von Amplifizierungsprodukten vorhanden ist; und

Erstellen einer Standardkurve, in der die verschiedenen vorgegebenen Mengen von dem Polynukleotidanalyten gegen die quantifizierten Mengen von dem Analyt-Amplikon, das in jeder von der Vielzahl von Amplifikationsreaktionen erzeugt wurde, aufgetragen sind, und dadurch das In-Beziehung-setzen der Mengen von dem Polynukleotidanalyten in der Vielzahl von Kontrollproben vor und die Menge von Analyt-Amplikons, die in der Vielzahl von Amplifikationsreaktionen synthetisiert wurden, nach der Amplifikation.

22. Das Verfahren gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 21, das des Weiteren einen Schritt zum Detektieren des Pseudoziel-Amplikons umfasst.

23. Das Verfahren gemäß Anspruch 6 oder Anspruch 21, wobei das Polynukleotidanalyt ein virales Polynukleotid ist.

24. Das Verfahren gemäß Anspruch 23, wobei das virale Polynukleotid ein HIV-Polynukleotid ist.

25. Das Verfahren gemäß Anspruch 21, wobei die konstante vorgegebene Menge von dem Pseudoziel zwischen $1,0 \times 10^3$ und 2×10^8 Molekülen, vorzugsweise zwischen $1,0 \times 10^4$ und 2×10^8 Molekülen, und noch bevorzugter zwischen $1,0 \times 10^5$ und 2×10^8 Molekülen liegt.

26. Das Verfahren gemäß Anspruch 21, wobei die Vielzahl von Amplifikationsreaktionen im Co-Amplifizierungsschritt aus der Gruppe, die aus einer Vielzahl von transkriptionsvermittelten Amplifikationsreaktionen, einer Vielzahl von NASBA-Reaktionen und einer Vielzahl von PCR-Reaktionen besteht, ausgewählt wird.

27. Das Verfahren gemäß Anspruch 26, wobei die Vielzahl von Amplifikationsreaktionen im Co-Amplifizierungsschritt eine Vielzahl von transkriptionsvermittelten Amplifikationsreaktionen ist.

28. Das Verfahren gemäß Anspruch 26 oder Anspruch 27, wobei der Quantifizierungsschritt das Hybridisieren der Sammlung von Amplifikationsprodukten aus dem Co-Amplifizierungsschritt mit einer markierten Probe, die für das Analyt-Amplikon, aber nicht für das Pseudoziel-Amplikon spezifisch ist, und das folgende quantitative Detektieren jeder markierten Probe, die spezifisch an das Analyt-Amplikon hybridisiert, umfasst.

29. Das Verfahren gemäß Anspruch 28, wobei die markierte Probe mit einem Acridiniumester markiert ist.

30. Das Verfahren gemäß Anspruch 28, das des Weiteren einen Schritt für das Einfangen von dem Polynukleotidanalyten auf einem festen Träger vor dem Co-Amplifizierungsschritt umfasst.

31. Ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine biologische Probe ein Polynukleotidanalyt enthält, das die Schritte umfasst:

Erhalten einer auf die Anwesenheit des Polynukleotidanalyten zu testenden biologischen Probe;

Kombinieren der biologischen Probe mit einem Pseudoziel, um zu einer gemischten Probe zu führen;

Isolieren der Nukleinsäuren der gemischten Probe, wobei dadurch eine Sammlung von Molekülen erhalten wird, die das Pseudoziel und jedes von den Polynukleotidanalyten, die in der biologischen Probe enthalten sind, umfasst;

Durchführen einer Polynukleotid-Amplifikationsreaktion, um das Pseudoziel und jedes von den Polynukleotidanalyten, das in der Sammlung von Molekülen enthalten ist, zu Co-amplifizieren, um Amplifizierungsprodukte zu erhalten, wobei Pseudoziel-Amplikons gebildet werden und wobei Analyt-Amplikons gebildet werden, wenn die Sammlung von Molekülen die Polynukleotidanalyte einschließt;

Detektion von jedem von den Analyt-Amplikons in den Amplifizierungsprodukten, ohne die den Pseudoziel-Amplikons zu detektieren; und

Bestimmung, dass die biologische Probe das Polynukleotidanalyt enthält, wenn die Analyt-Amplikons in den Amplifikationsprodukten detektiert werden.

32. Das Verfahren gemäß Anspruch 31, wobei die Amplifikationsreaktion aus der Gruppe, die aus einer transkriptionsvermittelten Amplifikationsreaktion, einer NASBA-Reaktion und einer PCR-Reaktion besteht, ausgewählt wird.

33. Das Verfahren gemäß Anspruch 32, wobei die Amplifikationsreaktion eine transkriptionsvermittelte Amplifikationsreaktion ist.

34. Das Verfahren gemäß entweder Anspruch 32 oder Anspruch 33, wobei der Detektionsschritt zuerst das Hybridisieren einer markierten Polynukleotidprobe, die Bindungsspezifität für Analyt-Amplikons besitzt, und dann das Messen des Ausmaßes der spezifischen Bindung der markierten Polynukleotidprobe und der Analyt-Amplikons umfasst.

35. Das Verfahren gemäß Anspruch 34, wobei der Isolierungsschritt das Immobilisieren von dem Pseudoziel und dem Polynukleotidanalyten an einen festen Träger umfasst.

36. Das Verfahren gemäß Anspruch 34, wobei der Detektionsschritt das Detektieren über Luminometrie umfasst.

37. Das Verfahren gemäß Anspruch 36, wobei das Polynukleotidanalyt aus HIV-Virionen stammt.

38. Das Verfahren gemäß Anspruch 37, wobei das Pseudoziel eine Sequenz besitzt, die aus der Gruppe, die aus SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 9 besteht, ausgewählt wird.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

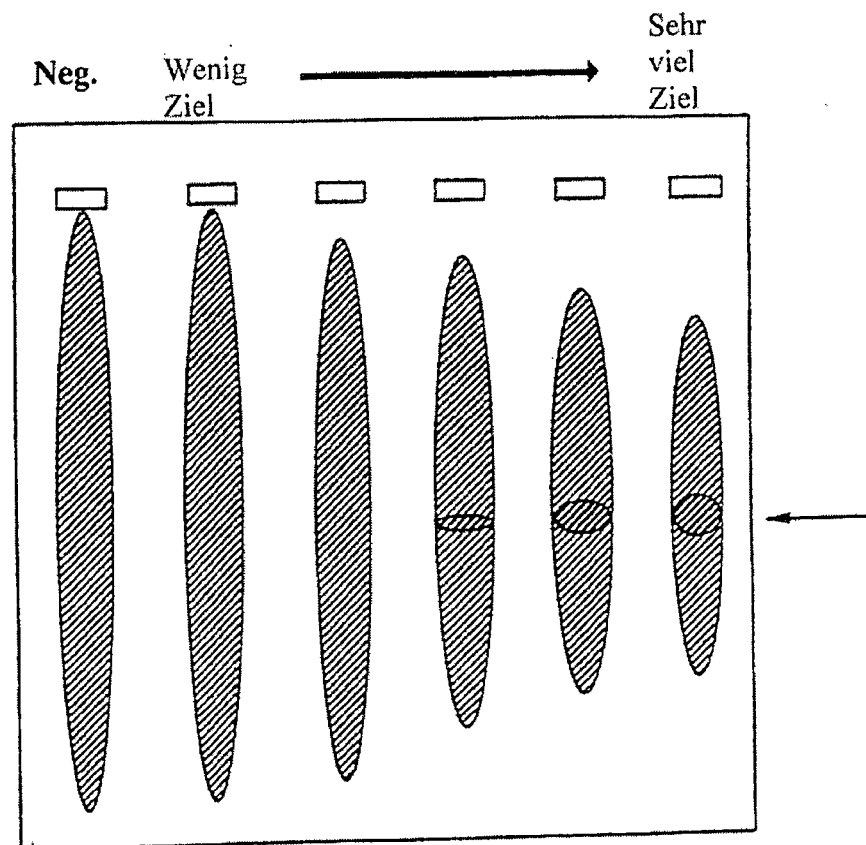


Fig. 1

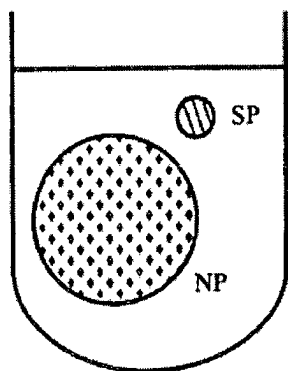


Fig. 2a

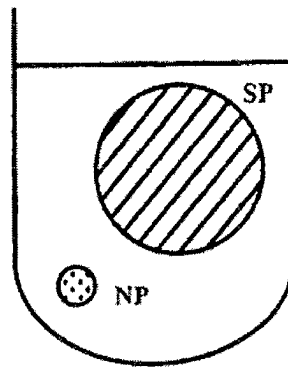


Fig. 2b

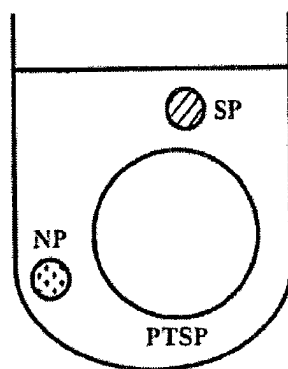


Fig. 2c

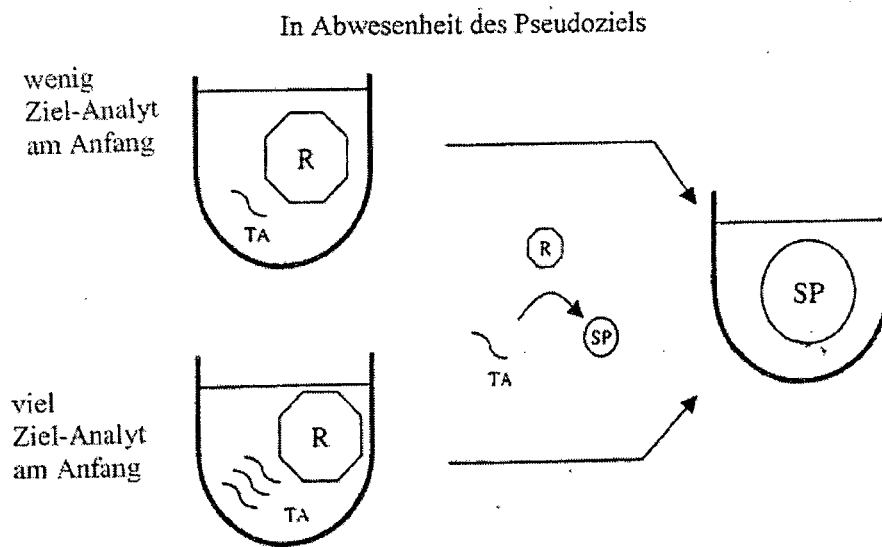


Fig. 3a

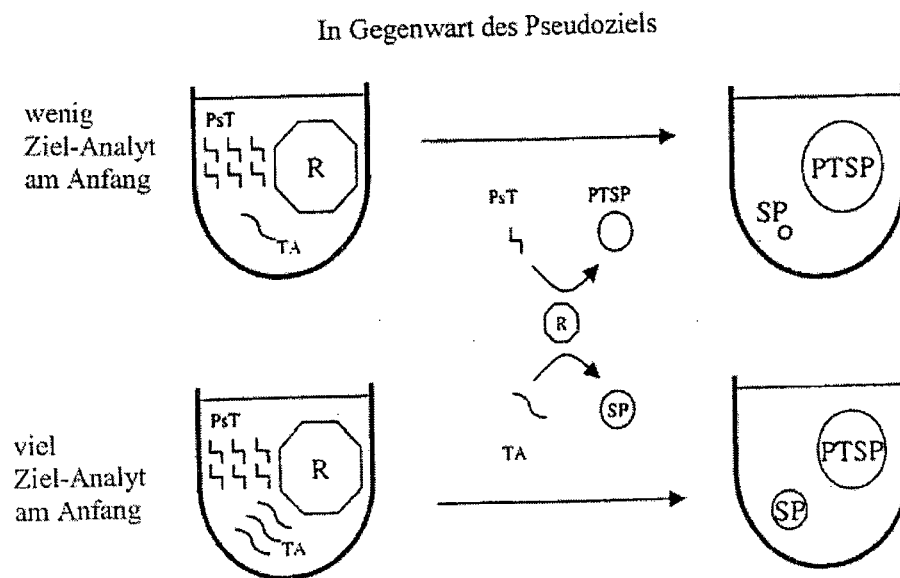


Fig. 3b

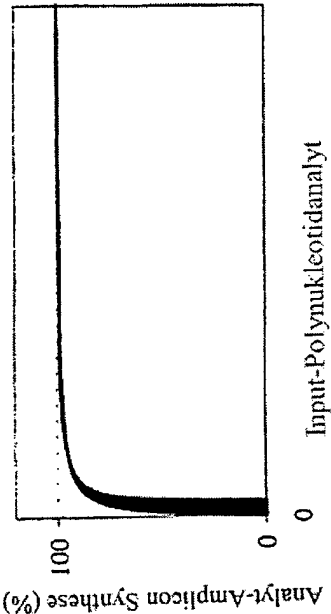


Fig. 4a

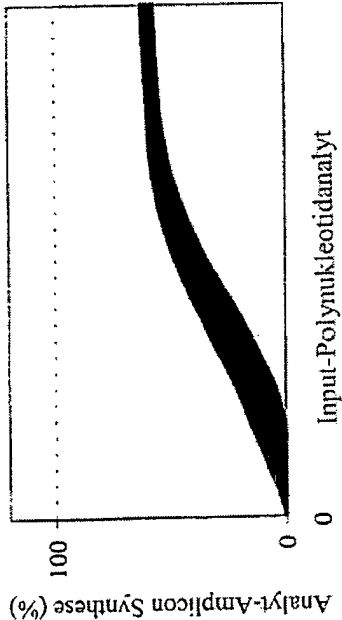


Fig. 4b

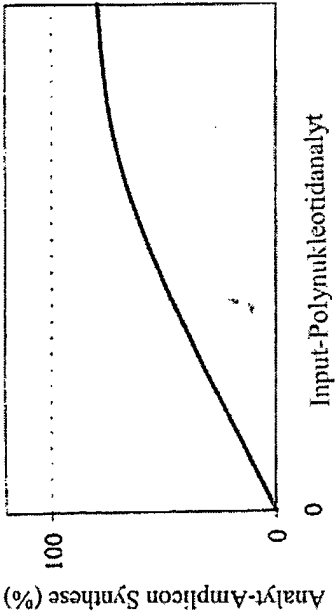


Fig. 4c

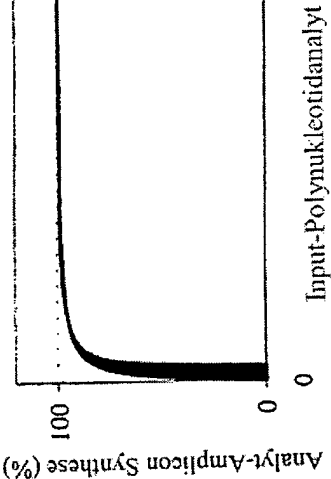


Fig. 4d

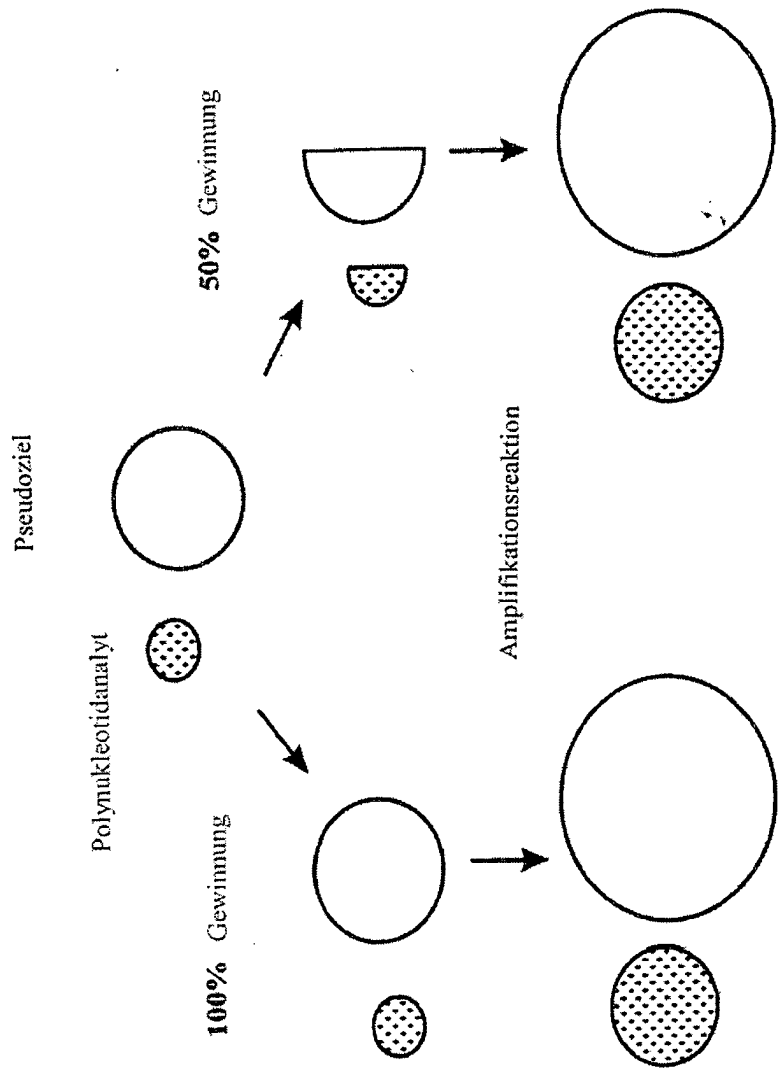
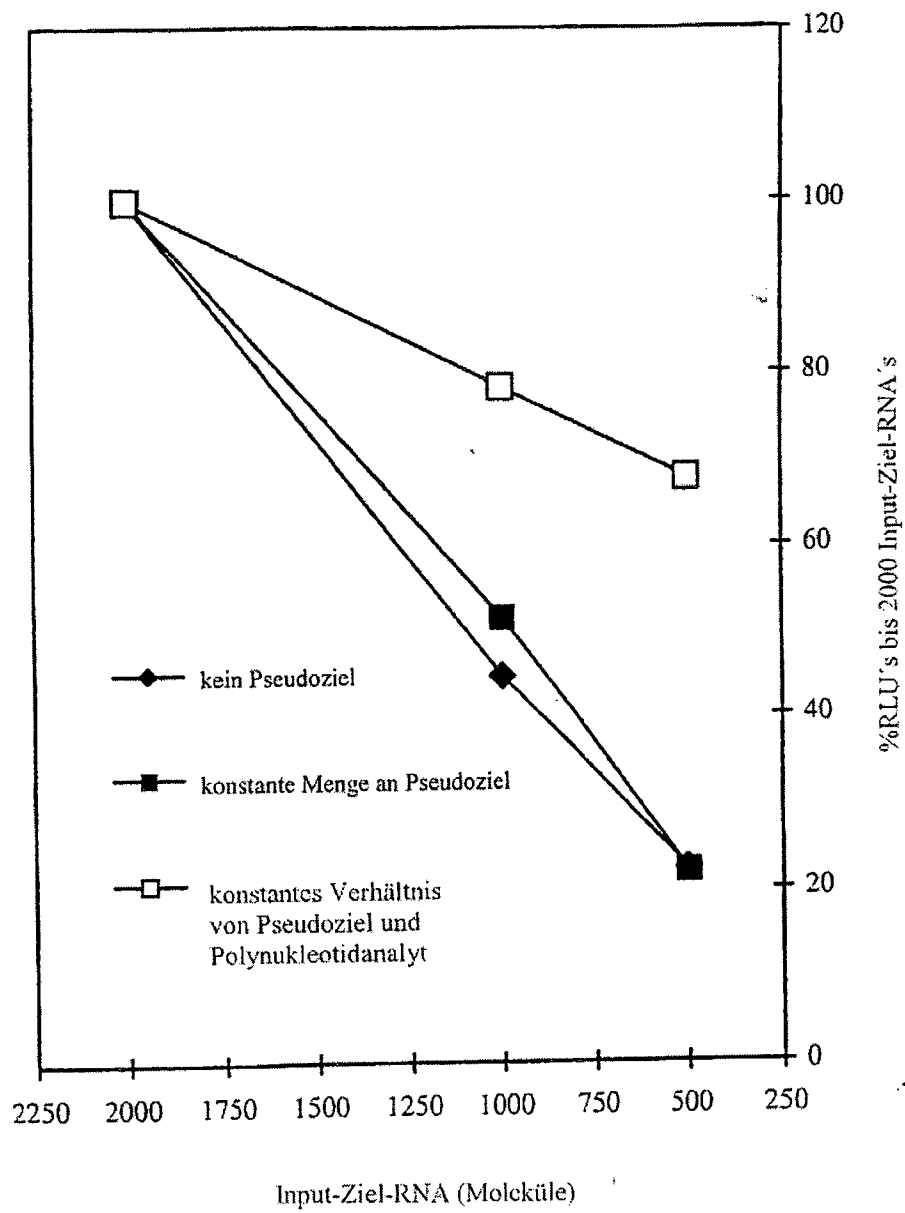


Fig. 5

**Fig. 6**

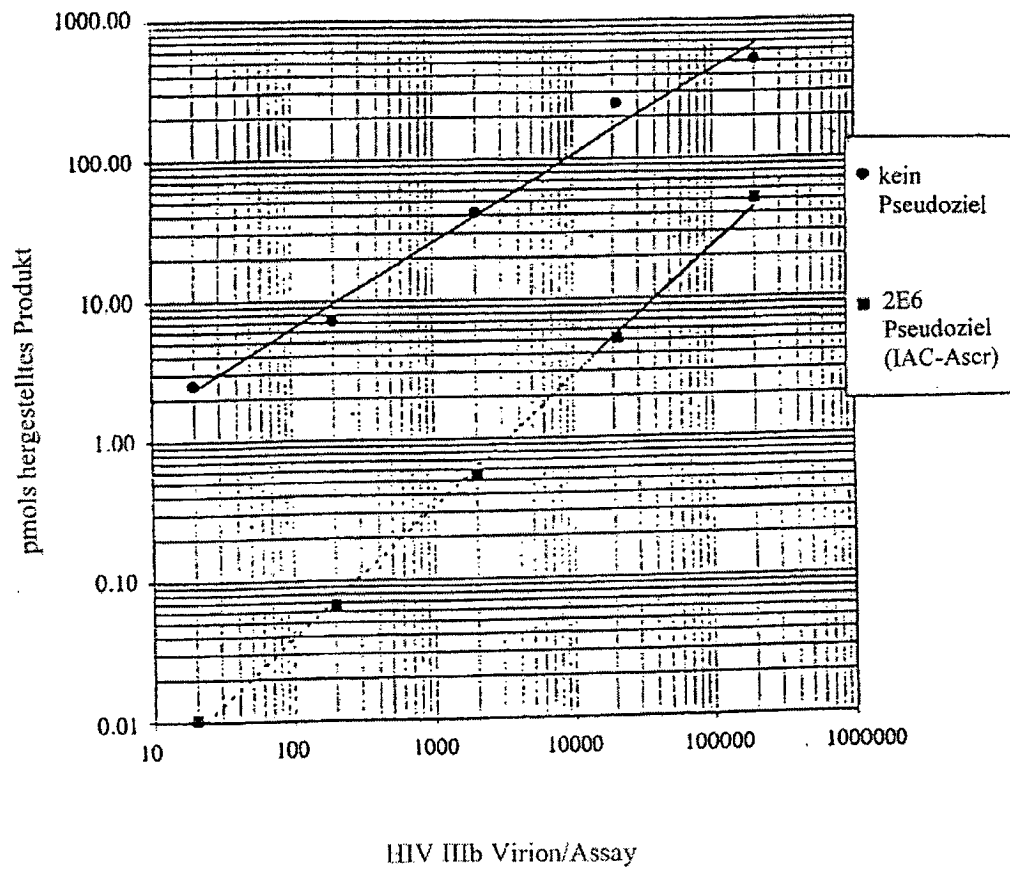


Fig. 7