



(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

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

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

(72) Erfinder:
Nunomura, Kiyotada, Tokyo 188-0013, JP

(74) Vertreter:

Viering, Jentschura & Partner, 80538 München

(54) Bezeichnung: POLYNUKLEOTID- AMPLIKATIONSVERFAHREN

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 eingelebt, 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 Amplifikationsmethoden (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 Untergruppe 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, das 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 Kontaminierung 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 Polymerasenkettenreaktion 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 derivativiert 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-Amplikон 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-Amplikон 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-Amplikон 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-Amplikон für irgendeine aus der Vielzahl von vermischten Proben und ein Analyt-Amplikон für alle der Vielzahl von gemischten Proben, die den Polynukleotidanalyten enthalten, einschließen; (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-Amplikон spezifisch ist jedoch nicht für das Pseudoziel-Amplikон 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-Amplikон 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 diente.

[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 unterscheiden werden können.

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

[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 diente. 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 Reaktionsprodukts 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 Pseudozielle 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 (\blacklozenge); konstante Menge des Pseudoziels (\blacksquare); und konstantes Verhältnis des Pseudoziels und des Polynukleotidanalyten (\square).

[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 (\bullet); und 2×10^6 Kopien des Pseudoziels pro Reaktion (\blacksquare).

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsform

[0042] Ich offenbare hierin, dass Polynukleotid-Amplifikationsreaktionen, die ein Pseudoziel beinhalteten, 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 das 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 Immunschwächerivirus (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 Polynukleotidanalytmatrize, 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 Polynukleotidanalyten 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, das der 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.

Grundlage der verbesserten Präzision und quantitativen Kapazität der Amplifikationsreaktionen

[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 stellen 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](#) dargestellte 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 besserer 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 μl 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, können 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 offebarten Verfahren zu entwerfen. Angesichts dieser Information können verwendbare Pseudoziele, die irgendeiner Zahl von Polynukleotidanalyten entsprechen, die detektiert und quantifiziert werden sollen, hergestellt werden. Beispelanwendungen in denen Pseudoziele in Verbindung mit Po-

Polynukleotid-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 hydrolyseren, 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-Amplikomengen 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 Reagenz pools, 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 Synthesierung 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 µl 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 µl 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 Amplifikationsreaktion 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 Spurenmengen 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-Amplikonsynthese 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 Kugelchen) 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 Kugelchen ersetzt werden kann. Darüber hinaus können die Kugelchen einen Bestandteil in einem Schema zum Reinigen der Matrize darstellen. Zum Beispiel können Kugelchen, die ein darauf aufgelagertes Oligo(dT)-Polynukleotid aufweisen mit einem Zelllysat vermischt werden, so dass Poly(A)⁺-mRNA auf den Kugelchen immobilisiert wird. Daher kann der Komplex, der die Kugelchen und die immobilisierte mRNA enthält, mit Reagenzien und Enzymen kombiniert werden, so dass eine TMA-Reaktion unter Verwendung der mit den Kugelchen als Matrize für die Amplifikation verbundenen RNA durchgeführt werden kann. Unter diesen Bedingungen können die Kugelchen direkt zum Reaktionsgefäß zugegeben werden. Wenn anstelle eines Oligo(dT)-Polynukleotids ein Polynukleotid mit einer anderen Sequenz auf den Kugelchen 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 Kugelchen 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 Zugeben 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 Hintergrundhybridisatormengen 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. malodorus, und E. raffinosus), Haemophilus influenzae, Listeria monocytogenes, Neisseria gonorrhoeae, Staphylococcus aureus, Gruppe B Streptococci, Streptococcus pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium, Mycobacterium intrazellulare, 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 des 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 bevorzugen 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

Schutzmfangs 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. Patent 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 Amplikommenge, 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 AATTTAACGACTCACTATAGGGAGAGTTGTATGTTGCTATTATGTCTA (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 enthält. 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 CCACAATTAAAAGAAAAGGGGGATTGG (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-Amplikons und nicht mit dem Pseudoziel-Amplikons 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 Reaktionsröhren 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 unmarkiertem 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-Acidiniumestermarker 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		
1.0×10^4	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		
1.0×10^5	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		
1.0×10^7	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 Reaktionsrörchen 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 Ziels wurden mit einem entsprechenden Volumen an HIV serologisch negativem Plasma kombiniert. Das Reagenz zum Einfangen des Ziels 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 CCCTGTTCTGCTGGAATAACTTCTGCTTCTATATT-TAAAAAAAAAAAAAA AAAA (SEQ ID NO: 6) aufweist, und 3,5 nM der 2'Methoxy(-)4258 A30-Sonde zum Einfangen, welche die Sequenz TCTGCTGTCCCTGTAATAAACCGTT-TAAAAAAAAAAAAAA (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
1,0x10 ³	100	152313	38630	25,4
1,0x10 ⁴	100	155062	67377	43,5
1,0x10 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 Amplifikonherstellung 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 Reaktionsröhren 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 Reaktionsröhren 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 Röhren in einer Halterung mit Magneten für einen Zeitraum von 5 Minuten isoliert, wobei während dieser Zeit die Kügelchen an der Innenseite jedes Röhrens 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

Reaktionsröhren verteilt, so dass alle Proben im Wesentlichen identische Mengen der auf Kugelchen eingefangen Polynukleotidanalyten enthielten. 10 µl Aliquots des Pseudoziels, die im Einzelprobenpuffer (1 mM EDTA, 10 mM HEPES) verdünnt wurden, wurden auf entsprechende Röhren verteilt. Jedes Aliquot enthielt entweder 0, 2 × 10⁶, 2 × 10⁷ oder 2 × 10⁸ 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 Röhren 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, Lichemissionsauslesungen 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 10⁶, 10⁷ oder 10⁸ 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 Selektionsreagens 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 Kugelchen, als Matrizen für die Amplifikationsreaktion eingefangen wurden, verbessert werden kann.

Tabelle 4

Unterschiedliche Pseudoziele verbessern die Präzision der Analyt-Amplikonherstellung

IAC-Ascr-Pseudoziel 1 (Kopien)	HIV-Virion (Kopien)	net. Durchs.	Amplikon (pmol)	Standard-abweichung (SD)	Variabilitäts-koeffizient (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)	Standard-abweichung (SD)	Variabilitäts-koeffizient (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 gewonnenen 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 geprämt 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 vieres waren die Mengen des Polynukleotidanalyten und des Pseudoziels die in Tabelle 6 dargestellt. 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 CCACAATTTAAAAGAAAAAGGG (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 deklettieren 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 Polynukleotidanalytmatrize 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 Zugeben des Pseudoziels zu einer Probe einschlossen, die ein 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 Magnetkügelchen 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.

Beispiel 6

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 lies 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 Natriummethaarsenid 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 anschließendem 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-IIb-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-IIb-RNA-Äquivalenten-Inputs in einer 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

Qualitative Assayformate

[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 anzusehen, 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 anzugeben, 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 "getun" 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 getun 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 Plasmatiter 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 Ziels 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-Detektionsmethode 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 Lumometers, 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 Schutzmfang 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

aatttaatac gactcaat agggagagt tgtatgtctg ttgttattat gtcta 55

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer (+)4108

<400> 2

acagcagtac 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	ucggcuuggcu	gaagcgcgca	cggcaagagg	cgagggggcg	60
cgacugguga	guacgc当地	aaauuuugacu	agcggaggcu	agaaggagag	agaugggugc	120
gagagcguca	guauuaagcg	ggggagaaau	agaucgaugg	aaaaaaaauuc	gguuaaggcc	180
agggggaaag	aaaaaaauaua	aaauaaaaaca	uauguauugg	gcaagcagg	agcuagaact	240
auucgcgauu	aaucgc当地	uguuagaaac	aucagaaggc	uguagacaaa	uacugggaca	300
gcuacaacca	uccuucaga	caggauacaga	agazcuauga	ucauuauaua	auacaguac	360
aacccucuuau	ugugugcauc	aaaggaua	gauaaaaagac	accaggaaag	cuuulagacaa	420
gauagaggaa	gagcaaaaca	aaaguuagaa	aaaagcacag	caagcagcag	cugacacagg	480
acacagcagu	caggucagcc	aaaauuaccc	uaugugcag	aaacaucagg	ggcaaauggu	540
acaucaggcc	auaucaccua	gaacuuuua	ugcaugggu	aaaguaguag	aagagaaggc	600
uuucagccca	gaaguauuac	ccauguuuuc	agcauuauca	gaaggagcc	ccccacaaaga	660
uuuaaacacc	augcuaaaca	cagugggggg	acaucagca	gcacuagcaa	uguuaaaaaga	720
gaccaucaau	gaggaagcug	cagaauugga	uagaguacau	ccagugcaug	cagggccuau	780
ugcaccaggc	cagaugagag	aaccaaggg	aagugacaua	gcaggaacua	cuaguacccu	840
ucaggaacea	auaggaugga	ugacaaaaua	uccaccuauc	ccaguaggag	aaauuuauua	900
aagauggaua	auccugggau	aaaaaaaau	aguagaaug	uauagccua	ccagcauuu	960
ggacauaaga	caaggaccaa	sagaacuuu	uagagacua	guagaccgu	ucuauaaaac	1020
ucuaagagcc	gagcaagcuu	cacaggaggu	aaaaaaugg	augacagaaa	ccuuguugg	1080
ccaaaaaugcg	aacccagauu	guaagacau	uuuaaaagca	uugggaccag	cgccuacacu	1140

agaagaaaug augacagcau gucaggggagu aggaggaccc gcccuaaagg caagaguuuu 1200
 ggcugaagca augagccaag uaacaaauac agcuaccaua auaugcaga gagggcaauuu 1260
 uaggaaccaa agazaagaugg uuaaguguuu caauuuguggc aaagaaggc acacagccag 1320
 aaauugcagg gcccuuaggaa aaaaggcgug uuggaaauug gaaaaggaaag gacaccaaau 1380
 gaaagauugu acugagagac eggcuaauuu uuuagggaag aucuggccuu ccuacaagg 1440
 aaggccaggg aauuuuucuuc agagcagacc agagccaaac gcccaccau uucuucagag 1500
 cagaccagag ccaacagccc caccacaa ggcuucagg ucgggggug agacaacaac 1560
 uccccucuag aagcaggagc cgauagacaa ggaacugua cccuuuacuu cccucagauc 1620
 acucuuuggc aacgaccccu cguacacaeua aagauaggg gccaacuuaa ggaagcucua 1680
 uuagauacag gaggcagauga uacaguauua gaagaaauga guuugccagg aagauggaa 1740
 caaaaauua uagggggaaau uggagguuuu aucaaaguua gacaguaua ucagauvacuc 1800
 auagaaaucu guggacauua agcuauaggu acaguauuag uaggaccuac accugucaac 1860
 auauuggaa gaaaucuguu gacutagauu gguugcattu uaaauuuucc cazuagccu 1920
 auugagacug uaccaguuaa auuaagccca ggaauuggaag gcccaaaagu uaaacaauugg 1980
 ccauuggacag aaaaaaaaaa aaaaacauua guagaaauuu guacagaaaaa ggaaaaaggaa 2040
 gggaaaaauu caaaaaauugg gccugagaaau ccauacaaua cuccaguauu ugccauaaag 2100
 aaaaaagaca guacuauaugg gagaaaaaauua guagauuuuca gagaacuuua uaagagaacu 2160
 caagacuucu gggaaaguuca auuaggaaua ccacaucccg caggguuaaaa aagaaaaaaa 2220
 ucaguaacag uacuggaauu gggugugcua uauuuuucag uucccuuaga ugaagacuuc 2280
 aggaaguauu cugcauuuac cauaccuagu auuaccaauug agacaccagg gauuagavau 2340
 caguacaua ugcuiuccaca gggauuggaaa ggauccaccag caauauuucca aaguagcaug 2400
 aaaaaauucu uagagccuuu uaaaaaacaaauu aauccagaca uaguuauucua ucaauacauug 2460
 gaugauuugu auuguggauc ugacuuuagaa auagggcagc auagaacaaa aauagaggag 2520
 cugagacaac aucuguuugag guggggacuu accacaccag aaaaaaaaaca ucagaaagaa 2580
 ccuccauucc uuuuggauugg uuaugaacuc cauccugaua auuggagcgu acagccuaaua 2640
 gugcugccag aaaaagacag bauuggccaa gucagauuuu cccagggaau aauuuuaggc aauuccuuega 2700
 ggaaccaaaag cacuacacaga auuaauacca cuaacacaa aagcagacu agaacuggca 2760
 gaaaaacagag agauuucuuaa agaaccagau cauggagugu auuaugaccc aucaaaagac 2820
 uuaauagcag aaauvacagaa gcaggggcaaa ggcacaaugga cauaucuuauu uuaucuagag 2880
 ccauuuuaaa aucugaaaaac agaaaaauau gcaagaauga gggggugccca cuciuaugau 2940
 guaaaaacaaau uaacagaggc agugcaaaaa auaaccacac aagcauagu auaauugggga 3000
 aagacuccua aauuuuaczu acccauacaa aagggaaacau gggaaacau guggacagag 3060
 uauuggcaag ccaccugau uccugagugg gauuuguuua auuacccucc uuuugugaaa 3120
 uuaugguacc aguuuagaaaaa agaaccuuua guaggagcag aaaccuuucua uguagauuggg 3180
 gcagcuaaca gggagacuaa auuagggaaaa gcaggauaug uuacuaacaa aggaagacaa 3240
 aagguguucc cccuaacuaa cacaacaaau cagaaacacug aguuacaagc auuuuuacua 3300
 gcuuuggcagg auucaggauu agaaguuuacac auaguacacag acucacaaaua ugcauuagga 3360
 aucauuaacag cacaaccaga uaaaagugaa ucagguuuuac ucaauuuuuucaau aauagagcag 3420
 uuaauaaaaa aggaaaaggua cuacuuggca uggguaccag cacacaaagg aauuuggagga 3480
 aaugaacaag uagauuauuu auuagauaagg ccaaaagaua uauacacagu auuacauuuu 3540
 gauuuaacc uggccaccugu aguagcaaaaa gaaaauaguag ccagcuguga uaaaugucag 3600
 cuaaaaaggag aagccaugca uggacaagua gacuguaguc cagggauuaug gcaacuagau 3660
 uguacacauu uagaaggaaaa aguuauccug guagcaguuc auguagccag uggauauaua 3720
 gaagcagaag uuuuucccgc agaaacaggc cagggaaacac cuauuuuuuucu uuuuzaauua 3780
 gcagggaaag gcccaguuua aacaauacau acagacaaug gcagcaauuu caccagugcu 3840
 acgguaagg ccggccguug ccccaaaaguc aaggaaguug auaacuuauu uaaagaaaaa uauaggacag 3900
 guaagagauc aggugacaca ucuuaagaca gcaguacaaa uggcaguauu cauccacaaau 3960
 uuuuuaagaa aaggggggau ugggggguauc agugcagggg aagaaaaauu agacauuaaua 4020
 gcaacagaca uacaaacuaa agaaauuacaa azacaaauua caaaaaauuca zaaauuuuucgg 4080
 guuuuuuacca gggacaggc aauuccacuu uggggaaaggc cagcaaaagc ccucuggaaa 4140
 ggugaaagggg caguauuaau acaagavaau agugacauaa aaguagugcc aagaagaaaa 4200
 gcaaaagaua uuggggauua uggaasacag ugugcaggug augauuugugu ggcaaguaga 4260
 cagoaugagg auuagaacau ggggggggg auaauuacac cauauguaug uuuucaggaa 4320
 agcuaggga ugguuuuaua gacauacaua ugaaaaggccu cauccaagaa uaaagucaga 4380
 aguacacauu ccacuagggg augcuagauu gguauuaaca acauauuugg gugcugcauac 4440
 aggagaaaga gacuggcauu ugguccagg agucuccaua gaauggagga aaaagagaua 4500
 uagcacacaa guagacccug aacuagcaga ccaacuuauu caucuguaau acuuuugacug 4560
 uuuuucagac ucugcuauua gaaaggccuu auuaggacac auaguuagcc cuagguguga 4620
 auuacacagca ggacauuaaca agguaggauc ucuacacauac uuggcaguaua cagcauuaua 4680
 aacacaaaaa aagauuaagc caccuuugcc uaguguuacg aacacugacag aggauuagau 4740
 gaacaagccc cagaagacca agggccacag agggagccac acaauuaug gacacuagag 4800
 cuuuuagagg agcuuaagaa ugaagcuguu agacauuuuuc cuaggauuug gcuccauggc 4860
 uuaggcuaac auuacuauga aacuuuuggg gauacuuggg caggagugga agccauuaaua 4920
 5040
 5100

agaauuuucugc aacaacugcu	guuuuuuccau uuuucagaaau	gggugugcgc ac auagcagaau	5160
aggcgguuacu cgacagagga	gagcaagaaa uggagccagu	agauuccuaga cuagagccu	5220
ggaagcaucc aggaagucag	ccuaaaaacug cuuguaccaa	uugcuauuggu aaaaaguguu	5280
gcuuuucauug ccaagguuugu	uucauaacaa aagccuagg	caucuccuau ggcaggaaga	5340
agcgaggagaca ggcacgaaga	ccuccuacag gcagucagac	ucaucaaguu ucucuaucaa	5400
agcaguaagu aquacauqua	augcaaccu uacaaauagc	aauaguaguca uaguaguag	5460
caauuaauaa agcaauuaguu	guguggucca uaguauaucu	agaaauuagg aaaaauuuua	5520
gacaagaaaa aauagacagg	uuauuugava gacuaauaga	aagagcagaa gacaguggca	5580
augagaguga aggagaaaaa	ucagcacuvg ugagaguggg	ggugggagaug gggcaccaug	5640
cuccuuggga uguguaugau	cuguagugu acagaaaaau	ugugggucac agucuaauuau	5700
gggguaccu uguggaagga	agcaaccuc acucuauuu	gugcaucaga ugcuaaaagca	5760
uaugauacag agguacauaa	uguuugggac acacaugecu	guguacccac agaccccaac	5820
ccacaagaag uaguauuggu	aaauvgugaca gaaaauuuua	acauguggaa aauugacauug	5880
guagaacaga ugcuaugagga	uauuaucagu uuaugggauc	aaagccuaaa gccaugugua	5940
aaauuaaccc cacucugugu	uaguuaauaag ugcacugauu	ugaagaauuga uacuaauacc	6000
aauguauqua gcccggagaa	gauuauggag aaaggagaga	aaaaaacug cucuuucaau	6060
aucagcacaa gcauaagagg	uaaggugcag aagaauaugg	cauuuuuuua uaaacuugau	6120
auuaauacca uagauuauga	uacuaccagc uauacuuga	caaguugvua caccucaguc	6180
auuacacagg ccuuguccaa	gguauccuuu gagccaaauuc	ccauacauua wugugccccc	6240
gcugguuuug cgauuucuaaa	auguaauaaau aagacguuca	auggaacagg accauguaca	6300
aaugucagca caguacaaug	uacacauugg auuaggccag	uaguaucaac ucaacugcug	6360
uuuaauuggc gucuggcaga	agaagggua guauuuuagu	cugccaaauuu cacagacaaau	6420
gcuaauacca uaauaguaca	gcuguaacaa ucuguagaaa	uuaauwguac aagaccccaac	6480
aacaauacaa gaaaauuaguu	ccguauccag agaggaccag	ggagagcauu uguuacaaaua	6540
ggaaaaauuag gaaauauagag	acaagcacau uguuacauua	guagagcaaa auggaauuac	6600
acuuuuaaac agauauaguag	caaauuaaga gaacaauuug	gaaaauuaua aacaauuauc	6660
uuuaagcagu ccuucaggagg	ggacccagaa auuguaacgc	acaguuuuuua uuguggaggg	6720
gaauuuuucu acuguaauuc	aacacaacug uuuuaauuga	cuugguuuuaa uaguacuugg	6780
aguacuaaag gguuauuaa	cacugaaggag agugacacaa	ucacccuccu augcagaaaua	6840
aaacaaauua uaaacauugug	gcaggaaguu gggaaagcaa	uguaugcccc ucccaucagu	6900
ggacaaauua gauguucauc	aaauuuuaca gggcugcuau	uaacaagaga uguggguaav	6960
agcaacaaug aguccgagau	cuucagaccu ggaggaggag	auaugaggga caauuggaga	7020
agugauuuau auuaauuaaa	aguauuuaa auugaaccu	uaggaguagc accccaccaag	7080
gcaaaagagaa gaguggugca	gagagaaaaa agagcagugg	gaauaggagc uuguguccuu	7140
ggguuucuugg gagcaggcagg	aagcacaua ggcgcagcgu	caugacgcu gacgguacag	7200
gccagacaaau uauugucugg	uauagugcag cagcagaaca	uuuuggcugag ggcuaauugag	7260
gchgcaacagc aucuguugca	acucacaguc uggggcauca	agcagcucca ggcaagaauc	7320
cuggcugugg aaagauaccu	aaaggaucaa cagcuccugg	ggauuugggg uggcucugga	7380
aaacucauuu gcaaccacugc	ugugccuugg aaugcuagu	ggaguauuaa auctucuggaa	7440
cagaauuugga auuacaugac	cuggaaggag uggcagacag	aaauuaacaa uacacaagc	7500
uuuaauacacu ccuuaauuga	agaaucgcac aaccagcaag	aaaagaauga acaagaaauua	7560
uuggaaauug auaauuugggc	aauugugugg aauugguuua	acauuacaaa uuggcugugg	7620
uaauuaauau uauucauaau	gauaguagga ggcuugguag	guuuuagaaau aguuuuugcu	7680
guacuuuucug uagugauauag	aguuaggcag ggauauucac	cauuuucguu ucagacccac	7740
cucccaaucc cgaggggacc	cgacaggccc gaaggaaauag	aagaagaagg ugugagagaa	7800
gacagagaca gauccauucg	aauugugac aggacuccuag	cacuuuucug ggcgaucug	7860
cgaggcugu gccuucuucag	cuaccacccg uuqagagacu	uacuucuugau uguuacgagg	7920
auuguggaaac uuucugggacg	cagggggugg gaagccuca	aaauuuggug gazuuccua	7980
caguauugga gucaggagcu	aaagaaauagu gcuuuuagcu	ugcuuauugc cacagcuaua	8040
gcaguagcug aggggacac	uaggguuuaa gaeguaguac	aaggagcuuu uagagcuauu	8100
cgcccacauac cuagaagaaa	aagacagggc uuggaaaggag	uuuugcuaua agauggggugg	8160
caagugguca aaaaauugug	ugguuggug ggcugugua	aggaaaaaa ugagacggagc	8220
ugagcagca gcaagauuggg	ugggagcagc auctucagac	cuagaaaaac auggagcaau	8280
cacaaguagc aacacagcag	cuuacaaucg uguuugugcc	uggguuaggc cacaagagga	8340
ggaggaggug gguuuuuccag	ucacaccuca gguuccuuua	agaccaauua cuuacaggc	8400
agcuguagau cuuagccacu	uuuuuuaaga aaaggggggc	cuggaagggc uauuucacuc	8460
ccaaacgaaaa caagauaucc	uugauuugug gauuuuac	acacaaggcu acuuuccuug	8520
uuagcagaac uacacacccag	ggccaggggau cagauuacca	cugaccuuug gauggugcu	8580
caagcuaqua ccaguugagc	cagagaaguu agaagaagcc	aacaaaggag agaacaccag	8640
cuuuguuucac ccugugagcc	ugcauggaaau ggaugacccg	gagagagaag uguuagagug	8700
gaggguuugac agcccccuaag	cäuucucauca cauggccca	gagcugcauc cgagauacuu	8760
caagaacuuc gacauucgag	cuugcuacaa gggactuuuc	cgccaggggac uuccaggggag	8820
gcguggccug ggcgggacug	gggagugggcg agcccucaga	uccugcaau aagcagcugc	8880
uuuuuugccug uacuggguuucu	cucugguuug accagauucug	accugggag 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
 gaggcucucuc gacgcaggac ucggcuugcu gaagcgcgca cggcaagagg cgagggcg 60
 cgacugguga guacgccaaa aauuuugacu agcggaggcu agaaggagag agaugggugc 120
 gagagcguca guauuaagcg ggggagaauu agaucgaugg gaaaaaaauuc gguuaaggcc 180
 agggggaaag aaaaaauua auuuaaaaca uauaguauugg gcaagcaggc agcuagaacg 240
 auucgcaguu aauccuggcc uguuagaaac aucagaaggc uguagacaaa uacugggaca 300
 gcuacaacca ucuccuucaga caggauacg agaacuuaga ucauuauua auaacaguac 360
 aaccucuau ugugugcauc aaaggauaga gauaaaaagac accaaggaag cuuwigacaa 420
 gauagggaa gacaaaaca aaaguaagaa aaaagcacag caagcaggcug cugacacagg 480
 acacagcagu caggucagcc aaaaauacc uauagugcag aacauccagg ggc当地auggu 540
 acaucaggcc auaucuccua gaacuuuaa ugcauugguu aauguagaa aagagaaggc 600
 uuucagccca gaaguaauac ccauguuuuc agcauuucauca gaggagccccc当地aaga 660
 uuuuacacc augcuuacaa cagugggggg acaucaacg gccaugcaaa uguuuaaaga 720
 gaccucaau gaggaaugc uagaguacau ccagugcaug cagggccuau 780
 ugcaccaggc cagaugagag aaccaagggg aagugacaua gcaggaacua cuaguacccu 840
 ucaggaaacaa auaggaugga ugaacaaaua uccaccuauc ccaguaggag aaaaaauuaa 900
 aagauvgaua auccugggau uaaaaaaaua aguaagaau uauagccua ccagcauuu 960
 ggacauaaga caaggacaa aagaacuuu uagagacaua guagacccgg ucuuuaaac 1020
 ucuaagagcc gaccaagcuu cacaggagg uaaaaauugg augecagaaa cciuugguu 1080
 caaaaaugcg aacccagauu guaagacauu uuuuuaagca uugggaccag cggcuacacu 1140
 agaagaaauug augacagcau gucagggagu aggaggaccc ggc当地aaggc当地aaguuu 1200
 ggc当地aaggca augagccaa uaaaaaaac agcucaccau augaugcaga gaggcauuu 1260
 uaggaaccaa agaaaagauugg uuaaguguu caauugugc aaagaaggc当地aagccag 1320
 aaauugcagg gccccuugc uuggaaauug gggaaaggaa gacaccaau 1380
 gaaagauugu acugagagac aggc当地aauu uuuuagggaa auctuggccu cciuacagg 1440
 aaggccaggg aauuuuucuuc agagcagacc agagccaaaca gccc当地aaccu uucuucagag 1500
 cagaccagag ccaacagccc caccagaaga gagcucucagg ucugggguag agacaacaac 1560
 ucccccucag aagcaggagc cgauagacaa ggaacuguuu cciuuaacuu cccucagac 1620
 acucuuuggg aacgccccu cgucacaaau aagauagggg ggc当地aaccu ggaaggcucua 1680
 uuagauacag gacgagaua uacaguauua gaagaaaua guuugccagg aagauggaaa 1740
 caaaaauuga uagggggauu ugggguuu aucaaaaguua gacaguaua ucagauacu 1800
 auagaaauucu guggacauaa agcuauaggu acaguauuag uaggacuuac accugucac 1860
 auaaauuggaa gaaauucuuu gacucaguuu ggiuugcaciuu uaaaaauucc cauuagccu 1920
 auugagacuc uaccaguuaa auuuaaggcc ggaugugau gcc当地aaccu uaaacaauugg 1980
 ccauacacag aaaaaaaaaa aaaaacaua guagaaaauu guacagaaaa gggaaaaggaa 2040
 gggaaaauuu caaaaaauugg gccugagaa ccauacaua cucaguauu ugccauaaag 2100
 aaaaaagaca guacuuaauu gaaaaaaaua guagauuuca gagaacuuua uaagagaacu 2160
 caagacuucu gggaaaguua auuaggaa ccacauccc caggguuuua aaagaaaaaa 2220
 ucaguacacg uacugggaugu gggugugc uuuuuuucag ucccuuaga ugaagacuu 2280
 aggaaguuaa cugcauuuac cauaccau uaaaaacaaag agacaccagg gauuagauau 2340
 caguacaaug ugcuuccaca ggggauggaa ggaucaccc caauauucca aaguagcaug 2400
 aaaaaaaucu vagagccuuu uaaaaacaa aauccagaca uaguauucua ucaauuacau 2460
 gaugauuugg auquagggauuc ugacuuagaa auaggcagc auagaacaaa aauagaggag 2520
 cugagacaaac aucuguuugag guggggacuu accacaccag aaaaaacaca ucagaaaggaa 2580
 cccuccauucc uuggggauuggg uuauugaacuc cauccugaua auggacagu acagccuaau 2640
 gugcugccag aaaaagacacg cuggacugc aaugacauac agaaguauu gggaaaauug 2700
 aauuggggca guacauuuu cccaggauu baaguaaggc aauuauguua acuccuuaga 2760
 ggaacaaag cacuacaga aguuauacca cuacacaaag aagcagacu agaacuggca 2820
 gaaaacagag agauucuaaa agaaccagua caugugagugu auuuugaccc auaaaaagac 2880
 uuaauagcag aaaaacagaa gcaggggca ggc当地augga caauucaaa uuaucagag 2940
 ccauuuaaaa auctugaaaac aggaaaaauu gcaagaauga gggugccca cacuuaugau 3000
 guaaaaacau uaacagaggc agugaaaaaa auaaccacag aaagcauagu auaauuggg 3060
 aagacuccua aauuuuaacu acccauacaa aaggaaacau gggaaacau guggacagag 3120

uaauuggcaag ccaccuggau uccugagugg gaguuuuguua auaccccucc	3180
uuauugguacc aguuuagagaa agaaccuaa guaggagcag aaaccuucaa uguagauggg	3240
gcagcuaaca gggagacuaa auuagaaaaa gcaggauang uuacuaacaa aggaagacaa	3300
aaggiuugucc cccuaacua cacaacaaa cagaaaacug aguuacaagc aauuuuauca	3360
gcuuugcagg auucaggaua agaaguääac auaguaacag acucacaa ugcavuaggä	3420
aucauucaag cacaaccaga uaaaugugaa ucagaguäg ucaaucaaa auuagagcag	3480
uuauaaaaaa aggaaaaggwu cuaucuggca ugguuaccag cacacaaagg aauuggagga	3540
aaugaacaag uagauaauuu agucagugcu ggaucagga aauuacuaauu uuugagugga	3600
auagauaagg cccaagauga acaugagaaa uaucacagua auuggagagc auggcagu	3660
gauuuuaacc ugcccacuugu aguagcaaaa gaaauaguag ccagcuguga uaaaugucag	3720
cuaaaaggag aagccaugca ugacaaagua gacuguaguc caggaauang gcaacuagau	3780
uguacacauu uagaaggaaa aguuauccug guagcaguuc avgugccag uggaauauua	3840
gaagcagaag uuauuccage agaaacaggc caggaacagc cauauuuuucu uuuaauua	3900
gcaggaagau ggccaguuaa bacauauacau acagacaaug gcagcaauu caccagugcu	3960
acgguaaagg cgcgcugug gugggcggga aucaagcagg aauuugggaa uccuacaaau	4020
ccccaaaguc aaggaguagu agaaucuaug aauuagaauu uaaagaaau uauaggacag	4080
quaagagauc aggcuugaaca ucuuuagaca gcaguacaa ugacaguauu caucuacaa	4140
cuuagaagau agagagggau uggggguac agugcagggg aagaaauagu agacauauua	4200
gcaacagaca uacaaacuaa agaauuacaa aaacaauua caaaaaauuca aaauuuucgg	4260
guuuuauuaca gggacagcag aauuccacuu ugaaaaggac cagcaagc cuucuggaaa	4320
ggugaagggg caguauauu acaagauau agucacaua aaguagugcc aagaagaaaa	4380
gcaagaauca uuaggauua uggaaacag auggcaggug augauuugug ggcagauaga	4440
caggaugagg auuagaacau ggaaauuuu aguauuacac cauauuguug uucaggggaa	4500
agcuagggga ugguuuuaua gacauacua ugaaagccu cauccaaga uaaguucaga	4560
aguacacaua ccauagggg augcuagauu gguauuaaca acauauuggg gucugcauac	4620
aggagaaaga gacuggcavu uggcucaggg agucuccava gaauggagga aaaagagaua	4680
uagcacacaa guagacccug aacuagcaga ccaacuaauu caucuguauu acuuugacug	4740
uuuuuucagac ucugcuuuaa gaaaggccuu auuaggacac auaguauagcc cuagguguga	4800
auaucuagca ggacauuaaca agguagacu ucuacauac uggcucuac cagcauuaau	4860
aacacaaaaa aagauuacu caccuuuugc uagguuuacg aaacugacac aggauagau	4920
gaacaagccc cagaagacca agggccacag agggagccac acaauuauu gacacuagag	4980
cuuuuaggg agcuuaagaa ugaagcuguu agacauuuuc cuaggauug gcuuccauggc	5040
uuaggggcaac auaucuaua aacuuauugg gauacuuggg caggagugga agccauuaau	5100
agaauuucuge aacaacugcu guuuuuccau uuucagaaauu gggugugcag auagcagaau	5160
aggcguiacu cgacagagga gagcaagaaa uggagccagu agauuccuaga cuagagccu	5220
ggaagcaucc aggaagucag ccaaaaaacug cuuguaccaa uggcuauug aaaaaguguu	5280
gcuuuucauug ccaaguuuug uucauuacaa aagccuugg caucuccuau ggcaggaaaga	5340
agcggagaca gcgatcgaga cccuccuac gcatcugac ucauacagu ucucuaucaa	5400
agcaguaua aguacauua augcaaccua uacaaauacg aauugugca uaguauuag	5460
caauuuauau agcaauauu guguggucca uaguauacau agauauauagg aaaaauuuua	5520
gacaaagaaa aauagcagg uuaauugaua gacuuauaga aagagcaga gacaguggca	5580
augagaguga aggagaaaaa ucagcacuug ugagaguggg gguggagag gggcaccaug	5640
cuccuuggg uguugaua cguagugcu acagaaaaau uggggucac agucuauuu	5700
ggguuaccug uguggaaggag agcaaccacc acucuuuuu gugcaucaga ugcuuaagca	5760
uaugeuacag agguacauua uguuuggg acacaugccu guguacccac agaccccaac	5820
ccacaagaag uguauuuggu aauugugaca gaaaaauuuu acauguggas aauugacau	5880
guagaacaga ugcuugagga uauuaucagu uuauugggauc aagccuuaaa gccaugugua	5940
aaauuaaccc cacucugugu uguuuuuaag ugcacugauu ugaagaauua uacuauuacc	6000
aauguauua gcccggagaaau gauauuggag aaaggagaga uaaaaaacuuc cucuuucaau	6060
aucagcacaa gcauaagagg uaaggugcag aaagaauauu cauuuuuuua uaaacuugau	6120
aaauuaccaa uagauuauga uacuaccacg uauacguua caaguugua caccucaguc	6180
auuacacagg ccuguccaa gguauuccu gaggccauu ccauacauua uuguggcccg	6240
gcugguuuug cgaauuuaaa auguauuaau aagacguuca uggcaacagg accauguaca	6300
aaugucagca caguacaaug uacacauug aauuaggccag uaguaucac ucaacugcug	6360
uuuaauuggca guguggcaga agaagagguu guauuugau cugccaaauu cacagacaa	6420
gcuuaaccca uauauuacu gcuuacccaa ucuguagaaa uuauuuguac aagacccaa	6480
aacaauccaa gaaaaaguau ccguauccag agaggaccag ggagggccu uguuacauua	6540
ggaaaaauag gaaaaauugag acaagcacau uguuacauua guagagcää auggauuaac	6600
acuuuuaacu agauuagauag caauuaaga gaaacauuug gaaauuaauu aacaauuauc	6660
uuuaaggcau ccucaggagg ggacccagaa avuguaacgc acaguuuuuu uuguggaggg	6720
gaauuuuuucu acuguaauuc aacacaacug uuuuauuaua cuugguuuaau uaguacuugg	6780
aguacuaauag gcuuacauua cacugaagga agugacacaa ucacccuccc augcagaaua	6840
aaacaaaaau uaaacauugug gcaggaaagua ggaaaaggca uguauugccccc ucccacuagu	6900
ggacaaauua gauguucauc aaauauuaca gggcugcuau uaacaagaga uggugguaau	6960
agcaacaauug aguccgagau cuucagaccu ggaggaggag auuugagggg caauuggaga	7020
agugaauua auaaaaauaa aguaguaaaa auugaaccau uaggaguagc accccaccaag	7080

gcaaagagaa gaguggugca gagagaaaaaa agagcagugg gaaauaggagc uuuguuccuu	7140
ggguucuugg gaggcagg aagcacuaug ggccgcgcu caaugacgcu gacgguacag	7200
gcccagacaau uauugucugg uauagugcag cagcagaaca auuugcugag ggcuaauugag	7260
gcccacgc aucuguugca acucacaguc ugcccgauc aagcagcucca ggcaagaauc	7320
cuggcugugg aaagauaccu aaaggaucaa cagcuccugg ggauuugggg uugcucugga	7380
aaacucauuu gcaccacugc ugugccuugg aaugcuagu ggaguauuaaucucuggaa	7440
cagauuugga avaaacaugac cuggauggag uggaacagag aaaaacaaacaa uuacacaagc	7500
uuauuacacu ccuuaauuga agaaucgca aaccagcaag aaaagaauga acaagaauua	7560
uuggaaauag avaaaugggc aaguuugugg aauugguuua acavaaacaaa uuggcugugg	7620
uauauaaaau uaucauaua gauaguagg ggcuungguag guuuuagaau aguuuuugcu	7680
guacuucuc ugugaaauag aguuaggcag ggauauucac cauiaucguu ucagacccac	7740
cucccaaucc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaaug aagaagaagg ugagagaga	7800
gacagagaca gauccauucg aauugugac ggaucuuag cacuuauucug ggacgaucug	7860
cggagccugu gccucuucag cuaccacccg uugagagacu uacucuugau uguacgagg	7920
auuguggaac uucugggacg cagggggugg gaagcccuca aauauuggug gaaucuccua	7980
caguauugga gucaggagcu aaagaauagu gcuguuageu ugcucaauugc cacagcuaua	8040
gcaguagcug aggacagaga uaggguuaua gaaguaguac aaggagcuaa uagagcuauu	8100
cgccacauac cuagaaagz aagacaggc uuggaaaggaa uuuugcuua agaugggugg	8160
caagugguca aaaagugug ugguuggug gcccugugva agggaaagaa ugagacgagc	8220
ugagccagca gcagaugggg ugggagcagc aucsugagc cuagaaaaac auggagcaau	8280
cacaaguagc aacacagcag cuacaaugc ugauugugcc uggcuagaag cacaagagga	8340
ggaggaggug gguuuuccag ucacaccuca gguaccuuua agaccaaua cuuacaaggc	8400
agcuguaag cuuagccacu uuuuaaaaga aaagggggga cuggaaggc uuuuucacuc	8460
ccaacgaaga caagauaucc uugaucugug gaucuaccac acacaaggcu acuucccuga	8520
uuagcagaac uacacccagg gcccagggaug cagauaucca cugaccuuug gauggugcua	8580
caagcuaua ccaguugagc cagagaaguu agaagaagcc aacaaaggag agaacaccag	8640
cuuguuacac ceugugagcc ugcauggaa ggaugacccg gagagagaag uguuagagug	8700
gagguuugac agccgcuag cauuucauca cauggccga gaggugcauc cggaguacuu	8760
caagaacuge ugacauucgag cuugcuacaa gggacuucc gcuggggacu uuccaggag	8820
gcguggccug ggccggacug eggaguggcg agccucag auccugcauau aagcagcugc	8880
uuuuugccug uacugggucu cucugguuag accagauucug agccugggag ctc	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
ccacaattttt aaaagaaaaag gggggatctgg 30

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

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

<400> 6
ccctgtttct gctggataa ctcttgttcc tttatattaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
aaaaaaaaa 67

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

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

<400> 7
tctgtgtcc ctgtataaaa cccgtttaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 57

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

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

<400> 8
ccacaatttt aaaagaaaaag 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 gaagcgccca	cgccaagagg cgagggggcg	60
cgacugguga guacgccccaa aauuuugacu agcggaggcu	agaaggagag agauggugc	120
gagaggcguca guauuaagcg ggggagaauu agaucauagg	gaaaaaaawuc gguuaaggcc	180
agggggaaag aaaaaauaua aauuaaaaaca uauaguaugg	gcaagcaggg agcuuagaacg	240
auucgcgauu auuccuggcc uguuugaaac aucagaaggc	uguagacaaa uacuugggaca	300
gcuacaacca ucccuucaga caggauacaga agaacuua	ucauuauaua avacaguagc	360
aaccucuau ugugugcauc aaaggauaga gauaaaagaa	accaggaaag cuuuuagacaa	420
gauagaggaa gacaaaaca aaaguuaagaa aaaaagcacag	caacaggcag cugacacagg	480
acacagcagu cagugcagcc aaaaauaccc uauagugcag	aacaucagg ggc当地auggu	540
acaucaggcc auaucaccua gaacuuuaaa ugcauggua	aaaguaguag aagagaaggc	600
uuucagccca gaaguauauc ccauguuuuc agcauuauca	gaaggagccca ccccacaaga	660
uuuaaacacc augcuuaua caguggggg acauacaga	gccaugccaa uguuuaaaaaga	720
gaccuauauu gaggaaggcug cagauugggaa uagaguau	ccagugcaug cagggccuuu	780
ugcaccaggc cagaugagag aaccagggg aaugacaua	gcaggacaua cuaguacccu	840
ucaggaacaa auaggauuga ugacaaaaua uccaccua	ccaguaggag aaaaauuaaua	900
aagauggaua auccugggau uaaaaauaaa aguaagaau	uauagcccua ccagcauucu	960
ggacuauaga caaggaccaa aagaacuuu uagagacaua	guagacccgu ucuuauaaac	1020
ucuaaggagcc gagcaaguu cacaggaggwu aaaaauugg	augacagaaa cciuugvuggu	1080
ccaaaaaugcg aaccggauu guagacauu uuuuuaagca	uugggaccag cggcuacacu	1140
agaagaaaug augacagcau gucaggaggu aggaggaccc	ggccauaagg caagguuuu	1200
ggcugaagca augagccaaq uaacaaauac agcuaccaua	augaugcaga gaggcaauuu	1260
uaggaaccaa agaaagaugg uuaagguuu caauuguggc	aaagaaggc acacagccag	1320
aaauuugcagg gccccuagga aaaaaggcug uuggaaau	ggaaaggaaag gacacccaaa	1380
gaaagauvgu acugagagac aggcuaauuu uuuaggaaag	ggaaaggaaag cciuacaagg	1440
aaggccaggc aauuuuucuuc agagcagacc agagccaa	gccccaccau uucuucagag	1500
cagaccaggg ccaacagccc caccagaaga gagcuu	cagg ucugggguaag agacaacaa	1560
ucccccucag aaggaggage cgauagacaa ggaacuguau	ccuuuubacuu cccucagau	1620
acucuuuggc aacgaccccu cgucacaaa aagauagggg	ggcaacuaaa ggaagcucua	1680
uuagauacag gagcagauga uacguauua gaagaaau	guuugccagg aagauggaaa	1740
ccaaaaaua uaggggggau uggggguuu aucaaaauaa	gacaguaua uacguuacuc	1800
auagaaaucu guggacauaa agcuuaggwu acaguauu	uaggaccuac accuguuac	1860
auaaauugga gaaucuguu gacucagauu gguugcacuu	uaaaauuucc cauuagccu	1920
auugagacug uaccaguaaa auuaagccu ggaauuggau	gcccggaaau uaaacaauugg	1980
ccauugacag aagaaaaaaa aaaagcauua guagaaauu	guacagaaaa gggaaaaggaa	2040
ggggaaaauuu caaaaauugg gccugagaa ccauacaa	ccauacaa cuccaguau ugc当地aaag	2100
aaaaaaagaca guacuaua gaaaaauua guagauuuca	gagaacuuua uaagagaacu	2160

caagacuuuc gggaaaguuca auuaggaaaua ccacaucccg caggguuuaaa aaagaaaaaa 2220
 ucaguaacag uacuggaugu gggugugc uauuuuucag uuccuuuaga ugaagacuuc 2280
 aggaaguaua cugcauuuac cauaccuagu auaaaacaug agacaccagg gauuagauau 2340
 caguacaug ugcuuccaca ggggauggaa ggaucaccag caauauucca aaguagcaug 2400
 acaaaaacu uagagccuuu uaaaaaacaa aauccagac uaguuaucua ucaaauacaug 2460
 gaugauuugu auguaggauc ugacuuuaga auagggcgc auagaacaaa aauagaggag 2520
 cugagacaaac aucuguugag guggggacu accacaccag aaaaaaaaaa ucagaagaa 2580
 ccuccauucc uuuggauggg uuaugaacu cauccugaua auggacagu acagccuaua 2640
 gugcugccag aaaaagacag cuggacuguc aaugacauac agaaguuuagu ggggaaauug 2700
 aauugggcaz gucagauuu gccagggauu aaaguaaggc aauuauguaa acuccuuaga 2760
 ggaaccaaag cacuaacaga aguaauacca cuaacagaag aagcagagc agaacuggca 2820
 gaaaacagag agauucuaaa agaaccaguia cauggagugu auuaugaccc aucsaaagac 2880
 uuaauvagc aaaaacagaa gcaggggccaa ggc当地caugga cauaucaaaau uuaucagag 2940
 ccuuuuuaaa aucugaaaaac aggaaaaaua gcaagaauga gggggccca cacuaugau 3000
 guaaaaacau uaacagaggc agugaaaaa auaaccacag aaagcauagu aauaugggga 3060
 aagacuccua auuuuuuaacu accccauacaa aagggaaacau gggaaacaaug guggacagag 3120
 uauuggcaag ccaccuggau uccugagugg gaguuuuguua auaccccucc uuuagugaaa 3180
 uuaugguacc aguuuagagaa agaaccacaua guaggagcag aaaccuucua uguagauuggg 3240
 gcagcuaaca gggagacuaa auuaggaaaaa gcaggauaugg uuacuaacaa aggaagacaa 3300
 aaggugugcc cccuaacuaa cacaacaaau cagaaaaac aguuacaagc auuuuuucua 3360
 gcuuuggcagg auucaggauu agaaguuaac auaguaacag acucacaaa ugc当地uagga 3420
 aucauucaag cacaaccaga uaaaagugaa ucagaguug ucaauucaau aauagaggcag 3480
 uuaauaaaaa egaaaaaggc cuaucuggc uggguaccag cacacaaagg aauuugggagga 3540
 aaugacaag uagauuuauu agucagugc gggaaucagga aauuacauuu uuuagugga 3600
 auagauaagg cccaagaga acaugagaaa uaucacaguia auuggagagc auggc当地uag 3660
 gauuuuuaacc ugcccaccu uguacacauu uggacaaguia gacuguagc cggaaauaugg 3720
 cuaaaaagg aagcccaugc uggacaaguia gacuguacu gggaaauaugg gcaacuagau 3780
 uguacacauu uagaaggaaa aguuuacccu guagcaguuc auguagccag uggauuaua 3840
 gaagcagaag uuuuucccgc agaaacaggc caggaaacag cauauuuuucu uuuuuuuuua 3900
 gcaggaagau gcccaguuu aacaauacau acagacaaug gcagcauuu caccagugc 3960
 acgguaagg ccgc当地uug guggggccggaa aucaaggcagg auuuugggaa uccuacaaau 4020
 ccccaaguc aaggaguagu agaauucuau aauuaagaaau uaaagaaaaau uauaggacag 4080
 guaagagauc aggugacuaa ucuuaagaca gcagucacaa uggcaguauu cauccagzaa 4140
 aatattgaa agggaaagct tgggggguauc agugcagggg aaagaaauagu agacauaua 4200
 gcaacagaca uacaaacuaa agaauuacaa aaacaaauu caaaaaauuca aauuuuucgg 4260
 guuuuuuaca gggacagcag aaaaaccuu uggaaaggac cagcaagc ggc当地uaggaa 4320
 ggugaagggg caguaguauu acaagauuaa agugacauaa aaguagugcc aagaagaaaa 4380
 gcaaagauca uuagggauu ugaaaaacag auggcaggug augauuugugu ggcaagugaa 4440
 caggaugagg auuagaacau ggaaaaguuu aguuuacac cauauuugug uuuuagggaa 4500
 agcuagggg ugguuuuuaua gacauacuu uggaaaggccu cauccaaagaa uaaguucaga 4560
 aguacacaua ccacuagggg augcuagauu gguuauuaca acaauuuggg gugc当地uac 4620
 aggagaaga gacuggcauu ugggucagg agucuccaua gauggaggaa aaaagagaua 4680
 uagcacacaa guagacccug aacuagcaga ccaacuuuuu caucugauu acuuuugacug 4740
 uuuuucagac ucugcuauaa gaaaggccuu auuaggacac auaguuagcc cuaggugug 4800
 auaucaagca ggacauaaca agguaggauc ucuacauuac uuggcacuag cagcauuau 4860
 aacacaaaa aagauuaagc caccuuuggc uaguguuacg aacugacag aggauuagug 4920
 gaacaagccc cagaagacca cuuuuugag accuuuagaa uggccacag agggagccac acauuaug aacugacag gacacuagag 4980
 cuuuuugag accuuuagaa ugaagcuguu agacuuuuc cuaggauuug gcuccauuggc 5040
 uuaggggcaac auaucauuga aacuuuuggg gauacuuggg caggagugga agccauaua 5100
 agaauucugc zacaacugc gagcaagaaaa uggagccagu agauuccuaga cuagagccu 5220
 aggc当地uacu cggacagagga ggaagcaucc cccuaacacuug cuuquaccau uugguauu aaaaaguguu 5280
 gcaacuucc aggaagucag gcuuucuuuug accuuuacaa aagccuuagg caucuccuuu ggc当地gaga 5340
 agcggagac ggc当地gaga cccuccuacag gcagucagac ucaucaaguia ucucuauaa 5400
 agcaguuagu aguacauugua auggacuuau acaaaauuac aauuaguagc uuguauug 5460
 caauuaauu acaauuagu guguggucca uaguauuau acaauuauagg aaaaauuuua 5520
 gacaagaaaa aauagacagg uuaauuugua gacuaauaga aagagcagaa gacaguggca 5580
 augagaguga aggagaaaaa ucagcacuu uggagauugg gggaggaaug gggcaccaug 5640
 cuccuuggg uguugauug cuguagugc acagaaaaau ugugggucac agucuauau 5700
 gggguaccu ugguggaaggc agcaaccacc acucuuuuu gggcaucaga ucuaagaaagca 5760
 uaugauacag aguacauua uguuuggcc acacauugccu guguacccac agaccccaac 5820
 ccacaagaag uguauuuggu aaaaugugaca gaaaauuuua acauguggaa aauugacacu 5880
 guagaaacaga ugc当地uagga uuaauuucu uuauggauc aagccuaaa gcaugugua 5940
 aauuuuaccc cacucugugu uaguuuuaag ugc当地uau ugaagaauga uacuaauuacc 6000
 aauuaguagua gccccggagaaau gauuauggag aaaggagaga uaaaaaacug cucuuucaau 6060
 aucagcacaa gc当地uaggcag aaagaaauuau cauuuuuuua uaaacuuugau 6120

'auaaucaccaa uagauaauga uacuaccagc uauacguuga cagguugua caccucaguc	6180
auvacacagg ccuguccaaa gguazuccuuu gagccaauuc ccauacauua uugugccccc	6240
gcugguiiug cgauucucaa auguaauaa aagacguuca auggaacagg accauguaca	6300
aaugucagca caguacaaug uacacavgg aauaggccag uaguaucaac ucaacugcug	6360
uuaaauggca gucuggcaga agaagaggua guaauuagau cugccauuuu cacagacaau	6420
gcuaaaacca uaauguaca gcugaacca ucuguagaaa uuaauuguac aagacccaaac	6480
aacaauacaa gaaaaaguag ccguauccag agagggatcg ggagagcatt uguuacaaaua	6540
ggaaaaauag gaaauauggag acaagcacau uguacaaaua guagagcaaa auggaauaac	6600
acuuuuaaac agauagauag caaaauaaga gaacaauuug gaaauuaua aacaauuauc	6660
uuuaagcagu ccucaggagg ggacccagaa auuguaacgc acaguuuuua uuguggaggg	6720
gaauuuuucu acvguaauuc aacacaacug uuuauaguau cuugguuuua uaguacuugg	6780
aguacuaaaag ggucaaauea cacugaagge agugacacaa ucacccuccc augcagaaaua	6840
aaacaauua uaacaaugug gcaggaagua gggaaagca uguaugeccc ucccaucagu	6900
ggacaaauua gauguucauc aaaauuauaca gggcugcuau uaacaagaga ugugguuaau	6960
agcaacaau aguccgagau cuucagaccu ggaggaggag auaugaggga caauuggaga	7020
agugaauuau auaaauauaa aguaguaaaa auugaccaau uaggaguagc acccacaag	7080
gcaaagagaa gaguggugca gagagaaaaa agaggagugg gaaugaggagc uuuguuccuu	7140
ggguucuugg gagcagcagg aagcacuaug ggcgcagcgu caaugacgcu gacgguacag	7200
gccagacaau uauugucugg uauagugcag cagcagaaca auuugcugag ggcuaauugag	7260
gcfgcaacgc aucuguugca acucacaguc ugcccgauc acgacgcuca ggcagaauac	7320
cuggcuggg aaagauaccu aaaggaucaa cagcuccugg ggauuugggg uugcucugga	7380
aaacuauuu gccccacuc cuggauggag ugggacagag aaaaauaaca uacucugaa	7440
cagauuugga auaaacauagc uuaauacacu cccuuauuuga agaaucgca aaccagcaag acaagaauua	7500
uuggaauuag auaaauuggc aaguuuggg aauugguuua acauaacaaa uuggcugugg	7560
uauauaaaa uauucauaau gauaguagga ggcuugguag guuuaagaaau aguuuuugcu	7620
guaciuuuzug uagugauaag aguuaggcag ggauuucac cauuaucgu uacgaccac	7680
cucccaaucc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaaug aagaagaagg ugagagaga	7740
gacagagaca gauccauuc gauagugaac ggauccuuag cacuuaucug ggacgaucug	7800
cggagccugu gccucuuucag cuaccacgc uugagagacu uacucuugau uguacgagg	7860
auuguggaac uucugggacg cagggggugg gaagcccuca aauauuggug gaaucuccua	7920
caguauugga gucaggagcua aagaaauagu gcugiuuagc ugcuacauugc cacagcuaua	7980
gcaguagcug aggggacaga uaggguaua gaagaguac aaggagcua uagagcuaau	8040
cgcccacauac cuagaagaaau aagacaggc uuggaaagg uuuugcuaua agaugggugg	8100
caagugguca aaaaagauag ugguuggaung gcccugua aggaaaaaa ugagacgagc	8160
ugagccagca gcaagauuggg ugggagcagc aucucgagac cuagaaaaac auggagcaau	8220
cacaaguage aacacagcag cuaacaaugc ugaauugugcc uggcuagaag cacaagagga	8280
ggaggaggug gguuuuccag ucacaccuca gguacuuua agaccaaua cuuacaaggc	8340
agcuguaagau cuuagccacu uuuuaaaaga aaagggggca cuggaaggggc uauuucacuc	8400
ccaaacgaaga caagauaucc uugaucugug gaucuaccac acacaaggcu acuucccuga	8460
uuagcagaac uacacatcg ggccagggaug cagauaucca cugacuuuug gauggugcua	8520
caagcuaqua ccaguuugac cagagaaguu agaagaagcc aacaaaggag agaacaccag	8580
cuuguuacac ccugugagcc ugcauggaau ggaugacccg gagagagaag uguuagagug	8640
gagguuugac agccgcuuag cauuucauca caugcccgaa gacugcuauc cggaguacuu	8700
caagaacugc ugacauucgag cuugcuacaa gggacuuucc gcuggggacu uuccaggag	8760
gcguggccug ggcgggacug gggaguggeg agccctcaga uccugcauau aagcagcugc	8820
uuuuuugccu vacugggcucu cucugguuaug accagaucug agccugggag cuc	8880
	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 enthält, 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 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 Pseudoziels als auch des Polynukleotidanalyts, 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

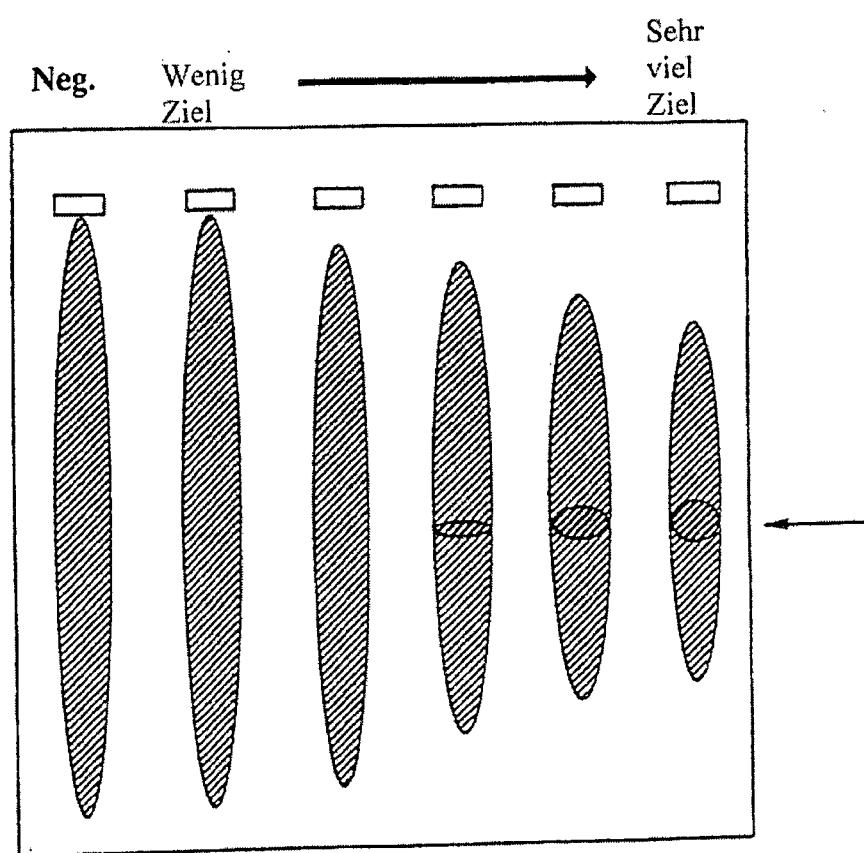


Fig. 1

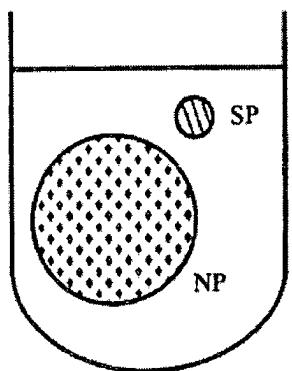


Fig. 2a

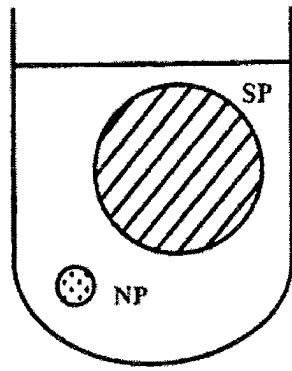


Fig. 2b

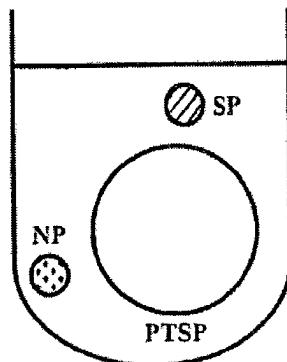


Fig. 2c

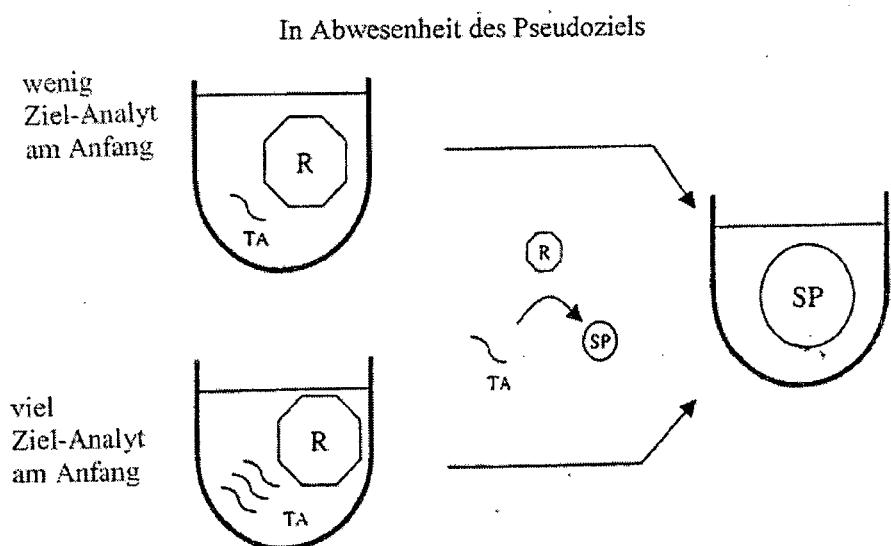


Fig. 3a

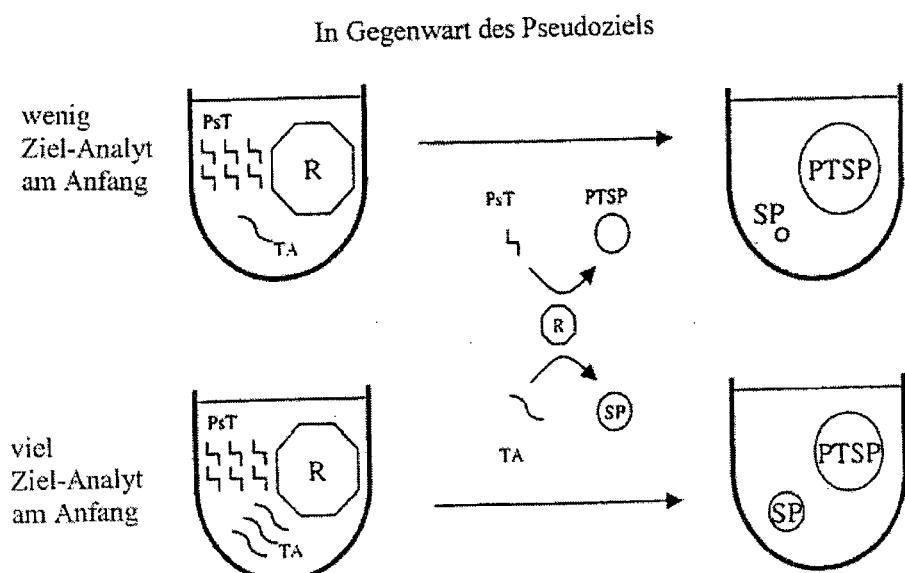


Fig. 3b

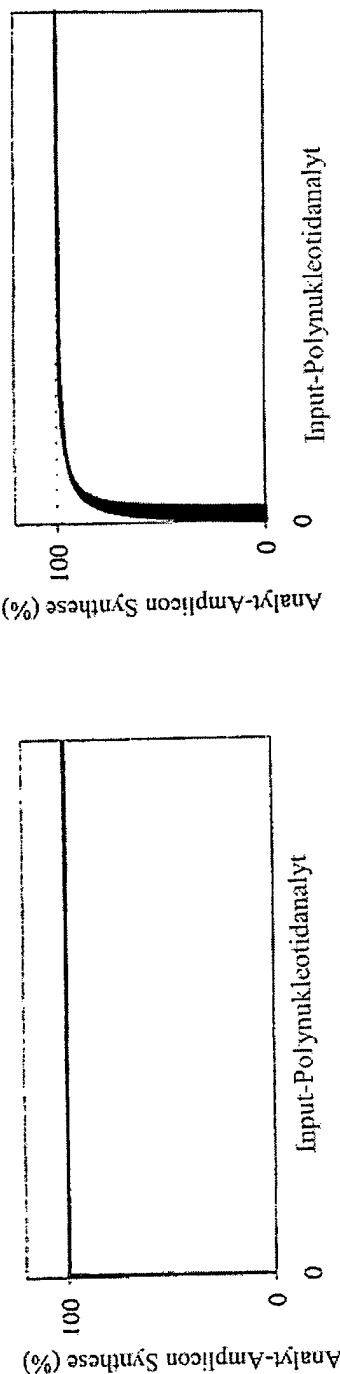


Fig. 4b

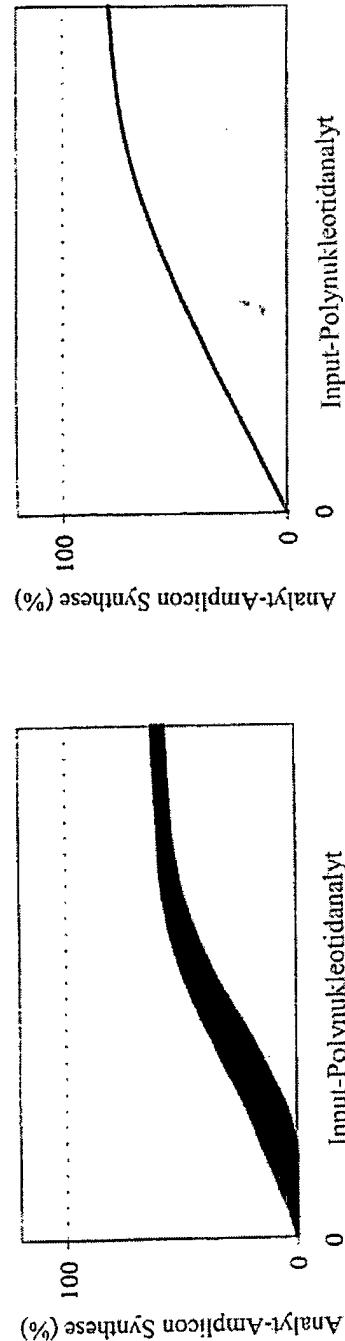


Fig. 4d

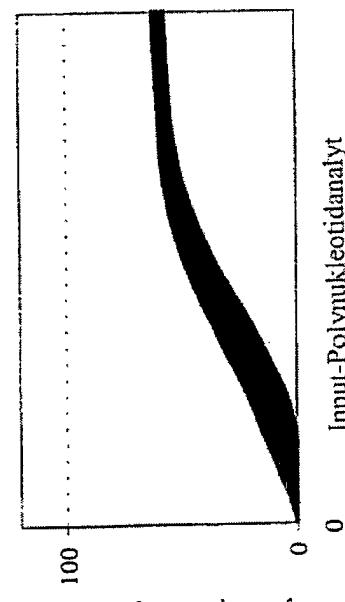


Fig. 4c

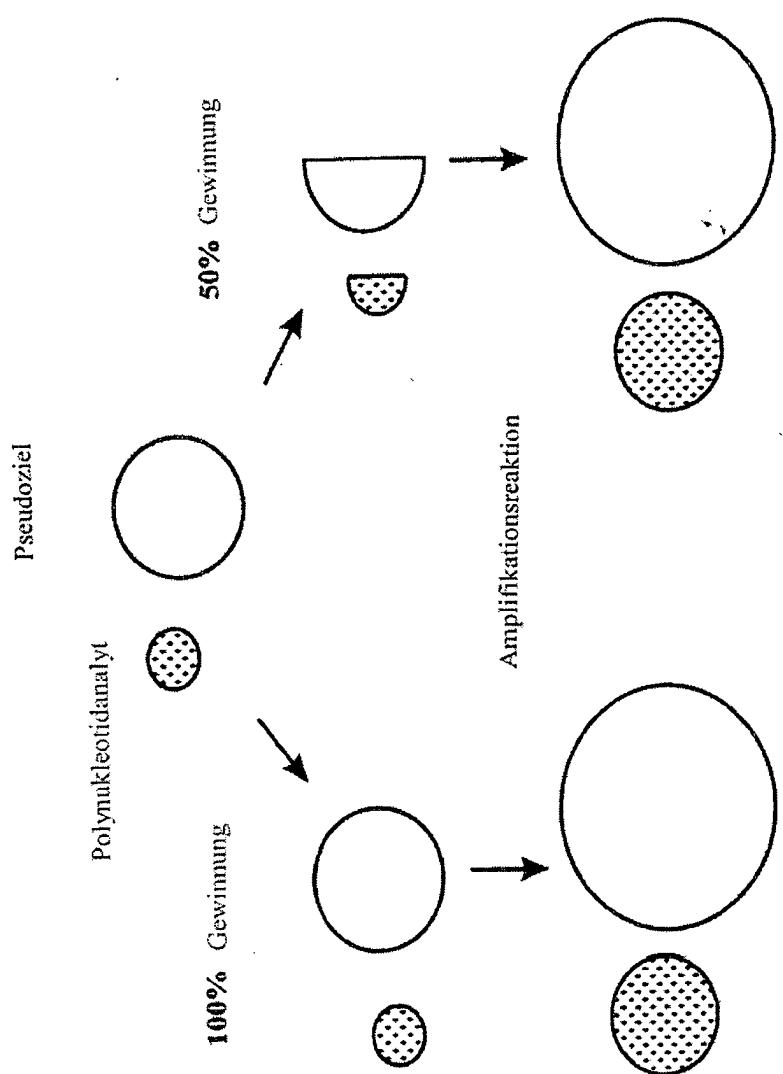


Fig. 5

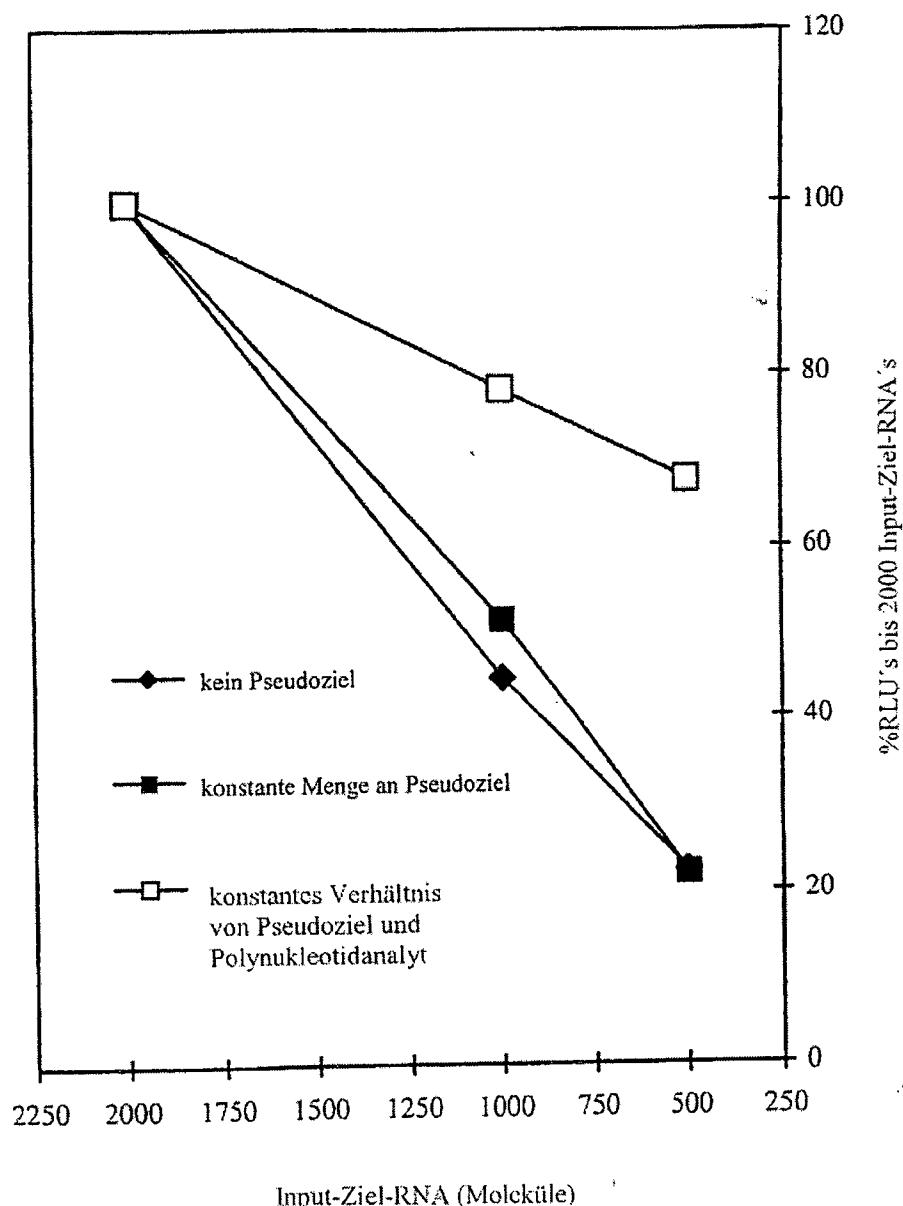


Fig. 6

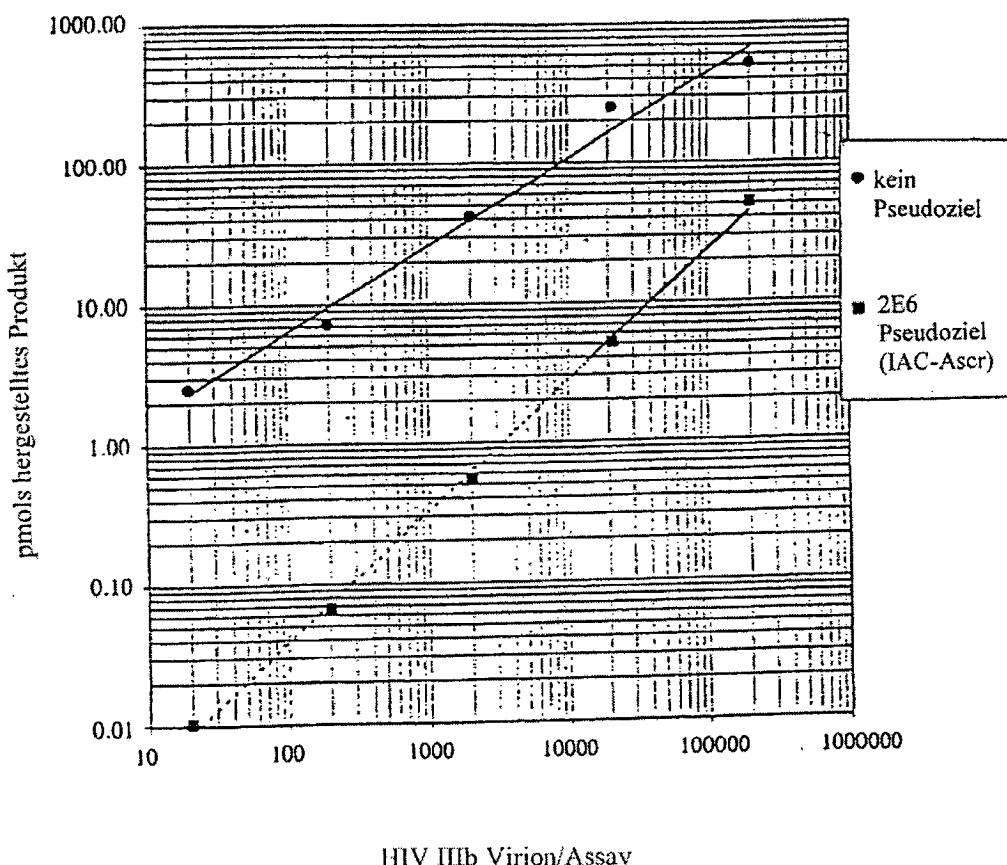


Fig. 7