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

(10) **DE 699 31 497 T2** 2007.05.03

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 102 864 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 31 497.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/17822**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 939 044.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/008212**
(86) PCT-Anmeldetag: **06.08.1999**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **17.02.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.05.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **24.05.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.05.2007**

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

(30) Unionspriorität:
95721 P **07.08.1998** **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:
Cellay LLC, Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:
GEYER, FEHNERS & PARTNER (G.b.R.), 80687 München

(72) Erfinder:
TRNOVSKY, Jan, Saugus, MA 01906, US;
McGRATH, Patricia, Cambridge, MA 02139, US

(54) Bezeichnung: **GEL MIKROTROPFEN FÜR DIE GENETISCHE ANALYSE**

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

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

Beschreibung

Querverweis auf verwandte Anmeldung

[0001] Die vorliegende Anmeldung leitet die Priorität vom USSN 60/095,721, eingereicht am 7. August, 1998, ab.

Technisches Gebiet

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der genetischen Analyse.

Stand der Technik

[0003] Die zytogenetische Untersuchung steckt nach wie vor in ihren Kinderschuhen. Derzeitige zytogenetische Verfahren sind auf die Analyse von Genanomalien, die leicht in Zellen, Zellkernen oder Chromosomen nachweisbar sind, beschränkt, teilweise weil Verfahren auf Objektträgerbasis manuell sehr aufwendig sind. Die Analyse von Anomalien, die in geringer Häufigkeit auftreten, wird im klinischen Rahmen nicht routinemäßig durchgeführt, weil viele Objektträger von Zellen, Zellkernen oder Chromosomen evaluiert werden müssten, um eine statistische Häufigkeit zu etablieren.

[0004] Die Bandierung ist der klassische Ansatz, der für das Analysieren von Chromosomen in der Metaphase-Spread verwendet wird. Diese Verfahren basiert auf der Färbung, welche zu dunkeln Banden in den Regionen der Chromosomen, wo das Chromatin in höheren Dichten auftritt, führt. Das Bandierungsmuster ist für jedes Chromosom spezifisch und ermöglicht die Identifikation für die Karyotypierung, welches die Bestimmung der Kopienzahl für jedes Chromosom darstellt. Die Auflösung der Bandierung ist jedoch nicht ausreichend, um kleine Deletionen oder Additionen der chromosomalen Masse nachzuweisen, die bei einer Vielzahl von Krankheitszuständen, insbesondere Krebs auftreten.

[0005] Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist ein anderer verwendeter Ansatz, um genomische DNA Fragmente zu lokalisieren oder um ganze Chromosomen zu färben oder um genetische Anormalitäten einschließlich Translokationen (31, 40), Aneusomie (41, 42) und Genamplifikation (43) nachzuweisen und zu charakterisieren. Diese genetischen Anormalitäten können in individuellen Zellen, Chromosomen, oder Zellkernen nachgewiesen werden, um den Tumor-Genotyp zu beurteilen, die genetische Heterogenität zu analysieren, und maligne Zellen nachzuweisen. Um die Integrität in FISH-Anwendungen zu bewahren, werden die Chromosomen üblicherweise auf Glas-Objektträger adsorbiert. Die Analyse erfordert deshalb die mikroskopische Evaluierung von individuellen Objektträgern, wodurch die Automatisierung und die schnelle Probenverarbeitung eingeschränkt werden. Fluoreszente in situ Hybridisierungen, die auf Glas-Objektträger zubereitet wurden, sind nicht nur auf die Untersuchung und die Reagenzien, sondern auch auf die Geräteausstattung und die Fachkenntnis und den Scharfsinn der verwendenden Wissenschaftler angewiesen, was in einer schlechten Reproduzierbarkeit resultiert. Eine innewohnende Beschränkung dieser Technologie ist, dass zumindest 100 kb DNA-Sequenz in einer Einzelzelle für die Ermittlung (68-70) vorhanden sein müssen. Zusätzlich sind die harschen Bedingungen für das Fixieren von entweder Gewebe oder intakten Zellen auf die Glas-Objektträger alles andere als optimal: bis zu 90 % der Untersuchungsprobe kann von dem Glasträger verloren werden.

[0006] Einige Chromosomen können ebenfalls durch Fluoreszenz-Färbung gefolgt von Flusszytometrie (14, 15) aufgelöst werden. Die erfolgreiche Chromosomsortierung ist jedoch von den Bindungscharakteristika des Fluoreszenz-Farbstoffes und dem Ausmaß in welchem das interessierende Gen von anderen Chromosomen ähnlicher Größe, Chromosomen-Klumpen, und DNA enthaltenden Trümmer (13) unterschieden werden kann, abhängig. Obwohl dieser Ansatz in der Konstruktion von Hefe-künstlichen Chromosomen (YAC)-Bibliotheken für Kartierungsstudien (16) in Spezies, die Chromosomen ähnlicher Größe aufweisen, wie Maus, Arabidopsis, und 20% des menschlichen Chromosoms resultiert, war eine eindeutige Auflösung nicht möglich. Die auf der Farbstoffaufnahme basierende Fluss-Sortierung ist für gut-aufgelöste Chromosomen möglich, jedoch arbeitet dieses Verfahren für Chromosomen mit ähnlicher Größe und Basenzusammensetzung, hauptsächlich menschliche Chromosomen 9-12 und die Mehrheit der Maus-Chromosomen schlecht. Weiters kann gegenwärtig die Flusszytometrie nicht verwendet werden, um hybridisierte Chromosomen, die durch konventionelle Verfahren zubereitet wurden, zu analysieren, weil unfixierte Chromosomen unter Verwendung von hohen Temperaturen und/oder Formamid zerfallen.

Zusammenfassung der beanspruchten Erfindung

[0007] Die Erfindung stellt Verfahren zu Nukleinsäure-Analyse bereit. Solche Verfahren führen zu der Bildung einer Population an Gel-Mikrotropfen, die eine Population an biologischen Einheiten einkapseln, jede Einheit weist eine Nukleinsäure auf, wobei zumindest einige Mikrotropfen in der Population jeweils eine einzige Einheit einkapseln. Die Nukleinsäuren können DNA oder RNA sein. Die Population an Gel-Mikrotropfen wird dann mit einer Sonde unter Bedingungen in Kontakt gebracht, durch welche die Sonde spezifisch zu zumindest einer komplementären Sequenz in der Nukleinsäure in zumindest einem Gel-Mikrotropfen hybridisiert. Zumindest ein Gel-Mikrotropfen wird dann analysiert oder detektiert. Die biologischen Einheiten können Zellen, Viren, Zellkerne, und Chromosom sein.

[0008] In einigen Verfahren werden zumindest 10.000 biologische Einheiten eingekapselt. In einigen Verfahren, werden die biologischen Einheiten vor dem in-Kontakt-bringen Schritt nicht chemisch fixiert. In einigen Verfahren werden die Nukleinsäuren vor dem in Kontakt bringen Schritt amplifiziert. Zu geeigneten Materialien für das Bilden von Tropfen zählen Agarose, Alginat, Carrageenan, oder Polyacrylamid.

[0009] Bei einigen Verfahren werden die Nukleinsäuren aus den Mikrotropfen durch Verdau mit Agarase gewonnen. Die gewonnene DNA kann gegebenenfalls mit einem Restriktionsenzym mit oder ohne vorangehendem Verdau der Agarase, verdaut werden. In einigen Verfahren wird die Gelmatrix mit sich selbst und/oder mit der Nukleinsäure, die analysiert wird, vernetzt, üblicherweise zwischen dem Denaturierungs- und dem in-Kontakt-bringen Schritt. Bei einigen Verfahren wird die Hybridisierung bei einer Temperatur über 68 °C oder in der Gegenwart einer Formamidkonzentration von größer als 20 % durchgeführt. Bei einigen Verfahren weisen die Mikrotropfen weiters ein Reagens auf, das ein Signal von der markierten Sonde verstärkt. Zum Beispiel kann die Sonde mit einem Enzym markiert sein, und das Reagenz kann das Substrat für das Enzym sein.

[0010] Bei einigen Verfahren werden die Mikrotropfen durch FACS^{tm} isoliert. Bei einigen Verfahren sind die biologischen Einheiten eine Population an Chromosomen, die von einer Population von verschiedenen Zellen in einem Patienten erhalten wurden. Bei einigen Verfahren wird das Verhältnis von einer Subpopulation an Mikrotropfen, die ein Chromosom enthält, das mit der Sonde hybridisiert ist, zu einer Subpopulation an Mikrotropfen, die ein Chromosom enthält, das nicht mit der Sonde hybridisiert ist, bestimmt. Bei einigen Verfahren, hybridisiert die Sonde mit einem Nukleinsäuresegment, das eine Mutation trägt, und das Verhältnis und das zeigt den Anteil der Zellen, die die Mutation tragen, in der Population an. Solche Verfahren sind besonders nützlich zum Analysieren von somatischen Mutationen.

[0011] Bei einigen Verfahren, wird ein isolierter Mikrotropfen, der ein einzelnes Chromosom enthält, verwendet, um eine Einzel-Chromosomenfragment-Bibliothek herzustellen. Eine solche Bibliothek kann wiederum für das Herstellen von Sonden für ein einzelnes Chromosom, wie Painting- oder Reverse Painting-Sonden verwendet werden.

[0012] Gel-Mikrotropfen eingekapselte biologische Einheiten können vor oder nach dem Hybridiserungsschritt für eine Periode von zumindest sechs Monate gelagert werden.

[0013] Die Erfindung bietet weiters Verfahren zum Diagnostizieren einer Krankheit aufgrund einer genetischen Mutation. Solche Verfahren führen dazu, dass eine Probe aus Zellen eines Patienten erhalten wird. Eine Population an Chromosomen von der Probe wird dann in eine Population von Mikrotropfen eingekapselt. Dann werden die Mikrotropfen in Kontakt mit einer ersten Sonde gebracht, die komplementär zu dem Nukleinsäuresegment ist, welches die somatische Mutation enthält, und einer zweiten Sonde, die komplementär zu dem Chromosom ist, in welchem die somatische Mutation distal zu der Stelle der somatischen Mutation vorkommt. Die erste Sonde hybridisiert mit einem Mikrotropfen, der das Chromosom mit der somatischen Mutation trägt, und die zweite Sonde hybridisiert mit einem Mikrotropfen, der das Chromosom unabhängig ob die somatische Mutation vorhanden ist, trägt. Dann wird das Verhältnis der Mikrotropfen die mit einer ersten Sonde hybridisieren und die mit einer zweiten Sonde hybridisieren bestimmt. Das Verhältnis kann dann zum Diagnostizieren der Existenz oder Prognosis der Krankheit von dem Verhältnis verwendet werden. Solche Verfahren sind besonders zum Diagnostizieren der Existenz oder zur Prognosis von Krebs nützlich.

[0014] Die Erfindung stellt weiters Verfahren zur Chromosomenanalyse bereit. Solche Verfahren führen zu der Bildung einer Population an Gel-Mikrotropfen, die eine Population an Zellkernen einkapselt, wobei zumindest einige Mikrotropfen in der Population jeweils einen einzigen Zellkern einkapseln. Dann wird die Gel-Mikrotropfenpopulation mit einer Sonde unter Bedingungen durch welche die Sonde spezifisch mit zumindest einer komplementären Sequenz in zumindest einem Chromosom in einem Zellkern von zumindest einem

Gel-Mikrotropfen hybridisiert, in Kontakt gebracht. Dann wird der zumindest eine Gel-Mikrotropfen isoliert oder detektiert.

[0015] Die Erfindung stellt weiters Verfahren zum Isolieren von Chromosomen bereit. Solche Verfahren führen zu der Kultivierung einer Population von Zellen in Genistein und Colcemid, um die Chromosomen in der Metaphase zu synchronisieren, und isolieren der Chromosomen von den Zellen. Andere Verfahren, die in Verbindung oder unabhängig von den vorangehend beschriebenen Verfahren verwendet werden können, führen zu der Lyse einer Population von Zellen, um ein Lysat zu bilden. Das Lysat wird dann mit einem Antikörper, der mit magnetischen Partikeln verbunden ist, behandelt, wobei der Antikörper spezifisch zu einem oder mehreren Chromosomen in den Zellen bindet. Die magnetischen Partikel werden dann vom Lysat isoliert.

[0016] Die Erfindung stellt weiters Verfahren zur Chromosomenanalyse bereit. Solche Verfahren führen zu der Bildung einer Population an Gel-Mikrotropfen, die eine Population an Zellen oder Zellkernen einkapseln, wobei zumindest einige Mikrotropfen in der Population jeweils einen einzigen Zellkern einkapseln. Es wird dann die Gel-Mikrotropfenpopulation mit einer Sonde unter Bedingungen in Kontakt gebracht, durch welche die Sonde spezifisch mit zumindest einer komplementären Sequenz in zumindest einem Zellkern in zumindest einem Gel-Mikrotropfen hybridisiert. Dann Isolieren oder Detektieren des zumindest einen Gel-Mikrotropfens.

[0017] Die Erfindung stellt weiters einen Satz bereit, der eine Agarose mit hohem Schmelzpunkt, eine Emulgiereinrichtung, ein Etikett, das anzeigt wie der Satz zur Sondenhybridisierungssanalyse verwendet wird, aufweist. Der Satz enthält gegebenenfalls zumindest eine Sonde, die mit einer Nukleinsäure hybridisiert.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0018] Fig. 1 zeigt eingekapselte und nicht-eingekapselte humane, Maus, und Pflanzenchromosome.

[0019] Fig. 2 zeigt eine Gelelektrophorese von chromosomaler DNA. Nicht-eingekapselte, frisch isolierte Chromosomen: b-Maus, e-Mensch K-562, g-Mensch REH; Nicht-eingekapselte Chromosome einen Monat nach der Isolierung: c-Maus, f-Mensch K-562, h-Mensch REH; Eingekapselte Chromosomen für 6 Monate gelagert: d-Maus, i-Mensch K-562, j-Mensch REH; Lambda DNA (0,1 µg) als Kontrolle verwendet: a, k.

[0020] **Fig.** 3A zeigte eine Flusssortierung des humanen Chromosoms 22 anschließend an die Mikrotropfen in situ Hybridisierung unter Verwendung einer bcr Locus-spezifischen Sonde.

[0021] **Fig.** 3B zeigt sortierte unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie visualisierte Chromosome.

[0022] Fig. 4 zeigt die Reinheit des Chromosoms 22 nach einem Sortierschritt durch die Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung von Primersätzen, die für die Chromosome 10, 21, oder 22 spezifisch sind.

[0023] Fig. 5 zeigt einen Restriktionsverdau von eingekapselten Chromosomen.

[0024] Fig. 6 wird die Detektion des transloziertes Chromosoms 22 links, Chromosom 9 Mitte, und translokationsfreies Chromosom 22 rechts durch MISH gezeigt.

[0025] Fig. 7 zeigt die zytometrische Detektion von gag HIV RNA in eingekapselten HIV infizierten Zellen nach der Hybridisierung mit zwei HRP-markierten Oligo-Sonden.

[0026] Fig. 8 zeigt die Detektion der Telomerase mRNA in HL-60 (Modell-Krebszelllinie) und humanen PBMCs unter Verwendung von Fluorescein-markierten Oligonukleotid-Sonden.

Definitionen

[0027] Eine isolierte Spezies bedeutet eine Zielspezies-Erfindung, die die vorherrschende Spezies darstellt (d. h., auf einer molaren Basis ist sie reichlicher vorhanden als alle anderen Spezies in der Zusammensetzung). Vorzugsweise weist eine isolierte Spezies zumindest etwa 50, 80 oder 90 Prozent (auf einer molaren Basis) aller vorhandenen makromolekularen Spezies auf. Am meisten bevorzugt ist die Zielspezies auf im Wesentlichen Homogenität gereinigt (kontaminante Spezies können in der Zusammensetzung durch herkömmliche Detektionsverfahren nicht nachgewiesen werden).

[0028] Polymorphismus bezieht sich auf das Auftreten von zwei oder mehr genetisch bestimmten alternativen

Sequenzen oder Allelen in einer Population. Ein polymorpher Marker oder Stelle ist der Locus, an welcher die Divergenz auftritt.

Detaillierte Beschreibung

I. Allgemeines

[0029] Die Erfindung stellt Verfahren zum Analysieren von Populationen von Nukleinsäure enthaltenden biologischen Einheiten durch Sondenhybridisierung bereit. Zum Beispiel können diese Verfahren verwendet werden, um Zellen, Viren, isolierte Zellkerne oder isolierte Chromosomen zu analysieren. Die Verfahren arbeiten durch Einkapseln von biologischen Einheiten in Gel-Mikrotropfen so dass zumindest einige Mikrotropfen in der Population eine einzige Einheit enthalten. Die Geltröpfchen stellen eine Stabilisierungsmatrix für die Hybridisierung bereit und halten die hybridisierten Nukleinsäuren für die nachfolgende Analyse zusammen. Eingekapselte Einheiten werden mit einer oder mehreren Sonden hybridisiert. GMDs werden leicht durch Zentrifugation bei niederer Geschwindigkeit gewonnen. Sonden können zum Beispiel so konstruiert sein, dass sie mit bestimmten Chromosomen oder mit spezifischen chromosomalen Loci, welche die Stellen der genetischen Abnormalität darstellen, hybridisieren. Nach der Hybridisierung werden die eingekapselten Einheiten basierend auf dem Hybridisierungssignal detektiert und/oder isoliert.

[0030] Die Verfahren ermöglichen die gleichzeitige Analyse einer großen Anzahl von biologischen Einheiten und können Einheiten, die einen seltenen Genotyp aufweisen, innerhalb solcher Populationen detektieren. Zum Beispiel können die Verfahren verwendet werden, um seltene kanzeröse Zellen in einer Population von normalen Zellen in einer frühen Phase der Krebsentwicklung zu identifizieren. Zu anderen Anwendungen zählen die Genidentifikation, Isolierung von Zellen, die ein bestimmtes Gen exprimieren, Herstellung von spezifischen Hybridisationssonden, und Isolierung von reinem Ausgangsmaterial für die DNA Sequenzierung. Ein zusätzlicher Nutzen ist, dass das Einkapseln in eine permeable Matrix die Hybridisierung in freier Lösung zulässt, wodurch die Reaktionskinetiken verbessert werden. Ein weiterer Nutzen ist, dass die Einkapselungsmatrix als ein Behälter für ein Substrat für eine Reaktion dienen kann, die durch ein an die Sonde gebundenes Enzym katalysiert wird. Die Verwendung von chemilumineszenten Substraten in dieser Art resultiert in einer hochsensitiven Detektion.

II. Bildung der Tröpfchen

[0031] Die Gel-Mikrotropfen (GMD)-Einkapselung hat sich aus dem Interesse, individuelle Zellen zu untersuchen (1-11) entwickelt. GMDs stellen eine definierte Mikroumgebung um eine biologische Einheit bereit. Das Gel behindert die Diffusion nicht und ermöglicht die Analyse einer Vielzahl von individuellen GMDs unter Verwendung der Flusszytometrie, sowie die Gewinnung der GMDs von Interesse mittels FACS. Die Anzahl der innerhalb jedes GMD's eingekapselten biologischen Einheiten wird durch die Poisson-Statistik angenähert, ähnlich zu der seriellen Verdünnungsklonierung oder Petrischalen-Inokulation. Um eine Zubereitung mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu erhalten, dass jedes GMD 0 oder 1 anfängliche Chromosome enthält, sollten 10 % der GMDs besetzt sein. GMDs können durch Dispergieren von Einheiten in flüssigem Gel, wie Agarose, in einen Überschuss einer hydrophoben Flüssigkeit zubereitet werden, um eine Emulsion zu bilden. Die Emulsion wird vorübergehend gekühlt, wodurch ein Gelieren hervorgerufen wird. Nach dem sie gebildet wurden, sind die GMDs physikalisch verschieden und robust und können aus dem Öl durch Zentrifugation bei niederer Geschwindigkeit in ein wässriges Medium hinein entnommen werden. Alternativ können die GMDs durch Drücken einer Mischung aus flüssigem Gel und Einheiten durch eine pulsierende Düse, wie der Druckkopf eines Tintenstrahldruckers, gebildet werden Die Instrumentation für die Mikrotropfen-Bildung, der CellSys 100 Microdrop Maker, ist ein spezifisch konstruierter Emulgator, der an einen hochpräzisen Motor, erhältlich von One Cell Systems, Inc., gekoppelt ist. Durch Verändern der Rotationsgeschwindigkeit, Art und Menge des oberflächenaktiven Stoffes, und Emulsionsviskosität, können Mikrotropfen im Bereich von zum Beispiel 2-200 µm hergestellt werden. Obwohl der Microdrop Maker für die Herstellung einer großen Anzahl von Mikrotropfen (z. B. 10^7) sehr effizient ist, welches wiederum eine Million biologischer Einheiten erfordert, um das Einzelbesetzungserfordernis des Mikroeinkapselungverfahren zu erfüllen, kann es für die Einkapslung von kleineren chromosomalen Zubereitungen miniaturisiert werden. Diese ist für klinische Anwendungen, zum Beispiel, der Evaluierung von Knochenmarkproben, in welchen nur eine kleine Anzahl von Zellen vorhanden sind, nützlich.

[0032] Es können verschiedene Gelarten für das Herstellen von Tröpfchen verwendet werden, einschließlich Agarose, Alginat, Carrageenan, oder Polyacrylamid. Agarose mit hohem Schmelzpunkt wird für das Einkapseln größerer humaner und pflanzlicher Chromosome bevorzugt.

III. Biologische Einheiten

[0033] Die Verfahren sind im Allgemeinen anwendbar für das Durchsuchen von Nukleinsäuren, und jeder biologischen Einheit, die sie enthält. Beispiele von biologischen Einheiten schließen Zellen, Organellen, wie Zellkerne, Mitochondrien, und Chloroplasten; Chromosome und Fragmente davon, und Viren ein. Solche Einheiten können von jeder Spezies einschließlich Säugetiere, Fische, Amphibien, Geflügel, Insekten, Bakterien, Eubakterien, und Pflanzen stammen. Zu bevorzugten Säugetieren zählen Menschen, Primaten, Rinder, und Nagetiere, wie Mäuse, Ratten und Kaninchen.

[0034] Bei einigen Verfahren werden die biologischen Einheiten aus einem Gewebe eines humanen Patienten erhalten. Die Gewebeprobe enthält häufig eine nicht-klonale Zellpopulation. Die Proben können aus jedem Gewebe erhalten werden, jedoch werden Blutproben und Gewebeproben aus den Loci der Krankheit, für welche der Patient verdächtigt wird, empfänglich zu sein, bevorzugt. Bei einigen Verfahren werden die Zellen aus Primärgewebeproben vor der Analyse vermehrt. Bei einigen Verfahren werden die biologischen Einheiten vor der Analyse von mehr als einem Individuum zusammengefasst (pooled). Bei einigen Verfahren werden die biologischen Einheiten (z. B., Chromosome) von einer homogenen Zelllinie erhalten. Zellen können direkt eingekapselt und analysiert werden, oder Zellkerne oder Chromosome können aus Zellen vor der Analyse isoliert werden.

IV. Vorbehandlung der GMDs vor der Hybridisierung

[0035] Vorzugsweise werden die Gel-bildenden Polymere miteinander und/oder mit den biologischen Einheiten vernetzt. Vorzugsweise ist eine solche Vernetzung reversibel ohne die biologischen Einheiten zu schädigen, wodurch ermöglicht wird, dass die biologischen Einheiten nach der Hybridisierung wiedergewonnen werden können und weiteren DNA Manipulationen unterzogen werden können. Eine solche Vernetzung assistiert in der Erhaltung der strukturellen Integrität der GMDs in den nachfolgenden Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte. Harsche chemische Fixierungsbehandlungen, wie die Formaldehyd-Behandlung, die in der herkömmlichen FISH verwendet wird, werden nicht benötigt. Solche Fixierungsbehandlungen bilden durch das Vernetzen von endogenen primären Amino-Gruppen in einer biologischen Einheit eine interne Matrix.

[0036] Vernetzte Gel-Mikrotropfen können hohen Temperaturen (zumindest 68 °) oder Konzentrationen an denaturierenden Lösungsmittel wie Formamid (z.B., 10, 20, 30, 40, oder bis zu 50 % Formamidkonzentration) widerstehen. DNA- oder RNA-Segmente können gegebenenfalls innerhalb der Tröpfchen mittels PCR amplifiziert werden. Ein PCR-Puffer, welcher Primer enthält, wird in Tröpfchen diffundiert, und die Tröpfchen werden dann einem Temperaturwechsel wie bei der herkömmlichen PCR Reaktion ausgesetzt. Unabhängig davon ob die Amplifikation durchgeführt wird, werden die Nukleinsäuren innerhalb der GMDs vor dem Durchführen des Hybridisierungsschrittes üblicherweise denaturiert (z. B., durch Behandlung mit Alkali, Wärme, Formamid oder anderen chemischen Denaturierungsmitteln).

V. Sonden

[0037] Die Sonden werden so konstruiert, dass sie mit ausgewählten Segmenten in den Nukleinsäuren der zu durchsuchenden biologischen Einheiten hybridisieren. Typische Sonden sind jene, die in herkömmlichen genetischen und ctyogenetischen Analysen verwendet werden. Bei vielen Verfahren werden zwei oder mehrere Sonden mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten verwendet. Bei einigen Verfahren wird eine große Population an unterschiedlichen Sonden verwendet. Üblicherweise tragen Sonden nachweisbare Markierungen. Wenn mehr als eine Sondenart verwendet wird, tragen die unterschiedlichen Arten manchmal verschiedene Markierungen.

[0038] Einige der in den Verfahren verwendeten Sonden sind Locus-spezifische Sonden, einschließlich Allel-spezifische Sonden und Spezies-spezifische Sonden. Allel-spezifische Sonden hybridisieren mit einem Allel eines Gens innerhalb einer Spezies ohne dass sie mit anderen Allelen hybridisieren. In ähnlicher Weise, hybridisieren Spezies-spezifische Sonden mit einem Gen einer Spezies ohne dass sie mit verwandten Genen in anderen Spezies hybridisieren. Einige der in dem Verfahren verwendeten Sonden hybridisieren mit einer Variantenform des mit einer Krankheit assoziierten Chromosoms, ohne mit der Wildtypform des Chromosoms, wie es in normalen Individuen gefunden wird, zu hybridisieren. Einige Sonden sind Mischungen aus Sonden, die konstruiert wurden, um mit einem Chromosom eines Individuums oder Spezies zu hybridisieren ohne mit anderen Chromosomen zu hybridisieren. Zum Beispiel kann eine Population an Sonden konstruiert werden, um mit dem humanen X-Chromosom zu hybridisieren, ohne dabei mit anderen humanen Chromosomen zu hybridisieren. Einige Sonden sind Mischungen, die so konstruiert sind, dass sie mit mehreren verschiedenen

Chromosomen hybridisieren. Zum Beispiel kann eine Sonden-Mischung so konstruiert werden, dass sie mit allen humanen Chromosomen hybridisiert. Einige Sonden hybridisieren mit Satelliten oder Wiederholungsregionen innerhalb von Chromosomen. Einige Sonden hybridisieren mit den zentromeren Regionen der Chromosomen.

[0039] Einige Sonden sind chromosomale „Painiting"-Sonden oder chromosomale „reverse Painting"-Sonden. Chromosomale Painting-Sonden sind eine Sammlung von Sonden, die so konstruiert sind, dass sie mit einem Segment eines Chromosoms hybridisieren. Mikroskopische Analyse eines Chromosoms, das mit einer solchen Sonde hybridisiert ist, zeigt ein angrenzendes Markierungssegment, wenn das gesamte Segment des Chromosoms vorhanden ist. Wenn das Segment durch eine Substitution, Deletion oder Insertion unterbrochen ist, erscheint eine Lücke in dem Markierungsmuster, was das Vorhandensein einer genetischen Abnormalität bedeutet. Chromosomale „reverse Painting"-Sonden sind so konstruiert, dass sie mit einem angrenzenden Segment eines Chromosoms, welches eine bekannte Mutation trägt, hybridisieren. Die mikroskopische Analyse eines Chromosoms, welches eine solche Mutation trägt, das mit solchen reverse painting-Sonden hybridisiert ist, zeigt ein benachbartes Markierungssegment.

[0040] Chromosomale reverse painting hat sich für das Bestimmen des Ursprungs von de novo unbalanzierten Verdopplungen und des Ausmaßes der Deletionen oder balanzierten Translokationen (20) als nützlich erwiesen. Anormale Chromosomen sind jedoch häufig in herkömmlichen FISH-Verfahren schwierig zu unterscheiden, weil das abgeleitete Chromosom die normalen Chromosomen überlagern kann. Die Verwendung des chromosomalen reverse paintings nach der Trennung der Chromosomen durch Flusszytometrie beseitigte dieses Problem.

[0041] Einige Sonden sind so konstruiert, dass sie an mRNA innerhalb der Zelle binden. Solche Sonden können so konstruiert werden, dass sie ein Segment des Antisense-Strangs der cDNA-Sequenz eingebaut haben.

[0042] Sonden sind typischerweise Nukleinsäuren und können RNA, DNA oder PNA sein. Sonden können weiters Antikörper oder andere Proteine sein, die die Fähigkeit aufweisen, DNA in einer Sequenz-spezifischen Art zu binden.

VI. Markierungen

[0043] Sonden sind üblicherweise markiert. Die verwendeten Markierungen lassen die Trennung basierend auf der Flusszytometrie und/oder die mikroskopische Visualisierung der Markierung zu. In einigen Verfahren werden die Sonden mit einer fluoreszierenden Markierung wie Fluorescein markiert. Wenn mehrere Sonden gleichzeitig verwendet werden, können die Sonden mit unterschiedlichen fluoreszierenden Molekülen, die bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren, markiert werden, um eine differentielle Detektion zu ermöglichen.

[0044] Bei einigen Verfahren wird das Signal der an die Sonde angehefteten Markierung durch Binden von Molekülen, die sekundäre Markierungen tragen, an die Markierung amplifiziert. Zum Beispiel, kann eine hybridisierte Sonde, die mit Fluorescein markiert ist, für 15-30 min mit Kaninchen Anti-Fluorescein IgG, welches mit Biotin konjugiert ist (Accurate Chemical & Scientific) inkubiert werden. Nach dem Waschen mit PBS-Puffer, werden die GMDs für 15-30 Minuten mit Avidin-FITC oder Avidin-Phycoerythrin (Sigma, St. Louis, MO) inkubiert. Da, im Durchschnitt, jedes Anti-Fluorescein mit fünf Biotin-Molekülen markiert ist und jedes Biotin-Molekül 2-4 Avidin Moleküle binden kann, wird eine 10-20fache Signalverstärkung erreicht.

[0045] Bei einigen Verfahren werden die Sonden mit einem Enzym markiert, die die Umwandlung eines Substrats in eine sekundäre Markierung katalysiert, die die Trennung und/oder Visualisierung der GMDs ermöglicht.

[0046] Bei einigen Verfahren werden die GMDs, mit Verbindungen markiert, die an eine beliebige DNA-Sequenz binden sowie sie mit Sequenz-spezifischen Sonden hybridisiert sind. Ein solches Markieren dient dazu, GMDs, die eine biologische Einheit enthalten von leeren GMDs zu unterscheiden.

VII. Trennung und Analyse von hybridisierten GMDs

[0047] Nach der Hybridisierung mit markierten Sonden, können die GMDs mit einem Flusszytometer analysiert werden. Im einfachsten Fall, in welchem eine einzige Sonderart verwendet wird, zählt der Flusszytometer die Anzahl der GMDs, die eine Markierung tragen, und die Anzahl der GMDs, denen eine Markierung fehlt. Wenn zwei unterschiedliche Sonden, die unterschiedliche Markierungen tragen, verwendet werden, kann der

Flusszytometer die GMDs zählen, die nur die erste Markierung tragen, die GMDs, die nur die zweite Markierung tragen, die GMDs, die beide Markierungen tragen, und die, die keine der Markierungen tragen. Bei Verfahren, die eine Vielzahl von Sonden anwenden, können noch weitere Kategorien an GMDs unterschieden werden.

[0048] Wenn eine Sonde auf eine bestimmte Sequenz gerichtet ist (z.B. ein spezifischer chromosomaler Defekt), signalisiert die Detektion der mit dieser Sonde hybridisierten GMDs, dass der Defekt zumindest in einigen der analysierten biologischen Einheiten vorhanden ist. Wenn alle GMDs, die biologische Einheiten tragen, mit einer zweiten Markierung markiert sind, ist es möglich, ein Verhältnis der GMDs, die mit der spezifischen Sonde hybridisiert sind, zu allen GMDs, die eine biologische Einheit einkapseln, zu bestimmen. Dieses Verhältnis ist der Anteil an biologischen Einheiten in einer Probenzubereitung, die einen Defekt tragen. Die Verfahren sind ausreichend sensitiv, um seltene Zellen in großen Populationen, z. B., eine Zelle in 10, 100, 1000, 10.000, 100.000 oder 1.000.000 nachzuweisen. Dieses Verhältnis kann beim Bestimmen der Existenz oder zur Prognose einer Krankheit signifikant sein. Zum Beispiel, wenn eine Zelleprobe von einem Gewebe stammt, welches verdächtigt wird, gegenüber Krebs empfänglich zu sein, ist das Verhältnis der Zellen, die einem mit Krebs assoziierten Defekt tragen, zu der Gesamtzahl der Zellen in einer Probe ein Maß inwieweit der Krebs fortgeschritten ist.

[0049] Bei einigen Verfahren, werden die in GMDs eingekapselten Chromosomen mit zwei verschiedenen Sonden hybridisiert, die zu Segmenten komplementär sind, die normalerweise auf verschiedenen Chromosomen gefunden werden, welche jedoch in kanzerösen Zellen in das selbe Chromosom transloziert sind. In dieser Situation gibt der Anteil an GMDs, die an beide Sonden binden im Verhältnis zu den GMDs die zu einer oder der anderen Sonde, jedoch nicht zu beiden, binden, das Verhältnis der kanzerösen zu den normalen Zellen in einer Population an.

[0050] Die Flusszytometrie kann gegebenenfalls gefolgt sein von einer FACS-Sortierung, um unterschiedliche GMD-Klassen für die weitere Analyse, wie Mikroskopie oder Chromosomenzubereitung zur Verfügung zu stellen. Alternativ können Gel-Mikrotröpfchen mit magnetischen Partikeln markiert werden und einer magnetischen Trennung (MACS) unterzogen werden. Magnetische Partikel können direkt an Hybridisierungssonden angeheftet werden oder können in einer Form bereitgestellt werden, so dass sie spezifisch an Hybridisierungssonden binden.

VIII. Visualisierung der hybridisierten Chromosome

[0051] Eingekapselte biologische Einheiten können mit oder ohne vorherige Flusszytometrie und FACS-Trennung visualisiert werden, um die Lage(n), an welche die Sonde gebunden ist, zu bestimmen. Die Analyse nach der Flusszytometrie und FACS-Trennung kann vorteilhaft sein, da man zu diesem Zeitpunkt eine relativ reine Population an biologischen Einheiten hat, die mit einer gegebenen Sonde hybridisiert wurden. Biologische Einheiten können mittels Mikroskopie, digitaler Bildanalyse, Scanning-Zytometrie, Photonenzählung oder ccd visualisiert werden. Die Visualisierung ist für das Analysieren der Hybridiserung von chromosomalen painting-Sonden oder chromosomalen reverse painting Sonden von Nutzen. Die Visualisierung ist weiters für das Bestimmen der chromosomalen Kopienzahl innerhalb einer Zelle und somit der Existenz chromosomaler Deletionen oder Verdoppelungen nützlich. Für biologische Einheiten, die mehrere Chromosome enthalten (z. B., Zellen und Zellkerne) kann die Visualisierung ebenfalls verwendet werden, um zwischen zwei unterschiedlichen Sonden, die an verschiedene Chromosome oder an dasselbe Chromosom binden, zu differenzieren. Wie erwähnt ist eine solche Analyse zum Identifizieren von einigen Krebsformen nützlich.

[0052] Biologische Einheiten werden für die Visualisierung vorzugsweise auf Mikroskop-Objektträgern oder dergleichen immobilisiert. Zum Beispiel immobilisiert das Plazieren einer kleinen Menge (10 µl) GMD, die in einem Substrat dispergiert sind, auf einem Glass-Objektträger mit einem Deckglas die GMDs ausreichend, um eine zuverlässige Detektion des emittierten Lichts zuzulassen.

[0053] Die digitale Bildgebung wurde ein unabkömmliches Werkzeug für die biologische Forschung aufgrund mehrerer Vorteile im Vergleich zum menschlichen Auge. Die Bildgebungsdetektoren mit höherer Sensitivität ermöglichen die Visualisierung von Objekten mit sehr geringem Licht, welche für das ununterstütze menschliche Auge nicht erkennbar sind. Die Spektrumsensitivität des menschlichen Auges ist auf 400 bis 700 nm beschränkt. Im Gegensatz dazu ist der Spektrumsensitivitätsbereich von Bildgebungsdektoren breiter, und Signale im Bereich von den Röntgenstrahlen bis zum Infrarot können detektiert werden.

[0054] Eine ladungsgekoppelte Bauteil (charged-coupled device: CCD) – Kamera, die Expositionen im Be-

reich von Sekunden bis Minuten bereitstellt, und besitzt Vorteile für das Detektieren von Restlichtmengen. Diese Kameras sind an ein Mikroskop gekoppelt, und dann werden digitale Bilder mit Hilfe einer geeigneten Insturmentation gesammelt. Für Anwendungen mit Restlicht, sind zwei Arten von CCD-Kameras erhältlich. Die erste ist die verstärkte CCD-Kamera (ICCD), die einen Bildverstärker und eine CCD Kamera verwendet. Der Bildverstärker verstärkt Restlichtbilder und die verstärkten Bilder werden durch eine Relay-Optik, wie eine Relay-Linse, auf eine CCD Kamera projiziert, wodurch ermöglicht wird, Restlichtbilder, die unter Verwendung einer CCD alleine nicht detektierbar wären, zu visualisieren. Die zweite ist eine gekühlte CCD (CCCD)-Kamera, die einen ähnlichen CCD-Chip für die Hochlicht-Bildgebung verwendet. Die CCCD reduziert das Rauschen der Kamera durch Kühlen und langsames Auslesen des Signals. Die Rauschreduzierung ermöglicht die Visualisierung eines Restlichtbildes, welches üblicherweise im Rauschen einer regulären CCD Kamera verborgen ist.

IX. DNA Isolation

[0055] Die Gel-Umgebung bewahrt die chromosomalen DNA-Moleküle in einer intakten Form. DNA in eingekapselten Chromosomen enthaltenden GMDs können in situ mit Restriktionsenzymen zu Fragmenten gespalten werden. Für große Fragmente wird der partielle Verdau bevorzugt. DNA Fragmente können dann von den Tropfen durch Verdauen der Gelmatrix freigesetzt werden. Zum Beispiel, wenn die Matrix Agarose ist, kann die Gelmatrix mit dem Enzym Agarose verdaut werden. Große Fragmente werden dann in Vektoren wie YACs, BACs oder PACs kloniert. Durch die obigen Verfahren herstellbare Bibliotheken aus gereinigten humanen Chromosomen sind für das Sequenzieren oder Kartieren des menschlichen Genoms und für das positionelle Klonieren nützlich. Reine sortierte Chromosomen sind auch als Quelle von chromosomalen painting- und chromosomalen reverse painting-Sonden von Nutzen. Solche Sonden können durch Amplifikation chromosomaler DNA unter Verwendung degenerativer Primer hergestellt werden.

X. Lagerung von eingekapselten biologischen Einheiten

[0056] Eingekapselte biologische Einheiten wie Chromosomen können für eine Stunde, einen Tag, eine Woche, einen Monat, sechs Monate, ein Jahr, für 2 Jahre oder 5 Jahre oder mehr ohne sichtbaren Abbau der Nukleinsäure gelagert werden. Gelagerte Chromosomen können eventuell verwendet werden, um spezifische Gene zu isolieren, um PCR Sonden herzustellen und um ein hochqualitatives Ausgangsmaterial für die DNA-Sequenzierung herzustellen, oder für die klinische Analyse.

[0057] Die obigen Verfahren können angewendet werden, um die Gegenwart, Empfänglichkeit, oder Prognose einer mit einem genetischen Defekt assoziierte Krankheit zu diagnostizieren. Die Verfahren sind besonders zum Diagnostizieren und Überwachen von Krankheiten aufgrund eines genetischen Defektes nützlich, der nur in einer Zellsubpopulation vorhanden ist, wie Defekte, die sich aus somatischen Mutationen ergeben. Zu Beispielen solcher mit einem genetischen Defekt assoziierten Krankheiten zählen Autoimmunkrankheiten, Entzündungen, Krebs, Krankheiten des Nervensystems, und Hypertonie. Zu Autoimmunkrankheiten zählen rheumatische Arthritis, Multiple Sklerose, Diabetes, (Insulin-abhängig und nicht-unabhängig), systemische Lupus erythematodes, und Graves-Krankheit. Zu Beispielen von Krebs zählen Blasen-, Gehirn-, Brust-, Colon-, Speiseröhren-, Nierenkrebs, Leukämie, Leber-, Lungen-, Mundhöhlen-, Eierstock-, Pankreas-, Prostata-, Haut-, Magen- und Uteruskrebs.

[0058] Viele Krebse ergeben sich aufgrund von Mutationen in seltenen Zellsubpopulationen. Krebse entwickeln sich und progressieren durch die Ansammlung von genetischen Abnormalitäten an kritischen Loci (34, 35). Diese Abnormalitäten können Veränderungen einer oder einiger weniger DNA Base(n), Deletionen mit Bereich von submikroskopisch zu ganzen Chromosomen, Verdoppelungen oder Amplifikationen höher Ebene von chromosomalen Regionen, oder Umordnungen, die eine abnormale Juxtaposition von DNA-Sequenzen (36) erzeugen, beinhalten. In einigen Fällen, wie der abl-bcr Fusion auf dem ursprünglichen Philadelphia-Chromosom, sind spezifische Translokationen mit der Aktivierung oder Modifikation von humanen Protoonkogenen (37, 38) assoziiert. In ähnlicher Weise ist das Ewing's Sarkom mit einer Translokation, welches das EWS Gen auf Chromosom 22 einschließt, assoziiert. Die Bestimmung des Anteils an kanzerösen Zellen in einem Tumor ermöglicht das Grading (Einstufung) des Tumors, für eine verbesserte Diagnosis, Prognose und Behandlungsplanung. Das Verhältnis kann ebenfalls für die Evaluierung von sowohl der Adäquanz der chirurgischen Toleranz als auch der Gegenwart von mikroskopischen Metastasen im Knochenmark oder an anderen Stellen wertvoll sein.

[0059] Die Verfahren sind ebenfalls für das Diagnostizieren der Gegenwart von latenten Viren nützlich. Zum Beispiel integrieren einige Viren, wie Herpes-Viren und Retroviren in die genomische DNA einiger Zellen innerhalb des Körpers und bleiben bis zur Aktivierung ruhend. Die Analyse einer Gewebeprobe eines Patienten, der

mit einem solchen Virus infiziert oder verdächtigt wird mit diesem infiziert zu sein, kann den Prozentsatz der Zellen, die mit dem Virus identifiziert sind und die Kopienzahl des Virus in unterschiedlichen Zellen bestimmen. Eine solche Information ist für das Diagnostizieren der Gegenwart von Viren, der Schwere der Infektion und des empfohlenen Behandlungsablaufes nützlich. Das Vorhandensein des Virus kann mittels einer Sonde, die so konstruiert ist, dass sie entweder mit der viralen genomischen Nukleinsäure oder mit der viralen mRNA, oder mit beiden hybridisiert, nachgewiesen werden. Die Verfahren können ähnlicherweise verwendet werden, um die Kopienzahl der viralen mRNA in Zellen des Patienten zu bestimmen. Eine solche Information kann für das Überwachen des Krankheitfortschritts nützlich sein, zum Beispiel als Antwort auf die Behandlung mit einem Arzneimittel.

[0060] Diese Verfahren sind ebenfalls für das Bestimmen der allelischen Häufigkeit in einer Population und für das Korrelieren solcher Häufigkeiten mit einem Phänotyp nützlich. Zum Beispiel können Zellen, die von einer Population von Individuen entnommen wurden, zusammengefasst (pooled) und durchsucht werden, um die Häufigkeit von unterschiedlichen allelen Formen eines Gens zu bestimmen. Wenn die Population einen üblichen Phänotyp (z.B. eine Krankheit) aufweist, kann eine Korrelation durchgeführt werden, um zu bestimmen, ob das Vorhandensein einer der allelen Form mit dem Phänotyp statistisch assoziiert ist.

[0061] Die Verfahren sind weiters für das Bestimmen von Zelltypen, die ein interessierendes Gen exprimieren, nützlich. Zum Beispiel, wenn ein neues Gen unbekannter Funktion entdeckt worden ist, kann eine Sonde, die zu einem Exon-Segment und gegebenenfalls zu Segmenten in aufeinanderfolgenden Exons komplementär ist, konstruiert werden. Infolgedessen, kann die Sonde mit der von dem Gen exprimierten mRNA hybridisieren. Eine Zellpopulation von unterschiedlichen Geweben eines Individuums wird erhalten, und die Zellen werden auf Hybridisierung mit der Sonde durchsucht. Zellen die mit der Sonde hybridisieren, exprimieren das Gen. Die Natur der Zellen, die das Gen exprimieren, stellt wertvolle Information bezüglich der Genfunktion bereit.

[0062] Ähnliche Verfahren können verwendet werden, um eine cDNA zu klonieren, wenn nur ein Teil der kodierenden Sequenz bekannt ist. Der Teil der bekannten Sequenz wird verwendet, um eine Sonde zu konstruieren. Eine Population an unterschiedlichen Zellen wird dann eingekapselt und mit der Sonde hybridisiert. Die Zellen werden dann gemäß dem Ausmaß der Expression getrennt. Zellen die das höchste Expressionsniveau zeigen, stellen ein geeignetes Quellmaterial zu Verfügung, von welchem die cDNA kloniert werden kann.

[0063] Die Verfahren sind weites für das Vergleichen und Überwachen der Expression eines gegebenen Gens oder Gene in unterschiedlichen Zelltypen nützlich. Eine Sonde wird so konstruiert, dass sie mit einem mRNA Transkript jedes Gens von Interesse hybridisiert.

[0064] Verschiedene Sonden können gegebenenfalls unterschiedliche Markierungen tragen. Die Sonden werden dann mit mRNA in einer Mikrotropfen eingekapselten Zellpopulation, die typischerweise Zellen verschiedener Art enthält, hybridisiert. Das Ausmaß der Hybridisierung jeder Zelle mit jeder Sonde wird dann bestimmt. Gegebenenfalls werden die Zellen isoliert, die mit einer bestimmten Sonde auf Niveaus, die signifikant ober- oder unterhalb des Durchschnitts liegen, hybridisiert und der Zelltyp wird bestimmt, wodurch die Korrelation zwischen Zelltyp und Expressionsniveau ermöglicht wird. Unterschiedliche Zellarten in einer Population können gegebenenfalls selbst mit Reagenzien, die spezifisch an einen bestimmten Zelltyp binden, markiert sein. Zum Beispiel kann ein bestimmter Zelltyp mittels eines Antikörpers, der einen für eine Zellart spezifischen Rezeptor bindet, markiert werden. Die Mikrotropfen werden dann auf sowohl die Zellart-Markierungen als auch die Sonden-Markierungen analysiert, wodurch der Vergleich der Expressionsniveaus der einzelnen mRNA-Spezies zwischen den Zellarten, die spezifisch markiert worden sind, erleichtert wird.

[0065] Die Verfahren sind ebenfalls für das Herstellen isolierter Chromosomen nützlich. Wie erwähnt sind isolierte Chromosome für, z.B., positionelle Klonierungsstudien und für das Herstellen von Sonden nützlich.

XII. Ausrüstungssätze

[0066] Die Erfindung beinhaltet ebenfalls Ausrüstungssätze für das Ausführen der Verfahren der Erfindung. Der Ausrüstungssatz weist Geräte und/oder Reagenzien, für das Herstellen der Gel-Mikrotropfen, und gegebenenfalls Sonde(n), für das Durchführen der Hybridisierung mit den eingekapselten Nukleinsäuren, auf. Zu Beispielen für Geräte zählen ein CellSys 100 Microdrop Maker und Komponenten davon, ein Instrument, welches eine pulsierende Novelle bereitstellt, wie zum Beispiel ein Tintenstrahldrucker, und ein Vortexer. Zu Beispielen von Reagenzien zählen Chemikalien, um ein Gel zu bilden, wie Agarose oder Acrylamid, Vernetzungsmittel, Denaturierungsmittel, und Hybridisierungspuffer. Der Ausrüstungssatz kann weiters Markierungen und andere Chemikalien, um das Markierungssignal zu verstärken, enthalten. Die Ausrüstungssätze enthalten üb-

licherweise Etiketten oder Instruktionen, die die Eignung des Ausrüstungssatzes für das Durchführen der Hybridisierung in Geltropfen und/oder die Flusszytometrie-Analyse angeben. Der Ausdruck „Etikett" wird allgemein verwendet, um jedes geschriebene oder aufgezeichnete Material zu umfassen, welches an den Ausrüstungssatz zu irgendeiner Zeit während der Herstellung, Transport, Verkauf oder Verwendung, angeheftet ist oder diesen anderweitig begleitet.

Beispiele

1. Einkapslung, Hybridisierung und Durchsuchen von Chromosomen und Stabilität der eingekapselten Chromosomen

Materialien und Verfahren

[0067] Zelllinien und Kultivierungsbedingungen: Zellen von humaner chronischer myelogener Leukämie, K-562, humaner akuter lymphozytischer Leukämie, REH (American Type Culture Collection, Rockville, MD), und Maus-Fibroblasten, Mus Spretus C1-5A (Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM) wurden in RPMI 1640 Medium, welches mit 10 % fötalem Rinderserum ergänzt war, bei 37 °C in der Gegenwart von 5 % CO_2 gezüchtet. Normale humane Lymphoblast-Zellen GM130 (NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repostiory, Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ) wurden unter identischen Bedingungen gezüchtet, außer dass RPMI 1640 Medium mit 15 % hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum ergänzt war.

[0068] Quelle der Pflanzenchromosomen: Pflanzenchromosomen der Ackerbohne Vicia faba (von J. Dolezel, Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czech Republic) wurden aus den Wurzelmeristemen nach der Zellzyklus-Synchronisation mit Hydroxyharnstoff und Metaphase-Anhäufung mit Amiprophosmethyl isoliert (21).

[0069] Mitotische Zellzubereitung: Maus C1-5A Zellen (eine anhaftende Zelllinie), welche das logarithmische Wachstum durchmachen wurden mit 0,2 µg/ml Colcemid (Sigma, St. Louis, MO) für 12-15 Stunden behandelt. Mitotische Zellen, die weniger anhaftend werden, wurden abgeschüttelt und in einer hypotonischen Lösung (55 mM KCl) resuspendiert. Humane K-562 Zellen, welche ein logarithmisches Wachstum durchmachen, wurden mit 60 µM Genistein (Sigma) für 24 Stunden behandelt, um das Wachstum zu synchronisieren (23). Die Zellen wurden dann pelletiert und einmal mit Hank's balanzierter Salzlösung (Sigma) gewaschen. Frisches Medium, welches 0,1 µg/ml Colcemid enthält, wurde hinzugefügt und die Zellen wurden für weitere 24 Stunden gezüchtet. Nach dem Zählen, wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (100 g für 10 min bei 4 °C) und in hypotonischer Lösung (75 mM KCl) resuspendiert. Humane REH Zellen wurden bis zur stationären Phase gezüchtet, um das Wachstum zu synchronisieren, und dann für 2 Stunden stehen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit geerntet und in frischem 0,1 µg/ml Colcemid enthaltendem Medium für 24 Stunden gezüchtet. Nach dem Pelletieren wurden die Zellen in hypotonischer Lösung (75 mM KCl) resuspendiert.

[0070] Chromosomenisolation: Humane und Maus-Chromosomen wurden mittels des Polyamin-Verfahrens isoliert (31, 32), mit geringfügigen Abweichungen. Ungefähr 2×10^7 Zellen wurden in 10 ml hypotonischer Lösung entweder für 30 min (humane REH) oder für 1 Stunde (humane K-562 und Maus C1-5A Zellen) bei Raumtemperatur aufquellen gelassen. Nach dem Aufquellen, wurden die Zellen durch 5 Min Zentrifugation bei 40g pelletiert und sanft in 0,1 ml frischer hypotonischer Lösung resuspendiert. Zwei ml Chromosom-Isolierungspuffer (CIB; 15 mM Tris-HCl, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,2 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, pH 7,2), ergänzt mit 0,1 % (Vol/Vol) 2-Mercaptoethanol und 0,2 % (Vol/Vol) Trition X-100 wurden hinzugefügt und die Lösung wurde durch kurzes Vortexing (10 Sekunden) gemischt. Die Röhrchen wurden für ungefähr 10 Minuten bei 0°C gehalten. C1-5A Zellen wurden durch eine 25 Gauge Nadel geführt, bis die Chromosomen freigesetzt wurden, wie durch Fluoreszenz-Mikroskopie überprüft wurde. Zellkerne und zelluläre Fragmente wurden durch drei aufeinanderfolgende 5 Min Zentrifugationen bei 40 g entfernt. Die oberen zweidrittel des Überstandes wurden nach der letzten Zentrifugation bei 4°C für 16 Stunden aufbewahrt. Der Überstand wurde dann vorsichtig dekantiert, um ein Aufwühlen des abgesetzten Chromosomenpellets zu verhindern. Die Chromosomen wurden in 0,2 ml CIB resuspendiert und die Aggregate wurden durch Zentrifugation bei 40 g für 5 Minuten pelletiert. Die Chromosomen wurden entweder in CIB gelagert oder unmittelbar in Agarose-Gel-Mikrotropfen (GMDs) eingekapselt.

[0071] Chromosomen-Einkapslung: Die Chromosom/Agarose Mischung (2,3 % Typ XII Agarose; (Sigma) 0,1 % Triton X-100 (Sigma), die 10^6 Chromosomen/0,55 ml enthalten) wurden durch Schmelzen der Agarose in CIB bei 100 °C, Abkühlen der Agarose auf 58 °C und dem Hinzufügen von 100 µl Chromosom-Suspension und 50 µl 11 % (Vol/Vol) Triton X-100 (vorgewärmt auf 50 °C) zu 0,4 ml geschmolzener Agarose hergestellt. Die

Mischung wurde bei 58° für 5 min gehalten und tropfenweise zu 15 ml CelMix™ 200 Emulsionmatrix (One Cell Systems, Cambridge, MA), die auf 58 °C vorgewärmt wurde, hinzugefügt. GMDs wurden mit einem CellSys 100 Microdrop Maker (One Cell Systems, Cambridge, MA), der mit einer 1,6 cm Klinge ausgestattet ist, unter Verwendung aufeinanderfolgender Rotorgeschwindigkeiten von 1.500 U/min für 1 Minute bei 20-25°C, 1.500 U/min für 1 Minute bei 0 °C, und 1.500 U/min für 5 Minute bei 0 °C hergestellt. Die GMDs wurden von der Emulsionmatrix duch Zentrifugation bei 350 g für 10 Minuten getrennt. Das eingekapselte Chromosom-enthaltende Pellet wurde zweimal mit 13 ml CIB gewaschen, durch Zentrifugieren bei 250g für 5 Minuten re-pelletiert, und bei 4 °C in 10 ml des gleichen Puffers gelagert.

[0072] Chromosomen-Färbung: Eingekapselte Chromosomen wurden mit Propidiumiodid (0,4 µg/ml) für die mikroskopische Untersuchungen und mit 7-Actinomycin (7AAD), mit der gleichen Konzentration, beide von Sigma, für die Flusszytometrie, gefärbt.

[0073] Hybridisierungssonden: LSI™ 22q (bcr-Locus spezifisch, Vysis, Downers Grove, IL), welches mit einer 300 kb Region des bcr Gens auf Chromosom 22 hybridisiert, wurde verwendet. Diese Sonde wurde direkt mit Spectrum Green™ (Fluorescein) markiert. Nach der Markierung reichte die Sondengrößenverteilung von 50-500 nt. Die DNA Sonde wurde vor der Hybridisierung 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

Mikrotropfen in situ Hybridisierung (MISH) der humanen Chromosomen

[0074] Eingekapselte chromosomale DNA wurde in 0,1 N NaOH, 50 % (Vol/Vol) Ethanol für 1,5 Minuten denaturiert. Die GMDs wurden einmal in 0,5 M Natriumcarbonat, pH 10,2 gewaschen. Nach der Denaturierung wurden die Hydroxylgruppen in den Agarose-Mikrotropfen mit 5 µM Divinylsulfon durch Inkubieren für 30 Minuten bei Raumtemperatur mild vernetzt.

[0075] Überschüssige reaktive Gruppen des Divinylsulfon wurden mit 2 % (Vol/Vol) 2-Mercaptoethanol für 30 Minuten in 40 mM Tris-HCl, pH 8,0 blockiert. Die GMDs wurden dann mit 2xSSC (0,15M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat) gewaschen.

[0076] 100 µl (ungefähr 2×10^5) humaner Chromosomen, die in GMDs eingekapselt sind, wurden mit 2,0 µl denaturierten Sonden (Sondenkonzentration war für den Hersteller gesetzlich geschützt) in einer Hybridisierungsmischung (2xSSC, 10 % (Vol/Vol) Dextransulfat, 50 µg/ml Lachssperma ssDNA) für 16 Stunden bei 68 °C hybridisiert. Nach der Hybridisierung, wurde die nicht spezifisch-gebundene Sonde durch Inkubieren der GMDs mit 1,0 ml 0,4 × SSC bei 72 °C für 5 Minuten (LSI/22) und zweimal waschen mit 0,4 × SSC bei Raumtemperatur entfernt. Cot-DNA wurde hinzugefügt, um die nicht-spezifische Hybridisierung mit Wiederholungssequenzen zu verhindern.

[0077] Mikroskopie und digitale Bildanalyse. Die Integrität der Chromosomen nach der Fluoreszenz-Färbung oder MISH wurde visuell mittels eines Olympus BH-2 Mikroskops (40 × SPlan 0,4 Objektiv oder Phasenkontrast A40 PL 0,65 Objektiv) untersucht, welches für Epifluoreszenz mit geeigneten Filtern für Fluorexein und 7AAD ausgerüstet ist.

[0078] Flusszytometrie-Analyse. Nach Färbung oder MISH, wurden eingekapselte Chromosomen unter Verwendung eines FACS Vantage Flusszytometers (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA), ausgerüstet mit einer Standard 100 µm Düse, analysiert. LYSYS II Vers. 2.0 Software wurde für die Datenanalyse verwendet. Um große Partikel zu entfernen, wurden die GMDs durch ein 53 µm Nylonsieb (Small Parts Inc., Miami Lakes, Fl) gesiebt. Für die Flusszytometrie-Analyse wurde eine Mikrotropfen-Konzentration, die 2×10^5/ml nicht überschreitet, verwendet. Vorwärtsstreusignale und Seitenstreusignale wurden auf einer logarithmischen Skala analysiert und in einem Scatter-Plot-Format untersucht, was eine Identifizierung der und Ausblenden von GMS ermöglicht. 7 ADD Fluoreszenz wurde verwendet, um GMDs, die eingekapselte Chromosomen enthalten, zu identifizieren. Ein Argonlaser mit einer Spektrallinie von 356 nm wurde verwendet, um 7ADD zu identifizieren. Um die mit den Spektrum Green™ markierten Proben hybridisierten Chromosome zu identifizieren, wurde die Fluorescein (FITC)-Intensität gemessen. Um die FITC-Fluoreszenz zu messen, wurde ein Argonlaser mit einer Spektrallinie von 488 nm verwendet.

[0079] Fluoreszenz-aktivierte-GMD-Sortierung: Eingekapselte Chromosomen wurden unter Verwendung eines FACS Vantage Fluoreszenz-aktivierten-Zell-Sortierers (Becton Dickinson), der mit einer „Makrosort"-Option ausgestattet ist, sortiert. Der Hülldruck wurde auf 2 psi eingestellt, mit einem Probendifferenzial von 1 psi. Eine Probenleitung mit großem Durchmesser wurde verwendet, um ein Verstopfen zu verhindern. Die GMD Proben wurden durch ein 53 µm Sieb vor dem Sortieren gesiebt. Die Sortiergeschwindigkeit war im Bereich

von 50 FITC-makrierten Chromosomen/Sekunde. Die sortierten GMD-eingekapselten Chromosomen wurden durch Zentrifugation bei niederer Geschwindigkeit pelletiert und mit 20 µl Antifade-Lösung (Oncor, Gaitersburg, MD) aufgenommen, mit CIB 1:1 verdünnt und mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops analysiert.

[0080] Verdau der denaturierten eingekapselten chromosomalen DNA mit HindIII: Eingekapselte Chromosomen wurden denaturiert, wir vorher beschrieben, mit 40 mM Tris-HCl, pH 8,0 gewaschen und nachfolgend mit Proteinase K (2 mg/ml), ergänzt mit Lithiumdodecylsulfat (1 %) in CIB für 12 Stunden bei 50 °C verdaut. Chromosomen wurden dann dreimal mit einem 200fachen Überschuss an CIB und zweimal mit einem 20fachen Überschuss an HindIII-Verdauungspuffer (50 mM NaCl/10 mM Tris-HCl, pH 8,0/10 mM $MgCl_2$) gewaschen. Der Verdau der eingekapselten Chromosome wurde unter Verwendung von 20 Einheiten HindIII (Gibco-BRL) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für 90 min bei 37 °C durchgeführt. Gelladungspuffer wurde hinzugefügt und die Proben, wie unten beschrieben, elektrophoretisiert.

[0081] Gel-Elektrophorese der chromosomalen DNA. Sowohl freie als auch eingekapselte Chromosomen wurden mit Proteinase K und Lithiumdodecylsulfat, wie oben beschrieben, für drei Stunden bei 50 °C behandelt. Gelladungspuffer (6 × 0,25 Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, 30 % Glycerol) wurde hinzugefügt und die Proben wurden auf 0,8 % SeaKem Gold (FMC BioProducts, Rockland, ME) Agarose in TAE Puffer (0,04 M Tis-Acetat, 1 mM EDTA) bei 56 Volt für 2-6 Stunden elektrophoretisiert. Propidiumiodid war in dem Gel (0,5 µg/ml) und in dem Elektrophorese-Puffer (0,05 µg/ml) während der Elektrophorese vorhanden. 0,25 µg Lambda DNA oder 1,0 µg ϕX174 DNA, geschnitten mit HinFI (Gibco-BRL), wurde als Standard verwendet.

[0082] Lagerung und Wiedergewinnung der Chromosomen. Freie und eingekapselte Chromosomen wurden bei 4 °C für bis zu 6 Monate in CIB aufbewahrt. Agarose (aus Pseudomonas atlantica, Sigma) wurde verwendet, um GMDs zu verdauen, um die Chromosomen von Interesse wiederzugewinnen. Eingekapselte Chromosomen wurden pelletiert, in Phosphat-gepufferter Salzlösung pH 7,0 (Sigma) resuspendiert, und Agarose (30 Einheiten pro 1000 GMDs) wurden hinzugefügt. Diese Suspension wurde bei 40 °C für 2 Stunden inkubiert, mit Proteinase, so wie oben beschrieben, behandelt, und die chromosomale DNA durch Gelelektrophorese analysiert. Ergebnisse

[0083] Fig. 1 zeigt eingekapselte und nicht-eingekapselte Human-, Maus-, und Pflanzenchromosome. Eingekapselte Chromosomen erscheinen sichtbar kompakter als nicht-eingekapselte Chromosomen, mit engeren zentromeren Regionen und fest-gebundenen Chromatid-Erweiterungen. Die zentromeren Regionen der eingekapselten Chromosomen erscheinen physisch ungetrennt, was ein Hinweis für einen Chromatid-Verlust wäre. Interessanterweise, wurde die Einkapselung von intakten Pflanzenchromosomen, die etwa 3-mal größer als humane Chromosomen sind, ebenfalls mit diesem Verfahren erfolgreich durchgeführt.

[0084] Stabilität der eingekapselten Chromosome: Um die Langzeitstabilität der eingekapselten Chromosome zu beurteilen, untersuchten wir die DNA-Fragmentierung mittels Gelelektrophorese. Wie in Fig. 2 dargestellt ist, konnte keine DNA Fragmentierung mittels elektrophoretischer Analyse gefunden werden, sogar 6 Monate nach der Einkapselung. Im Gegensatz dazu, hatte die DNA von nicht-eingekapselten Human- und Mauschromosomen, einen Monat nach der Isolation, ein verschmiertes Bandierungsmuster, was auf eine DNA Fragmentierung durch Nukleasespaltung hinweist. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die eingekapselte chromosomale DNA intakt bleibt, und für das Herstellen Chromosom-spezifischer Bibliotheken verwendet werden kann. Intakte Isolierung und Langzeitstabilität von hochqualitativer DNA mit hohem Molekulargewicht, wird ein bedeutender Vorteil für Forscher sein und eine Neuerung der Probenlagerung für den klinischen Einsatz.

[0085] In situ Hybridisierung eingekapselter Chromosomen: Eine wichtige Verbesserung war die Entwicklung eines Matrix-Vernetzungs-Verfahrens, welches die Verwendung von bis zu 50 % Formamid und Temperaturen von 95 °C ermöglicht, die für die reproduzierbare Hybridisierung notwendig ist. Die Agarose Hydroxylgruppen wurden mit Divinylsulfon mild vernetzt. Obwohl dieses Verfahren auch chromosomale DNA mit der Agarose-Matrix teilweise vernetzt, kann, da dieses Verfahren bei pH 10 reversibel ist, DNA von den GMDs nach der MISH freigesetzt werden, was für die eventuelle Konstruktion von Chromosom-spezifischen Bibliotheken wichtig ist.

[0086] Unter Verwendung von FACS Vantage, sowohl für die Flusszytometrie-Analyse als auch Zellsortierung, wurden Dual-Parameter-Dotblots durch graphische Darstellung der FITC-Fluoreszenz erzeugt, welche das Detektieren der mit den Chromosomen hybridisierten Sonden im Vergleich zu der 7ADD Fluoreszenz war, welcher als allgemeiner Farbstoff verwendet wurde, um alle Chromosome zu detektieren. Die **Fig.** 3A zeigt die Flusssortierung des humanen Chromosoms 22, anschließend an die Mikrotropfen in situ Hybridisierung unter Verwendung einer bcr-Locus spezifischen Sonde. Die Chromosomen wurden mit 7-Amino-Actinomycin (Vysis,

Downer's Grove, IL) gegengefärbt. Die Chromosomen wurden mit 7 ADD gegengefärbt. R1 schließt hohe FITC, geringe 7 ADD Fluoreszenz ein, die für die Chromosom 22 enthaltenden Gel-Mikrotropfen spezifisch sind. Das Streuungsdiagramm zeigt ebenfalls leere GMDs, eingekapselte Chromosomen und Rauschen. **Fig.** 3B zeigt unter Verwendung der Fluoresenz-Mikroskopie sortierte Chromosomen. Das Hybridisierungssignal ist als grüne (FITC) Farbe dargestellt. Die Hybridisierungssignale wurden mittels dem TSA-Verfahren, welches eine 10-100 fache Erhöhung der Signalintensität bereitstellt, verstärkt.

[0087] Fig. 4 zeigt die Reinheit von Chromosom 22 nach dem Sortierungsschritt durch die Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung von Primersätzen, die für die Chromosome 10, 21 oder 22 spezifisch sind. Die Amplifikationsergebnisse für jeden Primersatz wurden mittels unsortierten und sortierten Chromosompopulationen verglichen. Die unsortierten Chromosome erzeugten spezifische Amplicons für jeden Primer (Bahnen 3-5), sortiertes Chromosom 22 zeigte keine Kontamination mit Chromosom 10 (Bahn 8 vs. 60) und waren weniger als 1 % mit Chromosom 21 (Bahn 8 vs. Bahn 7) kontaminiert.

[0088] Wiedergewinnung von eingekapselten Chromosomen: Wir stellten fest, dass nach dem Wiedergewinnen der Chromosome aus Agarose Mikrotropfen, die DNA, sogar 6 Monate nach der Einkapselung, nicht fragmentiert war. Wir untersuchten ebenfalls die Integrität der DNA, nachdem die Mikrotropfen mit Agarase verdaut wurden, und fanden, dass das elektrophoretische Muster das gleiche war wie für unbehandelte eingekapselte Chromosome, die als Kontrolle verwendeten wurden. Diese Beobachtungen zeigen, dass nach der Freisetzung aus Gel-Mikrotropfen, eingekapselte Chromosome eine geeignete Quelle für DNA hoher Qualität für molekular genetische Studien sein werden.

[0089] Verdau der denaturierten eingekapselten Chromosomen: Ein bedeutendes Anliegen für die eventuelle Verwendung von sortierten Chromosomen, um Chromosomen-spezifische Bibliotheken zu erzeugen, war, dass der Verdau von chromosomaler DNA mit Restriktionsenzymen, welcher für das Klonieren großer DNA Fragmente (> 100 kb) in BAC Bibliothek notwendig ist, nicht möglich sein würde, da die Denaturierung die DNA-Sekundärstruktur zerstören würden. Um dieses Anliegen zu adressieren, testeten wir die Hypothese, dass eine kurze alkalische Behandlung die DNA nur teilweise denaturieren würde, und dass der nachfolgende Verdau mit Proteinase K bei 50 °C in einem Niedrig-Salz-Puffer über Nacht die Doppelsträngigkeit wiederherstellen würde, wodurch ein spezifischer Enzymverdau möglich wird. Aus der GM 130 Zelllinie isolierte humane Chromosomen wurden mit Proteinase K verdaut und mit HindIII gespalten. Das in Fig. 5 dargestellte elektrophoretische Ergebnis zeigt, dass die Restriktionsendonuklease HindIII die wiederhergestellte DNA spaltete und Fragmente typischer Größe erzeugte, wodurch demonstriert wurde, dass MISH behandelte Chromosomen für die Bibliothek-Konstruktion verwendet werden können.

Beispiel 2: Konstruktion von Chromosom-spezifischen BAC-Bibliotheken.

[0090] Ein großes unrealisiertes Ziel der Fluoreszenz in situ Hybridisierungsuntersuchungen war die Verwendung der Flusszytometrie, um spezifische Chromosomen für die Bibliothek-Konstruktion zu isolieren. Vor der Entwicklung des MISH Verfahrens, blieb nach der Hybridisierung nur eine kleine Fraktion an Chromosomen intakt und frei in Suspension. Ohne den Schutz, der durch die Verwendung der Agarose Mikrokügelchen erhalten wird, sind die meisten Chromosome verklumpt oder fragmentiert, wodurch sie für die Flusszytometrie-Analyse großteils ungeeignet sind (27). Wir haben nicht nur gezeigt, dass wir eingekapselte Chromosomen hybridisieren und flusssortieren können, sondern auch, dass Alkali-denaturierte Chromosomen mit Restriktionsendonuklease verdaut werden können. Aufgrund dieses Ergebnisses schlagen wir die Konstruktion von Chromosom-spezifischen Bibliotheken vor. Das humane Chromosom 21 wurde ausgewählt, da es, unter Verwendung herkömmlicher Dual-Fluoreszenz-Färbung, sehr oft schwierig zu identifizieren und sortieren ist, da es klein und in der Gegenwart von zellulären Trümmern nicht zu unterscheiden ist (29). Die zweite BAC Bibliothek wird unter Verwendung des humanen Chromosoms 9 erzeugt, welches zu der Gruppe von Chromosomen gehört, die aufgrund seiner Größenähnlichkeit zu etlichen anderen Chromosomen nicht durch konventionelle Dual-Fluoreszenz-Färbung aufgelöst werden kann (13).

[0091] Chromosom-Bibliotheken werden unter Verwendung der unten angeführten Schritte konstruiert.

Sortierten der MISH-markierten Chromosomen

↓

Entfernen hybridisierter Sonden

↓

Verdauen der sortierten Chromosome mit Proteinase K in Niedrig-Salz-Puffer

↓

Verdauen der chromosomalen DNA mit Restriktionsenzymen

↓

Ligieren der DNA Fragmente in BAC Vektor

↓

Elektroporation der ligierten Produkte in E. coli Wirt

↓

Durchsuchen der Transformanten auf Chromosom-spezifische Einfügungen

Beispiel 3: Verwendung von MISH-sortierten Chromosomen für das chromosomale reverse-painting

[0092] Die Entwicklung der in situ Hybridisierung mit flusssortierten Chromsom-Bibliotheken (25, 26), zusammen mit einer nicht-isotopischen Signaldetektion (30), wurde ein leistungsstarker Ansatz für die schnelle Analyse von humanen chromosomalen Anomalien, wie Aneuploidie und Translokationen. Diese Verfahren, die als Chromsomen-painting bezeichnet werden, werden immer häufiger in der klinischen Zytogenetik verwendet. Geringfügige Umordnungen, Additionen, oder Deletionen sind jedoch mittels herkömmlichem Chromosom-painting nicht nachweisbar, sind jedoch durch das chromosomale reverse-painting nachweisbar, welches mittels Sonden durchgeführt wird, die von anormalen Chromosomen erzeugt wurden. Ein Verfahren, das MISH sortierte Chromsomen verwendet, ist nachfolgend dargestellt.

Sortierten MISH-markierten anormalen Chromosomen

↓

Deproteinisieren der sortierten Chromosomen

↓

Erste Runde der chromosomalen DNA PCR Amplifikation

↓

Herstellen einer Biotin-markierte Sonde durch eine zweite PCR Amplifikationsrunde

↓

Verwendung der Sonde in FISH-painting von normalen chromosomalen Metaphase-Spreads

Beispiel 4: Detektion des Philadelphia Chromosoms

[0093] Das Philadelphia Chromosom ist ein verkürztes Chromosom 22, dass auf eine balanzierten Translokation zwischen Chromosom 9 und 22, mit den Translokation-Bruchpunkten bei 9q34 und 22q11, zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Translokation, wird das auf Chromosom 9 lokalisierte abl Onkogen zu einem großen Teil neben einen Teil des bcr Gens, welches auf Chromosom 22 ist, gestellt, wobei eine neue bcr-abl Genfusion erzeugt wird (40, 51, 52, 53, 54). Diese Genfusion kodiert ein abnormales Protein mit einer starken Tyrosinkinase-Aktivität im Vergleich zu der schwachen Tyrosinkinase Aktivität des normalen abl Proteins. Die abnormale Tyrosinkinase, die durch das bcr-abl erzeugt wird, ruft eine erhöhte Zellproliferation hervor und trägt zu der Leukämogenese durch unbekannte zelluläre Wege bei.

[0094] Translokationen wie bcr/abl werden derzeit durch zytogenetische Untersuchungen von Metaphase-Chromosom-Zubereitungen, die aus Knochenmark-Kulturen hergestellt werden, nachgewiesen. Obwohl dieses Verfahren geeignet ist, um die meisten der chronischen myelogenen Leukämie-Fälle (CML) zu ermitteln, in welchen PH^1-positive chromosomale Translokationen nach der Bandierung aufgrund der Größenunterschiede in den Metaphase-Spreads sichtbar sind, ist die zytogenetische Untersuchung bei der akuten lymphatischer Leukämie (ALL) nur bei 65-80 % der Fälle erfolgreich, abhängig von der Erfahrung jedes Laboratoriums (55). Die niedere Ausbeute in ALL ist das Ergebnis folgender Faktoren. Erstens, haben viele ALL Patienten inaspirable Knochenmarke, so dass keine Zellen verfügbar sind. Zweitens kann es schwierig sein, Lymphoblasten zu kultivieren, so dass es nur eine geringe Anreicherung an Leukämiezellen gibt. Und drittens, kann der Prozentsatz an Ph^1 tragenden Zellen in einer Probe so gering wie 30 % sein, im Gegensatz zur CML, in welcher nahezu 100 % der kanzerösen Zellen in einer Probe Ph^1 tragen. In Fällen, wo chromosomale Umordnungen in den klassischen Metaphase-Spreads nicht sichtbar sind, was bei Ph^1-positiven Chromsomen, sowohl bei CML als auch bei ALL-Leukämie, auftreten kann, müssen Fluoreszenz in situ Hybridisierung, Southern Blot (DNA) Analyse oder Polymerase Kettenreaktion (PCR)-Analyse durchgeführt werden, um Umordnungen zu detektieren (55).

[0095] In CML hat sich die Southern Blot-Analyse bei der Ermittlung von Hinweisen über das Ph^1 Chromosom in Patienten, in denen die Zytogenetik trotz des Vorhandenseins einer klinischen Präsentation von CML (53), negativ ist, als nützlich erwiesen. Dieser Ansatz ist in ALL nur von beschränktem Nutzen, da nur 25-50 % der Ph^1 Chromosom positiven ALL Patienten M-bcr aufweisen (häufigste Bruchpunktumordnungen). Nahezu alle M-bcr negativen Patienten weisen Translokations-Bruchpunkte in m-bcr (geringfügige Bruchpunktumordnungen) auf, irgendwo im ersten Intron, welches eine Größe von 70 kb hat, was die Durchführung einer unzweckmäßigen Anzahl von Southern blots erfordert, um diese Region angemessen zu untersuchen.

[0096] Die chromosomalen Bruchpunkte in CML und akuten Leukämien können über eine große DNA Sequenz auftreten: 5,8 kb für die bcr Region in CML und über 90 kb für das erste Intron des bcrl Gens in akuten Leukämien. Deshalb kann eine Fusion bcr/abl Gensequenz PCR Amplifikation mit DNA aus einer Patientenprobe nicht durchgeführt werden. Alle PCR basierenden Verfahren sind so ausgelegt, dass sie eine abnormale mRNA Fusion (RT PCR) amplifizieren und detektieren. Die Konstruktion dieser Verfahren nutzt die Tatsache aus, dass mRNA Sequenzen viel kürzer sind und keine Intron-Sequenzen aufweisen. Unter der Annahme, dass Primer konstruiert werden können, um kurze mRNA Abschnitte zu amplifizieren, die für bestimmte Translokationen spezifisch sind (derzeit für Ph^1 fusionierte mRNA erhältlich), kann das amplifizierte Ziel nach der Hybridisierung mit spezifischen Sonden detektiert werden, gefolgt von einer Gelelektrophorese und Northern blotting. Die Größe der bcr/abl fusionierten mRNA für unterschiedliche Patienten variiert innerhalb eines bestimmten Bereichs für CML- und akute Leukämie-Bruchpunkte, jedoch ist die gleichgroße Fusion-mRNA für jeden malignen Klon charakteristisch und kann für jeden Patient über den klinischen Verlauf der Leukämie überwacht werden.

[0097] Ein Vorteil der Verwendung der mRNA als Ziel für die PCR Amplifikation ist, dass mitotische Zellen nicht notwendig sind. Die praktische Sensitivitätsgrenze für die Detektion ist ungefähr 1 maligne Zelle pro 10.000 nicht-maligne Zellen. Während die ausgezeichnete Sensitivität der PCR für molekular-diagnostische Untersuchungen vorteilhaft sein könnte, ist seine Verwendung in einem klinischen Laboratorium mühevoll. Die Kontamination mit winzigen Mengen an amplifizierter DNA und/oder RNA von einer Patientenprobe oder Zelllinien-Kontrolle, sogar im Bereich von 1 bis 10 Kopien, kann Falsch-Positive Ergebnisse hervorrufen. Aerosole und Überträge sind die Hauptquellen für die Kontamination. Ein potentielles Problem beim Überwachen des Vorhandenseins des Ph^1-Chromosoms nach einer Chemotherapie oder Knochenmarktransplantation durch RT-PCR ist die Gegenwart von restlichen toten Leukämiezellen mit intakten mRNA, die die therapeutische Beurteilung verkomplizieren.

[0098] Die mit der Flusszytometrie-Analyse kombinierte MISH Technik leistet einen signifikanten Beitrag zu der Analyse von Translokationen. Da Metaphase-Chromosomen notwendig sind, tragen nur lebende Leukämie-Zellen Ph^1-Chromosomen für die Detektion bei. Solange Leukämie-Zellen proliferieren und die Mitose erreichen, können ungefähr 20 Ph^1 positive Chromosomen in der Gegenwart von 50.000 Chromosomen, einschließlich jener von Philadelphia-negativen Zellen, in etwa 5 Minuten detektiert werden. Dies entspricht der Detektion von 20 Zellen mit einer einzelnen Kopie des Ph^1 Chromosoms, oder 10 Zellen mit zwei defekten Kopien, in einer Umgebung von etwa 1.000 Zellen, die Ph^1-Chromosom negativ sind (2 % Leukämie-Zellen vorhanden). Um die statistische Signifikanz zu verbessern, kann die Analyse von 100.000 Ereignissen in ungefähr 10 Minuten durchgeführt werden, unter der Voraussetzung, dass Metaphase-Chromosomen von beiden Zelltypen vorhanden sind. Im Gegensatz dazu, müsste mit derzeitigen FISH-Verfahren unter Verwendung von Metaphase-Spreads, die von Knochenmarkkulturen, die einen mitotischen Index von 10 % aufweisen, erhalten

wurden, ein Ph-positiven Spread in der Gegenwart von 1,000 Ph-negativen Spreads gefunden werden, ein mittels konventioneller Mikroskopie laborintensiver und unzweckmäßiger Ansatz.

Materialien und Verfahren

[0099] Chromosom-Einkapselung und Hybridisierungsbedingungen waren wie oben beschrieben. Die LSI™ bcr/abl DNA Sonde wurde für die in situ Hybridisierung verwendet. Die Sonde war mit SpektrumGreen™/SpectrumOrange™ direkt markiert, die konstruiert wurden, um Translokationen zwischen Chromosom 9 und 22 zu detektieren (Vysis, Downers Grove, IL). Diese Sonde detektiert bcr/abl Genfusionen, das molekulare Äquivalent zu dem Philadelphia-Chromosom (Ph^1), sowohl in der Metaphase als auch in Interphase-Zellen. Es kann verwendet werden, um die bcr/abl Genfusion, die eine der Beiden Bruchpunkt-Regionen (M-bcr und m-bcr) in dem bcr Gen auf Chromosom 22 einschließt, zu identifizieren. Die bcr/abl Translokationssonde ist sowohl für die Verwendung in kultivierten Lymphozyten als auch in Knochenmarkzellen geeignet. Die LSI™ Sonde enthält keine Wiederholungssequenzen und ist aus einer abl Sonde, die direkt mit SpectumOrange Fluorophor markiert ist, und eine bcr Sonde, die direkt mit SpectrumGreen Fluorophor markiert ist, zusammengesetzt. Die abl Sonde beginnt zwischen c-abl Exon 4 und 5 und verläuft für etwa 200 kb in Richtung des Telomers auf Chromosom 9. Die bcr Sonde beginnt entweder zwischen bcr Exon 13 und 14 (m-bcr) oder zwischen bcr Exon 2 und 3 (M-bcr) und erstreckt sich etwa 300 kb in Richtung des Centromers, wobei die m-bcr Region vollständig überschritten wird. Die Größenverteilung der Sonde ist innerhalb des Bereiches von 50-500 nt (nach der Markierung).

[0100] Nach der Hybridisierung kann von den Chromosomen, die die M-bcr/abl Genfusion in chronischer myelogener Leukämie (CML) und in akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) enthalten, erwartet werden, dass sie die fusionierten orangen und grünen Signale im translozierten Chromosom 22 enthalten, die manchmal als gelb wahrgenommen werden. Normale Chromosomen 22 sollten ein grünes Signal anzeigen und normale Chromosome 9 sollten ein oranges Signal darstellen. Hybridisierte Chromosome, die die m-bcr/abl Genfusion in ALL aufweisen, sollten das fusionierte grüne/orange Signal im Chromosom 22 und das schwache grüne Signal, das nicht mit dem orangen Signal fusioniert ist auf Chromosom 9 (von der Chromosom 22 Region zwischen m-bcr und M-bcr, die auf das Chromsom 9 transloziert ist) enthalten.

Ergebnisse

[0101] Chromosomen Isolation: Um die Ausbeute an humanen mitotischen Zellen zu erhöhen, wurden K-562 Zellen mit einem neuartigen Verfahren unter Verwendung von Genistein, einem Isoflavon, das den Zellzyklus bei G_2/M blockiert, synchronisiert. Ein wichtiger Vorteil von Genistein für die Zellzyklussynchronisation war, dass es die Zellen nicht zu durchdringen erscheint und leicht durch Waschen entfernt werden kann. Nach der Synchronisation war das Wachstum der K-562 Zellen durch das Vorhandensein von Colcemid für bis zu 24 Stunden nicht signifikant beeinträchtigt, und ein hoher Prozentsatz (75 %) der Zellen erreichten deshalb die Mitose. Die Verwendung von Genistein ergab einen bereiten Vorrat an Millionen von Chromosomen, der eine extensive Experimentierung mit Einkapselung- und Fluoreszenz in situ Hybridisierungs-bedingungen erleichtert. Das Verfahren kann ebenfalls verwendet werden, um Chromsome für andere Zwecke zu isolieren.

[0102] In **Fig. 6** sind die Nachweise des translozierten Chromosoms 22, Links, Chromosom 9, Mitte, und das Translokations-freie Chromosom 22, Rechts, mittels MISH gezeigt. Das translozierte Chromosom 22 ist durch das Vorhandensein von sowohl grünen als auch roten Farben auf einem Hintergrund eines blaugefärbten gesamten Chromosoms identifizierbar. Die fusionierten roten und grüne Signale können als Gelb wahrgenommen werden (links unten in **Fig. 6**). Diese gelbe Farbe repräsentiert ebenfalls das fusionierte bcr/abl Gen (transloziertes Chromosom 22). Das Translokations-freie Chromosom 22 ist durch das Vorhandensein einer einzelnen grünen Farbe und Chromosom 9 durch das Vorhandensein einer einzelnen roten Farbe nachweisbar. Digitale Bilder, die mit einem CELLscan digitalen Bildsystem mit einem Exhaustive Photon Reassignment (EPR), welches durch eine Zusammenarbeit erhältlich war, erzeugt wurden, werden hier dargestellt, jedoch war ein Fluoreszenzmikroskop, das mit einem Dreifachbandfilter für DAPI, Fluorescein, und Rhodamin ausgestattet war, ausreichend, um die Translokationen im $Philadelphia^1$ Chromosom zu identifizieren.

Beispiel 6: Analysieren von eingekapselten humanen Zellkernen unter Verwendung von Mikroskopie und Flusszytometrie

[0103] Das Analysieren von MISH Signalen in Zellkernen liefert einen verbesserten Kontrast bezüglich des MISH Nachweises in Chromosomen. Weiters kann die MISH Analyse von Zellkernen in Fällen durchgeführt werden, wo die Zellproliferation schwierig oder unmöglich ist.

[0104] Die Anwendungen sind zahlreich und beinhalten die Detektion von: Translokationen, Deletionen, Monosomien oder Trisomien für die diagnostische und prognostische Analyse von Anomalien. Dieses Verfahren kann ebenfalls in Forschungsanwendungen, einschließlich Gen-Amplifikationen und Genkartierung verwendet werden. In diesem Beispiel verwendeten wir humane Zellkerne mit deletiertem Chromsom 3 als Modellsystem. Dieser genetische Defekt zeigt zahlreiche klinische Symptome in betroffenen Personen, einschließlich mentaler Retardation und multiple kongenitale Anomalien.

Isolationen von Zellkernen

[0105] Die Zellkerne werden aus der humanen lymphoblastoiden Zelllinie GM11428 (NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository, NIH, Bethesda, MD) isoliert. HL-60 Zellen sind eine Quelle für normale Zellkerne (Kontrolle), die in allen Chromosomen keine Deletionen aufweisen. Zellen im logarithmischen Wachstumsstadium wurden gesammelt und in einer hypotonischen Lösung (75 mM KCl) für 1 Stunde gequellt. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei niederer Geschwindigkeit pelletiert und in 2-Mercaptoethanol-freiem CIB Puffer (1 Million Zellen/ml) resuspendiert. Triton X-100 wird dann hinzugefügt, um eine Endkonzentration 0,2 % Zellkernen, die aus den Zellen freigesetzt wurden, zu erhalten, und wurden für 1 Stunde in dieser Lösung bei 4°C aufbewahrt, dann durch Zentrifugation bei 100 g pelletiert und im ursprünglichen Zellvolumen im selben Puffer resuspendiert und repelletiert. Schlussendlich werden die Zellkerne mit einer Konzentration von 10 Millionen Zellkernen pro ml 2-Mercaptoethanol-freiem CIB Puffer resuspendiert.

Einkapselung der Zellkerne

[0106] Die Einkapselung der Zellkerne wird im Wesentlichen, wie vorher für die Chromsosomen-Einkapslung beschrieben, durchgeführt. Die GMD Größe kann jedoch von 25-35 bis 45-55 µm durch Modifikation der Klingengeschwindigkeit während des Emulgierungsverfahrens anpasst werden, um die größere Größe von Zellkernen zu berücksichtigen.

Beispiel 7: Verbessertes Verfahren für die Chromosomen-Isolation

[0107] Die Chromosomen können in der Metaphase synchronisiert werden, indem die Zellen, aus denen die Chromosomen isoliert werden sollen, mit dem Flavonoid Genistein zusammen mit Colcemid, welches häufig benutzt wird, um den Zellzyklus in der Metaphase zu blockieren, kultiviert werden. Dieses Verfahren ergibt einen mitotischen Index von etwa 75 % (d.h., drei von 4 Zellen ergaben Metaphase-Chromosomen).

[0108] Die Chromosomen werden aus den Zellen durch eine hypotonische Behandlung freigesetzt. Die quantitative Freisetzung der Chromosomen erfordert zumindest eine gewisse Scherkraft, wie Vortexing oder Durchleiten durch eine Gauge-Nadel, und erzeugen einige Zelltrümmer. Nach der Chromosomen-Freisetzung, werden die Zellkerne durch Zentrifugation bei niederer Geschwindigkeit entfernt, um die Zellkerne zu entfernen. Um Proteine zu entfernen, werden die Chromosom-Lysate in einem Slide-A-Lyzer™ (Pierce, Rockford, IL), der eine großporige Membran (Ausschlussgrenze: Molekulargewicht von 100.000) aufweist, gegen ein 100faches Volumen an CIB (mit zwei Wechsel) dialysiert. Es können zwei Alternativen für die Trennung der Chromosomen von den zellulären Trümmern verwendet werden.

[0109] In einem ersten Ansatz, werden die Chromosomen mit magnetischen Kügelchen eingefangen, die mit Antikörper konjugiert sind, die für die doppelsträngige DNA der humanen Chromsomen spezifisch sind. Diese Antikörper sind in den Sera von Patienten vorhanden, die an Sklerodermie leiden (Chemicon International, Temecula, CA). Die Immunglobulin-Fraktion der Sera wird unter Verwendung von Protein A-Agarose (Perce, Rockford, IL) isoliert. Die IgG Fraktion wird dann mit einem Biotin-NHS Ester (Molecular Pobes, Eugene, OR), unter Verwendung der Vorgehensweise des Herstellers, biotinyliert. Streptavidin magnetische Mikrokügelchen (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) werden verwendet, um die biontinylierte IgG Fraktion der humanen Sera von Sklerodermie-Patienten zu binden. Die Mikrokügelchen werden dann verwendet, um die Chromosomen einzufangen. Die mit magnetischen Kügelchen bedeckten Chromosomen werden von dem nicht-chromosomalen Material mittels eines starken Feld-MACS-Separators (Miltenyi Biotec) getrennt. Dieser Ansatz ermöglicht auch die Anreicherung von besetzten GMDs aus einem Vorrat an größtenteils unbesetzten GMDs.

[0110] In einem zweiten Ansatz, werden die zellulären Trümmer von den Chromosomen mittels Antikörpern, die für zytoskeletale Proteine, die mit einem festen Träger konjugiert sind, spezifisch sind, getrennt. Im Chromosomen-Freisetzungsschritt, wird ein Detergenz (Triton X-100)-enthaltener Puffer verwendet, um die Membranen zu solubilisieren. Zytoskeletale Proteine, wie Fibronectin-Filamente, Actin-Filamente, oder Intermediärmikrofilamente, sind jedoch größtenteils in einer unlösbaren Form vorhanden. Obwohl die meisten Mikrotu-

bulus-Proteine durch Colcemid-Behandlung solubilisiert werden, können einige zurückbleiben. Antikörper gegen zytoskeletale Proteine (Fibronectin, Actin, Vimentin) sind von Accurate Chemical & Scientific (Westbury, NY, Biosource International (Camaillo, CA) und Cytoskeleton (Denver, CO) erhältlich. Diese Antikörper sind durch reduktive Aminierung mit AminoLink Plus Coupling Agarosegel (Pierce, Rockford, IL) konjugiert. 0,5 ml des Antikörper-derivatisierten Gels (in einer Compact Reaction Column, United States Biochemical, Cleveland, OH) werden verwendet, um die unlöslichen Fragmente der zellulären Trümmer einzufangen, indem eine dialysierte und konzentrierte Chromosomen-Lösung durch eine Säule geleitet wurde.

Beispiel 8: Nachweis mit chemilumineszenten Substraten.

[0111] Im Allgemeinen setzen exotherme chemische Reaktionen Energie in der Form von Schwinungs- und Rotationsanregungen oder Hitze frei. Bei chemilumineszenten Reaktionen jedoch, wird der elektronisch-erregte Zustand durch eine chemische Reaktion erreicht und Licht anstelle von Hitze wird erzeugt. Die energiereiche Quelle in den meisten chemilumineszenten Reaktionen ist Peroxid, Hydroperoxid, 1,2 Dioxetan, oder Dioxetanbindungen. Während dem Übergang dieser angeregten Zwischenprodukte in den elektronischen Grundzustand wird Licht, in einem Verfahren, das als direkte Chemilumineszenz bekannt ist, emittiert. Neuartige Acridan oder Dioxetan chemilumineszierende Substrate, die durch Tropix, BioTecx, und Mitarbeiter von Lumigen entwickelt wurden, ermöglichen den Nachweis von 10^{-19} Mol Meerrettich-Peroxidase oder 10^{-21} Mol Alkalische Phosphatase (74-76), eine wesentliche Verbesserung der Sensitivität gegenüber der Fluoreszenz-basierenden Detektion mit 10^{-14} Mol pro Liter.

[0112] Chemilumineszente Substrate für die Alkalische Phosphatase sind derzeit alle Phenylphosphatdioxetane (PPD). PPD (4-Methoxy-4-(3-phosphatphenyl)spiro[1,2 dioxetan,-3,2'-adamantan]dinatriumsalz) oder CSPDC® (Chlorin-Derivat von PPD) sind nun in klinischen Immununtersuchungen und Protein und Nukleinsäure-Detektionstestsätzen weit verbreitet. Auf PPD oder CSPD® basierende Substrate enthalten auch Fluoreszenzverstärker, die eine effizientere Erzeugung von chemilumineszentem Licht durch erweiterte Glühkinetiken fördern.

[0113] Andere Substrate wie PS-1, ein Substrat für HRP, das gerade kommerziell erhältlich wurde, nutzen Lumigen's Entdeckung aus, dass Ester der N-Alkylacridancarbonsäure durch Peroxidase-Enyzme in der Gegenwart von Wasserstoffperoxid und einem phenolischem Verstärker effizient oxidiert werden. Die Reaktion, die nur eine minimale katalytische Menge an Peroxidase erfordert, wandelt die Acridan-Verbindungen in den entsprechenden N-Alkylacridiniumester um. Die PS-1 HRP Substratreaktion erzeugt eine starke Chemilumineszenz, wobei der Peak in etwa 10 Minuten erreicht wird und einem ausgedehnten Abfall über mehrere Stunden. In einem direkten Vergleich mit einem auf verstärktem Luminol basierenden chemilumineszenten Reagens, welches früher das sensitivste Reagans zum Detektieren von HRP war, wurde gezeigt, dass PS1- bis zu 100mal heller ist (74).

[0114] Die derzeitige Nachweisgrenze unter Verwendung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und nicht-isotopisch-markierten Sonden ist etwa 100 kb DNA Ziel oder 10-30 Kopien mRNA (77-79). Obwohl etwas stärkere Signale unter Verwendung von Sonden, die mit radioaktiven Isotopen markiert sind, erhalten werden können, sind unakzeptabel lange Belichtungszeiten von Tagen bis Wochen notwendig, um etwa die selbe Länge an Ziel-DNAs nachzuweisen. Weiters machen Gesundheits- und Beseitigungsangelegenheiten diese Technologie für die meisten Laboratorien ungeeignet.

[0115] Die in situ Hybridisierungstechniken sind in den vergangen Jahren drastisch verbessert worden, sowohl in Bezug auf die Sicherheit als auch Sensitivität, hauptsächlich aufgrund der Verwendung von Enzymen anstelle von Isotopen als Reportermoleküle. Aufgrund des hohen Reaktionsumsatzes sind die Meerrettich Peroxidase (HRP) und die Alkalische Phosphatase (AP) die am häufigsten verwendeten Reporterenzyme. Unter Verwendung von Reporterenzymen kann die Lokalisierung der Hybridisierungssignale entweder mit kolorimetrischen immunhistochemischen Verfahren, die weniger sensitiv sind, oder mit fluoreszierenden Verfahren, die die Sensitivität im Vergleich zu nicht-enzymatischen Verfahren 10-100fach erhöhen, durchgeführt werden (80).

[0116] Die höchsten Nachweisgrenzen für beide Rezeptorenzyme werden jedoch unter Verwendung von chemilumineszenten Substraten erreicht, die die Emission von Licht, das durch eine enzymatische Reaktion ausgelöst wurde, fördern. Ungefähre Nachweisgrenzen für mehrere Ansätze werden unten gezeigt.

Nachweisverfahren	Nachweisgrenze[a]	Basenpaare[b]
Farbe	10^{-10}-10^{-12}	200-400
Fluoreszenz	10^{-13}-10^{-15}	100-200
Radioisotop	10^{-20}	10-100
PCR	10^{-22}	0,4-10
Chemilumineszenz	10^{-19}-10^{-21}	10-100
Mikrotropfen CL	10^{-21}	10-100[c]

Mol

Kilobasen

pro jedes GMD

Tyramid-Signalverstärkung

[0117] Das seit kurzem erhältliche, für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung konstruierte, Tyramid Signalverstärkungssystem (TSA) (NEN Life Sciences Produkts, Boston, MA), wurde verwendet, um das verstärkte Fluoreszenzsignal mit der Chemilumineszenz zu vergleichen. Die TSATechnologie (80) verwendet die Meerrettich Peroxidase (HRP), um die Ablagerung von Fluorophor- oder Biotin-markiertem Tyramid in der Nähe der Stelle der hybridisierten Sonde, proximal zum Enzym zu katalysieren. HRP kann 10^2-10^3 Tyramidmoleküle in 10 min ablagern, was zu einer starken Signalverstärkung führt. Da Tyramid sowohl mit Fluorphoren (TSA-Direkt) als auch mit Biotin (TSA-Indirekt) markiert werden kann, können weiters sowohl Fluoreszenz als auch Chemilumineszenzsignale nachgewiesen werden.

[0118] Für die Fluoreszenz-Messung nach der MISH, wurden die GMDs in TNB Blockierungspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,5% Blockierungsreagens, NEN) mit verdünnten Konjugaten, bestehend aus HRP mit Streptavidin für Biotin-markierte Sonden, oder Anti-Fluorescein für Fluorescein-markierte Sonden, (beide von NEN) für 30 Minuten inkubiert. Nach drei anschließenden Waschungen mit TNT (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,05 % TWEEN 20) wurden die GMDs mit 300 µl verdünntem Fluorescein-Tyramid für 10 Minuten inkubiert. Unreagiertes Tyramid wurde durch zweimaliges Waschen der GMDs mit TNT entfernt. Die MISH Signale wurden dann unter Verwendung der Fluoreszenz-Mikroskopie visualisiert.

Chemilumineszenter Nachweis der hybridisierten Sonden.

[0119] Mit Biotin-markierten Sonden hybridisierte GMDs wurden für 30 Minuten in TNB Blockierungspuffer, der entweder ein Straptavidin-HRP (NEN) oder HRP (Sigma)-Konjugat bei einer Verdünnung von 1:100 enthält, inkubiert. Mit Fluorescein-markierten Sonden hybridisierte GMDs wurden mit dem Anti-Fluorescein-HRP-Konjugat (NEN), 1:100 verdünnt, inkubiert. Bei einigen Signalverstärkungsversuchen, wurde vor den Chemilumineszenz-Messungen, Biotin-markiertes Tyramid anschießend an ein Streptavidin-Konjugat von entweder HRP oder AP gebunden. Unreagierte Konjugate wurden durch drei aufeinanderfolgende Waschungen mit TNT entfernt. GMDs wurden dann durch Zentrifugieren bei niederer Geschwindigkeit pelletiert und in 0,05 ml 0,4xSSC resuspendiert. Aliquote, die in einem Verhältnis von 1:5 mit dem entsprechenden chemilumineszenten Substrat verdünnt sind, wurden dann entweder mit einem Mikroskop, welches mit einer Photonenzählvorrichtung ausgestattet ist, oder einem Luminometer untersucht.

[0120] Für den Meerrettich Peroxidase Nachweis, wurden drei auf Luminol-basierende und ein auf Acridinium-basierendes Substrat verwendet. Zwei auf Luminol-basierende Substrate, LumiGLO™ und BM Chemilumineszenz ELISA Substrat, wurden von Kirkegaard und Perry Laboratories (KLP Inc,. Gaithersburg, MD) bzw. Boehringer Mannheim Corp. (Indianapolis, IN) erhalten. Ein drittes auf Luminol-basierendes Substrat, NF-1, welches keine phenolischen Verstärker benötigt, wurde kürzlich von BioTecx, Inc. (Houston, TX) entwickelt und war für die Experimentierung erhältlich. Das auf Acridinium-basierende Substrat, PS-1, wurde von Lumigen, Inc. (Southfield, MI) erhalten.

[0121] Für den Nachweis der Alkalischen Phosphatase, wurden zwei auf Adamantyl 1,2-dioxetanarylphos-

phat (PPD)-basierende Substrate verwendet. Lumi-Phos 530, welches von Lumigen erhalten wurde, ist eine vorgemischte Formulierung, die Phenylphosphatdioxetan, $MgCl_2$, Cetyltrimethylammoniumbromid, und einen Verstärker enthält. CSPD, ein mit Emerald II-Verstärker gemischtes PPD-Derivat, wurde von Tropix, Inc. (Bedford, MA) erhalten.

[0122] GMDs wurden in einer Substratlösung für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur für HRP oder 10-15 Minuten bei 37 °C für AP inkubiert.

[0123] Das von den in chemilumineszenten Substraten getränkten GMDs emittierte Licht, wurde mittels eines OPTOCOMP® I-Luminometer (MGM Instruments, Hamden, CT) gemessen.

Derivatisierung der GMDs mit HRP und AP

[0124] GMDs wurden aus biotinylierter Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, ME) mittels Standardemulgierverfahren gebildet und anschließend durch ein 62 und 45 µm Nylonsieb gesiebt (Small Parts, Miami Lakes, FL), um Mikrotropfen einheitlicher Größe zu erhalten. GMDs wurden dann mit TNB Blockierungspuffer für 15 Minuten blockiert. 5×10^5 GMDs enthaltende Aliquote wurden mit entsprechenden Verdünnungen von Streptavidin-HRP oder Streptavidin-AP (beide von Sigma) für 30 Minuten reagieren gelassen. Nach der Bindung, wurden die GMDs dreimal mit TNT Waschpuffer gewaschen.

Digitale Bild-Mikroskopie

[0125] Für die Chemilumineszenz-Bildgebung, wurde ein Olympus BH-2 Mikroskop, das mit Phasenkontrastobjektiven für die Visualisierung der GMDs ausgestattet war, mit einer Photonenzählvorrichtung über ein C-Mount verbunden. Eine Hamamatsu (Bridgewater, NJ C2400-32 ICCD (verstärkte CCD) Kamera wurde als Photonenzählvorrichtung verwendet. Die Kamera besteht aus einem Bildverstärker und einer CCD Kamera, die mit einer Relay-Linse und einer Steuereinheit (Hamamatsu II controller, Modell M4314) gekoppelt war. In dieser Konfiguration, visualisiert die CCD Kamera wirksam 756 × 485 Pixels (Bildelemente) (Pixelgröße 8,4 × 9,8 µm). Bilder wurden mittels des Hamamatsu ARGUS 20 Bildbearbeiters erzeugt und modifiziert, was eine Echtzeit-Bildbeobachtung ermöglicht.

[0126] Für die Fluoreszenz-Bildgebung, wurde das Mikroskop mit einer Hamamatsu C5985 gekühlten CCD Kamera verbunden, und die Bilder wurden mittels eines Hamamatsu Controller und eines Argus 20 Bildbearbeiters erzeugt. Die CCD Kamera wurde auf 20 °C unterhalb der Umgebungstemperatur mittels einer eingebauten Peltier-Effekt-Vorrichtung gekühlt. Sowohl die Chemilumineszenz- als auch die Fluoreszenzbilder wurden analysiert, überlagert oder pseudogefärbt unter Verwendung der Adobe® Photoshop® 4.0 Software (Adobe Systems, San Jose, CA), welches auf dem Windows® 95 Betriebssystem lief.

Ergebnisse

[0127] Diese Forschung hat die Durchführbarkeit des Nachweisens von zumindest 2-10 kb DNA-Sequenzen, die auf Einzelkopie-Genen lokalisiert sind, unter Verwendung von Sonden, die mit eingekapselten Zellkernen hybridisiert sind, und anschließendes Abbilden mittels Mikroskopie und einer CCD Kamera demonstriert. Eine 2,2 kb DNA Sequenz eines Einzelkopie-Gens, welches auf dem humanen Chromosom Y lokalisiert ist, kann mittels eines chemilumineszenten Substrats für HRP nachgewiesen werden. Diese Sequenz war mittels Fluoreszenz-markierten Sonden nicht nachweisbar.

[0128] Wir evaluierten eine Vielzahl von Substraten sowohl für HRP als auch AP Reportenenzyme. Obwohl die niedrigste Nachweisgrenze für HRP, gemessen in einem Luminometer, mittels eines auf Acridinium-basierendem Substrats erhalten wurde, zerstörte das für die mikroskopische Visualisierung notwendige niedere Lichtniveau das Substrat. Zwei auf PPD (Phenylphosphatdioxetan)-basierende Substrate für AP wurden ebenfalls durch das Rotlicht, welches für die Fokussierung der Proben für die Mikroskopie notwendig ist, nicht beeinträchtigt.

[0129] Um niedere Chemilumineszenz Lichtniveaus nachzuweisen verwendeten wir mehrere CCD Kameras, einschließlich einer Hamamatsu Peltier-Effekt-gekühlten CCD und einer Photometrics CH250, auf –40 °C gekühlt. Niedrige Lichtniveaus, die von Sonden erzeugt wurden, die mit Einzelkopie-Gen-Sequenzen hybridisieren, die ungefähr $4x10^2$-10^3 Reporterenzymmoleküle hatten, wurden am besten mittels einer Photonenzählvorrichtung nachgewiesen. Im Vergleich waren etwa 10^5 Reporterenzymmoleküle, die an Agarose GMDs gebunden sind, für den Nachweis mittels einer gekühlten CCD-Kamera, wie die Photometrics CH250 notwendig (sie-

he Tabelle 1 unten).

Tabelle 1. CCD Kamera-Nachweisgrenzen für Reporterenzymmoleküle, die mit Streptavidin konjugiert sind.

CCD Kamera	Nachgewiesene Rezeptorenzymmoleküle/GMD
Hamamatsu C5985 CCCD	$>10^5$
Photometrics CH250 CCCD	10^5
Hamamatsu C2400-32 ICCD	10^3

Beispiel 9: RNA-Nachweis in eingekapselten Zellen.

[0130] Die Fähigkeit schnell das Vorhandensein von Virus-spezifscher oder Krebs-spezifischer RNAs in individuellen Zellen, die in geringen Häufigkeiten vorliegen, nachzuweisen, hat Anwendungen in der Krankheitsdiagnostik, Überwachung und Behandlung sowie in der Blut-Durchsuchung.

[0131] Mikrotropfen in situ Hybridisierung (MISII) ist besonders für diese Anwendungen geeignet, da es das Erfordernis der Zellfixierung eliminiert und die Zellklumpenbildung verhindert, die den Nachweis von seltenen Zellen schwierig macht. Dieses Beispiel beschreibt das Nachweisen sowohl von Krebszellen (positiv für Telomerase mRNA Expression) als auch HIV-infizierte Zellen mittels einer Kombination aus MISH und Flusszytometrie.

Materialien und Verfahren

1. Zelllinien und Kultivierungsbedingungen

[0132] Humane promyelcytische Leukämie HL-60 Zellen Leukämie wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) gekauft. A3.01 Zellen und HIV-infizierte Zellen H9/HTLV-III NIH 1983 wurden von dem NIH AIDS Reserach and Reference Reagent Program, Rockville, MD erhalten. Alle Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) ergänzt, kultiviert und wurden bei 37 °C in der Gegenwart von 5% CO_2 gezüchtet.

2. Sonden und Fluoreszenz-Markierung

[0133] Oligonukleotidsonden zum Nachweisen von RNA, die am 5' Ende mit Fluorescein markiert sind, wurden von Oligoes Etc., Wilsonville, OR gekauft. Mit Meerrettich Peroxidase markierte Oligos wurden von Bioscore Internation, Camarillo, CA gekauft. Die Oligonuleleotidsonden zum Nachweisen der HIV RNA wurden aus der gag Region des HIV Genoms abgeleitet. Die Sequenzen der Oligonukleotidsonden sind unten dargestellt.

HIV RNA-Nachweis

H1 5'-(HRP)CCA TTC TGC AGC TTC CTC ATT GAT GGT CTC-3'
H2 5'-(HRP)CTT GTC TTA TGT CCA GAA TGC TGG TAG GGC-3'

Telomerase mRNA Nachweis

BF-1 5'FITC-CCA ACA AGA AAT CAT CCA CCA AAC GCA GGA GC 3'
BF-3 5'FITC-GAG GCT GTT CAC CTG CAA ATC CAG AAA CAG 3'
BF-4 5'FITC-GAA GGT TTT CGC GTG GGT GAG GTG AGG TG 3'

3. Zelleinkapselung

[0134] Humane Zellen, die bei verschiedenen Wachstumsstadien geerntet wurden, wurden durch Zentrifugation bei niederer Geschwindigkeit pelletiert, mit Hanks balanzierter Salzlösung (HBSS), die 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) enthält, gewaschen und in demselben Puffer mit einer Konzentration von 20×10^6 Zellen pro ml resuspendiert. Für die Einkapslung der Zellen, wurde Pluronsäure als oberflächenaktiver Stoff verwendet, da die Pluronsäure die Zellmembran-Integrität während der Emulgierung nicht beeinträchtigt.

[0135] Eine Zell-Agarose Mischung (2,3 % Typ XII Agarose und 0,1 % Pluronsäure in IIBSS, die 2×10^6 Zellen pro 0,52 ml enthält) wurde durch Schmelzen von 0,4 ml Agarose in HBSS bei 100 °C, Abkühlen der Agarose

auf 57°C, und Hinzufügen von 100 µl Zellsuspension und 20 µl 10 % Pluronsäure hergestellt. Die Mischung wurde bei 65° für 5 Minuten gehalten und dann tropfenweise zu 15 ml CelMix™ 200 Emulsionmatrix (One Cell Systems, Cambridge, MA), die auf 6 °C vorgewärmt wurde, schnell hinzugefügt. GMDs wurden mit einem CellSys100™ Microdrop Maker (One Cell Systems, Cambridge, MA), der mit einer 1,6 cm Klinge ausgestattet ist, unter Verwendung aufeinanderfolgender Rotorgeschwindigkeiten von 2.200 U/min für 1 Minute bei 20-25°C, 2.200 U/min für 1 Minute bei 0 °C, und 1.200 U/min für 7 Minute bei 0 °C hergestellt. Die GMDs wurden von der Emulsionmatrix duch Zentrifugation bei 400xg für 7 Minuten getrennt. Das eingekapselte Chromosom-enthaltende Pellet wurde zweimal mit DEPC behandelter HBSS gewaschen, und bei 4 °C in dem gleichen Puffers gelagert und innerhalb einer Woche verwendet. Die eingekapselten Zellen können jedoch in 70 % Ethanol bei –20°C Langzeit (zumindest einen Monat) gelagert werden.

4. Mikrotropfen In Situ Hybridisierung (MISH) eingekapselter humaner Zellen.

[0136] Alle für den zellulären RNA Nachweis verwendeten Lösungen wurden in DEPC behandeltem Wasser zubereitet. 1 µl DEPC (10 % in 70 % Ethylalkohol) wurde ungefähr zu 100.000 GMDs, die 10.000 Zell-besetzte GMDS enthalten, in einem Volumen von 50 µl hinzugefügt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurde ein gleiches Volumen an 2x Hybridisierungspuffer hinzugefügt und die Mischung wurde für eine gegebene Zeit bei Temperaturen im Bereich von 50 bis 58 °C inkubiert. Für die Hybridisierung mit den Oligosonden enthielt die 2x Hybridisierungslösung 1.2 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 mg/ml Lachssperma-DNA, 0,1 mg/ml E. coli tRNA, 100 Einheiten plazentaler RNAsc Inhibitor/ml und 200 µl Vanadyl Ribnukleosid Complex/ml (BRL, Bethesda, MD). Vor dem Mischen mit den eingekapselten Zellen, wurden 10-20 Picomol/0,1 ml Oligonukleotidsonden dem 2xHybridisierungpuffer hinzugefügt. Nach dem Durchführen der Hybridisierung bei 55°C, wurden die GMDs mittels Waschpuffer (WB, 0,05 M Tris-IICl, pH, 0, 0,15 M NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,1 % Tween 20) bei Temperaturen im Bereich von 20 bis 55 °C gewaschen. Die Hybridisierungssignale wurden durch eine Tyramid-Signalverstärkung (TSA, NEN™ Life Science Products, Boston, MA) entweder direkt (mit HRP-markierten Sonden) oder nach der Bindung mit Anti-Fluorescein-HRP (mit Fluorescein-markierten Sonden) verstärkt.

[0137] Um HIV RNA mit Oligosonden, die direkt mit HRP markiert waren, nachzuweisen, wurden die eingekapselten Zellen zuerst dreimal mit HRP stabilisierendem Puffer (Biotecx, Cambridge, MA) gewaschen, vor 2xHybridisierungspuffer hinzugefügt wurde.

5. Tyramid Signalverstärkung

[0138] Das Tyramid Signalverstärkungssystem (TSA) (NEN Life Sciences Products, Boston, MA) ist für die nicht-isotope in situ Hybridisierung ausgelegt. Die TSA Technologie (37) verwendet die Meerrettich Peroxidase (HRP), um die Ablagerung von Fluorophor-markiertem Tyramid in der Nähe der Stelle der hybridisierten Sonde, proximal zum Enzym zu katalysieren. HRP kann 10^2-10^3 Tyramidmoleküle in 10 min ablagern, was zu einer starken Signalverstärkung führt. Nach der MISH, wurden die GMDs in TNB Blockierungspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,5% Blockierungsreagens, NEN) mit 1:200 verdünnten Konjugaten an Anti-Fluorescein HRP (NEN) für 30 Minuten inkubiert. Nach drei anschließenden Waschungen mit TNT (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20) wurden die GMDs mit 1:100 verdünntem Tyramid-Fluorescein für 10 Minuten inkubiert. Unreagiertes Tyramid wurde durch zweimaliges Waschen der GMDs mit TNT entfernt.

6. Mikroskopie und Digitale Bildanalyse

[0139] Die Integrität der eingekapselten zellulären Nukleinsäuren (sowohl DNA als auch RNA nach Fluoreszenzfärbung mit 0,2 µg/ml Acridinorange) und MISH Fluoreszenzsignale wurden mittels eines Olympus BH-2 Mikroskops (Phasenkontrast 40 × SPlan 0,4 Objektiv), das für Epifluoreszenz mit geeigneten Filtern für DAPI, Fluorescein, oder Phycoerythrin ausgestattet ist, visuell untersucht. Digitale Bilder wurden mit einer gekühlten CCD Kamera (B/W Hamamatsu C5985-02 mit Steuereinheit), die mit dem Mikroskop verbunden ist, aufgenommen. Die digitalen Bilder wurden mit Hilfe einer Computersoftware (Adobe Photoshop Version 4.0, Adobe Systems, San Jose, CA) bearbeitet.

7. Flusszytometrie-Analyse eingekapselter Zellen nach MISH.

[0140] Die Flusszytometrie-Analyse nach der MISH wurde mittels eines EPICS Elite (Coulter Corporation, Miami, FL) durchgeführt. 15 mW einer 488 nm Linie eines luftgekühlten Argonlasers wurde verwendet, um das Fluorescein in hybridisierten Sonden anzuregen. Der Auslöseparameter für Sammelvorgänge war die Vorwärtsstreuung (nachweisen von eingekapselten Zellen). 10.000 Listendateien-Vorgänge wurden mit einer Rate von ungefähr 600 besetzten GMDs pro Sekunde gesammelt, und mittels der Elite 4.01 Software analy-

siert.

Ergebnisse

[0141] Die Fig. 7 zeigt den flusszytometrischen Nachweis von gag HIV RNA in eingekapselten HIV-infizierten Zellen nach der Hybridisierung mit zwei HRP-markierten Oligosonden. A2.01 Zellen mit derselben Abstammung wie H9 Zellen wurden als Kontrollzellen verwendet. Sowohl Kontroll- als auch HIV-infizierte Zellen wurden für 4 Tage kultiviert. Die Peaks sind farbkodiert und stellen das Folgende dar: Roter Peak, A3.01 Zellen, Sonden nicht vorhanden (mittlere Fluoreszenz 0,258); Blauer Peak, H9 HTLVIII Zellen, Sonden nicht vorhanden (mittlere Fluoreszenz=0,289); Gelber Peak, A3.01 Zellen, Sonden vorhanden (mittlere Fluoreszenz=3,41); Grüner Peak, H9HTI.VIII Zellen, Sonden vorhanden (mittlere Fluoreszenz=19.2). Die mittlere Fluoreszenz HIV-infizierter und nicht-infizierter Zellen, die mit Oligosonden hybridisiert sind, wurde für die Berechnung des S/N-Wertes verwendet, welche mit 5 ermittelt wurde. Es ist frührer geschätzt worden, dass H9/HTLV-III Zellen ungefähr 250-500 Kopien der HIV-spezifischen RNA exprimieren. Der Nachweis einer solch kleinen RNA Kopienzahl weist auf die Sensitivität der Untersuchung für das Ermitteln von HIV-infizierten Zellen in humanem Blut hin.

[0142] Fig. 8 zeigt den Nachweise der Telomerase mRNA in HL-60 (Modell Krebszelllinie) und humanen PBMCs mittels Fluorescein-markierten Oligonukleotidsonden, gefolgt von einer TSA Signalverstärkung. Hybridisierungsbedingunen und TSA Verstärkung sind in Abschnitt Materialien und Verfahren beschrieben. Die Histogramme sind wie folgt farbkodiert: rot=HL-60 Zellen; schwarz=humane PBMCs. Der linke Peak stellt unbesetzte GMDs dar und der rechte Peak stellt GMDs dar, die mit einer einzelnen Zelle besetzt sind. Die relative mittlere Fluoreszenz der rechten Peaks ist 220 für HL-60 Zellen und 78 für humane PBMCs (S/N-2,8). Diese Ergebnisse zeigen die Wirksamkeit dieser Methodologie für das Nachweisen der differentiellen Expression von mRNA in verschiedenen Zelltypen, und insbesondere zwischen normalen und Krebszellen.

Bibliographie

1) Powell, Ph. D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, 1989.
2) Powell & Weaver, Bio/Technology 8:333-37, 1990.
3) Weaver, Methods, Academic Press, Vol. 2, No. 3:234-247, 1991.
4) Weaver, Bio/Technology 9:873-876, 1991.
5) Weaver, Bio/Technology 6:1084-89, 1988.
6) Williams, J. Clin Micro 28:1002-8, 1990.
7) Abebe, Am. J. Hum. Genetics 53:1264, 1993.
8) Abebe, In Situ hybridization to HIV-1 RNA in gel microdrops, American Society for Cell Biology, 1993.
9) Nguyen, Cytometry, 21, 111-119, 1995.
10) Trnovsky, Am. J. Hum. Genetics, 59:p Al35, 1996.
11) Trnovsky, Poster 46 In The San Diego Conference an Nucleic Acids presented as section of American Association for Glinical Chemistry, November 1996.
12) Collins, Science, 262:43-46, 1993.
13) Barthoidi, Methods in Enzymology Vol.151, 252-267, 1987.
14) Gray, in Flow Gytogenerics, JW Gray (ed), Academic Press, pp. 137-149, 1989.
15) Young, in Flow Cytogenetics, JW Gray (ed), Academic Press, pp. 1-13, 1989.
16) Latt, in Flow Cytogenetics, ed. Grey JW, Acadenic Press, pp. 243-256, 1989
17) Shizua, P.N.A.S, USA 89:8794-8797, 1992.
18) Current Protocols in Human Genetics John Wiley & Sons, ed. by Dracopoli NC, et al., 1996.
19) Smith, Methods in Enzymology, Academic Press, Vol.155, p. 449, 1987.
20) Carter, J. Med. Genetics, 29:299-307, 1993.
21) Dolezel, in Kew Chromosome Conference IV, ed. Brandham E, and Bennett MD., p. 185-200, Royal Botanic Garden, Kew, 1995.
22) Macas, Hiotechniques, 402-408, 1993.
23) Matsukuawa, Cancer Research, 53:1328-1331, 1993.
29) Boyle, Genomics 12:517-525, 1992.
25) Vooijs, Am. J. Hum. Genet., 52:586-597, 1993.
26) Weier, Generation of five high complexity painting probe libraries from flow-sorted mouse chromosomes, Genomics (submitted).
27) Bauman "Flow Cytometric Measurement of Specific DNA and RNA Sequences," in: Flow Cytogenetics, JW Gray (ed), Academic Press, pp. 276-303, 1989.
28) Shapiro, Practical Flow Cytometry, third edition, Wiley-Liss, p. 284, 1995.

29) Cram, Chromosome analysis and sorting. In 1996 Annual course in flow cytometry; applications in immunobiology and cell biology, Brunswick, Maine, p20, 1996.
30) Human Chromosomes: Principles and Techniques, ed. Verma RS and Babu A., MeGraw-Hill, 1995.
31) Abebe, (1993), Amer. J. Hum. Genetics. 53:1264.
32) Abebe, (1993) In Situ Hybridization to HIV-1 RNA in Gel Microdrops, American Society for Cell Biology.
33) Nguyen, (1995), Cytometry 21:111-119.
34) Cline, (1994) New Engl. J. Medicine 330:328-336.
35) Vogelstein B. (1990), Nature 348:681-682.
36) Yamamoto T, (1993), Microbiology and Immunology 37:11-22.
37) Daley (1990), Science 247:824-26.
38) Rowley (1990), Cancer Res. 50:3816-25.
39) Smith (1993), Clinical Genetics 43(1):5-8.
40) Tkachuk, (1990), Science 250(4980):559-62.
41) Devilee, Cancer Res 5825-5830.
42) Escudier, Blood 81: 2702-2707.
43) Kallioniemi (1992), PNAS 89:5321-5.
44) Farrell SA. (1991), Am J Med Genetics 40:345-1.
45) Weier, (1993) PCR, DNA Sequence 4:47-51.
46) Scherthan, (1994) Nature Genetics.
47) Bellanne-Chantelot, Cell 70:159-168.
48) Goguen B and Kedersha N (1993), Nature 363:189-90.
49) Telenius, (1992), Genes, Chromasomes and Cancer 4:257-263.
50) Weier, Genomics (submitted).
51) Crisan, (1993) The bcr/abl rearrangements in chronic myelogenous leukemia and acute leukemias: Clinical perspectives and quality controls, In Farkas DH, (ed.) Molecular Biology and Pathology: A Guidbook for Quality Control. San Diego, Academic Press pp. 103-121.
52) Kawasaki al. (1988), PNAS 85:5698-5702
53) Inokuchi (1991), Blood 78:3125-3127.
54) Naumowski (1988), Cancer Research 48:2876-2879,
55) Crisan (1994), Diagnostic Hematology 8:725-750.
56) Weaver (1988), Bio/Technology 6:1084-1089.
57) Weaver (1991), Methods, Academic Press, vol. 2, p. 234-247.
58) Weaver (1991), Bio/Technology 9:873-876.
59) Powell (1990), Bio/Technology 8:333-7.
60) Gray (1995), J. Imm. Meth. 182:155.
61) Weaver, Antibody secretion assay using gel microdrops and flow cytometry, in Flow Cytometry Applications in Animal Cell Culture. Ed. Al-Rubeai and Emery. Marcel Dekker, New York, NY, 39-62, 1995.
62) Ryan, (1995) J. Clin. Microbiol. 33:1720-1726.
63) Blumenthal (1979), J. Cell. Biol. 81:255-259
64) Sillar (1981), J. Histochem. Cytochem. 29P:74-78
65) Cram (1983), Cancer Res. 43:4828-4837
66) Chen (1994), WO 94/02641.
67) Weaver (1991) In Methods, Academic Press, 2(3):234.
68) Abebe (1993) Mol. Biol. Cell, 4:113A.
69) Nguyen (1998) Cytometry, 21:111.
70) Trnovsky et al. (1996) Am. J. Hum. Genetics, 59:pA135
71) Powell (1990), Bio/Technology, 8:33.
72) Ryan, (1995), J Clin Micro., 33:1720.
73) Kenny, (1995), Bio/Technology, 13:787.
79) Akhavan-Tafti (1994), New chemiluminescent substrates for the detection of horseradish peroxidase, In Bioluminescence and Chemiluminescence ed. A.K. Campbell, L.J. Kricka and P.E. Stanley) John Wiley and Sons p. 198.
75) Schaap (1989) Clin. Chem. 35(9):1863.
76) Bronstein (1999) Analytical Biochemistry 219:169.
77) Herrington (1990) Non-isotopic in situ hybridization. in human pathology, in in Situ Hybridization: Application to Developmental Biology and Medicine, ed. Harris N, and DG wilkinson, Cambridge University Press, p. 291.
78) Raap (1992), In situ hybridization for molecular cytogenetics, In Situ Hybridization: Medical Applications, ed. Coulton GR, and J de Belleroche, Kluwer Academic Publishers, p.97
79) Nuovo, (1992) In Situ Hybridization: Protocols and. Applications, Raven Press, New York.

80) Litt, (1996) A high sensitivity signal enhancement method. American Biotechnology Laboratory, December, p.16.
81) Shaw (1995), Biotechniques, 19:945.
82) Rushbrooke (1993), Luminescence imaging in the life sciences using an intensified CCD system, in Bioluminescence and Chemiluminescence. Ed. Szalay AA, LJ Kricka and PE Stanley. Proceedings of the 7th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence held in Banff, Canada, John Wiley &Sons p.28.
83) Carter, (1993) Science, 259:1330.
84) Vergnaud, (1986), Am. J. Hum. Genet., 38:109

Patentansprüche

1. Verfahren zur Nukleinsäureanalyse, welches Folgendes aufweist:
a) Bilden einer Population an Gel-Mikrotropfen, die eine Population an biologischen Einheiten einkapseln, jede Einheit weist eine Nukleinsäure auf, wobei zumindest einige Mikrotropfen in der Population jeweils eine einzige Einheit einkapseln.
b) Reversibles Vernetzen von Polymeren, die das Gel, bilden miteinander und/oder mit den biologischen Einheiten, wobei die Mikrotropfen Formamid bis zu einer Konzentration von 50 % widerstehen können.
c) In Kontakt bringen der Gel-Mikrotropfenpopulation mit einer Sonde unter Bedingungen durch welche die Sonde spezifisch zu zumindest einer komplementären Sequenz in der Nukleinsäure in zumindest einem Gel-Mikrotropfen hybridisiert.
d) Isolieren und Detektieren des zumindest einen Gel-Mikrotropfens.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Vernetzen mit Divinylsulfon durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiters das Denaturieren der Nukleinsäure in dem Mikrotropfen vor dem Schritt des in Kontakt bringens aufweist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die biologischen Einheiten vor dem Schritt des in Kontakt bringens nicht chemisch fixiert werden.

5. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiters das Amplifizieren der Nukleinsäure vor dem Schritt des in Kontakt bringens aufweist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiters das Verdauen des Gels zumindest eines isolierten Mikrotropfens mit Agarose aufweist, um die Nukleinsäure innerhalb des Mikrotropfens zu isolieren.

7. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiters das Denaturieren der Nukleinsäure in den Mikrotropfen vor dem Schritt des in Kontakt bringens aufweist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Gel Agarose ist und das Vernetzen das Vernetzen von Hydroxylgruppen in der Agarose miteinander und mit Hydroxylgruppen in der Nukleinsäure zwischen dem Bildungs- und dem in Kontakt bringen Schritt aufweist.

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Sonde markiert ist und die Mikrotropfen weiters ein Reagens aufweisen, welches ein Signal von der markierten Sonde verstärkt.

10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Sonde mit einem Enzym markiert ist und das Reagens ein Substrat für das Enzym ist.

11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der zumindest eine Gel-Mikrotropfen durch Fluoreszenz-aktivierte-Zell-Sortierung isoliert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der zumindest eine Gel-Mikrotropfen durch Flusszytometrie, Mikroskopie, digitale Bildanalyse, Scan-Zytometrie, Photonenzählung, oder ccd detektiert wird.

13. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Sonde eine Locus-spezifische Sonde ist.

14. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Sonde eine erste bzw. eine zweite Sonde aufweist, die komplementär zu unterschiedlichen Chromosomen in einem Wildtyp-Individuum sind, wobei eine Co-Hybridisierung

der ersten und zweiten Sonde an das selbe Chromosom eine chromosomale Translokation in einem Individuum anzeigt.

15. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Population an Chromosomen aus einer Einzelzelle oder einer homogenen Zelllinie von einem Patienten erhalten wird.

16. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiters das Markieren von Mikrotropfen aufweist, die eine Einheit enthalten, mit einer zweiten Markierung ohne das leere Mikrotropfen mit der zweiten Markierung markiert werden.

17. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Population an Chromosomen aus einer Population von verschiedenen Zellen von einem Patienten erhalten wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, welches weiters das Bestimmen des Verhältnisses von einer Subpopulation an Mikrotropfen, die ein Chromosom enthält, das mit der Sonde hybridisiert ist, zu einer Subpopulation an Mikrotropfen, die ein Chromosom enthält, das nicht mit der Sonde hybridisiert ist, aufweist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das Verhältnis weniger als 1:10 ist.

20. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Sonde mit einem Nukleinsäuresegment hybridisiert, das eine Mutation trägt und das Verhältnis zeigt den Anteil der Zellen, die die Mutation tragen, in der Population an.

21. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Mutation eine somatische Mutation ist.

22. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Mutation eine Keimbahnmutation ist.

23. Verfahren nach Anspruch 1, welche weiters das in Kontakt bringen eines isolierten Geltropfens, welcher die Nukleinsäure enthält, mit einem Restriktionsenzym aufweist, wobei das Restriktionsenzym die Nukleinsäure innerhalb des Tropfens spaltet.

24. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiters das Herstellen einer Einzel-Chromosomenfragment-Bibliothek aus einem Chromosom in einem isolierten Gel Mikrotropfen aufweist.

25. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiters das Herstellen von Sonden von einem einzelnen Chromosom in einem isolierten Gel Mikrotropfen aufweist.

26. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Population an Chromosomen zumindest 10.000 Chromosomen aufweist.

27. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die biologischen Einheiten Zellen sind und die Sonde mit einem RNA Molekül innerhalb einer Zelle hybridisiert.

28. Verfahren nach Anspruch 27, welches weiters das Vergleichen oder das Überwachen der mRNA Konzentrationen zwischen zwei oder mehreren eingekapselten Zellen aufweist.

29. Verfahren zum Diagnostizieren einer Krankheit aufgrund einer Mutation nach Anspruch 1, wobei
Schritt (a) das Einkapseln einer Population an Chromosomen, die von einer Probe eines Patienten erhalten wird, in eine Population an Gel-Mikrotropfen aufweist;
Schritt (b) weist das in Kontakt bringen der Gel-Mikrotropfen mit einer ersten Sonde die komplementär zu dem Nukleinsäuresegment ist, welches die somatische Mutation enthält, und einer zweiten Sonde auf, die komplementär zu dem Chromosom ist, in welchem die somatische Mutation distal zu der Stelle der somatischen Mutation vorkommt, wobei die erste Sonde mit einem Mikrotropfen hybridisiert, die das Chromosom mit der somatischen Mutation tragen, und die zweite Sonde mit einem Mikrotropfen hybridisiert, die das Chromosom unabhängig ob die somatische Mutation vorhanden ist, tragen;
Schritt (c) weist das Bestimmen des Verhältnisses der Mikrotropfen die mit einer ersten Sonde hybridisieren und die mit einer zweiten Sonde hybridisieren auf, und das Verfahren weist weiters das Diagnostizieren der Existenz oder Prognosis der Krankheit von dem Verhältnis auf.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Krankheit Krebs ist.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Mutation im p53, BRCA-1, BRCA-2, ras oder im Retinoblastom-Gen auftritt.

32. Verfahren zur chromosomalen Analyse nach Anspruch 1, wobei
Schritt (a) das Bilden einer Population an Gel-Mikrotropfen, die eine Population an Zellkernen einkapselt, aufweist, wobei zumindest einige Mikrotropfen in der Population jeweils einen einzigen Zellkern einkapseln;
Schritt (b) das in Kontakt bringen der Gel-Mikrotropfenpopulation mit einer Sonde unter Bedingungen durch welche die Sonde spezifisch mit zumindest einer komplementären Sequenz in zumindest einem Chromosom in einem Zellkern von zumindest einem Gel-Mikrotropfen hybridisiert, aufweist;
Schritt (c) weist das Isolieren oder Detektieren des zumindest einen Gel-Mikrotropfens auf.

33. Verfahren zur chromosomalen Analyse nach Anspruch 1, wobei
Schritt (a) das Bilden einer Population an Gel-Mikrotropfen, die eine Population an Zellen oder Zellkernen einkapselt, aufweist, wobei zumindest einige Mikrotropfen in der Population jeweils einen einzigen Zellkern einkapseln;
Schritt (b) das in Kontakt bringen der Gel-Mikrotropfenpopulation mit einer Sonde unter Bedingungen durch welche die Sonde spezifisch mit zumindest einer komplementären Sequenz in zumindest einem Zellkern in zumindest einem Gel-Mikrotropfen hybridisiert, aufweist;
Schritt (c) weist das Isolieren oder Detektieren des zumindest einen Gel-Mikrotropfens auf.

34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei die Sonde mit einem Enzym markiert ist und die Gel-Mikrotropfen ein Substrat für das Enzym enthalten.

35. Verfahren nach Anspruch 33, wobei die Gel-Mikrotropfen von einem biotinylierten Gel gebildet werden, und das Substrat über einen Avidin oder Strptavidin-Anteil an Biotin gebunden ist.

36. Verfahren nach Anspruch 35, wobei das Substrat chemilumineszent ist.

37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei das Enzym Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase ist.

38. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das Detektieren die Verteilung der Sonde innerhalb des Zellkerns des zumindest einen Mikrotropfens anzeigt.

39. Verfahren nach Anspruch 33, wobei die Sonde mit einer einzigen Kopie einer genomischen Sequenz die kürzer als 50kb ist, hybridisiert.

40. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das Isolieren und das Detektieren durch Flusszytometrie, gegebenenfalls mit FACS, oder MACS durchgeführt wird.

41. Ein Satz, der eine Agarose mit hohem Schmelzpunkt, eine Emulgiereinrichtung, ein Etikett, der anzeigt wie der Satz zur Sondenhybridisierungssanalyse verwendet wird, und ein Vernetzungsreagenz, um Hydroxylgruppen in der Agarose miteinander und mit Hydroxylgruppen in der Nukleinsäure zu vernetzen, aufweist, wobei die aus der Agarose gebildeten Mikrotropfen, die die Nukleinsäure einkapseln, Formamid bis zu einer Konzentration bis zu 50% widerstehen können.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

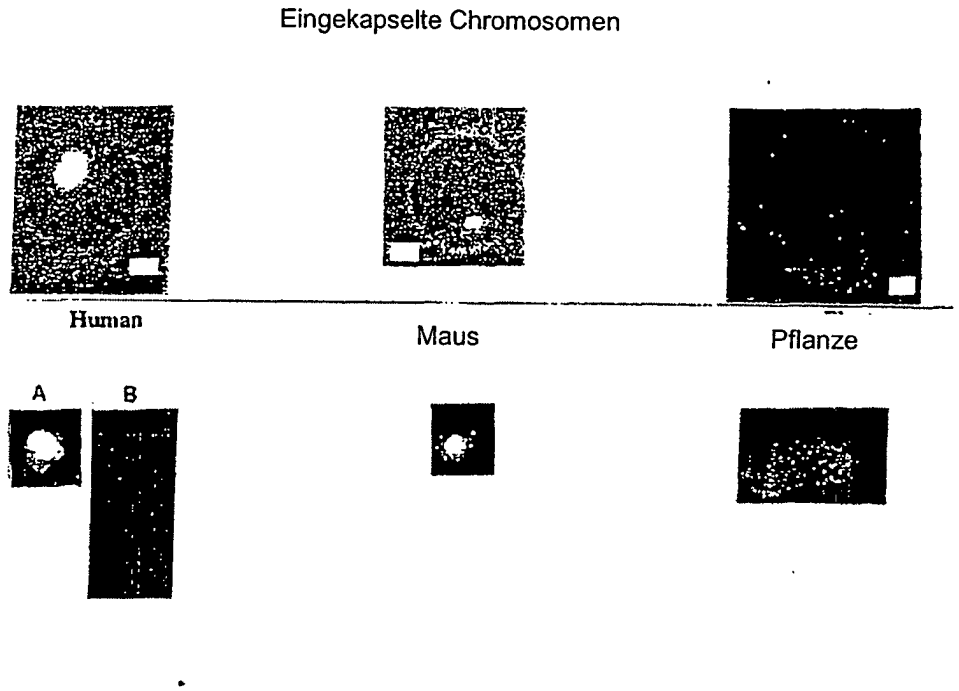

FIG. 2

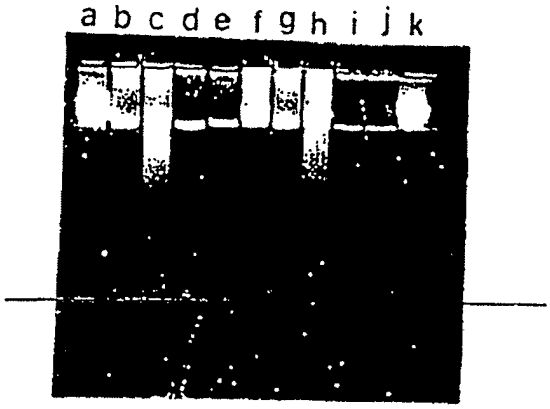

FIG. 3

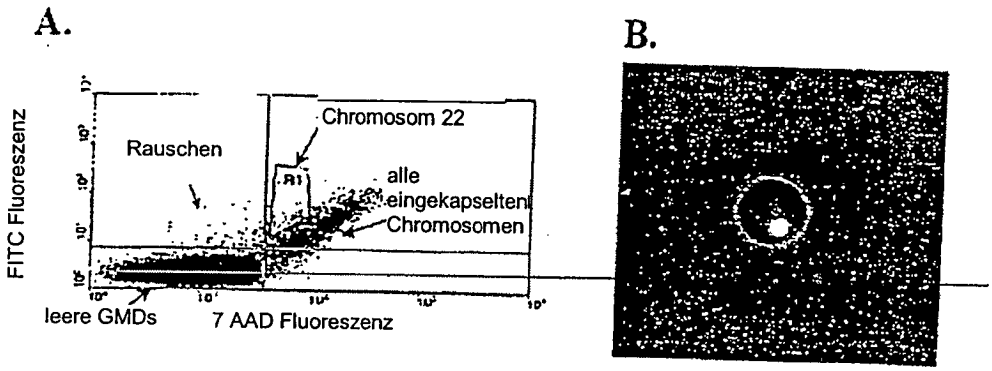
A.
B.
FITC Fluoreszenz
Rauschen
Chromosom 22
R1
alle
eingekapselten
Chromosomen
leere GMDs
7 AAD Fluoreszenz

FIG. 4

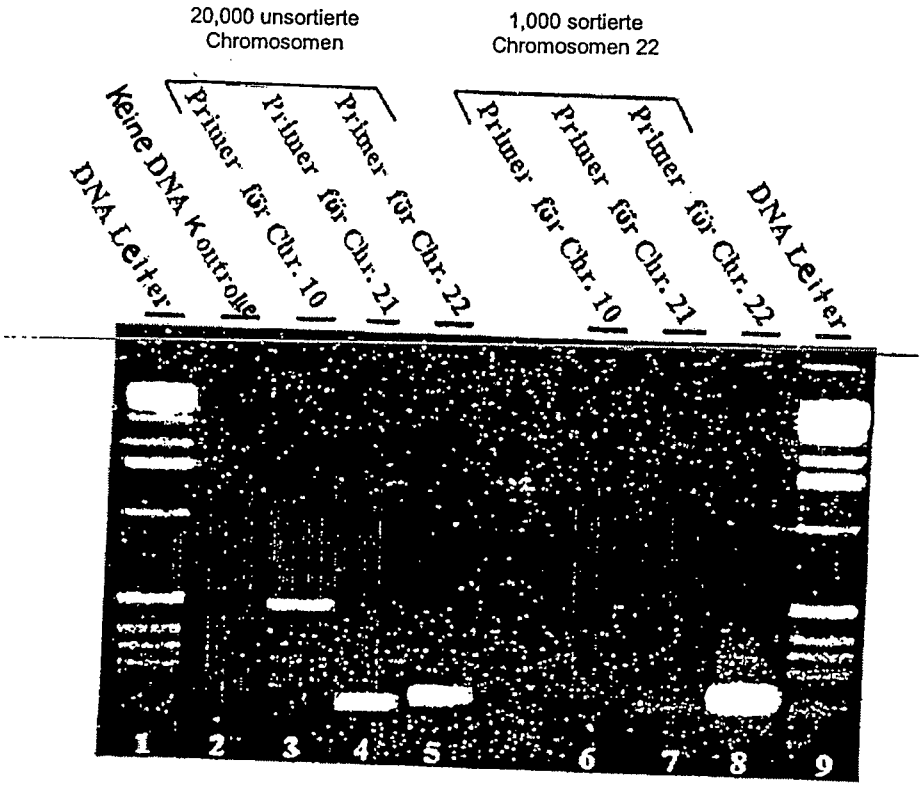
20,000 unsortierte Chromosomen
1,000 sortierte Chromosomen 22
DNA Leiter
Keine DNA Kontrolle
Primer für Chr. 10
Primer für Chr. 21
Primer für Chr. 22
Primer für Chr. 10
Primer für Chr. 21
Primer für Chr. 22
DNA Leiter
1
2
3
4
5
6
7
8
9

FIG. 5

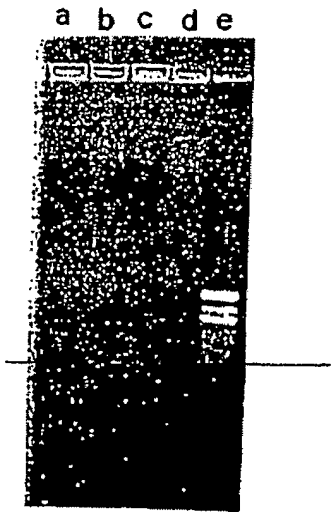

FIG. 6

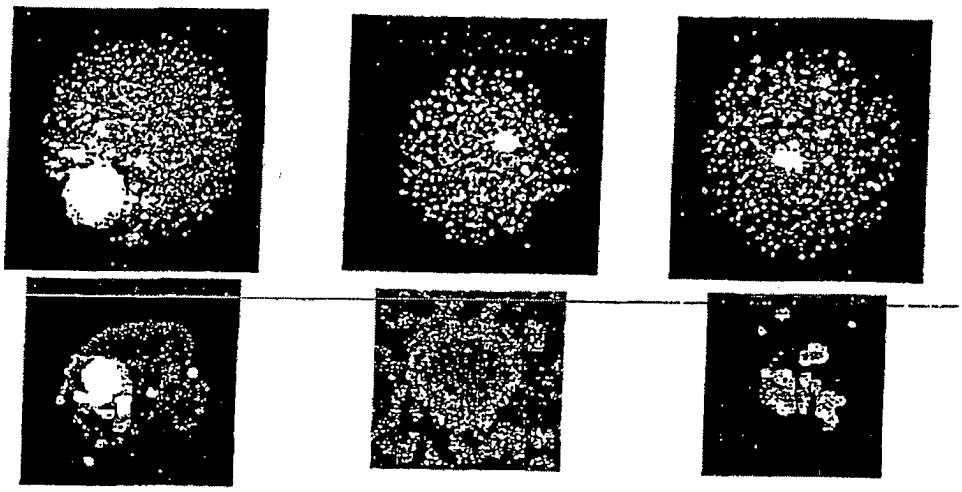

FIG. 7

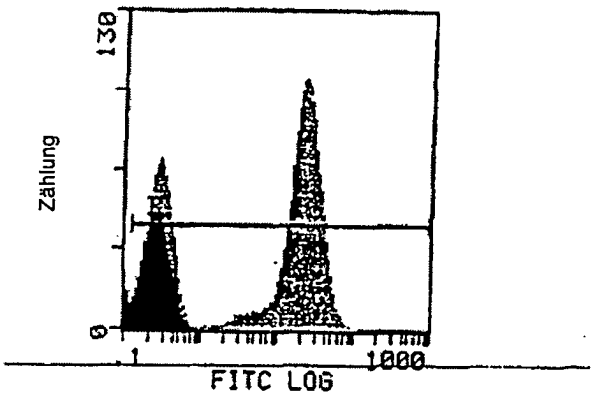

FIG. 8

