



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 603 17 315 T2 2008.08.21

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 490 682 B1

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/53** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 603 17 315.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US03/09604

(96) Europäisches Aktenzeichen: 03 745 653.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2003/083476

(86) PCT-Anmeldetag: 28.03.2003

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 09.10.2003

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 29.12.2004

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 07.11.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 21.08.2008

(30) Unionspriorität:

367703 P 28.03.2002 US

(73) Patentinhaber:

Marligen Biosciences, Inc., Ijamsville, Md., US

(74) Vertreter:

Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183
Wiesbaden

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR

(72) Erfinder:

CLAUSEN, Peter A., Ijamsville, MD 21754, US;
LAZAR, James G., Bethesda, MD 20817, US;
CARLSON, David P., Gaithersburg, MD 20886, US

(54) Bezeichnung: NACHWEIS VON DNA-BINDUNGSPROTEINEN

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

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

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG****Fachgebiet der Erfindung**

[0001] Die Erfindung stellt Zusammensetzungen und Verfahren zur Charakterisierung von Transkriptionsfaktoraktivität bereit. Insbesondere stellt die Erfindung Nukleinsäurekonstrukte bereit, die Proteinbindestellen enthalten, und Verfahren zum Detektieren und Messen der Bindung von Proteinen, und insbesondere Transkriptionsfaktoren, an die Bindestellen in diesen Konstrukten.

Stand der Technik und verwandte Techniken

[0002] Eukaryonten bestehen aus spezialisierten Zelltypen, die in Geweben und Organen organisiert sind. Unabhängig von Zelltyp und -funktion enthalten sämtliche Zellen innerhalb eines einzelnen eukaryontischen Organismus denselben Satz von Genen, den man als Genom bezeichnet. Unterschiede zwischen Zellen entstehen durch die differenzielle Expression von Genen. Die Expression einzelner Gene wird kontrolliert durch die Bindung von Proteinen an regulatorische Sequenzen von DNA im Genom, wie z. B. Promotoren und Repressor-Elemente. Proteinbindung an derartige Kontrollsequenzen kann einen Anstieg oder eine Abnahme in der Transkriptionsrate eines Gens verursachen. Diese DNA-Bindungsproteine, bezeichnet als Transkriptionsfaktoren, regulieren Gentranskription und kontrollieren dadurch sämtliche essenzielle Eigenschaften einer Zelle, einschließlich der zellulären Reproduktion, Entwicklung und Differenzierung, der Antwort auf Umweltreize und Gewebehomöostase im normalen und im Krankheitszustand. Transkriptionsfaktoren umfassen hunderte von spezialisierten Proteinen, die Genexpression regulieren, indem sie entweder das Enzym RNA-Polymerase bei der Initiation und Aufrechterhaltung der Transkription unterstützen oder hemmen.

[0003] Die Aktivierung oder Inhibition von regulatorischen Transkriptionsfaktoren findet als ein Downstream-Ereignis in Signaltransduktionskaskaden statt, die durch Störungen initiiert werden, wie z. B. eine Änderung des Oxidationszustands einer Zelle, oder die Bindung eines Liganden an seinen Zelloberflächenrezeptor. Im Fall von Zelloberflächenrezeptoren kann ein Ligandenbindungsereignis eine Signalkaskade auslösen, die sich auffächert, um mehrere Gene zu regulieren, die zu biologischen Antworten beisteuern. Crosstalk zwischen Signaltransduktionssystemen ist ebenfalls verbreitet, wobei disparate Stimuli viele derselben Proteinkinasen, Phosphatasen und Second-Messenger-Systeme nutzen. In hohem Maße verfeinerte Regulation von biologischen Antworten findet somit statt als Netze von interagierenden Signalsystemen, an denen Kinasen, Phosphatasen und Second Messenger beteiligt sind, die durch jeden Stimulus ausgelöst werden, und die in qualitativ und/oder quantitativ verschiedenen Sätzen von Transkriptionsfaktoraktivierungen kulminieren. Es ist geschätzt worden, dass es näherungsweise 1000 Transkriptionsfaktoren im humanen Genom gibt, welche die Spezifität beisteuern, um die unabhängige Expression von näherungsweise 40 000 Genen zu regulieren. Folglich können biologische Antworten, die durch Änderungen in der Genexpression gekennzeichnet sind, über verschiedene Signaturen von Transkriptionsfaktoraktivierung definiert werden. Transkriptionsfaktoren sind somit von bedeutendem Interesse als Angriffsziele, um spezifische einzelne oder globale Änderungen in der Genexpression zu bewirken.

[0004] Zelloberflächenrezeptoren sind ein primärer Fokus pharmazeutischer Forschung und umfassen die Mehrheit der therapeutischen Angriffsziele. Diese auf Rezeptoren abzielenden Strategien sind bei der Behandlung von Krankheiten und bei lebensverlängernden Maßnahmen erfolgreich gewesen, aber die meisten dieser Therapien leiden an einem Mangel an Spezifität. In der Mehrheit der Fälle sind Zelloberflächenrezeptoren multifunktionell. Zum Beispiel kann ein gegebener Rezeptor auf verschiedenen Zelltypen vorkommen und komplexe Netze von Signalkaskaden aktivieren, um mehrere biologische Antworten zu regulieren. Ein gut untersuchtes Beispiel für den multifunktionellen Charakter von Rezeptoren ist der Insulinrezeptor. Insulinrezeptoren sind in diversen Geweben weit verbreitet und aktivieren mehrere Second-Messenger-Systeme um direkt metabolische Antworten zu beeinflussen, die von der Glukosehomöostase bis zur Lipolyse, der Blutplättchenaggregation und, (wie) in jüngster Zeit (bekannt wurde), der Bildung des Gedächtnis reichen (1–3).

[0005] Die Folge einer multifunktionellen Rolle für einzelne Rezeptoren besteht darin, dass viele Arzneimittel, die heutzutage auf dem Markt sind, nachteilige Nebenwirkungen haben, die der Gesellschaft und der pharmazeutischen Industrie enorme Kosten abverlangen. Die Notwendigkeit, biologische Antworten auf potenzielle therapeutische Mittel besser zu bestimmen und den Charakter von potenziellen therapeutischen Mitteln vollständiger zu verstehen, hat ein großes Interesse für die Entwicklung und Anwendung von DNA-Microarrays zur vergleichenden Analyse von Genen geweckt.

[0006] Das Ergebnis von diesem Interesse sind viele Fortschritte und Erfolge unter Verwendung von Gen-chip-Technologie gewesen. Durch das Screening von zehntausenden von Genen auf DNA-Microarrays, sind Muster oder Profile von Genexpression, die bis zu mehrere hundert Gene umfassten, verwendet worden, um spezifische Krankheiten zu diagnostizieren und zu klassifizieren (5).

[0007] Dennoch hat es sich in vielen Fällen aufgrund der Komplexität der Krankheiten als schwierig herausgestellt, Profile der Genexpression zu erhalten, die das Verständnis des Krankheitsprozesses steigern.

[0008] Unter diesen Umständen kann die Charakterisierung von Transkriptionsfaktoraktivität eine alternative Möglichkeit bereitstellen, um Krankheiten zu diagnostizieren und zu klassifizieren. Im Gegensatz zu Ergebnissen, die durch die Charakterisierung der Genexpression von mRNA erhalten wurden, haben Berichte nachgewiesen, dass signifikante qualitative und quantitative Unterschiede in der Transkriptionsfaktoraktivität mit der Expression von krankheitsassoziierten Genen, die für den Ausbruch und den Verlauf von Infektionskrankheiten, Autoimmun-, inflammatorischen, neurologischen, Zirkulations- (14) und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (15, 17), Adipositas (18) und Krebs (15, 16, 19) verantwortlich sind, verbunden sind und diese möglicherweise kontrollieren. Es ist nachgewiesen worden, dass Transkriptionsfaktoren diagnostische (5) und prognostische (6) Anwendungen haben und es sind Transkriptionsfaktoren als Angriffsziele für therapeutische Intervention bei Krebs und inflammatorischen Erkrankungen (4) identifiziert worden. Leider ist der Fortschritt bei der auf Transkriptionsfaktoren abzielenden Therapie und bei transkriptionsfaktorbasierten diagnostischen und prognostischen Anwendungen langsam gewesen, aufgrund des Engpasses, der bei dem Screening einer großen Anzahl von Proben auf mehrere Transkriptionsfaktoren besteht. Zurzeit steht für die schnelle umfassende Charakterisierung der Aktivität von mehreren Transkriptionsfaktoren keine Technologie zur Verfügung.

[0009] Konventionelle Verfahren zum Detektieren und Messen von DNA-Bindungsproteinen, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, umfassen den Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)(24), Supershift-EMSA (25) und ELISA-basierte Methoden. Der EMSA, oder die Gel-Retentionsanalyse, stellt ein einfaches und schnelles Verfahren zum Detektieren von DNA-Bindungsproteinen, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, bereit und ist verbreitet angewendet worden. Der Assay basiert auf der Beobachtung, dass Komplexe aus Protein und DNA langsamer durch ein nicht denaturierendes Polyacrylamid-Gel wandern als freie DNA-Fragmente oder doppelsträngige Oligonukleotide. Der EMSA wird ausgeführt, indem man ein gereinigtes Protein oder ein komplexes Gemisch von Proteinen, (wie z. B. nukleäre oder Gesamtzellextrakt-Präparationen), mit einem markierten DNA-Fragment, das die mutmaßliche Proteinbindestelle enthält, inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden dann mittels Elektrophorese auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel analysiert. Die Spezifität des DNA-Bindungsproteins für die mutmaßliche Bindestelle wird ermittelt, indem man Kompositionsexperimente unter Verwendung von DNA-Fragmenten oder Oligonukleotiden, die eine Bindestelle für das Protein von Interesse enthalten, und anderen, nicht verwandten DNA-Sequenzen, durchführt. Gel-Retentionsanalysen verwenden typischerweise radioaktiv markierte DNA-Sonden, aber nicht radioaktive Markierungen, wie z. B. Biotin oder Fluoreszenzfarbstoffe können ebenfalls verwendet werden. Dieses Verfahren ist jedoch nicht für das schnelle Screening einer großen Anzahl von Proben oder mehreren Transkriptionsfaktoren gleichzeitig geeignet.

[0010] Der Supershift-EMSA ist eine Ergänzung zur Gel-Retentionsanalyse, der die spezifische Identifizierung des DNA-gebundenen Proteins unter Verwendung von spezifischen Antikörpern erlaubt. Der Supershift-EMSA wird ausgeführt, indem man ein gereinigtes Protein, oder ein komplexes Gemisch von Proteinen (wie z. B. nukleäre oder Gesamtzellextrakt-Präparationen) mit einem markierten oder unmarkierten DNA-Fragment, das die mutmaßliche Proteinbindestelle enthält, und einem Antikörper gegen das mutmaßliche Protein inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden dann mittels Elektrophorese auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel analysiert und der DNA-Protein-Antikörper-Komplex kann detektiert werden, indem man die Markierung auf der DNA detektiert, oder indem man einen Antikörper verwendet, um den Antikörper im DNA-Protein-Antikörper-Komplex zu detektieren. Wiederum wird die Spezifität des DNA-Bindungsproteins für die mutmaßliche Bindestelle durch Kompositionsexperimente unter Verwendung von DNA-Fragmenten oder Oligonukleotiden, die eine Bindestelle für das Protein von Interesse enthalten, und anderen, nicht verwandten DNA-Sequenzen, ermittelt. Der „Superkomplex“ von DNA-Protein-Antikörper hat eine signifikant reduzierte Mobilität im Vergleich zum DNA-Protein-Komplex, wenn er der Elektrophorese in nicht denaturierenden Gelen unterzogen wird. Obwohl nützlich für die Grundlagenforschung, sind Gel-Retentions- und Supershift-Analysen nicht quantitativ und können nur die Gegenwart oder Abwesenheit eines bestimmten DNA-Bindungsproteins detektieren.

[0011] Unlängst sind ELISA-Methoden für die Detektion von bekannten DNA-Bindungsproteinen erhältlich geworden (22). In diesen ELISA-Assays sind DNA-Fragmente, die eine mutmaßliche Proteinbindestelle enthalten, an eine feste Phase, wie z. B. die Böden der Vertiefungen (Wells) einer 96-Well-Polystyrenplatte, ge-

bunden. Die Probe, die ein gereinigtes Protein enthält, oder ein komplexes Gemisch von Proteinen (wie z. B. nukleäre oder Gesamtzellextrakt-Präparationen) wird in der Vertiefung inkubiert, welche das immobilisierte DNA-Fragment enthält, das die mutmaßliche Proteinbindestelle enthält. Die Vertiefung wird dann gewaschen, um sämtliche nicht gebundene Komponenten der Probe zu entfernen, und ein Antikörper, der spezifisch für das mutmaßliche, gebundene Protein ist, wird hinzugegeben. Die Bindung des Antikörpers wird unter Verwendung von Standard-ELISA-Methoden mit kolorimetrischer, fluoreszenter oder chemilumineszenter Detektion erreicht.

[0012] ELISA-Assays sind ungefähr 10-fach sensitiver als Gel-Retentionssassays und können für die Hochdurchsatzanalyse angepasst werden. Sie leiden jedoch an einem bedeutenden Nachteil, insofern als die zielproteinbindenden Sequenzen bekannt sein müssen, und Antikörper zur Detektion des gebundenen Proteins erhältlich sein müssen. Demnach sind sie auf Untersuchungen von Systemen begrenzt, die schon gut charakterisiert worden sind. Des Weiteren können diese Assays nicht gebündelt werden, und folglich macht das Probenvolumen, das benötigt wird, um ein Verzeichnis von DNA-bindenden Markern zu erhalten, den breiten Einsatz dieser Methode zum Erstellen von Profilen von DNA-Bindungsproteinen unmöglich.

[0013] Ein Multiplex-Transkriptionsfaktorassay, der auf einer Kombination aus Gel-Retentionssassay und DNA-Chip-Technologie basiert, ist ebenfalls vor kurzem beschrieben worden (23). In diesem Assay wird ein nukleäres Extrakt mit einem Pool von biotinmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotiden inkubiert. Die proteingebundenen Oligonukleotide werden einer Elektrophorese unterzogen, und der Anteil, der im Gel zurückgehalten wird, wird aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Die Sequenzen der Oligonukleotide werden dann durch Hybridisierung mit einem Membran-Array bestimmt. Obwohl diese Methode gebündelt ist und ein Transkriptionsfaktorprofil erstellen kann, beinhaltet sie mehrere Schritte und erfordert viele Manipulationen, die per Hand ausgeführt werden müssen, und ist folglich ungeeignet für Analysen mit moderatem oder hohem Durchsatz.

[0014] Es ist somit offenkundig, dass Zusammensetzungen und Verfahren, die eine simultane Detektion von mehreren DNA-Bindungsproteinen in einem Multiplex- oder Array-Format erlauben, und die Profile von DNA-Bindungsaktivität von Proteinen, insbesondere Transkriptionsfaktoren, bereitstellen, außerordentlich wünschenswert sind. Insbesondere ist es in hohem Maße wünschenswert, Assays zu entwickeln, welche die Detektion und die Messung von mehreren Protein-DNA-Bindungsereignissen in einer einzigen Probe erlauben.

[0015] Die vorliegende Erfindung stellt somit neue Zusammensetzungen und Analyse-Verfahren bereit, die eine spezifische Detektion von DNA-Bindungsproteinen erlauben. Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung eine wesentliche Verbesserung gegenüber dem vorbekannten Stand der Technik dar, insofern als sie einen quantitativen Output bereitstellt, ohne die Notwendigkeit für spezifische Antikörper oder Proteinbindungsreagenzien. Des Weiteren resultiert die vorliegende Erfindung nicht in der Freisetzung von löslichen Signalmolekülen, sodass die Detektion von DNA-Bindungsproteinen in einem Festphasen- oder Flüssigphasen-Array-Format ausgeführt werden kann, wodurch der Einsatz von Signalamplifikationsverfahren erleichtert wird, die nicht eingesetzt werden können, wenn ein lösliches Signal erzeugt wird.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0016] Folglich ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Verfahren und Zusammensetzungen zum Detektieren von sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen bereitzustellen.

[0017] Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, Verfahren für die simultane Detektion einer Mehrzahl von sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, bereitzustellen.

[0018] Gemäß dieser Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Detektieren von sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen bereitgestellt, das Folgendes umfasst: (a) das Inkontaktbringen eines Detektions-Duplex mit einer Probe, von der angenommen wird, dass sie mindestens ein sequenzspezifisches DNA-Bindungsprotein enthält, für eine Zeitdauer, die ausreichend ist, um eine sequenzspezifische Bindung zwischen dem besagten DNA-Bindungsprotein und dem Duplex zu erlauben; (b) das Inkontaktbringen des Gemisches aus Stufe (a) mit einem Spaltungsreagens, das zur Spaltung des Detektions-Duplex in der Lage ist, wobei die Spaltung des Detektions-Duplex durch Bindung des besagten DNA-Bindungsproteins an den Duplex gehemmt wird; und (c) dem Detektieren der Inhibition der Spaltung durch das DNA-Bindungsprotein. Das Spaltungsreagens kann ein sequenzspezifisches Spaltungsreagens sein, wie z. B. eine Restriktionsendonuklease, und der Detektions-Duplex kann die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease umfassen. Die Re-

striktionsendonuklease kann eine Typ II- oder Typ IIS-Restriktionsendonuklease sein, und die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease kann die Erkennungssequenz einer Typ I- beziehungsweise Typ IIS-Restriktionsendonuklease sein. Das Spaltungsreagens kann auch eine Exonuklease sein, der eine signifikante Endonukleaseaktivität fehlt.

[0019] Bei diesen Verfahren kann der Detektions-Duplex umfassen: (i) ein erstes Oligonukleotid, das eine Markierungssequenz umfasst und (ii) ein zweites Oligonukleotid, das komplementär zu dem ersten Oligonukleotid ist, wobei das zweite Oligonukleotid eine detektierbare Markierung umfasst. Der Detektions-Duplex kann außerdem eine Einfangmarkierung (Einfang-tag) umfassen. Der Detektions-Duplex kann vor dem Inkontaktbringen mit der Probe über die Einfangmarkierung auf einem festen Träger immobilisiert werden. Es kann eine Mehrzahl von Detektions-Duplexen verwendet werden, wobei jeder Detektions-Duplex eine Einfangmarkierung trägt, die das Einfangen des Duplex auf einer vorbestimmten Position auf einer festen Oberfläche erlaubt.

[0020] Gemäß einer weiteren Aufgabe der vorliegenden Erfindung, wird ein Verfahren zur Detektion von sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen bereitgestellt, das Folgendes umfasst: (a) das Inkontaktbringen einer Probe, von der angenommen wird, dass sie mindestens ein sequenzspezifisches DNA-Bindungsprotein enthält, mit einem Detektions-Duplex, für eine Zeitspanne, die ausreichend ist, um eine sequenzspezifische Bindung zwischen dem besagten Duplex und dem Bindungsprotein zu erlauben; und (b) die Detektion der Bindung zwischen dem Duplex und dem Bindungsprotein. Der Duplex kann vor oder nach Stufe (a) oder (b) auf einem festen Träger immobilisiert werden. Die Immobilisierung kann über eine Einfangmarkierung auf dem Duplex erfolgen. Die Detektion kann erzielt werden, in dem man die Proteinprobe vor dem Inkontaktbringen mit dem Duplex mit einer detektierbaren Markierung markiert. Die Detektion kann über ein Detektionsreagens erzielt werden, das spezifisch das besagte Bindungsprotein bindet, wie z. B. ein Antikörper. Bei diesem Verfahren kann der Detektions-Duplex markiert werden, und die Immobilisierungsstufe kann über das Einfangen des Bindungsproteins auf einer Oberfläche erzielt werden.

[0021] Gemäß eines weiteren Aspekts der Erfindung wird ein Verfahren zum Detektieren von sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen bereitgestellt, das Folgendes umfasst: (a) das Inkontaktbringen einer Einfang-Oberfläche mit einer Probe, von der angenommen wird, dass sie mindestens ein sequenzspezifisches DNA-Bindungsprotein enthält, für eine Zeitspanne, die ausreichend ist, um das Einfangen des besagten sequenzspezifischen Bindungsproteins auf der Einfang-Oberfläche zu erlauben, und (c) das Detektieren der Bindung zwischen dem Duplex und dem Bindungsprotein.

[0022] Die hier beschriebene Erfindung widmet sich dem nicht gedeckten Bedarf für einen Hochdurchsatz-Multiplex-Assay zur Charakterisierung von Transkriptionsfaktoraktivität. Die Erfindung stellt Vorteile gegenüber zurzeit erhältlichen Technologien zur Charakterisierung von Transkriptionsfaktoraktivität bereit.

[0023] Weitere Aufgaben, Eigenschaften, Aspekte, Anwendungen und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der detaillierten Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen ersichtlich werden, die folgt.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0024] [Fig. 1](#) zeigt Beispiele für Detektions-Duplexe. Alle Duplexe enthalten eine Proteinbindesequenz. Der Detektions-Duplex kann vollständig doppelsträngig sein, oder kann teilweise einzelsträngig sein und teilweise doppelsträngig sein, und kann Gaps (Lücken) und Einzelstrangbrüche enthalten. Der Detektions-Duplex kann aus einem oder mehreren Oligonukleotiden aufgebaut sein und kann ein oder mehrere mit sich selbst hybridisierende Regionen umfassen, die Haarnadel-Strukturen ausbilden. Der Detektions-Duplex kann eine beliebige Kombination von natürlichen und nicht natürlichen Nukleotiden enthalten und kann nicht natürliche Verknüpfungen zwischen den Nukleotiden enthalten. Der Detektions-Duplex kann eine oder mehrere detektierbare Markierungen umfassen und eine oder mehrere Bindungsgruppen. Der Detektions-Duplex kann auf einem Träger immobilisiert sein oder kann in der Lage sein, auf einem Träger immobilisiert zu werden durch eine Bindungsgruppe oder durch Hybridisierung von einem einzelsträngigen Abschnitt des Detektions-Duplexes mit einer komplementären Sequenz auf dem Träger. Der Detektions-Duplex kann auch beabsichtigte oder unbeabsichtigte Basen-Fehlpaarungen enthalten. Der Detektions-Duplex kann andere Einheiten, wie z. B. Peptide, Kohlenhydrate, und dergleichen, umfassen.

[0025] [Fig. 2](#) Eigenschaften von externen Spaltungsreagenzien. Diese Figur fasst die Eigenschaften von einigen der externen Spaltungsreagenzien der vorliegenden Erfindung zusammen. „Polarität“ beschreibt die Richtung des Verdaus. „Substrat“ beschreibt die Präferenz des Enzyms für einzelsträngige (ss) oder doppelsträngige (ds) DNA. „Struktur“ gibt die bestimmten Nukleinsäurestrukturen an, die mit jedem Enzym kompatibel

sind: „5'-PO₄“ gibt an, ob eine 5'-Phosphatgruppe für die Enzymaktivität erforderlich ist, oder nicht. „5'-Ü“ gibt an, ob das Enzym DNA mit einem 5'-Überhang verdauen wird, oder nicht, „3'-Ü“ gibt an, ob das Enzym DNA mit einem 3'-Überhang verdauen wird, oder nicht, „blunt“ gibt an, ob das Enzym Aktivität gegenüber glatten (blunt) Enden von DNA-Fragmenten aufweist und „nick“, gibt an, ob das Enzym an einem Einzelstrangbruch (nick) in doppelsträngiger DNA beginnend verdauen wird.

[0026] [Fig. 3](#) stellt die Detektion von Proteinbindung durch Schutz vor Spaltung durch sequenzspezifische Spaltungsreagenzien, insbesondere Typ II-Restriktionsendonukleasen, dar. Bei dieser Ausführungsform enthält der Detektions-Duplex innerhalb der Proteinbindesequenz eine Spaltungsstelle für eine Restriktionsendonuklease. Proben, die möglicherweise DNA-Bindungsproteine enthalten, werden mit den Duplexen gemischt, und DNA-Bindungsproteine, sofern vorhanden, binden an die Proteinbindesequenz. Anschließend wird eine Restriktionsendonuklease hinzu gegeben. Wenn Protein an die Proteinbindestelle gebunden hat, dann kann die Restriktionsendonuklease die doppelsträngige DNA nicht spalten, und die Markierung wird detektiert werden ([Fig. 3A](#)). Wenn kein Protein an die Proteinbindestelle gebunden hat, dann wird die Restriktionsendonuklease die DNA spalten und die detektierbare Markierung freisetzen, die ausgewaschen werden wird und nicht detektiert werden wird ([Fig. 3B](#)).

[0027] [Fig. 4](#). Diese Figur stellt die Detektion von Proteinbindung durch Schutz vor Spaltung durch sequenzspezifische Spaltungsreagenzien, insbesondere Typ IIS-Restriktionsendonukleasen, dar, die DNA in einem bestimmten Abstand von der Enzymbindestelle spalten. Bei dieser Ausführungsform enthalten die Detektions-Duplexe außerhalb der Proteinbindesequenz eine Bindestelle für die Zielsuche von Restriktionsendonukleasen. Proben, die möglicherweise DNA-Bindungsproteine enthalten, werden mit den Duplexen gemischt, und DNA-Bindungsproteine, sofern vorhanden, binden an die Proteinbindesequenz. Anschließend wird eine Typ IIS-Restriktionsendonuklease zu der Reaktion hinzu gegeben. Die Typ IS-Restriktionsendonuklease bindet an ihre spezifische Bindestelle im Duplex und versucht, den DNA-Strang in der Proteinbindesequenz zu spalten. Wenn Protein gebunden an die Proteinbindesequenz hat, dann wird die zielsuchende Restriktionsendonuklease nicht in der Lage sein, die doppelsträngige DNA zu spalten, und die Markierung wird detektiert werden ([Fig. 4A](#)). Wenn kein Protein an die Proteinbindesequenz gebunden hat, dann wird die Typ IS-Restriktionsendonuklease die DNA spalten und wird die detektierbare Markierung freisetzen, die ausgewaschen werden kann und nicht detektiert werden kann ([Fig. 4B](#)).

[0028] [Fig. 5](#). Diese Figur stellt die Detektion von Proteinbindung an DNA durch Schutz des Detektions-Duplex vor Verdau durch externe Spaltungsreagenzien dar. In diesem Beispiel ist der Detektions-Duplex an einen Träger gebunden. Das glatte Ende der doppelsträngigen DNA-Sequenz ist ein Substrat für Exonukleasen, die spezifisch sind für glatte Enden, wie z. B. die T7-Exonuklease und Exonuklease III. Eine detektierbare Markierung wird an den Detektions-Duplex, zwischen dem Träger und der Proteinbindesequenz, angefügt. Proben, die möglicherweise DNA-Bindungsproteine enthalten, werden mit den Duplexen gemischt und DNA-Bindungsproteine, sofern vorhanden, binden an die Proteinbindesequenz. Anschließend wird eine für glatte Enden spezifische Exonuklease hinzu gegeben. Wenn kein Protein an die Proteinbindesequenz gebunden hat, dann ist die Exonuklease frei, um den Detektions-Duplex in Richtung des Trägers zu verdauen. Bei diesem Prozess wird die detektierbare Markierung freigesetzt und wird nicht detektiert werden ([Fig. 5B](#)). Wenn Protein an die Proteinbindesequenz gebunden hat, dann wird die Exonuklease nicht in der Lage sein gebunden hat, dann wird die Exonuklease nicht in der Lage sein, den Detektions-Duplex jenseits der Bindestelle zu verdauen. Folglich wird die Markierung an den Detektions-Duplex und den Träger angebunden bleiben und wird detektiert werden ([Fig. 5A](#)).

[0029] [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) stellen die Detektion von Proteinbindung an einen Detektions-Duplex durch den Schutz einer Sonden-Einfangsequenz und die anschließende Detektion der Sonden-Einfangsequenz durch Hybridisieren mit einer detektierbaren Sonde dar. In diesem Beispiel ist der Detektions-Duplex an einen Träger gebunden. Der erste Strang der DNA ist kovalent am 3'-Ende an den Träger gebunden und ist am 5'-Ende mit einer Phosphatgruppe markiert. Der zweite DNA-Strang ist durch Hybridisierung an den ersten gebunden. Der Detektions-Duplex enthält eine Proteinbindesequenz und eine Sonden-Einfangsequenz, wobei die Sonden-Einfangsequenz sich zwischen dem Träger und der Proteinbindesequenz befindet. Die Sonden-Einfangsequenz ist so konstruiert, dass sie komplementär zu einer markierten Oligonukleotid- oder Nukleinsäure-Sonde ist. Die DNA wird mit einer Probe gemischt, und Proteine, sofern vorhanden, binden an die Proteinbindesequenz. Anschließend wird Lambda-Exonuklease zu der Reaktion hinzu gegeben. Die Lambda-Exonuklease verdaut spezifisch nur DNA-Stränge vom 5'-Ende her, die phosphoryliert sind. Wenn Protein an die Proteinbindesequenz gebunden hat, dann wird der DNA-Strang vor dem Verdau durch Lambda-Exonuklease geschützt sein ([Fig. 6](#)). Als Nächstes wird das Reaktionsgemisch hitzedenaturiert und gewaschen. Die Hitzenaturierung und das Waschen werden die Lambda-Exonuklease inaktivieren und entfernen, das Protein von

der Bindesequenz auf der DNA trennen, und die DNA-Stränge trennen, welche allesamt ausgewaschen werden. Der erste DNA-Strang, der die Sonden-Einfangsequenz enthält, bleibt an den Träger gebunden. Ein markiertes Oligonukleotid oder eine Nukleinsäure wird mit dieser Sondensequenz hybridisiert, um die Anwesenheit dieses Stranges zu detektieren. Alternativ kann die Proteinbindesequenz auch als Sonden-Einfangsequenz verwendet werden. Ein solches Format würde jedoch bei einem Multiplexformat für jede Protein-Einfangsequenz ein unterschiedliches markiertes Oligonukleotid erfordern, während die Anordnung mit einer separaten Sonden-Einfangssequenz so konstruiert werden kann, dass jede Sonden-Einfangssequenz dieselbe ist, während sämtliche Proteinbindesequenzen verschieden seien können.

[0030] Wenn kein Protein an die Proteinbindesequenz gebunden hat, ([Fig. 7](#)), dann wird die Lambda-Exonuklease den ersten DNA-Strang bis auf den Träger herab verdauen und der zweite DNA-Strang, der mit dem ersten Strang hybridisiert war, wird freigesetzt werden, da es keinen komplementären Strang mehr gibt, mit dem er hybridisieren könnte. Wenn das Gemisch hitzedenaturiert und gewaschen wird, werden der zweite DNA-Strang und der verdaute erste Strang beide ausgewaschen und lassen nichts zurück, woran das markierte Oligonukleotid oder die markierte Nukleinsäure binden könnten. Demzufolge wird keine Markierung detektiert werden.

[0031] [Fig. 8](#) Diese Figur stellt die Detektion von Proteinbindung an DNA durch die Bindung von markierten Proteinen an einen Detektions-Duplex dar. In diesem Beispiel werden die Komponenten der Probe mit einer reaktiven Gruppe, wie z. B. N-Hydroxysuccinimid-Derivaten von Biotin oder Fluoreszenzfarbstoffen wie z. B. Cy3 oder Cy5 (Amersham Biosciences), markiert. Nach dem Markieren werden die markierten Proteine in Kontakt mit dem Detektions-Duplex auf einem Träger gebracht. Nachdem ungebundenes Material ausgewaschen wurde, werden Proteine, die an die Proteinbindesequenz auf dem Detektions-Duplex binden, über die Markierung detektiert, die jetzt an den Träger gebunden ist. Alternativ können die markierten Proteine in Lösung mit dem Detektions-Duplex in Kontakt gebracht werden, und der Detektions-Duplex kann anschließend auf einem Träger eingefangen werden.

[0032] [Fig. 9](#). Diese Figur stellt die Detektion von Proteinbindung an Detektions-Duplex durch die Verwendung von Detektionsreagenzien zum Detektieren der an den Detektions-Duplex gebundenen Proteine dar. In diesem Beispiel lässt man die Probe direkt mit einem immobilisierten Detektions-Duplex reagieren und erlaubt Proteinen an die Proteinbindesequenz zu binden. Die gebundenen Proteine werden anschließend mit einem Detektionsreagens detektiert, das bestehen kann aus, zum Beispiel, Antikörpern, die gegen spezifische Proteine gerichtet sind, Antikörpern, die gegen allgemeine Klassen von Proteinen gerichtete sind, Antikörpern, die gegen spezifische biochemische Motive, wie z. B. Phosphotyrosinreste, gerichtet sind, oder ein Gemisch von Antikörpern gegen viele Proteine, Klassen oder Motive. Alternativ können die gebundenen Proteine mit anderen Biochemikalien detektiert werden, wie z. B. Proteinen, die als SH2-Domänen-Proteine bekannt sind, oder anderen rekombinanten oder synthetischen Protein-Aminosäuren, die an die Proteine binden, die an die DNA gebunden sind. Alternativ können chemische Färbemittel verwendet werden, um die an die DNA gebundenen Proteine zu detektieren. Derartige Färbemittel können die Farbe wechseln, wenn sie an bestimmte Arten von Proteinen gebunden sind, oder es kann die Bindung des Färbemittels an bestimmte Arten von Proteinen einen Wechsel von einem nicht fluoreszierenden Zustand in eine fluoreszierenden Zustand induzieren (das Phos-PhoQ-Proteinfärbemittel von Pierce, zum Beispiel, färbt nur phosphorylierte Proteine).

[0033] [Fig. 10](#) stellt die Detektion von Proteinbindung an Detektions-Duplex durch ein Einfangreagens dar. In diesem Beispiel wird ein markierter Detektions-Duplex zu der Probe hinzu gegeben und man lässt Proteine an den Detektions-Duplex binden. Protein-Duplex-Komplexe werden dann auf einem Träger eingefangen, der modifiziert wurde, sodass er ein Einfangreagens auf seiner Oberfläche umfasst. Nachdem die Komplexe eingefangen worden sind, wird die Markierung auf dem Detektions-Duplex detektiert. Bei diesem Format könnte das Einfangreagens, zum Beispiel, ein für das Protein spezifischer Antikörper sein.

[0034] [Fig. 11](#). [Fig. 11](#) stellt die Detektion von Proteinbindung an Detektions-Duplex durch ein Einfangreagens dar. In diesem Beispiel wird ein markierter Detektions-Duplex zu der Probe hinzu gegeben und man lässt Proteine an den Detektions-Duplex binden. Dann wird ein erstes Einfangreagens hinzu gegeben, das an die Protein-Komponente der Protein-Duplex-Komplexe bindet. Diese ersten Einfangreagens-Protein-Duplex-Komplexe werden dann auf einem Träger eingefangen, der modifiziert wurde, sodass er ein zweites Einfangreagens auf der Oberfläche umfasst. Nachdem die Komplexe eingefangen worden sind, wird die Markierung auf dem Detektions-Duplex detektiert. Bei diesem Format könnte das erste Einfangreagens, zum Beispiel, ein polyklonaler Ziegen-Antikörper sein, der spezifisch für das Protein ist, und das zweite Einfangreagens könnte ein Antikörper-spezifisches Reagens sein, wie z. B. Protein G.

[0035] [Fig. 12](#) zeigt die Ergebnisse eines Experiments, das die Detektion von Proteinbindung an Detektions-Duplexen mit Detektionsreagenzien demonstriert. Ein Detektions-Duplex, der eine Einfangmarkierung enthält, wurde durch das Annealing von zwei Oligonukleotiden erzeugt. Der so gebildete Detektions-Duplex enthielt eine Bindestelle für NFκB-p50 und eine Einfangmarkierung. Der Detektions-Duplex wurde mit einer Auswahl von Konzentrationen des NFκB-p50-Proteins inkubiert und wurde dann auf Beads (Kügelchen) eingefangen durch Hybridisierung der Einfangmarkierung mit einem komplementären Oligonukleotid, das an das Bead gebunden war. Gebundenes Protein wurde unter Verwendung eines Kaninchen-Antikörpers gegen das NFκB-p50-Protein, gefolgt von einem phycoerythrinmarkierten Anti-Kaninchen-Antikörper, detektiert. Fluoreszenz-Signale auf den Beads wurden in einem Luminex 100-Durchflusszytometer gemessen.

[0036] [Fig. 13](#) zeigt die Detektion von NFκB-p50-DNA-Bindungsprotein durch Schutz des Detektions-Duplex vor Verdau durch das Typ IIS-Restriktionsenzym Fok I. In diesem Beispiel wurde ein Detektions-Duplex verwendet, der eine Einfangmarkierung, eine Markierung, eine Proteinbindestelle und eine Fok I-Bindestelle umfasste. Der Detektions-Duplex umfasste eine Fok I-Bindestelle und eine NFκB-p50-Bindestelle, dergestalt, dass das Fok I(-Enzym) die DNA innerhalb der p50-Bindestelle spalten würde. Eine Biotin-Markierung wurde bei der Synthese in den Detektions-Duplex eingebracht, sodass die Biotin-Markierung freigesetzt werden würde, wenn der Duplex durch Fok I gespalten werden würde. Der Detektions-Duplex wurde mit und ohne NFκB-Protein inkubiert. Fok I-Enzym wurde hinzu gegeben und man ließ es reagieren. Die Detektions-Duplexen wurden dann durch Hybridisierung der Einfangmarkierung mit komplementären Oligonukleotiden, die an die Beads gebunden waren, auf Beads eingefangen. Die Biotin-Markierung wurde mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat detektiert. Die Probe, die mit p50-Protein inkubiert wurde, erzeugte ein erhebliches Signal, während die Probe ohne p50-Protein fast gar kein Signal erzeugte, was darauf hinweist, dass die Bindung des p50-Proteins den Duplex vor dem Verdau durch das Fok I-Enzym schützte.

[0037] [Fig. 14](#). Detektion von NFκB-p50-Protein durch Schutz des Detektions-Duplex vor Verdau durch die Lambda-Exonuklease. In diesem Beispiel umfasste der Detektions-Duplex eine Proteinbindesequenz, eine Biotin-Markierung und eine 5'-Phosphatgruppe am 5'-Ende von einem der DNA-Stränge, die an Polystyren-Beads gekoppelt waren. Nach der Kopplung wurden die an Beads gekoppelten Detektions-Duplexe mit und ohne NFκB-p50-Protein inkubiert. Anschließend wurde Lambda-Exonuklease hinzu gegeben und inkubiert, um dem Enzym Zeit zu geben, den mit der 5'-Phosphatgruppe markierten DNA-Strang zu verdauen. Im Anschluss an den Verdau wurde Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat hinzu gegeben, um die Biotin-Markierung zu detektieren, die auf dem Detektions-Duplex verblieben war, der an die Beads gekoppelt war. In der Abwesenheit von p50-Protein wurde die Detektions-Markierung vollständig verdaut, während in der Gegenwart von p50-Protein ein Signal von näherungsweise 3600 Fluoreszenz-Einheiten gemessen wurde, was zeigt, dass p50 anhand seiner Fähigkeit, die Aktivität der Lambda-Exonuklease gegenüber einem Detektions-Duplex zu hemmen, detektiert werden konnte.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0038] Die Erfindung stellt Verfahren und Zusammensetzungen zum Detektieren und Identifizieren von sequenzspezifischen Nukleinsäure-Bindungsproteinen in einer Probe bereit. Die Probe kann eine beliebige Probe sein, wie z. B. ein Zell- oder Gewebeextrakt, von dem angenommen wird, dass er derartige Bindungsproteine enthält. Die Verfahren und Zusammensetzungen können zum Detektieren eines beliebigen Proteins verwendet werden, das in sequenzspezifischer Weise an Nukleinsäuren bindet. Beispiele für derartige Proteine umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, eukaryontische Transkriptionsfaktoren. Die Verfahren sind geeignet für die schnelle und sensitive Multiplex-Detektion von Nukleinsäure-Bindungsproteinen.

[0039] Die Verfahren umfassen entweder einen spaltungsbasierten Mechanismus oder einen auf einem Proteinerkennungselement basierten Mechanismus. Bei dem spaltungsbasierten Mechanismus wird ein markierter Detektions-Duplex mit einer Probe in Kontakt gebracht, von der angenommen wird, dass die ein sequenzspezifisches Nukleinsäure-Bindungsprotein enthält, dass an eine Sequenz innerhalb des Duplex binden wird. In allen Fällen, kann der Detektions-Duplex außerdem eine Gruppe enthalten, die das Einfangen des Duplex auf einem festen Träger oder einer festen Oberfläche erlaubt. Das Einfangen des Duplex kann vor oder nach dem Mischen mit der Probe stattfinden. Die Verwendung dieser Einfanggruppe erlaubt die Herstellung von Arrays zum Detektieren von mehreren Bindungsproteinen in einer Probe, d. h., es erlaubt das „Multiplexen“ der Methode.

[0040] Nach einer Zeitspanne, die ausreichend ist, die Bindung zwischen dem Duplex und jeglichen Proteinen in der Probe zu erlauben, wird der Duplex mit einem Spaltungsreagens behandelt. Wenn Protein an den Duplex gebunden ist, wird die Spaltung des Duplex durch das Spaltungsreagens gehemmt. In umgekehrter Weise

kann, wenn kein Protein gebunden ist, die Spaltung ablaufen. Der Duplex ist, in solch einer Weise markiert, dass die Gegenwart oder Abwesenheit einer Spaltung durch eine Änderung des Signals der Markierungsgruppe, die anfangs auf dem Duplex vorhanden ist, identifiziert werden kann. Diese Änderung des Signals zeigt dann nicht nur die Gegenwart oder Abwesenheit von Proteinbindung an den Duplex an, sondern es stellt die Änderung in der Größenordnung des Signals auch ein quantitatives Maß für die Menge der Proteinbindung bereit. Die Verfahren können unter Verwendung von bekannten Proben geeicht werden, und die Ergebnisse können außerdem mit Kontrollreaktionen verglichen werden.

[0041] Das Spaltungsreagens kann unspezifisch sein, wie z. B. eine Exonuklease, die einen oder beide Strände des Duplex von einem Ende aus spalten kann, oder kann sequenzspezifisch sein, wie z. B. eine Restriktionsendonuklease, die an den Duplex an einer spezifischen Stelle bindet und an dieser Stelle spaltet (d. h. eine Typ II-Restriktionsendonuklease) oder an einer bestimmten Stelle in einiger Entfernung von der spezifischen Stelle (d. h. eine Typ IIS-Restriktionsendonuklease). In jedem Fall hemmt die Gegenwart eines Bindungsproteins, wie z. B. eines Transkriptionsfaktors, der an den Duplex gebunden ist, sterisch die Spaltung des Duplex. Die Abwesenheit von Proteinbindung lässt die Spaltung stattfinden, und diese Spaltung setzt die Markierung aus dem Duplex frei.

[0042] Bei den Verfahren, die einen auf einem Proteinerkennungselement basierten Mechanismus verwenden, können die Proteine in einer Probe, von der angenommen wird, dass sie ein Bindungsprotein enthält, vor dem Kontakt mit dem Detektions-Duplex markiert werden, wobei in diesem Fall das Bindungsprotein selbst als das Erkennungselement fungiert, oder das Bindungsprotein wird, vor oder nach der Bindung an den Detektions-Duplex, spezifisch an ein Reagens gebunden, wie z. B. einen Antikörper oder ein anderes spezifisches Erkennungselement. Wenn das Bindungsprotein vor dem Mischen mit dem Detektions-Duplex an ein Reagens gebunden ist, kann der Duplex selbst direkt markiert werden, um die Detektion der Bindung zu erleichtern. Die Detektion der Markierung kann durch direkte Beobachtung erfolgen oder kann durch eine sekundäre Detektion erleichtert werden. Zum Beispiel könnte eine sekundäre Detektion erzielt werden, durch Behandlung mit einem Spaltungsreagens, dass eine Markierung freigesetzt. Die Spaltung kann nur stattfinden, wenn der Detektions-Duplex vorhanden ist, was seinerseits nur stattfinden kann, wenn der Duplex an ein spezifisches Bindungsprotein gebunden ist.

Definitionen

Protein oder DNA-Bindungsprotein

[0043] Wie hier verwendet, bezeichnet „Protein“ und „DNA-Bindungsprotein“ ein beliebiges Peptid, Polypeptid, oder einen Peptid enthaltenden Stoff oder Komplex, der spezifisch an eine bestimmte Nukleinsäuresequenz binden kann. Das DNA-Bindungsprotein kann ein Komplex von zwei oder mehr einzelnen Molekülen sein. Derartige Komplexe werden für gewöhnlich als „Homodimere“, „Heterodimere“, „Homotypische Komplexe“ und „Heterotypische Komplexe“ bezeichnet. Derartige Komplexe bestehen aus einer beliebigen Anzahl von einzelnen Einheiten, die durch kovalente Bindungen oder nicht kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Das DNA-Bindungsprotein kann natürlich oder synthetisch sein und es ist nicht erforderlich, dass es in einer bestimmten Form vorliegt. Beispiele für wohlbekannte DNA-Bindungsproteine umfassen AP-1, Jun, Fos, CREB, ATF-1, Myc, Max, NF-kappa B, PPARy und Ubx. Nukleinsäure-Bindungsproteine aller Arten, wie z. B. Polymerasen, Proteine des Telomerase-Komplexes, Gyrase und Splicing-Proteine, sind ebenfalls in dieser Definition eingeschlossen.

Probe

[0044] Wie hier verwendet, bezeichnet „Probe“ ein beliebiges Material, dass ein DNA-Bindungsprotein enthalten könnte, einschließlich, aber nicht beschränkt auf menschliche und tierische Gewebe, kultivierte Zellen, kultivierte oder natürlicherweise auftretende Mikroorganismen, Körperflüssigkeiten, Blut, Serum, und dergleichen. Die Probe muss nicht ausschließlich das biologische Material enthalten. Die Probe kann auch aus einem DNA-Bindungsprotein enthaltenden Material auf oder in einer physikalischen Matrix bestehen.

Detektions-Duplex

[0045] Wie hier verwendet, bezeichnet „Detektions-Duplex“ ein DNA-Molekül, das eine doppelsträngige Region enthält, die eine Proteinbindestelle umfasst. Der Detektions-Duplex kann teilweise einzelsträngig und partiell doppelsträngig sein und kann Gaps (Lücken) und Einzelstrangbrüche enthalten. Der Detektions-Duplex kann aus einem oder mehreren Oligonukleotiden aufgebaut sein und kann ein oder mehrere mit sich selbst

hybridisierende Regionen umfassen, die Haarnadel-Strukturen ausbilden. Der Detektions-Duplex kann eine beliebige Kombination von natürlichen und nicht natürlichen Nukleotiden enthalten und kann nicht natürliche Verknüpfungen zwischen den Nukleotiden enthalten. Der Detektions-Duplex kann ein oder mehrere detektierbare Markierungen umfassen. Der Detektions-Duplex kann eine oder mehrere Bindungsgruppen umfassen. Der Detektions-Duplex kann eine oder mehrere Modifikationen umfassen, welche die Stabilisierung von einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA beeinflussen. Derartige Modifikationen können invertierte ,T'-Reste, thiolierte Reste, Peptid-Nukleinsäure-Verknüpfungen, Chimären aus RNA und DNA, und dergleichen umfassen. Der Detektions-Duplex kann auf einem Träger immobilisiert werden, oder kann in der Lage sein, auf einem Träger immobilisiert zu werden durch eine Bindungsgruppe oder durch Hybridisierung eines einzelsträngigen Abschnitts des Detektions-Duplex mit einer komplementären Sequenz auf dem Träger. Der Detektions-Duplex kann auch beabsichtigte oder unbeabsichtigte Basenfehlpaarungen enthalten. Beispiele für Detektions-Duplex sind in [Fig. 1](#) gezeigt. Der Fachmann wird erkennen, dass eine große Auswahl von geeigneten Detektions-Duplexen in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, und dass die in [Fig. 1](#) dargestellten Beispiele nicht beschränkend für die vorliegende Erfindung sein sollen.

Einfang-Markierung

[0046] Wie hier verwendet, bezeichnet „Einfang-Markierung“ eine Sequenz in dem Detektions-Duplex, die verwendet werden kann, um den Duplex auf einem Träger einzufangen.

Bindungsgruppe

[0047] Wie hier verwendet, ist eine „Bindungsgruppe“ eine chemische oder biochemische Gruppe, die verwendet werden kann, um einen Stoff, wie z. B. DNA oder Protein, an einen festen Träger anzufügen. Die Bindungsgruppe kann eine nicht kovalente Bindung, eine reversible kovalente Bindung oder eine irreversible kovalente Bindung zwischen dem Stoff und dem festen Träger ausbilden. Beispiele für chemische Bindungsgruppen umfassen die Aldehydgruppe (CHO) und die Aminogruppe (-NH₂), die verwendet werden können, um den Stoff chemisch an den festen Träger zu binden unter Verwendung von Methoden, die im Fachgebiet wohlbekannt sind. Der Fachmann wird erkennen, dass andere geeignete Bindungsgruppen im Fachgebiet bekannt sind und in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Beispiele von biochemischen Gruppen umfassen Biotin, IgG und DNA. Ein Stoff, der mit Biotin markiert ist, wird starke nicht kovalente Bindungen mit einem avidinbeschichteten Träger ausbilden. IgG wird an einen festen Träger binden, der mit Protein G beschichtet ist, und DNA wird an einen festen Träger binden, der mit einer komplementären RNA- oder DNA-Sequenz beschichtet ist. Andere derartige Bindungs-Wechselwirkungen, die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind im Fachgebiet bekannt.

Detektionsreagens

[0048] Wie hier verwendet, ist ein „Detektionsreagens“ eine detektierbare Einheit, die in der Lage ist, an eine zweite Einheit zu binden, um die Detektion der zweiten Einheit direkt oder indirekt zu ermöglichen. Detektionsreagenzien können Nukleinsäuren, Proteine oder Peptide oder andere Biomoleküle sein, die eine Markierung umfassen können, oder nicht. Beispiele für Detektionsreagenzien umfassen Peptide, Oligonukleotide, monoklonale und polyklonale Antikörper, Antikörperfragmente, Lektine, Färbemittel, Farbstoffe, und dergleichen und chimäre Formen von diesen Einheiten. Detektionsreagenzien, die nicht direkt detektierbar sind, können eine Markierung umfassen oder können durch ein sekundäres Detektionsreagens, das eine Markierung umfasst, detektiert werden. Zum Beispiel können Antikörper mit markiertem Protein G detektiert werden.

Markierung

[0049] Wie hier verwendet, ist eine „Markierung“ eine detektierbare Signaleinheit oder ein Reporterelement. Eine große Auswahl an Markierungen oder Reporterelementen kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, einschließlich, zum Beispiel, radioaktiver Isotope, Fluoreszenz-Markierungen, Chemiluminiszenz-Markierungen, Bioluminiszenz-Markierungen und Enzym-Markierungen. Markierungen können direkt oder indirekt gebunden sein. Die Markierungen können auch Haptene sein, die durch Sekundärreagenzien erkannt werden, wie z. B. Antikörper, Peptide, direkte chemische Wechselwirkung und andere Verfahren, die im Fachgebiet wohlbekannt sind. Die Markierung kann auch ein Oligonukleotid sein, oder eine Nukleinsäure, die durch Hybridisierung, Polymerisierung, Ligation und/oder Amplifikation durch Verfahren, die im Fachgebiet wohlbekannt sind, detektiert werden kann. Die Markierung kann verwendet werden, um eine Zunahme oder Abnahme in einem Signal-Anzeigewert zu erzeugen. Die Markierung kann auch zwei Chromophore umfassen, die in unmittelbarer Nachbarschaft gebunden sind, um ein Phänomen zu nutzen, das als Fluoreszens-Reso-

nanz-Energie-Transfer (FREI) bezeichnet wird. Wenn es mit Licht der passenden Wellenlänge bestrahlt wird, absorbiert das eine Chromophor ein Photon und befindet sich dann im angeregten Zustand. Die Energie des angeregten Chromophors wird auf ein Akzeptormolekül übertragen, wenn das Chromophor und der Akzeptor sich in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft zueinander befinden. Dieser Energietransfer verhindert, dass das angeregte Chromophor die Energie in Form eines Licht-Photons freisetzt und dämpft somit die Fluoreszenz des Chromophors. Wenn das Akzeptormolekül sich nicht in ausreichender räumlicher Nähe befindet, findet der Energietransfer nicht statt, und das angeregte Chromophor kann dann fluoreszieren. Paare von geeigneten interagierenden Signaleinheiten sind im Fachgebiet wohlbekannt. Ein ähnliches Phänomen, das als Lumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (LRET) bekannt ist, findet zwischen sensitisierten Lanthanid-Metallen und Akzeptor-Farbstoffen statt und kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Zusätzlich umfassen andere Markierungen, die verwendet werden können, um die Detektion zu beschleunigen, Chemilumineszenz-Markierungen, Immunoaffinitäts-Markierungen, wie z. B. c-Myc, Affinitäts-Markierungen, wie z. B. die Zellulose-Bindedomäne, Streptavidin, Biotin, Streptavidin oder ein beliebiges ganzes oder Teil-Makromolekül mit einer abgestimmten Passform, Reporter-Enzyme mit chromogenen, lumineszenten, fluoreszenten oder anderen Tracer-Fähigkeiten.

Träger

[0050] Wie hier verwendet, kann „Träger“ ein beliebiges poröses oder nicht poröses Material oder eine Matrix sein, das/die geeignet ist, zum Anfügen von Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren, und dergleichen. Die Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, und dergleichen können kovalent oder nicht kovalent an den Träger gebunden sein durch eine beliebige Methode oder Kombination von Methoden, die im Fachgebiet wohlbekannt sind. Träger im Sinne der Erfindung können Nylon, Nitrozellulose, Diazonitrozellulose, Glas, Silikon, Polystyren, Polyvinylchlorid, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Sepharose, Agar, Stärke oder ein beliebiges anderes Material, dass die Immobilisierung von Biomolekülen erlaubt, umfassen. Das Material kann in Form von Filtern, Membranen, flachen Oberflächen, Schläuchen, Kanälen, Vertiefungen (Wells), Blättern, Partikeln, Beads, Mikrosphären, Säulen, Fasern (z. B. optischen Fasern), und dergleichen vorliegen. Der Träger kann auch ein Multiwell-Format (wie z. B. Mikrotiterplatten), wie z. B. 12-Well-, 24-Well-, 48-Well-, 96-Well-, 384-Well- und 1536-Well-Platten, umfassen. Partikel oder Beads können aus Glas, Latex, einem magnetischen Material (magnetische, paramagnetische oder supermagnetische Beads) oder einem anderen Material gefertigt sein. Ein Beispiel für einen Träger, der in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, ist ein Satz von farbcodierten Mikrosphären, wie z. B. jene, die von der Luminex Corporation (Austin, Texas) hergestellt und vertrieben werden.

Array

[0051] Wie hier verwendet, bezeichnet der Begriff „Array“ eine systematische Anordnung von verschiedenen Molekülen oder Stoffen auf einem Träger, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, biologische Moleküle, wie z. B. DNA, RNA, Proteine, und dergleichen oder Chemikalien, die auf einem Träger angeordnet oder immobilisiert sind. Arrays von biologischen Molekülen wie z. B. Oligonukleotiden, Sonden, Rezeptoren, Antikörpern oder einer beliebigen Einheit, die mit Zielmolekülen reagiert, sind ein in zunehmendem Maße wichtiges Werkzeug in der biotechnologischen Industrie und verwandten Fachgebieten geworden. Arrays, die eine Mehrzahl von biologischen Molekülen umfassen, finden in einer Vielzahl von Anwendungen Verwendung, einschließlich des Arzneimittel-Screenings, der Nukleinsäuresequenzierung, der Mutationsanalyse, genomicscher und proteomischer Anwendungen, und dergleichen. Derartige Arrays können auf Mikroplatten, Glasobjektträgern, Beads, Mikrosphären, Mikrofluid-Vorrichtungen oder Standard-Blotting-Membranen ausgebildet werden und können als „Arrays“, Microarrays, oder Chips bezeichnet werden. Einfangmoleküle können durch kovalente oder nicht kovalente Wechselwirkungen an den Träger gebunden sein. Wenn sie an eine ebene Oberfläche gebunden sind, sind die Einfangmoleküle in einer systematischen Weise gebunden, sodass die Identität eines jeden, bestimmten Einfangmoleküls anhand seiner Position auf dem Array identifiziert werden kann.

[0052] Derartige Arrays können auf ebenen Objekten konstruiert sein, wie z. B. Glas- oder Plastik-Mikroskop-Objektträgern. Arrays können auch auf der Innenfläche eines Schlauchs oder eines Mikrotiterplatten-Wells konstruiert sein oder auf der Innenseite der Kanäle einer Mikrofluid-Vorrichtung konstruiert sein. Im Allgemeinen gibt es keine Einschränkung bezüglich des Formats des Arrays, vorausgesetzt, die einzelnen Stellen, an welche die Einfangmoleküle gebunden sind, können identifiziert werden. Wenn der Träger ein Satz von Beads oder Mikrosphären ist, dass müssen Sätze von Beads oder Mikrosphären, die mit verschiedenen Einfangmolekülen verknüpft sind, in irgendeiner Weise unterscheidbar sein. Bei einer Ausführungsform sind Beads von der Luminex Corporation (Austin, Texas), durch den Zusatz von zwei verschiedenen Farbstoffen in zehn verschiedenen Konzentrationen farbcodiert, woraus sich 100 verschiedene farbige Beads ergeben. Einfangmole-

küle können an Beads einer spezifischen Farbe gebunden werden, und die Farbe eines jeden Beads kann durch Durchflusszytometrie identifiziert werden. Ein Bead-Array wird angefertigt durch die Bindung spezifischer Einfangmoleküle an Sätze von Beads einer spezifischen Farbe und dann dem Mischen verschiedener Sätze von farbigen Beads, um einen Array zu erzeugen. Bei einer anderen Ausführungsform können Mikropartikel von Pharmaseq (Princeton, New Jersey), die jedes eine einzigartige Radiofrequenz-Markierung enthalten, verwendet werden, um spezifische Mikropartikel zu identifizieren.

[0053] Andere Verfahren können verwendet werden, um einzelne Beads zur Identifizierung zu markieren, wie z. B. Nukleinsäure- und Peptid-Markierungen. Der Array kann eine beliebige Anzahl von zwei bis 100 000 Elementen, bevorzugt zwischen 3 und 5000 Elementen, enthalten. Bei einer Ausführungsform wendet die Erfindung ein Bead-Array-Format an, wie z. B. die kommerziell erhältliche LabMAP™-Technologie, aber sie kann für praktisch jede Art von Array-Plattform oder -formst angewendet werden. Die Erfindung umfasst ein Assay-System mit der Kapazität zur quantitativen und qualitativen Charakterisierung von Aktivitäten von bis zu 100 000 verschiedenen regulatorischen Proteinen in einem einzigen Reaktionsgefäß, -well, oder -röhrchen.

Einfangreagens

[0054] In der vorliegenden Erfindung bezeichnet ein „Einfangreagens“ ein beliebiges Molekül, das spezifisch ein DNA-Bindungsprotein oder einen Detektions-Duplex aus einer Lösung einfangen wird, die ein oder mehrere biologische Moleküle enthält. Beispiele für Einfangreagenzien sind poly- und monoklonale Antikörper und Antikörperfragmente. Einfangreagenzien können Moleküle sein, die an Haptene oder Bindungsgruppen binden. Proteine, die eine natürliche Affinität für spezifische DNA-Bindungsproteine besitzen und Proteine, die modifiziert worden sind, sodass sie spezifisch an die DNA-Bindungsproteine binden, sind ebenfalls in dieser Definition eingeschlossen. Einfangmoleküle können auch Moleküle sein, die an ein anderes Molekül binden, welches das DNA-Bindungsprotein bindet. Zum Beispiel kann Anti-Kaninchen-IgG verwendet werden, um einen Kaninchen-Antikörper-Protein-Komplex einzufangen. Auf ähnliche Weise kann Protein G verwendet werden, um einen Ziegen-Antikörper-Protein-Komplex einzufangen. Beispiele für Einfangreagenzien und die entsprechenden Bindungsgruppen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Beispiele für Einfangreagenzien und die Haptene, an die sie binden

Hapten/Bindungsgruppe	Einfangreagens
Biotin	Avidin, Streptavidin
Sialinsäure, Kohlenhydrate, Glycoproteine	Lektine, wie z. B. Concanavalin A
Digoxigenin	Anti-Digoxigenin
Fc-Fragment von IgG	Protein A, Protein G, Protein A/G
5-BrdU (5-Bromdesoxyuridin)	Anti-BrdU
Dinitrophenyl (DNP)	Anti-DNP
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Anti-FITC
N-2-Acetylaminofluoren (AAF)	Anti-AAF
N-2-Acetylamino-7-iodofluoren (AAIF)	Anti-AAIF
Oligo- oder Poly-dA	Oligo- oder Poly-dT
Oligo- oder Poly-dC	Oligo- oder Poly-DG
Phenylboronsäure (PBA)	Salicylhydroxamsäure
Aldehyd- und Ketongruppen	Hydrazide
Sulphydrylgruppe	Maleimide
Aminogruppe	N-Hydroxysuccinimidester
Thiole (Glutathion)	Schwermetalle (Hg^{2+})

[0055] Einfangreagenzien können auch Chemikalien oder Farbstoffe umfassen, die an DNA, Proteine oder DNA-Protein-Komplexe binden können. Einfangreagenzien umfassen auch Reagenzien, die spezifische Konformationen von Biomolekülen erkennen oder bestimmte Modifikationen erkennen können. Zum Beispiel können Antikörper, die gegen Phosphoserin gerichtet sind, als Einfangreagenzien verwendet werden, um Proteine einzufangen, die einen exponierten Phosphoserinrest enthalten. Zusätzlich können SH2-Domänen verwendet

werden, um Proteine einzufangen, die ein bestimmtes Motiv aus vier Aminosäuren enthalten, das Phosphotyrosin enthält.

Profil

[0056] Wie hier verwendet, ist ein „Profil“ eine Kombination der Messungen von zwei oder mehr Eigenschaften eines biologischen, biochemischen oder chemischen Systems. Die Messungen können gleichzeitig oder aufeinander folgend erfolgen. Zum Beispiel kann ein Profil die Konzentration von zwei oder mehr Proteinen in einer Probe umfassen. Ein anderes Beispiel für ein Profil ist der Phosphorylierungszustand von zwei oder mehr Proteinen in einer Probe. Profile können qualitative oder quantitative Messungen umfassen und können sowohl subjektive als auch objektive Daten umfassen.

Sequenzspezifisches Spaltungsreagens

[0057] Wie hier verwendet, ist ein „sequenzspezifisches Spaltungsreagens“ ein Reagens, das DNA an einer spezifischen Stelle, basierend auf der Erkennung einer spezifischen DNA-Sequenz, spalten kann. Beispiele für sequenzspezifische Spaltungsreagenzien umfassen Typ II-Restriktionsendonukleasen, wie z. B. EcoRI, HindIII und BamHI. Sequenzspezifische Spaltungsreagenzien umfassen auch die Klasse der Typ IIS-(oder zielsuchenden) Restriktionsendonukleasen, die an eine spezifische DNA-Sequenz binden und die DNA in einem bestimmten Abstand von der Enzymbindestelle spalten.

Externes Spaltungsreagens

[0058] Wie hier verwendet, bezeichnet ein „externes Spaltungsreagens“ ein Reagens, dass den Verdau oder die Spaltung von einem oder mehreren Strängen von Nukleinsäure an oder in der Nähe von einem oder mehreren Enden der Nukleinsäure initiiert. Der Verdau oder die Spaltung läuft in einer einzigen Richtung bezogen auf die Initiationsstelle ab. Externe Spaltungsreagenzien umfassen die Enzyme, die für gewöhnlich als Exonukleasen bezeichnet werden. Beispiele für externe Spaltungsreagenzien und ihre Eigenschaften sind in [Fig. 2](#) dargestellt.

Sonden-Einfang-Sequenz

[0059] Wie hier verwendet, bezeichnet „Sonden-Einfang-Sequenz“ eine DNA-Sequenz, die verwendet werden kann, um eine markierte oder unmarkierte Oligonukleotid- oder Nukleinsäuresonde einzufangen. Die Sequenz kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein. Die Sonden-Einfang-Sequenz kann verwendet werden um Detektions-Duplexe oder DNA-Protein-Komplexe einzufangen.

Signalamplifikation

[0060] Wie hier verwendet, bezeichnet „Signalamplifikation“ eine beliebige Methode, die verwendet wird, um das Signal eines biologischen Assay über das Signal hinaus zu verstärken, das mit einer „Einzelmarkierungs“-Detektions-Strategie erreicht werden kann. Signalamplifikation kann auf einer enzymkatalysierten Reporter-Abscheidung basieren, wie z. B. bei der Tyramid-Signalamplifikation oder kann auf einer Enzym-Amplifikation basieren. Alternativ können Strategien, welche die Anzahl von Markierungen erhöhen, verwendet werden. Derartige Strategien umfassen die Bindung von Dendrimeren, verzweigten Polymeren, und langen linearen Polymeren, die mehrere Bindestellen für eine sekundäre detektierbare Markierung enthalten. Beispiele für diese Strategien umfassen, ohne Einschränkung, Oligonukleotid-Dendrimere, verzweigte DNA und das Hybrid-Einfangen. Andere Amplifikationsstrategien sind auf dem Fachgebiet bekannt und können im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Zum Beispiel können auch Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, wie z. B. die Polymerasekettenreaktion und die Rolling-Circle-Amplifikation verwendet werden, um das erhaltene Signal zu amplifizieren. Obwohl viele dieser Strategien anfangs entwickelt wurden, um die Sensitivität des Detektierens von Nukleinsäuren zu erhöhen, können sie leicht zur Detektion anderer Moleküle angepasst werden, einfach indem ein geeignetes Nukleinsäuremolekül an ein Detektionsreagens, wie z. B. einen Antikörper, ein Peptid, Avidin, oder Streptavidin, angefügt wird. In der vorliegenden Erfindung kann jedes Verfahren zur Signalamplifikation verwendet werden, um das Signal, das durch den Assay erzeugt wird, zu verstärken.

[0061] Die vorliegende Erfindung stellt somit Zusammensetzungen und Verfahren zum Detektieren und Messen von DNA-Bindungsproteinen bereit. Zusätzlich stellt die Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren für die simultane oder beinahe simultane Detektion von mehreren DNA-Bindungsproteinen in einem Multiplex-

oder Array-Format bereit und stellt außerdem Zusammensetzungen und Verfahren bereit zum Erstellen von Profilen von DNA-Bindungsaktivität von Proteinen, insbesondere Transkriptionsfaktoren. In noch speziellerer Hinsicht stellt die Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren zum Detektieren und Messen von mehreren Protein-DNA-Bindungereignissen in einer einzigen Probe in einem Hochdurchsatzformat bereit.

[0062] Bei einer Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zum Detektieren von Proteinbindung an einen Detektions-Duplex bereit, wobei die Bindung des Proteins an den Detektions-Duplex die Spaltung des Duplex durch ein sequenzspezifisches Spaltungsreagens hemmt und dadurch ein Signal verstärkt oder ab schwächt.

[0063] Bei dieser Ausführungsart umfasst der Detektions-Duplex eine DNA-Sequenz, die von einem sequenzspezifischem Spaltungsreagens erkannt wird, sodass das sequenzspezifische Spaltungsreagens den Detektions-Duplex spalten wird, wenn kein Protein an die Proteinbindestelle gebunden hat. Wenn jedoch Protein an die Proteinbindestelle des Detektions-Duplex gebunden hat, wird die Spaltung des Detektions-Duplex gehemmt werden und dadurch ein Signal verstärkt oder abgeschwächt. Typ II-Restriktionsenzyme können bei dieser Ausführungsart der Erfindung verwendet werden, wenn die Proteinbindestelle im Detektions-Duplex eine bekannte Schnittstelle für ein Typ II-Restriktionsenzym umfasst, oder sich in ausreichender räumlicher Nähe zur Restriktionsenzymbindestelle befindet, sodass durch die Bindung eines spezifischen Bindungs protein an die Proteinbindestelle die Bindung des Restriktionsenzyms an die Enzymerkennungssequenz gehemmt oder verhindert wird. Zum Beispiel kann ein Detektions-Duplex verwendet werden, der eine Bindungsgruppe, eine Markierung, und eine Proteinbindestelle zwischen der Bindungsgruppe und der Markierung umfasst, wobei die Proteinbindestelle eine Restriktionsendonuklease-Schnittstelle umfasst. Der Detektions-Duplex wird mit der Probe in Kontakt gebracht, und DNA-Bindungsproteine, sofern vorhanden, binden an den Detektions-Duplex. Ein sequenzspezifisches Spaltungsreagenz, wie z. B. eine TypII-Restriktionsendonuklease wird hinzu gegeben. Wenn Protein an die Proteinbindestelle gebunden hat, dann bleibt der Detektions-Duplex intakt. Wenn keine Protein an den Detektions-Duplex gebunden hat, dann wird der Detektions-Duplex gespalten, womit die Bindungsgruppe von der Markierung getrennt wird und somit die Detektion der Markierung verhindert wird. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der Erfindung ist in [Fig. 3](#) dargestellt.

[0064] Es kann eine andere Art von sequenzspezifischem Spaltungsreagenz in dieser Ausführungsart der Erfindung verwendet werden. Typ IIS-Restriktionsendonukleasen erkennen und binden an eine spezifische DNA-Sequenz, aber spalten die DNA an einer bestimmten Region, die von der Enzymbindestelle entfernt liegt. Assays, die diese Enzyme einsetzen, sind vorteilhaft, weil die Proteinbindestelle nicht eine Erkennungssequenz für das sequenzspezifische Spaltungsreagens umfassen muss. Stattdessen kann die Bindestelle für das sequenzspezifische Spaltungsreagenz in den Detektions-Duplex eingebaut werden. In diesem Beispiel umfasst ein Detektions-Duplex eine Bindungsgruppe, eine Markierung, eine Proteinbindestelle und eine Bindestelle für ein sequenzspezifische Spaltungsreagenz, sodass das sequenzspezifische Spaltungsreagenz, wenn es an den Detektions-Duplex gebunden ist, den Duplex in oder in der Nähe der Proteinbindestelle spaltet. Der Detektions-Duplex wird in Kontakt mit der Probe gebracht und DNA-Bindungsproteine, sofern vorhanden, binden an den Detektions-Duplex. Ein sequenzspezifisches Spaltungsreagens, wie z. B. eine Typ IIS-Restriktionsendonuklease, wird hinzu gegeben. Wenn Protein an die Proteinbindestelle gebunden hat, dann bleibt der Detektions-Duplex intakt. Wenn kein Protein an den Detektions-Duplex gebunden hat, dann wird der Detektions-Duplex gespalten, wobei die Bindungsgruppe von der Markierung getrennt wird und somit die Detektion der Markierung verhindert wird. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der Erfindung ist in [Fig. 4](#) dargestellt. Der Duplex kann auf einem Träger eingefangen werden, um die Detektion der Markierung zu erleichtern.

[0065] Bei einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zum Detektieren von Proteinbindung an einen Detektions-Duplex bereit, wobei die Bindung des Proteins an den Detektions-Duplex die Spaltung des Duplex durch ein externes Spaltungsreagens hemmt und dadurch ein Signal verstärkt oder ab schwächt. Das externe Spaltungsreagens kann einen oder beide Stränge des Detektions-Duplex spalten, beginnend an einem oder an mehreren Enden des DNA-Strangs in dem Duplex. Bei einer Ausgestaltung dieser Ausführungsform wird der Detektions-Duplex zunächst auf einem Träger immobilisiert. Die Probe wird mit dem Detektions-Duplex auf dem Träger in Kontakt gebracht und man lässt Protein an den Detektions-Duplex binden. Anschließend wird ein externes Spaltungsreagens mit dem Detektions-Duplex auf dem Träger in Kontakt gebracht. Wenn Protein an den Detektions-Duplex gebunden hat, dann wird das externe Spaltungsreagens nicht in der Lage sein, den Detektions-Duplex vollständig zu verdauen, weil dieser durch die Gegenwart des Proteins geschützt sein wird. Wenn kein Protein an den Detektions-Duplex gebunden hat, dann wird das externe Spaltungsreagens einen oder beide Stränge des Detektions-Duplex verdauen und wird die Markierung ins Medium freisetzen, woraus sie ausgewaschen werden kann. Wenn Protein an den Detektions-Duplex ge-

bunden hat, dann wird die Markierung an den Träger gebunden bleiben und wird detektiert werden. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der Erfindung ist in [Fig. 5](#) dargestellt.

[0066] Ein weiteres Beispiel für diese Ausführungsform ist in den [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) dargestellt. In diesem Beispiel umfasst der immobilisierte Detektions-Duplex eine Sonden-Einfang-Sequenz und eine Proteinbindesequenz und eine Phosphatgruppe am 5'-Ende des immobilisierten oder immobilisierbaren Stranges. Der Detektions-Duplex kann auf einem Träger immobilisiert werden oder kann in anderen Stufen auf einem Träger eingefangen werden, wie es vorteilhaft ist. Die Einfangsequenz und die Proteinbindesequenz können dieselbe sein oder verschieden sein. In einem Array-Format wird es vorteilhaft sein, wenn die Sonden-Einfangsequenz und die Protein-Einfangsequenz verschieden sind, sodass dasselbe Detektionsreagens mit vielen verschiedenen Detektions-Duplexen verwendet werden kann.

[0067] In diesem Beispiel wird der Detektions-Duplex mit der Probe, die möglicherweise DNA-Bindungsproteine enthält, in Kontakt gebracht. Sofern vorhanden, binden die Proteine an die Proteinbindestelle im Detektions-Duplex. Der Detektions-Duplex wird dann mit der Lambda-Exonuklease in Kontakt gebracht, einem externen Spaltungsreagens, welches den 5'-phosphorylierten DNA-Strang in 5'-3'-Richtung verdaut. Wenn Protein an den Detektions-Duplex gebunden hat, dann wird das Enzym daran gehindert werden, den phosphorylierten Strang des Detektions-Duplex zu spalten. Wenn kein Protein gebunden hat, dann wird der 5'-phosphorylierte Strang des Detektions-Duplex vollständig verdaut werden. Der Detektions-Duplex wird dann hitzedenaturiert und gewaschen, um das externe Spaltungsreagens zu inaktivieren, die Stränge des Detektions-Duplex zu trennen, und die Spaltprodukte zu entfernen. Wenn der Detektions-Duplex durch Proteinbindung geschützt war, dann bleibt der Strang, der die Sonden-Einfang-Sequenz enthält, an den Träger gebunden. Wenn der Duplex nicht geschützt war, weil kein Protein an den Detektions-Duplex gebunden hat und den Verdau gehemmt hat, dass sich der Strang, der die Sonden-Einfang-Sequenz enthält, nicht länger auf dem Träger befinden. Eine markierte Oligonukleotid- oder Nukleinsäure-Sonde wird dann hinzu gegeben, die man mit der Sonden-Einfangsequenz, sofern vorhanden, hybridisieren lässt. Das Vorhandensein von Signal weist darauf hin, dass der Detektions-Duplex durch gebundenes Protein geschützt war ([Fig. 6](#)). Die Abwesenheit eines Signals weist darauf hin, dass der Strang durch das externe Spaltungsreagens verdaut wurde und nicht durch Proteinbindung geschützt war ([Fig. 7](#)).

[0068] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung stellt ein Verfahren zum Detektieren von Proteinbindung an einen Detektions-Duplex bereit, wobei die Proteine in einer Probe vor oder im Anschluss an die Bindung an einen Detektions-Duplex markiert werden. Nach dem Waschen werden Proteine, die an den Detektions-Duplex gebunden haben, anhand des Vorhandenseins der Markierung, die an den Detektions-Duplex gebunden ist, detektiert. Proteine in der Probe werden durch Verfahren markiert, die allgemein im Fachgebiet verwendet werden, einschließlich aktiver Ester, wie z. B. N-Hydroxysuccinimidester von Fluoreszenzfarbstoffen, wie z. B. Cy3 und Cy5, sulphydrylreaktiven Markierungen und anderen Verfahren, die allgemein im Fachgebiet verwendet werden. In einem Beispiel für diese Ausführungsform wird eine Probe mit einem aminreaktiven Farbstoff markiert, wie z. B. dem N-Succinimidester des Fluoreszenzfarbstoffs Cy3 (Amersham Biosciences). Das Verfahren wird im Wesentlichen alle oder nahezu alle der Proteine in der Probe markieren. Die markierte Probe wird dann mit einem Detektions-Duplex in Kontakt gebracht werden. Der Detektions-Duplex kann auf einem Träger immobilisiert sein oder kann in Lösung vorliegen. Eine Inkubationszeitdauer schließt sich an, sodass Proteine Gelegenheit haben, an die Proteinbindestelle im Detektions-Duplex zu binden. Wenn der Detektions-Duplex in Lösung vorliegt, wird er nun auf einem Träger eingefangen, und die ungebundenen Moleküle werden ausgewaschen. Proteine, die an den Detektions-Duplex gebunden haben, werden anhand der Markierung detektiert. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der Erfindung ist in [Fig. 8](#) dargestellt.

[0069] Bei einer weiteren Variante dieser Ausführungsform werden zwei oder mehrere Proben separat mit verschiedenen Markierungen markiert und dann gemischt. Diese gemischte Probe wird dann mit dem Detektions-Duplex in Kontakt gebracht. Eine Inkubationszeitdauer schließt sich an, um den markierten Proteinen Zeit zu geben, an den Detektions-Duplex zu binden. Wenn der Detektions-Duplex in Lösung vorliegt, wird er nun auf einem Träger eingefangen, und die ungebundenen Moleküle werden ausgewaschen. Proteine, die an den Detektions-Duplex gebunden haben, werden anhand der Markierungen detektiert. Da zwei oder mehr Proben mit verschiedenen Markierungen markiert wurden, wird jede Markierung detektiert und unabhängig voneinander gemessen, und die Ergebnisse können als eine differentielle Analyse von DNA-Bindungsproteinen in den beiden Proben ausgedrückt werden, in einer ähnlichen Weise zu der Art, in der RNA-Moleküle auf DNA-Microarrays differentiell markiert und gemessen werden (27).

[0070] Noch eine weitere Ausführungsform stellt ein Verfahren zum Detektieren von Proteinbindung an einen Detektions-Duplex bereit, wobei die Proteine in einer Probe an einen Detektions-Duplex gebunden werden,

woraufhin überschüssige Protein ausgewaschen werden und gebundene Proteine anschließend mit einem Detektionsreagens detektiert werden. Der Detektions-Duplex kann zunächst auf einem Träger eingefangen werden oder kann nach anderen Stufen auf einem Träger eingefangen werden, wie es vorteilhaft ist. Die Reihenfolge des Inkontaktbringens von Duplex, Probe und Detektionsreagens kann in jeder Reihenfolge ausgeführt werden. In einem Beispiel für diese Ausführungsform wird ein immobilisierter Detektions-Duplex mit einer Probe in Kontakt gebracht, die möglicherweise DNA-Bindungsproteine enthält. Der immobilisierte Detektions-Duplex wird mit der Probe inkubiert, um Proteinen Gelegenheit zu geben, an den Detektions-Duplex zu binden. Ungebundene Stoffe werden ausgewaschen, und die gebundenen Proteine werden mit einem Detektionsreagens detektiert. Dieses Beispiel ist in [Fig. 10](#) dargestellt. Die Proteine können mit spezifischen Antikörpern detektiert werden, die nur ein einziges Protein detektieren, oder können mit Antikörpern detektiert werden, die Klassen von Proteinen oder bestimmte Proteinmotive detektieren. Zum Beispiel enthalten viele DNA-Bindungsproteine phosphorylierte Tyrosin-, Threonin- oder Serin-Reste, und Proteine können mit Anti-Phosphotyrosin-, Anti-Phosphoserin- und Anti-Phosphothreonin-Antikörpern detektiert werden. Proteine können auch mit anderen Proteinen detektiert werden, die an bestimmte Motive binden. Zum Beispiel können DNA-Bindungsproteine mit einer Klasse von Proteinen detektiert werden, die als SH2-Domänen(-Proteine) bezeichnet wird. SH2-Domänen binden an ein Motiv aus vier Aminosäuren, das Phosphotyrosin einschließt. Gebundene Proteine können auch mit einem chemischen oder biochemischen Färbemittel detektiert werden.

[0071] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung stellt ein Verfahren zum Detektieren von Proteinbindung an einen Detektions-Duplex bereit, wobei das Protein zunächst an einen markierten Detektions-Duplex gebunden wird, woraufhin der Protein-Detektions-Duplex-Komplex mit einem Einfang-Reagenz auf einem Träger eingefangen wird und detektiert wird. Alternativ können zunächst das Einfangreagens, Protein und der markierte Detektions-Duplex in Kontakt gebracht werden und anschließend auf einem Träger eingefangen werden. Im Allgemeinen können die Zugabe von Einfangreagens, Probe und markiertem Detektions-Duplex in jeder beliebigen Reihenfolge ausgeführt werden. In einem Beispiel für diese Ausführungsform wird das Einfangreagens auf einem Träger immobilisiert. Der markierte Detektions-Duplex wird mit der Probe, die möglicherweise DNA-Bindungsproteine enthält, in Kontakt gebracht. Die Probe wird mit dem Detektions-Duplex inkubiert, um Proteinen, sofern welche (vorhanden sind), Gelegenheit zu geben, an den Detektions-Duplex zu binden. Nach der Inkubation wird das Gemisch mit einem immobilisierten Einfangreagens in Kontakt gebracht, das den Protein-Detektions-Duplex-Komplex auf dem Träger einfängt, und die Markierung auf dem Detektions-Duplex wird detektiert. Dieses Beispiel ist in [Fig. 11](#) dargestellt. Wenn kein Protein an den Detektions-Duplex gebunden hat, dann kann das Protein immer noch durch das Einfangreagens eingefangen werden, aber es wird keine Markierung detektiert werden, da die Markierung an dem Detektions-Duplex angefügt ist. In diesem Beispiel könnte das Einfangreagens ein Antikörper gegen ein spezifisches DNA-Bindungsprotein sein, das auf dem Träger immobilisiert worden ist.

[0072] In einem weiteren Beispiel für diese Ausführungsform, dargestellt in [Fig. 12](#), wird der markierte Detektions-Duplex mit der Probe in Kontakt gebracht, die möglicherweise DNA-Bindungsproteine enthält. Diese Probe wird mit dem Detektions-Duplex inkubiert, um Proteinen, sofern welche (vorhanden sind), Gelegenheit zu geben, an den Detektions-Duplex zu binden. Nach der Inkubation wird das Gemisch mit einem ersten Einfangreagens in Kontakt gebracht, das an den Protein-Detektions-Duplex-Komplex bindet. Der erste Einfangreagens-Protein-Detektions-Duplex-Komplex wird dann durch ein zweites Einfangreagens auf einem Träger eingefangen, und die Markierung auf dem Detektions-Duplex wird detektiert. In diesem Beispiel könnte das erste Einfangreagens ein Antikörper sein, der spezifisch für ein DNA-Bindungsprotein ist und das zweite Einfangreagens auf dem Träger könnte ein Molekül sein, wie z. B. Protein A oder Protein G, welches das erste Antikörper-Einfangreagens binden kann.

[0073] Die bereits beschriebenen Ausführungsformen der Erfindung sind leicht zur Anwendung in einem Array-Format adaptierbar. Insbesondere stellt die Erfindung ein Verfahren zum Detektieren von DNA-Bindungsproteinen bereit, das zwei oder mehr Detektions-Duplexe umfasst, die auf einem Träger immobilisiert sind. Bei einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zum Detektieren einer Mehrzahl von DNA-Bindungsproteinen bereit, unter Verwendung von zwei oder mehr Detektions-Duplexen. Die Duplexe werden mit der Probe in Lösung gemischt und anschließend auf einem Träger in einem Array-Format eingefangen. Zum Beispiel können Detektions-Duplexe, die einzigartige einzelsträngige Abschnitte enthalten, an einen Träger gebunden werden, der einen Array von Oligonukleotiden umfasst, die komplementär zu den einzelsträngigen Abschnitten des Detektions-Duplexes sind. Zusätzlich können Detektions-Duplexe durch eine Bindungsgruppe entweder vor oder im Anschluss an den Kontakt mit der Probe auf einem Träger in einem Array-Format eingefangen werden. Der Array kann auch einen Array von Antikörpern oder anderen Einfangreagenzien umfassen, die verwendet werden können, um DNA-Bindungsprotein-Detektions-Duplex-Komplexe einzufangen.

[0074] Die hier beschriebene Erfindung ist gut geeignet für die Anwendung auf einem durchflusszytometrischen Bead-Array mit Multiplex-Fähigkeit, wie z. B. dem von der Luminex Corporation entwickelten LabMAP-System (28). Um einen Bead-Array herzustellen, werden Polystyren-Mikrosphären von Innen mit präzisen Anteilen von zwei spektral verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Jedes Bead wird mit einer von 10 verschiedenen Konzentrationen von jedem Fluorochrom gefärbt, woraus sich ein Bead-Array ergibt, der aus 100 spektral verschiedenen Mikrosphären-Sätzen besteht. Jeder Mikrosphären-Satz kann anhand seiner spektralen Kennzeichnung (dem Verhältnis von zwei Farbstoff-Farben) unterschieden werden, und sie können in einem einzigen Test kombiniert werden, was es erlaubt, bis zu 100 verschiedene Analyte gleichzeitig in einem einzigen Reaktionsgefäß zu messen. Stoffe, wie z. B. Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, und dergleichen, können unter Verwendung von Standardchemie, die im Fachgebiet wohlbekannt ist, an die Mikrosphären gekoppelt werden. Ein dritter Fluoreszenzfarbstoff wird an ein Reportermolekül gekoppelt, und quantifiziert die biomolekulare Wechselwirkung, die auf der Mikrosphären-Oberfläche aufgetreten ist. Mikrosphären werden in einem schnell fließenden Fluidstrom einzeln abgefragt, wenn sie zwei getrennte Laser passieren. Digitale Hochgeschwindigkeits-Signalverarbeitung klassifiziert die Mikrosphären anhand ihrer spektralen Kennzeichnung und quantifiziert das Reportersignal auf der Oberfläche des Beads. Waschen, um ungebundenen Reporter zu entfernen, ist im Allgemeinen nicht notwendig, was den Assay im Wesentlichen homogen macht. Tausende von Mikrosphären werden pro Sekunde abgefragt, woraus sich ein Analysesystem ergibt, das in der Lage ist, innerhalb weniger Sekunden bis zu 100 verschiedene Reaktionen in einem einzigen Reaktionsgefäß zu analysieren und zu melden. Die Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können durch die Bindung von Detektions-Duplexen, Oligonukleotiden oder Einfang-Reagenzien an Beads leicht an ein Bead-Array-Format angepasst werden. Detektions-Duplexe können auf den Beads immobilisiert werden oder können nach Kontakt mit der Probe auf den Beads eingefangen werden. Antikörper oder andere Einfangreagenzien können auf den Beads immobilisiert werden, oder es können Komplexe nach Kontakt mit der Probe auf den Beads eingefangen werden.

[0075] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung können leicht für die Verwendung in Verbindung mit Signalamplifikationsverfahren angepasst werden, die verwendet werden, um die Sensitivität der Detektion zu erhöhen. Enzym-Amplifikation, Rolling Circle-Amplifikation, Ligasekettenreaktion und andere Verfahren, die ein detektierbares Signal amplifizieren können, sind im Rahmen dieser Erfindung eingeschlossen.

[0076] Verfahren der vorliegenden Erfindung können bei der Detektion, dem Screening und der Diagnose von verschiedenen Krankheiten, Störungen oder Zuständen in biologischen Proben verwendet werden. Die Verfahren der Erfindung können auch für die Beobachtung des Verlaufs einer Krankheit oder Behandlung verwendet werden. Verfahren der vorliegenden Erfindung können auch zum Screening von biologischen Verbindungen oder biologischen Molekülen verwendet werden, welche die Aktivität oder die Menge von DNA-Bindungsproteinen in einer Probe beeinflussen oder ändern können. Die vorliegende Erfindung kann auch verwendet werden, um den Effekt einer genetischen Variation auf die Bindungsfähigkeit von DNA-Bindungsproteinen zu bestimmen. Zum Beispiel könnte die Erfindung verwendet werden, um gleichzeitig die Affinität einer einzigen oder mehrerer DNA-Bindungsproteine zu einer großen Anzahl von verschiedenen Proteinbindesequenzen zu messen.

[0077] Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren bereit, die verwendet werden können, um zelluläre Netzwerke und zelluläre Signalwege aufzuklären und zu verstehen. Profile von DNA-Bindungsproteinen, die durch Verfahren und Zusammensetzungen dieser Erfindung erstellt wurden, können mit Software kombiniert werden, welche die erzeugten Daten und Profile analysiert. Derartige Software kann Funktionen umfassen wie z. B. Mustererkennungs- und Musterfindungs-Algorithmen, unüberwachte oder überwachte hierarchische Cluster-Analyse, und dergleichen, welche die Entdeckung von neuen Bio-Markern, Diagnose und Stadienbestimmung von Krankheiten erleichtern, und den Effekt von potenziellen neuen Arzneimitteln voraussagen können. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung können auch in Verbindung mit Software verwendet werden, die Proteine und Proteinbindesequenzen mit ihren funktionellen und biologischen Eigenschaften korreliert. Derartige Eigenschaften können strukturelle, regulatorische, oder enzymatische Funktionen der entdeckten Proteine umfassen, die biologischen „Zielstellungen“, zu denen die Proteine oder Gene beitragen, die funktionelle Beziehung des entdeckten Proteins zu einem oder mehreren anderen Proteinen oder Genen, die funktionelle Beziehung von Proteinbindesequenzen zu anderen Proteinen oder Nukleinsäuresequenzen, die Beziehung der entdeckten Proteine zu wichtigen biologischen Prozessen und biochemischen Funktionen.

[0078] Kombinationen der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Verfahren mit Computersoftware und Computer- und Labor-Hardware sind von dieser Erfindung umfasst.

Beispiele

Beispiel 1. Bead-Kopplung.

[0079] Oligonukleotide wurden unter Anwendung von Standard-EDC-Carboxylat-Kopplungschemie gekoppelt. In Kürze, es werden Beads in MES-Puffer, pH 4,7, suspendiert, und Oligonukleotide werden hinzu gegeben bis zu einer Endkonzentration von 2 μ M. Frisches EDC wird hinzu gegeben, um eine Endkonzentration von 1–2 mg/mg bereitzustellen, und man lässt es mit der Bead-Suspension 30 Minuten lang im Dunkeln unter Rotation reagieren. Eine ähnliche Konzentration von frischem EDC wird erneut zu der Bead-Suspension hinzu gegeben, und man lässt für weitere zwei Stunden im Dunkeln unter Rotation reagieren. Gekoppelte Beads werden einmal mit 50 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05% Tween-20, einmal mit 0,2% SDS in PBS, zweimal mit PBS, pH 7,5, die 0,02% Tween-20 enthält, einmal mit PBS, pH 7,5, gewaschen und in PBS, pH 7,5, auf eine Endkonzentration von 1000–2000 Beads/Mikroliter resuspendiert.

Beispiel 2. Detektion von Proteinbindung an Detektions-Duplexe mit Detektionsreagenzien unter Verwendung einer Einfang-Markierung.

Oligonukleotid-Annealing:

[0080] Detektions-Duplexe wurden aus dem Oligonukleotid PO4Kbfor (PO4-AGTTGAGGGATCCCCAG-GAGCGGCTTATCGGTCTATTCAACTCCCCCTAGGGG) zusammengesetzt, das eine Markierungssequenz, eine NF- κ B-Bindestelle und eine 5'-Phosphatgruppe trägt, und dem komplementären Oligonukleotid KBrev (TCCTGGGGATCCCCCTCAACT) dem die Markierungssequenz fehlt.

[0081] Das Annealing von PO4Kbfor und KBrev wurden durchgeführt, indem zunächst 100 μ M Oligonukleotid-Stammlösungen mit Annealing-Puffer (40 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, und 1 mM EDTA) verdünnt wurden, um ein Verhältnis von 20 nM PO4Kbfor zu 1 μ M KBrev zu erhalten. 100 μ l des Oligonukleotid-Gemischs wurden dann für eine Minute auf 95°C erhitzt und über eine Zeitspanne von 45 Minuten in linearer Weise auf Raumtemperatur abgekühlt. 1 μ l des hybridisierten Gemischs, das die Detektions-Duplexe enthielt, die eine einzelsträngige Markierungssequenz aufwiesen, wurde zu 19 μ l Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer (10 mM Tris, pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂), der 250 ng Poly(dI-dC) und 0,5% Bovines Serumalbumin (Fraktion V) enthielt, und wurde mit variierenden Mengen von NF- κ B-p50-Protein für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 1800 Beads, suspendiert in 25 μ l Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer, der 0,35% BSA enthielt, wurden zu angemessenen Reaktionsansätzen hinzu gegeben und wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an die Hybridisierung von DNA-Bindungsprotein-Detektions-Duplex-Komplexen an Bead-Oberflächen wurden 25 μ l Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer, der (0,1 μ g) NF- κ B-p50-spezifische Primärantikörper (Santa Cruz Biotechnology Katalognr. SC-114) enthielt, zu dem Detektions-Duplex-Proben-Bead-Gemisch hinzu gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln unter Agitation inkubiert. Unter Verwendung einer Filterplatte (Millipore MABV1250) und einem Vakuum-Mehrfachansaugstutzen, wurden Beads einmal mit 100 μ l Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer, der 0,35% BSA enthielt, gewaschen. 50 μ l einer 1:500 Verdünnung von phycoerythrinmarkiertem Anti-Kaninchen-Sekundär-Antikörper (Sigma Katalognr. P9537) wurden zu jedem Assay im Anschluss an eine 30-minütige Inkubation im Dunkeln unter Agitation im Dunkeln unter Agitation bei Raumtemperatur hinzu gegeben. 25 μ l von jedem Assay wurden unter Verwendung der Luminex 100-Instrumentierung ausgelesen. Daten von diesem Experiment sind in [Fig. 12](#) gezeigt, und das Signal, das erhalten wurde, zeigt eine dosisabhängige Antwort auf die Menge an DNA-Bindungsprotein, das zu dem Detektions-Duplex gegeben wurde.

Beispiel 3. Detektion von Proteinbindung an DNA mit einem Einfangreagens.

[0082] Zwei Mikrogramm des Einfangreagens (Santa Cruz Biotechnologies NF- κ B-p65-Antikörper, Katalognr. SC-372) wird mit Bead-Trägern inkubiert, die kovalent mit rekombinantem Protein G (Upstate Biotechnology) gekoppelt sind. Diese Inkubation wird für zwei Stunden unter Agitation bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht ausgeführt. Beads werden dann mit 3-mal 200 μ l-Volumen Transkriptionsfaktor-Puffer gewaschen, um Antikörper zu entfernen, die nicht an die Protein G-Oberfläche gebunden haben. 200 fmol des Biotin-HPNFKB65-Haarnadel-Detektions-Duplex

Biotin-TATCCAAGGGGACTTCCCCCTG

G

3'-ATAGGTTCCCCCTGAAAGGGGAC
werden für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 20 μ l Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer (10 mM Tris, pH 7,5,

50 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂), der 250 ng Poly(dl-dC) und 0,5% Bovines Serumalbumin (Fraktion V) enthielt, mit 2 µg von nukleären Zellextrakten inkubiert, die aus Kontroll- und TNF-alpha-stimulierten HeLa-Zellen erhalten wurden. Im Anschluss an die Inkubation der Proben mit Detektions-Duplexen wurden 25 µl Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer, der 1000 an Einfangreagens gebundene Protein-G-Beads enthielt, zu jedem Assay hinzu gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Beads werden dann mit 2-mal 200 µl-Volumen Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer gewaschen, um Haarnadel-Oligonukleotide zu entfernen, die nicht auf Bead-Oberflächen eingefangen wurden. Jeder Assay wird dann in 100 µl Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)-Konjugat (2 µg/ml in Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer) resuspendiert, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und unter Verwendung der Luminex 100-Instrumentierung analysiert.

[0083] TNF-stimulierte Extrakte enthalten NF-κB-p65-Protein, das einen Komplex mit Haarnadel-Oligonukleotiden ausbildet, die zur Detektion verwendet werden. Die NF-κB-p65-Haarnadel-Oligonukleotid-Komplexe werden durch die Anti-p65-Antikörper eingefangen, die auf Bead-Oberflächen immobilisiert sind, und NF-κB-p65-biotinylierte-DNA-Komplexe, die mit der Bead-Oberfläche verbunden sind, werden unter Verwendung von SA-PE detektiert.

Beispiel 4. Detektion von Proteinbindung an DNA mit Inhibition von sequenzspezifischer Spaltung.

[0084] In diesem Beispiel werden Typ II-Restriktionsendonukleasen verwendet mit Detektions-Duplexen, die Haarnadel-Oligonukleotide umfassen, die an Beads gekoppelt sind. Typ II-Restriktionsenzyme spalten doppelsträngige DNA an derselben Stelle, an der sie DNA erkennen und daran binden.

[0085] Haarnadel-Oligonukleotide (KBREHP, Biotin-TCCAAGGGATTCCCCAGTG-amino-C-6-TACTGGGAATCCCCTGGA), die überlappende Transkriptionsfaktor-(NF-κB) und Restriktionszym (EcoRI) – Bindestellen aufweisen, werden über Amino-C6 unter Verwendung von Standard EDC-Chemie an Bead-Oberflächen gekoppelt, wie zuvor beschrieben. Ungefähr 1000 der gekoppelten Beads werden pro 25 µl Assay verwendet. KBREHP-gekoppelte Beads werden für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 µg nuklearem Extrakt (erhalten aus Kontroll- und TNF-behandelten HeLa-Zellen) in einem 25 µl-Volumen Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer (10 mM Tris, pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂), der 250 ng Poly(dl-dC) und 0,5% Bovines Serumalbumin (Fraktion V) enthielt, inkubiert. Im Anschluss an die Bindung wurden die Reaktionen mit Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer auf 50 µl gebracht und mit 1 M MgCl₂ versetzt, um eine Endkonzentration von 10 mM MgCl₂ zu erhalten. Proben werden dann mit 10 µl Restriktionsendonuklease EcoRI für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. 50 µl Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)(2 µg/ml) werden zu jeder Reaktion hinzu gegeben und vor der Analyse unter Verwendung der Luminex 100-Instrumentierung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Aktives NF-κB-p50 bindet an DNA und schützt vor dem Verdau durch die EcoRI Endonuklease. NF-κB wird gemessen an dem Signal, das auf der Bead-Oberfläche zurückgehalten wird, quantifiziert.

Beispiel 5. Detektion von Proteinbindung an DNA mit Inhibition von sequenzspezifischer Spaltung durch Typ II-Restriktionsendonukleasen.

[0086] Detektions-Duplexe wurden zusammengesetzt durch die Hybridisierung von Oligonukleotiden, mit der Bezeichnung FOR (Biotin-AAGGATGAGCGGGGGATCCAATAGGCCTGCTTATCGGTCTAT), die eine NF-κB-Bindesteile, eine Fok I-Bindestelle und eine Markierungssequenz umfassen, mit Oligonukleotiden, mit der Bezeichnung bREV (CTATTGGGATCCCCGCTCATCCTT), die komplementär zu dem FOR-Oligonukleotid sind, denen aber eine komplementäre Markierungssequenz fehlt.

[0087] Die Hybridisierung der Oligonukleotid-Paare wurde wie folgt erreicht:

bREV und FOR wurden auf 1 µM beziehungsweise 40 µM in Puffer verdünnt, der 40 mM Tris. pH 7,5, 100 mM NaCl und 1 mM EDTA enthielt. Oligonukleotide wurden dann für eine Minute auf 95°C erhitzt, und man ließ sie über eine Zeitdauer von 45 Minuten auf Raumtemperatur abkühlen.

[0088] Bindung von Transkriptionsfaktoren wurde durchgeführt durch Inkubieren von 1 µl des hybridisierten Oligonukleotids mit rekombinantem NF-κB-p50 Transkriptionsfaktor (Promega, Katalognr.) in einem Gesamtvolumen von 15 µl Bindungspuffer (10 mM Tris, pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂), der 250 ng Poly(dl-dC) und 0,5% Bovines Serumalbumin (Fraktion V) enthielt. Im Anschluss an eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurde jeder Assay mit 15 µl Bindungspuffer, der mit 20 mM MgCl₂ versetzt war und 1 µl Fok I (4 Einheiten) oder 1 µl Fok I-Aufbewahrungspuffer enthielt, gemischt und für weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. 30 µl Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer, der Luminex-Beads (1000 Beads) enthielt, die mit einem einzelsträngigen Einfang-Oligonukleotid (ATAGACCGATAAGCAGCCGC) gekoppelt waren, wurden zu

jedem Assay hinzu gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die verdauten und unverdauten Detektions-Duplexen auf Bead-Oberflächen zu immobilisieren. Um biotinylierte Oligonukleotide, die mit Bead-Oberflächen verbunden waren, sichtbar zu machen, wurden 10 Minuten vor der Analyse unter Verwendung der Luminex 100-Instrumentierung 60 μ l Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) (2 μ g/ml) zu jeder Reaktion hinzu gegeben. Aktives NF- κ B-p50 bindet an DNA und schützt vor dem Verdau durch die Fok I Typ IIS-Restriktionsendonuklease. NF- κ B wird gemessen an dem zurückgehaltenen Signal quantifiziert.

Beispiel 6. Detektion von Proteinbindung an DNA durch Inhibition eines externen Spaltungsreagens.

[0089] Lambda-Exonuklease ist in hohem Maße spezifisch für doppelsträngige DNA, die eine 5'-Phosphatgruppe trägt, und hat eine in großem Maße reduzierte Aktivität gegenüber DNA, die nicht phosphoryliert ist. Der Lambda-Exonuklease-Verdau von DNA findet in der 5'-3'-Richtung statt.

[0090] Oligonukleotid PO4Kbfor (PO4-AGTTGAGGGATCCCCAGGAGCGGCTTATCGGTCTATTCAACT-CCCTAGGGG), das eine Markierungssequenz, eine NF- κ B-Bindestelle und eine 5'-Phosphatgruppe trägt, wurde mit dem biotinylierten komplementären Oligonukleotid biotinKBrev (TCCTGGGGATCCCCTCAACT-biotin) hybridisiert, dem die Einfangmarkierungssequenz fehlt.

[0091] Annealing wurde durchgeführt, indem zunächst 100 μ M Oligonukleotid-Stammlösungen mit Annealing-Puffer (40 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, und 1 mM EDTA) verdünnt wurden, um ein Verhältnis von 400 nM PO4Kbfor:10 μ M biotinKBrev zu erhalten. Das Oligonukleotidgemisch wurde dann für eine Minute auf 95°C erhitzt und über eine Zeitspanne von 45 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt, um ein doppelsträngiges Paar auszubilden, das eine einzelsträngige Markierungssequenz aufweist. Ungefähr 50 000 Beads, gekoppelt mit Einfangmarkierungssequenz, wurden mit 50 μ l des hybridisierten Oligonukleotids für eine Stunde bei Raumtemperatur hybridisiert. Beads wurden dann gewaschen, um nicht hybridisierte Oligonukleotide zu entfernen und in Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer resuspendiert.

[0092] DNA-Bindung an den p50 Transkriptionsfaktor wurde durchgeführt durch Inkubieren von 0,5 Gel-Retentionseinheiten von rekombinantem p50 (definiert als die Menge von p50, die erforderlich ist, um unter Verwendung eines konventionellen Gel-Retentionssassay (Promega) die Retention von 190 fmol doppelsträngigem NF- κ B-bindenden Oligonukleotid zu bewirken) (Promega, Katalognr. E3770) mit 1000 hybridisierten Beads in einem 20 μ l-Volumen Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer (10 mM Tris, pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂), der 250 ng Poly(dl-dC) und 0,5% Rinderserumalbumin (Fraktion V) enthielt. Im Anschluss an eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurden 20 μ l Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer, dem MgCl₂ auf 3 mM zugesetzt wurden, und der 3 Einheiten der Lambda-Exonuklease oder die gleiche Menge an Lambda-Exonuklease-Aufbewahrungspuffer enthielt, zu angemessenen Reaktionen hinzu gegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an den Enzymverdau wurden 10 Minuten vor der Analyse unter Verwendung der Luminex 11-Instrumentierung 40 μ l Streptavidin-PE-Konjugat (4 μ g/ml) in PBS, pH 7,5, zu den Proben hinzu gegeben. Ergebnisse dieses Experiments sind in [Fig. 13](#) dargestellt, die eine Dosis-Antwort des erhaltenen Signals zeigt mit der Menge von hinzu gegebenem DNA-Bindungsprotein.

Beispiel 7. Detektion von Proteinbindung an DNA durch Inhibition eines externen Spaltungsreagens und einer markierten Oligonukleotid-Sonde.

[0093] Einzelsträngige Oligonukleotide PO4P50 (5'-PO4-AGTTGAGGGATCCCCAAGGGCGAAGG-AACTCGACGTGGAGCCGTTT-aminoC6) mit einer Transkriptionsfaktorbindesequenz und einer Sonden-Einfangsequenz werden über Amino-C6 an Beads gekoppelt, wie zuvor beschrieben. Oligonukleotid PO4P50rev wird in Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer (10 mM Tris, pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂) für eine Stunde mit Beads hybridisiert, die an PO4P50 gekoppelt sind (1 pmol pro 1000 Beads). Die Beads werden dann gewaschen und in Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer auf eine Konzentration von 1000 Beads/ μ l resuspendiert. Bindungsreaktionen werden dann durch Inkubieren von 1000 Beads mit Proben in einem 20 μ l -Volumen Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer, der 0,35% BSA und 0,1–2 μ g Poly-(dl-dC) enthielt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss an die Bindungsreaktion werden 20 μ l Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer, der mit MgCl₂ auf 3 mM versetzt war, und der 3 Einheiten der Lambda-Exonuklease oder ein Äquivalent an Lambda-Exonuklease-Aufbewahrungspuffer enthielt, zu angemessenen Reaktionen hinzu gegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. 1 pmol der biotinmarkierten einzelsträngigen Sonden-DNA wird dann zu jeder Reaktion hinzu gegeben und mit Beads hybridisiert durch Erhitzen auf 95°C für eine Minute gefolgt von Abkühlen über eine Zeitspanne von 30 Minuten, um Raumtemperatur zu erreichen. Im Anschluss an die Hybridisierung der Sonde an beaglekoppelte DNA wurden Assays mit 2-mal 100 μ l SA-PE (2 μ g/ml) in PBS, pH 7,5, gewaschen. Im Anschluss an eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wur-

den die Assays unter Verwendung der Luminex 100-Instrumentierung analysiert.

Beispiel 7. Detektion von Proteinbindung an DNA durch direkte Markierung von Protein

[0094] Getrennt werden 10 µg Kontroll-Zellextrakt und 10 µg HeLa-Zellextrakte, versetzt mit 10 Gel-Retentionseinheiten von rekombinantem NF-κB-p50 in 20 µl Markierungspuffer (PBS, pH 8,0) suspendiert. 0,5 mg der wasserlöslichen Form von N-Hydroxysuccinimid-Biotin (NHS-Biotin) wurden zu jeder Markierungs-Reaktion hinzu gegeben. Mit dem Vortex-Schüttler mischen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren. 30 µl Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer (10 mM Tris, pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂) zu jeder Markierungs-Reaktion hinzu geben und nicht eingebautes NHS-Biotin durch Entsalzen über eine G-25 Spin-Säule entfernen. Eine Gel-Retentionseinheit der entsalzten und markierten Probe mit Beads inkubieren, die mit einem Haarnadel-Detektionsmolekül gekoppelt sind, das eine NF-κB-p50-Bindestelle trägt. Diese Inkubation wird in einem Gesamtvolumen von 20 µl Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer durchgeführt, der 100 ng Poly-(dl-dC) und 0,35% BSA, Fraktion V, enthält. Im Anschluss an eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, 80 µl Streptavidin-Phycoerythrin (2 µg/ml) in Transkriptionsfaktor-Bindungspuffer hinzu geben, 10 Minuten inkubieren und unter Verwendung der Luminex 100-Instrumentierung analysieren. Beads, die mit markiertem HeLa-Zellextrakt inkubiert wurden, das mit rekombinantem NF-κB-p50 versetzt war, haben im Vergleich zu Beads, die mit markierten HeLa-Zellextrakten inkubiert wurden, die nicht mit rekombinantem NF-κB-p50 versetzt waren, signifikantes Phycoerythrin-Signal, das mit ihrer Oberfläche verbunden ist.

Literaturangaben:

1. Kido et al., Clin Endocrinol Metab 2001. Mar 86(3):972-9.
2. Ferrannini et al., Eur J Clin Invest 1999. Oct 29(10):842-52.
3. Zhao et al., Mol Cell Endocrinol 2001. May 25; 177(1-2):125-34.
4. Braddock. Ann Med 2001 Jul 33(5):313-8.
5. Alizadeh et al., Nature 2000. Feb 3; 403(6769):503-11.
6. Takanami et al., Tumour Biol 2001. Jul-Aug 22(4):205-10.
7. Szybalski et al., Gene 1991. Apr 100:13-26.
8. Kuo et al., Ann NY Acad Sci 1994. Jul 29; 726:223-34; discussion 234-5.
9. Elbrecht et al., DNA 1985 Jun 4(3):233-40.
10. Peck et al., Nucleic Acids Res 1994. Feb 11; 22(3):443-9.
11. Brunet et al., Anal Biochem 1994. Oct 222(1):76-80.
12. Skulstad et al., Virus Res 1995 Aug 37(3): 253-70.
13. Dignam et al., Methods Enzymol 1983. 101:582-98.
14. Fujimaki et al., Opinions in Structural Biology 2001. Feb 11(1):26-32.
15. Morishita et al., Pharmacol Ther 2001. Aug 91 (2):105-14
16. Fruchart et al., Am J Cardiol 2001 Dec 20; 88(12 Suppl 1):24-9
17. Sporn et al., Trends Mol Med 2001. Sep 7(9):395-400.
18. Kersten et al., EMBO Rep 2001 Apr 2(4):282-6
19. Bamburger et al., Cancer Research 2000. Sep 15; 60(18):5012-6.
20. Salti et al., British Journal of Cancer 1999. Sep 81(1):133-40.
21. Aoyagi et al., Clin Cancer Res 1998. Sep 4(9):2153-60.
22. Shen et al., Biotechniques 2002 32(5):1168-1177.
23. Lam et al., American Biotechnology Laboratory July 2002.
24. Ausubel, F.M. et al., (1989) In: Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, John Wiley and Sons. New York.
25. Juan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993 April 1; 90 (7):2584-2588.
26. Shen et al., Biotechniques 2002 32(5):1168-1177.
27. Shalon et al., Genome Research 1996 6(7):639-645.
28. Fulton et al., Clinical Chemistry 1997 43:1749-1756.

[0095] Fachleute werden erkennen oder in der Lage sein, unter Verwendung von nicht mehr als Routine-Experimenten, viele Äquivalente zu den spezifischen Ausführungsformen der hier beschriebenen Erfindung zu ermitteln. Derartige Äquivalente sollen von den folgenden Ansprüchen umfasst werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Detektieren einer Mehrzahl von sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen, welches folgendes umfaßt:

(a) Inkontaktbringen einer Mehrzahl von Detektions-Duplexen, wobei jeder der Detektions-Duplexe (i) ein erstes Oligonukleotid umfaßt, welches eine unterscheidbare Einfangmarkierung umfaßt, wobei die Einfangmarkierung eine Nukleinsäuresequenz von natürlichen Nukleotiden ist, die durch natürliche Verknüpfungen zwischen Nukleotiden verknüpft sind, und (ii) ein zweites Oligonukleotid umfaßt, welches zu dem ersten Oligonukleotid komplementär ist, wobei das zweite Oligonukleotid eine detektierbare Markierung umfaßt, mit einem Zell- oder Gewebeextrakt, von dem angenommen wird, daß er eine Mehrzahl von sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen enthält, für eine Zeitdauer, die ausreichend ist, um sequenzspezifische Bindung zwischen dem Duplex und den Bindungsproteinen zu erlauben,

(b) Inkontaktbringen des Gemischs aus Stufe (a) mit einem Spaltungsreagens, welches zur Spaltung des Detektions-Duplex in der Lage ist, wobei die Spaltung des Detektions-Duplex durch Bindung des DNA-Bindungsproteins an den Duplex gehemmt wird,

(c) Einfangen des resultierenden Gemischs auf einem festen Träger durch Hybridisieren der Einfangmarkierung an ein komplementäres Oligonukleotid auf dem festen Träger und

(d) Detektieren der Inhibition der Spaltung durch das DNA-Bindungsprotein durch Detektieren des Vorliegens oder Nichtvorliegens der Markierung auf dem festen Träger.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Markierung Biotin, Digoxigenin, ein Peptid, ein Protein, ein kleines Molekül, ein radioaktives Isotop, einen fluoreszierenden Rest, eine chemilumineszente Markierung, eine biolumineszente Markierung oder ein Enzym, welches zur Erzeugung eines Signals in der Lage ist, umfaßt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei jeder Detektions-Duplex an einer vorbestimmten Position auf einer festen Oberfläche eingefangen wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei jeder Detektions-Duplex auf einem unterscheidbaren Kugelchen eingefangen wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Spaltungsreagens ein nichtsequenzspezifisches Spaltungsreagens ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Spaltungsreagens eine Endonuklease ist.

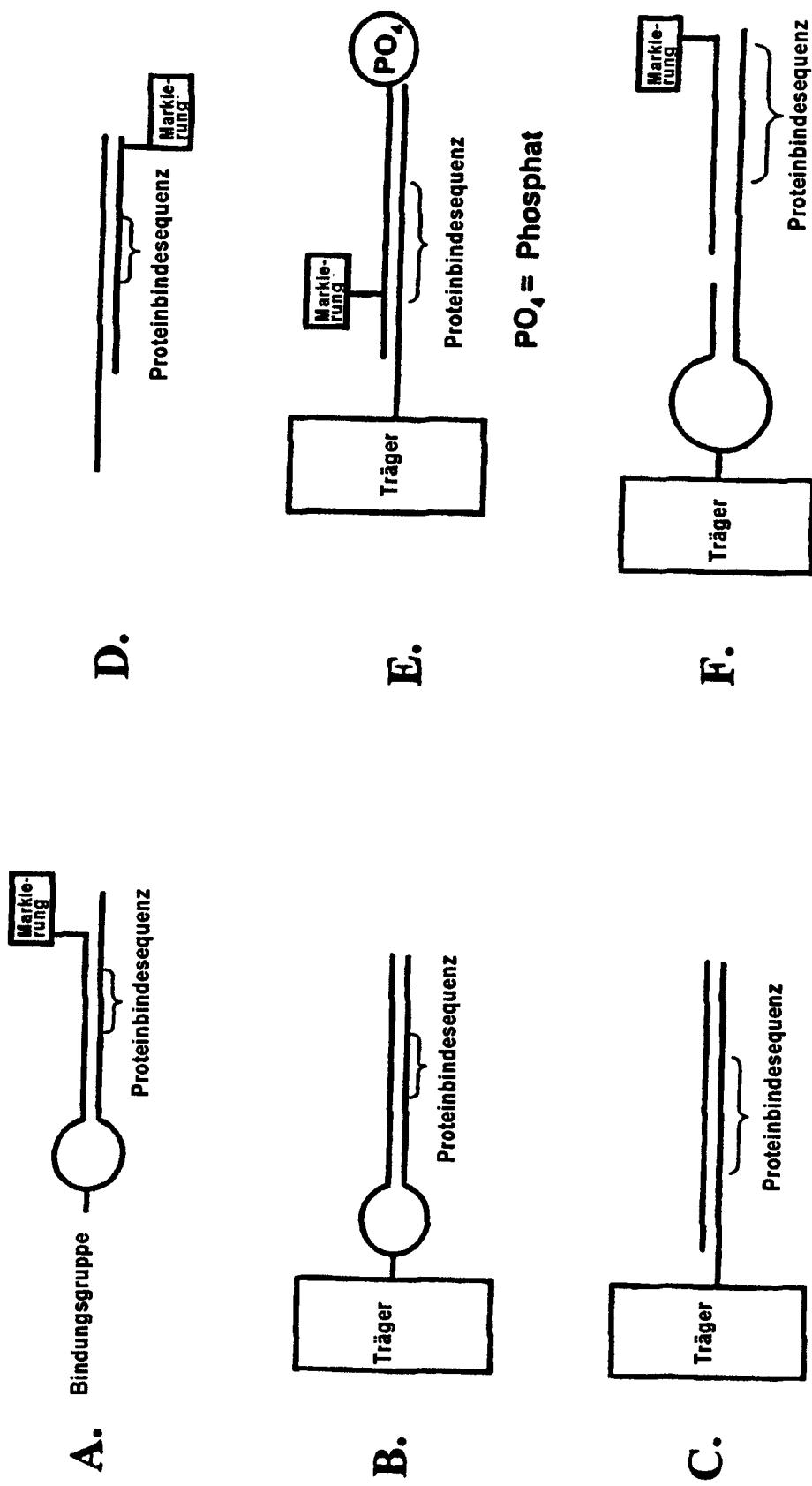
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Spaltungsreagens eine Präferenz für doppelstrangige Nukleinsäuren hat.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Spaltungsreagens ein sequenzspezifisches Spaltungsreagens ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nuklease eine Exonuklease ist, der eine signifikante Endonukleaseaktivität fehlt.

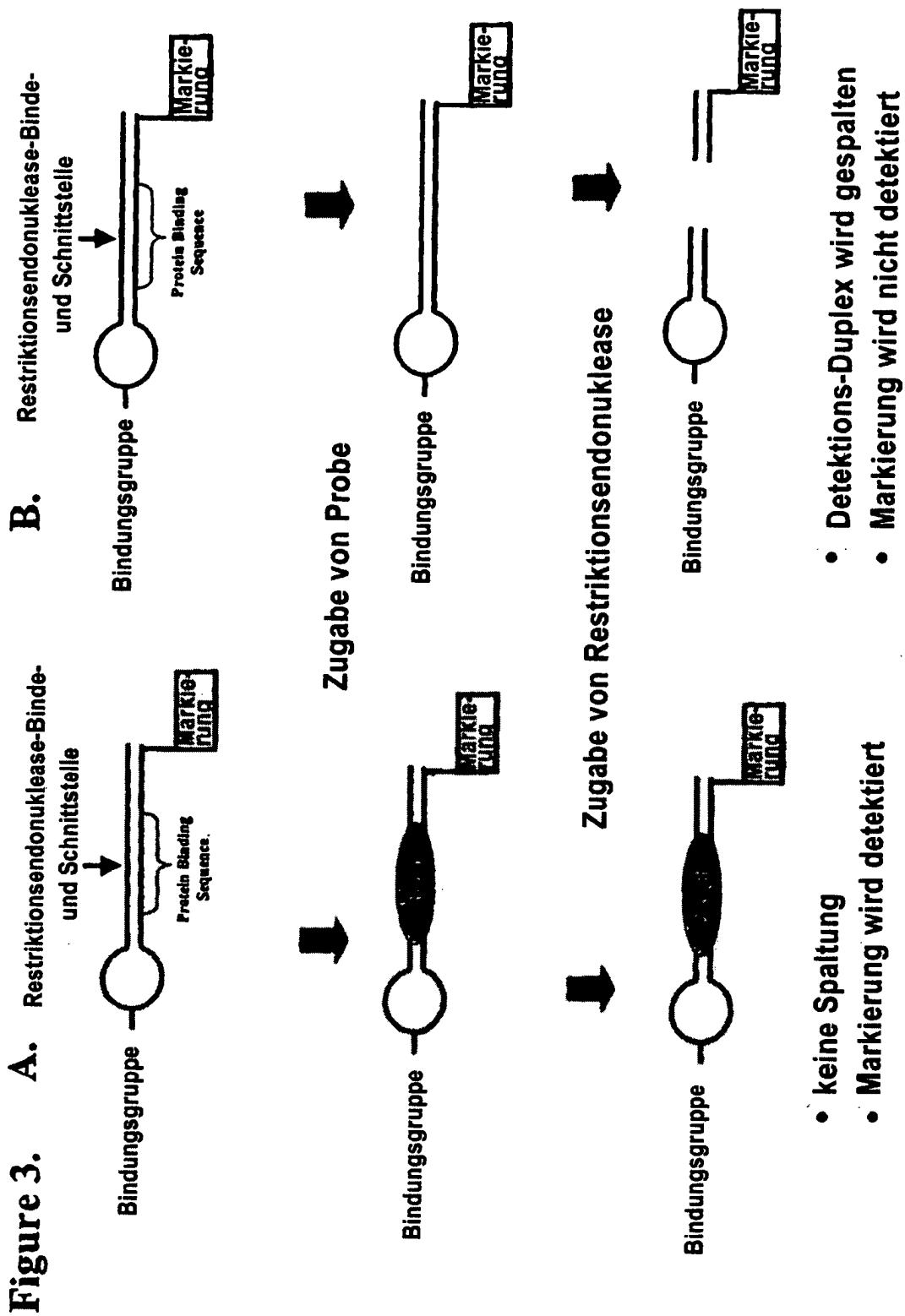
Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

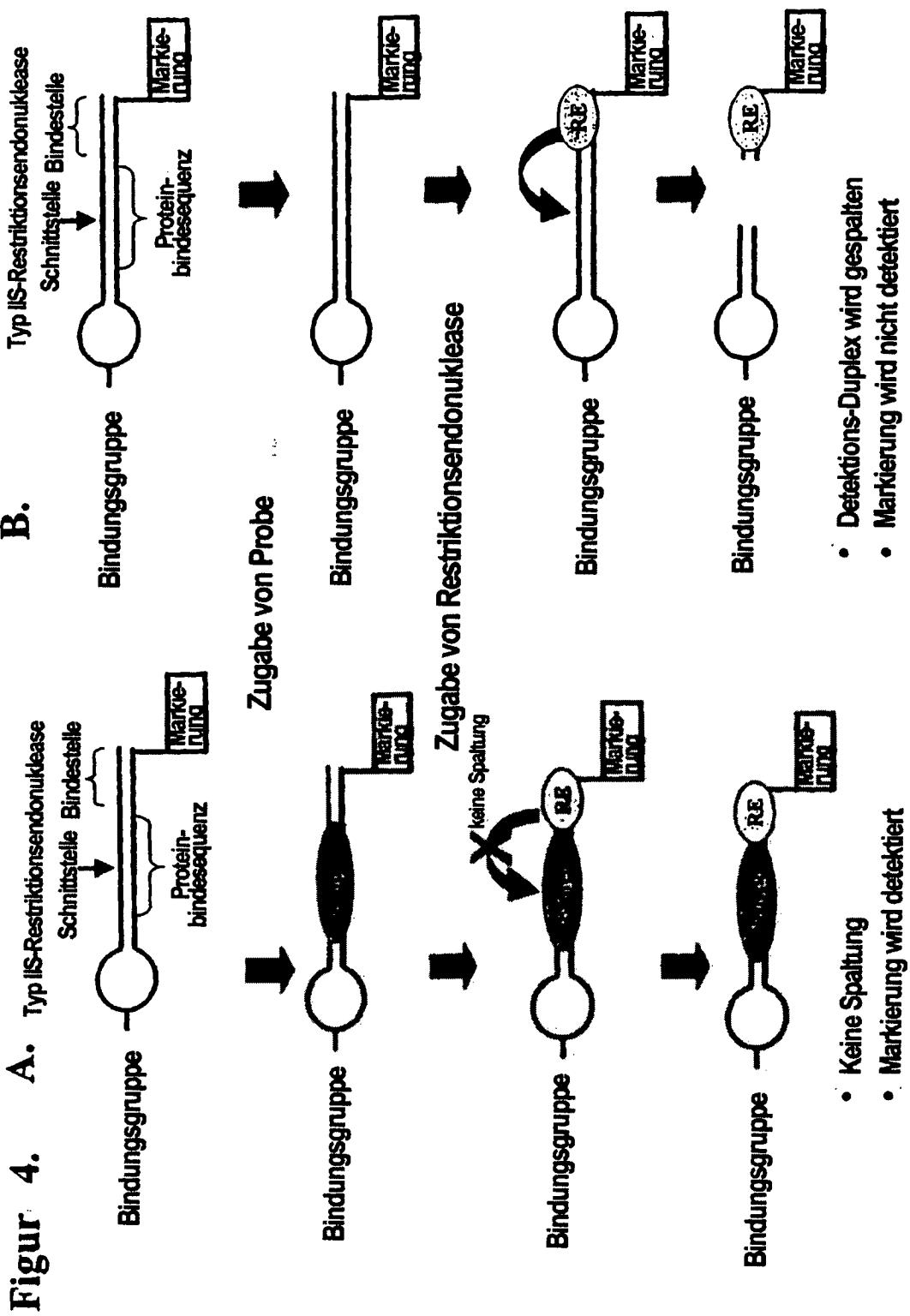
Figur 1. Beispiele für Detektions-Duplexe



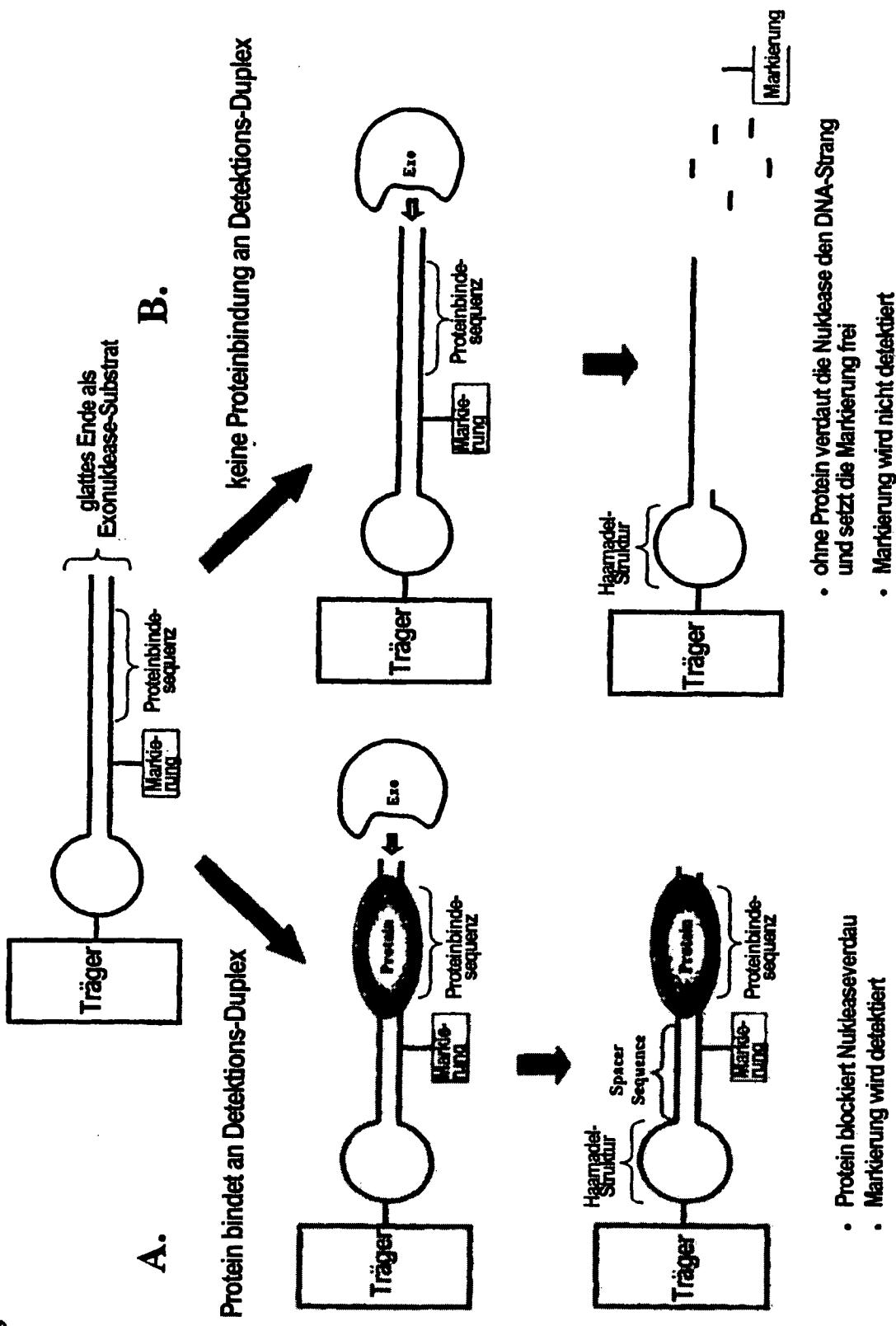
Figur 2. Eigenschaften von externen Spaltungsreagenzien

Enzym	Polarität	DNA -Substrat		Struktur			erzeugte Produkte	
		ss	ds	5' PO ₄	5'ext	3'ext	blunt	nick
Lambda Exonuklease	5'→3'	+/-	+	ja	+/-	+	+	-
T7 Exonuklease	5'→3'	-	+	nein	+/-	+	+	ss DNA, dNMP, dinuc
Exonuklease III	3'→5'	-	+	nein	+	+/-	+	ss DNA, dNMP
Exonuklease I	3'→5'	+	-	nein	-	+/-	+/-	NR dNMP, Dinukleotid
Exonuklease T	3'→5'	+	-	nein	-	+	+/-	NR dNMP
BAL-31 Nuklease	3'→5'	+	+	nein	+	+	+	ss DNA, dNMP

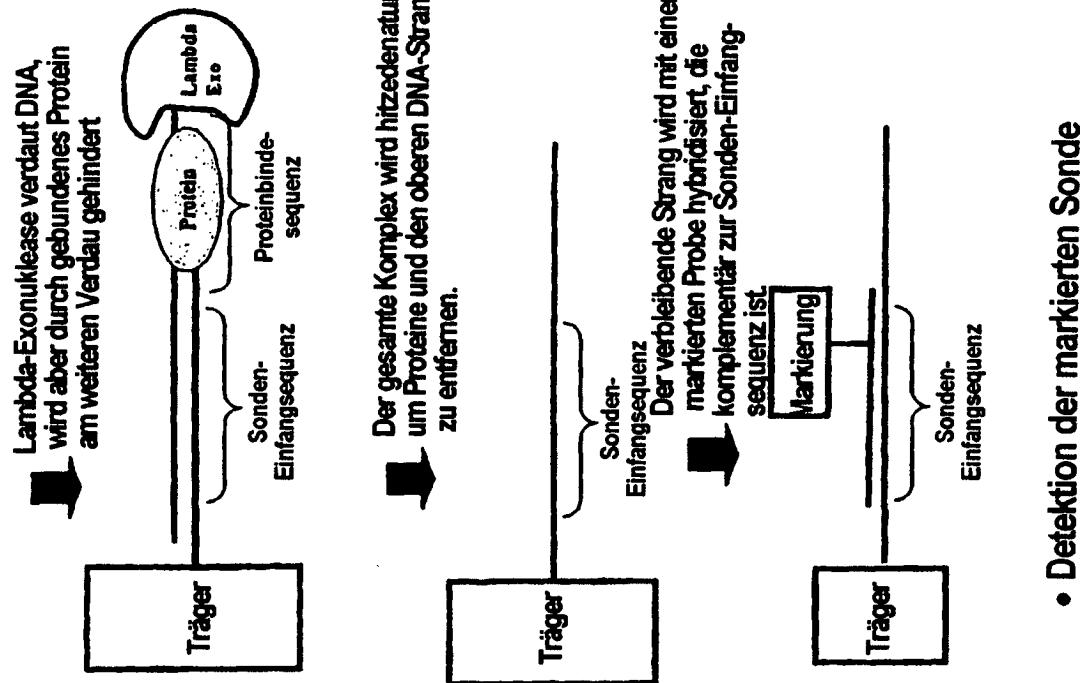
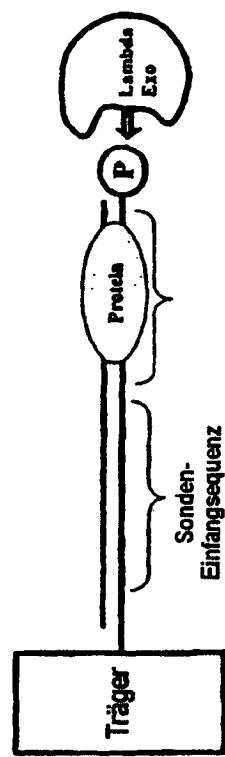
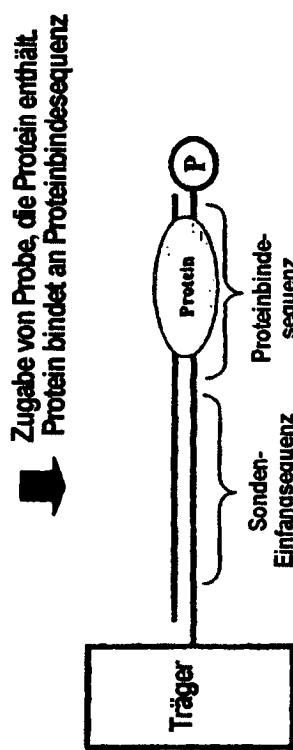
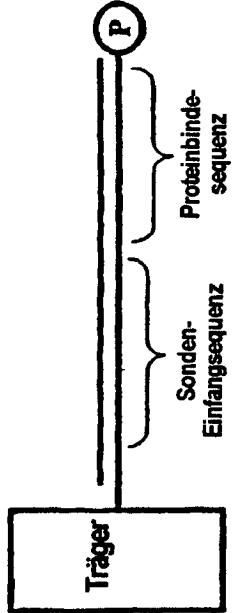




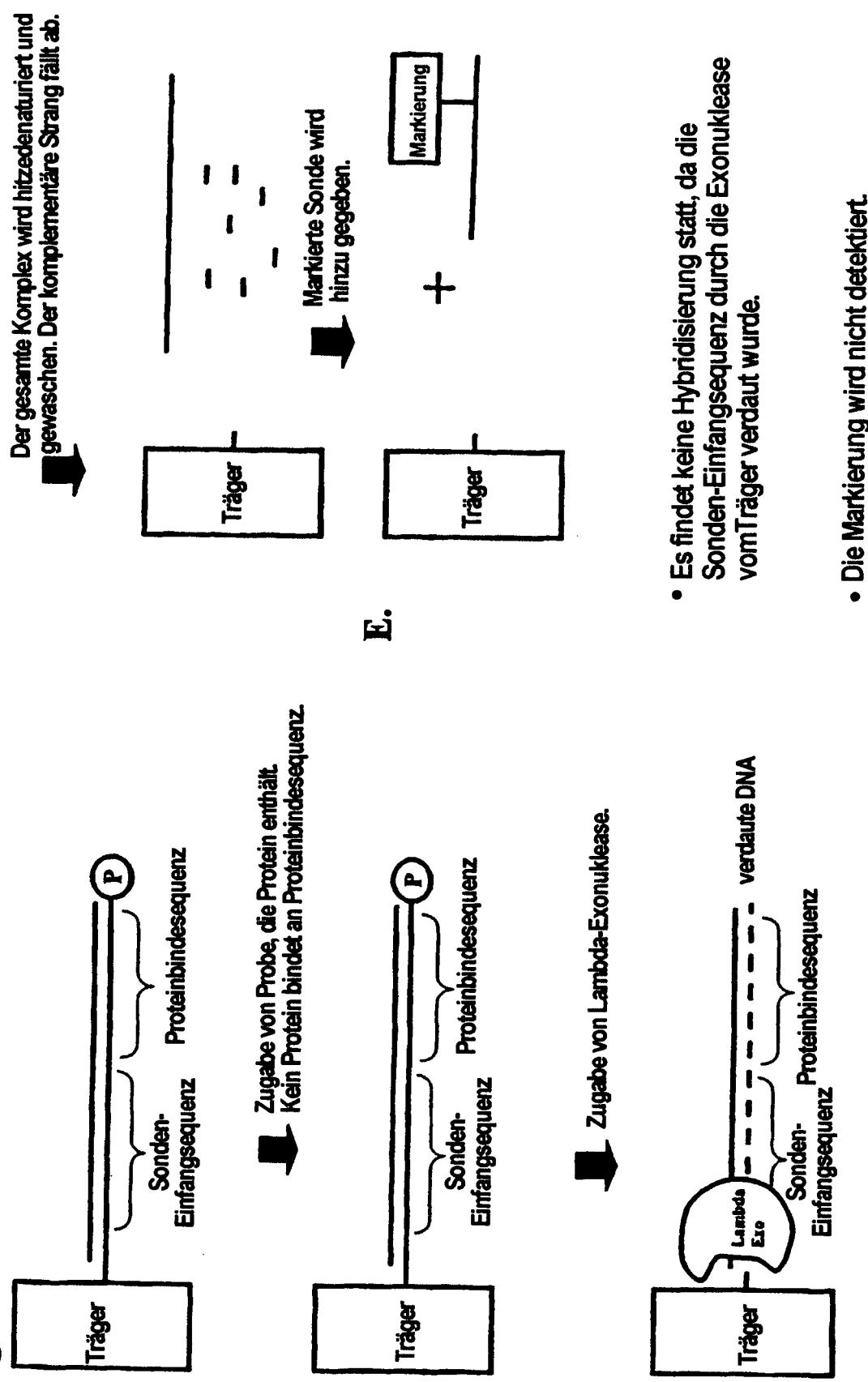
Figur 5.

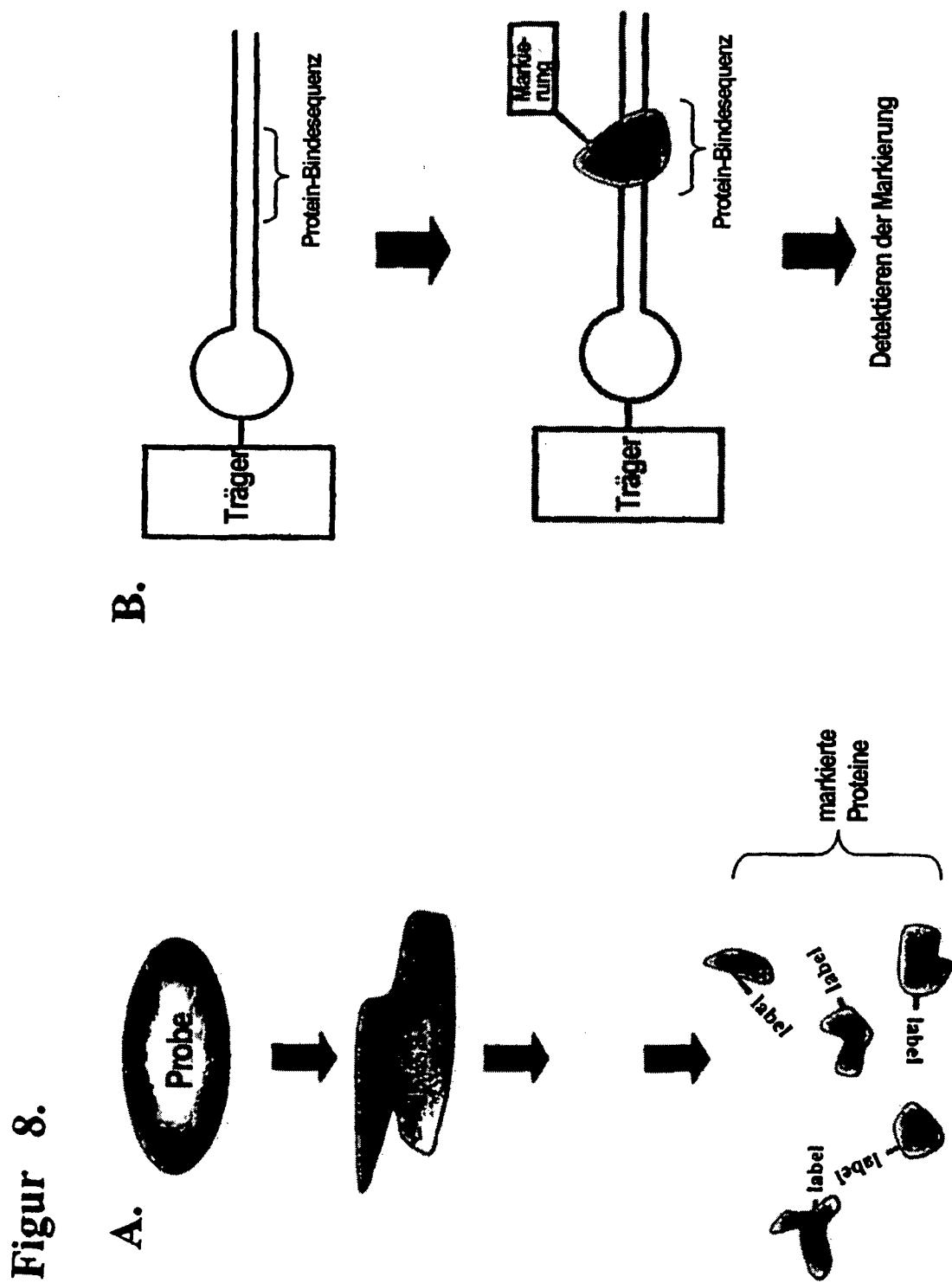


Figur 6.

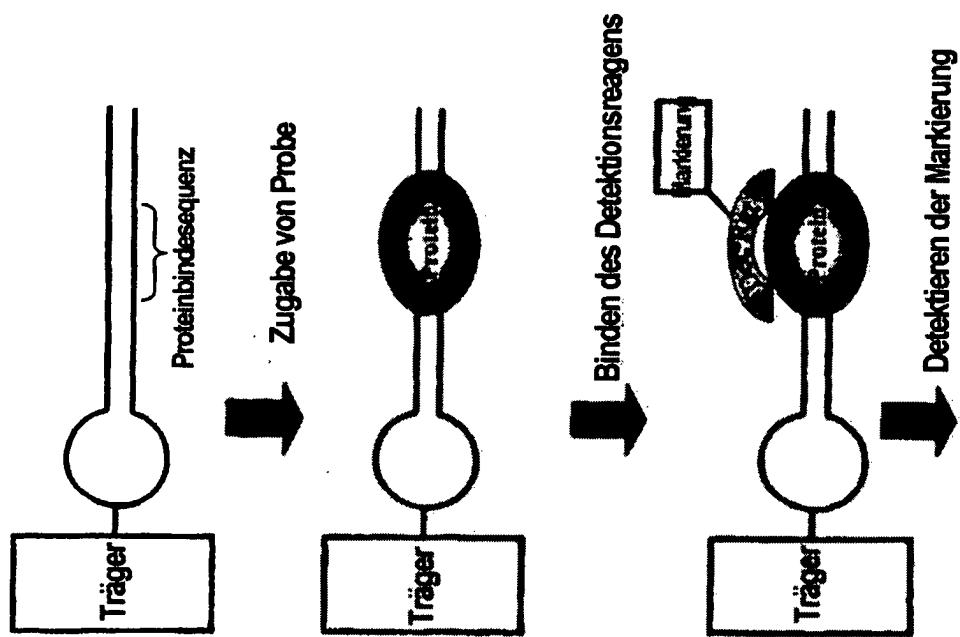


Figur 7.





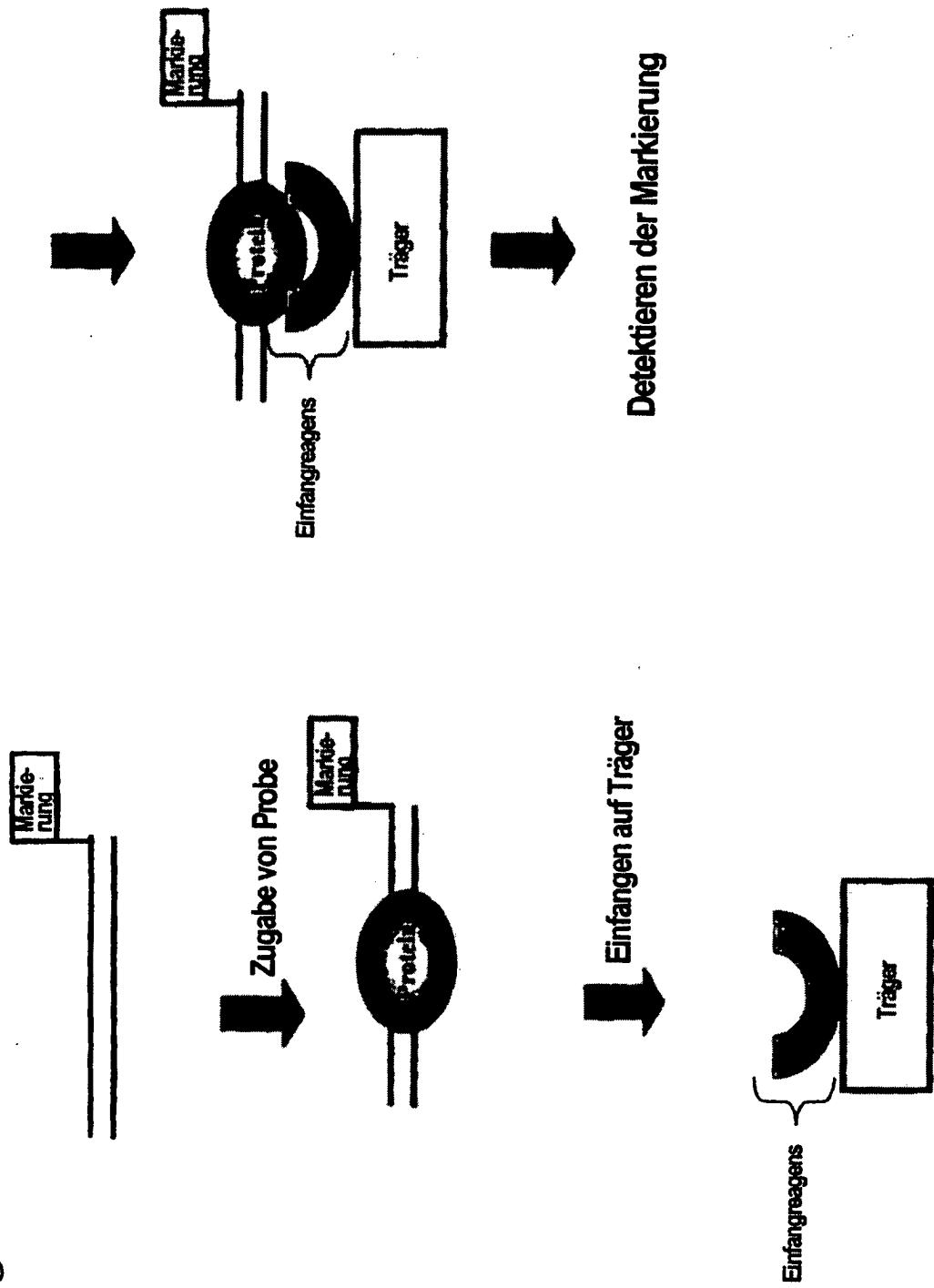
Figur 9.

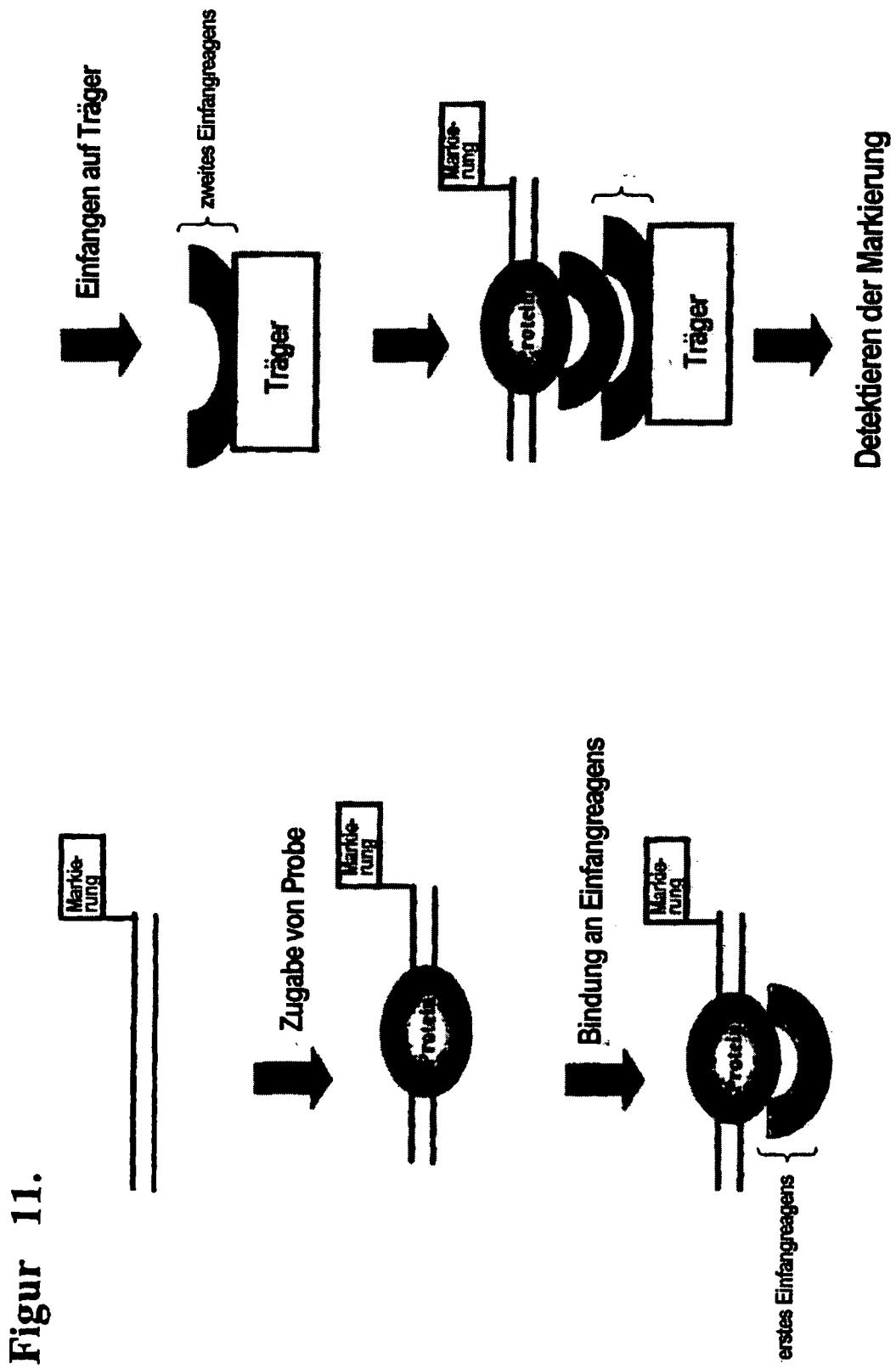


Detektionsreagens (Det.-Reag.) kann umfassen:

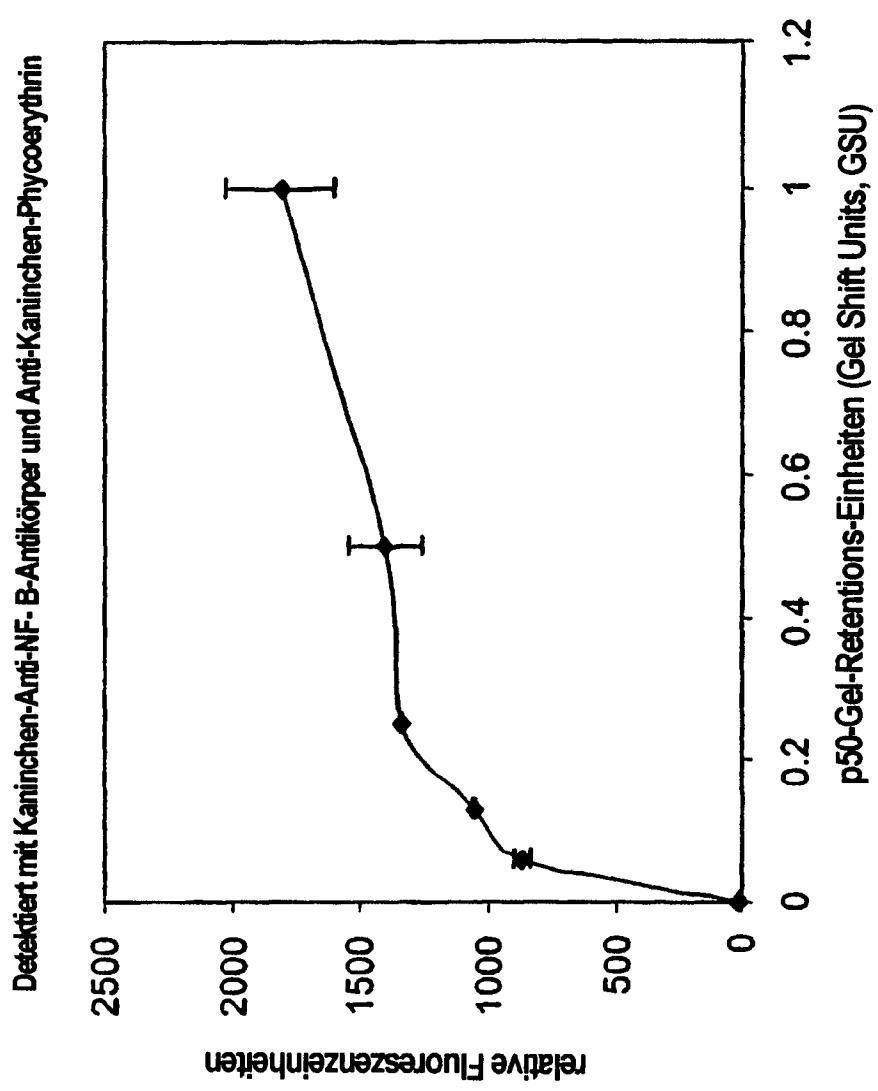
- Antikörper spezifisch für ein einziges Protein
- Antikörper gegen Klassen von Proteinen
- Antikörper gegen Phospho-Aminosäuren
- Proteine, die an ein spezifisches Proteinnmotiv binden
- Gemische von Antikörpern
- Proteinfarbmittel
- Phospho-Protein-Farbmittel
- Eine beliebige Gemisch-Kombination des oben genannten
- Sekundärreagenzien können verwendet werden, um das Detektionsreagens oder die Markierung zu detektieren.

Figur 10.

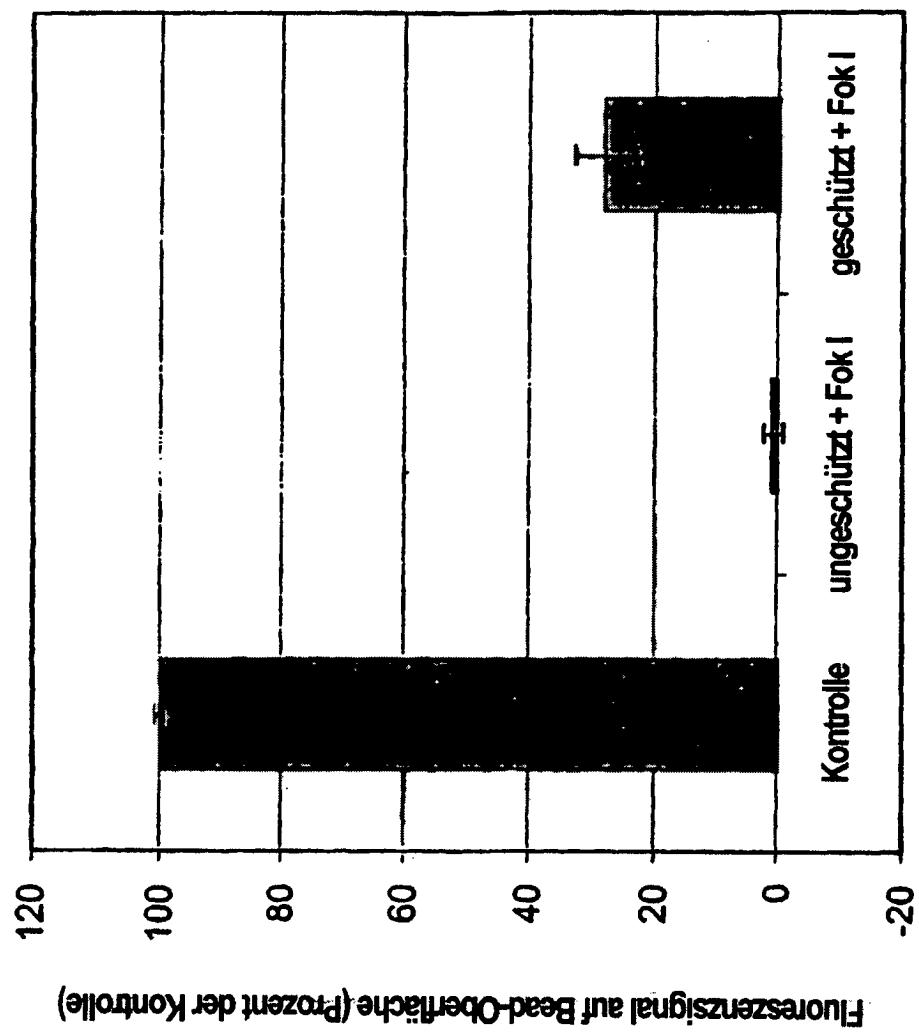




Figur 12. Dosis-Antwort der NF- B-Bindung an auf Beads immobilisierte Detektions-Duplexe



Figur 13. Detektion von NF- B-p50-Protein durch Schutz des Detektions-Duplex vor Verdau durch das Typ IIIS-Restriktionsenzym Fok I



Figur 14. Detektion von NF- B-p50-Protein durch Schutz des Detektions-Duplex vor Verdau durch Lambda-Exonuklease

