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

(10) **DE 699 27 113 T2** 2006.01.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 002 877 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 27 113.4**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 121 773.8**
(96) Europäischer Anmeldetag: **03.11.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.05.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **07.09.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.01.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

31805698	**09.11.1998**	**JP**
6347699	**10.03.1999**	**JP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Sanko Junyaku Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

(72) Erfinder:
Usui, Mitsugu, Abiko-shi, Chiba-ken, JP

(74) Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80538 München

(54) Bezeichnung: **Methode zur Genvervielfältigung**

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

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft spezielle und neue Sonden, ein Gen-amplifizierendes Verfahren und Verwendung von Quer-(alternierendem) Binden der speziellen Sonden und ein Verfahren des direkten Nachweises eines Target-Gens und ein Verfahren zum Nachweis von Antigen/Antikörper unter Verwendung des Gen-amplifizierenden Verfahrens.

2. Beschreibung des Standes der Technik

[0002] In jüngster Zeit wurden ein Verfahren zum Amplifizieren eines Gens unter Verwendung einer DNA-Polymerase, repräsentiert durch ein Polymerase-Kettenreaktions-Verfahren (im folgenden genannt das „PCR-Verfahren"), ein Verfahren zum Amplifizieren eines Gens durch Hybridisieren von Polymer-DNA mit zuvor verzweigter einzelsträngiger DNA (im folgenden genannt das („verzweigte DNA-Sonden-Verfahren") usw. zum Nachweis sehr kleiner Mengen eines Target-Gens entwickelt.

[0003] Die Amplifikation des Gens durch das PCR-Verfahren involviert das Annealen (Hybridisieren) eines Primers komplementär zu einem Target-Gen (oder einem Primer), und das Amplifizieren des Gens durch Erhöhen und Abfallen von Temperatur unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase. Von Nachteil ist, dass dieses Verfahren eine lange Zeit von der Amplifikation bis zum Nachweis eines Gens benötigt und teuer ist. Darüber hinaus kann die Amplifikationseffizienz und Spezifizität abhängig vom Design eines Primers, komplementär zu dem Target-Gen variieren.

[0004] Die Amplifikation des Gens durch das verzweigte DNA-Sonden-Verfahren auf der anderen Seite involviert das frühere Synthetisieren einer verzweigten Polymer-einzelsträngigen DNA-Sonde und das Hybridisieren der verzweigten Polymer-einzelsträngigen DNA-Sonde mit einem Target-Gen, um das Target-Gen nachzuweisen

[0005] Jedoch die Hybridisierung der verzweigten Polymereinzelstrang-DNA-Sonde mit dem Target-Gen dauert lange Zeit, da die verzweigte DNA-Sonde ein Polymer darstellt.

[0006] Darüber hinaus ist die verzweigte Polymer-einzelsträngige DNA in ihrer Größe limitiert, so dass der Nachweis des Target-Gens auch limitiert ist.

AUFGABE UND ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Erfindung wurde realisiert im Hinblick auf die Probleme des Standes der Technik, wie oben erwähnt und ihre Aufgabe ist es, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, um ein Gen effizient zu amplifizieren, ohne die Verwendung von Enzym oder verzweigter DNA.

[0008] Um das Problem, wie oben erwähnt zu lösen, umfasst ein Gen-amplifizierendes Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung die Schritte des Bereitstellens einer Vielzahl von Paaren von Sonden, jeweils bestehend aus drei oder mehr Teilen komplementär zu solchen Teilen der anderen Sonde; und Hybridisieren besagter Paare von Sonden, so dass sie abwechselnd überlagern, um ein doppelsträngiges Polymer auszubilden.

[0009] Das Paar von Sonden zur Anwendung im Gen-Amplifikationsverfahren kann zwei DNA-Sonden darstellen, eine DNA-Sonde in der RNA-Sonde, zwei RNA-Sonden, zwei PNA-(Peptid-Nukleinsäure oder Polyamid-Nukleinsäure)-Sonden, eine PNA-Sonde und eine DNA-Sonde oder eine PNA-Sonde und eine RNA-Sonde.

[0010] Die Paare von Sonden sind strukturiert, so dass sie komplementäre Teile an drei oder mehr Stellen aufweisen, welche jeweils in einer spezifischen Art und Weise ohne Fehler während der 1:1-Hybridisierung hybridisiert sind.

[0011] Ein Target-Gen-Nachweisverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst in einem ersten Aspekt die Schritte des Bereitstellens eines Paares von Sonden, wobei eine davon ein Gen in einem Teil davon aufweist, welches komplementär zu einem Target-Gen ist, das Hybridisieren einer Vielzahl von besagter Paare von Sonden mit dem Target-Gen durch das Gen-amplifizierende Verfahren, wie oben beschrieben, um ein doppelsträngiges Polymer auszubilden und das Amplifizieren der Sonden, um das Target-Gen nachzuweisen.

[0012] Ein Antigen/Antikörper-Nachweisverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst in einem ersten Aspekt die Schritte des Bereitstellen eines Paares von Sonden, wobei eine davon ein Gen aufweist, welches in einem Teil davon komplementär mit einem Target-Gen an einen Antigen/Antikörper gebunden ist, das Hybridisieren einer Vielzahl von besagten Paaren von Sonden mit dem Target-Gen durch das Gen-amplifizierende Verfahren, wie oben beschrieben, um ein doppelsträngiges Polymer auszubilden und den Nachweis von Antigen/Antikörper.

[0013] Das Target-Gen-nachweisende Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst in einem zweiten Aspekt die Schritte des Bereitstellens eines Paares von Sonden und einer weiteren Sonde komplementär zu einem Gen in einem Teil von besagtem Paar von Sonden und zu einem Target-Gen, das frühere Hybridisieren besagter anderen Sonde an das Target-Gen, das Hybridisieren besagter Paare von Sonden mit den Target-Gen durch das Gen-amplifizierende Verfahren, wie oben beschrieben, um ein doppelsträngiges Polymer auszubilden und das Amplifizieren der Sonden, um das Target-Gen nachzuweisen.

[0014] Das Antigen/Antikörper nachweisende Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst in einem zweiten Aspekt die Schritte des Bereitstellens eines Paares von Sonden und einer weiteren Sonde komplementär zu einem Gen in einem Teil von besagtem Paar von Sonden und zu einem Target-Gen, gebunden an besagten Antigen/Antikörper, das zuvor Hybridisieren von besagter weiteren Sonde an das Target-Gen und das Hybridisieren von besagten Paaren von Sonden mit dem Target-Gen durch das Gen-amplifizierende Verfahren, wie oben beschrieben, um ein doppelsträngiges Polymer auszubilden und den Nachweis von Antigen/Antikörper.

[0015] In dem Target-Gen nachweisenden Verfahren kann ein interkalierender Farbstoff, wie z.B. Ethidiumbromid, Oligreen, SYBR-Green u. dgl. an die Sonden gebunden werden, welche durch das Gen-amplifizierende Verfahren amplifiziert werden, um eine amplifizierte polymere Fluoreszenz nachzuweisen.

[0016] In dem Antigen/Antikörper nachweisenden Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann ein interkalierender Farbstoff, wie z.B. Ethidiumbromid, Oligreen, SYBR-Green od. dgl. an die Sonden gebunden werden, welche durch das Gen-amplifizierende Verfahren amplifiziert werden, um das Target-Gen gebunden an Antigen/Antikörper od. dgl. durch Fluoreszenz nachzuweisen.

[0017] In dem Target-Gen nachweisenden Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung können als Markermaterial zum Nachweis ein Fluoreszenz-Donor-Farbstoff und ein Fluoreszenz-Akzeptor-Farbstoff, welche Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (fluorescent resonance energy transfer (FRET) einsetzen, wie z.B. Radioisotope, wie ^{125}I, ^{32}P und dgl., lichtemittierende und farbgebende Materialien, beispielsweise Digoxigenin, Acridinester od. dgl., alkalische Phosphatase zum Einsetzen eines lichtemittierenden Materials, wie z.B. Dioxyethan od. dgl., sowie fluoreszente Materialien, wie z.B. 4-Methylumbelliferilphosphat od. dgl., und Biotin zum Einsetzen fluoreszierende lichtemittierender, farbgebender Materialien od. dgl. gebunden an Avidin zuvor zu den Sonden hinzugefügt werden, welche durch das Gen-amplifizierende Verfahren amplifiziert werden sollen, um das Target-Gen nachzuweisen.

[0018] In dem Antigen/Antikörper nachweisenden Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung können als ein Markermaterial zum Nachweis ein Fluoreszenz-Donor-Farbstoff und ein Fluoreszenz-Akzeptor-Farbstoff, welche Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (fluorescent resonance energy transfer (FRET) einsetzen, wie z.B. Radioisotope, wie ^{125}I, ^{32}P und dgl., lichtemittierende und farbgebende Materialien, beispielsweise Digoxigenin, Acridinester od. dgl., alkalische Phosphatase zum Einsetzen eines lichtemittierenden Materials, wie z.B. Dioxyethan od. dgl., sowie fluoreszente Materialien, wie z.B. 4-Methylumbelliferilphosphat od. dgl., und Biotin zum Einsetzen fluoreszierender, lichtemittierender, farbgebender Materialien od. dgl., gebunden an Avidin, zu einem Paar von Sonden zuvor hinzugefügt werden, welches amplifiziert werden soll durch das Gen-amplifizierende Verfahren, um den Antigen/Antikörper nachzuweisen.

[0019] Jede der besagten Sonden gemäß der vorliegenden Erfindung besteht aus drei oder mehr Teilen komplementär zu solchen Teilen der anderen Sonde.

[0020] Das Paar von Sonden kann aus zwei DNA-Sonden, einer DNA-Sonde und einer RNA-Sonde, zwei RNA-Sonden, zwei PNA-Sonden, einer PNA-Sonde und einer RNA-Sonde oder einer PNA-Sonde oder einer RNA-Sonde bestehen.

[0021] Ein doppelsträngiges Polymer gemäß der vorliegenden Erfindung wird ausgebildet durch Verwendung einer Vielzahl von Paaren von Sonden und ihr Hybridisieren, so dass sie alternierend überlagern.

[0022] Die DNA-Sonde besteht aus einzelsträngigen Fragmenten, welche hauptsächlich aus Phosphorsäure, Zucker und Basen bestehen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin), wohingegen die RNA-Sonde aus einzelsträngigen Fragmenten besteht, welche hauptsächlich aus Basen bestehen, die Adenin, Uracil, Guanin und Cytosin darstellen. PNA weist eine Struktur auf, in welcher das Skelett von „Phosphorsäure und Zucker" in der DNA ersetzt wird durch ein „N-(2-aminoethyl)Glycinderivat" und weist die gleichen Komponenten an Basen wie DNA und RNA auf.

[0023] Die Länge der Sonden zur Anwendung in dem Verfahren, wie oben erwähnt, reicht von 10 Basen bis 1000 Basen und am meisten bevorzugt von 10 Basen bis 100 Basen.

[0024] Das Paar von Sonden ist nicht speziell limitiert hinsichtlich des Typs an Basen in den übereinstimmenden komplementären Abteilen. Darüber hinaus kann die Länge der komplementären Teile, welche in einer Sonde existieren, gleich oder unterschiedlich sein.

[0025] Die Anzahl der Sonden hybridisiert, um ein doppelsträngiges Polymer zur Anwendung in den, wie oben erwähnten Verfahren, auszubilden ist im Bereich von 10^2 bis 10^{15}.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0026] Fig. 1 ist ein schematisches Diagramm, welches ein Beispiel eines Paares von Sonden zeigt;

[0027] Fig. 2 ist ein schematisches Diagramm eines Beispiels, welches zeigt, wie ein Paar von Sonden gebunden ist,

[0028] Fig. 3 ist ein schematisches Diagramm, welches die Ausbildung eines Polymers zeigt, welches aus der Hybridisierung eines Paares von DNA-Sonden in Alternierung resultiert;

[0029] Fig. 4 ist ein schematisches Diagramm, welches ein Beispiel illustriert einer dreidimensionalen konzeptionellen Struktur des Polymers, dargestellt in Fig. 3;

[0030] Fig. 5 ist ein schematisches Diagramm, welches die DNA-Sonden illustriert, welche in bindenden Mustern, verschieden von denjenigen von Fig. 3, hybridisiert sind;

[0031] Fig. 6 illustriert ein Beispiel einer dreidimensionellen konzeptionellen Struktur des schematischen Diagramms von Fig. 5;

[0032] Fig. 7 ist ein schematisches Diagramm, welches ein Beispiel eines Paares von DNA-Sonden zeigt, in welchen Teile, abgeschnitten durch ein Restriktionsenzym, insertiert sind;

[0033] Fig. 8 ist ein schematisches Diagramm, welches ein Beispiel illustriert, in welchem Sonden dreidimensional alternierend gebunden sind, um ein Polymer auszubilden, welches substantiell unter Verwendung eines Restriktionsenzyms geschnitten wird;

[0034] Fig. 9 ist ein schematisches Diagramm, welches ein Beispiel eines Paares von DNA-Sonden zeigt, jeweils bestehend aus komplementären Teilen mit verschiedenen Längen untereinander;

[0035] Fig. 10 ist ein schematisches Diagramm, welches die Ausbildung eines Polymers illustriert, welches von der alternierenden Hybridisierung des Paares von DNA-Sonden, dargestellt in Fig. 9, resultiert;

[0036] Fig. 11 ist ein schematisches Diagramm, welches ein Verfahren des direkten Nachweises eines Target-Gens unter Verwendung eines Paares von DNA-Sonden gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt, wobei eine Sonde, die komplementäre Regionen mit einem Target-Gen und dem Paar von DNA-Sonden gemäß der vorliegenden Erfindung (amplifizierende Gene in der Figur) aufweist, mit dem Target-Gen hybridisiert wird, und anschließend das Paar von DNA-Sonden gemäß der vorliegenden Erfindung (amplifizierendes Gen 1 und amplifizierendes Gen 2 in der Figur) hinzugegeben werden, um ein doppelsträngiges Polymer während der Hybridiserung eines Taget-Gens auszubilden, so dass das Target-Gen leicht nachgewiesen werden kann;

[0037] Fig. 12 ist ein schematisches Diagramm, welches ein Verfahren zum Nachweis eines Target-Gens zeigt, welches ein Paar von DNA-Sonden verwendet, wobei eine davon eine DNA-Sonde (amplifizierendes Gen 1 in der Figur) ist, welche so strukturiert ist, so dass ein Gen in einem Teil davon komplementär zu einem

Target-Gen ist, und die andere davon eine Target-Sonde ist (amplifizierendes Gen 2 in der Figur), welche ein Paar mit der einen DNA-Sonde ausbildet, und eine Vielzahl der Paare von Sonden mit der Target-Sonde hybridisiert, um ein doppelsträngiges Polyer auszubilden, und das Target-Gen nachweist;

[0038] Fig. 13 ist ein Flussdiagramm, welches einen ersten Aspekt des Antigen/Antikörper nachweisenden Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung illustriert;

[0039] Fig. 14 ist ein Foto, welches die Ergebnisse von Beispiel 1 zeigt;

[0040] Fig. 15 ist ein Foto, welches die Ergebnisse von Beispiel 2 zeigt; und

[0041] Fig. 16 ist ein Foto, welches die Ergebnisse von Beispiel 3 zeigt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0042] Einige Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden im folgenden beschrieben unter Verweis auf die beigefügten Zeichnungen. Es versteht sich ohne weitere Erläuterung, dass jedoch diese Ausführungsformen hauptsächlich illustrativ sind und eine Vielzahl von Modifikationen gemacht werden kann, ohne vom Geist und Umfang der vorliegenden Erfindung abzuweichen.

[0043] Fig. 1 ist ein schematisches Diagramm, welches ein Beispiel eines Paares von DNA-Sonden zeigt. Unter Verweis spezifisch auf Fig. 1 weist eine DNA-Sonde Nr. 1 eine X-Region, eine Y-Region und eine Z-Region auf, wohingegen eine DNA-Sonde Nr. 2 eine X'-Region, eine Y'-Region und eine Z'-Region aufweist.

[0044] Die DNA-Sonde Nr. 1 und die DNA-Sonde Nr. 2 sind so strukturiert, dass wenn sie hybridisiert werden, die X-Region nur mit X'-Region gebunden wird; die Y-Region nur mit Y'-Region gebunden wird; und die Z-Region nur mit der Z'-Region gebunden wird (siehe Fig. 2).

[0045] Anders gesagt, in einem Paar von DNA-Sonden, jeweils bestehend aus drei oder mehr Teilen komplementär zu solchen Teilen der anderen DNA-Sonde gemäß der vorliegenden Erfindung ist, wenn sie hybridisiert werden, so dass sie abwechselnd überlagern, die X-Region nur mit der X'-Region gebunden; die Y-Region nur mit der Y'-Region gebunden; und die Z-Region nur mit der Z'-Region gebunden, wie in Fig. 2 gezeigt ist, so dass das Paar von Sonden abwechselnd hybridisiert ist in drei bindenden Mustern.

[0046] Folglich sind durch die Verwendung der Sonden, strukturiert wie oben erwähnt, die beiden Sonden abwechselnd gebunden. Genauer gesagt, sind die DNA-Sonde Nr. 1 und die DNA-Sonde Nr. 2 dreidimensional abwechselnd gebunden, um ein Polymer zu erzeugen, wie in Fig. 3 illustriert wird.

[0047] Konsequenterweise kann eine Vielzahl von Paaren von Sonden, welche abwechselnd in dreidimensional bindenden Mustern, wie in Fig. 2 gezeigt, hybridisiert sind, ein doppelsträngiges Polymer ausbilden, wobei ein Beispiel davon schematisch in Fig. 3 illustriert wird.

[0048] Fig. 4 illustriert ein Beispiel einer dreidimensionalen konzeptionellen Struktur des doppelsträngigen Polymers von Fig. 3. Fig. 5 ist ein schematisches Diagramm, illustrierend eine Vielzahl von Paaren der DNA-Sonde, welche in verschiedenen Bindungsmustern hybridisiert haben. Fig. 6 illustriert ein Beispiel einer konzeptionellen dreidimensionalen Struktur des schematischen Diagramm von Fig. 5.

[0049] Das gleiche Prinzip der Hybridisierung für beide DNA-Sonden illustriert in Fig. 3 trifft auch auf die Hybridisierung einer DNA-Sonde und einer RNA-Sonde, von zwei RNA-Sonden, von zwei PNA-Sonden, eine PNA-Sonde und einer DNA-Sonde oder eine PNA-Sonde und einer RNA-Sonde zu.

[0050] Zur Illustration der Struktur der vorliegenden Erfindung unter Verwendung eines spezifischeren Beispiels kann die Hybridisierung von zwei DNA-Sonden durchgeführt werden, so dass, wenn eine Sonde Nr. 3 und eine Sonde Nr. 4 hybridisiert werden, Schnittstellen ausgebildet werden, durch ein Restriktionsenzym (unterstrichene Teile werden geschnitten durch ein Enzym mit dem Namen „Hae III"), wie in Fig. 7 gezeigt.

[0051] Mit anderen Worten, nachdem die Sonden dreidimensional alternierend gebunden wurden, um ein Polymer auszubilden, kann ein Restriktionsenzym verwendet werden, um das Polymer vor Cross-Kontamination in einer nachfolgenden unterschiedlichen experimentellen Operation zu bewahren (siehe Fig. 8).

[0052] Zur Illustration der Struktur der vorliegenden Erfindung unter Verwendung eines spezifischeren Beispiels benötigt die Hybridisierung von zwei DNA-Proben nicht, dass die Längen der komplementären Teile in einer Sonde einheitlich sind, wie dies in Fig. 9 gezeigt ist. Genauer gesagt, wenn eine Sonde Nr. 5 und eine Sonde Nr. 6 hybridisieren, werden eine X-Region und eine X'-Region mit 24 Basen hybridisieren; eine Y-Region und eine Y'-Region hybridisierend mit 22 Basen und eine Z-Region und eine Z'-Region hybridisierend mit 20 Basen (siehe Fig. 10).

[0053] Als nächstes wird das Target-Gen-Nachweisverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung unter Verwendung spezifischerer Beispiele beschrieben. In einem ersten Aspekt, wie in Fig. 12 illustriert, wird aus einem Paar von Sonden eine Sonde so strukturiert, dass ein Teil des Gens in der Sonde komplementär zu einem Target-Gen ist. Nachdem die eine Sonde mit dem Target-Gen hybridisiert ist, wird eine Vielzahl von Paaren von Sonden durch das Gen-Amplifikationsverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung hybridisiert, um ein doppelsträngiges Polymer auszubilden, welches nachgewiesen wird durch Amplifizieren der Sonden.

[0054] In einem zweiten Aspekt, wie in Fig. 11 illustriert, wird eine Sonde, verschieden von einem Paar von Sonden komplementär zu einem Gen und einem Teil von einer der Sonden und einer Target-Sonde verwendet und zuvor mit dem Target-Gen hybridisert. Anschließend wird eine Vielzahl von Paaren von Sonden durch den Gen-amplifizierende Verfahren, wie oben erwähnt, hybridisiert, um ein doppelsträngiges Polymer auszubilden, welches durch Amplifizieren der Sonden nachgewiesen wird.

[0055] Als nächstes wird der erste Aspekt des Antigen/Antikörper-nachweisenden Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung beschrieben werden unter Verwendung eines spezifischeren Beispiels unter Verweis auf Fig. 13. Wie illustriert, wird aus einem Paar von Sonden eine Sonde so strukturiert, dass ein Gen in einem Teil davon komplementär zu einem Target-Gen gebunden an ein Antigen/Antikörper ist. Anschließend wird eine Vielzahl von Paaren von Sonden durch das Gen-amplifizierende Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung hybridisiert, um ein doppelsträngiges Polymer auszubilden, um das Antigen und den Antikörper nachzuweisen.

[0056] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung beschrieben werden in Verknüpfung mit mehreren Beispielen. Es versteht sich jedoch ohne weitere Erläuterung, dass die vorliegende Erfindung nicht auf diese Beispiele begrenzt ist.

1. DNA-Sonden, verwendet in Beispiel 1 und 2:
(1) Gen-amplifizierende Sonde 1
5-TgA CTT ACT TAA CCg gAA ACA T·AAg CAg gAT CCT
CTA AgC CTg A·CgA AgT ATT TAA Cgg Tgg TAT g-3
(2) Gen-amplifizierende Sonde 2
3-gCT TCA TAA ATT gCC ACC ATA C·TTC gTC CTA ggA
gAT TCg gAc T·ACT gAA TgA ATT ggC CTT TgT A-5
(3) Gen-amplifizierende Sonde 3
6' – TgC CgA CCg gCg AgC g·Tag CAT ggC CCT CTA g·CTT
ATC ggC CTC gAg A -3'
(4) Gen-amplifizierende Sonde 4
3'-gAA Tag CCg gAg CTC T·ATC gTA CCg ggA gAT C·ACg
gCT ggC CgC TCg C -5'
2. Synthetische HCV-RNA und eine Vielzahl von DNA-Sonden verwendet in Beispiel 3 und Beispiel 4:
(1) HCV-RNA, welche eine 5'-nichtkodierende Region von Hepatitis C-Virus (im Folgenden abgekürzt als „synthetisierte HCV-RNA") synthetisiert.
(2) HCV-RNA Einfangsonde A 5'(Phosphorsäure)-Tag AgC gTg CAg ATA gTC gAT·CCT
CAC Agg ggA gTg ATT CAT ggT-3
Dies ist eine Kombination einer bedeutungslosen Basensequenz und einer Basensequenz kompelementär zur HCV-RNA.
(3) HCV-RNA-Einfangsonde B
5'(Biotinlabel)-TAg AgC gTg CAg ATA gTC gAT·CCT CAC
Agg ggA gTg ATT CAT ggT-3'
Dies ist eine Kombination einer bedeutungslosen Base und einer Basensequenz komplementär zur HCV-RNA.
(4) Sonde C
3'-TAC TTA gTg Agg ggA CAC TCC·gAA TAA gTC ATA
gCT CAT-5'
Dies ist eine Kombination einer Basensequenz komplementär zur HVC-RNA und einer Basensequenz komplementär zur amplifizierenden Sonde 5.

(5) Sonde D
3'-gCC CAg gAA AgA ACC TAg TTg·gAA TAA gTC ATA
gCT CAT-5'
Dies ist eine Kombination einer Basensequenz komplementär zur HCV-RNA und einer Basensequenz komplementär zur amplifizierenden Sonde 5.
(6) Sonde E
3'-CAT CAC AAC CCA gCg CTT TCC·gAA TAA gTC ATA
gCT CAT-5'
Dies ist eine Kombination einer Basensequenz komplementär zur HCV-RNA und einer Basensequenz komplementär zur amplifizierenden Sonde 5.
(7) Gen-amplifizierende Sonde 5
5'-CTT ATT CAg TAT CgA gTA·TAg CAg gAT CCC TCT AAg·TgC Cgg
ACC AgC gAg Cgg-3'
Dies ist eine Basensequenz komplementär zu den Einfangsonden C, und D und E.
(8) Gen-amplifizierende Sonde 6
3'-ACg gCC Tgg TCg CTC gCC·ATC gTC CTA ggg AgA TTC·gAA TAA
gTC ATA gCT CAC-5'
(9) Genamplifizierende Sonde 7
3' (biotinisiert)-ACg gCC Tgg TCg CTC gCC·ATC gTC CTA ggg AgA
TTC·gAA TAA gTC ATA gCT CAT-5'

(Beispiel 1)

1. Aufgabe

[0057] Der Effekt der Gen-Amplifikation im Hinblick auf die Temperatur auf die Hybridisierung wurde nachgewiesen unter Verwendung von Gen-amplifizierenden Sonden, welche ein Paar von DNA-Sonden gemäß der vorliegenden Erfindung darstellen.

2. Materialien

1) Die Sonde 1 zur Gen-Amplifikation und die Sonde 2 zur Gen-Amplifikation wurden für die Gen-Amplifikation eingesetzt.
2) 20xSSC (333mM-NaCl, 333mM-$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, pH 7,0) wurden verwendet als Puffer-Lösung.

3. Verfahren

[0058] 5 µl der Gen-amplifizierenden Sonde 1 und der Gen-amplifizierenden Sonde 2, jeweils präpariert als 10^{13} Kopien/µl wurden in eine sterilisierte Mikrotube von 0,2 ml gegeben. 40 µl von 20xSSC wurden weiterhin hinzugefügt und Mikrotube wurde mit einem Deckel verschlossen. Anschließend wurde die Mikrotube bei 94°C für 30 Sekunden gekocht und auf 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C, 68°C und 70°C für jeweils 30 Minuten erhitzt.

[0059] Nach dem Erhitzen wurde die Elektrophorese durchgeführt unter Verwendung von 0,5% Agarose-Gel, um den Effekt der Genamplifikation durch Ethidiumbromid-Anfärben zu bestätigen.

4. Ergebnisse

[0060] Fig. 14 ist ein Foto, welches die Ergebnisse von Beispiel 1 mit Elektrophorese bei 100 Volt für 30 Minuten unter Verwendung von 0,5% Agarose-Gel zeigt.

[0061] Das Aragrose-Gel ist ein Gel, welches DNA-Moleküle gemäß ihrer Größe auftrennen kann und 0,5% Agarose-Gel wird im allgemeinen verwendet, um DNA-Moleküle von 30.000 bis 40.000 Basenpaaren aufzutrennen.

[0062] Das Foto von Fig. 14 zeigt ein Polymer, welches soweit gewachsen ist unter ansteigenden Temperaturen, dass es nicht länger mit 0,5% Agarose-Gel wandern kann, als ein Ergebnis eines exakt alternierenden doppelsträngigen Polymers, ausgebildet durch das Paar von DNA-Sonden abhängig von der Temperatur der Hybrdisierung.

(Beispiel 2)

1. Aufgabe

[0063] Es wurde nachgewiesen, dass ein Polymer, amplifiziert durch Sonden zur Gen-Amplifikation, welche ein Paar von DNA-Sonden gemäß der vorliegenden Erfindung darstellen, mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden können.

2. Materialien

1) Die Gen-amplifizierende Sonde 3 und die Gen-amplifizierende Sonde 4 wurden zur Gen-Amplifikation verwendet.
2) Hae III (hergestellt von Takara Shuzo (Brewer) Co., Ltd.) wurde als Restriktionsenzym eingesetzt.
3) M-Puffer (hergestellt von Takara Shuzo (Brewer) Co., Ltd.) wurde verwendet als Pufferlösung für das Restriktionsenzym.
4) 20xSSC (333mM-NaCl, 333mM-$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, pH 7,0) wurde als eine Pufferlösung verwendet.

3. Verfahren

[0064] 5 µl der Gen-amplifizierenden Sonde 3 und der Gen-amplifizierenden Sonde 4, jeweils hergestellt als 10^{13} Kopien/µl, wurden in eine sterilisierte Mikrotube von je 0,2 µl hinzugegeben. 5 µl von 20xSSC und 35 µl an sterilisiertem, destillierten Wasser wurden des weiteren hinzugegeben, um eine Reaktionslösung A herzustellen, und die Mikrotube wurde mit einem Deckel verschlossen. Ähnlich zur Reaktionslösung A wurden 2,5 µl der Gen-amplifizierenden Sonde 3 und der Gen-amplifizierenden Sonde 4, jeweils hergestellt als 10^{13} Kopien/µl in eine sterilisierte Mikrotube von 0,2 ml hinzugegeben. 5 µl an 20xSSC und 40 µl an sterilisiertem, destillierten Wasser wurden des weiteren hinzugegeben, um eine Reaktionslösung B herzustellen, und die Mikrotube wurde mit einem Deckel verschlossen. Die Reaktionslösungen A und B wurden bei 94°C für 30 Sekunden gekocht, bzw. bei 62°C für 30 Minuten erhitzt.

[0065] Nach dem Erwärmen wurden 5 µl an M-Puffer und 5 µl an Hae III hinzugegeben zu jeder der Reaktionslösungen A und B zur Reaktion bei 37°C für 24 Stunden und Elektrophorese wurde durchgeführt unter Verwendung von 2% Agarose-Gel, um ein amplifiziertes Polymer geschnitten durch das Restriktionsenzym durch das Ethidium-bromidanfärben zu bestätigen.

4. Ergebnisse

[0066] Fig. 15 ist ein Foto, welches die Ergebnisse von Beispiel 2 mit Elektrophorese bei 100 Volt für 30 Minuten unter Verwendung von 2% Agarose-Gel zeigt. Das Foto zeigt, dass ein Paar von DNA-Sonden, welches ein exakt alternierendes doppelsträngiges Polymer ausbildet, auf minimale Einheiten durch das Restriktionsenzym geschnitten wurde.

(Beispiel 3)

1. Materialien

1) Die Gen-amplifizierende Sonde 5 und die Gen-amplifizierende Sonde 6 wurden zur Gen-Amplifikation eingesetzt.
2) Magnetische Beads gebunden an Streptavidin (Produktname: Streptavidin MagneSpehere hergestellt von Promega) wurden als eine feste Phase zur B/F-Abtrennung verwendet.
3) 20xSSC und 0,5xSSC (40fach verdünnt von 20xSSC) wurden als Pufferlösungen verwendet.

2. Verfahren

[0067] 10 µl von jeweils synthetischer HCV-RNA hergestellt aus 10^1 Kopien/10 µl, 10^2 Kopien/10 µl, 10^3 Kopien/10 µl, 10^4 Kopien/10 µl, 10^5 Kopien/10 µl, 10^6 Kopien/10 µl, 10' Kopien/10 µl, 10^6 Kopien/µl, 10^9 Kopien/10 µl, und 10^{10} Kopien/10 µl wurden jeweils in eine sterilisierte Mikrotube von 0,2 ml hinzugegeben. Als nächstes wurde jeweils 1 µl der HCV-RNA Sonde B, Sonde C, Sonde, D bzw. Sonde E hergestellt zu 10^{13} Kopien/µl, 10 µl der Gen-amplifizierenden Sonde 5, hergestellt zu 10^{13} Kopien/µl und 25 µl an 20xSSC hinzugegeben. Die jeweiligen Mikrotuben wurden mit einem Deckel verschlossen und die Inkredienzien wurden mit einem Mischer vermischt und bei 62°C für 60 Minuten erwärmt.

[0068] Sobald die Temperatur auf Raumtemperatur abgesunken war, wurden 5 µl den Gen-amplifizierenden Sonde 6 hergestellt zu 10^{13} Kopien/µl zu jeder der Mikrotuben hinzugegeben. Anschließend wurde jede der Mikrotuben mit einem Lid bedeckt und die Inkredienzien wurdenmit einem Mischer vermischt und auf 62°C für 60 Minuten erhitzt.

[0069] Sobald die Temperatur auf Raumtemperatur abgesunken war, wurden 10 µl an Streptavidin MagneSphere (im folgenden als „magnetische Beads" bezeichnet) zu jeder der Mikrotuben zur Reaktion bei 37°C für 30 Minuten gegeben. Nach der Reaktion wurden die magnetischen Beads eingefangen unter Verwendung eines Magnetes und der Überstand wurde entfernt. Anschließend wurden 50 µl an 0,5xSSC und 10 µl an Ethidiumbromid (hergestellt von Wako Junyaku Co., Ltd.) hergestellt zu 100 µl/ml zur Reaktion bei Raumtemperatur für 20 Minuten hinzugegeben.

[0070] Nach der Reaktion wurden die magnetischen Beads eingefangen unter Verwendung eines Magnets und der Überstand wurde entfernt. Anschließend wurden 50 µl an 0,5xSSC hinzugegeben. Unmittelbar danach wurden die magnetischen Beads eingefangen unter Verwendung eines Magneten und der Überstand wurde entfernt. Anschließend wurden 50 µl an 0,5xSSC hinzugegeben und alle Inkredienzien wurden in eine 96 Well-Platte mit flachem Boden überführt. Ultraviolette Strahlen wurden auf dem Boden der 96 Wellplatte eingestrahlt und ein amplifizierendes Gen, welches darin resultierte, Fluoreszenz per Interkalation von Ethidiumbromid zu emittieren, wurde fotografiert.

3. Ergebnisse

[0071] Fig. 16 ist ein Foto, welches die Fluoreszenz von Ehtidiumbromid, erzeugt durch Bestrahlen mit ultravioletten Strahlen auf dem Boden der 96 Wellplatte zeigt. Wie aus Fig. 16 ersichtlich ist, wurde die stärkste Fluoreszenz bei 10^{10} Kopien/10 µl gefunden und die Fluoreszenz wurde graduell schwächer in Übereinstimmung der Menge an synthetischer HCV-RNA.

(Beispiel 4)

1. Materialien

1) Die Gen-amplifizierende Sonde 5 und die Gen-amplifizierende Sonde 7 wurden zur Gen-Amplifikation verwendet.
2) Eine 96 Wellplatte (Produktname: NucleoLink™, hergestellt von Nunc) wurden als eine feste Phase zur B/F-Trennung verwendet.
3) „HPR-Streptavidin", hergestellt von ZYMED Laboratories, Inc. wurden als Peroxidase-konjugiertes Streptavidin verwendet.
4) Ein Färbekit T für Peroxidase, hergestellt von Sumitomo Bakelite Co., Ltd. wurde als Anfärbereagenz verwendet.
5) 2N-H_2SO_4 wurde als eine Enzym-Reaktions-Stop-Lösung verwendet.
6) 20xSSC und 0,5xSSC wurden als Puffer-Lösungen verwendet.

2. Verfahren

[0072] 10 µl jeweils von synthetischer HCV-RNA, hergestellt zu 0 Kopien/10 µl, 10^3 Kopien/10 µl, 10^4 Kopien/10 µl, 10^5 Kopien/10 µl, 10^6 Kopien/10 µl und 10' Kopien/10 µl wurden jeweils zu den Wells in einer 96 Wellplatte (NukleoLink™, hergestellt von Nunc) zuvor gebunden mit einer HCV-RNA Einfangsonde (spezielles Blocken wurde nicht angewandt), hinzugegeben. Anschließend wurden jeweils 10 µl von Sonde C, Sonde D, Sonde E hergestellt zu 10^{11} Kopien/µl, die Gen-amplifizierenden Sonde 5, hergestellt zu 10^{11} Kopien/µl und 60 µl an 20xSSC hinzugegeben.

[0073] Nach Vermischen der Inkredienzien mit einer Pipette wurden sie auf 94°C für 30 Sekunden erhitzt und bei 62°C für 30 Minuten erwärmt.

[0074] Sobald die Temperatur auf Raumtemperatur abgefallen war, wurden 10 µl der Genamplifizierenden Sonde 5 hergestellt zu 10^{11} Kopien/µl und 20 µl der Gen-amplifizierenden Sonde T zu jeder der Mikrotuben hinzugegeben. Sie wurden mit einer Pipette vermischt und anschließend auf 94°C für 30 Sekunden erhitzt und bei 62°C für 60 Minuten erwärmt.

[0075] Nachdem die Temperatur auf Raumtemperatur abgefallen war, wurde 0,5xSSC enthaltend 0,1

%-Tween20 verwendet, um 4x zu waschen. 100 µl an „HRP-Streptavidin" wurde jedem Well hinzugegeben bei 37°C für 20 Minuten erwärmt. Nach Entfernen der Lösung in jedem Well mit Hilfe von Absaugen wurden 0,5xSSC enthaltend 0,1%-Tween20 für 4 maliges Waschen verwendet.

[0076] 100 µl des Färbekits T für Peroxidase wurden zu jedem Well zur Reaktion in einem dunklen Raum (bei Raumtemperatur) für 10 Minuten gegeben. Nach der Reaktion wurden 100 µl der Enzym-Reaktions-Stop-Lösung hinzugegeben und die Lichtabsorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3. Ergebnisse

[0077] Die Ergebnisse von Beispiel 4 sind in Tabelle 1 gezeigt. Das Anfärben wurde in Übereinstimmung mit der Menge der hinzugegebenen synthetisierten HCV-RNA in einer Größenordnung von 10^3 bis 10' Kopien aus der Tatsache, dass Anfärben in dem Peroxidase konjugierten Streptavidin, gelabelt in einem Teil des Paares der DNA-Sonden, welche alternierend hybridisiert waren, um ein doppelsträngiges Polymer auszubilden, beobachtet wurde, bestätigt.

Tabelle 1

Anzahl der Kopien	Absorptionsgrad
0	1,497
10^3	1,843
10^4	1,897
10^5	1,955
10^6	2,064
10^7	2,343

[0078] Wie oben beschrieben, kann das Gen-amplifizierende Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung effizient ein Gen amplifizieren ohne eine DNA-Polymerase oder eine verzweigte DNA einzusetzen.

[0079] Des weiteren kann das Antigen/Antikörper nachweisende Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung effizient Antigen/Antikörper nachweisen unter Verwendung des Gen-amplifizierenden Verfahrens.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zum Ausbilden eines Nukleinsäure-Polymers, wobei das Verfahren folgendes umfasst:
(a) Bereitstellen einer Vielzahl von Paaren von Nukleinsäuresonden, wobei jede Sonde zwischen 10 und 1000 Basen lang ist, eine erste Sonde von besagtem Paar von Sonden drei oder mehr Nukleinsäureregionen umfasst, wobei besagte erste Sonde zumindest eine Nukleinsäureregion X, eine Nukleinsäureregion Y und eine Nukleinsäureregion Z umfasst und die folgende Struktur aufweist



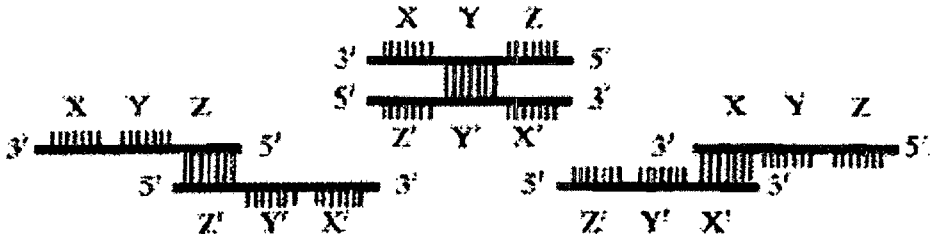
, und

eine zweite Sonde von besagtem Paar von Sonden drei oder mehr Nukleinsäureregionen umfasst, wobei besagte zweite Sonde zumindest eine Nukleinsäureregion Z', eine Nukleinsäureregion Y' und eine Nukleinsäureregion X' umfasst und die folgende Struktur aufweist



, und
(b) Binden besagter Vielzahl von Paaren von Sonden aneinander, um ein Polymer auszubilden, wobei besagte

Nukleinsäureregion X hybridisierbar mit besagter Nukleinsäureregion X' ist, besagter Nukleinsäureregion Y hybridisierbar mit besagter Nukleinsäureregion Y' ist und besagter Nukleinsäureregion Z hybridisierbar mit besagter Nukleinsäureregion Z' ist, so dass besagte Vielzahl von Paaren von Sonden die folgende Strukturen ausbilden



wobei die Strukturen miteinander alternierend gebunden sind, um besagtes Polymer auszubilden.

2. Das Verfahren von Anspruch, wobei besagtes Paar von Sonden zwei DNA-Sonden umfasst, eine DNA-Sonde und eine RNA-Sonde, zwei RNA-Sonden, zwei PNA-Sonden, eine PNA-Sonde und eine DNA-Sonde oder eine PNA-Sonde und eine RNA-Sonde.

3. Das Verfahren von Anspruch 1, wobei besagte Nukleinsäureregion X komplett komplementär ist mit besagter Nukleinsäureregion X', besagte Nukleinsäureregion Y komplett komplementär ist mit besagter Nukleinsäureregion Y; und besagter Nukleinsäureregion Z komplett komplementär ist mit besagter Nukleinsäureregion Z'.

4. Ein Verfahren zum Nachweis eines Target-Gens, wobei das Verfahren folgendes umfasst:
(a) Bereitstellen einer Vielzahl von Paaren von Nukleinsäuresonden, wobei jede Sonde zwischen 10 und 1000 Basen lang ist, eine erste Sonde von besagtem Paar von Sonden drei oder mehr Nukleinsäureregionen umfasst, wobei besagte erste Sonde zumindest eine Nukleinsäureregion X, eine Nukleinsäureregion Y und eine Nukleinsäureregion Z umfasst und die folgende Struktur aufweist



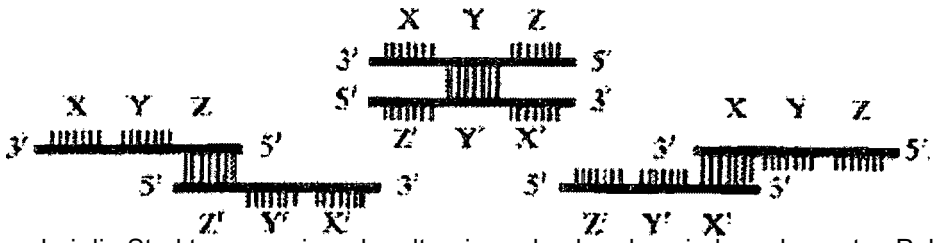
, und

eine zweite Sonde von besagtem Paar von Sonden drei oder mehr Nukleinsäureregionen umfasst, wobei besagte zweite Sonde zumindest eine Nukleinsäureregion Z', eine Nukleinsäureregion Y' und eine Nukleinsäureregion X' umfasst und die folgende Struktur aufweist



, und

wobei eine Sequenz von einer Sonde von besagtem Paar von Sonden komplementär mit einer Sequenz von besagtem Target-Gen ist;
(b) Binden besagten Target-Gens und besagter Vielzahl von Paaren von Sonden aneinander, so dass besagte Vielzahl von Paaren von Sonden ein Polymer ausbilden, wobei besagte Nukleinsäure-Region X mit besagter Nukleinsäureregion X' hybridisierbar ist, besagte Nukleinsäure-Region Y mit besagter Nukleinsäureregion Y' hybridisierbar ist und besagte Nukleinsäure-Region Z mit besagter Nukleinsäureregion Z' hybridisierbar ist, so dass besagte Vielzahl von Paaren von Sonden die folgenden Strukturen ausbilden,



wobei die Strukturen aneinander alternierend gebunden sind, um besagtes Polymer auszubilden; und

(c) Nachweis besagten Polymers, und dadurch Nachweis besagten Target-Gens.

5. Ein Verfahren zum Nachweis eines Target-Gens, wobei das Verfahren folgendes umfasst:
(a) Bereitstellen (1) einer Vielzahl von Paaren von Nukleinsäuresonden, wobei jede Sonde zwischen 10 und 1000 Basen lang ist, eine erste Sonde von besagtem Paar von Sonden drei oder mehr Nukleinsäureregionen umfasst, wobei besagte erste Sonde zumindest eine Nukleinsäureregion X, eine Nukleinsäureregion Y und eine Nukleinsäureregion Z umfasst und die folgende Struktur aufweist



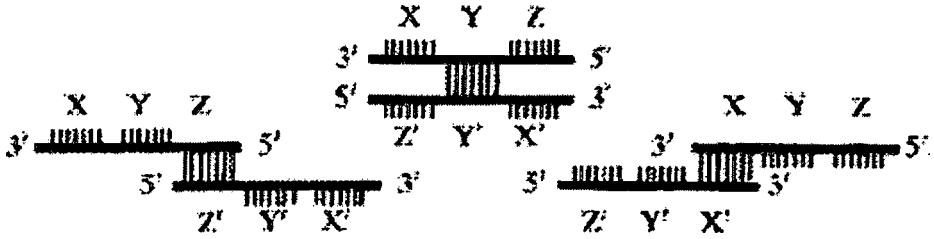
, und

einer zweiten Sonde von besagtem Paar von Sonden drei oder mehr Nukleinsäureregionen umfasst, wobei besagte zweite Sonde zumindest eine Nukleinsäureregion Z', eine Nukleinsäureregion Y' und eine Nukleinsäureregion X' umfasst und die folgende Struktur aufweist



, und

(2) einer weiteren Sonde, welche eine erste Sequenz enthält, welche komplementär zu einer Sequenz von besagtem Target-Gen ist und welche eine zweite Sequenz enthält, die komplementär mit einer Sequenz von einer Sonde von besagtem Paar von Sonden ist;
(b) Binden besagten Target-Gens, besagter weiterer Sonde und besagter Vielzahl von Paaren von Sonden aneinander, so dass besagte Vielzahl von Paaren von Sonden ein Polymer ausbildet, wobei besagte Nukleinsäure-Region X mit besagter Nukleinsäureregion X' hybridisierbar ist, besagter Nukleinsäure-Region Y mit besagter Nukleinsäureregion Y' hybridisierbar ist, und besagte Nukleinsäure-Region Z mit besagter Nukleinsäureregion Z' hybridisierbar ist, so dass besagte Vielzahl von Paaren von Sonden die folgenden Strukturen ausbilden:



wobei die Strukturen alternierend gebunden sind, um besagtes Polymer auszubilden; und
(c) Nachweis besagten Polymers und dadurch Nachweis besagten Target-Gens.

6. Das Verfahren von Anspruch 4, wobei besagtes Target-Gen an einen Antigen/Antikörperkomplex gebunden ist und dadurch besagter Antigen/Antikörperkomplex nachgewiesen wird.

7. Das Verfahren von Anspruch 5, wobei besagtes Target-Gen an einen Antigen/Antikörperkomplex gebunden ist und dadurch besagter Antigen/Antikörperkomplex nachgewiesen wird.

8. Das Verfahren von irgendeinem der Ansprüche 4 bis 7, wobei besagtes Paar von Sonden zwei DNA-Sonden, eine DNA-Sonde und eine RNA-Sonde, zwei RNA-Sonden, zwei PNA-Sonden, eine PNA-Sonde und eine DNA-Sonde, oder eine PNA-Sonde und eine RNA-Sonde umfasst.

9. Das Verfahren von irgendeinem der Ansprüche 4 bis 7, wobei besagte Nukleinsäureregion X komplett komplementär ist mit besagter Nukleinsäureregion X', besagter Nukleinsäureregion Y komplett komplementär mit besagter Nukleinsäureregion Y' ist, und besagte Nukleinsäure-Region Z komplett komplementär mit besagter Nukleinsäureregion Z' ist.

10. Das Verfahren von irgendeinem der Ansprüche 4 bis 7, wobei besagter Nachweisschritt (c) das Einbringen eines fluoreszierenden Materials in besagtes Polymer umfasst und anschließend das Nachweisen besagten fluoreszierenden Materials.

11. Das Verfahren von irgendeinem der Ansprüche 4 bis 7, worin zumindest eine Sonde von besagter Vielzahl von Paaren von Sonden ein Marker-Material enthält und besagter Nachweisschritt (c) das Nachweisen von besagtem Marker-Material umfasst.

12. Ein Paar von Nukleinsäuresonden, wobei jede Sonde 10 bis 1000 Basen lang ist, eine erste Sonde von besagtem Paar von Sonden drei oder mehr Nukleinsäureregionen umfasst, wobei besagte erste Sonde zumindest eine Nukleinsäureregion X umfasst, eine Nukleinsäureregion Y und eine Nukleinsäureregion Z und folgende Struktur aufweist:



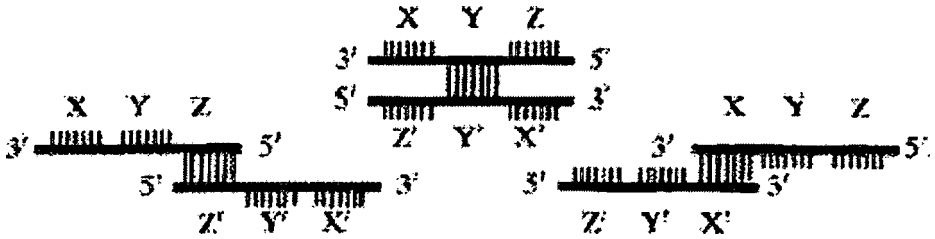
, und

eine zweite Sonde von besagtem Paar an Sonden drei oder mehr Nukleinsäureregionen umfasst, wobei besagte zweite Sonde zumindest eine Nukleinsäureregion Z', eine Nukleinsäureregion Y' und eine Nukleinsäureregion X' umfasst und die folgende Struktur aufweist:



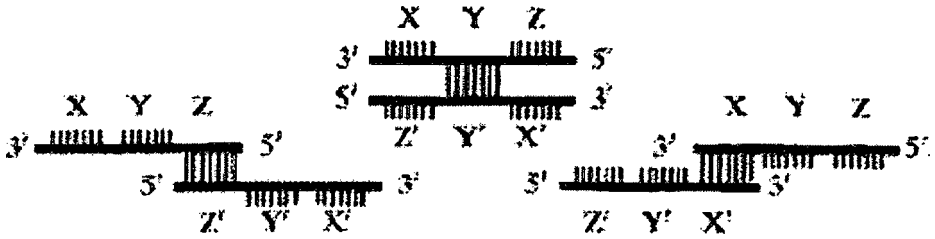
und,

wobei besagte Nukleinsäureregion X hybridisierbar ist mit besagter Nukleinsäure X', besagter Nukleinsäureregion Y hybridisierbar ist mit besagter Nukleinsäureregion Y' und besagter Nukleinsäureregion Z hybridisierbar ist mit besagter Nukleinsäureregion Z', so dass besagtes Paar von Sonden eine der folgenden Strukturen ausbildet:



13. Das Paar von Sonden von Anspruch 12, wobei besagtes Paar von Sonden zwei DNA-Sonden, eine DNA-Sonde und eine RNA-Sonde, zwei RNA-Sonden, zwei PNA-Sonden, eine PNA-Sonde und eine DNA-Sonde oder eine PNA-Sonde und eine RNA-Sonde umfasst.

14. Ein Polymer, bestehend aus einer Vielzahl von Paaren von Sonden gemäß Anspruch 12, wobei besagte Vielzahl von Paaren von Sonden die folgenden Strukturen ausbilden:



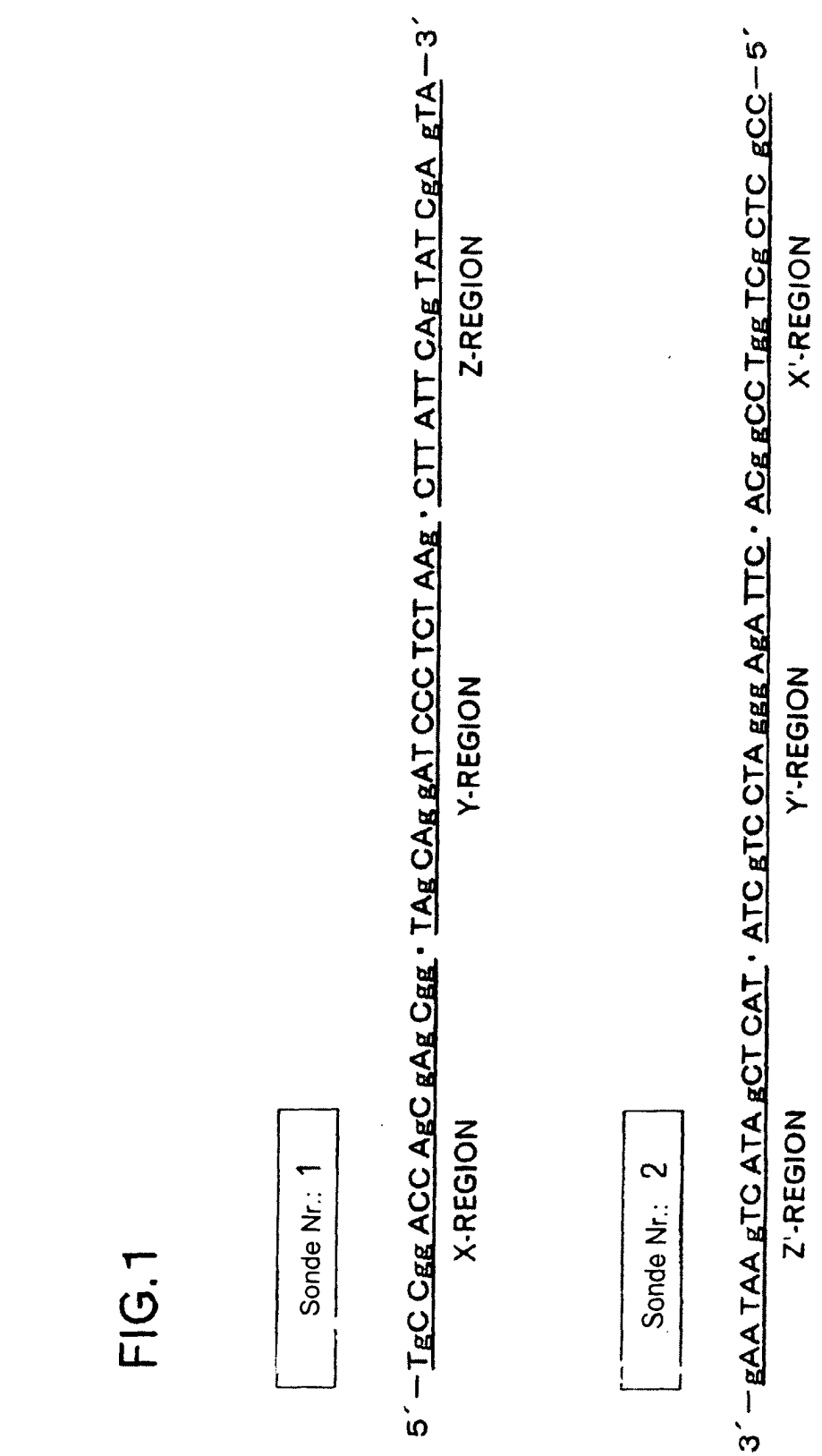
wobei die Strukturen aneinander alternierend gebunden sind, um besagtes Polymer auszubilden.

15. Das Polymer gemäß Anspruch 14, wobei besagtes Paar von Sonden zwei DNA-Sonden umfasst, eine DNA-Sonde und eine RNA-Sonde, zwei RNA-Sonden, zwei PNA-Sonden, eine PNA-Sonde und eine DNA-Sonde oder eine PNA-Sonde und eine RNA-Sonde.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG.1



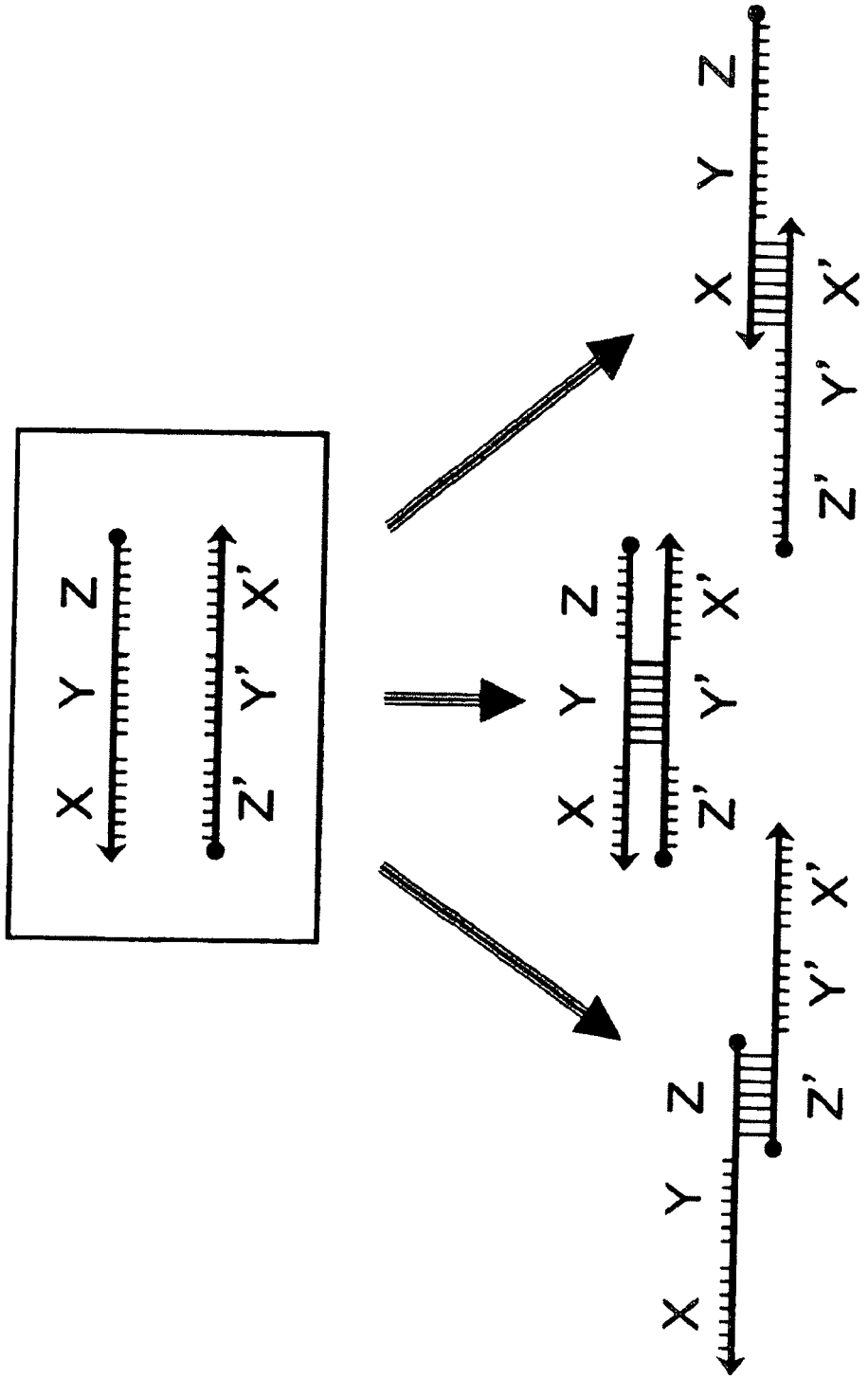


FIG.2

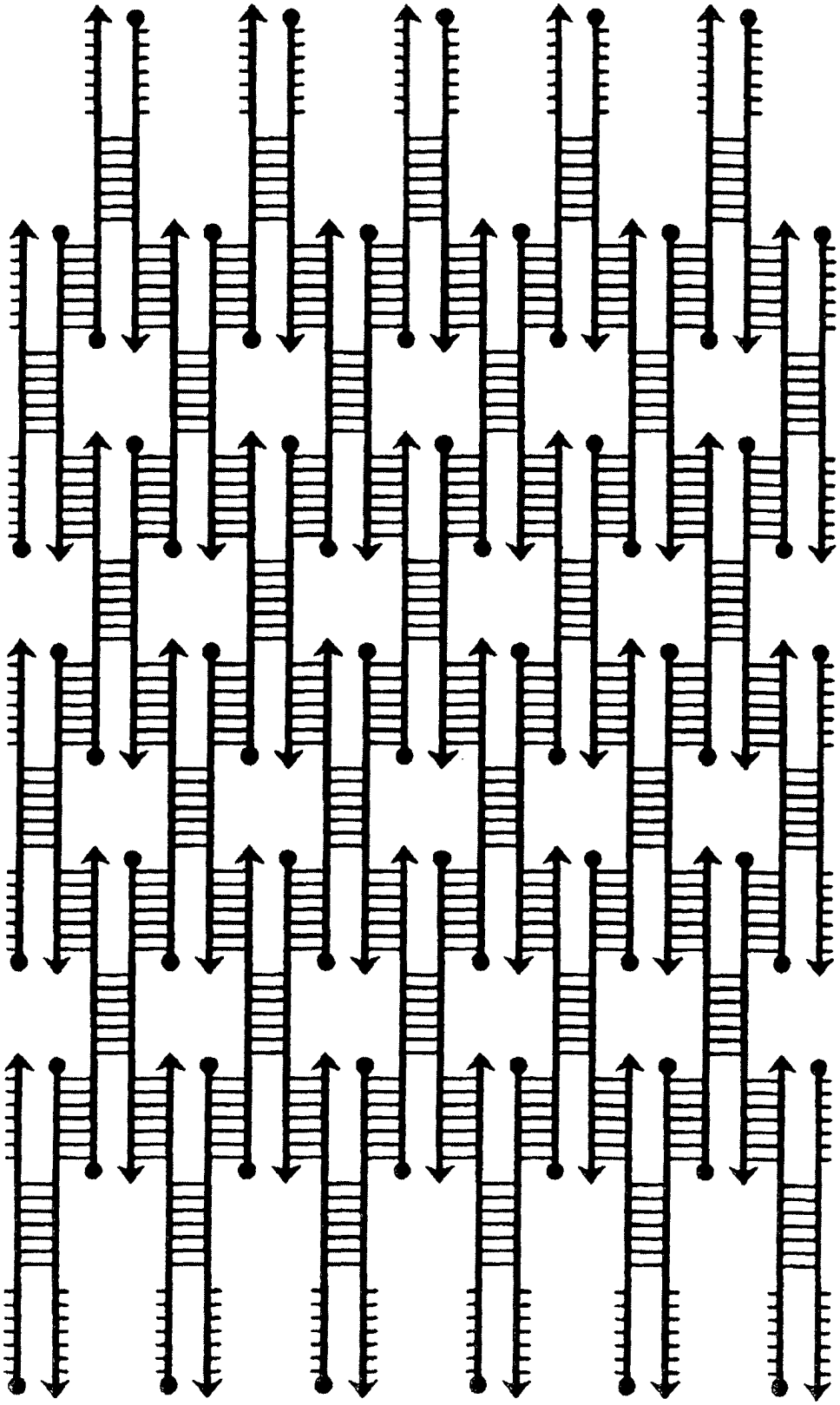


FIG.3

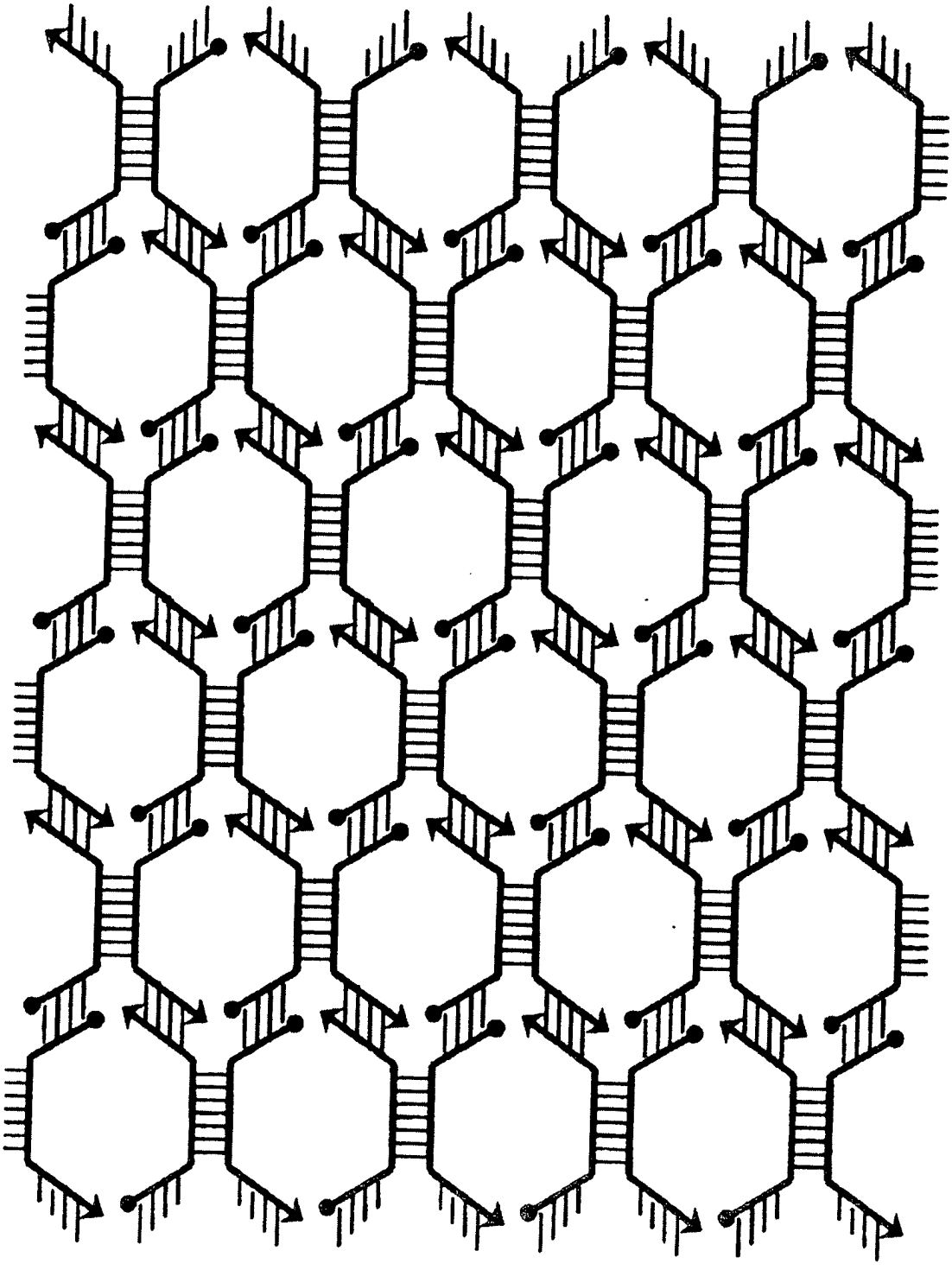


FIG.4

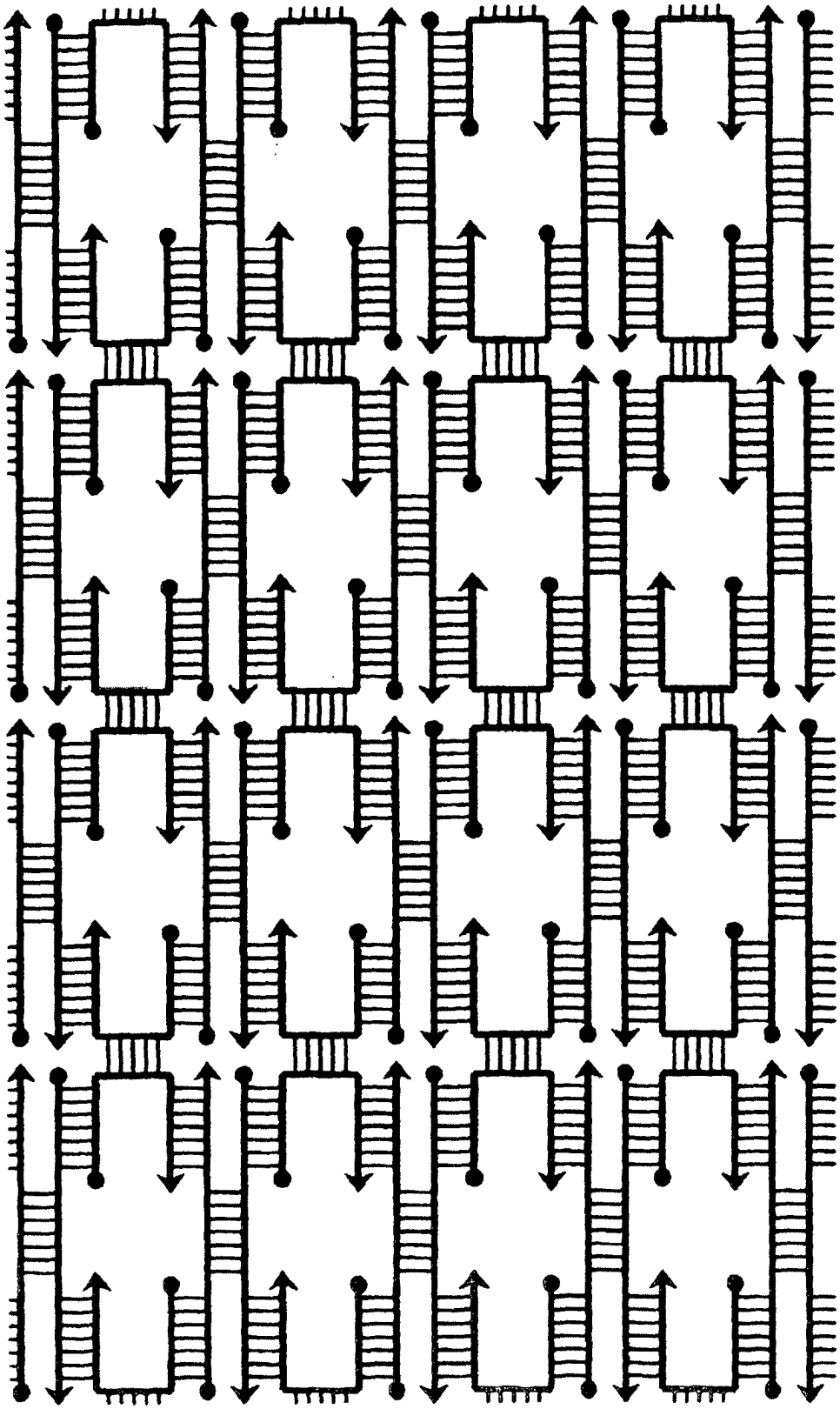


FIG.5

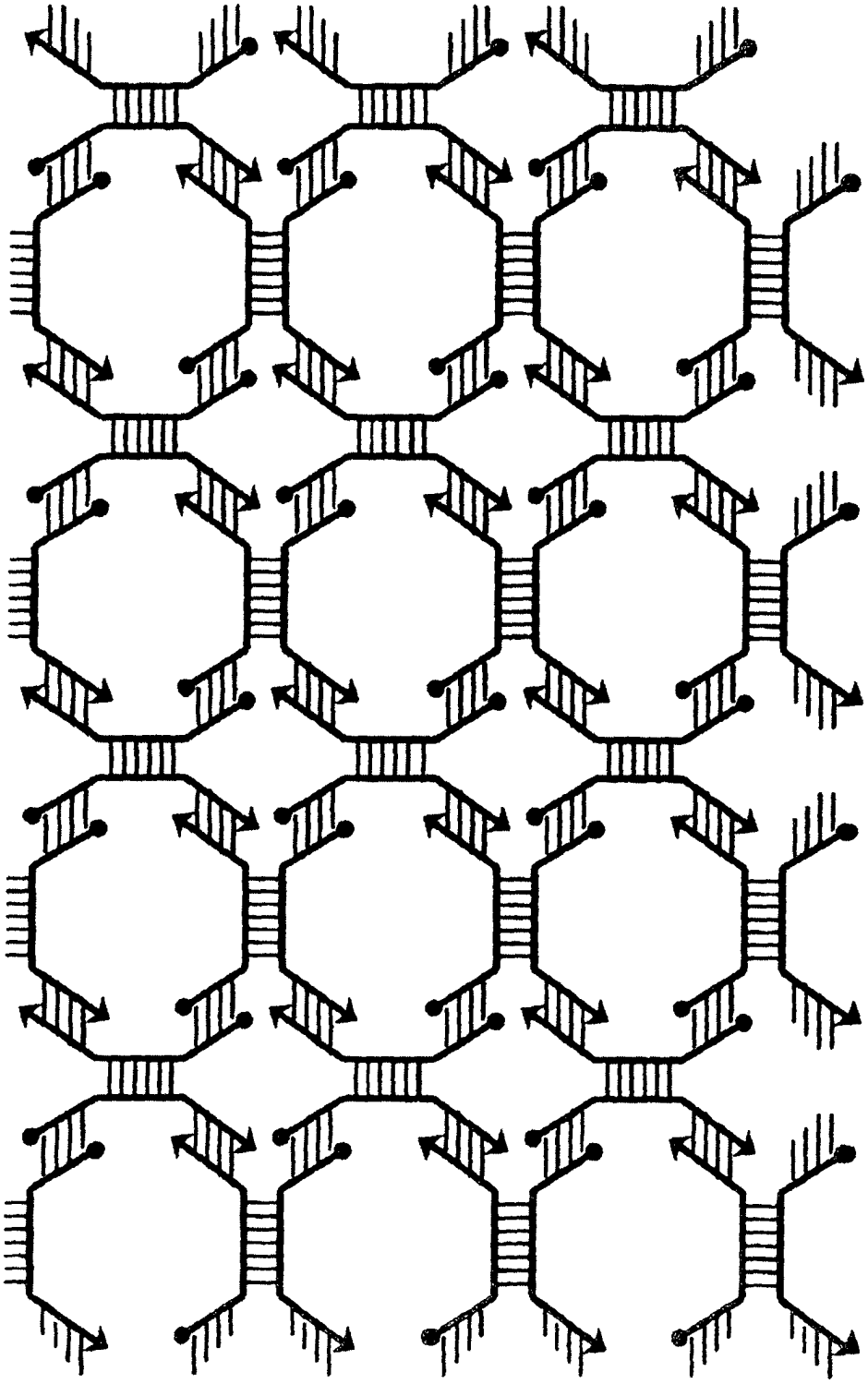


FIG.6

FIG.7

(Sonde Nr.: 3)

5'— TgC CgA CC gg CgA gCg · TAg CAT gg CC CTC TAg · CTT ATC gg CC TCg AgA — 3'

(Sonde Nr.: 4)

3'— gAA TAg CC gg AgC TCT · ATC gTA CC gg gAg ATC · ACg gCT gg CC gCT CgC — 5'

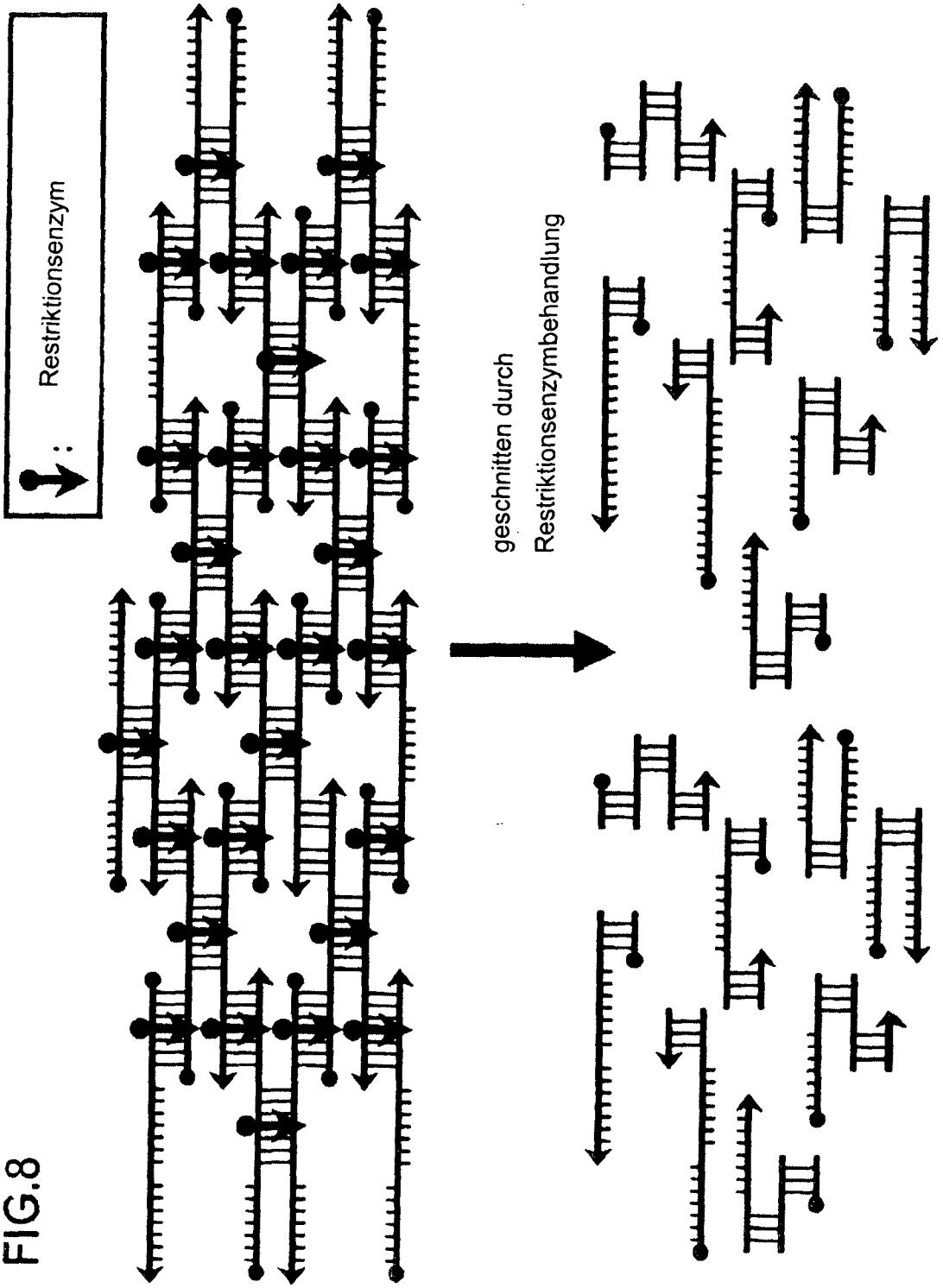

Restriktionsenzym
geschnitten durch
Restriktionsenzymbehandlung

FIG.8

FIG.9

(Sonde Nr.:5)

5-TgA CTT ACT TAA CCg gTA AAA CAT · AAg CAg gAT CCT CTA AgC CTg A · CgA AgT ACA gTC Cgg Tgg Tg-3

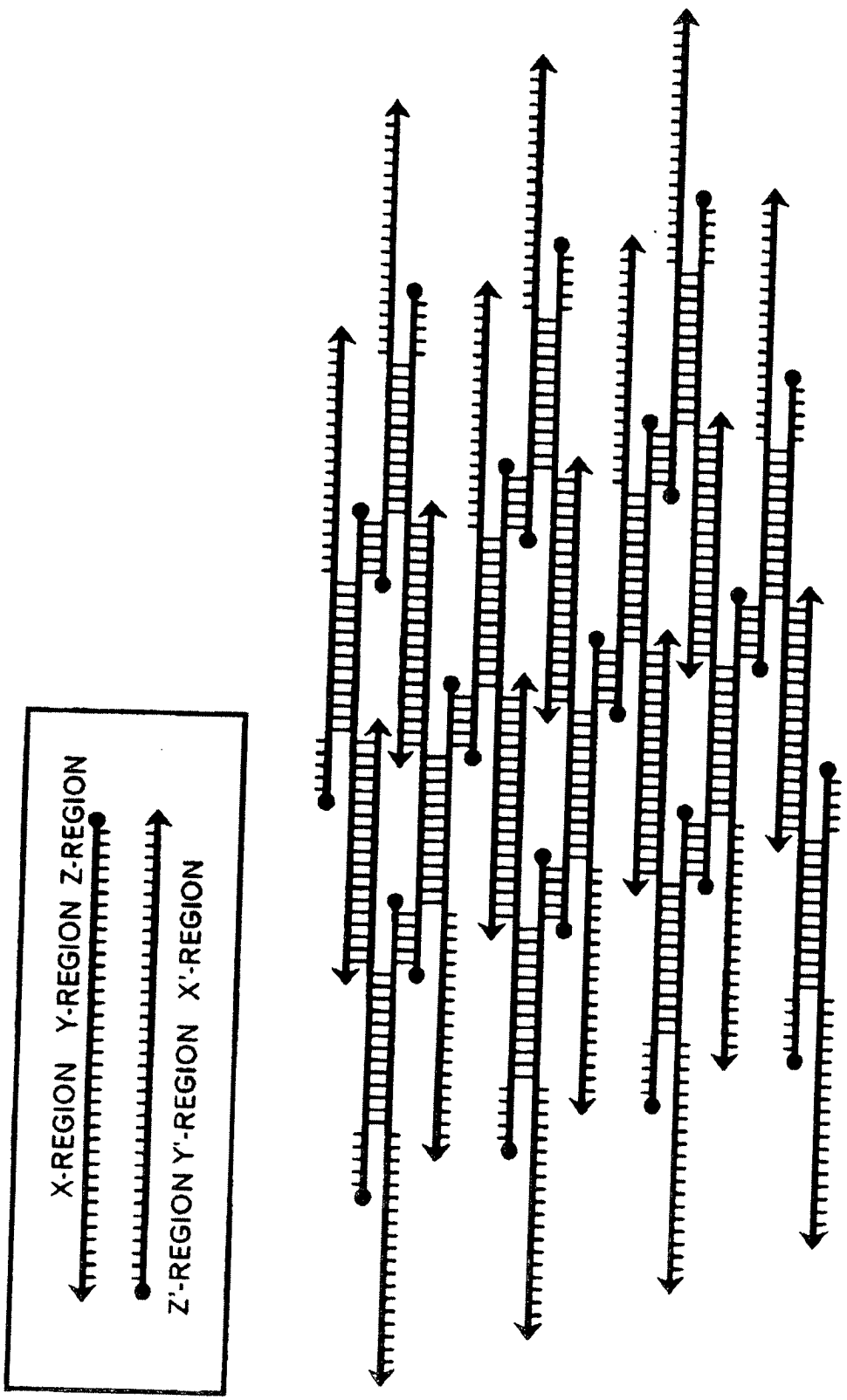
X-REGION (24 Basen) Y-REGION (22 Basen) Z-REGION (2 Basen)

(Sonde Nr.: 6)

3-gCT TCA TgT CAg gCC ACC AC · TTC gTC CTA ggA gAT TCg gAc T · ACT gAA TgA ATT ggC CAT TTT gTA-5

Z'-REGION (20 Basen) Y'-REGION (22 Basen) X'-REGION (24 Basen)

FIG.10



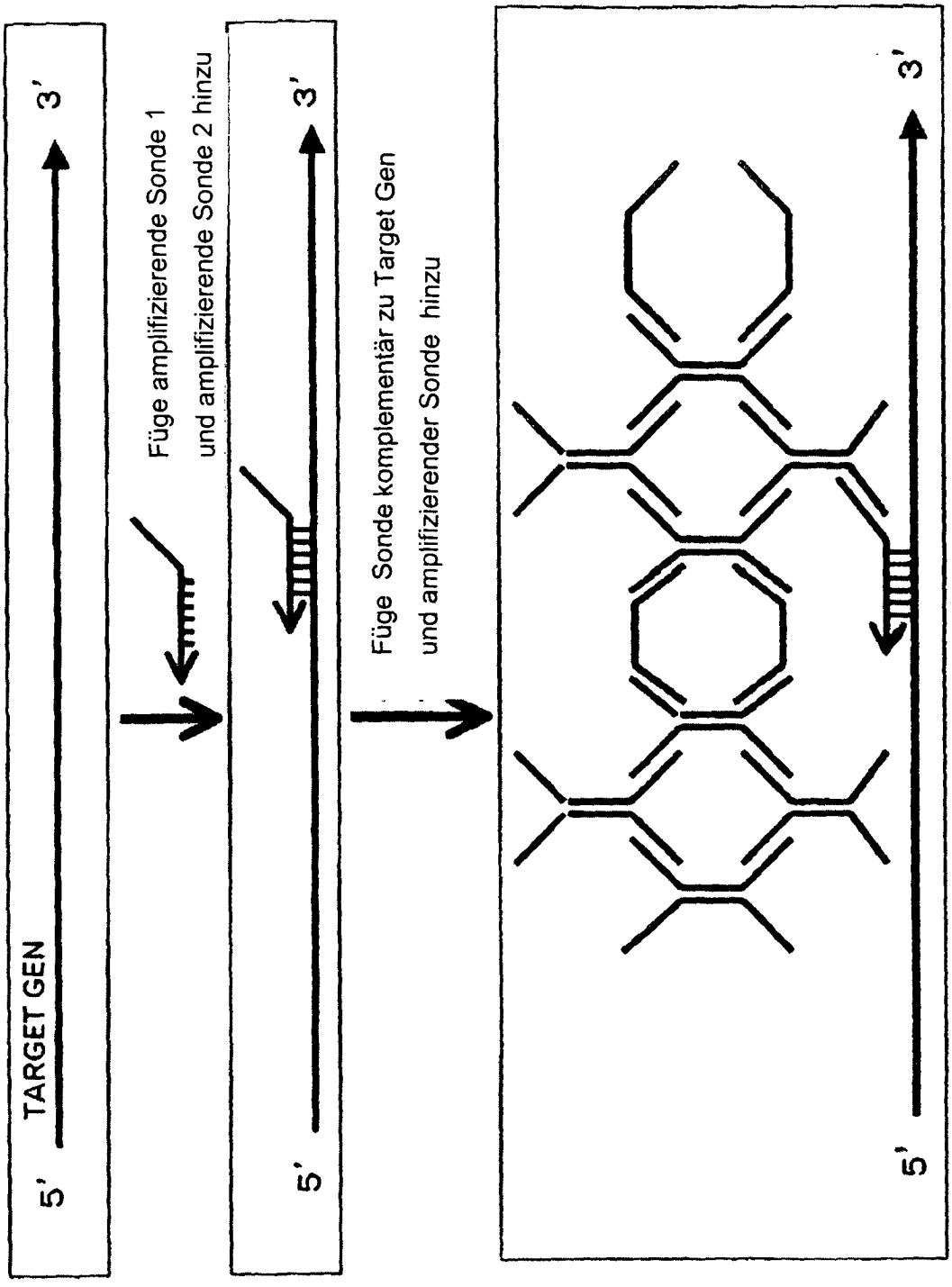

5'
TARGET GEN
3'
Füge amplifizierende Sonde 1
und amplifizierende Sonde 2 hinzu
5'
3'
Füge Sonde komplementär zu Target Gen
und amplifizierender Sonde hinzu
5'
3'

FIG.11

FIG.12

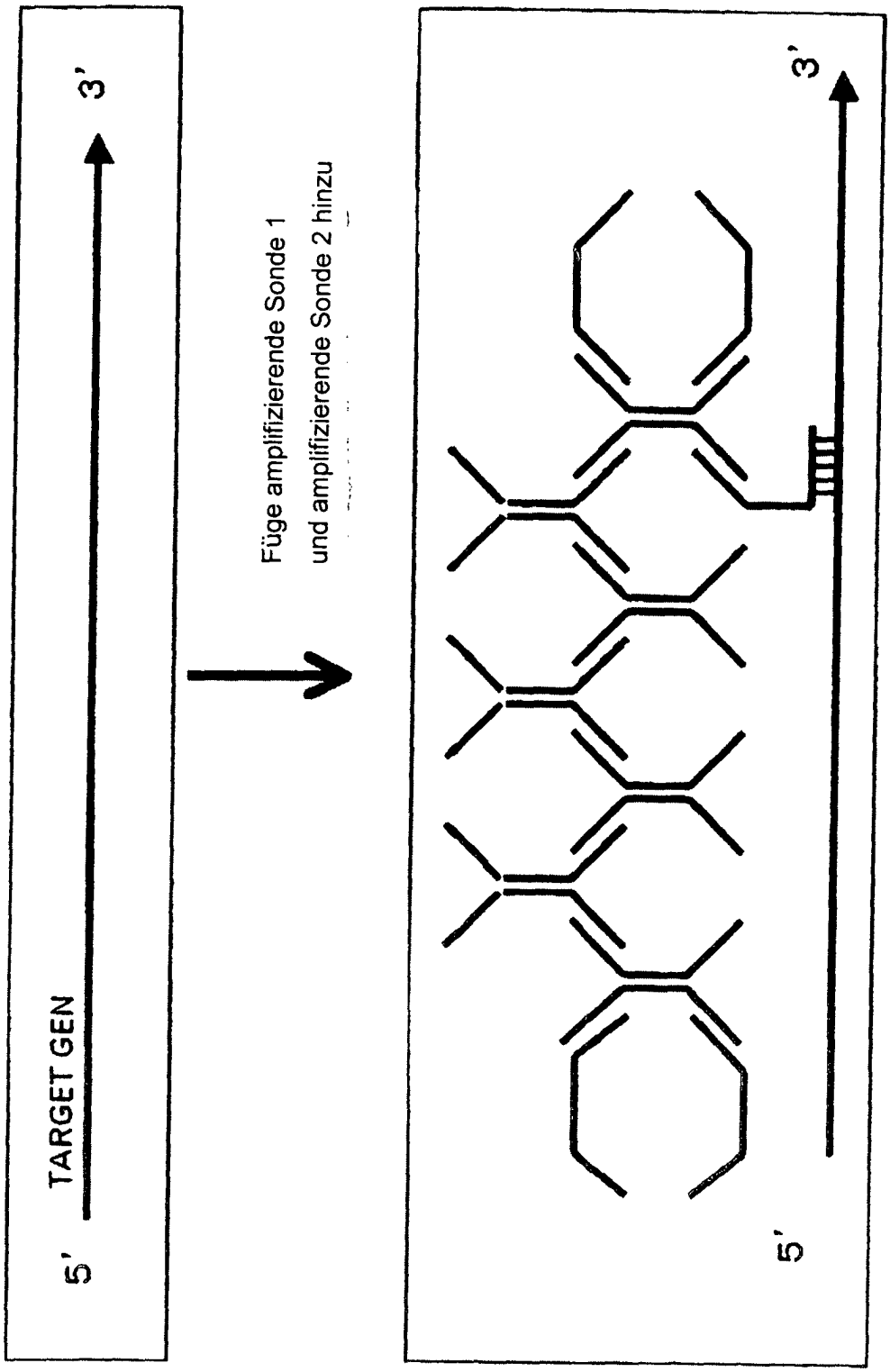

5'
TARGET GEN
3'
Füge amplifizierende Sonde 1
und amplifizierende Sonde 2 hinzu
3'
5'

FIG.13

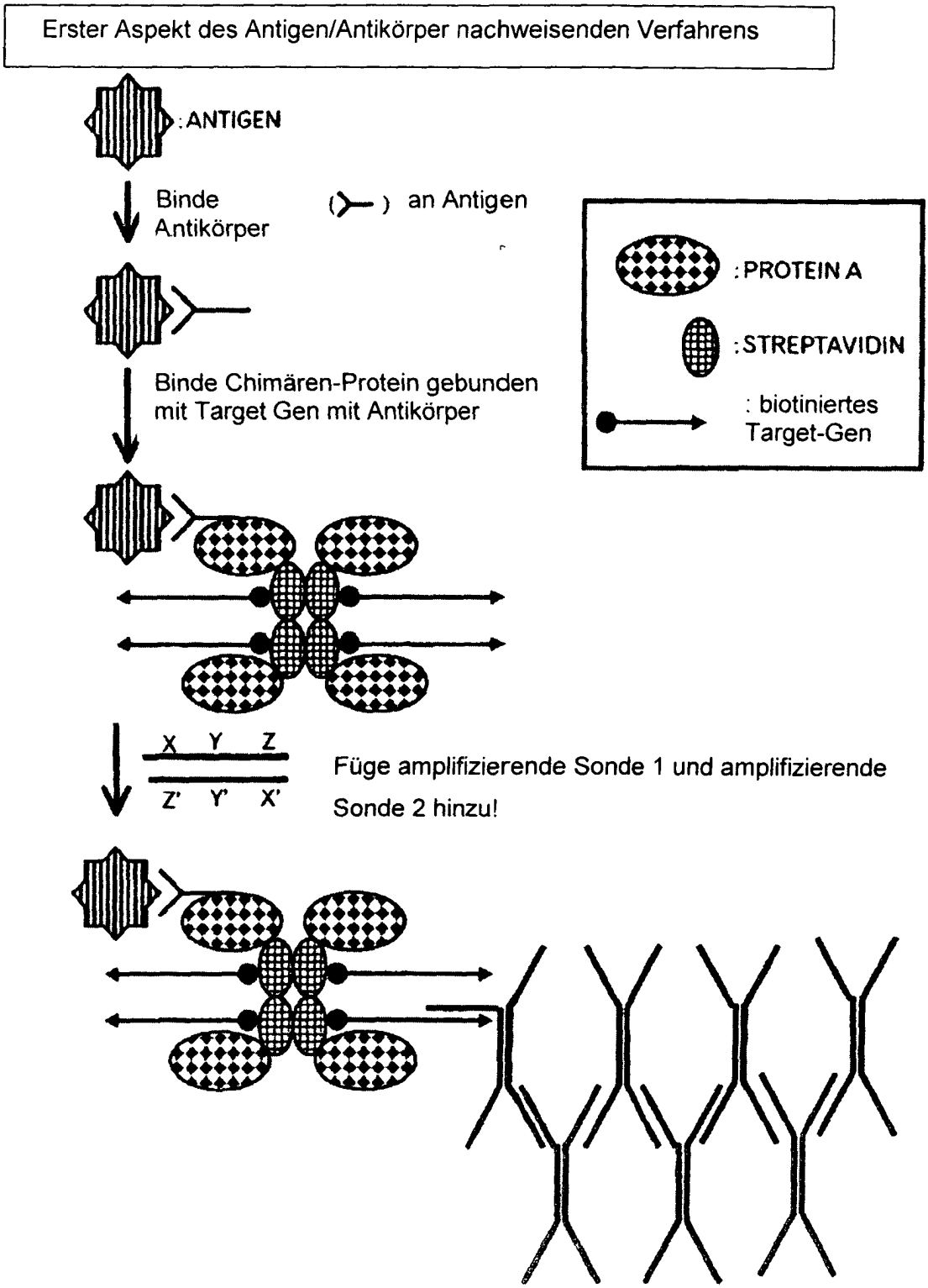
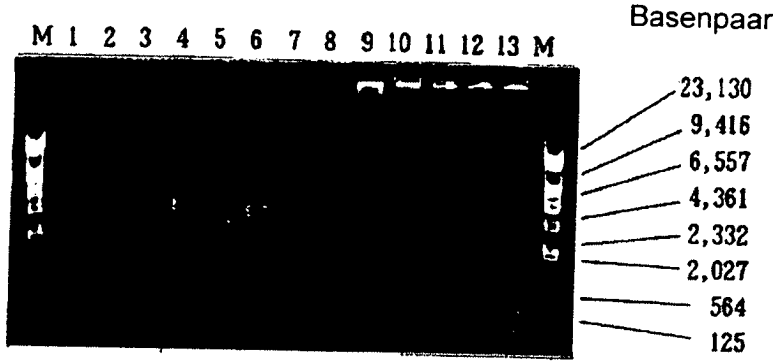

Erster Aspekt des Antigen/Antikörper nachweisenden Verfahrens
: ANTIGEN
Binde Antikörper
an Antigen
: PROTEIN A
: STREPTAVIDIN
: biotiniertes Target-Gen
Binde Chimären-Protein gebunden mit Target Gen mit Antikörper
X Y Z
Z' Y' X'
Füge amplifizierende Sonde 1 und amplifizierende Sonde 2 hinzu!

FIG. 14

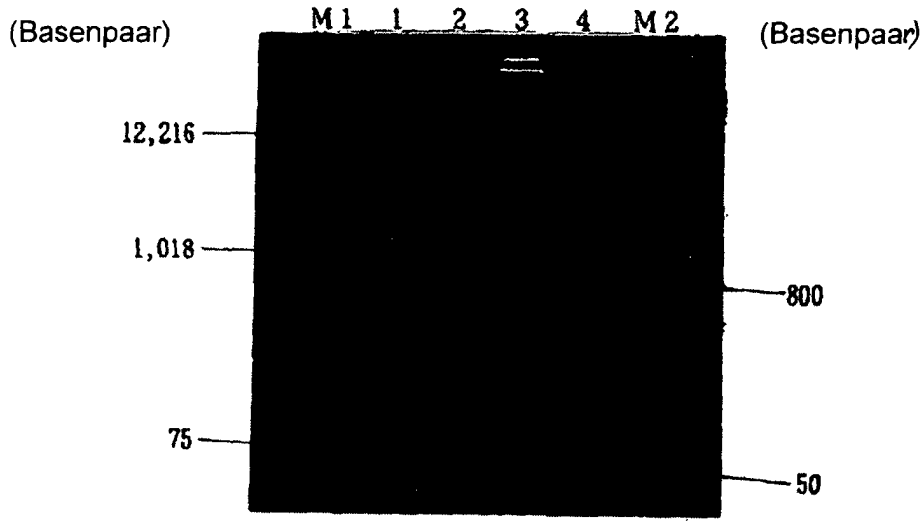


AGAROSE GEL KONZENTRATION: 0,5%

M: DNA GRÖßEN MARKER (λ Hind III digest)

1: GEN AMPLIFIZIERENDE SONDE 1 ALLEIN
2: GEN AMPLIFIZIERENDE SONDE 2 ALLEIN
3: PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 50°C
4: PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 52°C
5 PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 54°C
6: PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 56°C
7: PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 58°C
8 PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 60°C
9: PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 62°C
10: PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 64°C
11: PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 66°C
12: PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 68°C
13: PAAR VON GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN AMPLIFIZIERT BEI HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR VON 70°C

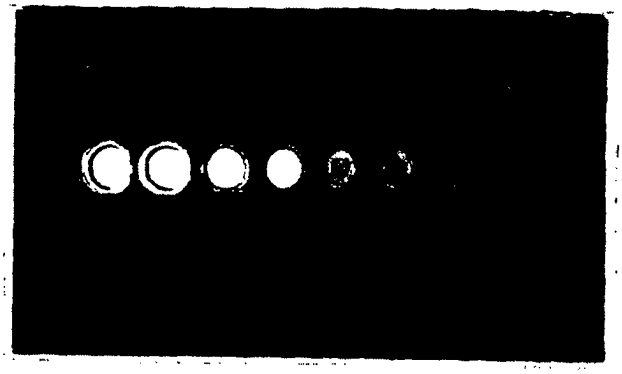
FIG. 15



AGAROSE GEL KONZENTRATION: 2.0%

M1: DNA GRÖßEN MARKER
M2: DNA GRÖßEN MARKER
1: GEN AMPLIFIZIERENDE SONDE 3 ALLEIN
2: GEN AMPLIFIZIERENDE SONDE 4 ALLEIN
3: PAAR VON AMPLIFIZIERTEN GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN
4: PAAR VON AMPLIFIZIERTEN GEN AMPLIFIZIERENDEN SONDEN GESCHNITTEN DURCH RESTRIKTIONSENZYM Hae III

FIG. 16



10^{2}	10^{1}	Ref.					
10^{10}	10^{9}	10^{8}	10^{7}	10^{6}	10^{5}	10^{4}	10^{3}
A	B	C	D	E	F	G	H

10^{10}～10^{1} : HCV－RNA Menge (Zahl der Kopien)