



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 34 092 T2** 2007.07.05

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 978 570 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 34 092.4**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 121 906.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **04.08.1993**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.02.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **29.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.07.2007**

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

C12Q 1/70 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12R 1/32 (2006.01)

C12R 1/36 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

925405 04.08.1992 US

(73) Patentinhaber:

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

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

MCALLISTER, Diane L., San Diego, CA 92123, US;

HAMMOND, Philip W., Monrovia, CA 91016, US;

YEASING, Y. Yang, San Diego, CA 92130, US;

MCDONOUGH, Sherrol, San Diego, CA 92122, US;

KACIAN, Daniel, San Diego, CA 92124, US;

DATTAGUPTA, Nanibhushan, San Diego, CA

92130, US; RYDER, Thomas B., CA 95030, US

(54) Bezeichnung: **Nachweis von Mycobacterium tuberculosis durch Vervielfältigung von Nukleinsäuresequenzen**

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

FACHBEREICH DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung betrifft Verfahren zur Erhöhung der Anzahl Kopien einer spezifischen Nukleinsäuresequenz oder „Zielsequenz“ der rRNA von *M.tuberculosis*, die entweder einzeln oder als große oder kleine Komponente eines homogenen oder heterogenen Gemischs von Nukleinsäuren vorliegen kann. Das Gemisch von Nukleinsäuren kann das in einer Probe vorliegende sein, die für diagnostische Tests, ökologische Tests, für Forschungsstudien, für die Herstellung von Reagentien oder Materialien, für andere Verfahren wie das Klonen oder für weitere Zwecke entnommen wurde.

[0002] Die selektive Amplifikation spezifischer Nukleinsäuresequenzen ist nützlich zur Erhöhung der Empfindlichkeit diagnostischer und ökologischer Assays unter Beibehaltung der Spezifität, zur Erhöhung der Empfindlichkeit, Bequemlichkeit, Genauigkeit und Zuverlässigkeit einer Vielfalt von Forschungstechniken und zur Bereitstellung eines reichlichen Vorrats an spezifischen Oligonukleotiden für verschiedene Zwecke.

[0003] Die vorliegende Erfindung eignet sich aufgrund der Bequemlichkeit ihrer Ausführungsform besonders zur Anwendung bei diagnostischen Tests.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0004] Der Nachweis und/oder die Quantifizierung spezifischer Nukleinsäuresequenzen stellt eine zunehmend wichtige Methode zur Identifizierung und Klassifizierung von Mikroorganismen, zur Diagnose von Infektionskrankheiten, für den Nachweis und die Charakterisierung genetischer Anomalien, zur Identifizierung mit Krebs assoziierter genetischer Veränderungen, zur Untersuchung genetischer Krankheitsanfälligkeiten und zur Messung der Reaktion auf verschiedene Behandlungsarten dar. Derartige Verfahrensweisen finden auch erweiterten Einsatz beim Nachweisen und Quantifizieren von Mikroorganismen in Nahrungsmitteln, Umweltproben, Saatgut und weiteren Materialarten, bei denen das Vorhandensein spezifischer Mikroorganismen eine Überwachung erfordern kann. Weitere Anwendungen finden sich in der Gerichtsmedizin, der Anthropologie, der Archäologie und der Biologie, bei denen die Messung des Verwandtschaftsgrads von Nukleinsäuresequenzen zur Identifizierung von Tatverdächtigen, zur Abklärung von Vaterschaftsprozessen, zur Aufstellung genealogischer und phylogenetischer Stammbäume und als Klassifikations-Hilfsmittel für eine Vielfalt von Lebensformen eingesetzt wird.

[0005] Eine verbreitete Methode zum Nachweisen und Quantifizieren spezifischer Nukleinsäuresequenzen ist die Nukleinsäure-Hybridisierung. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit zweier Nukleinsäure-Stränge, die komplementäre oder im Wesentlichen komplementäre Sequenzen enthalten, unter geeigneten Bedingungen spezifisch aneinander zu binden und dabei eine doppelsträngige Struktur auszubilden. Zum Nachweisen und/oder Quantifizieren einer spezifischen Nukleinsäuresequenz (bekannt als „Zielsequenz“) wird ein markiertes Oligonukleotid (bekannt als „Sonde“) hergestellt, die zur Zielsequenz komplementäre Sequenzen enthält. Die Sonde wird mit einer Probe gemischt, in der die Zielsequenz vermutet wird, und es werden für die Hybridbildung geeignete Bedingungen geschaffen. Die Sonde hybridisiert an die Zielsequenz, sofern sie in der Probe vorhanden ist. Die Sonden-Ziel-Hybride werden dann von der einzelsträngigen Sonde auf eine von vielfältigen Weisen getrennt. Die Menge an an die Hybride gebundenem Marker wird dann als Mengenangabe der Zielsequenz in der Probe gemessen.

[0006] Die Empfindlichkeit des Nukleinsäure-Hybridisierungs-Assays ist in erster Linie durch die spezifische Aktivität der Sonde, die Rate und den Umfang der Hybridisierungsreaktion, die Durchführung des Verfahrens zur Trennung hybridisierter und unhybridisierter Sonde und die Empfindlichkeit, mit welcher der Marker nachgewiesen werden kann, begrenzt. Die empfindlichsten Verfahrensweisen können viele der Merkmale vermissen lassen, die für routinemäßige klinische und ökologische Tests erforderlich sind, wie Schnelligkeit, Bequemlichkeit und Wirtschaftlichkeit. Darüber hinaus können ihre Empfindlichkeitsgrade für viele gewünschte Anwendungen nicht ausreichend sein.

[0007] Als Folge der Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Komponenten und Komponentenschritten dieser Art von Assay liegt nahezu immer eine Umkehrbeziehung zwischen Empfindlichkeit und Spezifität vor. Daher können Schritte, die der Erhöhung der Empfindlichkeit des Assays dienen sollen (zum Beispiel eine Steigerung der spezifischen Wirksamkeit der Sonde) zu einem höheren Prozentsatz falsch-positiver Testergebnisse führen. Die Verknüpfung von Empfindlichkeit und Spezifität stellt eine beträchtliche Hürde hinsichtlich einer verbesserten Empfindlichkeit der Hybridisierungs-Assays dar. Eine Lösung für dieses Problem bestünde

in einer spezifischen Erhöhung der Menge an vorhandener Zielsequenz unter Verwendung eines Amplifikationsverfahrens. Würde man einen einzelnen Abschnitt der Zielsequenz amplifizieren, ohne dass ein wesentlicher Teil der in den restlichen Sequenzen der Probe codierten Information amplifiziert würde, so könnte dies zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit führen, ohne daß zugleich die Spezifität beeinträchtigt würde.

[0008] Ein Verfahren zur spezifischen Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen mit der Bezeichnung Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“ oder „PCR“) wurde beschrieben von Mullis et al. (Siehe US-Patentschriften 4683195, 4683202 und 4800159 und Europäische Patentanmeldungen 86302298.4, 86302299.2 und 87300203.4 und Methods in Enzymology, Band 155, 1987, S. 335-350.) Das Verfahren verwendet sich wiederholende Zyklen einer Primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthese, die gleichzeitig ablaufen, und wobei jeder Strang einer komplementären Sequenz als eine Matrize genützt wird. Die zu amplifizierende Sequenz ist definiert durch die Positionen der Primer-Moleküle, die die Synthese einleiten. Die Primer sind zum 3'-Endabschnitt der Zielsequenz oder ihres Komplements komplementär und müssen mit jenen Stellen komplexieren, damit die Nukleinsäure-Synthese einsetzen kann. Nach Synthese des Verlängerungsprodukts werden die Stränge im allgemeinen durch Wärmedenaturierung vor dem nächsten Syntheseschritt getrennt. Beim PCR-Verfahren werden Kopien beider Stränge einer komplementären Sequenz synthetisiert.

[0009] Der Schritt der Strangtrennung, wie bei der PCR zur Auftrennung der neu synthetisierten Stränge am Ende jedes Zyklus der PCR-Reaktion angewandt, erfolgt oftmals als Denaturierung durch Wärme. Das erfordert entweder ein thermostabiles Enzym oder die Zugabe von neuem Enzym zwischen den Schritten der Wärmedenaturierung und der Einleitung des nächsten Zyklus der DNA-Synthese. Die Erfordernis einer wiederholten Kreisführung der Reaktionstemperatur zwischen mehreren unterschiedlichen und extremen Temperaturen ist ein Nachteil des PCR-Verfahrens. Um die PCR bequem durchführbar zu machen, sind programmierbare Wärmekreisprozeß-Instrumente erforderlich.

[0010] Das PCR-Verfahren wurde an die RNA-Transkription gekoppelt, indem eine Promotor-Sequenz in einen der bei der PCR-Reaktion verwendeten Primer eingebaut und dann nach mehrzyklischer Amplifikation mittels des PCR-Verfahrens die doppelsträngige DNA als Matrize für die Transkription der einzelsträngigen RNA verwendet wurde. (Siehe z.B. Murakawa et al., DNA 7:287-295 (1988).)

[0011] Weitere Verfahren zur Amplifikation einer spezifischen Nukleinsäuresequenz umfassen eine Reihe von Schritten der Primer-Hybridisierung, Verlängerung und Denaturierung zur Bereitstellung eines intermediären doppelsträngigen DNA-Moleküls, das eine Promotorsequenz durch die Verwendung eines Promotorsequenz-enthaltenden Primers aufweist. Die doppelsträngige DNA wird zur Erzeugung vielfacher RNA-Kopien der Zielsequenz verwendet. Die resultierenden RNA-Kopien können als Zielsequenzen zum Erhalt weiterer Kopien, und diese wiederum in vielfachen Zyklen, verwendet werden. (Gelegentlich als „Transkriptions-Amplifikations-System“ oder TAS bezeichnet; siehe z.B. Burg, et al., WO 89/1050; Gingeras, et al., WO 88/10315; Europäische Patentanmeldung Nr. 89313154.0, wie veröffentlicht unter Nr. 0373960 (Gingeras et al.); Europäische Patentanmeldung; Nr. 88113948.9, wie veröffentlicht unter Nr. 0329822 (Davey und Malek); Malek et al. WO 91/02818 und Europäische Patentanmeldung Nr. 90307503.4, wie veröffentlicht unter Nr. 0408295 (Kacian und Fultz), wie auch unten erörtert.).

[0012] Bei Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:392-396 (Jan. 1992) wird ein mit Oligonukleotiden arbeitendes Amplifikations-Verfahren zur Verwendung mit einer DNA-Matrize unter Gebrauch einer Restriktionsendonuklease zum Erhalt der Ausgangs-Zielsequenz und eines Enzyms zum Strangbrechen beim DNA/DNA-Komplex, um eine Verlängerungsreaktion und dadurch die Amplifikation zu ermöglichen. In der Europäischen Patentanmeldung Nr. 88306717.5, wie unter Nr 0300796 veröffentlicht (Becker et al), wird ein Amplifikations-Verfahren beschrieben, bei dem ein Primer an die Zielsequenz hybridisiert wird und der resultierende Duplex vor der Verlängerungsreaktion und Amplifikation aufgespalten wird; falls sich der Primer über die Hybridisierungsregion hinaus erstreckt, erfordert dies vor der Verlängerung eine Abspaltung und eine Blockierung des Primers an dessen 3'-Ende, um das Auftreten unerwünschter Verlängerungsreaktionen vor der Amplifikation zu verhindern. Urdea, WO 91/10746, beschreibt eine Signal-Amplifikationsmethode, die eine T7-Promotorsequenz einbezieht.

[0013] Zu weiteren Verfahren der Amplifikation von Nukleinsäure zählt die Ligasekettenreaktion (Ligase Chain Reaction oder „LCR“), wie beschrieben in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 320308, bei der mindestens vier separate Oligosonden verwendet werden; zwei der Oligosonden hybridisieren an entgegengesetzte Enden desselben Zielstranges in geeigneter Orientierung, so daß die dritten und vierten Oligosonden mit den ersten und zweiten Oligosonden hybridisieren, wobei sie im Zuge der Ligation miteinander verbundene Sonden bilden, die denaturiert und nachgewiesen werden können. Bei einem weiteren Verfahren handelt es

sich um das in EP-A-0427073, veröffentlicht am 15. Mai 1991, beschriebene Verfahren, bei dem eine palindrome Sonde, die zur Bildung einer Haarnadel fähig ist und eine funktionelle Promotor-Region in der Haarnadel aufweist, an eine Zielsequenz hybridisiert wird, dann an ein anderes Oligonukleotid durch Ligation verknüpft wird, das an die Zielsequenz hybridisiert ist, so daß spezifische RNA-Transkripte erhalten werden können.

[0014] Es können relativ große Mengen bestimmter RNAs unter Verwendung eines rekombinanten einzelsträngigen RNA-Moleküls mit einer Erkennungssequenz für die Bindung einer RNA-gerichteten Polymerase, bevorzugt einer Q β -Replikase, hergestellt werden. (Siehe z.B. US-Patentschrift Nr. 4786600 an Kramer et al.) Eine Anzahl von Schritten ist erforderlich, um die spezifische Sequenz in eine DNA-Kopie des Varianten-Moleküls einzuführen, sie in einen Expressionsvektor zu klonieren, sie in RNA zu transkribieren und sie dann mit Q β -Replikase zu replizieren.

DEFINITIONEN

[0015] Wie hierin verwendet, weisen die folgenden Begriffe die folgenden Bedeutungen auf, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben.

A. Nukleinsäure

[0016] Mit „Nukleinsäure“ ist entweder RNA oder DNA, neben jeglichen Nukleotid-Analoga oder anderen Molekülen, gemeint, die in der Sequenz vorhanden sein können und die die Ausführung der vorliegenden Erfindung nicht behindern.

B. Matrize

[0017] Eine „Matrize“ ist ein Nukleinsäure-Molekül, das durch eine Nukleinsäure-Polymerase kopierbar ist. Eine Matrize kann entweder aus RNA oder aus DNA bestehen und kann in Abhängigkeit von der Polymerase entweder einzelsträngig oder doppelsträngig oder teilweise doppelsträngig vorliegen. Die synthetisierte Kopie ist zur Matrize komplementär. Bei dieser Erfindung umfaßt der Begriff Kopien auch Nukleinsäure mit der zu einer Matrize äquivalenten RNA- oder DNA-Sequenz, die im Fachbereich herkömmlicherweise als homologe Sequenzen bezeichnet werden.

C. Primer

[0018] Bei einem „Primer“ handelt es sich um ein Oligonukleotid, das komplementär zu einer Matrize ist und mit der Matrize zum Erhalt eines Primer/Matrize-Komplexes hybridisiert, um die Synthese mittels einer DNA-Polymerase, zum Beispiel einer Reverse Transcriptase, einzuleiten, und der durch die Zugabe kovalent gebundener und an sein 3'-Ende geknüpfter Basen, die komplementär zur Matrize sind, verlängert wird. Das Ergebnis ist ein Primer-Verlängerungsprodukt. Nahezu alle bekannten DNA-Polymerasen (einschließlich Reverse Transcriptasen) erfordern die Komplexbildung eines Oligonukleotids mit einer einzelsträngigen Matrize („Priming“) zur Einleitung der DNA-Synthese. Unter geeigneten Umständen kann ein Primer ein Teil eines Promotor-Primers sein. Solche Primer sind allgemein 10 bis 100 Basen, bevorzugt 20 bis 50 Basen, lang.

D. Promotor oder Promotor-Sequenz

[0019] Bei einem „Promotor“ oder einer „Promotor-Sequenz“ handelt es sich um eine spezifische Nukleinsäuresequenz, die durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase („Transkriptase“) als ein Signal zur Bindung an ein Nukleinsäure-Molekül und zur Einleitung der Transkription von RNA an einer spezifischen Stelle erkannt wird. Zur Bindung erfordern solche Transkriptasen allgemein, daß der Promotor und sein Komplement doppelsträngig sind; der Matrizen-Abschnitt braucht nicht doppelsträngig zu sein. Einzelne DNA-abhängige RNA-Polymerasen erkennen eine Vielzahl verschiedener Promotor-Sequenzen, die in ihrer Effizienz hinsichtlich einer Förderung der Transkription deutlich variieren können. Bindet eine RNA-Polymerase an eine Promotor-Sequenz zur Einleitung der Transkription, so ist diese Promotor-Sequenz nicht Teil der transkribierten Sequenz. Daher enthalten die so hergestellten RNA-Transkripte die Promotor-Sequenz nicht.

E. Promotor-Primer

[0020] Ein Promotor-Primer umfaßt einen Promotor und einen Primer. Es handelt sich um ein Oligonukleotid, das hinreichend komplementär zum 3'-Ende einer Ziehnukleinsäure-Sequenz ist, um am oder nahe dem 3'-Ende jener Ziehnukleinsäure-Sequenz zu komplexieren, was bedeutet, daß der Promotor-Primer dicht genug am

Ende der Zielsequenz komplexiert, um eine Amplifikation einer ausreichenden Menge an Zielsequenz zu ermöglichen, so dass die Anforderungen für den Assay, die Tests, die Klonierung und weitere Anwendungen der amplifizierten Nukleinsäure erfüllt sind. Der Promotor-Primer wird als eine Matrice zum Erhalt einer kompletären Nukleinsäuresequenz verwendet, die vom 3'-Ende (auch bekannt als der 3'-Terminus) einer Zielnukleinsäure-Sequenz ausgeht, um einen generell doppel-strängigen Promotor zu ergeben, der einer beliebigen denaturierenden oder enzymatischen Aktivität unterzogen werden kann, durch die der Doppelstrang zerstört werden kann. Solche Promotor-Primer sind allgemein 40 bis 100 Basen, bevorzugt 40 bis 60 Basen, lang.

[0021] Mit einer DNA- oder RNA-abhängigen DNA-Polymerase wird auch ein komplementärer Strang zum Zielnukleinsäure-Molekül erhalten, wobei die Zielsequenz als eine Matrice verwendet wird.

F. Modifizierter Primer oder Promotor-Primer

[0022] Das 3'-Ende des Primers oder des Promotor-Primers kann modifiziert oder blockiert werden, um die Rate und/oder den Umfang einer davon ausgehenden Verlängerungsreaktion zu verhindern oder zu vermindern. Ein Primer oder Promotor-Primer mit sowohl modifizierten als auch unmodifizierten Bestandteilen besteht für die Zwecke der vorliegenden Erfindung aus im Wesentlichen derselben Nukleinsäuresequenz. Anders gesagt enthält der modifizierte Primer oder Promotor-Primer keine unterschiedliche Komplexier-Sequenz (Primer) insofern, als sowohl das modifizierte als auch das unmodifizierte Oligonukleotid in effektiv derselben Position (plus oder minus etwa 10 Basen) an die Zielnukleinsäure-Sequenz hybridisiert. Auch enthält der modifizierte Promotor-Primer keine vom unmodifizierten Promotor-Primer unterschiedliche Erkennungssequenz (Promotor). Dies bedeutet, daß innerhalb von etwa 10 Basen die modifizierten und unmodifizierten Primer oder Promotor-Primer gleich sind, durch dieselbe RNA-Polymerase erkannt werden und an mehr oder weniger dieselbe Zielsequenz hybridisieren (obschon nicht notwendigerweise an exakt dieselbe Position). Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind modifizierte und unmodifizierte Primer oder Promotor-Primer mit Ausnahme der Modifikation identisch.

[0023] Das 3'-Ende des zum Ziel komplementären Abschnitts eines Primers oder Promotor-Primers kann in vielfältiger Weise modifiziert werden, wie den Fachleuten des Bereichs wohlbekannt. Geeignete Modifikationen eines Promotor-Primers können in der Addition von Ribonukleotiden, 3'-Desoxynukleotid-Resten (z.B. Cordycepin (CO, Glen Research)), 3',2'-Didesoxynukleotid-Resten, modifizierten Nukleotiden mit nicht-Phosphodiester-Rückgrat-Verknüpfungen (z.B. Phosphorthioaten) und nicht-Nukleotid-Verknüpfungen, wie z.B. beschrieben bei Arnold, et al., WO 89/02439 (RS), oder Alkandiol-Modifikationen (Wilk et al. Nuc. Acids Res. 18:2065, 1990) (RP) bestehen, oder die Modifikation kann einfach in einem oder mehreren Nukleotid-Resten, die 3' zur Hybridisierungs-Sequenz und nicht komplementär zur Zielnukleinsäure sind, bestehen. Natürlich sind auch andere wirksame Modifikationen möglich.

[0024] Bei einer Amplifikationsreaktion kann ein Gemisch aus modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden in einem breiten Verhältnisbereich von modifizierten zu unmodifizierten Oligonukleotiden (z.B. 1:1 bis 1000:1) Verwendung finden. Auch kann ein Gemisch aus Oligonukleotiden mit verschiedenen 3'-Modifikationen verwendet werden.

G. Plus (+)- und Minus (-)-Strang/Stränge

[0025] Erörterungen der Nukleinsäure-Synthese lassen sich, indem Begriffe zur Benennung der beiden komplementären Stränge eines Nukleinsäure-Duplex übernommen werden, stark vereinfachen und verdeutlichen. Traditionell wurde der Strang, der für die zur Erzeugung von Proteinen oder strukturellen RNAs verwendeten Sequenzen codiert, als der „Plus“-Strang und sein Komplement als der „Minus“-Strang bezeichnet. Heute ist bekannt, daß in vielen Fällen beide Stränge funktional sind und demnach die Zuordnung der Bezeichnung „plus“ für einen und „minus“ für den anderen willkürlich ist. Nichtsdestotrotz sind die Begriffe sehr nützlich zur Bezeichnung der Sequenz-Orientierung der Nukleinsäuren und werden zu diesem Zweck hierin verwendet, wobei der „Plus“-Strang den ursprünglichen Zielsequenz-Strang bezeichnet, der mit dem ersten Primer oder Promotor-Primer komplexiert wird.

H. Zielnukleinsäure-Sequenz, Zielsequenz

[0026] Eine „Zielnukleinsäure-Sequenz“ oder „Zielsequenz“ weist eine gewünschte, zu amplifizierende Nukleinsäuresequenz auf und kann entweder einzelsträngig oder doppelsträngig sein und kann weitere Sequenzen in 5'- oder 3'-Position der zu amplifizierenden Sequenzen umfassen, die amplifiziert werden können oder auch nicht.

[0027] Die Zielnukleinsäure-Sequenz enthält die komplexbildenden Sequenzen, an die der Promotor-Primer während der Ausführung der vorliegenden Erfindung hybridisiert. Dort, wo die Zielnukleinsäure-Sequenz ursprünglich einzelsträngig ist, bezieht sich der Begriff sowohl auf den (+)- als auch den (-)-Strang, ebenso wie auf die zur Zielsequenz komplementäre Sequenz. Dort, wo die Zielnukleinsäure-Sequenz ursprünglich doppelsträngig ist, bezieht sich der Begriff sowohl auf die (+)- als auch auf die (-)-Stränge.

I. DNA-abhängige DNA-Polymerase

[0028] Bei einer „DNA-abhängigen DNA-Polymerase“ handelt es sich um ein Enzym, welches eine komplementäre DNA-Kopie von einer DNA-Matrize synthetisiert. Ein Beispiel hierfür ist die Bakteriophagen-T7-DNA-Polymerase. Alle bekannten DNA-abhängigen DNA-Polymerasen erfordern einen komplementären Primer, der RNA oder DNA sein kann, oder ein Copolymer, um die Synthese einzuleiten. Es ist bekannt, daß unter geeigneten Bedingungen bestimmte DNA-abhängige DNA-Polymerasen zur Synthetisierung einer komplementären DNA-Kopie von einer RNA-Matrize in der Lage sind.

J. DNA-abhängige RNA-Polymerase (Transkriptase)

[0029] Bei einer „DNA-abhängigen RNA-Polymerase“ oder „Transkriptase“ handelt es sich um ein Enzym, das vielfache RNA-Kopien aus einem doppelsträngigen oder teilweise doppelsträngigen DNA-Molekül mit einer (gewöhnlich doppelsträngigen) Promotor-Sequenz synthetisiert. Es sollte zur Kenntnis genommen werden, daß die vorliegende Erfindung einzelsträngige Promotor-Sequenzen im Promotor-Primer, neben den RNA-Polymerasen, die sie erkennen, umfaßt. Die RNA-Moleküle („Transkripte“) werden in der 5' → 3'-Richtung des RNA-Moleküls, beginnend bei einer spezifischen Position direkt flußabwärts des Promotors, synthetisiert. Beispiele der Transkriptasen sind die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T7, T3 und SP6.

K. RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase)

[0030] Bei einer „RNA-abhängigen DNA-Polymerase“ oder „reversen Transkriptase“ handelt es sich um ein Enzym, welches eine komplementäre DNA-Kopie von einer RNA-Matrize synthetisiert. Alle bekannten reversen Transkriptasen sind auch zur Herstellung einer komplementären DNA-Kopie von einer DNA-Matrize in der Lage; also handelt es sich sowohl um RNA- als auch DNA-abhängige DNA-Polymerasen. Ein Primer muß die Synthese sowohl mit den RNA- als auch den DNA-Matrizen einleiten können.

L. RNase H

[0031] Bei der „RNase H“ handelt es sich um ein Enzym, das den RNA-Abschnitt eines RNA:DNA-Duplex abbaut. Die RNase H können Endonukleasen oder Exonukleasen sein. Die reversen Transkriptasen von Vogel-Myeloblastose-Virus und Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus weisen über ihre Polymerase-Aktivität hinaus eine RNase H-Aktivität auf. Bei einigen geklonten reversen Transkriptasen fehlt die RNase H-Aktivität. Es stehen auch Quellen für RNase H ohne eine assoziierte Polymerase-Aktivität zur Verfügung. Der Abbau kann zur Abtrennung von RNA aus einem RNA:DNA-Komplex führen. Alternativ dazu kann die RNase H die RNA an verschiedenen Stellen einfach so zerschneiden, daß Abschnitte der RNA abschmelzen, oder Enzymen ermöglichen, Abschnitte der RNA abzuwickeln, oder die erzeugten RNA-Fragmente können als Primer für die Verlängerung durch eine Polymerase dienen.

M. Hybridisieren, Komplex

[0032] Die Begriffe „hybridisieren“ und „Komplex“ beziehen sich auf die Bildung von Duplexen zwischen Nukleotid-Sequenzen, die ausreichend komplementär sind, um Duplexe (oder „Komplexe“) über Watson-Crick-Basenpaarung zu bilden. Dort, wo ein Promotor-Primer oder Primer mit dem Ziel (Matrize) hybridisiert, sind die Komplexe (oder Hybride) ausreichend stabil, um der durch eine DNA-Polymerase zur Einleitung der DNA-Synthese geforderten Priming-Funktion zu dienen.

N. Spezifität

[0033] Bei Spezifität handelt es sich um eine Eigenschaft der Nukleinsäuresequenz, mit der ihre Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen Ziel- und nicht-Ziel-Sequenzen in Abhängigkeit von den Sequenz- und Assay-Bedingungen beschrieben wird.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0034] Die vorliegende Erfindung stellt ein Kit zur Verfügung, das ein erstes Oligonukleotid bestehend aus der Sequenz xGCCGTCACCCACCAACAAGCT (SEQ ID Nr. 22) und ein zweites Oligonukleotid bestehend aus der Sequenz xGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACC (SEQ ID Nr. 2), enthält, wobei x für nichts steht oder eine durch eine RNA-Polymerase erkannte Sequenz ist. Solch ein Kit kann zur Durchführung einer autokatalytischen Methode zur Synthetisierung vielfacher Kopien von der *M.tuberculosis*-Ziel-rRNA-Nukleinsäure-Sequenz verwendet werden (d.h. die Methode zyklisiert automatisch ohne Erfordernis einer Veränderung der Reaktionsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert oder Ionenstärke).

[0035] Solch eine Methode stellt die Behandlung einer Zielsequenz mit einem ersten Oligonukleotid (das eine komplexbildende Sequenz aufweist, die ausreichend komplementär zu einem 3'-Endabschnitt der Zielsequenz ist, um damit zu hybridisieren) (dies allein wird als Primer bezeichnet) und das eine Sequenz in 5'-Position zur komplexbildenden Sequenz aufweist, die eine Sequenz umfaßt, die in doppelsträngiger Form als ein Promotor für eine RNA-Polymerase dient (diese Anordnung wird als Promotor-Primer bezeichnet), und mit einem zweiten Oligonukleotid (das ein Primer oder Promotor-Primer ist, der eine komplexbildende Sequenz aufweist, die ausreichend komplementär zum Komplement der Zielsequenz ist, um damit zu hybridisieren), bereit, unter Bedingungen, bei denen ein Oligonukleotid/Zielsequenz-Komplex gebildet werden kann und die DNA- und RNA-Synthese einsetzen kann. In einer Ausführungsform sind eines oder beide der ersten und zweiten Oligonukleotide ein Gemisch aus einer blockierten und einer unblockierten Oligonukleotid-Sequenz (blockierte Oligonukleotide weisen ein modifiziertes 3'-Ende auf, um die Rate und/oder den Umfang der Primer-Verlängerung durch eine DNA-Polymerase ganz zu verhindern oder zu vermindern) oder ein Gemisch aus Oligonukleotiden mit unterschiedlichen 3'-Modifikationen. Ein derartiges Gemisch erhöht die Effizienz der spezifischen Amplifikationsreaktion signifikant, im Vergleich zu einer Verwendung von entweder nur blockierten oder nur unblockierten Oligonukleotiden. Das Verhältnis solcher Oligonukleotide kann in Abhängigkeit von der spezifisch zu amplifizierenden Matrizen-Sequenz variiert werden, doch liegt es allgemein zwischen 1:1 und 1000:1, blockiert zu unblockiert. Für die Erfindung sind keine definierten 3'- und 5'-Enden der Zielsequenz erforderlich.

[0036] Im Besonderen umfasst eine Amplifikationsmethode wie oben beschrieben (a) das Behandeln einer Zielsequenz mit einem ersten Promotor-Primer-Oligonukleotid, das eine komplexbildende Sequenz aufweist, die ausreichend komplementär zu einem 3'-Endabschnitt der Zielsequenz ist, um damit zu hybridisieren, und das eine Sequenz in 5'-Position zur komplexbildenden Sequenz aufweist, die eine Sequenz umfaßt, die in doppelsträngiger Form als ein Promotor für eine RNA-Polymerase dient, unter Bedingungen, bei denen ein Oligonukleotid/Zielsequenz-Komplex gebildet werden kann und die DNA-Synthese mittels einer geeigneten Polymerase (z.B. einer DNA-Polymerase) eingeleitet werden kann, (b) Inkubieren des ersten Oligonukleotid/Ziel-Komplexes unter Verlängerungsreaktions-Bedingungen, so daß das 3'-Ende des Ziels zum Erhalt einer Hybrid-Matrize für eine RNA-Polymerase verlängert werden kann, und (c) Inkubieren der Hybrid-Matrize unter Bedingungen, bei denen vielfache RNA-Kopien der Zielsequenz unter Verwendung einer RNA-Polymerase, die die Promotor-Sequenz erkennt, hergestellt werden können. Die Erfindung umfaßt auch die Erzeugung eines 3'-Endes einer RNA-Zielsequenz in Schritt (b) durch die Wirkung eines Enzyms, das selektiv den RNA-Abchnitt eines RNA:DNA-Hybrids (z.B. RNase H) abbaut. Die derart hergestellte RNA kann zum Erhalt weiterer Mengen an Produkt autokatalytisch zyklisiert werden.

[0037] Bei anderen Methoden erfolgen die folgenden Schritte: (a) Zusammenbringen einer Nukleinsäure-(z.B. RNA oder DNA)-Zielsequenz mit einem ersten Oligonukleotid-Primer oder Promotor-Primer unter Bedingungen, bei denen ein erster Oligonukleotid/Zielsequenz-Komplex so gebildet wird, daß die DNA-Synthese durch eine geeignete Polymerase (z.B. eine DNA-Polymerase) eingeleitet werden kann, (b) Inkubieren des ersten Oligonukleotids unter Verlängerungsreaktions-Bedingungen, so daß das Ziel von der Polymerase als eine Matrize zum Erhalt eines ersten, zum Ziel komplementären DNA-Verlängerungsprodukt verwendet werden kann (sofern der erste Primer nicht blockiert ist); (c) sofern das Ziel ein RNA-Molekül ist, Trennen des DNA-Verlängerungsprodukts vom RNA-Ziel unter Verwendung eines Enzyms, das selektiv das RNA-Ziel abbaut, oder, sofern das Ziel ein DNA-Molekül ist, Trennen der beiden DNA-Stränge (z.B. durch Erhitzen auf 90-100°C oder mittels anderer Methoden); (d) Zusammenbringen des DNA-Verlängerungsprodukts mit einem zweiten Oligonukleotid, das einen Primer oder einen Promotor-Primer umfaßt und das eine komplexbildende Sequenz aufweist, die ausreichend komplementär zum 3'-Endabschnitt des DNA-Verlängerungsprodukts ist, um damit unter Bedingungen zu hybridisieren, bei denen ein zweites Oligonukleotid/Verlängerungsprodukt-Komplex gebildet wird und die DNA-Synthese wie oben eingeleitet werden kann, was von jeglichen blockierenden Molekülen auf diesem Primer abhängt. Ist bei dieser Erfindung das erste Oligonukleotid kein Promotor-Primer, so ist das zweite Oligonukleotid ein Promotor-Primer, was bedeutet, daß das zweite Oligonukleotid eine Sequenz in 5'-Position zur komplexbildenden Sequenz aufweist, die eine Promotor-Sequenz für

eine RNA-Polymerase enthält. Darüber hinaus bestehen das erste und/oder zweite Oligonukleotid entweder aus einem Gemisch eines blockierten und eines unblockierten Oligonukleotids oder einem Gemisch von Oligonukleotiden mit unterschiedlichen 3'-Modifikationen.

[0038] Die Amplifikationsreaktion wird in einem Gemisch vorgenommen, das im Wesentlichen aus den erforderlichen Reaktionspartnern und Reagentien besteht. Ein derartiges Gemisch kann allerdings auch Enzyme oder weitere Substituenten enthalten, die die Amplifikation der Erfindung (z.B. den Mechanismus der Reaktion) nicht qualitativ beeinflussen. Solche Substituenten können die Menge an beobachteter Amplifikation beeinflussen. Zum Beispiel kann das Gemisch andere Promotor-Primer für dieselbe Zielsequenz enthalten oder kann „Helfer“-Oligonukleotide aufweisen. Solche Helfer-Oligonukleotide werden in einer Weise ähnlich der der Hybridisierungs-Helfer-Sonden verwendet, wie beschrieben bei Hogan et al., US-Patentschrift 5030557, nämlich durch Förderung der Bindung des Promotor-Primers an seine Zielnukleinsäure, und zwar selbst dann, wenn die Zielnukleinsäure eine signifikante Sekundärstruktur aufweist. Trotz der Ähnlichkeit bezüglich der Verwendung solcher Helfer-Oligonukleotide überraschte es, daß solche Helfer-Oligonukleotide bei einem Amplifikations-Protokoll ohne nachteilige Auswirkung auf die Effizienz des Verfahrens eingesetzt werden konnten.

[0039] Das erste Oligonukleotid kann ein Promotor-Primer und das zweite Oligonukleotid ein Primer, oder umgekehrt, sein, oder es können sowohl das erste als auch das zweite Oligonukleotid ein Promotor-Primer sein, wobei die Promotor entweder identisch (in dem Sinne, daß die Promotoren durch dieselbe RNA-Polymerase erkannt werden) oder verschieden sein können. Die Verwendung verschiedener Promotoren ist besonders dann nützlich, wenn die amplifizierte Nukleinsäure zum Klonen verwendet wird. Die ersten und zweiten Oligonukleotide und die aus der Zielsequenz erhaltene RNA können dann für die autokatalytische Synthese vielfacher Kopien (womit sowohl komplementäre als auch homologe Nukleinsäuresequenzen gemeint sind) der Zielsequenz verwendet werden.

[0040] Der modifizierte Primer oder Promotor-Primer des Kits gemäß der vorliegenden Erfindung besteht im Wesentlichen aus einer einzelnen Nukleinsäuresequenz, die eine Modifikation am oder nahe (innerhalb von 3 Basen) dem 3'-Ende des gegebenen Primers oder Promotor-Primers aufweist, die die Verlängerung des Primers auf einer Matrize mittels einer DNA-Polymerase verändert (vermindert oder blockiert). Vorzugsweise wird dieser modifizierte Primer oder Promotor-Primer mit einem unmodifizierten Primer oder Promotor-Primer gemischt, der im Wesentlichen aus derselben Nukleinsäuresequenz besteht, neben einem oder mehreren anderen Primern oder Promotor-Primern einer unterschiedlichen Nukleinsäuresequenz (die ebenfalls ein Gemisch von blockierten und unblockierten Oligonukleotiden sein können). Die erfindungsgemäßen Kits umfassen auch Gemische von Primern und Promotor-Primern mit mehr als einer Modifikation an oder in der Nähe von ihren 3'-Enden.

[0041] Ein erfindungsgemäßer Kit kann nach der Erzeugung eines definierten 5'-Endes (d.h. eines von bekannter Sequenz) in einer RNA-Zielsequenz verwendet werden, durch Behandlung der RNA mit einem DNA-Oligonukleotid, das nahe der zweiten Primer-Bindungsstelle hybridisiert und dabei ein Substrat für RNAse H bildet. Dieses Substrat wird dann mittels RNAse H zur Begrenzung des 5'-Endes des RNA-Ziels gespalten, welches wie oben erörtert amplifiziert werden kann.

[0042] Eine Amplifikation unter Verwendung des erfindungsgemäßen Kits kann die Zusammenwirkung einer DNA-Polymerase (zum Beispiel einer reversen Transkriptase) und einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase (Transkriptase) mit einem enzymatischen Hybrid-Trennschritt zur Herstellung von Produkten, die selbst zur Erzeugung weiteren Produkts verwendet werden können, einschließen, wobei eine autokatalytische Reaktion entsteht ohne daß eine Beeinflussung der Reaktionsbedingungen, z.B. eine Wärmezyklisierung, erforderlich wäre. Ferner werden bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, die eine Vorbehandlung einbeziehen, alle bis auf den/die einleitenden Schritt/e der Vorbehandlung bei ein und derselben Temperatur ausgeführt.

[0043] Bei einem Beispiel eines typischen Assays wird eine Probe einschließlich zu amplifizierendes rRNA-Ziel mit einem Puffer-Konzentrat, enthaltend den Puffer, Salze (z.B. divalente Kationen wie Magnesium), Nukleotid-Triphosphate, Primer und/oder Promotor-Primer (blockiert und/oder unblockiert), ein Thiol-Reduktionsmittel wie Dithiothreitol und ein Polykation wie Spermidin, gemischt. Die Reaktion wird dann wahlweise bei nahezu 100°C zur Denaturierung jeglicher Sekundärstruktur inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (etwa 20°C) werden Enzyme, enthaltend DNA- und RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, RNAse H-Aktivität und DNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität zugesetzt und das Gemisch über etwa 10 Minuten bis vier Stunden hinweg bei 37°C bis 42°C inkubiert. Die Reaktion kann dann durch Zugabe einer lumineszierend markierten Sonde, durch Inkubieren über 10 bis 30 Minuten hinweg bei 60°C, durch Zugabe einer Lösung zur

selektiven Hydrolyse des Markers auf nicht-hybridisierter Sonde, durch Inkubieren der Reaktion über 5 bis 10 Minuten hinweg bei 60°C, und durch Messen der verbliebenen Chemilumineszenz in einem Luminometer analysiert werden. (Siehe z.B. den Hybridisierungs-Schutzassay (HPA) von Arnold et al., wie beschrieben in WO 89/02476, veröffentlicht am 29. März 1989, und die entsprechende veröffentlichte Europäische Anmeldung Nr. 0309230.) Die erfindungsgemäßen Kits können bei vielen weiteren Assay-Systemen, wie sie den Fachleuten bekannt sind, verwendet werden.

[0044] Gemäss einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine Mischung modifizierter und unmodifizierter Oligonukleotide oder eine Mischung unterschiedlich modifizierter Oligonukleotide bereitgestellt, wobei die Mischung eine Mischung von Primern oder eine Mischung von Promotor-Primern ist, die die gleiche Promotorsequenz aufweisen und wobei jedes modifizierte oder unmodifizierte Oligonukleotid im Wesentlichen an die gleiche Zielsequenz hybridisiert und wobei die Oligonukleotide aus einem der folgenden Oligonukleotide (a) bis (c) ausgewählt sind:

- (a) Oligonukleotid bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus GGGATAAGCCTGGG-AAACTGGGTCTAATACC (SEQ ID Nr. 2) und dem Oligonukleotid, das zu der Nukleinsäuresequenz komplementär ist;
- (b) Oligonukleotid wie in (a) oben aufgeführt, das am 5'-Ende mit einer durch eine RNA-Polymerase erkannten Sequenz verbunden ist; und
- (c) Oligonukleotid wie in (a) oder (b) oben aufgeführt, das eine Modifikation an oder in der Nähe seines 3'-Endes aufweist, die die Verlängerung durch eine Polymerase vermindert oder blockiert.

[0045] Unter dieser Mischung wird auch eine solche verstanden, die eine Komponente eines erfindungsgemäßen Kits bilden kann.

[0046] Die Kits gemäß der Erfindung können diagnostische Kits oder andere Kits sein, die in diagnostischen Verfahrensweisen oder anderen Verfahrensweisen Verwendung finden können, und die Erfindung ist anpassbar an die Multiwell-Verfahrenstechnik, welche in der Form von Kits bereitgestellt werden kann.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0047] In [Abb. 1](#) ist die Struktur der Alkandiol-Modifikation, bezeichnet als RP, gezeigt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0048] Ein Kit gemäß der Erfindung stellt in vorteilhafter Weise Oligonukleotide für ein Amplifikationsverfahren bereit, mit dem RNA-Kopien einer *M.tuberculosis* rRNA-Zielsequenz durch Verwendung eines Gemischs von blockierten und unblockierten Promotor-Primern oder Promotor-Primern mit unterschiedlichen 3'-Modifikationen, synthetisiert werden, bestehend im Wesentlichen aus derselben Nukleinsäure-Sequenz in einem Verhältnis, das eine verminderte Menge an nicht-spezifischen Nebenprodukten erzielt. Der Amplifikationsprozess verläuft spontan und isothermisch unter einem breiten Bereich von Bedingungen. Die nachfolgend beschriebenen Amplifikationsreaktionen stellen eine Reihe logischer Schritte dar. Die relative Rate jedes Schritts bestimmt die effektive Ausbeute an Amplifikationsprodukt. Die Verwendung eines Gemischs von blockierten und unblockierten Primern vermindert die Nebenreaktionen und verbessert folglich die Amplifikation. Nebenprodukte, wie etwa „Primer-Dimere“, wurden beschrieben und sind im Fachbereich als die Effizienz der Amplifikationsreaktionen beeinflussend wohlbekannt. Ein Amplifikationsverfahren, wie in dieser Anmeldung vorgestellt, vermindert den Wirkungsgrad, mit dem solche Nebenprodukte gebildet werden, und erhöht daher die Amplifikationsleistung.

[0049] Geeignete DNA-Polymerasen umfassen reverse Transkriptasen, wie zum Beispiel die reversen Transkriptasen von Vogel-Myeloblastose-Virus (AMV) und Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus (MMLV). Promotor oder Promotor-Sequenzen, die sich für den Einbau in bei der vorliegenden Erfindung verwendete Promotor-Primer eignen, sind Nukleinsäure-Sequenzen (entweder natürlich vorkommende oder synthetisch oder mittels Verdauung durch Restriktionsendonuklease erzeugte), die durch eine RNA-Polymerase spezifisch erkannt werden, die diese Sequenz erkennt und sich daran bindet und den Transkriptionsprozeß einleitet, bei welchem RNA-Transkripte erzeugt werden. Promotorsequenzen für die es eine bekannte und verfügbare Polymerase gibt, die dazu fähig ist, die Startersequenz zu erkennen sind besonders geeignet. Zu solchen Promotoren zählen jene, die durch bestimmte Bakteriophagen-Polymerasen, wie zum Beispiel Bakteriophage T3, T7 oder SP6, erkannt werden. Die Sequenz kann wahlweise Nukleotid-Basen umfassen, die sich über die eigentliche Erkennungsstelle für die RNA-Polymerase hinaus erstrecken und die zusätzliche Stabilität und Empfindlichkeit für Abbauprozesse oder eine erhöhte Transkriptionsleistung verleihen können.

[0050] Obschon einige der reversen Transkriptasen, die zur Verwendung mit den Oligonukleotid-Kits gemäß der Erfindung geeignet sind, eine RNase H-Aktivität aufweisen, wie zum Beispiel AMV- oder MMLV-reverse Transkriptase, kann die Zugabe einer exogenen RNase H, wie z.B. E. coli RNase H, bevorzugt sein. Die Beispiele (siehe unten) zeigen zwar, daß die Zugabe exogener RNase H nicht erforderlich ist, doch kann die in AMV-reverse Transkriptase vorliegende RNase H-Aktivität durch relativ große Mengen an im Reaktionsgemisch vorhandener heterologer DNA gehemmt werden; eine Lösung für das Problem besteht in der Zugabe von exogener RNase H. Ein weiterer Fall, bei dem die Zugabe von RNase H erforderlich sein kann, liegt dann vor, wenn ein Oligonukleotid intern an die Ziel-RNA hybridisiert (d.h. das Oligonukleotid hybridisiert so, daß sich Zielsequenz-Nukleotide sowohl über das 3'- als auch das 5'-Ende des Oligonukleotids hinaus erstrecken).

[0051] Das zweite Oligonukleotid das eine Primersequenz bereitstellt kann blockiert oder ähnlich dem ersten Oligonukleotid modifiziert sein. Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist dann, wenn das erste Oligonukleotid unmodifiziert ist, das zweite Oligonukleotid modifiziert. Auch ist dann, wenn das erste Oligonukleotid kein Promotor-Primer ist, das zweite Oligonukleotid ein Promotor-Primer. Ist außerdem das erste Oligonukleotid lediglich ein Primer, so kann es unblockiert sein, wobei das zweite Oligonukleotid dann ein Promotor-Primer ist, der sowohl blockierte als auch unblockierte Bestandteile enthält, die im Wesentlichen aus einer einzigen Nukleinsäure-Sequenz bestehen.

[0052] Überraschenderweise wird durch solch ein Gemisch von blockierten und unblockierten Oligonukleotiden, die im Wesentlichen aus derselben Nukleinsäure-Sequenz bestehen, die gebildete Menge an nicht-spezifischem Produkt vermindert und dadurch der Wirkungsgrad der Amplifikation erhöht.

[0053] Die erzeugten RNA-Kopien oder Transkripte können ohne weitere Handhabung autokatalytisch vervielfacht werden.

[0054] Gemäss einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung sind sowohl das erste als auch das zweite Oligonukleotid Promotor-Primer, und eines oder beide können jeweils sowohl aus modifizierten als auch unmodifizierten Promotor-Primern bestehen. In solch einem Falle ist es bevorzugt, daß beide Promotoren durch dieselbe RNA-Polymerase erkannt werden, sofern nicht Einführung des zweiten Promotors zu anderen Zwecken als der Amplifikation, zum Beispiel zum Klonen, angestrebt wird. Sind beide Oligonukleotide Promotor-Primer, so werden während der autokatalytischen Reaktion zu beiden Strängen der doppelsträngigen Matrize komplementäre Transkripte erzeugt, wodurch die Anzahl der synthetisierten Kopien der Zielsequenz erhöht werden kann.

[0055] Zu beachten ist, daß, indem das erste Oligonukleotid (Primer oder Promotor-Primer) ein Ende der Zielsequenz definiert, nun das zweite Oligonukleotid (Primer oder Promotor-Primer) das andere Ende definiert; die Endigungen ebenfalls durch eine spezifische Restriktionsendonuklease definiert sein können oder durch andere geeignete Mittel (was ein natürliches 3'-Ende einschließt). Die RNA-Transkripte können von der ursprünglichen Zielnukleinsäure verschiedene Endigungen aufweisen, doch bleibt die Sequenz zwischen dem ersten Oligonukleotid und dem zweiten Oligonukleotid intakt. Die so hergestellten RNA-Transkripte können in obigem System ohne weitere Handhabung automatisch im Kreisprozeß geführt werden. Daher ist die Reaktion autokatalytisch.

[0056] Ebenfalls zu beachten ist, daß jedes Oligonukleotid Nukleotid-Sequenzen in 5'-Position zu seiner Priming-Sequenz aufweisen kann, was zum Zusatz einer zusätzlichen Nukleotid-Sequenz an der schließlich resultierenden doppelsträngigen DNA führen kann; wobei die zusätzliche Nukleotid-Sequenz nicht auf eine Promotor-Sequenz beschränkt ist.

[0057] Bei einer anderen Ausführungsform kann die vorliegende Erfindung aus einem ersten und zweiten Oligonukleotid bestehen, mit dem ein Promotor-Primer bereitgestellt wird, der lediglich aus einem blockierten Oligonukleotid besteht, oder lediglich aus einem unblockierten Oligonukleotid, oder aus einem Oligonukleotid mit einem Gemisch unterschiedlicher Modifikationen am oder nahe dem 3'-Ende.

[0058] Die Amplifikation kann in Gegenwart von Zusatzstoffen zur Förderung der Amplifikation vorgenommen werden. Bereits verwendete Beispiele stellen Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Ethylenglycol, Glycerin oder Zink dar.

[0059] Die Komponenten des Reaktionsgemischs können schrittweise oder auf einmal zugegeben werden. Die Reaktion läuft in vorteilhafter Weise unter Bedingungen ab, die zur Aufrechterhaltung der Stabilität der Reaktionsbestandteile, wie etwa der Enzym-Komponenten, geeignet sind, ohne, daß eine Modifikation oder Be-

einflussung der Reaktionsbedingungen während des Ablaufs der Amplifikationsreaktion erforderlich wäre.

BEISPIELE

VORWORT

[0060] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Nützlichkeit der Kits gemäß der vorliegenden Erfindung. Sie stellen keine Beschränkung dar und sollten nicht als solche verstanden werden.

[0061] Sofern nicht anderweitig angegeben, waren die Reaktionsbedingungen für die Amplifikation in den folgenden Beispielen wie folgt: 50 mM Tris-HCl, 35 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 15 mM N-Acetylcystein, 4 mM rATP, 4 mM rCTP, 4 mM rGTP, 4 mM rUTP, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP, 10% Glycerin, 10% Dimethylsulfoxid, 300-600 Einheiten MMLV-reverse Transkriptase, 200-400 Einheiten T7 RNA-Polymerase, 0,15 µM jeweils von Primer oder Promotor-Primer und spezifische Mengen an Matrize und Enzymen in 100 µl-Volumina bei 42°C für 1 Stunde. Auch Dithiothreitol, Spermidin und/oder Polyethylenimin (PEI) können dem Reaktionsgemisch in vorteilhafter Weise zugegeben werden.

[0062] Die in den folgenden Beispielen verwendeten Enzyme sind T7- oder T3-RNA-Polymerase und die reverse Transkriptase von Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus (MMLV). Weitere RNA-Polymerasen mit verschiedenen Promotor-Spezifitäten eignen sich ebenfalls.

[0063] Die relative Amplifikation wurde wie folgt gemessen. Eine Probe des Amplifikations-Reaktionsgemisch (gewöhnlich 10 µl) wurde 100 µl einer lumineszierend markierten Sondenlösung (zum Beispiel mit Acridinium-mester markiert – siehe obigen HPA-Bezug), enthaltend etwa 75 fMol Sonde, 0,1 M Lithiumsuccinat, pH 4,7, 2% (Gew/Vol) Lithiumlaurylsulfat, 15 mM Aldrithiol, 20 mM EDTA und 20 mM EGTA, zugegeben und gemischt. Die Reaktionen wurden dann 20 Minuten lang bei 60°C inkubiert und abgekühlt. Jeder Hybridisierungsreaktion wurden 300 µl von 0,6 M Natriumborat, pH 8,5, 1% TritonJX-100, zugegeben. Die Reaktionen wurden dann gemischt und sechs Minuten lang bei 60°C inkubiert, um den chemilumineszierenden Marker der unhybridisierten Sonde zu zerstören. Dieses Verfahren der Zerstörung des chemilumineszierenden Markers der unhybridisierten Sonde ist recht spezifisch; es bleibt lediglich eine sehr geringe Fraktion der unhybridisierten Sonde chemilumineszent. Die Reaktionen wurden abgekühlt und die verbliebene Chemilumineszenz in einem Luminometer unter Zugabe von 200 µl von 0,1% Wasserstoffperoxid, 1 mM Salpetersäure und grenzflächenaktives Mittel, und 200 µl von 1,0 N Natriumhydroxid quantifiziert. Im Assay emittiert aus hybridisierter Sonde Licht. Die abgestrahlte Photonenmenge wurde in einem Luminometer gemessen und die Ergebnisse als Relative Licht-Einheiten (RLU) aufgezeichnet. Da die Reaktion, die den chemilumineszierenden Marker der unhybridisierten Sonde zerstört, nicht 100% wirksam ist, liegt im allgemeinen ein Hintergrundpegel an vorhandenem Signal im Bereich von etwa 1000 bis 2000 RLU vor.

[0064] Viele weitere Assay-Methoden sind ebenfalls anwendbar, einschließlich von Assays unter Anwendung einer Hybridisierung an isotopisch markierte Sonden, von Blotting-Verfahren und der Elektrophorese.

[0065] Diese Reaktionsbedingungen sind nicht unbedingt optimiert und wurden, wie für einige Systeme angemerkt, verändert. Die verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen stellen Beispiele dar und sind nicht als Beschränkung zu verstehen, da auch andere Sequenzen für diese und weitere Zielsequenzen verwendet wurden.

BEISPIEL 1

[0066] Um zu zeigen, daß die Amplifikation mit einem modifizierten Promotor-Primer eintrat, der komplementär zu einer Sequenz innerhalb eines RNA-Ziels war, wurde ein zu einer Sequenz in *M. tuberculosis* rRNA (Seq ID Nr. 1; Primer-Teil ist Seq ID Nr. 22) komplementärer Promotor-Primer in entweder unmodifizierter Form oder mit 3'-Alkandiol (RP) oder 3'-Cordycepin (CO) synthetisiert und mit einem Primer derselben Richtung wie die Ziel-RNA (Seq ID Nr. 2) inkubiert und 3 zMol des Ziels unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die Reaktionen wurden mit einer Sonde derselben Richtung wie die Ziel-RNA (Seq. ID Nr. 3) mit Helfer-Oligonukleotiden analysiert, wie beschrieben bei Hogan (US-Patentschrift 5030557, Means for Enhancing Nucleic Acid Hybridization, Seq ID Nrn. 4 und 5).

[0067] Die Ergebnisse zeigen, daß eine signifikante Amplifikation mit einem Promotor-Primer eintritt, der eine 3'-Modifikation aufweist.

Promotor-Primer-Modifikation	RLU
Unmodifiziert	314445
3'-Cordycepin	71382
Unmodifiziert	683737
3'-RP	70014

BEISPIEL 2

[0068] Um zu zeigen, daß Gemische von modifizierten und unmodifizierten Promotor-Primern in einem Amplifikations-Assay funktionieren, wurden Reaktionen mit 15 pMol des Primers und eines Promotor-Primers (siehe unten) vorgenommen und untersucht, wie in Beispiel 1 beschrieben. Es wurden drei zMol der Ziel-RNA verwendet.

		pMol Promotor-Primer		RLU
		unmodifiziert	CO-modifiziert	
Experiment 1	+ Ziel	15	0	834902
	+ Ziel	3	12	971938
	-Ziel	3	12	1456
Experiment 2	+ Ziel	3	12	1015199
	+ Ziel	0,1	15	961041

[0069] Die Ergebnisse zeigen, daß ein Gemisch von blockierten und unblockierten Oligonukleotiden ebenso gut oder besser wie alle unblockierten Oligonukleotide, selbst bei einem Verhältnis von 1:150, unblockiert zu blockiert, funktionierte.

BEISPIEL 3

[0070] Bei diesem Experiment wurden 3 zMol der Ziel-RNA mit verschiedenen Konzentrationen von CO-blockiertem und unblockiertem Primer und einem Gemisch von 15 pMol CO-blockiertem Promotor-Primer und 0,1 pMol unblockiertem Promotor-Primer wie in Beispiel 1 inkubiert. Die Produkte wurden mittels Hybridisierungs-Assay nachgewiesen.

pMol Primer		RLU
blockiert	unblockiert	
0	15	969522
10	5	802840
13	2	648271

[0071] Über die beobachtete zufriedenstellende Amplifikation hinaus wurde überraschenderweise festgestellt, daß die Menge an nicht-Matrizen-gerichtetem Produkt in jenen Reaktionen beträchtlich geringer war, die mit blockierten Oligonukleotiden vorgenommen wurden, als bei den mit unblockierten Oligonukleotiden vorgenommenen Reaktionen.

BEISPIEL 4

[0072] Bei diesem Experiment wurde die Wirkung des Mischens einer einzelnen Oligonukleotid-Sequenz mit zwei verschiedenen 3'-Modifikationen gezeigt. Drei zMol der Ziel-RNA wurden amplifiziert wie in Beispiel 1. Der Promotor-Primer wurde mit einem unblockierten 3'-Ende, blockiert mit RP oder mit CO, synthetisiert. Zwei pMol

des Primers wurden verwendet.

Pmol Promotor-Primer			RLU
RP-modifiziert	CO-modifiziert	unmodifiziert	
0	15	0,1	450157
2	13	0,01	681647
2	13	0	678871
5	10	0	755839

[0073] Dieses Beispiel zeigte, daß ein Gemisch von unmodifizierten und modifizierten oder ein Gemisch verschiedener Arten von modifizierten Promotor-Primern gut amplifizierte, indem es den Nachweis von 3 zMol RNA-Ziel in einer Stunde zuließ.

BEISPIEL 5

[0074] Bei diesem Beispiel wurde ein Gemisch von modifizierten und unmodifizierten Primern und Promotor-Primern zur Amplifikation von 3 zMol *M. tuberculosis*-rRNA verwendet. Ein Gemisch von 2 pMol RP-modifiziertem Promotor-Primer und 13 pMol CO-modifiziertem Promotor-Primer wurde mit unmodifiziertem Primer oder einem Gemisch von unmodifiziertem Primer und mit einem 3'-Phosphorthioat-Nukleotid (PS) synthetisiertem Primer verwendet. Die Sequenzen und Hybridisierungs-Sonden sind dieselben wie in Beispiel 1.

Primer-Modifikation		RLU
unmodifiziert	PS-modifiziert	
--	15 pmol	118411
1 pMol	14 pmol	364733
Kein Ziel		1266

[0075] Unter diesen Bedingungen zeigte das Gemisch von modifizierten und unmodifizierten Primern die beste Wirkung.

SEQUENZBESCHREIBUNG

<110> Gen-Probe Incorporated

<120> NACHWEIS VON MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DURCH VERVIELFÄLTIGUNG
VON NUKLEINSÄURESEQUENZEN

<130> P53256EP

<140> 99121906.4

<141> 1993-08-04

<150> EP 93306169.9

<151> 1993-08-04

<150> US 07/925405

<151> 1992-08-04

<160> 22

<170> Patentln Ver. 2.1

<210> 1

<211> 55

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 1

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acagccgtca cccaccaac aagct

55

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 2

gggataagcc tgggaaactg ggtctaatac c

31

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 3

gtcttgtggt ggaaagcgct ttag

24

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 4

ccggatagga ccacgggatg cat

23

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 5

cggtgtggga tgaccccgcg

20

<210> 6

<211> 47

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 6

aatttaatac gactcactat agggagacca ggccactcc gctaacc

47

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 7

cgcggaacag gctaaaccgc acgc

24

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 8

ggaggatatg tctcagcgct act

23

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 9

cggctgagag gcagtacaga aagtgtcgtg gttagcgg

38

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 10

gggtaaccgg gtaggggttg tgtgtgcggg gttgtg

36

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 11

ataatccacc tatccagta ggagaaat

28

<210> 12

<211> 55

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 12

aatttaatac gactcactat agggagacca cacctgtct tatgtccaga atgct

55

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 13

gcacgtagtt agccggtgct tattcttcag

30

<210> 14

<211> 53

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 14

aatttaatac gactcactat agggagagca agcctgatcc agccatgccg cgt

53

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 15

gcttgcgccc attgtccaaa atttccact gc

32

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 16

tcggccgccc atattggc

18

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 17

aacggccttt tcttcctga caaaagtcct ttacaaccg

40

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 18

cgtagttagc cggcgcttat tcttcaggta ccgtca

36

<210> 19

<211> 46

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 19

taatattaac cctcactaaa gggagaccag gccacttccg ctaacc

46

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 20

ataatccacc tatcccagta ggagaaat

28

<210> 21

<211> 55

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 21

aatttaatac gactcactat agggagacca caccttgtct tatgtccaga atgct

55

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonukleotid

<400> 22

gccgtcaccc caccaacaag ct

22

Patentansprüche

1. Kit enthaltend ein erstes Oligonukleotid bestehend aus der Sequenz xGCCGTCACCCCACCAACAAGCT (SEQ ID Nr. 22) und ein zweites Oligonukleotid bestehend aus der Sequenz xGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACC (SEQ ID Nr. 2), wobei x für nichts steht oder eine durch eine RNA-Polymerase erkannte Sequenz ist.

2. Kit nach Anspruch 1, wobei eines des ersten und zweiten Oligonukleotide ein Promotor-Primer ist.

3. Kit nach Anspruch 2, wobei das erste Oligonukleotid das Oligonukleotid ist, das durch SEQ ID Nr. 1 (GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGCCGTCACCCCACCAACAAGCT) dargestellt ist, und das zweite Oligonukleotid die Sequenz ist, die durch SEQ ID Nr. 2 (GGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACC) dargestellt ist.

4. Kit nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei eine oder mehrere der Sequenzen ein modifiziertes 3'-Ende aufweist bzw. aufweisen, das die Verlängerung durch eine Polymerase reduziert oder blockiert.

5. Kit nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, wobei der Promotor-Primer eine Mischung von modifizierten und unmodifizierten Gliedern oder eine Mischung von unterschiedlich modifizierten Gliedern umfasst, wobei jedes modifizierte Glied eine Modifikation bei oder in der Nähe des 3'-Endes aufweist, die die Verlängerung durch eine Polymerase reduziert oder blockiert.

6. Kit nach einem der Ansprüche 1 bis 5, des Weiteren umfassend eine Hybridisierungssonde, wobei die Sonde ein Oligonukleotid umfasst bestehend aus der Sequenz GTCTTGTGGTGGAAAGCGTTAG (SEQ ID Nr. 3).

7. Kit nach einem der Ansprüche 1 bis 6, des Weiteren umfassend Helfer-Oligonukleotide dargestellt durch SEQ ID Nr. 4 (CCGGATAGGACCACGGGATGCAT) und SEQ ID Nr. 5 (CGGTGTGGGATGACCCCGCG).

8. Methode für das Amplifizieren der Mycobacterium-Nukleinsäure in einer Probe umfassend die Amplifikation der Nukleinsäure mit einem Paar von Oligonukleotiden ausgewählt aus Paaren von Oligonukleotiden für die Nukleinsäureamplifikation, wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 definiert.

9. Methode zum Erfassen von M. tuberculosis-Nukleinsäure, umfassend die Amplifikation der Nukleinsäure mit einem Paar von Oligonukleotiden ausgewählt aus Paaren von Oligonukleotiden für die Nukleinsäureamplifikation, wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 definiert, und das Erfassen der amplifizierten Nukleinsäure mit einer Hybridisierungssonde, wie in Anspruch 6 definiert.

10. Verwendung eines Satzes von Oligonukleotiden des Kits nach Anspruch 7 zum Erfassen von M. tuberculosis-Nukleinsäure durch eine Methode nach Anspruch 9.

11. Oligonukleotid bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus GGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACC (SEQ ID Nr. 2) und dem Oligonukleotid, das zu der Nukleinsäuresequenz komplementär ist.

12. Oligonukleotid nach Anspruch 11, das am 5'-Ende mit einer durch eine RNA-Polymerase erkannten Sequenz verbunden ist.

13. Oligonukleotid nach Anspruch 11 oder Anspruch 12, das eine Modifikation an oder in der Nähe seines 3'-Endes aufweist, die die Verlängerung durch eine Polymerase reduziert oder blockiert.

14. Mischung modifizierter und unmodifizierter Oligonukleotide oder Mischung unterschiedlich modifizierter Oligonukleotide, wobei die Mischung eine Mischung von Primern oder eine Mischung von Promotor-Primern ist, die die gleiche Promotorsequenz aufweisen und wobei jedes modifizierte oder unmodifizierte Oligonukleotid im Wesentlichen an die gleiche Zielsequenz hybridisiert und wobei die Oligonukleotide aus den Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 11 bis 13 ausgewählt sind.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

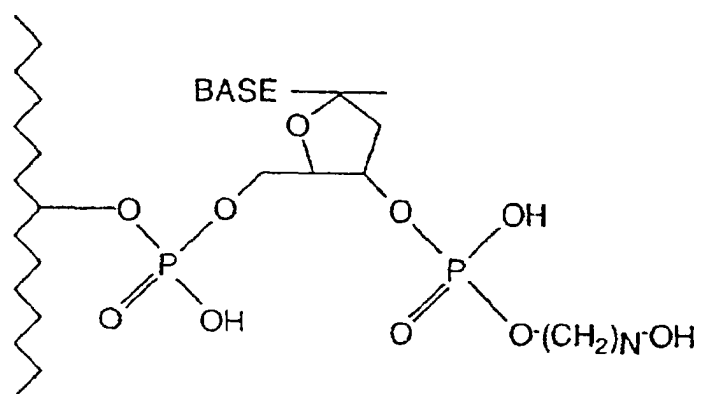


FIG. 1