



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **281 421 A5**

5(51) C 12 Q 1/48
G 01 N 33/535

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 Q / 306 367 5	(22)	26.08.87	(44)	08.08.90
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Hunger, Hans-Dieter, Dr. rer. nat.; Behrendt, Gerhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Schmidt, Gerhard, Dr. rer. nat., DD				
(73)	siehe (71)				
(54)	Markierte molekulare Sonden und Verfahren zu deren Herstellung				

(55) molekulare Sonden; Markierung; Aminoglycosid-Phosphotransferasen; Nachweis von Biomolekülen; Aminoglycosid-Antibiotika, molekularbiologische Techniken; Kopplung; Fusionsproteine

(57) Diese Erfindung betrifft durch Aminoglycosid-Phosphotransferasen markierte molekulare Sonden, die zum Nachweis von Biomolekülen durch Übertragung radioaktiv markierter Phosphate auf Aminoglycosid-Antibiotika als Substrat in molekularbiologischen Techniken verwendet werden. Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Kopplung von Aminoglycosid-Phosphotransferasen an molekulare Sonden mit oder ohne Spacer durch kovalente, ionische Bindungen oder elektrostatische Wechselwirkungen sowie gentechnisch hergestellte Fusionsproteine aus Enzym und Protein als molekularer Sonden.

Patentansprüche:

1. Markierte molekulare Sonden aus molekularer Sonde und markierendem Enzym, **gekennzeichnet dadurch**, daß molekulare Sonden an Aminoglucosid-Phosphotransferasen direkt oder über einen Spacer gekoppelt sind.
2. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die molekularen Sonden immunreaktive Sonden sind.
3. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die immunreaktiven Sonden mono- oder polyklonale Antikörper, Antiseren, Proteine oder Peptide sind.
4. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Protein Protein A ist.
5. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die molekularen Sonden natürlich vorkommende, chemisch hergestellte oder gentechnisch erzeugte Nucleinsäuren oder deren Derivate oder Fragmente davon sind.
6. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Nucleinsäuren einsträngige DNS oder Fragmente davon, doppelsträngige oder partiell doppelsträngige DNS oder Fragmente davon, Oligodesoxyribonucleotide, RNS oder Fragmente davon oder Oligoribonucleotide sind.
7. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Nucleinsäuren gentechnisch erzeugte Hybridisationssonden sind.
8. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die molekularen Sonden Proteine mit spezifischer Affinität zu einem anderen Biomolekül sind.
9. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Protein Streptavidin, Avidin oder ein kopplungsfähiges Enzym ist.
10. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die molekularen Sonden chemische Verbindungen mit Affinität zu einem Biomolekül sind.
11. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß die chemische Verbindung Biotin ist.
12. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Aminoglucosid-Phosphotransferase Neomycin-Phosphotransferase I oder II sind.
13. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die molekulare Sonde an das Enzym über eine kovalente Bindung oder über einen Spacer mit kovalenten Bindungen gekoppelt ist.
14. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Sonde an das Enzym über Glutaraldehyd, Benzochinon, Bis-succinimidylester, Bisimidate und/oder Azide gekoppelt ist.
15. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, 13 oder 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Spacer zwischen molekularer Sonde und Aminoglucosid-Phosphotransferase zwischen 1 und 150 Atomen lang sind und ggf. eine oder mehrere Ringstrukturen enthalten.
16. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, 13 oder 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Spacermolekül photochemisch, reduktiv oder hydrolytisch spaltbar ist.
17. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kopplung reversibel ist.
18. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die molekulare Sonde und das Enzym über ionische Bindungen gekoppelt sind.
19. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß die molekulare Sonde und das Enzym über Polyethylenimin gekoppelt sind.
20. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die molekulare Sonde und das Enzym über hydrophobe oder andere elektrostatische Wechselwirkungen gekoppelt sind.
21. Markierte molekulare Sonden nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die markierten molekularen Sonden Fusionsproteine aus einem Protein und einer Aminoglucosid-Phosphotransferase sind.
22. Verfahren zur Herstellung markierter molekularer Sonden, **gekennzeichnet dadurch**, daß an eine molekulare Sonde oder ein Gemisch molekularer Sonden eine Aminoglucosid-Phosphotransferase gekoppelt wird.

23. Verfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet dadurch**, daß als molekulare Sonde eine immunreaktive Sonde eingesetzt wird.
24. Verfahren nach Anspruch 23, **gekennzeichnet dadurch**, daß als immunreaktive Sonde ein mono- oder polyklonaler Antikörper, ein Antiserum, ein Protein oder ein Peptid eingesetzt wird.
25. Verfahren nach Anspruch 24, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Protein Protein A eingesetzt wird.
26. Verfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet dadurch**, daß als molekulare Sonde eine oder mehrere natürlich vorkommende, chemisch hergestellte oder gentechnisch erzeugte Nucleinsäuren oder deren Derivate oder Fragmente eingesetzt werden.
27. Verfahren nach Anspruch 26, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Nucleinsäuren einsträngige DNS oder Fragmente davon, doppelsträngige oder partiell doppelsträngige DNS oder Fragmente davon, Oligodesoxytribonucleotide, RNS oder Fragmente davon oder Oligoribonucleotide eingesetzt werden.
28. Verfahren nach Anspruch 26, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Nucleinsäuren gentechnisch erzeugte Hybridisationssonden eingesetzt werden.
29. Verfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet dadurch**, daß als molekulare Sonden Proteine mit spezifischer Affinität zu einem Biomolekül eingesetzt werden.
30. Verfahren nach Anspruch 29, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Proteine Avidin, Streptavidin oder kopplungsfähige Enzyme eingesetzt werden.
31. Verfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet dadurch**, daß als molekulare Sonde eine chemische Verbindung mit Affinität zu einem Biomolekül eingesetzt wird.
32. Verfahren nach Anspruch 31, **gekennzeichnet dadurch**, daß als chemische Verbindung Biotin eingesetzt wird.
33. Verfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Aminoglucosid-Phosphotransferase Neomycin-Phosphotransferase I oder II eingesetzt wird.
34. Verfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kopplung der Aminoglucosid-Phosphotransferase an die molekulare Sonde durch die Herstellung einer oder über Spacer mehrerer kovalenter Bindungen erfolgt.
35. Verfahren nach Anspruch 34, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Kopplung Glutaraldehyd, p-Benzochinon, Bis-succinimidylester, Bisimidate und/oder Azide eingesetzt werden.
36. Verfahren nach Anspruch 22, 34 und 35, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Spacer 1 bis 150 Atome lange Gruppierungen mit ggf. einer oder mehreren Ringstrukturen eingesetzt werden.
37. Verfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kopplung der Aminoglucosid-Phosphotransferase an die molekulare Sonde durch die Herstellung ionischer Bindungen oder durch eine oder mehrere chemische Verbindungen, die zu beiden Komponenten ionische Bindungen ausbilden, erfolgt.
38. Verfahren nach Anspruch 37, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Kopplung Polyethylenimin eingesetzt wird.
39. Verfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kopplung über hydrophobe oder andere elektrostatische Wechselwirkungen erreicht wird.
40. Verfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet dadurch**, daß als markierte molekulare Sonden gentechnisch hergestellte Fusionsproteine aus einem Protein und einer Aminoglucosid-Phosphotransferase eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Diese Erfindung betrifft an molekulare Sonden gekoppelte Aminoglucosid-Phosphotransferasen und Verfahren zu ihrer Herstellung. Die erfindungsgemäßen Kopplungsprodukte werden vor allem in Nachweismethoden für DNS, RNS oder Proteine in der Medizin, Molekularbiologie, Genetik, Mikrobiologie, Phytopathologie, Landwirtschaft und im Veterinärwesen eingesetzt.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Als molekulare Sonden werden eine Vielzahl von chemischen Verbindungen und Biomolekülen bezeichnet, die spezifische Affinität zu anderen Biomolekülen aufweisen und deshalb zu deren Nachweis oder affinitätschromatographischer Reinigung geeignet sind. Zu diesen Sonden zählen.

- immunreaktive Sonden, z.B. Antikörper, Antiseren, immunologisch reaktive Proteine;
- Hybridisationssonden, z.B. Nucleinsäurefragmente unterschiedlicher Kettenlänge, DNS- und RNS-Moleküle;
- Proteine, die eine spezifische Affinität zu einem anderen Biomolekül besitzen, z.B. Avidin oder Streptavidin;
- organische Verbindungen, die eine spezifische Affinität zu Biomolekülen besitzen, z.B. Biotin.

Der Nachweis spezifischer Biomoleküle (Zielformen) erfolgt in der Molekularbiologie durch Reaktion der Zielformen mit den molekularen Sonden (z. B. durch Immunreaktion, Hybridisierung), wobei die Sonden entweder direkt markiert (z. B. radioaktiv, Fluoreszenzfarbstoffe) oder mit einem zweiten Nachweissystem gekoppelt sind, das durch eine weitere, spezifische Reaktion zum Nachweis der Zielformen führt (z. B. Farbstoffabscheidung und anschließende photographische Auswertung). Diese Nachweisverfahren sind in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben und stellen den bekannten Stand der Technik dar. Innerhalb dieser Nachweisverfahren spielt die Kopplung von Enzymen an die Sonden eine zunehmende Rolle, siehe z. B. *Immunochemical Techniques*, Hrsg. S. Avrameas et al., Amsterdam (Elsevier Science Publishers) 1983 und *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 15, Hrsg. R. H. Burdon und P. H. van Knippenberg, Kapitel 11, *Preparation of Enzyme-Antibody or Other Enzyme Macromolecule Conjugates*, S. 221-278, Amsterdam usw. (Elsevier Science Publishers) 1985. Eine Vielzahl von Enzymen wurde z. B. an Antikörper gekoppelt (S. Avrameas, T. Ternynck, J. L. Guesdon, *Scand. J. Immunol.* (1978) 8, Suppl. 7, S. 7-23): alkalische Phosphatase, Galactosidase, Glucoamylase, Glucoseoxidase, Glucuronidase, Lactatdehydrogenase, Lactoperoxidase, Peroxidase, Ribonuclease, Tyrosinase. Nach Avrameas et al., loc. cit., müssen Enzyme, die zur Kopplung an molekulare Sonden verwendet werden sollen, bestimmte allgemeine Anforderungen erfüllen:

1. hohe spezifische Aktivität und Durchsatzrate des Substrates;
 2. gute Stabilität bei Raumtemperatur und bei Arbeitstemperatur;
 3. kein oder geringer Aktivitätsverlust nach der Kopplung;
 4. leichte Zugänglichkeit in hochreiner Form aus leicht zugänglichen Materialien oder einfache Präparation.
- Diese Anforderungen werden von den bisher verwendeten Enzymen nur teilweise erfüllt. Die am meisten verwendeten Enzyme bei Nachweisreaktionen sind Peroxidase und alkalische Phosphatase. Die relativ geringe Thermostabilität der Enzyme bereitet dabei besonders beim Ansatz in Hybridisationsreaktionen (z. B. 48 Stunden bei 65°C) Schwierigkeiten bzw. macht einen Einsatz ganz unmöglich.

Ein weiterer Nachteil der bisher verwendeten Enzyme besteht darin, daß zum Nachweis im allgemeinen Farbreaktionen genutzt werden, wobei eine relativ geringe Nachweisempfindlichkeit erreicht wird. Die Übertragung von ^{32}P -markiertem Phosphat würde einen wesentlich empfindlicheren Nachweis als bei den beschriebenen Verfahren erlauben. Die Übertragung von ^{32}P -markiertem Phosphat auf ein Substrat mittels eines an eine Sonde gekoppelten Enzyms wurde bisher jedoch nicht beschrieben.

Bei der Kopplung von Enzymen an molekulare Sonden werden als Kopplungsreagenzien in der Regel bifunktionelle Moleküle mit gleichen funktionellen Gruppen, z. B. Glutaraldehyd (siehe z. B. S. Avrameas, *Bull. Soc. Chim. Biol.* [1968] 50, S. 1169 ff.), Benzochinon (siehe z. B. M. Renz, Ch. Kurz [1984], *Nucl. Acids Res.* 8, 3435-3444), Bisimidoeester (siehe z. B. W. C. Mentzer et al., *J. Protein Chem.* [1982] 1, 141-155), oder mit unterschiedlichen Gruppen, z. B. Azidoaryloxysuccinimide (siehe z. B. T. H. Ji und J. Ji, *Anal. Biochem.* [1982] 121, S. 286-289), Azidoarylglyoxal (siehe z. B. S. M. Politz, H. F. Noller, P. D. McWirther, *Biochemistry* [1981] 20, 372-378) oder Azidoarylthiophthalimid (siehe z. B. R. B. Moreland et al., *Anal. Biochem.* [1982] 121, 321-326). Zunehmende Bedeutung gewinnt das System Biotin-Avidin (Streptavidin), da durch seine Anwendung eine kaskadenartige Verstärkung bis zum Faktor 8 erfolgen kann (siehe z. B. USP 4.463.090). Dabei wird als Nachweissystem meist mit an Streptavidin oder Biotin gekoppelter Peroxidase oder alkalischer Phosphatase gearbeitet, so daß wieder eine Farbreaktion zum Nachweis genutzt wird.

In den z. B. empfindlichsten Hybridisationsverfahren (z. B. Nachweis einzelner Gene aus menschlicher DNS) sind diese nicht-radioaktiven Nachweisverfahren mit an Sonden gekoppelten Enzymen noch klar den Nachweisverfahren mit direkt radioaktiv markierten Nukleinsäuresonden unterlegen. Speziell auf diesem Gebiet werden Methoden mit wesentlich höherer Nachweisempfindlichkeit benötigt.

Mit den bisher bekannten Sonden lassen sich einerseits nur Verstärkungen bis zum Faktor 8 unter Nutzung der Kaskade mit Biotin/Avidin erreichen, wobei aber an ein und demselben festen Träger gearbeitet wird. Bei Nachweisverfahren unter Abscheidung eines Farbstoffes ist eine solche Verstärkung nicht möglich, außerdem wird durch die niedergeschlagenen Farbstoffe oftmals eine Wiederverwendung der Biomoleküle unmöglich gemacht.

Der Nachweis mit enzymgekoppelten Sonden ist bisher an Färbefahrten gebunden, bei denen die höhere Nachweisempfindlichkeit der autoradiographischen Methode nicht genutzt wird. Für einen radioaktiven Nachweis mit Verstärkung des Signals stehen gegenwärtig keine Enzyme zur Verfügung, die den Bedingungen aller Reaktionsschritte gewachsen sind.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, eine enzymmarkierte molekulare Sonde zu entwickeln, die gegenüber bekannten Sonden eine höhere Nachweisempfindlichkeit bietet.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein phosphorylierendes Enzym an eine molekulare Sonde zu koppeln, das den Anforderungen an ein kopplungsfähiges Enzym genügt.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß molekulare Sonden an Aminoglucosid-Phosphotransferasen direkt oder über einen Spacer gekoppelt werden.

Es wurde überraschend gefunden, daß Aminoglucosid-Phosphotransferasen Eigenschaften aufweisen, die sie zur Verwendung beim Nachweis von Biomolekülen unter Signalverstärkung besonders geeignet machen. Diese besonderen Eigenschaften sind:

- eine hohe Thermostabilität; die Enzyme behalten auch nach Erwärmen auf 100°C ihre Aktivität, erfüllen die Anforderungen an Lagerstabilität und gewährleisten lange Inkubationszeiten sowohl während Erkennungsreaktionen von Biomolekül und Sonde als auch während der Reaktion des Enzyms mit dem Substrat;
- Detergenzien-Stabilität; diese Enzyme sind im Gegensatz zu anderen Enzymen trotz Veränderung ihrer Sekundärstruktur durch Detergenzien noch enzymatisch aktiv;

- hohe spezifische Aktivität; durch Übertragung von ^{32}P -markiertem Phosphat auf ein Substrat lassen sich radioaktiv hochmarkierte Substrate herstellen;
- leichte Zugänglichkeit; die Aminoglucosid-Phosphotransferasen können relativ leicht aus Zellysaten von Mikroorganismen gewonnen werden.

Die Fähigkeit der Aminoglucosid-Phosphotransferasen, ohne Schädigung auch bei für Enzyme harten Reaktionsbedingungen radioaktiv markiertes Phosphat zu übertragen und ihre Arbeitsfähigkeit bei den üblichen Hybridisationsbedingungen (d. h. bis zu 48 Stunden bei 65°C) zeigen deutlich die Sonderstellung dieser Enzyme und machen sie deshalb für Nachweisverfahren besonders geeignet.

Durch die erfindungsgemäßen, markierten molekularen Sonden werden Reaktionsprodukte erzeugt, die hoch radioaktiv und damit leicht nachweisbar sind. Der Nachweis gelingt auch noch bei Konzentrationen der Zielmoleküle, die nach den bekannten Nachweisverfahren nicht nachweisbar sind.

Molekulare Sonden, die zur Kopplung mit den Aminoglucosid-Phosphotransferasen verwendet werden können, sind:

- immunreaktive Sonden, insbesondere monoklonale oder polyklonale Antikörper, Antiseren, Proteine – insbesondere Protein A, Peptide (sowohl natürlich vorkommende als auch synthetisch oder gentechnisch hergestellte);
- Nucleinsäuren oder deren Derivate oder Fragmente davon, insbesondere einsträngige DNS oder Fragmente davon, doppelsträngige oder partiell doppelsträngige DNS oder Fragmente davon, Oligodesoxyribonucleotide, RNS oder Fragmente davon, oder Oligoribonucleotide oder gentechnisch erzeugte Hybridisationssonden;
- Proteine mit spezifischer Affinität zu einem anderen Biomolekül, z. B. Streptavidin, Avidin oder bestimmte, kopplungsfähige Enzyme;
- chemische Verbindungen mit Affinität zu einem Biomolekül, insbesondere Biotin, m-Aminophenylborsäure oder Cibacron Blue F3 GA.

Zu den Aminoglucosid-Phosphotransferasen, auch als Aminocyclitol-Phosphotransferasen bezeichnet, gehören die bekannteren Neomycin-Phosphotransferasen I und II (auch Kanamycin-Phosphotransferase I und II, Lividomycin-Phosphotransferase; siehe zur Nomenklatur M. J. Haas, J. E. Dowding, *Methods in Enzymology* [1975] 43, S. 611–617 und Enzyme Nomenclature 1984, Nomenclature Committee, International Union of Biochemistry, Academic Press New York 1984), die Streptomycin-Phosphotransferase (Abkürzungen: NPT I bzw. NPT II; APH mit der Bezeichnung der O-Phosphorylierung, z. B. APH 6; siehe dazu K. L. Rinehardt, *J. Infect. Diseases* [1969] 119, S. 345–350). Von den genannten Aminoglucosid-Phosphotransferasen werden die Neomycin-Phosphotransferase I und II bevorzugt.

Das Enzym kann aus genetisch manipulierten Wirtszellen oder aus Wildstämmen isoliert werden; diese Verfahren sind z. B. bei B. Reiss, R. Sprengel, H. Will, H. Schaller, *Gene* (1984) 30, 211–218 und P. Trieu-Cout und P. Courvalin, *J. Antimicrob. Chemother.* [1986] 18, Suppl. C, 93–102, beschrieben.

Zur Kopplung von Enzym und molekularer Sonde stehen eine Vielzahl von Verfahren und Reagenzien zur Verfügung, von denen bevorzugte Verfahren und Reagenzien beschrieben werden, wobei jedoch für den Fachmann offensichtlich ist, daß außer den genannten andere bifunktionelle Moleküle oder andere Verfahren ebenfalls verwendet werden können und dabei erfindungsgemäße markierte molekulare Sonden hergestellt werden.

Das hauptsächlich durchgeführte Verfahren besteht darin, Enzym und molekulare Sonde mittels einer chemischen Verbindung kovalent miteinander zu koppeln, wobei die als Kopplungsstelle verwendete Spacerlänge zwischen 1 und 150 Atome betragen kann und in dieser Kette eine oder mehrere Ringstrukturen enthalten sein können.

Durch die Kopplung wird weder die Erkennungsfähigkeit der Sonde für das Biomolekül noch die Arbeitsfähigkeit des Enzyms wesentlich beeinträchtigt. Es ist auch eine direkte Kopplung von Enzym an die Sonde möglich; Beispiele hierfür sind die Fusionsproteine.

Die Herstellung einer kovalenten Bindung zur Erzeugung einer erfindungsgemäßen, markierten molekularen Sonde kann z. B. durch Glutaraldehyd, p-Benzochinon, Bis-succinimidylester, Bisimidate und/oder Azide erfolgen. Zu den Bis-succinimidylestern zählen z. B. Bis-[2-(succinimidooxycarbonyloxy)ethyl]-sulfon, Bis-(sulfosuccinimidyl)-suberat, Disuccinimidyl-suberat, Disuccinimidyl-tartrat, Dithiobis-(succinimidylpropionat), 3,3'-Dithiobis-(sulfosuccinimidyl)-propionat, Ethylenglykolbis-(succinimidylsuccinat), Ethylenglykolbis-(sulfosuccinimidylsuccinat), Bis-[2-(sulfosuccinimidooxycarbonyloxy)ethyl]-sulfon und Disulfosuccinimidyltartrat. Zu den Bisimidaten gehören z. B. Dimethyladipimidat, Dimethyl-3,3'-dithiobis-(propionimidat), Dimethyl-pimelimidat, Dimethyl-suberimidat, usw. Beispiele für Azide sind N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimid, p-Azidophenacylbromid, p-Azidophenylglyoxal, N-(4-Azidophenylthio)-phthalimid, 4,4'-Dithiobis-(phenylazid), 4-(Azidophenyl)-1,4-dithio-buttersäureimid-ethylester, 4-Fluor-3-nitrophenylazid, N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoat, N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure, 4-Azidobenzoessäureimid-methylester, 2-Diazo-3,3,3-trifluorpropionylchlorid, p-Nitrophenyl-2-diazo-3,3,3-trifluorpropionat, N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoat. Zu dieser Klasse gehören auch spaltbare Kopplungsreagenzien, durch deren Einsatz zur Herstellung der erfindungsgemäßen Sonden Produkte erzeugt werden, die in einem Reaktionsschritt des Nachweisverfahrens wieder gespalten werden können und damit die Enzymreaktion mit frei beweglichen Enzymen durchgeführt werden kann, was einen kinetischen Vorteil beinhaltet.

Zu diesen spaltbaren Kopplungsreagenzien gehören z. B. N-Succinimidyl-(4-azidophenyl-1,3'-dithiopropionat, Sulfosuccinimidyl-2-(m-azido-0-nitrobenzamido)-ethyl-1,3'-dithiopropionat, Sulfosuccinimidyl-(4-azidophenyl-dithio)-propionat, Sulfosuccinimidyl-2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat.

Einen Spezialfall für kovalente Kopplung von molekularen Sonden an Enzyme stellen die Fusionsproteine dar. Sie werden meist synthetisch oder gentechnisch hergestellt, wobei Sondenprotein und Enzym peptidisch miteinander verknüpft werden. Bei den gentechnisch hergestellten Fusionsproteinen ist dabei die genetische Information für das Sondenprotein benachbart und im Leseraster auf einem gentechnischen Vektor lokalisiert und wird vom Wirtorganismus in eine durchgängige Aminosäuresequenz übersetzt.

Neben der kovalenten Bindung ist eine Bindung über ionische Gruppen möglich. Dabei können Verbindungen verwendet werden, an die sowohl das Enzym als auch die molekulare Sonde ionisch gebunden werden, z. B. Polyethylenimin, Polyelektrolyte oder Ampholyte. Als drittes Kopplungsprinzip ist die Herstellung der erfindungsgemäßen markierten molekularen Sonden durch elektrostatische Wechselwirkungen möglich. Zu den elektrostatischen Wechselwirkungen zählen die hydrophob-hydrophob-, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Bindungen über van-der-Waalsche Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Erfindung bezieht sich auch auf Verfahren zur Herstellung von mittels Aminoglycosid-Phosphotransferasen markierten molekularen Sonden. Das Verfahren besteht darin, an eine molekulare Sonde oder an ein Gemisch molekularer Sonden eine Aminoglycosid-Phosphotransferase zu koppeln. Als Sonden können dazu die bereits weiter oben genannten immunreaktiven Sonden, Nucleinsäuren, Proteine oder chemischen Verbindungen verwendet werden. Als Aminoglycosid-Phosphotransferasen werden Neomycin-Phosphotransferase I und II bevorzugt. Zur Nomenklatur und zu weiteren Varianten zur Durchführung des Verfahrens gilt das gleiche wie oben.

Eine Verfahrensvariante zur Herstellung von markierten molekularen Sonden besteht darin, die Aminoglycosid-Phosphotransferase an die molekulare Sonde durch die Herstellung einer direkten kovalenten Bindung oder über Kopplungsreagenzien kovalent zu binden. Als Kopplungsreagenzien kommen die bereits genannten in Betracht. Die Reaktionsbedingungen sind von der Art der molekularen Sonde, von der Aminoglycosid-Phosphotransferase und vom Kopplungsreagens abhängig. Es können jedoch auch bereits beschriebene Standard-Protokolle zur Herstellung der Kopplung verwendet werden. Bei den Kopplungsvarianten ist zu beachten, daß für bevorzugte Ausführungsformen eine Spacergruppe mit 1 bis 150 Atomen in der Kette und ggf. Ringstrukturen in der Kette verwendet wird, die der markierten molekularen Sonde Gelegenheit gibt, eine möglichst große Anzahl von Substratmolekülen zu erreichen. Bevorzugt werden Kopplungen mit Glutaraldehyd, p-Benzochinon, Bis-succinimidylestern, Bisimidaten oder Aziden, wie sie bereits beschrieben worden sind. Eine zweite Verfahrensvariante besteht darin, die Kopplung über die Ausbildung ionischer Bindungen vorzunehmen. Die Kopplung kann dabei z. B. direkt zwischen einem Protein (Enzym) und einer DNS als molekularer Sonde erfolgen. Bevorzugt werden Varianten, bei denen die Kopplung durch eine oder mehrere chemische Verbindungen erfolgt, zu der/denen beide Reaktionspartner ionische Bindungen ausbilden können. Solche Verbindungen sind z. B. Polyethylenimine unterschiedlicher Molmassen, Polyelektrolyte oder Ampholyte, aber auch oligomere oder polymere Verbindungen mit Ladungen im Molekül. Eine weitere Verfahrensvariante besteht darin, zur Kopplung elektrostatische Wechselwirkungen von Enzym und molekularer Sonde zu nutzen. Solche Wechselwirkungen können hydrophob-hydrophob oder Dipol-Dipol sein oder über van-der-Waals'sche Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen.

Einen Sonderfall stellen auch hier die Fusionsproteine dar, die gentechnisch oder synthetisch hergestellt werden und bei denen Sonde und Enzym direkt miteinander verbunden sind, wie es weiter oben bereits beschrieben worden ist.

Die nach den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten markierten molekularen Sonden können in Nachweisverfahren für Biomoleküle verwendet werden. Die erfindungsgemäß verwendeten Enzyme, die Aminoglycosid-Phosphotransferasen, zeichnen sich durch hohe Beständigkeit in allen Nachweisschritten aus, d. h., die erfindungsgemäßen markierten Sonden können in Hybridisationsverfahren bei Temperaturen von 65°C eingesetzt werden. Durch die Verwendung dieser Sonden ist beim autoradiographischen Nachweis in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Reaktionspartner, die wesentlich von der Beweglichkeit der Sonde und vom Angebot an Substrat bestimmt wird, ein Verstärkungsfaktor von mindestens 10 zu erzielen, oftmals jedoch ein wesentlich höherer Faktor. Bisher ist eine solche Verstärkung mit an Enzyme gekoppelten Sonden nicht erreicht worden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Kopplung von polyklonalem Antikörper an Kanamycin-Phosphotransferase

1 ml Anti-Humanserumalbumin-Antiserum (Kaninchen) mit 0,9% NaCl wird mit 10 mg Benzochinon in 0,3 ml Ethanol 1 Stunde bei Zimmertemperatur zur Reaktion gebracht. Danach wird überschüssiges Benzochinon mittels einer Sephadex G 25-Säule abgetrennt und der Komplex Benzochinon-Antikörper fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen werden in einem Immuntest gegen Humanserumalbumin (HSA) geprüft. Die gesuchte Fraktion wird mit 1 mg Kanamycin-Phosphotransferase in 1 ml 1 M Bicarbonat-Puffer (pH-Wert 9) über Nacht bei Zimmertemperatur im Dunkeln zur Reaktion gebracht.

Das Reaktionsprodukt wird über Nacht gegen 0,9% NaCl-Lösung dialysiert und so verwendet. Es kann nach der Dialyse auch in Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert werden, oder das Produkt Antikörper-Benzochinon-Kanamycin-Phosphotransferase kann sofort zur immunologischen Reaktion eingesetzt werden.