



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 14 848 T2 2004.05.06**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 975 800 B1**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 14 848.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB98/00521**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 910 911.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/038334**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.02.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **03.09.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.02.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **21.05.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.05.2004**

(30) Unionspriorität:

<b>807901</b>	<b>27.02.1997</b>	<b>US</b>
<b>870370</b>	<b>06.06.1997</b>	<b>US</b>

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Ingeneus Corp., Bridgetown, BB**

(72) Erfinder:

**NIE, Xiao-Feng, Eileen, Thornhill, CA; WU, Min,  
Yuan, Thornhill, CA**

(74) Vertreter:

**Mitscherlich & Partner, Patent- und  
Rechtsanwälte, 80331 München**

(54) Bezeichnung: **UNTERSUCHUNG VON NUKLEOTIDEN IN LOESUNG MIT HILFE VON PNA-SONDEN**

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

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

**Beschreibung**

## Hintergrund der Erfindung

## Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft Sonden, die Peptidnukleinsäuren (PNAs) umfassen und eine Methode zur Verwendung der PNA-Sonden, um Nukleotide in Lösung, ohne einen festen Träger oder ein in Nachbarschaft angeordnetes doppelsträngiges Nukleotidkonstrukt, zu sequenzieren oder zu erfassen.

## Beschreibung des verwandten Standes des Technik

[0002] PNAs sind Polyamidanalogs von DNA und RNA. Siehe beispielsweise US-Patent Nr. 5,539,982 von Nielsen et al. Nielsen et al beschreiben, dass die PNAs natürliche Polynukleotide nachahmen, indem einzelsträngige (ss) DNA- und RNA-Stränge komplementär gebunden werden. Die PNAs umfassen im allgemeinen Liganden, die an ein Peptidgrundgerüst gebunden sind. Repräsentative Liganden umfassen entweder die vier hauptsächlich natürlich vorkommenden DNA-Basen (z. B. Thymin, Cytosin, Adenin oder Guanin) oder andere natürlich vorkommende Nukleobasen (z. B. Inosin, Uracil, 5-Methylcytosin oder Thiouracil) oder künstliche Basen (z. B. Bromthymin, Azaadenine oder Azaguanine, etc), die über einen geeigneten Linker mit dem Peptidgrundgerüst verbunden sind.

[0003] Sonden, die PNA-Sequenzen umfassen, sind bereits dafür angewendet worden, um Zielnukleotidsequenzen nachzuweisen. Das US-Patent Nr. 5,503,980 von Cantor schlägt die Verwendung von PNA-Sonden in einem Verfahren zur Sequenzierung einer Nukleinsäure vor, wobei die Nukleinsäure mit einem Satz von PNA-Sonden, die willkürliche, allerdings bestimmbare, Basenfrequenzen innerhalb des einsträngigen Bereichs neben einem doppelsträngigen Bereich enthalten, hybridisiert, wobei der einzelsträngige Bereich des Satzes bevorzugt jede mögliche Kombination von Sequenzen über einen vorbestimmten Bereich umfasst. Die Hybridisierung erfolgt durch komplementäre Erkennung des einzelsträngigen Bereichs eines Ziels mit dem einzelsträngigen Bereich der Sonde und wird thermodynamisch durch das Vorhandensein der Doppelsträngigkeit in Nachbarschaft der Sonde favorisiert.

[0004] Obwohl allerdings Cantor beschreibt, dass die Nukleinsäuren PNAs sein können, wird weder beschrieben noch vorgeschlagen, diese Sonden in Abwesenheit eines festen Trägers zu verwenden. Darüberhinaus erfordert die vorliegende Erfindung kein angrenzendes Konstrukt von zu testendem DNA-Material.

[0005] Zusätzlich zu der Lehre, einen festen Träger, wie bei Cantor zu verwenden, lehren Perry-O'Keefe et al „Peptide Nucleic Acid Pre-Gel Hybridization: An Alternative to Southern Hybridization“, 93 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 14670 (Dezember 1996), dass die PNA im Allgemeinen nicht gut an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Siehe hierzu Perry-O'Keefe et al auf Seite 14673, Fußnote. Darüberhinaus sind Homopyrimidin-PNA-Konstrukte, bei denen man festgestellt hatte, dass sie dsDNA gut binden, wohl nicht als Sonden geeignet. Die Anmelder haben entdeckt, dass die Qualifikation, die vorgibt, dass nur Homopyrimidin mit dsDNA durch Stranginversion binden kann, nicht korrekt ist und eher aus den angewendeten Hybridisierungsbedingungen hervorgeht.

[0006] Smulevitch et al „Enhancement of Strand Inversion by Oligonucleotides Through Manipulation of Backbone Charge“, 14 Nature Biotechnology 1700 (Dez. 1996) (beschrieben in Landsdorp, „Close Encounters of the PNA Kind“, 14 Nature Biotechnology 1653 (Dez. 1996) beschreiben, PNA-Primer für die Hybridisierung mit dsDNA zu verwenden. Allerdings lehren Smulevitch et al die Verwendung von Gelen für den Nachweis der Hybridisierung und es wird nicht die Verwendung von Fluoreszenzmarkern vorgeschlagen.

[0007] Viele Arten von Probeanalysen verlassen sich auf die Fluoreszenzeigenschaften eines Farbstoffs. Eine Fluoreszenz tritt auf, wenn ein durch Licht einer Wellenlänge angeregtes Molekül in den nicht angeregten (Grund) Zustand zurückkehrt, wobei Licht einer längeren Wellenlänge emittiert wird. Das angeregte und emittierte Licht, das verschiedene Wellenlängen aufweist, kann voneinander unter Verwendung optischer Filter, eine Kamera oder eine CCD, getrennt werden. Die Fluoreszenz ist dafür verwendet worden, bestimmte Moleküle (und damit Strukturen) durch Lichtmikroskopie seit vielen Jahren zu visualisieren, und sie wird ebenfalls bei anderen analytischen Techniken, wie die Fließzytometrie, eingesetzt. Desweiteren kann die Emission von Fluoreszenz, die verschiedene Farben zeigt, mit dem menschlichen Auge, einer Kamera oder einer Ladungskopplungsvorrichtung (CCD) nachgewiesen werden.

[0008] Beispielsweise beschreibt das US-Patent Nr. 5,594,138 von Dykstra et al ein Verfahren zum Fluoreszenznachweis einer Nukleinsäure. Das Verfahren umfasst das in Kontakt bringen von Nukleinsäuren mit einem Fluoreszenzmarker, der eine Bisdikationische Arylfuranverbindung ist und das Belichten der Nukleinsäure bei einer Frequenz, die die Fluoreszenz des Fluoreszenzmarkers induziert. Der Fluoreszenzmarker kann mit einer Nukleotidsequenz als Sonde für Hybridisierungsstudien konjugiert sein oder er kann an viele Reagenzien für in situ Markierungsstudien konjugiert sein.

- [0009] Das US-Patent 4,963,477 von Tchen beschreibt eine Sonde hoher Empfindlichkeit, die eine modifizierte Nukleinsäure, die von spezifischen Antikörpern erkannt werden kann, enthält.
- [0010] Die in situ Fluoreszenzhybridisierung (FISH) ist eine Technik, bei der eine fluoreszierende Sonde, die an humane Chromosomen durch Binden DNA an einen festen Träger, wie ein Glasträger, bindet, nachgewiesen wird. Siehe beispielsweise K. H. Andy Ghoo, Ed., „In Situ Hybridization Protocols“, Kapitel 2 und 4 (Humana Press, Totowa, NJ, 1994). Wie alle herkömmlichen Nachweisverfahren, die die Hybridisierung mit Sonden umfassen, verlässt sich dieses Verfahren auf den festen Träger, um die zwei komplementären DNA-Stränge auseinander zu halten, während die Sonde mit einem der Stränge hybridisiert. Außerdem erfordert die FISH einen komplizierten Puffer und ein kompliziertes Temperaturreglerprotokoll, mit einer Inkubation über Nacht.
- [0011] Die WO 93/24652 betrifft die in situ Hybridisierung von DNA oder PNA mit Nukleinsäure enthaltenden chromosomatischen oder extra-chromosomatischen Zielobjekten. Allerdings sagt dieses Dokument nichts über die Unterscheidung zwischen verschiedenen Hybridisierungskomplexen aus.
- [0012] Carlsson et al, 380 Nature 207 (21. März 1996) betrifft die Überprüfung genetischer Mutationen unter Anwendung der Kapillarelektrophorese. Dieses Dokument lehrt keinen Assay oder schlägt einen solchen vor, wobei die Fluoreszenzintensität des bestrahlten Markers im Testmedium umgekehrt proportional zur Anzahl der Basenfehlpaarungen zwischen der Zielnukleotidsequenz und der PNA-Probe über einen Bereich, der 0 Basenfehlpaarungen bis mindestens 3 Basenfehlpaarungen umfasst, ist.
- [0013] Die WO 92/ 18650 betrifft Fluoreszenzanisotropietechniken zum Nachweis der Nukleinsäurehybridisierung, im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung, die die gesamten Fluoreszenzemissionsintensitätsänderungen, die mit der Hybridisierung zusammenhängen, misst.
- [0014] Bis zur vorliegenden Erfindung war es allerdings nicht möglich gewesen, schnell auf die Anwesenheit von Nukleotidsequenzen in Lösung unter Anwendung einer Methode, die nicht die Probe zerstört, weniger gefährlich für das Laborpersonal als Assays auf Strahlenbasis, keine Kosten und Verzögerungen hinsichtlich der Herstellung fester Träger erfordert und schnell automatisierbar ist, zu testen. Ein zeit- und kosteneffektiver Nachweis von Mutanten genetischer Sequenzen war bisher der Tempo limitierende Schritt bei der Korrelation mutanter Genotypen mit veränderten Phänotypen. Obwohl herkömmliche DNA-Sequenziermethoden bisher als das genaueste Mittel für die Identifizierung von Mutationen angesehen worden sind, sind diese Methoden relativ langsam und laborintensiv, und sie sind nicht besonders gut dafür geeignet, große Mengen von Proben genomischer DNA schnell zu überprüfen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

- [0015] Die vorliegende Erfindung stellt Methoden zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen und/oder Bestimmung von Sequenzinformation von Nukleinsäuren zur Verfügung. Die erfindungsgemäßen Sonden umfassen PNA.
- [0016] Die Erfindung stellt eine Methode zum Nachweis von mindestens einer einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleotidsequenz in einem flüssigen Medium zur Verfügung, wobei die Methode die Zugabe von PNA-Sonden mit mindestens einem Marker in das flüssige Medium zur Bildung von mindestens einem Hybridisierungskomplex mit mindestens einer Nukleotidsequenz in dem Medium, den Nachweis der mindestens einen Nukleotidsequenz durch den Nachweis von mindestens einem Signal, das mit einer Menge des mindestens einen Hybridisierungskomplexes in dem flüssigen Medium korreliert, umfasst.
- [0017] Das Verfahren kann ohne Bindung der PNA-Sonden, Nukleotidsequenzen oder Hybridisierungskomplexe an einen festen Träger oder Gel durchgeführt werden.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

- [0018] Die Erfindung wird nun im Zusammenhang mit den folgenden Zeichnungen beschrieben, worin die Bezugszeichen jeweils gleiche Elemente bedeuten.
- [0019] **Fig. 1** ist eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung und die **Fig. 2, 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, 4C, 5A, 5B, 6A, 6B, 7A, 7B, 8A, 8B, 8C, 9A, 9B, 9C, 9D, 10A, 10B, 11A, 11B, 12A, 12B, 13A, 13B, 13C, 14A, 14B, 15A, 15B, 16A, 16B, 16C, 16D, 17A, 17B, 18A, 18B, 19A, 19B, 19C, 19D und 19E** sind Fluoreszenzspektren.

#### Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen.

- [0020] Die Erfindung wendet PNA-Sonden an, um Nukleotidsequenzen in einer Probe nachzuweisen und/oder zu charakterisieren. PNA-Sonden sind in der Lage, dsDNA durch Binden eines Stranges zu erkennen, wobei sie vermutlich mit dem anderen Strang hybridisieren und einen PNA-DNA-Komplex erzeugen. Diese Erkennung kann mit dsDNA-Zielsequenzen, 20 oder mehr Basenpaaren, stattfinden. Sondensequenzen jeder Länge von 8 bis 20 Basen sind bevorzugt, weil dieses der Bereich ist, innerhalb dessen die kleinste einzig

vorkommende DNA-Sequenz von Prokaryonten und Eukaryonten aufgefunden wird. Sonden mit 12 bis 18 Basen sind insbesondere bevorzugt, weil dieses die Längen der kleinsten einzig vorkommenden Sequenz im menschlichen Genom ist. Allerdings kann eine Vielzahl von kürzeren Sonden dafür verwendet werden, eine Nukleotidsequenz mit einer Vielzahl von nicht einzigartigen Zielsequenzen darin, die miteinander kombinieren, um die Nukleotidsequenz allein zu identifizieren, nachzuweisen.

[0021] Die erfindungsgemäßen Sonden sind in der Lage, Triplex-Komplexe mit dsDNA und Duplex-Komplexe mit RNA oder ssDNA zu bilden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind ebenfalls in der Lage, Triplex-Komplexe zu bilden, worin eine erste PNA-Sonde mit RNA oder ssDNA bindet und eine zweite ssDNA mit dem erhaltenen Duplex-Komplex bindet. Siehe beispielsweise Egholm et al., „PNA Hybridizes to Complementary Oligonucleotides Obeying the Watson-Crick Hydrogen-Bonding Rules“, 365 Nature 566 (1993) und Tomac et al., „Ionic Effects on the Stability and Conformation of Peptide Nucleic Acid Complexes“, 188 J. Am. Chem. Soc. 5544 (1996).

[0022] In den erfindungsgemäßen PNA-Sonden sind die Basen, die an das Polymergrundgerüst gerüstet sind, primär natürlich vorkommende Nukleobasen, die an der Position gebunden sind, die für die Sondenherstellung erforderlich ist. Alternativ können die Basen nicht natürlich vorkommende Nukleobasen (Nukleobasenanalogs), andere Basen bindende Einheiten, aromatische Einheiten, (C1–C4)-Alkanoyl, Hydroxyl oder sogar Wasserstoffe sein. Es sollte selbstverständlich sein, dass der Ausdruck Nukleobase Nukleobasen, die entfernbare Schutzgruppen tragen, umfasst. Desweiteren kann mindestens eine Base des Polyamidgrundgerüsts durch eine DNA-Einlagerungsverbindung, einen Reporterliganden, wie beispielsweise ein Fluorophor, eine Radiomarkierung, eine Spinmarkierung, ein Hapten oder ein Proteinerkennungseligand, wie Biotin, ersetzt sein oder damit substituiert sein. Bevorzugte nachweisbare Markierungen umfassen ein Radioisotop, ein stabiles Isotop, ein Enzym, eine fluoreszierende Chemikalie, eine lumineszierende Chemikalie, eine chromatische Chemikalie, ein Metall, eine elektrische Lagung oder eine räumliche Struktur.

[0023] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst die PNA-Sonde eine PNA-Sequenz, die kovalent an einen Fluoreszenzmarker, der bei Bestrahlung mit einem Laser fluoresziert, gebunden ist. Bevorzugte Fluoreszenzmarker umfassen Biotin, Rhodamin und Fluorescein.

[0024] Es ist bevorzugt, den Fluoreszenzmarker am 5'-Terminus der PNA mit einem kurzen Linker, um eine Wechselwirkung mit der PNA zu minimieren, vorzusehen.

[0025] Zur Unterscheidung einer mutanten Nukleotidsequenz von einer Referenznukleotidsequenz, worin die beiden Sequenzen nur in einer einzigen Base voneinander unterschiedlich sind, ist es bevorzugt, die PNA-Sonde so auszugestalten, dass der mutante Bereich des mutanten Nukleotids der Mitte der PNA-Sonde entspricht. Diese Ausgestaltung führt zu einer höheren Hybridisierungsausbeute und zu einem stabileren Hybrid, als in dem Fall, wenn der mutante Teil des Nukleotids einem Terminus einer Probe entspricht, weil die Bindungsfehlpaarung zwischen der Sonde und dem Nucleotid zentral innerhalb der Probe lokalisiert ist.

[0026] Die PNA-Sonden werden in ein flüssiges Medium, das mindestens eine Nukleotidsequenz und/oder eine Mutantenversion von mindestens einer Sequenz enthalten soll, gegeben. Das flüssige Medium kann jedes herkömmliche Medium sein, von dem bekannt ist, dass es für die Erhaltung von Nukleotiden geeignet ist, siehe beispielsweise Sambrook et al., „Molecular Cloning: A Lab Manual“, 2d (1989). Beispielsweise kann das flüssige Medium Nukleotide, Wasser, Puffer und oberflächenaktive Mittel umfassen.

[0027] Die Nukleotide in dem flüssigen Medium können aus klinischen Proben nach jedem herkömmlichen Verfahren, einschließlich einem automatisierten Verfahren, erhalten werden. Beispiele für diese Verfahren sind zum Beispiel in Sambrook et al., Band 2, Seiten 9.16 bis 9–19 und 7.6 bis 7.7 zusammengefasst. Ein Beispiel für einen Automat für die Reinigung von Nukleinsäuren ist der BioRobot 9600, hergestellt von Qiagen.

[0028] Beispielsweise sind eine Vielzahl von Erkrankungen bekannt, die mit der Anwesenheit einer mutanten DNA im Genom eines Individuums zusammenhängen. Wenn die Sequenzen der Wildtyp-DNA und der Mutanten-DNA erkannt sind, ist es möglich, diese Nukleotidsequenzen aus klinischen Proben unter Anwendung herkömmlicher Technologien zu isolieren. Die PCR ist die bevorzugte Methode zur Isolierung von Nukleotiden aus klinischen Proben. Die PCR wird unter Verwendung eines Primers, der in der Lage ist, die Wildtyp-DNA und die Mutanten-DNA zu amplifizieren, durchgeführt.

[0029] Die Nukleotidsequenzen werden in das flüssige Medium in einer bekannten Konzentration gegeben, weil die Konzentration die Magnitude des Signals (z. B. die Fluoreszenzintensität), das in den darauf folgenden Schritten bei der erfindungsgemäßen Methode erzeugt wird, beeinflussen kann. Die Nukleotidkonzentration kann durch beispielsweise Messen der UV-Absorption bei 260 nm bestimmt werden.

[0030] Die isolierten Nukleotide werden in das flüssige Medium gegeben und vor dem Nachweis denaturiert. Bevorzugt wird die Denaturierung bei etwa 90°C bis etwa 100°C in etwa 30 Sekunden bis etwa 5 Stunden in Gegenwart der PNA-Sonde durchgeführt.

[0031] Bevorzugt werden die PNA-Sonden in das flüssige Medium in einer Konzentration des 1- bis 20-fachen der Konzentration der nachzuweisenden Nukleotidsequenz gegeben.

[0032] Die Hybridisierung zwischen den komplementären Basen findet unter einer großen Vielzahl von Bedingungen mit Änderungen hinsichtlich der Temperatur, Salzkonzentration, elektrostatischer Stärke und Puf-

ferzusammensetzung statt. Beispiele für diese Bedingungen und Verfahren zur Anwendung derselben sind im Stand der Technik bekannt. Siehe hierzu beispielsweise Perry-O'Keefe et al., Egholm et al., Sambrook et al., Bd. 2 S. 9.47–9.55 und die Pre-Gel Hybridisierungstechnik, die in Band 4, Nr. 3 von PerSeptive Biosystems Magazine beschrieben ist.

[0033] Es ist bevorzugt, dass sich die Hybridisierungskomplexe bei einer Temperatur von etwa 4°C bis etwa 75°C für etwa 2 Minuten bis etwa 24 Stunden bilden. Es ist insbesondere bevorzugt, die Denaturierung für nicht mehr als 60 Minuten in Gegenwart der PNA-Sonde durchzuführen, wonach dann die Temperatur passiv auf Raumtemperatur ohne Abschrecken abgekühlt wird.

[0034] Es ist möglich, die Hybridisierung in Lösung unter Verwendung bestimmter Reagentien zu vereinfachen. Bevorzugte Beispiele für diese Reagentien umfassen einzelsträngige Bindungsproteine, wie das Rec A-Protein, das T4-Gen-32-Protein, einzelsträngige Bindungsproteine von *E. coli*, Nukleinsäurefurchenbindeproteine der Haupt- oder Untergruppe, zweiwertige Ionen, mehrwertige Ionen und Einlagerungssubstanzen, wie Ethidiumbromid, Actinomycin D, Psoralen und Angelicin.

[0035] In Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Methode werden die Hybridisierungskomplexe von unhybridisierten PNA-Sonden vor dem Nachweis des Signals der hybridisierten PNA-Sonden abgetrennt. Die Abtrennung wird durch mindestens eine Methode, zu der die Filtration, Zentrifugation, Fällung, Ionenaustauschharztrennung und die Elektrophorese in freier Lösung (d. h. die Elektrophorese in einem flüssigen Medium im Gegensatz zur Gel-Elektrophorese), zählen, durchgeführt.

[0036] Die Abtrennung kann über eine G50-Säule erfolgen. Nach der Hybridisierung wird die Mischung aus den Hybridisierungskomplexen und der nicht hybridisierten DNA und PNA auf eine G50-Säule aufgetragen. Die Säule wird bei 500 bis 1000 Upm für 1 bis 2 Minuten zentrifugiert. Die ungebundene PNA wird filtriert und verbleibt in der Säule. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wird durch die Säule gelassen und in einer Küvette gesammelt.

[0037] Tatsächlich kann die Zentrifugation auch vermieden werden. Die Lösung kann durch die Säule durch die Schwerkraft oder durch Waschen unter Verwendung von extra Mengen an Puffer fließen. Allerdings dient die Zentrifugation zu dem Zweck, die Abtrennungszeit zu verkürzen und zu verhindern, dass die Probe verdünnt wird.

[0038] Die Abtrennung kann durch Zentrifugation erfolgen. Nach der Hybridisierung wird die Probe (ohne Übertragung) in zwei Schichten (Gradient) durch Zentrifugation bei 1000 bis 10000 Upm für 2 bis 20 Stunden getrennt. Die leichtere, nicht hybridisierte PNA befindet sich reichlich in der oberen Schicht, während der schwerere Hybridisierungskomplex in der unteren Schicht konzentriert ist. Die untere Schicht wird in einer Küvette für die Fluoreszenzmessung gesammelt.

[0039] In gewissen Ausführungsformen ist der Filtrationsschritt vermeidbar, wenn eine elektrische Methode angewendet wird, um die hybridisierte PNA zu konzentrieren. In diesen Ausführungsformen wird ein elektrisches Feld an das flüssige Medium vor dem Nachweis der gewünschten Nukleotidsequenz oder konkurrierend damit angelegt, und die Änderung der Intensität einer Fluoreszenzemission als Funktion des elektrischen Feldes wird als Indiz dafür nachgewiesen, ob die PNA-Sonde an mindestens eine Sequenz der vollständig komplementären Nukleotidsequenz und der unvollständig komplementären Nukleotidsequenz hybridisiert ist.

[0040] Die bevorzugten Marker zur Anwendung in der Erfindung sind Fluorophore. Wie der Fachmann weiß, ist die Wellenlänge, die bevorzugt dafür gewählt wird, die Fluoreszenz des Fluoreszenzmarkers zu indizieren, im Stand der Technik als „Anregungsmaximum“ bekannt, d. h. die Wellenlänge, die von einem Molekül absorbiert wird und dieses Molekül auf einen höheren elektronischen Zustand anregt. Wenn das Markermolekül von dem höheren zu einem niedrigerem elektronischen Zustand übergeht, emittiert das Molekül eine Art sichtbare Strahlung, d. h. Fluoreszenz, d. h. eine Wellenlänge, die als „Emissionsmaximum“ bezeichnet wird. Es ist diese Fluoreszenz, die in der vorliegenden Erfindung nachgewiesen wird. Das durch die Verbindung emittierte nachweisbare Signal kann unter Anwendung von Techniken, die im Stand der Technik bekannt sind, nachgewiesen werden, beispielsweise durch Beobachtung mit dem menschlichen Auge, die Anwendung elektronischer Mittel zum Nachweis einer erzeugten Wellenlänge (z. B. Kameras oder CCDs) und dergleichen. In vorteilhafter Weise wird die Wellenlänge der Fluoreszenz ausreichend von derjenigen des Anregungslichts durch optische Filter entfernt, um so eine gute Abtrennung der beiden Wellenlängen zu ermöglichen.

[0041] Die Anregungswellenlänge wird so gewählt (durch Routineexperimente und/oder konventionelles Wissen), dass sie dem Anregungsmaximum für den zu verwendeten Marker entspricht, und sie beträgt bevorzugt 400 bis 1000 nm, insbesondere 400 bis 750 nm. Wenn beispielsweise der Marker Fluorescein ist, beträgt die bevorzugte Anregungswellenlänge etwa 488 nm.

[0042] In bevorzugten Ausführungsformen wird ein Argonionenlaser verwendet, um den Marker mit Licht mit einer Wellenlänge in einem Bereich von 400 bis 520 nm zu bestrahlen und die Fluoreszenzemission wird in einem Bereich von 500 bis 750 nm nachgewiesen. Die Dauer der Bestrahlung beträgt bevorzugt etwa 10 Millisekunden bis etwa 1 Minute.

[0043] Eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann einen Behälter für ein flüssiges Medium zum Halten des flüssigen Mediums; einen Laser zum Bestrahlen des Nukleotids; einen Flu-

oreszenzdetektor zum Nachweis der Fluoreszenz, die durch den Laser induziert wird; eine Datenanalysevorrichtung zur Analyse der Daten, die durch den Fluoreszenzdetektor erzeugt werden und ein Ausgabegerät, das die Datenanalyse, die durch die Datenanalysevorrichtung erzeugt wird, berichtet, aufweisen. Siehe beispielsweise **Fig. 1**, die ein schematisches Diagramm eines Fluoreszenznachweissystems, das für die Durchführung der erfindungsgemäßen Methode geeignet ist, zeigt.

[0044] Bei bestimmten Ausführungsformen wird die Fluoreszenzemission, die durch Bestrahlen der hybridisierten PNA-Sonden mit einer Lichtquelle erzeugt wird, von der Fluoreszenzemission nicht hybridisierter PNA-Sonden unterschieden, ohne dass die hybridisierten und nicht hybridisierten PNA-Sonden abgetrennt werden. Bei bestimmten Ausführungsformen wird die Fluoreszenzemission einer PNA-Sondenart, die an eine Nukleotidsequenz hybridisiert ist, von der Fluoreszenzemission einer anderen PNA-Sondenart, die an eine Nukleotidsequenz, die von der ersten Nukleotidsequenz verschieden ist, unterschieden. Beispielsweise kann die Gegenwart von jeder der beiden Nukleotidsequenzen, die sich nur in einem einzigen Nukleotid unterscheiden auf der Basis nachgewiesen werden, dass eine fluoreszierende PNA-Sonde, die genau komplementär zu einem der beiden Nukleotide ist, effektiver an das präzise Komplement als an das unpräzise Komplement bindet, was eine höhere Konzentration an Hybridisierungskomplexen in Lösung schafft und eine höhere Fluoreszenzintensität nach der Entfernung der nicht hybridisierten PNA-Sonde.

[0045] Eine Vielzahl von PNA-Sonden kann gleichzeitig verwendet werden, um eine Vielzahl von Wirkungen zu erreichen. Einige Sonden, die auf verschiedene Segmente einer einzelnen Nukleotidsequenz zielgerichtet sind, können verwendet werden, um die Verlässlichkeit der Nachweismethode zu verstärken. In ähnlicher Weise kann eine Sonde einen dsDNA-Strang zum Ziel haben, während eine andere Probe den komplementären Strang der dsDNA zum Ziel haben kann.

[0046] Eine bevorzugte Methode zum Nachweis, ob die DNA ein Mutantentyp oder der entsprechende Wildtyp ist, umfasst die gleichzeitige Verwendung von (a) einer ersten PNA-Sondenart, die eine Sequenz zum Ziel hat, die sowohl im Wildtyp als auch in der DNA vom Mutantentyp, jedoch anderenfalls einzigartig ist, vorkommt und (b) einer zweiten PNA-Sondenart, die auf ein Sequenzziel gerichtet ist, die einzigartig gegenüber der DNA vom Mutantentyp ist, wobei die ersten und die zweiten Arten der PNA-Sonde verschiedene Marker, die unterscheidbare Signale hervorbringen, aufweisen. Somit zeigt der Nachweis des ersten Sondensignals an, dass der Test gut gelaufen ist (d. h. die erste Sonde fungiert als positive Kontrolle) und der Nachweis des zweiten Sondensignals zeigt an, dass die DNA vom Mutantentyp vorhanden ist. Beispielsweise kann eine Sonde einen Fluoresceinmarker, der einen Fluoreszenzmissionsintensitätspeak bei 525 nm zeigt, aufweisen, während die andere Sonde einen Rhodaminmarker, der einen Fluoreszenzmissionsintensitätspeak bei 580 nm zeigt, aufweist.

[0047] Im Gegensatz zu den Nachweismethoden des Standes der Technik ist es mit der vorliegenden Erfindung möglich, das Gesamtvolumen des flüssigen Mediums (d. h. die zu analysierende Probe) in bestimmten Ausführungsformen auf nicht mehr als etwa 250 Mikroliter zu beschränken. Es ist ebenfalls möglich, das Gesamtvolumen in bestimmten Ausführungsformen auf nicht mehr als 10 Mikroliter zu beschränken. Beim Test auf eine dsDNA-Mutante unter Verwendung von PNA, wenn ein Ergebnis erhalten wird, für das noch Zweifel bestehen, kann ein weiterer Test sofort mit der Probe durchgeführt werden, in dem die komplementäre PNA-Sonde hinzugefügt wird, um den komplementären DNA-Strang zu testen. Wenn als Teil des ersten Tests zentrifugiert wird, sollte die Probe in ein neues Röhrchen gegeben werden und mit der komplementären PNA hybridisiert werden. Alternativ kann der PNA-Test mit sowohl der PNA-Sonde und der komplementären PNA-Sonde, die an jedem der denaturierten DNA-Stränge im ersten Durchgang und zur gleichen Zeit hybridisiert sind, durchgeführt werden.

[0048] Für forensische Anwendungen können die Proben getestet, gelagert und dann wieder getestet werden, weil sich die PNA aus der Hybridisierung über mehrere Tage entfernt, und die DNA rekombiniert in diesem Zeitraum und wird durch diese Prozedur nicht abgebaut. Demzufolge kann eine gefrorene Probe nach dem Test anschließend in dem gleichen Röhrchen mehrfach wieder getestet werden.

[0049] Die **Fig. 2** zeigt eine DNA-Hybridisierung über einen Zeitraum. Man ließ eine PNA-Sonde mit einer Wildtyp-DNA (WT DNA) und einer Mutanten-DNA (MT DNA) hybridisieren. Die Hybridisierung zwischen der Sonde und der DNA wurde über einen Zeitraum durch Messung der Fluoreszenzintensität verfolgt. **Fig. 2** zeigte, dass die Hybridisierung der DNA-Sonde mit der DNA möglicherweise zeitabhängig schwächer wird, was nahe legt, dass die DNA wieder ihre native Struktur über die Zeit durch Verdrängen der PNA einnimmt.

[0050] Klinische Proben können unter Verwendung von mindestens 100-fach weniger Chemikalien oder genomisches Material (100 Mikroliter gegenüber 10 Milliliter) als es für konventionelle Methoden typisch ist, getestet werden. Selbst wenn daher das 10- oder 20-fache der Konzentration der herkömmlicher Weise verwendeten PNA verwendet wird, verbrauchen die Tests nur 1/5 bis 1/10 der Menge an PNA, während ein sehr aussagekräftiges Ergebnis erhalten wird.

[0051] Die Erfindung wird nun im einzelnen mit Bezug auf die folgenden Beispiele erläutert, es sollte allerdings selbstverständlich sein, dass die vorliegende Erfindung nicht darauf eingeschränkt sein sollte.

## Beispiel 1

[0052] Ein 150 by (Basenpaar) Fragment genomischer DNA vom Wildtyp p53 Gen (SEQ ID Nr.:1) wurde mit der PCR amplifiziert. Die PCR wurde unter Verwendung des GeneAmp PCR Systems 2400 von Perkin Elmer durchgeführt, mit einem heißen Start bei 95°C für 5 Minuten. Nach Zugabe des Taq-Enzyms, wurden 35 Zyklen wie folgt durchgeführt:

Denaturierung:	94°C für 30 Minuten
Annealing:	45°C für 45 Minuten (45°C ist 5°C niedriger als der Primer T <sub>m</sub> )
Verlängerung:	72°C für 30 Minuten (1 kb/min) mal 35.

[0053] Die PCR wurde unter Verwendung einer Mischung, die in 100 µl Volumen 10x Reaktionspuffer (10 µl), 20 mMol MgCl<sub>2</sub> (10 µl), 10 mMol dNTP-Mischung (2), 25 pmol/µl Primer 1 (1 µl), 25 pmol/µl primer 2 (1 µl), 100 µg/µl DNA-Matritze (1 µl), dd H<sub>2</sub>O (74 µl) und Taq Polymerase (1 µl) (5 Einheiten/µl) enthält, durchgeführt.

[0054] In ähnlicher Weise wurde ein Mutantenfragment (SEQ ID Nr.:2) des gleichen genomischen 150 by Fragments ebenfalls mit PCR amplifiziert. Das Mutantenfragment war identisch zum Wildtypfragment, mit Ausnahme einer Punktmutation an der Aminosäureposition 344, bei der die Wildtyp-DNA-Sequenz CTG in CAG geändert war.

[0055] Eine 12-mer PNA-Sonde wurde von PerSeptive Biosystems, Inc. (Framingham, MA, USA) erhalten und wurde so gestaltet, dass sie komplementär zu einem 12 Nukleotidsegment des 150 by p53 Wildtypfragment (SEQ ID Nr.:1) war. Die Sonde hatte die folgende Struktur:

5' H-Fluo CAT TCA GCT CTC Lys -CONH<sub>2</sub>

[0056] Die Pufferlösung für die Hybridisierung bestand aus 10 mM Tris-HCl, pH 7,1, 1 Gewichtsprozent BSA (Rinderserumalbumin) und 0,1 % Triton X-100 (tert.-Octylphenoxypolyethoxyethanol). Es wurden 50 pmol der genomischen Wildtyp-DNA in 300 pmol der PNA-Sonde gegeben und in 100 µl Puffer gemischt. 50 pmol der genomischen Mutanten-DNA wurde zu 300 pmol der PNA-Sonde gegeben und in 100 µl Puffer gemischt.

[0057] Jede Sonde wurde bei 95°C für 30 Minuten erhitzt. Jede Probe wurde dann zu dem Puffer gegeben, der auf 30°C vorerwärmt war, und man ließ für 1 Stunde hybridisieren.

[0058] Die Komponenten jeder Probe wurden über G50 Spinsäulen (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durch Zentrifugieren bei 600g für 2 Minuten aufgetrennt. Die ungebundene PNA wurde zentrifugiert und verblieb in der Säule. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden ging durch die Säule und wurde in einer Küvette für den Fluoreszenznachweis gesammelt. Die Küvette wurde dann in ein Fluoreszenzspektrometer für eine laserinduzierte Fluoreszenz (Bestrahlungswellenlänge von 488 nm in allen Beispielen) und den Nachweis der fluoreszierenden Sonde, die an die genomische Ziel-DNA gebunden ist, eingesetzt. Wie in den **Fig. 3B** und **3C** gezeigt ist, war die relative Fluoreszenzintensität bei 525 nm der genomischen Wildtyp-DNA-Probe (**Fig. 3B**) 4mal höher als diejenige der mutanten Probe (**Fig. 3C**), was die Unterscheidung der genomischen DNA-Mutantenprobe von der genomischen Wildtyp-DNA-Probe erlaubte. **Fig. 3A** zeigt die Fluoreszenzintensität der Sonde allein.

## Beispiel 2

[0059] Dieses Beispiel war ähnlich wie Beispiel 1, mit der Ausnahme folgender Einzelheiten. Die genomische Mutanten-DNA-Probe (SEQ ID No.:3) hatte eine Basensequenz, bei der die Aminosäureposition 344 von der Wildtypsequenz CTG in CGG geändert war. Beide Proben wurden bei 94°C für 20 Minuten erhitzt. Der Puffer wurde auf 25°C vorgewärmt, und man ließ die Proben für 30 Minuten hybridisieren. Die Komponenten jeder Probe wurden unter Verwendung von G50 Spinsäulen und Zentrifugieren bei 800 Upm für 1,5 Minuten aufgetrennt. Die relative Intensität bei 525 nm der nachgewiesenen Fluoreszenz von der genomischen Wildtyp-DNA-Probe (**Fig. 4B**) war 6mal größer als die der genomischen Mutanten-DNA-Probe (**Fig. 4C**), was die Unterscheidung der genomischen Wildtyp-Probe von der mutierten genomischen Probe erlaubt. **Fig. 4A** zeigt die Fluoreszenzintensität der Sonde allein in der Lösung.

## Beispiel 3

[0060] Dieses Beispiel war ähnlich wie die Beispiele 1 und 2, mit der Ausnahme folgender Einzelheiten. Die genomische Mutanten-DNA-Probe (SEQ ID No.:4) hatte zwei Basenänderungen von der genomischen Wildtyp-DNA an der Aminosäureposition 344, von CTG nach AAG. Jede Probe wurde anfangs bei 100°C für 45 Minuten erhitzt. Der Puffer wurde auf 45°C vorerwärmt, und man ließ jede Probe für 20 Minuten hybridisieren. Die Komponenten jeder Probe wurden unter Verwendung von G75 Spinsäulen und Zentrifugieren bei 1000

Upm für 1 Minute aufgetrennt. Die relative Intensität bei 525 nm der nachgewiesenen Fluoreszenz von der genomischen Wildtyp-DNA-Probe (**Fig. 5A**) war 8mal höher als diejenige der genomischen Mutantenprobe (**Fig. 5B**), was die Unterscheidung der genomischen Wildtypprobe von der genomischen Mutantenprobe erlaubte.

#### Beispiel 4

[0061] Dieses Beispiel war ähnlich wie Beispiel 3, mit der Ausnahme folgender Einzelheiten. Die genomische Mutanten-DNA-Probe (SEQ ID No.:5) hatte eine Zweibasenänderung von der genomischen Wildtyp-DNA an der Aminosäureposition 344, von CTG zu GCG. Jede Probe wurde anfangs bei 100°C für 15 Minuten erhitzt. Der Puffer wurde auf 50°C vorerhitzt, und man ließ jede Probe für 2 Stunden hybridisieren. Die Komponenten jeder Probe wurden unter Verwendung von G50 Spinsäulen und Zentrifugieren bei 1200 Upm für 1 Minute aufgetrennt. Die relative Intensität bei 525 nm der nachgewiesenen Fluoreszenz von der genomischen Wildtyp-DNA-Probe war 7mal höher als diejenige von der genomischen Mutantenprobe, was die Unterscheidung der genomischen Wildtypprobe (**Fig. 6A**) von der mutierten genomischen Probe (**Fig. 6B**) erlaubte.

#### Beispiel 5

[0062] Dieses Beispiel war ähnlich wie die anderen Beispiele, mit der Ausnahme folgender Einzelheiten. Die genomische Mutanten-DNA-Probe (SEQ ID No.:6) hatte eine 3-Basenänderung von der genomischen Wildtyp-DNA an der Aminosäureposition 344, von CTG nach TAC. Jede Probe wurde anfangs bei 95°C für 30 Minuten erhitzt. Der Puffer wurde auf 25°C vorerwärmt, und man ließ jede Probe für 60 Minuten hybridisieren. Die Komponenten jeder Probe wurden unter Verwendung von G50 Spinsäulen und Zentrifugieren bei 750 Upm für 2 Minuten getrennt. Wie in den **Fig. 7A** und **7B** gezeigt ist, war die relative Intensität bei 525 nm der nachgewiesenen Fluoreszenz von der genomischen Wildtyp-DNA-Probe (**Fig. 7A**) 10mal höher als diejenige der genomischen Mutantenprobe (**Fig. 7B**), was die Unterscheidung der genomischen Wildtypprobe von der genomischen Mutantenprobe erlaubte.

#### Beispiel 6

[0063] Dieses Beispiel war ähnlich wie Beispiel 1, mit der Ausnahme folgender Einzelheiten. 100 pmol der 12 by PNA von Beispiel 1 mit Fluoreszeinmarkierung (Per Septive Biosystems), 25 pmol der 150 by PCR amplifizierten dsDNA, einschließlich Wildtyp (CTG) (SEQ ID No.:1) und die in einer Base mutierte DNA (CAG, SEQ ID No.:2 und CGG, SEQ ID No.:3) und 115 µl Puffer (0,5xTBE-Arbeitslösung (0,0225Mol Trisborat/0,0005Mol EDTA), pH 6,5) wurden bei Raumtemperatur vermischt. Die Mischung wurde dann für 30 Minuten bei 95°C erhitzt und bei Raumtemperatur für etwa 1 Stunde hybridisiert.

[0064] Zwei Metalldrähte, die als Elektroden dienen, wurden in jede Probe eingesetzt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm beobachtet, während eine Spannung von 5 Volt bei einem Strom von 10mA an- und ausgeschaltet wurde, mit einem Elektrodenabstand von etwa 7 oder 8 mm. Wenn die Spannung angelegt war, wanderten die DNA und die DNA-PNA zur Anode, weil die DNA negativ geladen ist, während die ungebundene PNA nicht wanderte, weil sie neutral ist.

[0065] **Fig. 8** zeigt das Fluoreszenzspektrum der Wildtyp-DNA. Nach der Hybridisierung bei 25°C für eine Stunde, wurde die Lösung in eine Küvette übertragen. Die Küvette wurde in ein Fluoreszenzspektrometer eingesetzt, und dann wurden zwei Elektroden in die Lösung getaucht, um die Änderung der Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 525 nm mit dem angelegten elektrischen Feld nachzuweisen. Die Fluoreszenzintensität bei 525 nm verminderte sich mit der Spannungsanlegung und erhöhte sich bei Entfernung der Spannung. Die **Fig. 8B** und **8C** zeigen die Fluoreszenzspektren der DNA mit einer Basenfehlpaarung (SEQ ID No.: 2 und SEQ ID No.: 3). Nach der Hybridisierung bei 25°C für 1 Stunde zeigte das Fluoreszenzspektrum der Mutanten-DNA einen Unterschied zum Spektrum der Wildtyp-DNA. Wenn die Spannung angelegt war, erhöhte sich die Intensität schnell, und wenn die Spannung entfernt war, verringerte sich die Intensität.

#### Beispiel 7

[0066] Dieses Beispiel war ähnlich wie Beispiel 1, mit der Ausnahme folgender Einzelheiten. Ein 375 by Fragment der p53 Wildtyp-DNA (SEQ ID No.: 7), ein entsprechendes 375 by DNA-Mutantenfragment (SEQ ID No.: 8), ein entsprechendes 375 by DNA-Mutantenfragment (SEQ ID No.: 9) und ein 633 by DNA-Fragment (SEQ ID No.: 10) wurden durch PCR erhalten. Die 375 by Wildtyp-DNA enthielt eine DNA-Zielsequenz, die komplementär zur 12-Basen-PNA von Beispiel 1 war. Die 633 by DNA hatte diese Zielsequenz nicht, und sie wurde als negative Kontrolle in diesem Beispiel verwendet. SEQ ID No.: 8 war identisch zum Wildtypfragment (SEQ ID No.: 7) mit der Ausnahme einer Punktmutation an der Aminosäureposition 344, bei der die DNA-Wildtypse-



quenz CTG in CAG geändert war. SEQ ID No.: 9 war identisch zum Wildtypfragment (SEQ ID No.: 7) mit der Ausnahme einer Punktmutation an der Aminosäureposition 344, bei der die DNA-Wildtypsequenz CTG in CGG geändert war.

[0067] Jede Probe umfasste 50 pmol des jeweiligen DNA-Fragments, 200 pmol der PNA-Sonde und 130 ml Puffer (0,5xTBE bei einem pH von 6,5). Jede Probe wurde auf 95°C für etwa 30 Minuten erhitzt. Man ließ dann jede Probe für 1 Stunde bei Umgebungsbedingungen (25°C) hybridisieren. Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung mit einer G50 Säule filtriert.

[0068] Jede Probe wurde in ein Fluoreszenzspektrometer zum Nachweis der Fluoreszenzsonde, die an die genomische Ziel-DNA gebunden ist, eingesetzt. Wie bei den vorherigen Beispielen war die relative Fluoreszenzintensität bei 525 nm am höchsten für die Proben, die die DNA-Fragmente vollständig komplementär zur Sonde enthalten, was die Unterscheidung der Proben, die die DNA-Mutantenfragmente (**Fig. 9B–9C**) von der Probe, die die DNA-Wildtypfragmente enthält (**Fig. 9A**), erlaubt. Wie erwartet, zeigte das negative DNA-Kontrollfragment die geringste Fluoreszenzintensität von allen (**Fig. 9D**).

#### Beispiel 8

[0069] Eine klinische Probe wird von einem Individuum, das an einer Krankheit, von der bekannt ist, dass sie durch eine einzelne Nucleotidmutation innerhalb eines bekannten Segments des humanen Genoms verursacht wird, leiden soll, erhalten. Ein Fragment dieses Gensegments wird mit PCR unter Verwendung eines Primers, der das Fragment, ungeachtet dessen, ob es die Wildtyp-DNA oder die DNA-Mutante enthält, amplifizieren kann, amplifiziert.

[0070] Eine PNA-Sonde mit 12 Basen wird bereitgestellt, die komplementär zu einem Teil des DNA-Fragmentmutantentyps, der das mutierte Nucleotid enthält, ist, worin das mutierte Nucleotid eine Base aufweist, die komplementär zur einer in der Mitte befindlichen Base der Sonde ist. Die Sonde wird an ihrem 5'Ende mit Fluoreszein markiert.

[0071] 50 pmol der aus der PCR enthaltenen DNA und 300 pmol der PNA-Sonde werden in 100 ml einer Pufferlösung gegeben. Die Probe wird bei 95°C für 30 Minuten erhitzt. Die Probe wird dann zu dem Puffer, der auf 30°C vorerwärmt ist, gegeben, und man läßt für 1 Stunde hybridisieren.

[0072] Die Komponenten der Probe werden über G50 Spinsäulen durch Zentrifugation bei 600 Upm für 2 Minuten aufgetrennt. Die unhybridisierte PNA wird mit einer Säule filtriert, und das flüssige Individuum, das die Hybride und die DNA enthält, geht durch die Säule und wird in einer Küvette gesammelt.

[0073] Die Küvette wird in ein Fluoreszenzspektrometer für den Nachweis der Fluoreszenzsonde, die an die DNA gebunden ist eingesetzt. Wenn die Fluoreszenzintensität der Probe bei 525 nm einen vorbestimmten Intensitätswert überschreitet, dann ist die DNA vom Mutantentyp in dem Individuum nachgewiesen worden. Wenn die Fluoreszenzintensität der Probe bei 525 nm nicht einen vorbestimmten Intensitätswert überschreitet, dann ist die DNA vom Mutantentyp nicht in dem Individuum nachgewiesen worden. Der vorbestimmte Intensitätswert wird vorher durch Kalibrieren des Spektrometers unter Verwendung von negativen und positiven Kontrollproben bestimmt.

#### Beispiel 9

[0074] Dieses Beispiel ist ähnlich wie Beispiel 8, mit Ausnahme der folgenden Einzelheiten. Zwei nicht markierte DNAs (die eine ist der Wildtyp (SEQ ID No.: 1), die andere ist der mutierte Typ (SEQ ID No.: 3)) sollen identifiziert werden. Eine Sonde, die komplementär zu der mutierten DNA (SEQ ID No.: 3) ist, mit der folgenden Sequenz 5'CAT TCC GCT CTC (synthetisiert mit PerSeptive Biosystems) wurde verwendet, um zwei unbekannte DNAs zu indentifizieren.

[0075] Jede Probe, die 100 pmol Sonde, 25 pmol DNA (WT DNA oder mutierte DNA) und 115 µl Puffer (0,5xTBE, pH 6,5) umfasst, wurde bei 95°C für 30 Minuten erhitzt. Man ließ dann jede Probe für 1 Stunde bei 25°C hybridisieren. Vor der Fluoreszenzmessung wurde jede Probe auf eine G50 Säule aufgetragen und bei 750 Upm für 2 Minuten zentrifugiert. Der Hybrid floß durch die Säule und wurde in einer Küvette gesammelt, während die unhybridisierte Sonde filtriert wurde und auf der Säule verblieb. Die Küvette wurde in ein Fluoreszenzspektrometer für die Fluoreszenzmessung eingesetzt.

[0076] Wie in den **Fig. 10A** und **10B** gezeigt ist, zeigt die relative Fluoreszenzintensität bei 525 nm eine große Differenz in den Spektren. Die Probe mit einem stärkeren Fluoreszenzsignal (**Fig. 10A**) wird als die Mutanten-DNA (SEQ ID No.: 3) identifiziert. Die andere Probe mit der schwächeren Fluoreszenzintensität ist die Wildtyp-DNA (SEQ ID No.: 1).

#### Beispiel 10

[0077] Dieses Beispiel ist ähnlich wie Beispiel 8, mit Ausnahme der folgenden Einzelheiten. Anstatt der Ver-

wendung einer einzelnen Sonde wie in Beispiel 8, wurden in diesem Beispiel zwei Sonden verwendet. Die erste Sonde ist die Sonde von Beispiel 8, die vollständig komplementär zu einem Bereich des DNA-Fragments vom Mutantentyp ist. Die zweite Sonde ist identisch mit der ersten Sonde, mit der Ausnahme, dass sie die Wildtyp-Nucleobasensequenz anstelle der Nucleobasensequenz vom Mutantentyp aufweist. Ein erster Bereich der Probe wird gemäß Beispiel 8 unter Verwendung der ersten Sonde geprobt. Ein zweiter Bereich, der äquivalent im Hinblick auf die Größe des ersten Bereichs ist, wird in ähnlicher Weise unter Verwendung der zweiten Sonde geprobt. Nach der Denaturierung, Hybridisierung und Trennung, wird die Fluoreszenz von jedem Bereich gemessen. Wenn die Fluoreszenzintensität des ersten Bereichs diejenige des zweiten Bereichs überschreitet, dann ist die DNA vom Mutantentyp in dem Individuum nachgewiesen worden. Wenn die Fluoreszenzintensität des zweiten Bereichs diejenige des ersten Bereichs überschreitet, dann ist die DNA von Mutantentyp nicht in dem Individuum nachgewiesen worden.

[0078] Die Methode dieses Beispiels könnte auch für die Anwendung mit einer diagnostischen Vorrichtung, die einen festen Träger mit zwei kontrastierenden Arten von PNA-Sonden, die an verschiedene Bereiche des Trägers gebunden sind, umfasst, geeignet sein. Die Probe ist nicht aufgeteilt, sondern sie ist vielmehr gleichmäßig auf dem Träger dispergiert, so dass beide Sondentypen gleichmäßig in Kontakt kommen. Die Fluoreszenzintensität der beiden Bereiche der Vorrichtung kann in der gleichen Weise wie die zwei getrennten Proben in Beispiel 9 verglichen werden.

#### Beispiel 11

[0079] Biotinylierte doppelsträngige DNA (SEQ ID No.: 1 und SEQ ID No.: 3) wurde mit PCR amplifiziert. Es wurde einsträngige DNA unter Verwendung von Dynabeads (von DYNAL company) wie folgt hergestellt: 25 µl 2 × Bindungs- und Waschpuffer (von M-280 streptavidin kit) und 25 µl (25 pmol) biotinylierte DNA (SEQ No.: 1 und No.: 2) wurden in 2 mg der vorgewaschenen Dynabeads von M-280 Streptavidin gegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert, wobei die Perlen suspendiert gehalten wurden. Die Mischung wurde dann in einen Magneteilchenkonzentrator (MPC, Dynal, Inc.) bei Raumtemperatur für 2 Minuten eingesetzt, wonach dann der Überstand mit einer Pipette entfernt wurde. 20 µl frisch hergestellte 0.1N NaOH wurden hinzugegeben, und die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten gehalten. Die Dynabeads wurden mit dem immobilisierten biotinylierten Strang auf der Seite des Röhrchens unter Verwendung von MPC gesammelt, und der NaOH-Überstand wurde mit der nichtbiotinylierten einzelsträngigen DNA in ein sauberes Röhrchen übertragen. Der NaOH-Überstand wurde mit 2,5 µl frisch hergestellter 0,2N HCl neutralisiert.

[0080] 200 pmol der Sonde und 150 µl 0,5 × TBE Puffer wurden in den Überstand, der eine einsträngige DNA enthält, gegeben. Die Mischung wurde bei 94°C für 5 Minuten erhitzt und dann bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Nach der Trennung auf einer G50 Säule bei 650 Upm für 2 Minuten, wurde die ungebundene PNA in der Säule filtriert, und der Hybrid ging durch die Säule und wurde in einer Küvette gesammelt. Die Probe wurde in ein Fluoreszenzspektrometer für den Fluoreszenznachweis eingesetzt. Wie in den **Fig. 11A** und **11B** gezeigt ist, war die relative Fluoreszenzintensität bei 525 nm der einsträngigen DNA-Probe vom Wildtyp (**Fig. 11A**) 5mal höher als diejenige der einzelsträngigen DNA-Mutanten (**Fig. 11B**).

#### Beispiel 12

[0081] Jede Probe, die 400 pmol Sonde, 100 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 1) und 100 µl Puffer (0,5xTBE, pH 6,5) enthielt, wurde bei 95°C für 30 Minuten erhitzt. Man ließ dann jede Probe für 1 Stunde bei 25°C hybridisieren. Vor der Fluoreszenzmessung wurde jede Probe auf eine G50 Säule übertragen und bei 720 Upm für 2 Minuten zentrifugiert. Die Hybride flossen durch die Säule und wurden in einer Küvette gesammelt, während die unhybridisierte Sonde filtriert wurde und in der Säule verblieb. Die Küvette wurde in ein Fluoreszenzspektrometer für die Fluoreszenzmessung eingesetzt.

[0082] Wie in den **Fig. 12A** und **12B** gezeigt ist, zeigt die relative Fluoreszenzintensität bei 525 nm eine große Differenz in den Spektren. Das Spektrum mit einem stärkeren Fluoreszenzsignal (**Fig. 12A**) zeigt eine perfekt übereinstimmende Sondenhybridisierung mit WT DNA (SEQ ID Nr.: 1). Das andere Spektrum mit einer schwächeren Fluoreszenzintensität (**Fig. 12B**) zeigt eine by Basenfehlpaarung in der Sondenhybridisierung mit WT DNA (SEQ ID Nr.: 1).

#### Beispiel 13

[0083] Zwei DNA-Sonden, mit dem gleichen Farbstoff (Fluorescein) die mit zwei perfekt übereinstimmenden Zielen in verschiedenen Strängen hybridisiert sind.

[0084] Beispiel 13a: Eine Sonde, die perfekt mit einer Zellsequenz übereinstimmt.

[0085] Ein 150 by Fragment genomischer DNA von einer mutierten p53 DNA (SEQ ID Nr.: 11) wurde mit PCR amplifiziert und unter Verwendung von QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc.; Chatsworth, CA, USA)

amplifiziert. Das mutierte Fragment war identisch mit dem Wildtypfragment (SEQ ID Nr.: 1), mit der Ausnahme einer 2-Basenmutation an der Aminosäureposition 340 (d. h. Basen 88-90), wo die DNA-Wildtypsequenz ATG in GAG geändert war.

[0086] Eine 12-mer PNA-Sonde (Sonde Nr. 1) wurde mit PerSeptive Biosystems, Inc. von Framingham, MA, USA synthetisiert. Die Sonde hat die Struktur:

**5' H-Fluo-O-CAT TCA GCT CTC Lys-CONH<sub>2</sub>,**

aufweist, war so gestaltet, dass sie mit einem 12 Nukleotidsegment der 150 bp p53 ME DNA, die am Basenpaar an der Stelle 95 beginnt und an der Basenpaarstelle 106 endet (siehe SEQ ID Nr.: 11), komplementär war.

[0087] Es wurde 0,5 × TBE-Lösung (0,0225 Mol Tris-borate/0,0005 Mol EDTA, pH 6,5) als Hybridisierungspuffer verwendet. 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 11) wurden in 115 µl 0,5xTBE-Puffer gegeben. Dann wurden 2,5 pmol der Sonde Nr. 1 in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0088] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung mit einer G50 Spinsäule (erhältlich von Pharmacia Biotech, AB, Uppsala, Schweden) filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0089] **Fig. 13A** zeigt das Fluoreszenzspektrum von 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 11), die mit 2,5 pmol der Sonde Nr. 1 hybridisiert ist. Es erscheint ein Peak bei 525 nm.

[0090] Beispiel 13b: Eine Sonde, die perfekt mit einer Zielsequenz übereinstimmt.

[0091] Es wurde eine 12-mer PNA-Sonde (Sonde Nr.2), die mit PerSeptive Biosystems, Inc. hergestellt ist und die Struktur

**5' H-Fluo-O-TCG AGG AGT TCC Lys-CONH<sub>2</sub>,**

aufweist, hergestellt, die vollständig komplementär zu einem Ziel im Strang von ME DNA die komplementär zu dem Strang ist, der in Beispiel 13a als Ziel diente, war, mit Start an der Basenpaarposition 83 und dem Ende bei der Basenpaarposition 94 (siehe SEQ ID Nr.: 11).

[0092] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 11) wurden in 115 µl 0,5xTBE-Puffer gegeben. Dann wurde die Sonde in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0093] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0094] **Fig. 13B** zeigt das Fluoreszenzspektrum von 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 11), die mit 5 pmol der Sonde 2 hybridisiert ist.

[0095] Beispiel 13c: Zwei Sonden, die perfekt mit zwei Zielsequenzen in verschiedenen Strängen übereinstimmen.

[0096] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 11) wurden in 115 µl 0,5xTBE-Puffer gegeben. Dann wurden 2,5 pmol der Sonde Nr. 1 und 5 pmol der Sonde Nr. 2 in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0097] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinkolonne filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA Hybriden wurde in eine Küvette überführt und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0098] **Fig. 13C** zeigt das Fluoreszenzspektrum von 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 11), die mit 2,5 pmol der Sonde Nr. 1 und 5 pmol der Sonde Nr. 2 hybridisiert ist. Wie in **Fig. 13C** gezeigt ist, beträgt die Fluoreszenzintensität bei 525 nm etwa die Summe der Intensitäten bei 525nm, die in den **Fig. 13A** und **13B** gezeigt sind.

#### Beispiel 14

[0099] Zwei PNA-Sonden mit verschiedenen Farbstoffen (Fluoreszein und Rhodamin), die mit einem perfekt übereinstimmenden Ziel hybridisiert sind.

#### Beispiel 14a

[0100] Ein 150 bp Fragment genomischer DNA von der Wildtyp p53 DNA (SEQ ID Nr.: 1) wurde mit PCR amplifiziert und unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit gereinigt.

[0101] Eine 12-mer Rhodamin markierte PNA-Sonde (Sonde Nr. 3), die mit PerSeptive Biosystems, Inc., synthetisiert ist und die Struktur

**5' H-Rho-O-CAT TCA GCT CTC Lys-CONH<sub>2</sub>,**

aufweist, wurde so gestaltet, dass sie zu einem 12 Nukleotidsegment der 150 bp p53 DNA komplementär ist,

mit einem Start an der Basenpaarposition 15 und dem Ende an der Basenpaarposition 106 (siehe SEQ ID Nrs: 1, 11 und 12).

[0102] 20 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 1) wurden in 50 µl 0,5xTBE-Puffer gegeben. Dann wurden 20 pmol der Sonde Nr. 3 in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0103] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösungen mit den PNA-DNA Hybriden wurde in eine Küvette überführt und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0104] **Fig. 14A** zeigt das Fluoreszenzspektrum der DNA, die mit der Rhodamin markierten PNA-Sonde hybridisiert ist. Der Emissionspeak im Fluoreszenzspektrum taucht bei etwa 580 nm auf.

#### Beispiel 14b

[0105] 20 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 1) wurden in 50 µl 0,5xTBE-Puffer gegeben. Dann wurden 15 pmol der rhodaminmarkierten Sonde (Sonde Nr. 3) und 5 pmol der fluoresceinmarkierten Sonde (Sonde Nr. 1) in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt, und dann wurde die Probe bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0106] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA Hybriden wurde in eine Küvette überführt und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0107] **Fig. 14B** zeigt ein Fluoreszenzspektrum der DNA, die die mit der Sondenmischung aus der Rhodamin markierten PNA-Sonde (Sonde Nr. 3) und der Fluorescein markierten PNA-Sonde (Sonde Nr. 1) hybridisiert ist. Eine Schulter, die bei 580 nm auftaucht, ist zumindest zum Teil auf die Rhodamin markierte Sonde, die mit der Zielsequenz hybridisiert ist, zurückzuführen und ein Peak, der bei 525 nm auftaucht, ist teilweise auf die Fluorescein markierte Sonde, die mit der Zielsequenz hybridisiert ist, zurückzuführen.

#### Beispiel 15

[0108] Zwei PNA-Sonden mit verschiedenen Farbstoffen (Fluorescein und Rhodamin), die mit zwei perfekt übereinstimmenden Zielen auf zwei Strängen hybridisiert sind.

#### Beispiel 15a

[0109] 20 pmol DNA (SEQ ID Nr. 11) wurden in 50 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurden 20 pmol der Rhodamin markierten Sonde (Sonde Nr. 3) in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt, und dann wurde die Probe bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0110] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinkolonne filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0111] **Fig. 15A** zeigt ein Fluoreszenzspektrum der DNA, die mit der Rhodamin markierten PNA-Sonde (Sonde Nr. 3) hybridisiert ist. Ein breiter Peak taucht bei 580 nm auf, der von den Hybridisierungskomplexen herührt, die mit Rhodamin markiert sind.

#### Beispiel 15b

[0112] 20 pmol DNA (SEQ ID Nr. 11) wurden in 50 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurden 20 pmol einer Rhodamin markierten Sonde (Sonde Nr. 3) und 5 pmol einer Fluorescein markierten Sonde (Sonde Nr. 2) in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt, und dann wurde die Probe bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0113] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinkolonne filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0114] **Fig. 15B** zeigt ein Fluoreszenzspektrum der DNA, die mit den Sonden Nummern 2 und 3 hybridisiert ist. Ein breiter Peak taucht bei 580 nm auf und ist auf die Rhodamin markierte Sonde zurückzuführen, und ein Peak taucht bei 525 nm auf, der auf die Fluorescein markierte Sonde zurückzuführen ist.

#### Beispiel 16

[0115] Eine PCR amplifizierte und gereinigte 633 by DNA (SEQ ID Nr.: 10) ohne Zielsequenz wurde als negative Kontrolle für die Sonden verwendet.

[0116] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 10) wurden in 115 µl 0.5xTBE-Puffer gegeben, und dann wurden die Sonden mit den Nummern 1–3 in die Lösung gegeben. Jede Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und dann bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0117] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinkolonne filtriert.

[0118] Die Lösung wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0119] **Fig. 16A** zeigt ein Fluoreszenzspektrum einer Sonde allein (d. h., dass keine DNA in die Probe gegeben wurde, die 15 pmol der Sonden —5 pmol von jeweils der Sonden mit den Nummern 1, 2 und 3 enthielt).

[0120] **Fig. 16B** zeigt ein Fluoreszenzspektrum mit 5 pmol der Sonde Nr. 1 und der DNA-Negativkontrolle (SEQ ID Nr.: 10).

[0121] **Fig. 16C** zeigt ein Fluoreszenzspektrum mit 5 pmol der Sonde Nr. 2 und der DNA-Negativkontrolle (SEQ ID Nr.: 10).

[0122] **Fig. 16D** zeigt ein Fluoreszenzspektrum mit 5 pmol der Sonde Nr. 3 und der DNA-Negativkontrolle (SEQ ID Nr.: 10).

[0123] Alle Spektren zeigten die Fluoreszenzintensität bei einem Hintergrundniveau bei 525 nm und 580 nm.

#### Beispiel 17

[0124] Zwei DNA-Sonden mit dem gleichen Farbstoff (Fluorescein), die mit einer Zielsequenz mit einer Basenfehlpaarung und einer perfekt übereinstimmenden Zielsequenz hybridisiert sind.

#### Beispiel 17a

[0125] Ein 15 by Fragment genomischer DNA des p53 DNA-Gens MQ (SEQ ID Nr.: 12) wurde durch PCR amplifiziert und unter Verwendung des QIAquick PCT Purification Kit gereinigt. Das mutierte Fragment war identisch zu dem ME-DNA (SEQ ID Nr.: 11) -Fragment, mit Ausnahme einer Basenmutation an der Aminosäureposition 340 (Basen 80–90), an der die DNA-Sequenz CTG in GTC geändert war.

[0126] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 12) wurden in 115 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurden 5 pmol der Sonde Nr. 2, die eine Basenfehlpaarung gegenüber der Zielsequenz aufweist, in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0127] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0128] **Fig. 17A** zeigt das Fluoreszenzspektrum von 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 12), die mit 5 pmol der Sonde Nr. 2 hybridisiert ist. Das Spektrum zeigt die Fluoreszenzintensität bei Hintergrundniveau.

#### Beispiel 17b

[0129] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 12) wurden in 115 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurde die Sonde Nr. 1 in die Lösung gegeben. Die Sonde stimmte perfekt mit dem DNA-Ziel überein. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0130] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0131] **Fig. 17B** zeigt das Fluoreszenzspektrum mit 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 12), die mit 5 pmol der Sonde Nr. 1 hybridisiert ist. Das positive Signal bei 525 nm ist deutlich in **Fig. 17B** gezeigt.

#### Beispiel 17c

[0132] Es wurden 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 12) in 115 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurden 5 pmol der Sonde Nr. 1 und 5 pmol der Sonde Nr. 2 in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0133] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Probe aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0134] **Fig. 17C** zeigt das Fluoreszenzspektrum mit 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 12), die mit 5 pmol der Sonde Nr. 1 und 5 pmol der Sonde Nr. 2 hybridisiert ist. Die Fluoreszenzintensität bei 525 nm ist etwa gleich der Intensität, die in **Fig. 17B** gezeigt ist.

## Beispiel 18

[0135] 2 PNA-Sonden mit unterschiedlichen Farbstoffen (Fluorescein und Rhodamin), die mit einem Ziel mit einer Basenfehlpaarung und mit einem perfekt übereinstimmenden Ziel hybridisiert sind.

## Beispiel 18a

[0136] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 12) wurden in 115 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurden 5 pmol der Rhodamin markierten Sonde (Sonde Nr. 3) in die Lösung gegeben. Diese Sonde stimmte perfekt mit der Zielsequenz überein. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0137] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0138] **Fig. 18A** zeigt das Fluoreszenzspektrum mit 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 12), die mit 5 pmol der Sonde Nr. 3 hybridisiert ist. Das positive Signal bei 580 nm ist deutlich in **Fig. 18A** gezeigt.

## Beispiel 18b

[0139] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 12) wurden in 115 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurden 5 pmol der Sonde Nr.3, die perfekt mit der Zielsequenz übereinstimmte und 5 pmol der Sonde Nr. 2, die eine Basenfehlpaarung gegenüber der Zielsequenz aufweist, in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0140] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0141] **Fig. 18B** zeigt das Fluoreszenzspektrum mit 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 12), die mit 5 pmol der Sonde Nr. 3 und 5 pmol der Sonde Nr. 2 hybridisiert ist. Die Fluoreszenzintensität bei 525 nm ist etwa gleich zur Intensität, die in **Fig. 18A** gezeigt ist. Der Unterschied zwischen der Intensität bei 580 nm und bei 525 nm ist etwa gleich zu der, die in **Fig. 18A** gezeigt ist.

## Beispiel 19

[0142] Drei PNA-Sonden mit dem gleichen Farbstoff (Fluorescein), die mit zwei Zielsequenzen mit einer Basenfehlpaarung und mit einem perfekt übereinstimmenden Ziel hybridisiert sind.

## Beispiel 19a

[0143] Ein 115 by Fragment genomischer DNA des p53 DNA-Gens QR (SEQ ID Nr.: 13) wurde mit PCR amplifiziert und unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Das mutierte Fragment war identisch zu dem ME-DNA (SEQ ID Nr.: 11)-Fragment, mit Ausnahme einer Basenmutation an der Aminosäureposition 340 (Basen 85–87), an der die DNA-Sequenz CTC in GTC geändert war und einer Basenfehlpaarung an der Aminosäureposition 344 (Basen 100–112), bei der die DNA-Sequenz CTG in CGG geändert war.

[0144] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 13) wurden in 115 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurden 5 pmol der Sonde Nr. 1, die eine Basenfehlpaarung gegenüber der Zielsequenz an der Basenpaarposition 101 aufweist, in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0145] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung mit einer G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0146] **Fig. 19A** zeigt das Fluoreszenzspektrum mit 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 13), die mit 5 pmol der Sonde Nr. 1 hybridisiert ist. Das Spektrum zeigt die Fluoreszenzintensität bei 525 nm bei Hintergrundniveau.

## Beispiel 19b

[0147] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 13) wurden in 115 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurde die Sonde Nr. 2, die eine Basenfehlpaarung zur Zielsequenz an der Basenpaarposition 85 aufweist, in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0148] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0149] **Fig. 19B** zeigt das Fluoreszenzspektrum mit 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 13), die mit 5 pmol der Sonde Nr. 2 hybridisiert ist. Das Spektrum zeigt die Fluoreszenzintensität bei 525 nm bei Hintergrundniveau.

#### Beispiel 19c

[0150] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 13) wurden in 115 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Eine 12-mer Fluorescein markierte PNA-Sonde (Sonde Nr. 4), die mit PerSeptive Biosystems, inc., synthetisiert ist und die Struktur

**5'-H-Fluo-O-CAT TCC GCT CTC Lys-CONH<sub>2</sub>,**

aufweist, wurde so gestaltet, dass sie vollständig komplementär zu einem 12 Nucleotidsegment von SEQ ID Nr 13 war, mit einem Start an der Basenpaarposition 95 und dem Ende an der Basenpaarposition 106. Diese Sonde wurde in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0151] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung mit einer G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0152] **Fig. 19C** zeigt das Fluoreszenzspektrum mit 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 13), die mit 5 pmol der Sonde Nr. 4 hybridisiert ist. Das positive Signal bei 525 nm ist deutlich in **Fig. 19C** gezeigt.

#### Beispiel 19d

[0153] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 13) wurden in 115 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurden 5 pmol der Sonde Nr. 1 und 5 pmol der Sonde Nr. 2 in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0154] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0155] **Fig. 19D** zeigt das Fluoreszenzspektrum von 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.:13), die mit 5 pmol der Sonde Nr. 1 und 5 pmol der Sonde Nr. 2 hybridisiert ist. Das Spektrum zeigt die Fluoreszenzintensität bei 525 nm bei Hintergrundniveau.

#### Beispiel 19e

[0156] 5 pmol DNA (SEQ ID Nr.: 13) wurden in 115 µl 0,5 × TBE-Puffer gegeben. Dann wurden 5 pmol der Sonde Nr. 1, 5 pmol der Sonde Nr. 2 und 5 pmol der Sonde Nr.4 in die Lösung gegeben. Die Probe wurde bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert.

[0157] Vor der Fluoreszenzmessung wurde die ungebundene Sonde aus der Lösung über eine G50 Spinsäule filtriert. Die Lösung mit den PNA-DNA-Hybriden wurde in eine Küvette gegeben und einer Fluoreszenzmessung unterworfen.

[0158] **Fig. 19E** zeigt das Fluoreszenzspektrum der QR-DNA (SEQ ID Nr.: 13), die mit den PNA-Sonden mit den Nummern 1, 2 und 4 hybridisiert ist. Die Fluoreszenzintensität bei 525 nm ist etwa gleich der Intensität, die in **Fig. 19C** gezeigt ist.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) Allgemeine Information:

- (i) Anmelder: Eileen Nie und Yuan Min Wu
- (ii) Titel der Erfindung: PNA-Diagnosemethoden
- (iii) Zahl der Sequenzen: 13
- (iv) Korrespondenzadresse:

- (A) Empfänger: Caesar, Rivise, Bernstein, Cohen & Pokotilow. Ltd.
- (B) Straße: 12<sup>th</sup> Floor, 7 Penn Center, 1635 Market Street
- (C) Stadt: Philadelphia
- (D) Staat: Pennsylvania
- (E) Land: U.S.A.
- (F) PLZ: 19103-2212

(v) Computer lesbare Form:

- (A) Mediumtyp: Floppy disk
- (B) Computer: IBM PC kompatibel
- (C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: Patentin Release #1,0., Version #1.30

(vi) Aktuelle Anmeldungsdaten:

- (A) Anmeldungsnummer:
- (B) Einreichungstag:

(vii) Information über Anwalt/Agent:

- (A) Name: Tener, David M.
- (B) Registrationsnummer: 37.054
- (C) Referenz/Aktenzeichen: E1047/20001

(ix) Telekommunikationsinformation:

- (A) Telefon: 215-567-2010
- (B) Telefax: 215-751-1142



(2) Information für SEQ ID Nr.:1:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 150 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelstängig
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekulare: genomische DNA

(iii) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:1:

```
AACACCAGCT CCTCTCCCA GCCAAAGAAG AAACCACTGG ATGGAGAATA TTTCACCCTT 60
CAGATCCGTG GGCCTGAGCG CTTGAGATG TTCCGAGAGC TGAATGAGGC CTTGGAACTC 120
AAGGATGCCC AGGCTGGGAA GGAGCCAGGG 150
```

(2) Information für SEQ ID Nr.:2:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 150 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelstängig
- (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:2:

```
AACACCAGCT CCTCTCCCA GCCAAAGAAG AAACCACTGG ATGGAGAATA TTTCACCCTT 60
CAGATCCGTG GGCCTGAGCG CTTGAGATG TTCCGAGAGC AGAATGAGGC CTTGGAACTC 120
AAGGATGCCC AGGCTGGGAA GGAGCCAGGG 150
```

(2) Information für SEQ ID Nr.:3:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 150 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelstängig
- (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:3:

```
AACACCAGCT CCTCTCCCCA GCCAAAGAAG AAACCACTGG ATGGAGAATA TTTCACCCTT 60
CAGATCCGTG GGCCTGAGCG CTTGAGATG TTCCGAGAGC GGAATGAGGC CTTGGAATC 120
AAGGATGCCC AGGCTGGGAA GGAGCCAGGG 150
```

(2) Information für SEQ ID Nr.:4:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 150 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelstängig
- (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:4:

```
AACACCAGCT CCTCTCCCCA GCCAAAGAAG AAACCACTGG ATGGAGAATA TTTCACCCTT 60
CAGATCCGTG GGCCTGAGCG CTTGAGATG TTCCGAGAGA AGAATGAGGC CTTGGAATC 120
AAGGATGCCC AGGCTGGGAA GGAGCCAGGG 150
```

(2) Information für SEQ ID Nr.:5:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 150 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelstängig
- (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:5:

```
AACACCAGCT CCTCTCCCCA GCCAAAGAAG AAACCACTGG ATGGAGAATA TTTCACCCTT 60
CAGATCCGTG GGCCTGAGCG CTTGAGATG TTCCGAGAGG CGAATGAGGC CTTGGAATC 120
AAGGATGCCC AGGCTGGGAA GGAGCCAGGG 150
```

## (2) Information für SEQ ID Nr.:6:

## (i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 150 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelstängig
- (D) Topologie: linear

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:6:

```

AACACCAGCT CCTCTCCCA GCCAAGAAG AAACCACTGG ATGGAGAATA TTTCACCCTT 60
CAGATCCGTG GGCCTGAGCG CTTCGAGATG TTCCGAGAGT ACAATGAGGC CTTGGAACTC 120
AAGGATGCCC AGGCTGGGAA GGAGCCAGGG                                     150

```

## (2) Information für SEQ ID Nr.:7:

## (i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 375 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelstängig
- (D) Topologie: linear

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:7:

```

TTAATACGAC TCACTATAGG GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTCCCCTCT AGAAATAATT 60
TTGTTTAACT TTAAGAAGGA GATATACCAT GGGCCATCAT CATCATCATC ATCATCATCA 120
TCACAGCAGC GGCCATATCG ACGACGACGA CAAGCAAACA CCAGCTCCTC TCCCAGCCA 180
AAGAAGAAAC CACTGGATGG AGAATATTTC ACCCTTCAGA TCCGTGGGCG TGAGCGCTTC 240
GAGATGTTC GAGAGCTGAA TGAGGCCTTG GAACTCAAGG ATGCCCAGGC TGGGAAGGAG 300
CCAGGGGATC CGGCTGCTAA CAAAGCCCGA AAGGAAGCTG AGTTGGCTGC TGCCACCGCT 360
GAGCAATAAC TAGCA                                                         375

```

## (2) Information für SEQ ID Nr.:8:

## (i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 375 Basen

(B) Art: Nukleotid

(C) Strangform: doppelstängig

(D) Topologie: linear

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:8:

```

TTAATACGAC TCACTATAGG GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTCCCCTCT AGAAATAATT 60
TTGTTTAACT TTAAGAAGGA GATATACCAT GGGCCATCAT CATCATCATC ATCATCATCA 120
TCACAGCAGC GGCCATATCG ACGACGACGA CAAGCAAACA CCAGCTCCTC TCCCAGCCA 180
AAGAAGAAAC CACTGGATGG AGAATATTTC ACCCTTCAGA TCCGTGGGCG TGAGCGCTTC 240
GAGATGTTCC GAGAGCAGAA TGAGGCCTTG GAACTCAAGG ATGCCCAGGC TGGGAAGGAG 300
CCAGGGGATC CGGCTGCTAA CAAAGCCCGA AAGGAAGCTG AGTTGGCTGC TGCCACCGCT 360
GAGCAATAAC TAGCA 375

```

## (2) Information für SEQ ID Nr.:9:

## (i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 375 Basen

(B) Art: Nukleotid

(C) Strangform: doppelstängig

(D) Topologie: linear

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:9:

```

TTAATACGAC TCACTATAGG GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTCCCCTCT AGAAATAATT 60
TTGTTTAACT TTAAGAAGGA GATATACCAT GGGCCATCAT CATCATCATC ATCATCATCA 120

TCACAGCAGC GGCCATATCG ACGACGACGA CAAGCAAACA CCAGCTCCTC TCCCAGCCA 180
AAGAAGAAAC CACTGGATGG AGAATATTTC ACCCTTCAGA TCCGTGGGCG TGAGCGCTTC 240
GAGATGTTCC GAGAGCGGAA TGAGGCCTTG GAACTCAAGG ATGCCCAGGC TGGGAAGGAG 300
CCAGGGGATC CGGCTGCTAA CAAAGCCCGA AAGGAAGCTG AGTTGGCTGC TGCCACCGCT 360
GAGCAATAAC TAGCA 375

```

## (2) Information für SEQ ID Nr.:10:

## (i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 633 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelstängig
- (D) Topologie: linear

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:10:

```

CCGGCGGGCCC CTGCACCAGC CCCCTCCTGG CCCCTGTCAT CTTCTGTCCC TTCCCAGAAA 60
ACCTACCAGG GCAGCTACGG TTTCCGTCTG GGCTTCTTGC ATTCTGGGAC AGCCAAGTCT 120
GTGACTTGCA CGTACTCCCC TGCCCTCAAC AAGATGTTTT GCCAACTGGC CAAGACCTGC 180
CCTGTGCAGC TGTGGGTGA TTCCACACCC CCGCCCGGCA CCCGCGTCCG CGCCATGGCC 240
ATCTACAAGC AGTCACAGCA CATGACGGAG GTTGTGAGGC GCTGCCCCCA CCATGAGCGC 300
TGCTCAGATA GCGATGGTCT GGCCCTCCT CAGCATCTTA TCCGAGTGA AGGAAATTG 360
CGTGTGGAGT ATTTGGATGA CAGAAACACT TTTCGACATA GTGTGGTGGT GCCCTATGAG 420
CCGCCTGAGG TTGGCTCTGA CTGTACCACC ATCCACTACA ACTACATGTG TAACAGTTCC 480

TG CATGGGCG GCATGAACCG GAGGCCCATC CTCACCATCA TCACACTGGA AGACTCCAGT 540
GGTAATCTAC TGGGACGGAA CAGCTTTGAG GTGCGTGTTC GTGCCTGTCC TGGGAGAGAC 600
CGGCGCACAG AGGAAGAGAA TCTCCGCAAG AAA 633

```

(2) Information für SEQ ID Nr.:11:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 150 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelstängig
- (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:11:

```
AACACCAGCT CCTCTCCCCA GCCAAAGAAG AAACCACTGG ATGGAGAATA TTTCACCCTT 60
CAGATCCGTG GGCCTGAGCG CTTGAGGAG TTCCGAGAGC TGAATGAGGC CTTGGAAGTC 120
AAGGATGCCC AGGCTGGGAA GGAGCCAGGG 150
```

(2) Information für SEQ ID Nr.:12:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 150 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelstängig
- (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:12:

```
AACACCAGCT CCTCTCCCCA GCCAAAGAAG AAACCACTGG ATGGAGAATA TTTCACCCTT 60
CAGATCCGTG GGCCTGAGCG CTTGAGCAG TTCCGAGAGC TGAATGAGGC CTTGGAAGTC 120
AAGGATGCCC AGGCTGGGAA GGAGCCAGGG 150
```

## (2) Information für SEQ ID Nr.:13:

## (i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 150 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: doppelsträngig
- (D) Topologie: linear

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.:13:

```

AACACCAGCT CCTCTCCCA GCCAAAGAAG AAACCACTGG ATGGAGAATA TTTCACCCTT   60
CAGATCCGTG GCGTGAGCG CTTCCAGGAG TTCCGAGAGC GGAATGAGGC CTGGAACTC 120
AAGGATGCCC AGGCTGGGAA GGAGCCAGGG                                     150

```

**Patentansprüche**

1. Methode für das Erfassen mindestens einer einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nucleotid-Zielsequenz in einem flüssigen Medium, welche Methode Folgendes umfasst:

Zugeben, zu dem flüssigen Medium, einer PNA-Sonde, die in der Lage ist, einen Hybridisierungskomplex mit der mindestens einen Zielsequenz zu bilden, wobei die PNA-Sonde einen fluoreszierenden Marker umfasst, Abtrennen der nichthybridisierten PNA-Sonde von dem Hybridisierungskomplex unter Bildung eines Testmediums, Bestrahlen des Testmediums mit einem Laserstrahl, der eine Wellenlänge aufweist, die den fluoreszierenden Marker anregt und den fluoreszierenden Marker veranlasst, fluoreszierendes Licht auszustrahlen, Messen einer Intensität des ausgestrahlten fluoreszierenden Lichts, und Vergleichen der gemessenen Intensität mit einer Bezugsintensität, um zu erfassen, ob das flüssige Medium die mindestens eine Zielsequenz enthält und um die Anzahl der Basenfehlpaarungen zwischen der mindestens einen Zielsequenz und der PNA-Sonde über einen Bereich, der 0 Basenfehlpaarungen bis mindestens 3 Basenfehlpaarungen umfasst, zu bestimmen, und wobei die Methode, mit Ausnahme des Abtrennschritts, ausschließlich ohne Binden der PNA-Sonde, der Nucleotidsequenz oder des Hybridisierungskomplexes an einen festen Träger oder ein festes Gel durchgeführt wird.

2. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei die Abtrennung durch mindestens eines unter Filtrieren, Zentrifugieren, Ausfällen und Freilösungselektrophorese ausgeführt wird.

3. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei der Laserstrahl eine Wellenlänge von ca. 450 bis ca. 530 nm aufweist.

4. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei das ausgestrahlte fluoreszierende Licht in einem Bereich von 400 bis 1000 nm gemessen wird.

5. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei mindestens zwei verschiedene PNA-Sonden, die in der Lage sind, einen Hybridisierungskomplex mit der mindestens einen Zielsequenz zu bilden, dem flüssigen Medium zugegeben werden, eine erste von den mindestens zwei verschiedenen PNA-Sonden einem ersten Segment einer ersten Nucleotidzielsequenz komplementär ist, eine zweite der mindestens zwei verschiedenen PNA-Sonden einem zweiten Segment einer zweiten Nucleotidzielsequenz komplementär ist und die ersten und zweiten Segmente voneinander verschieden sind.

6. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 5, wobei die ersten und zweiten Sonden jeweils den ersten und zweiten Segmenten vollständig komplementär sind.

7. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 6, wobei die erste Nucleotidsequenz der zweiten Nucleotidsequenz komplementär ist.
8. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 7, wobei die erste Nucleotidsequenz und die zweite Nucleotidsequenz als doppelsträngige DNA gekoppelt sind.
9. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 6, wobei die erste Nucleotidsequenz und die zweite Nucleotidsequenz sich in verschiedenen Genomen befinden.
10. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 9, wobei die erste Sonde einen ersten Marker aufweist, der eine erste fluoreszierende Ausstrahlungsintensität bei einer ersten Wellenlänge aufweist, die zweite Sonde einen zweiten Marker aufweist, der eine zweite fluoreszierende Ausstrahlungsintensität bei einer zweiten Wellenlänge aufweist, die ersten und zweiten Wellenlängen verschieden sind, die erste Nucleotidsequenz durch Überwachen der fluoreszierenden Ausstrahlungsintensität bei der ersten Wellenlänge und die zweite Nucleotidsequenz durch Überwachen der fluoreszierenden Ausstrahlungsintensität bei der zweiten Wellenlänge erfasst wird.
11. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 6, wobei die erste Sonde einen ersten Marker aufweist, der eine erste fluoreszierende Ausstrahlungsintensität bei einer ersten Wellenlänge aufweist, die zweite Sonde einen zweiten Marker aufweist, der eine zweite fluoreszierende Ausstrahlungsintensität bei einer zweiten Wellenlänge aufweist, die ersten und zweiten Wellenlängen verschieden sind, die erste Nucleotidsequenz durch Überwachen der fluoreszierenden Ausstrahlungsintensität bei der ersten Wellenlänge und die zweite Nucleotidsequenz durch Überwachen der fluoreszierenden Ausstrahlungsintensität bei der zweiten Wellenlänge erfasst wird.
12. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 11, wobei die erste Nucleotidsequenz eine positive Kontrolle darstellt, von der zu erwarten ist, dass sie sich in dem zu analysierenden flüssigen Medium befindet, die erste Intensität die Bezugsintensität darstellt, die zweite Intensität die gemessene Intensität darstellt und die zweite Nucleotidsequenz durch Vergleich der ersten Intensität und der zweiten Intensität erfasst wird.
13. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 12, wobei die zweite Nucleotidsequenz nur in einem mutanten Genom zu finden ist und die erste Nucleotidsequenz in dem mutanten Genom und in einem entsprechenden Wildtyp-Genom zu finden ist.
14. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 13, wobei die ersten und zweiten Marker aus der Gruppe ausgewählt werden, die aus Fluorescein und Rhodamin besteht.
15. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 12, wobei eine dritte PNA-Sonde, die einen dritten Marker aufweist, der eine dritte fluoreszierende Ausstrahlungsintensität bei einer dritten Wellenlänge aufweist, die von den ersten und zweiten Wellenlängen verschieden ist, dem flüssigen Medium als negative Kontrolle zugegeben wird, von der nicht zu erwarten ist, dass sie sich mit irgendeiner Nucleotidsequenz hybridisiert, und die zweite Nucleotidsequenz durch Vergleichen der ersten, zweiten und dritten Intensitäten erfasst wird.
16. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei mindestens zwei verschiedene PNA-Sonden, die in der Lage sind, einen Hybridisierungskomplex mit mindestens einer Zielsequenz zu bilden, dem flüssigen Medium zugegeben werden, eine erste von dem mindestens zwei verschiedenen PNA-Sonden einem ersten Segment der mindestens einen Zielsequenz komplementär ist, eine zweite der mindestens zwei verschiedenen PNA-Sonden einem zweiten Segment der mindestens einen Zielsequenz komplementär ist und die ersten und zweiten Segmente voneinander verschieden sind.
17. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 16, wobei die erste Sonde einen ersten Marker aufweist, der eine erste fluoreszierende Ausstrahlungsintensität bei einer ersten Wellenlänge aufweist, die zweite Sonde einen zweiten Marker aufweist, der eine zweite fluoreszierende Ausstrahlungsintensität bei einer zweiten Wellenlänge aufweist, die ersten und zweiten Wellenlängen verschieden sind, das erste Segment durch Überwachen der fluoreszierenden Ausstrahlungsintensität bei der ersten Wellenlänge und das zweite Segment durch Überwachen der fluoreszierenden Ausstrahlungsintensität bei der zweiten Wellenlänge erfasst wird.



18. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 17, wobei das erste Segment eine positive Kontrolle darstellt, von der zu erwarten ist, dass sie sich in dem zu analysierenden flüssigen Medium befindet, die erste Intensität die Bezugsintensität darstellt, die zweite Intensität die gemessene Intensität darstellt und das zweite Segment durch Vergleich der ersten Intensität und der zweiten Intensität erfasst wird.

19. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 18, wobei eine dritte PNA-Sonde, die einen dritten Marker aufweist, der eine dritte fluoreszierende Ausstrahlungsintensität bei einer dritten Wellenlänge aufweist, die von der ersten und zweiten Wellenlängen verschieden ist, dem flüssigen Medium als negative Kontrolle zugegeben wird, von der nicht zu erwarten ist, dass sie sich mit irgendeinem Nucleotidsegment hybridisiert, und das zweite Segment durch Vergleichen der ersten, zweiten und dritten Intensitäten erfasst wird.

20. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei der Hybridisierungskomplex im wesentlichen aus einer PNA-Sequenz, einem Fluorophor und der Nucleotidsequenz besteht.

21. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei alle bei dieser Methode verwendeten Sonden aus der gleichen Sequenz und dem gleichen Marker bestehen, wobei der Marker der einzige durch die Methode erfasste Marker ist.

22. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei das ausgestrahlte fluoreszierende Licht eine Wellenlänge aufweist, die länger ist als die Laserstrahlwellenlänge.

23. Methode für das Erfassen mindestens einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei mindestens eine Nucleotidsequenz eine doppelsträngige DNA

24. Methode für das Erfassen einer einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nucleotidsequenz in einem ersten flüssigen Medium, welche Methode Folgendes umfasst:

Bereitstellen des ersten flüssigen Mediums, das Probe-Nucleotidsequenzen umfasst, Zugabe, zu dem ersten flüssigen Medium, einer PNA-Sonde, die in der Lage ist, einen Hybridisierungskomplex mit der Nucleotidsequenz zu bilden, wobei die PNA-Sonde einen fluoreszierenden Marker umfasst, Bestrahlen des ersten flüssigen Mediums mit einem Laserstrahl, der eine Wellenlänge aufweist, die den fluoreszierenden Marker anregt und den fluoreszierenden Marker veranlasst, fluoreszierendes Licht auszustrahlen, Erfassen einer ersten Intensität des fluoreszierenden Lichts in dem ersten flüssigen Medium, und Feststellen, ob die erste Intensität einer zweiten Intensität eines zweiten flüssigen Mediums entspricht, das die mit der PNA-Sonde hybridisierte Nucleotidsequenz enthält, um zu erfassen, ob die Nucleotidsequenz sich in dem ersten flüssigen Medium befindet, wobei die PNA-Sonde, die Nucleotidsequenz und der Hybridisierungskomplex nicht an einen festen Träger oder ein festes Gel gebunden sind und der Hybridisierungskomplex im wesentlichen aus einer PNA-Sequenz, einem Fluorophor und der Nucleotidsequenz besteht.

25. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 24, wobei der Laserstrahl durch einen Argonionenlaser hergestellt wird, der den Marker mit Licht von einer Wellenlänge von ca. 450 bis ca. 530 nm bestrahlt.

26. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 24, wobei das fluoreszierende Licht in einem Bereich von 400 bis 1000 nm erfasst wird.

27. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 24, wobei

- (i) es sich bei der Nucleotidsequenz um eine Mutanttyp-DNA handelt, die von einer Wildtyp-DNA zu unterscheiden ist, die von der Mutanttyp-DNA verschieden ist,
- (ii) die PNA-Sonde einem Segment der Mutanttyp-DNA vollständig komplementär und einem Segment der Wildtyp-DNA nicht vollständig komplementär ist und
- (iii) die Mutanttyp-DNA erfasst wird, wenn die erste Intensität der zweiten Intensität entspricht.

28. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 24, wobei

- (i) es sich bei der Nucleotidsequenz um eine Wildtyp-DNA handelt, die von einer Mutanttyp-DNA zu unterscheiden ist, die von der Wildtyp-DNA verschieden ist,
- (ii) die PNA-Sonde einem Segment der Wildtyp-DNA vollständig komplementär und einem Segment der Mutanttyp-DNA nicht vollständig komplementär ist und

(iii) die Wildtyp-DNA erfasst wird, wenn die erste Intensität der zweiten Intensität entspricht.

29. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 24, wobei die Nucleotidsequenz in dein flüssigen Medium vor dem Erfassungsschritt bei einer Temperatur non ca. 85°C bis ca. 100°C ca. 30 Sekunden bis ca. 5 Stunden denaturiert wird.

30. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 29, wobei die Bildung des Hybridisierungskomplexes bei einer Temperatur von ca. 4°C bis ca. 75°C 2 Minuten bis ca. 24 Stunden durchgeführt wird.

31. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 30, wobei der Denaturierungsschritt nicht länger als 60 Minuten durchgeführt wird, woraufhin die Temperatur passiv ohne Abschrecken auf Raumtemperatur abgekühlt wird.

32. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 24, wobei die PNA-Sonde dem ersten flüssigen Medium in einer Konzentration zugegeben wird, die das 1-bis 20fache derjenigen einer vermuteten Konzentration der Nucleotidsequenz beträgt.

33. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 24, wobei ein Gesamtvolumen des ersten flüssigen Mediums in dem Erfassungsschritt nicht mehr als ca. 5 Milliliter beträgt.

34. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 33, wobei das Gesamtvolumen nicht mehr als ca. 20 Mikroliter beträgt.

35. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 24, wobei es sich bei der Nucleotidsequenz um dohppeisträngige DNA handelt.

36. Methode für das Erfassen einer Nucleotidsegienz nach Anspruch 29, wobei die PNA-Sonde dein ersten flüssigen Medium vor Abschluss des Denaturierungsschritts zugegeben wird.

37. Methode nach Anspruch 24, wobei alle bei dieser Methode verwendeten Sonden aus der gleichen Sequenz und dein gleichen Marker bestehen, wobei der Marker der einzige Marker ist, der bei der Methode erfasst wird.

38. Methode nach Anspruch 24, wobei das erfasste fluoreszierende Licht im wesentlichen aus dem von dem Marker ausgestrahlten fluoreszierenden Licht besteht.

39. Methode nach Anspruch 24, wobei die PNA-Sonde einem Segment der Nucleotidsequenz vollständig komplementär ist.

40. Methode nach Anspruch 24, wobei die PNA-Sonde eine Einbasenfehlpaarung eines Segments der Nucleotidsequenz ist.

41. Methode nach Anspruch 24, wobei die PNA-Sonde eine Zweibasenfehlpaarung eines Segments der Nucleotidsequenz ist.

42. Methode nach Anspruch 24, wobei die PNA-Sonde eine Dreibasenfehlpaarung eines Segments der Nucleotidsequenz ist.

43. Methode nach Anspruch 24, wobei

- (i) die Probe-Nucleotidsequenzen der Nucleotidsequenz identisch oder Analoge sind, die sich von der Nucleotidsequenz durch mindestens eine Base unterscheiden,
- (ii) die PNA-Sonde einem Segment der Nucleotidsequenz vollständig komplementär und einem Segment der Analoge nicht komplementär ist,
- (iii) die Nucleotidsequenz erfasst wird, wenn die erste Intensität der zweiten Intensität entspricht und
- (iv) die Analoge erfasst werden, wenn die erste Intensität der zweiten Intensität nicht entspricht.

44. Methode nach Anspruch 43, wobei die Analoge sich von der Nucleotidsequenz durch eine Base unterscheiden.

45. Methode nach Anspruch 43, wobei die Analoge sich von der Nucleotidsequenz durch zwei Basen unterscheiden.
46. Methode nach Anspruch 43, wobei die Analoge sich von der Nucleotidsequenz durch drei Basen unterscheiden.
47. Methode nach Anspruch 43, wobei alle bei dieser Methode verwendeten Sonden aus der gleichen Sequenz und dem gleichen Marker bestehen, wobei der Marker der einzige durch diese Methode erfasste Marker ist.
48. Methode nach Anspruch 47, wobei das erfasste fluoreszierende Licht im wesentlichen aus dem von dem Marker ausgestrahlten fluoreszierenden Licht besteht.
49. Methode nach Anspruch 48, wobei die Analoge sich von der Nucleotidsequenz durch eine Base unterscheiden.
50. Methode nach Anspruch 24, wobei
- (i) die Probe-Nucleotidsequenzen der Nucleotidsequenz identisch oder Analoge sind, die sich von der Nucleotidsequenz durch mindestens eine Base unterscheiden,
  - (ii) die PNA-Sonde einem Segment der Analoge vollständig komplementär ist und einem Segment der Nucleotidsequenz nicht vollständig komplementär ist,
  - (iii) die Nucleotidsequenz erfasst wird, wenn die erste Intensität der zweiten Intensität entspricht und
  - (iv) die Analoge erfasst werden, wenn die erste Intensität der zweiten Intensität nicht entspricht.
51. Methode nach Anspruch 50, wobei die Analoge sich von der Nucleotidsequenz durch eine Base unterscheiden.
52. Methode nach Anspruch 50, wobei die Analoge sich von der Nucleotidsequenz durch zwei Basen unterscheiden.
53. Methode nach Anspruch 50, wobei die Analoge sich von der Nucleotidsequenz durch drei Basen unterscheiden.
54. Methode nach Anspruch 50, wobei alle bei dieser Methode verwendeten Sonden aus der gleichen Sequenz und dem gleichen Marker bestehen, wobei der Marker der einzige durch diese Methode erfasste Marker ist.
55. Methode nach Anspruch 54, wobei das erfasste fluoreszierende Licht im wesentlichen aus dem von dem Marker ausgestrahlten fluoreszierenden Licht besteht.
56. Methode nach Anspruch 55, wobei die Analoge sich von der Nucleotidsequenz durch eine Base unterscheiden.
57. Methode nach Anspruch 24, wobei das erfasste fluoreszierende Licht eine Wellenlänge besitzt, die länger ist als die Laserstrahlwellenlänge.
58. Methode nach Anspruch 24, wobei die erste Intensität einer Anzahl von Basenfehlpaarungen zwischen der Nucleotidsequenz und der PNA-Sonde über einen Bereich umgekehrt proportional, der 0 Basenfehlpaarungen bis mindestens 3 Basenfehlpaarungen umfasst.
59. Methode für das Erfassen einer einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nucleotidsequenz in einem ersten flüssigen Medium, die Folgendes umfasst:
- Bereitstellen des ersten flüssigen Mediums, das Probe-Nucleotidsequenzen umfasst,
  - Zugeben, zu dem ersten flüssigen Medium, einer PNA-Sonde, die in der Lage ist, einen Hybridisierungskomplex mit der Nucleotidsequenz zu bilden, wobei die PNA-Sonde einen fluoreszierenden Marker umfasst,
  - Abtrennen der nichthybridisierten PNA-Sonde von dem Hybridisierungskomplex unter Bildung eines ersten Testmediums, B
  - Bestrahlen des ersten Testmediums mit einem Laserstrahl, der eine Wellenlänge aufweist, die den fluoreszierenden Marker anregt und den fluoreszierenden Marker veranlasst, fluoreszierendes Licht auszustrahlen, direktes Erfassen einer ersten Intensität des ausgestrahlten fluoreszierenden Lichts in dem ersten Testmedium,

und

Vergleichen der ersten Intensität mit einer Bezugsintensität, die durch Sondieren einer positiven Kontrollsequenz hergestellt wird, und einer Basislinienintensität, die durch Sondieren einer negativen Kontrollsequenz hergestellt wird,

wobei die Nucleotidsequenz erfasst wird, wenn die erste Intensität der Bezugsintensität entspricht, die Nucleotidsequenz nicht erfasst wird, wenn die erste Intensität der Basislinienintensität entspricht, und eine homologe Sequenz, die sich von der Nucleotidsequenz durch mindestens eine Base unterscheidet, erfasst wird, wenn die erste Intensität zwischen der Basislinienintensität und der Bezugsintensität liegt und wobei die Methode, mit Ausnahme des Abtrennschritts, vollkommen ohne Binden der PNA-Sonde, der Nucleotidsequenz oder des Hybridisierungskomplexes an einen festen Träger oder ein festes Gel durchgeführt wird.

60. Methode nach Anspruch 59, wobei die homologe Sequenz sich durch eine Base von der Nucleotidsequenz unterscheidet.

61. Methode nach Anspruch 59, wobei der Hybridisierungskomplex im wesentlichen aus einer PNA-Sequenz, einem Fluorophor und der Nucleotidsequenz besteht.

62. Methode nach Anspruch 59, wobei alle bei dieser Methode verwendeten Sonden aus der gleichen Sequenz und dem gleichen Marker bestehen, wobei der Marker der einzige durch diese Methode erfasste Marker ist.

63. Methode nach Anspruch 59, wobei das erfasste fluoreszierende Licht im wesentlichen aus dem von dem Marker ausgestrahlten fluoreszierenden Licht besteht.

64. Methode nach Anspruch 59, wobei das erfasste fluoreszierende Licht eine Wellenlänge aufweist, die länger ist als die Laserstrahlwellenlänge.

65. Methode nach Anspruch 59, wobei die erste Intensität einer Anzahl von Basenfehlpaarungen zwischen der Nucleotidsequenz und der PNA-Sonde über einen Bereich umgekehrt proportional ist, der 0 bis mindestens 3 Basenfehlpaarungen umfasst.

66. Methode für das Erfassen einer einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nucleotid-Zielsequenz in einem flüssigen Medium, welche Methode Folgendes umfasst:

Bereitstellen des flüssigen Mediums, das erste Nucleotidsequenzen, die der Nucleotidsequenz identisch sind, oder zweite Nucleotidsequenzen umfasst, die sich von der Nucleotidsequenz durch mindestens eine Base unterscheiden, Zugabe, zu dem flüssigen Medium, von PNA-Sonden, die einem Segment der Nucleotidsequenz vollständig komplementär und einem Segment der zweiten Nucleotidsequenzen nicht vollständig komplementär sind, wobei jede der PNA-Sonden einen fluoreszierenden Marker umfasst,

Hybridisieren der PNA-Sonden mit den ersten oder zweiten Nucleotidsequenzen,

Bestrahlen des flüssigen Mediums, um den fluoreszierenden Marker dazu zu bringen, fluoreszierendes Licht einer Wellenlänge von 400 bis 1000 nm auszustrahlen, und

Erfassen einer Intensität des fluoreszierenden Lichts,

wobei ein elektrisches Feld vor oder gleichzeitig mit dem Erfassungsschritt an das flüssige Medium angelegt wird und eine Änderung in der Intensität des fluoreszierenden Lichts als Funktion des elektrischen Felds erfasst wird als Anzeichen, ob die PNA-Sonden zu den ersten Nucleotidsequenzen oder den zweiten Nucleotidsequenzen hybridisiert werden.

67. Methode nach Anspruch 66, wobei die ersten und zweiten Nucleotidsequenzen sich durch eine Base voneinander unterscheiden.

Es folgen 48 Blatt Zeichnungen

**FIG.1**

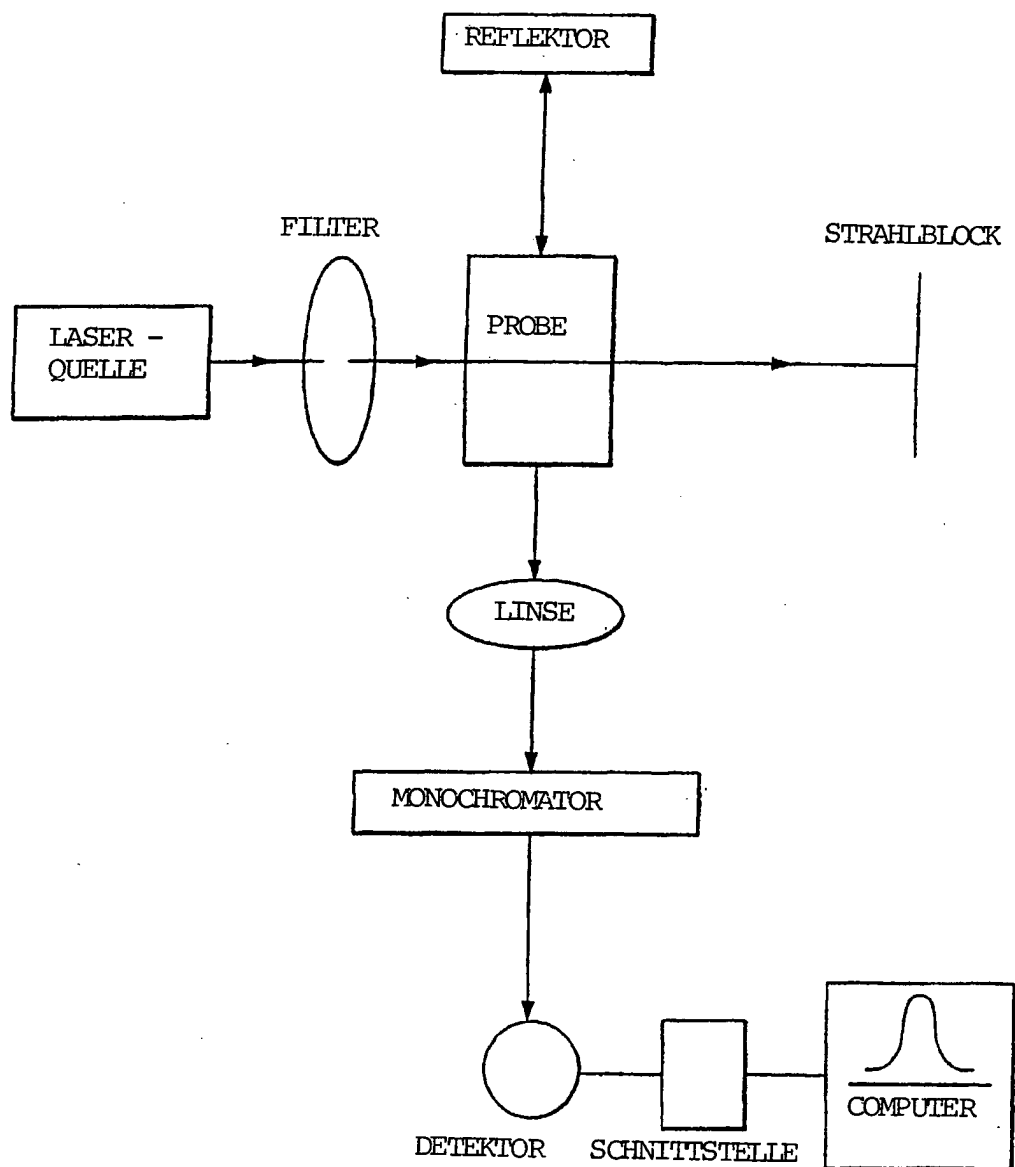
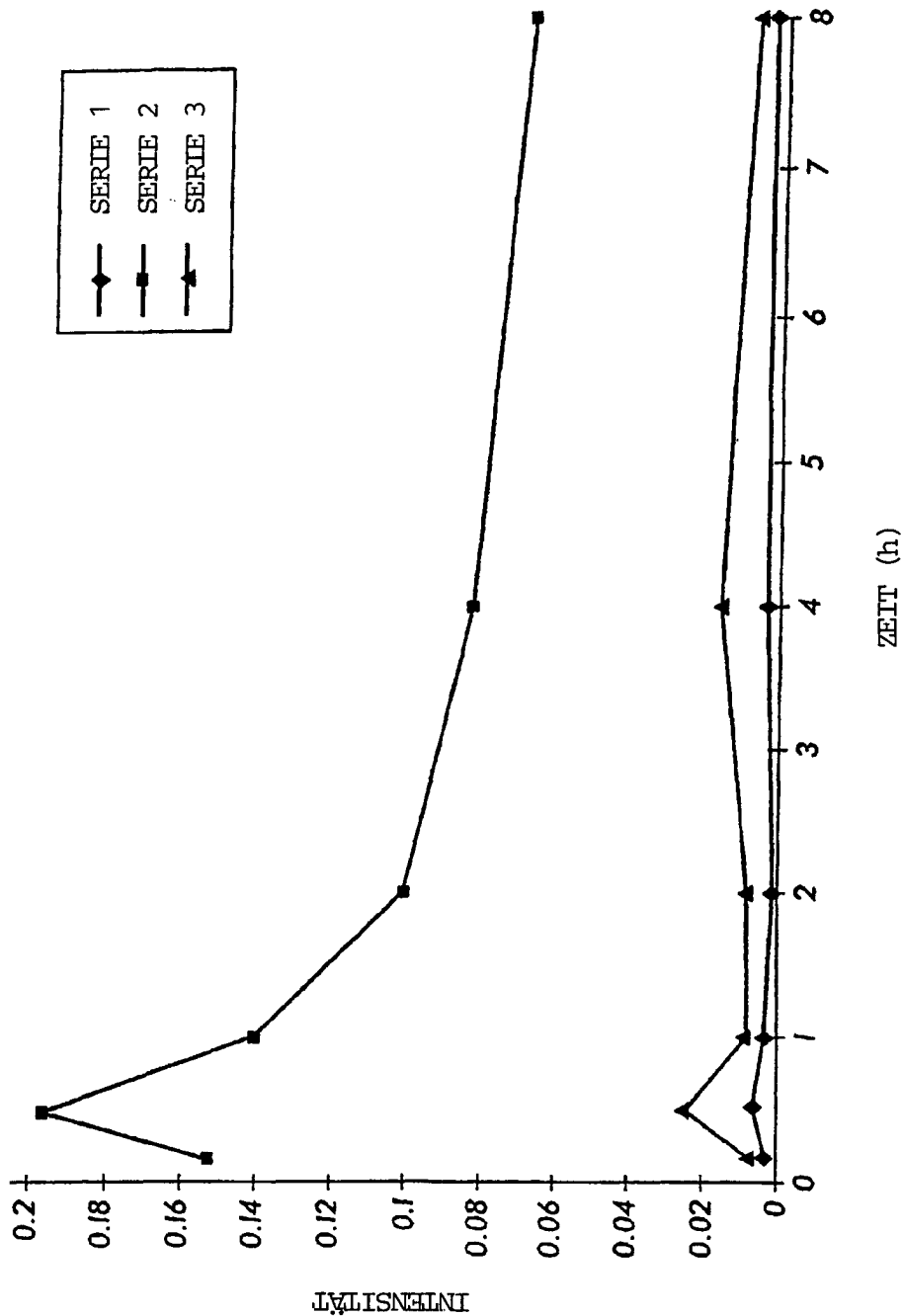


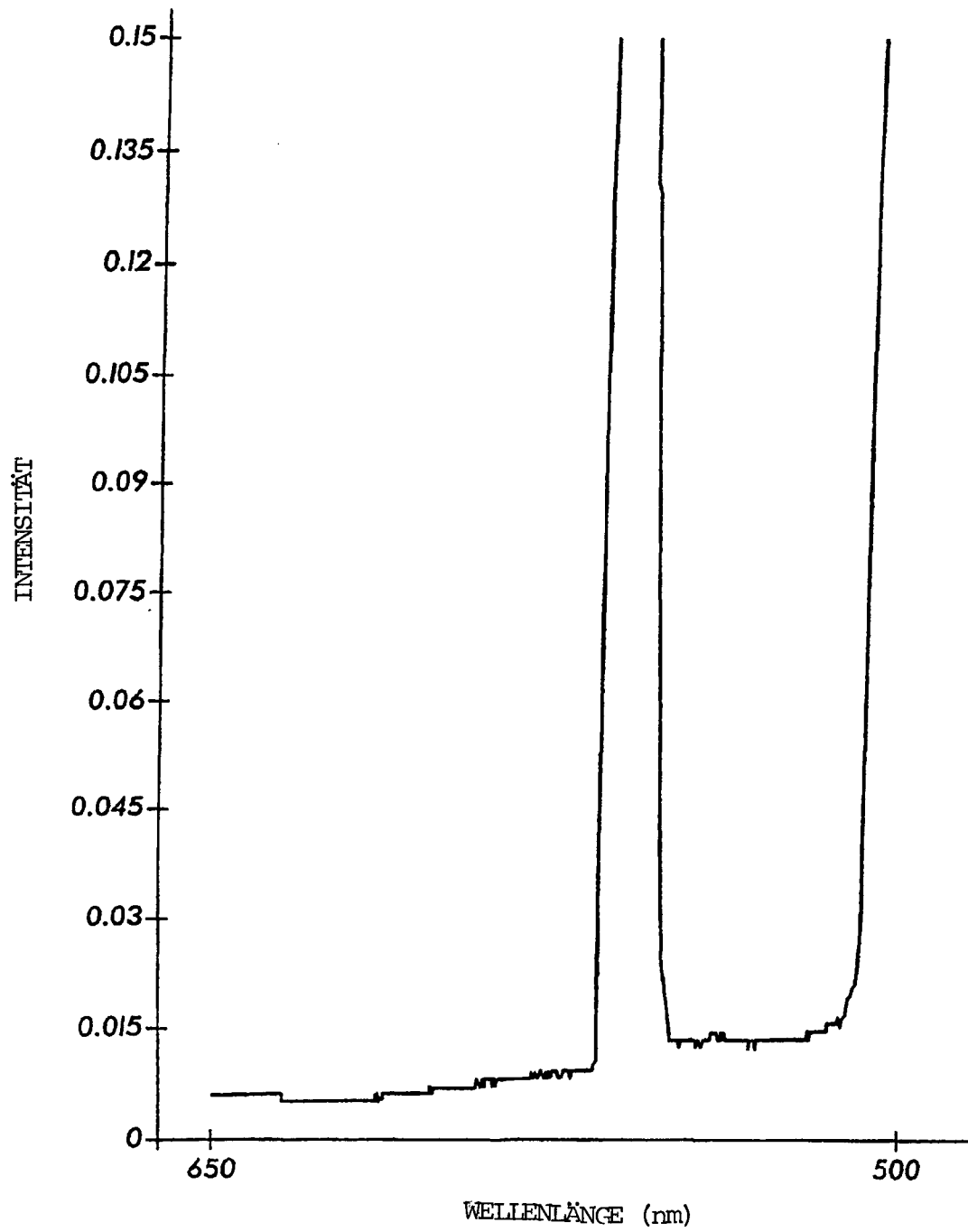
DIAGRAMM EINES FLUORESZENZNACHWEISSYSTEMS

FIG.2

SERIE 1 SONDE ALLEIN  
SERIE 2 WT DNA  
SERIE 3 MT DNA  
FLUORESCENZINTENSITÄT DES HYBRIDS GEGENÜBER DER HYBRIDISIERUNGSDAUER

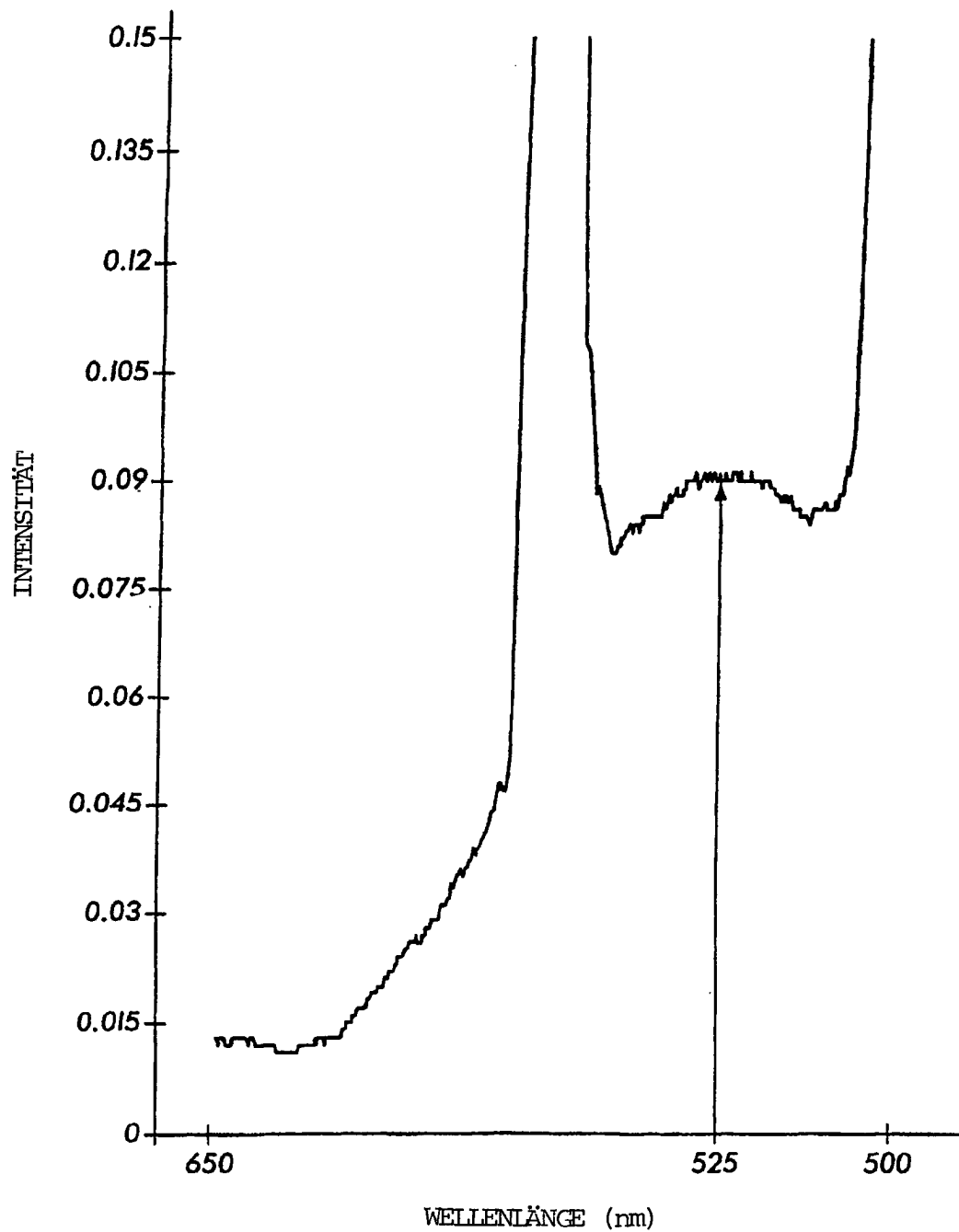


**FIG.3A**



FLUORESZENZSPEKTRUM DER SONDE ALLEIN

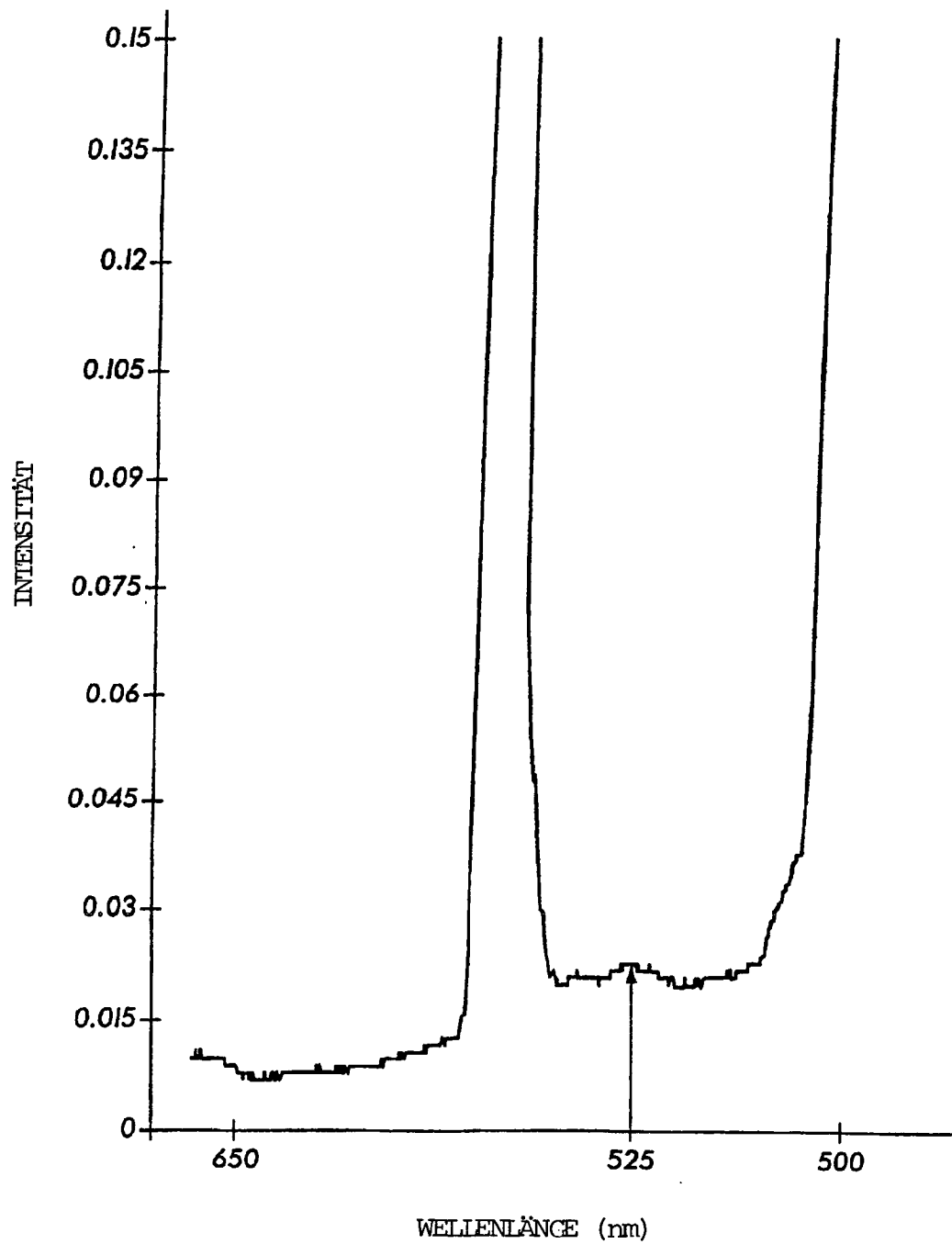
**FIG.3B**



FLUORESZENZSPEKTRUM DER WT DNA HYBRIDISIERUNG  
BEI 30°C FÜR 1 STUNDE

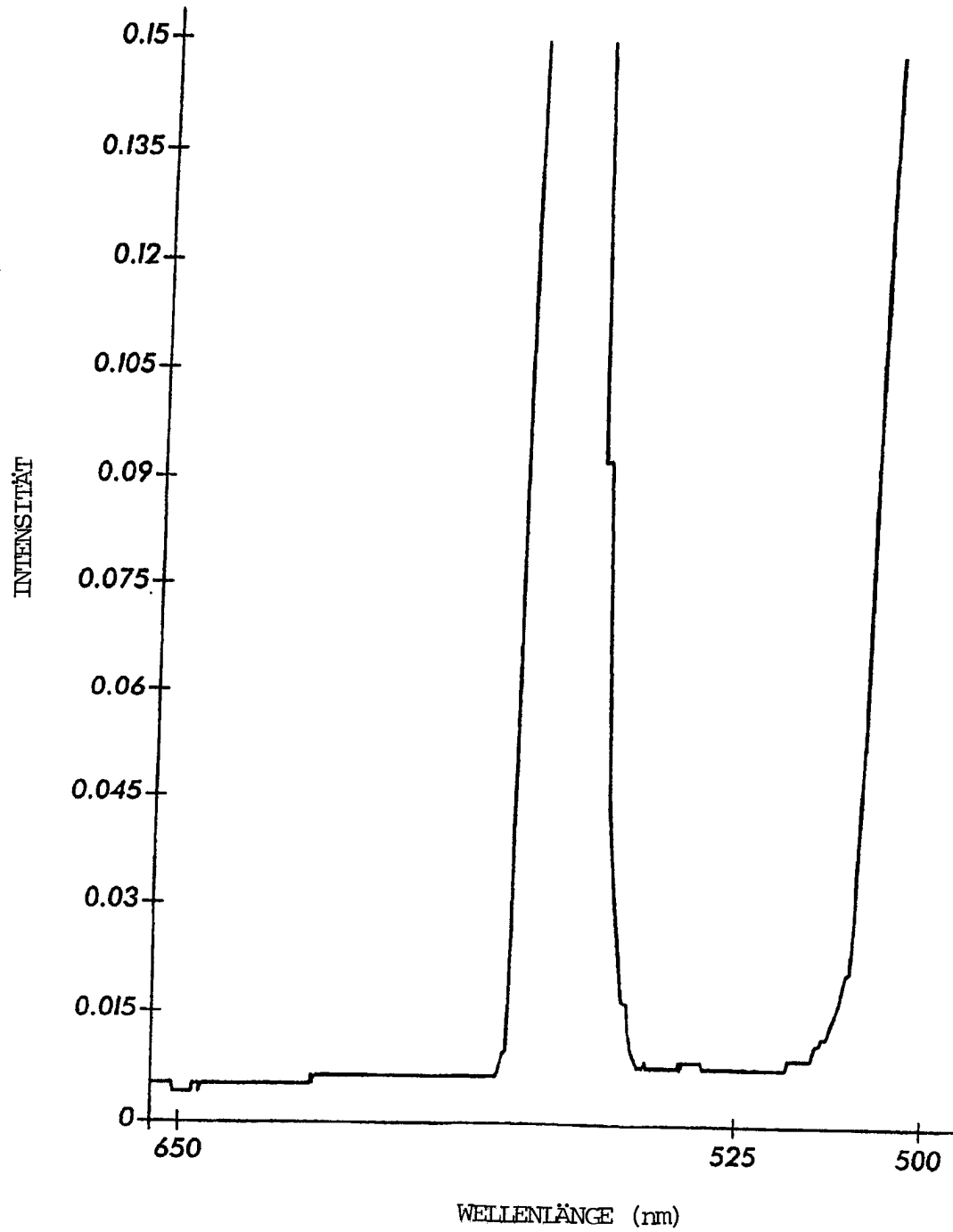


**FIG.3C**



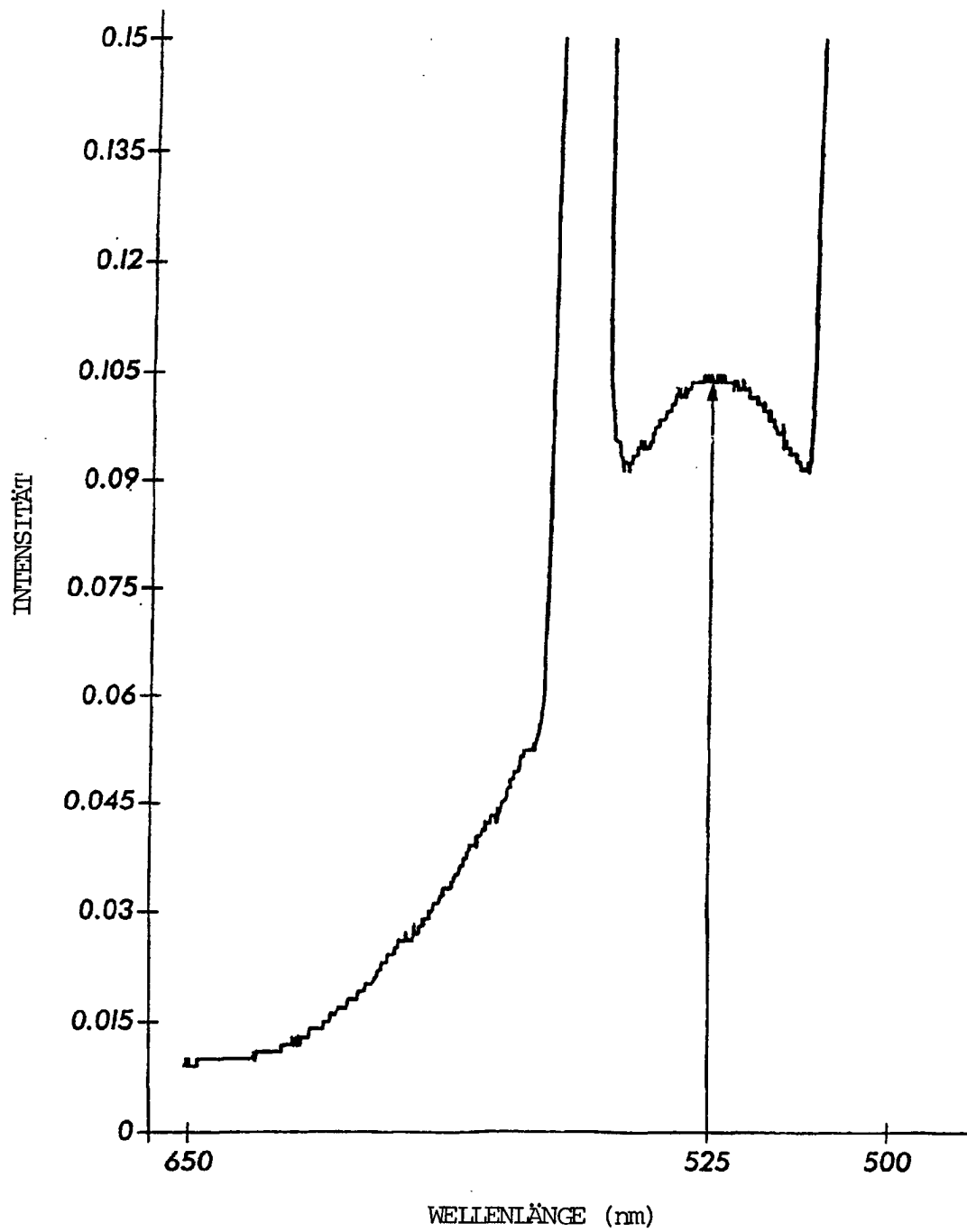
FLUORESZENZSPEKTRUM DER MUTANTIEN - DNA (Q)-HYBRIDISIERUNG  
BEI 30°C FÜR 1 STUNDE

**FIG. 4A**



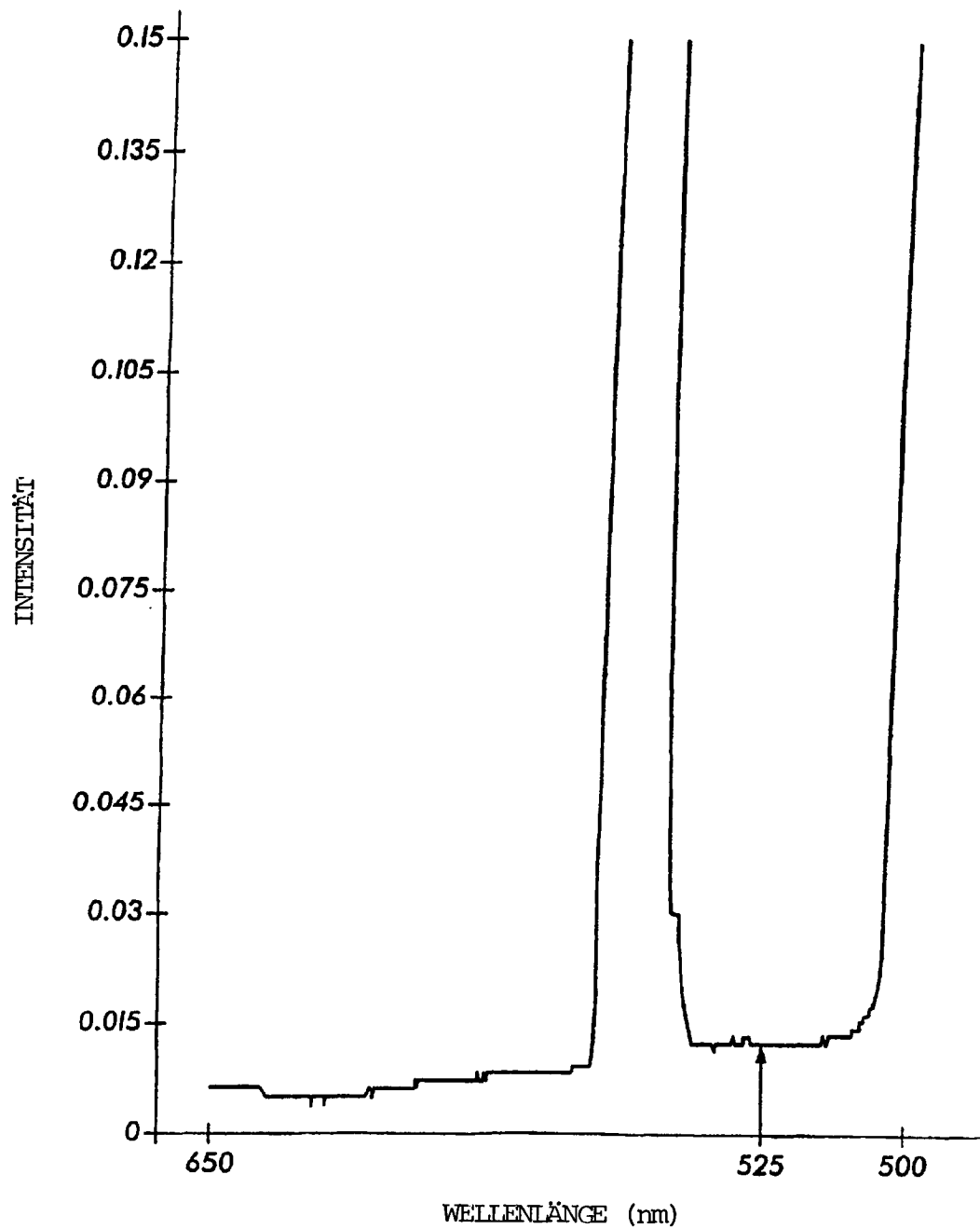
SONDE ALLEIN

**FIG.4B**



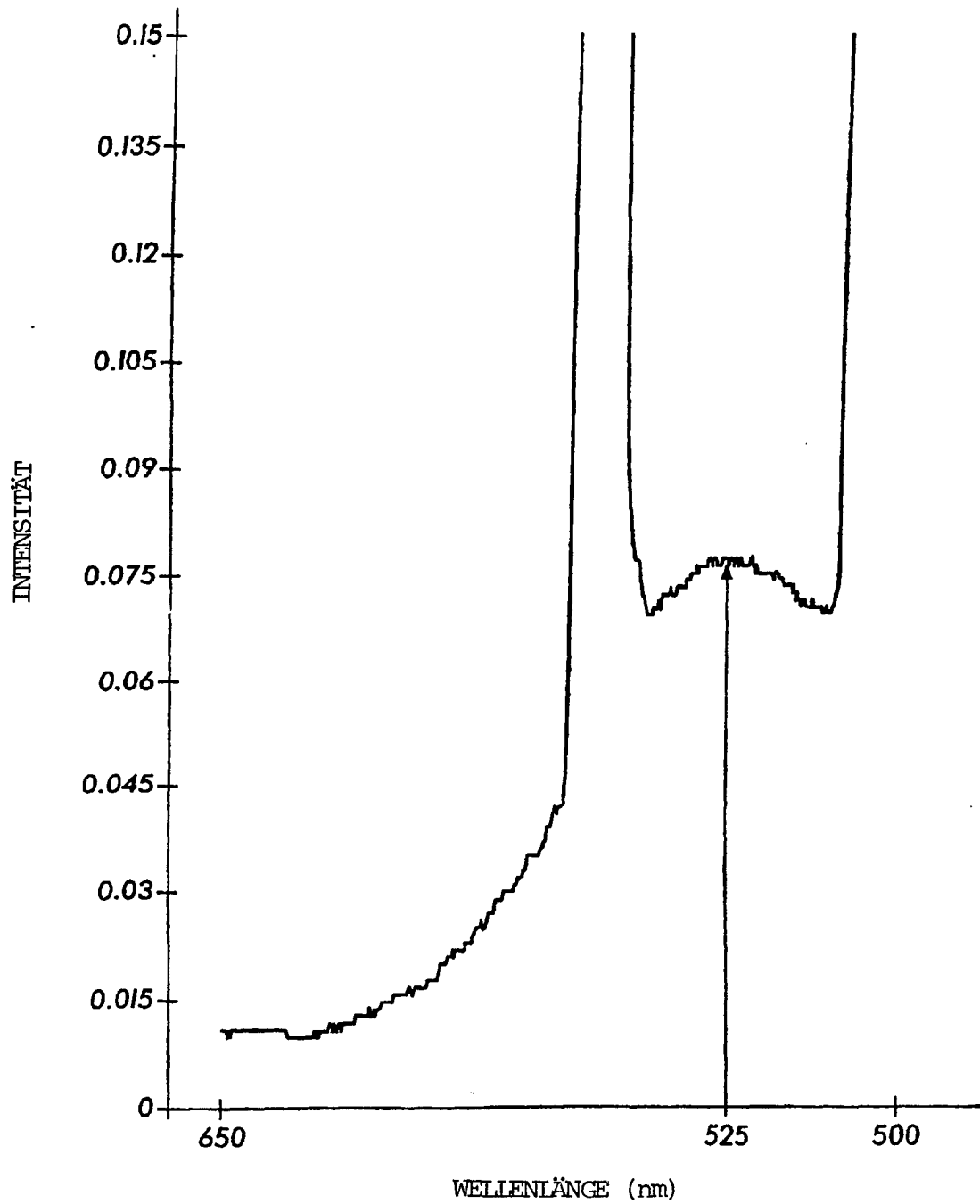
FLUORESZENZSPEKTRUM DER WT DNA HYBRIDISIERUNG  
BEI 25°C FÜR 30 MINUTEN

**FIG.4C**



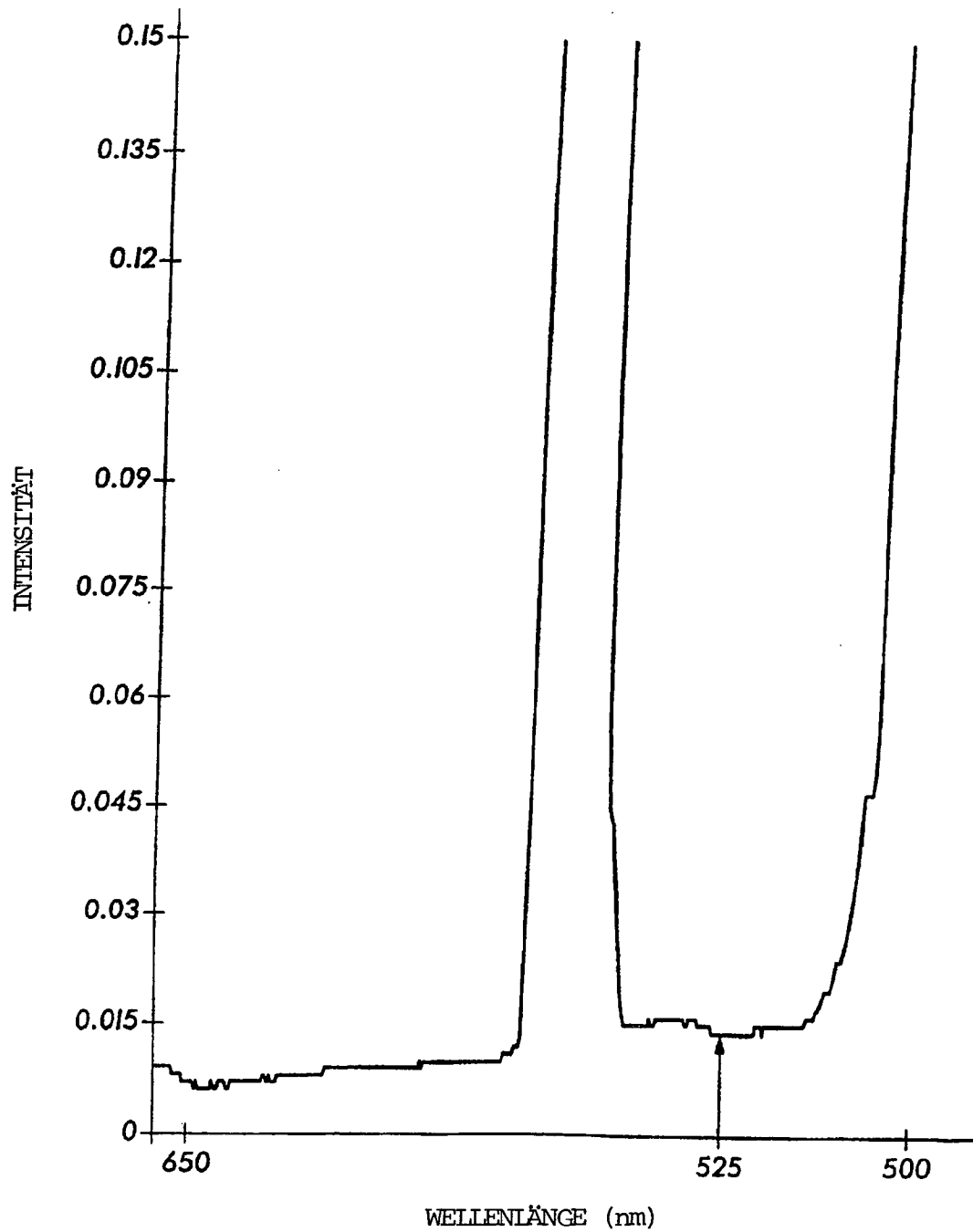
FLUORESZENZSPEKTRUM DER MUTANTIEN-DNA-(R)-HYBRIDISIERUNG  
BEI 25°C FÜR 30 MINUTEN

**FIG.5A**



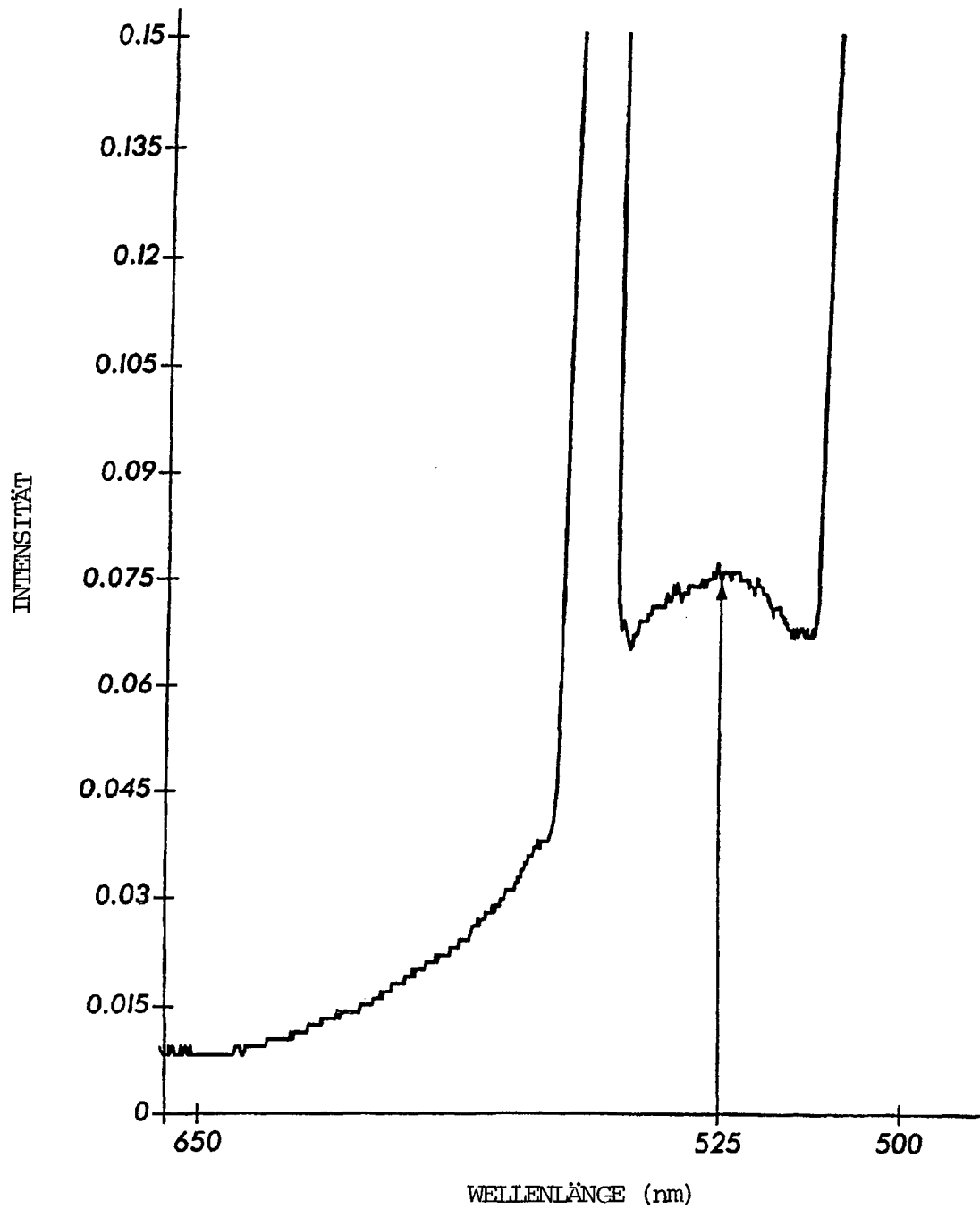
FLUORESZENZSPEKTRUM DER WT DNA HYBRIDISIERUNG  
BEI 45°C FÜR 20 MINUTEN

**FIG.5B**



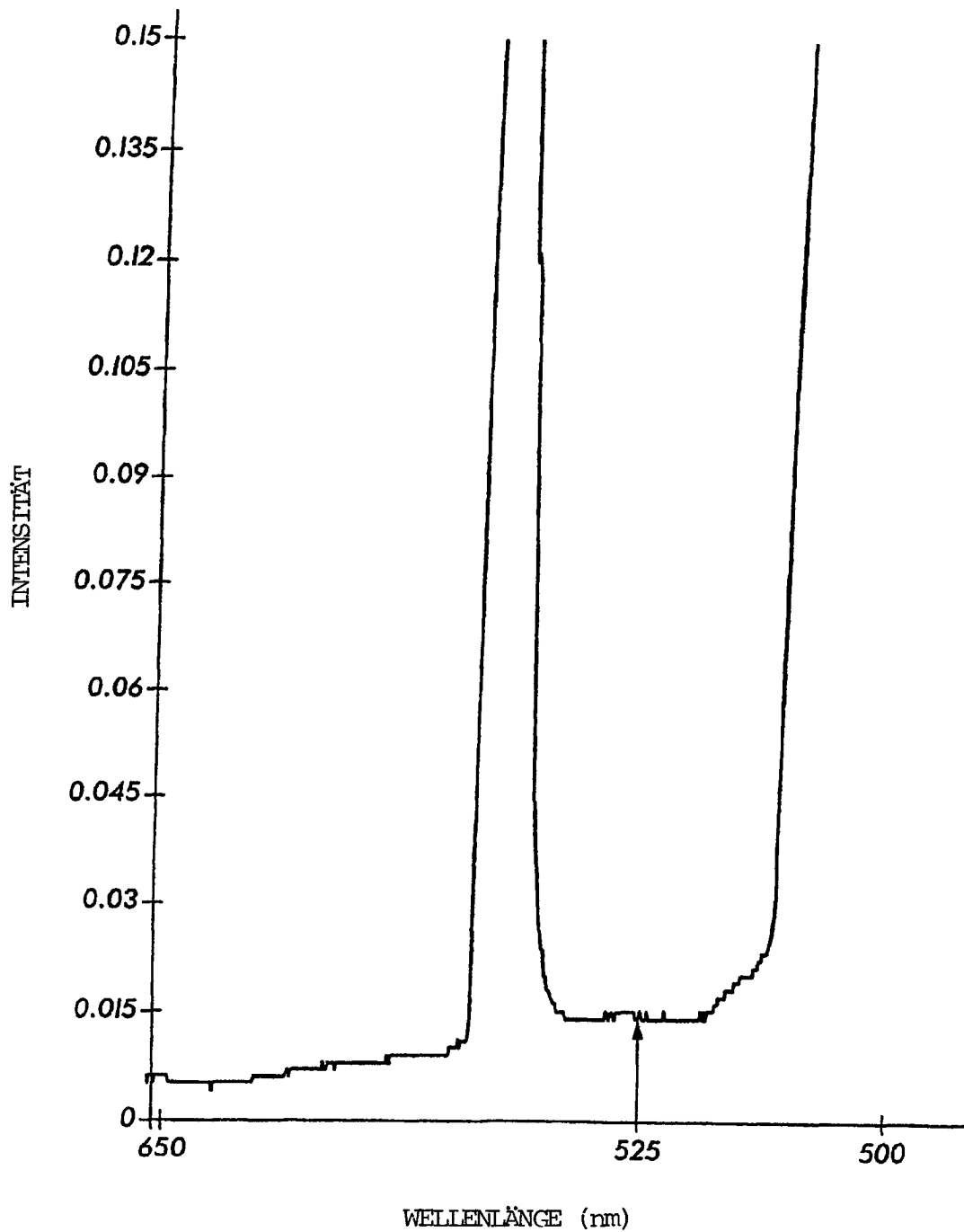
FLUORESZENZSPEKTRUM DER MUTANTIEN-DNA- (AAG)-HYBRIDISIERUNG  
BEI 45°C FÜR 20 MINUTEN

**FIG.6A**



FLUORESZENZSPEKTRUM DER WT DNA HYBRIDISIERUNG  
BEI 50°C FÜR 2 STUNDEN

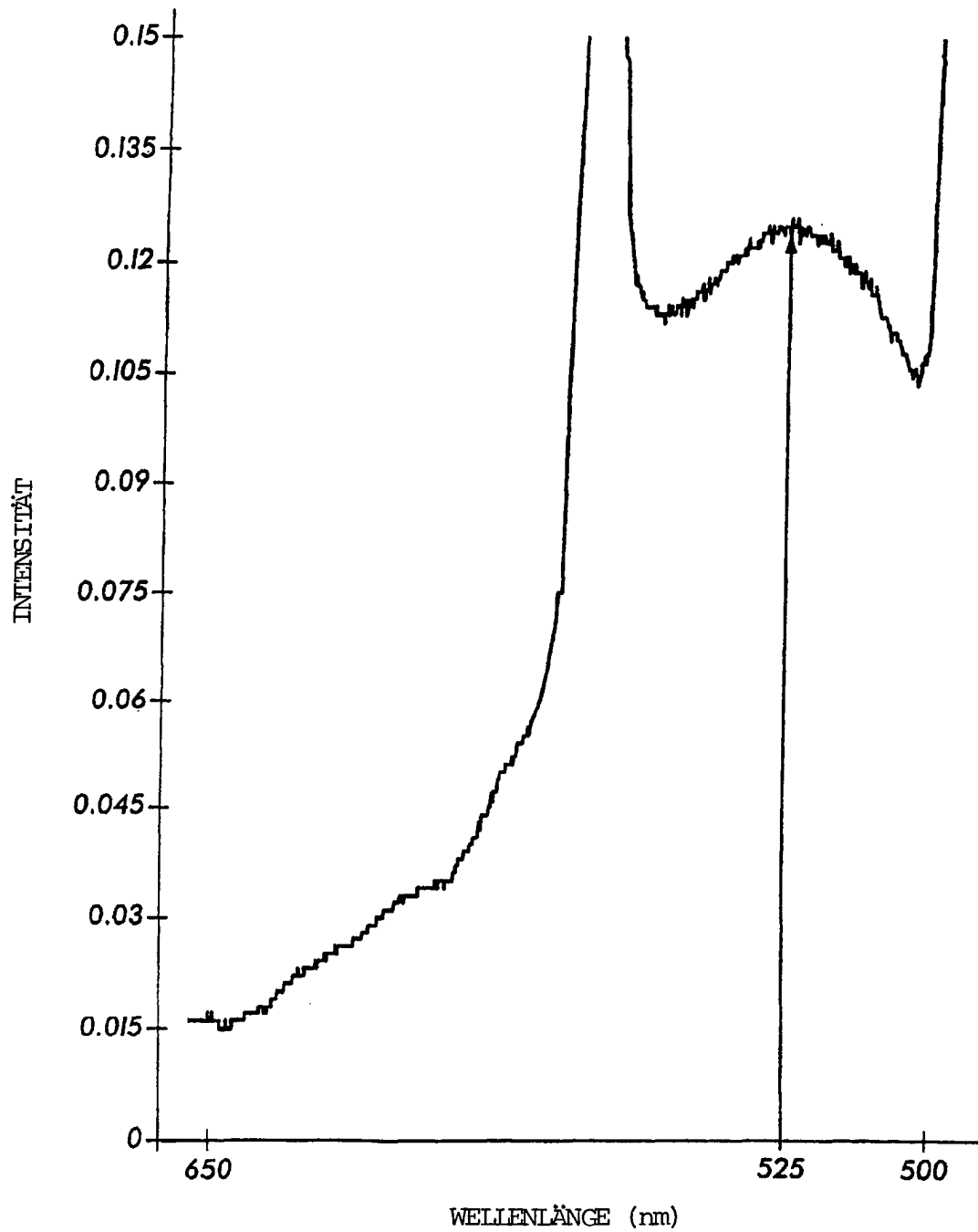
**FIG. 6B**



FLUORESZENZSPEKTRUM DER MUTANTEN-DNA-(GCG)-HYBRIDISIERUNG  
BEI 50°C FÜR 2 STUNDEN

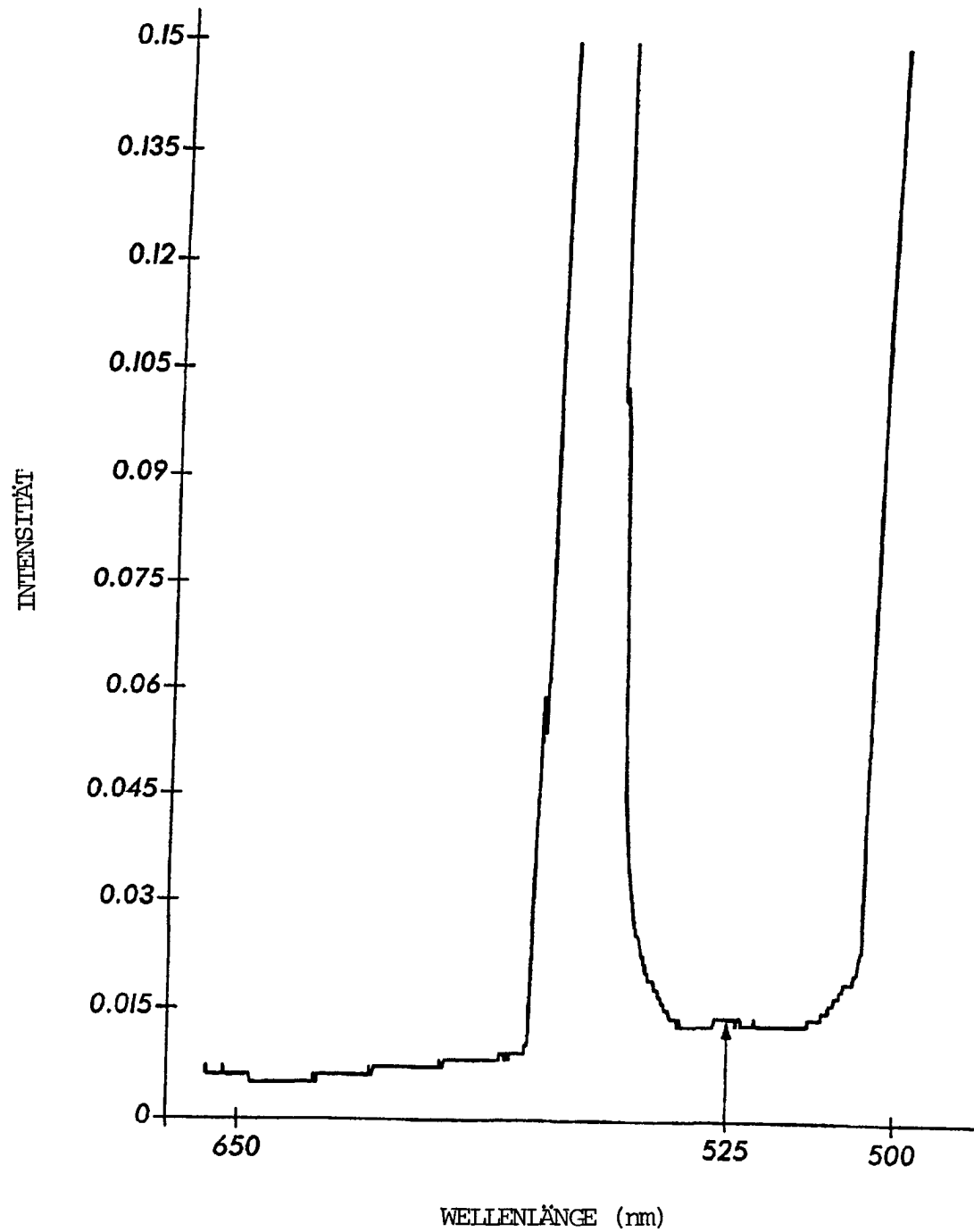


**FIG. 7A**

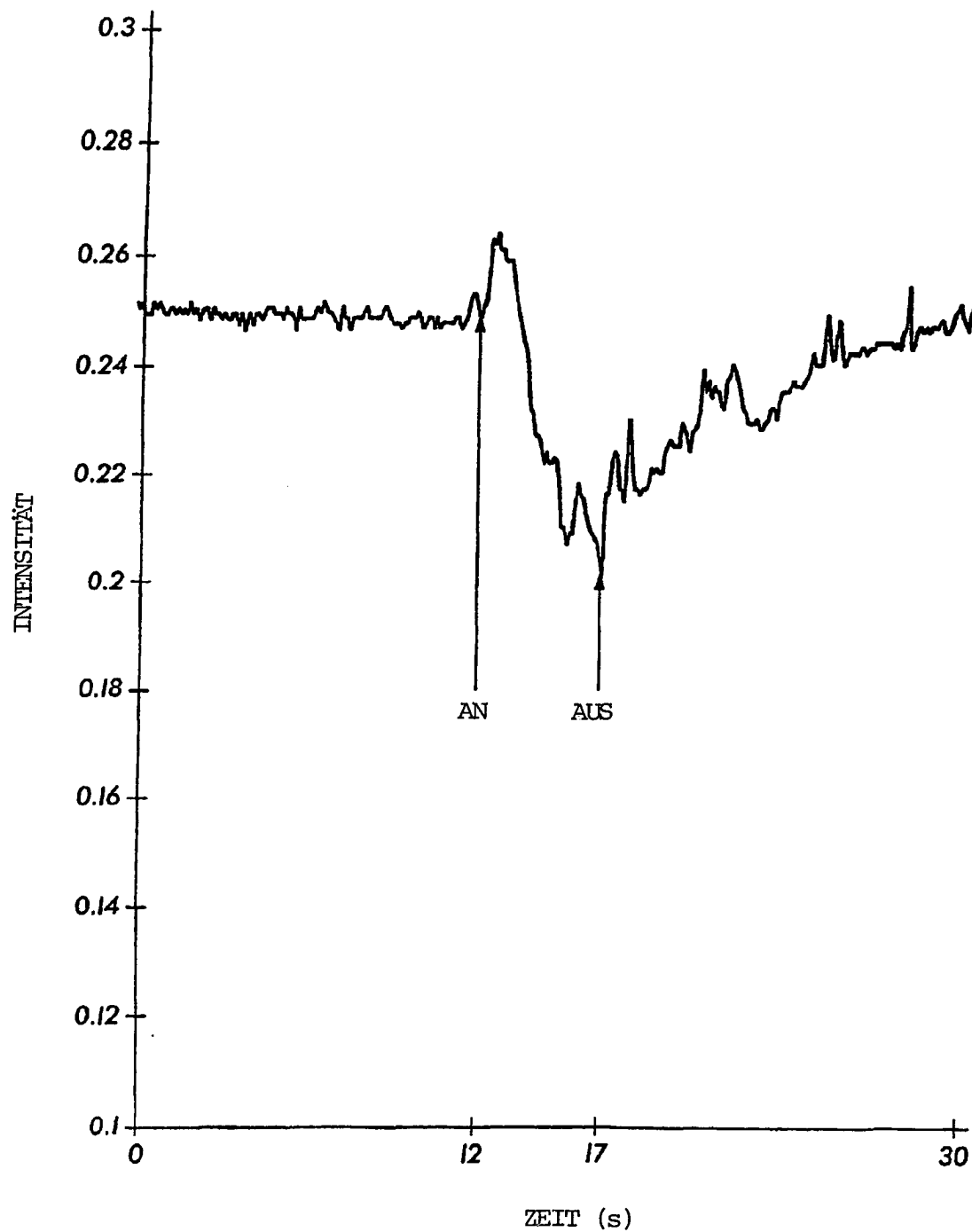


FLUORESZENZSPEKTRUM DER WT DNA HYBRIDISIERUNG  
BEI 25°C FÜR 1 STUNDE

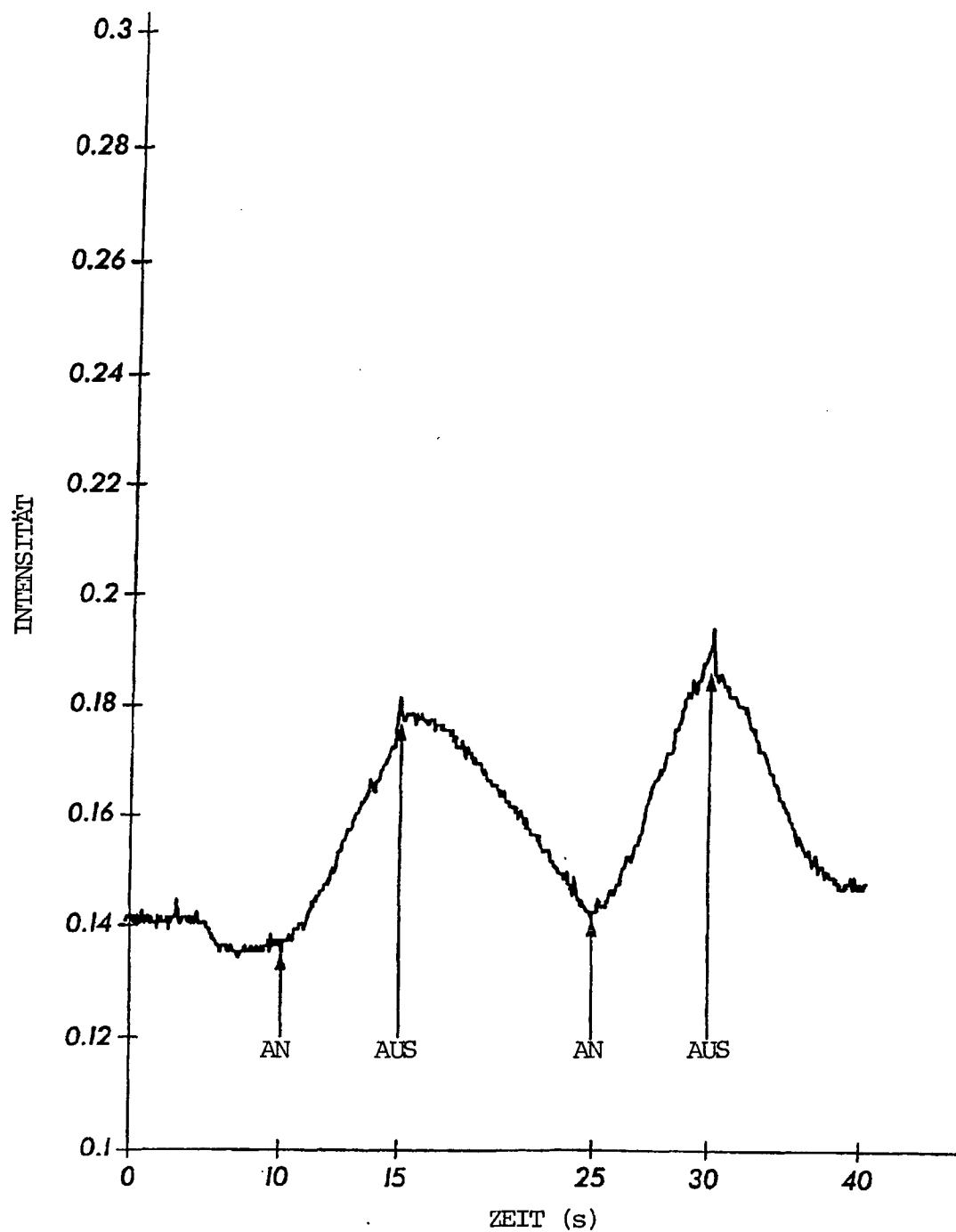
**FIG. 7B**



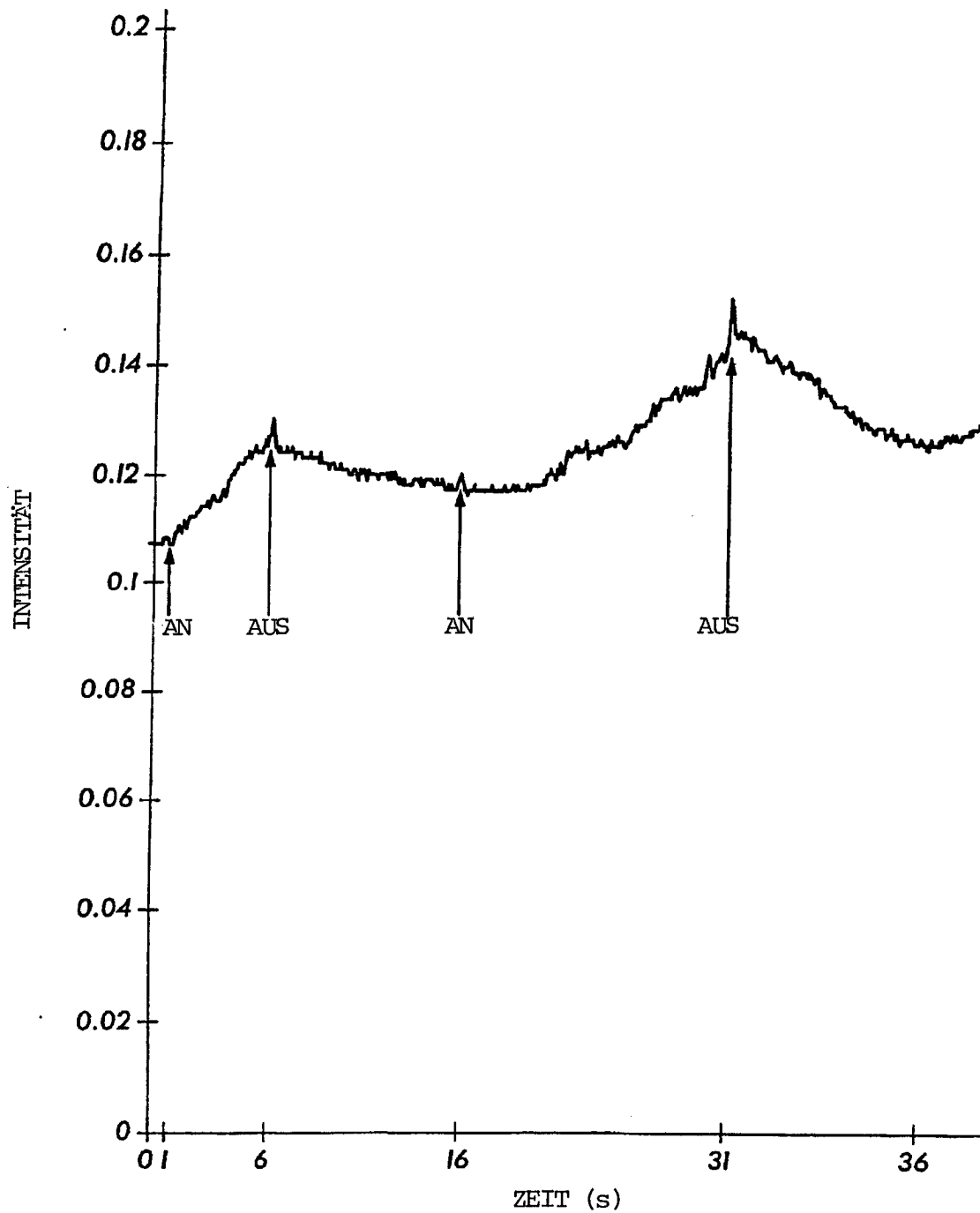
FLUORESZENZSPEKTRUM DER MUTANTEN-DNA-(TAC)-HYBRIDISIERUNG  
BEI 25°C FÜR 1 STUNDE

**FIG.8A**

FLUORESZENZSPEKTRUM DER WT DNA (Seq ID Nr.1), AUFGENOMMEN BEI 525nm,  
WENN DER ELEKTRISCHE STROM AN UND AUS GESCHALTET WIRD

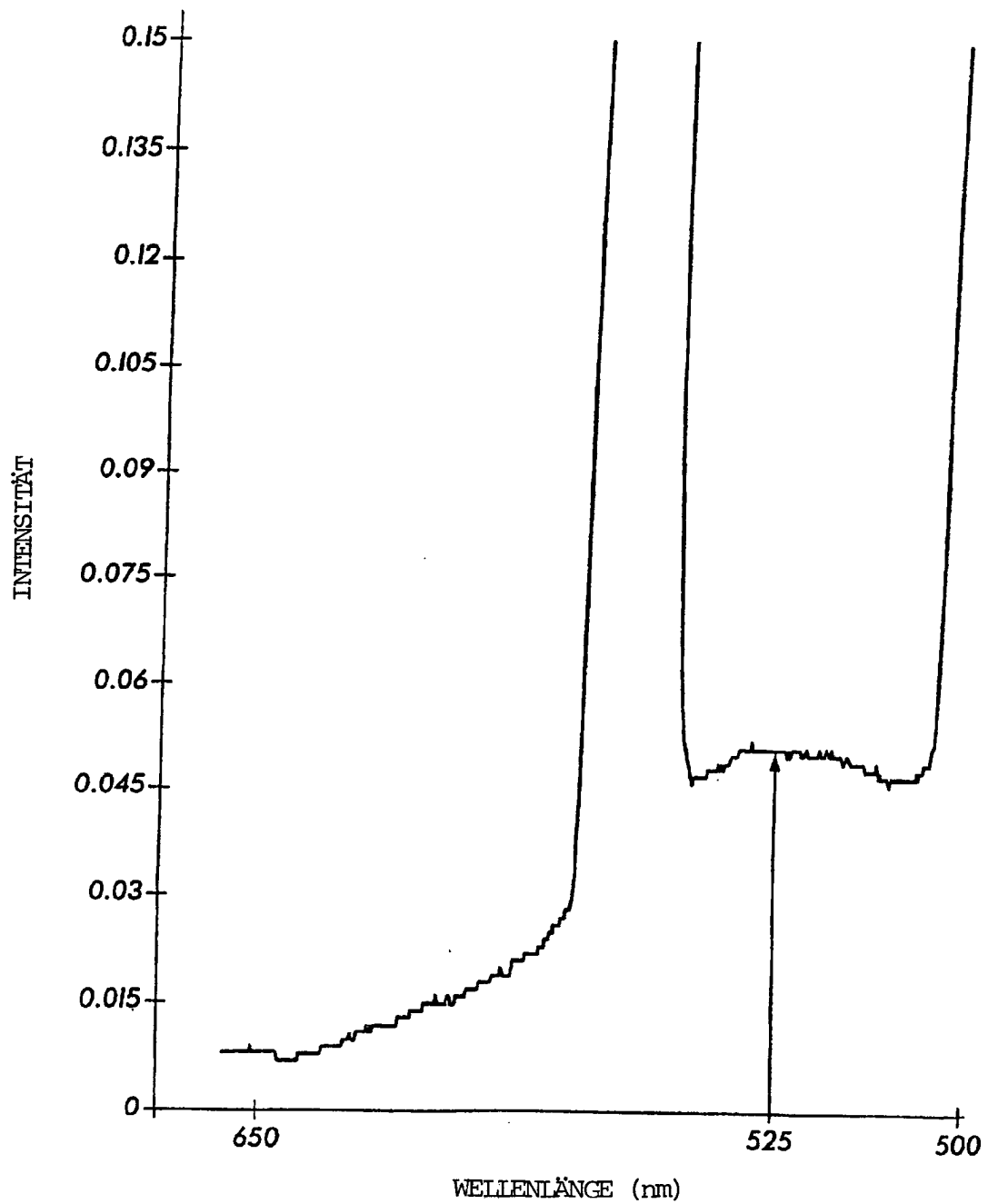
**FIG.8B**

FLUORESZENZSPEKTRUM DER MUTANTEN-DNA (Seq. ID Nr.2), AUFGENOMMEN BEI 525nm, WENN DER ELEKTRISCHE STROM AN UND AUS GESCHALTET WIRD

**FIG.8C**

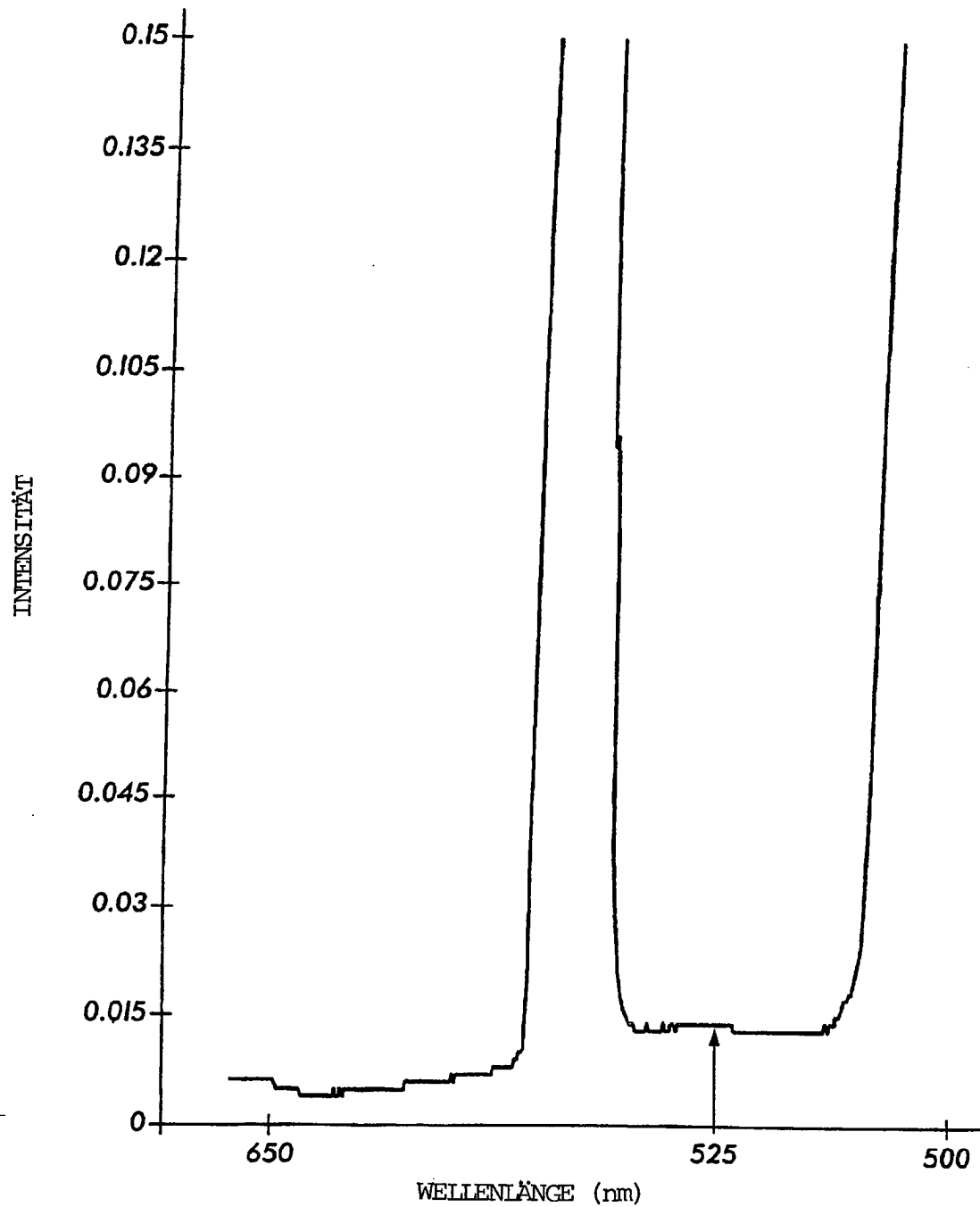
FLUORESCENZSPEKTRUM DER MUTANTIEN-DNA (Seq.ID Nr.3), AUFGENOMMEN BEI 525nm, WENN DER ELEKTRISCHE STROM AN UND AUS GESCHALTET WIRD

**FIG.9A**



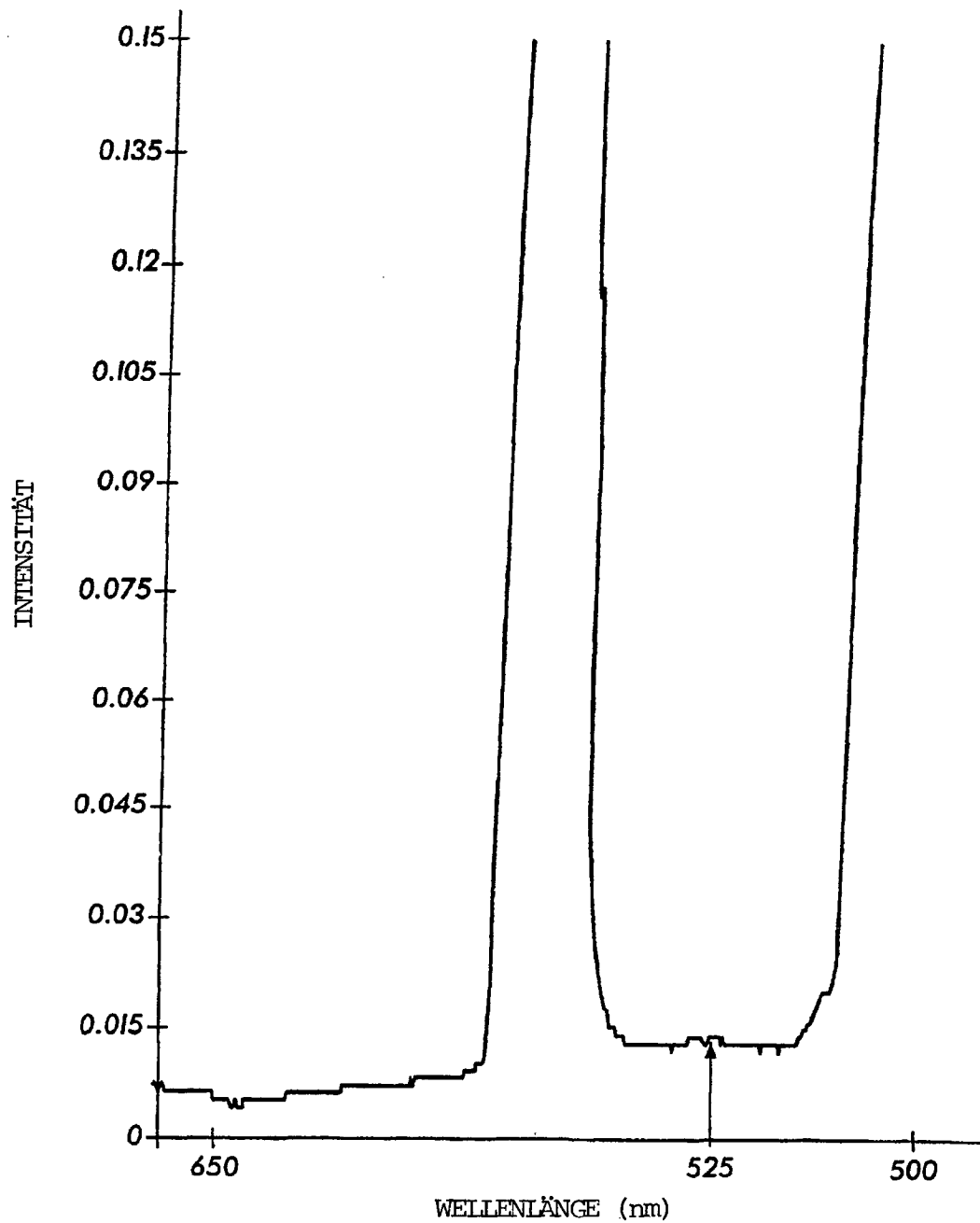
FLUORESZENZSPEKTRUM DER WILD TYPE DNA (Seq.ID Nr.7)  
HYBRIDISIERUNG BEI 25°C FÜR 1 STUNDE

**FIG.9B**



FLUORESZENZSPEKTRUM DER MUTANTEN-DNA (Seq.ID Nr.8)  
HYBRIDISIERUNG BEI 25°C FÜR 1 STUNDE

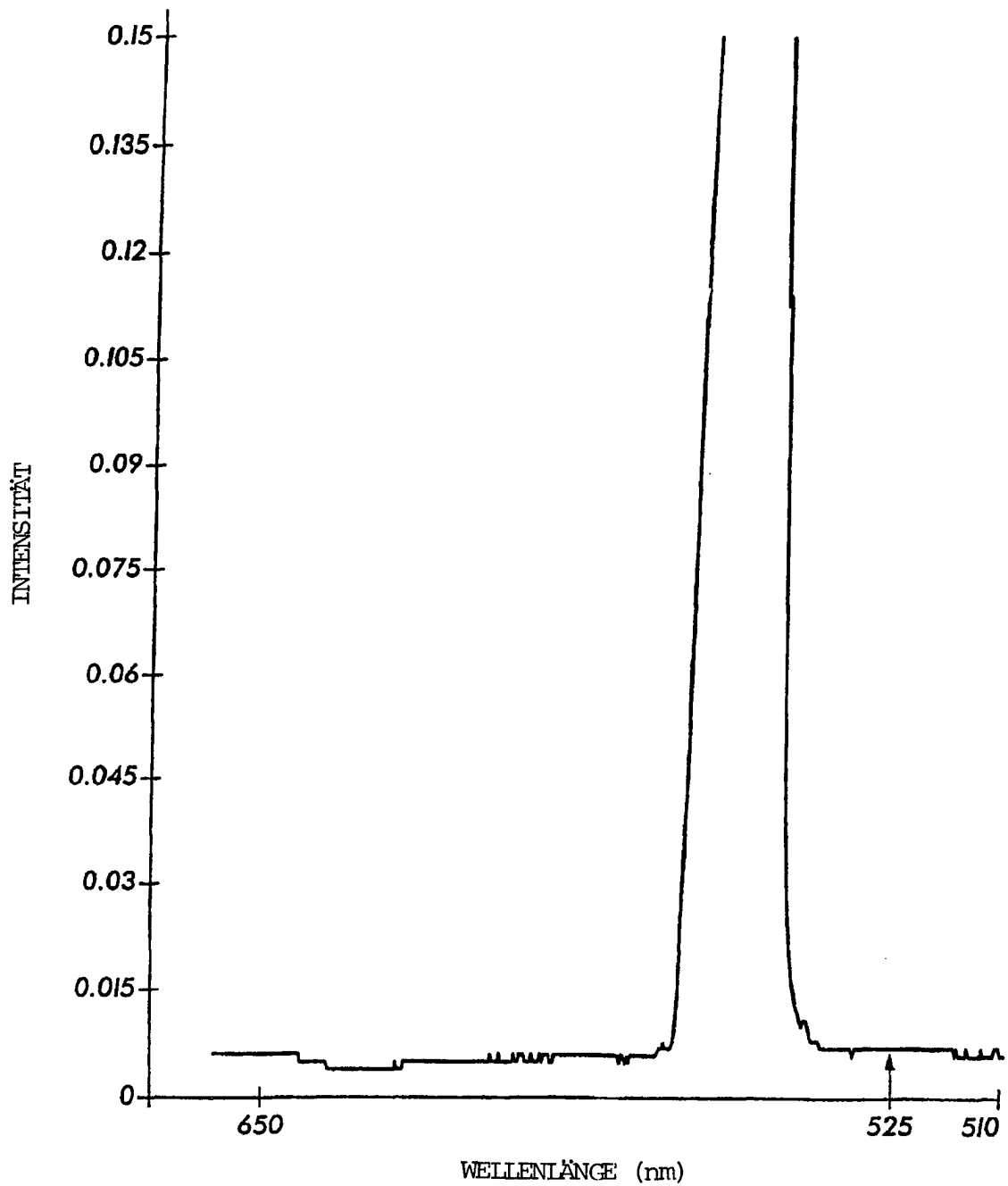
**FIG.9C**



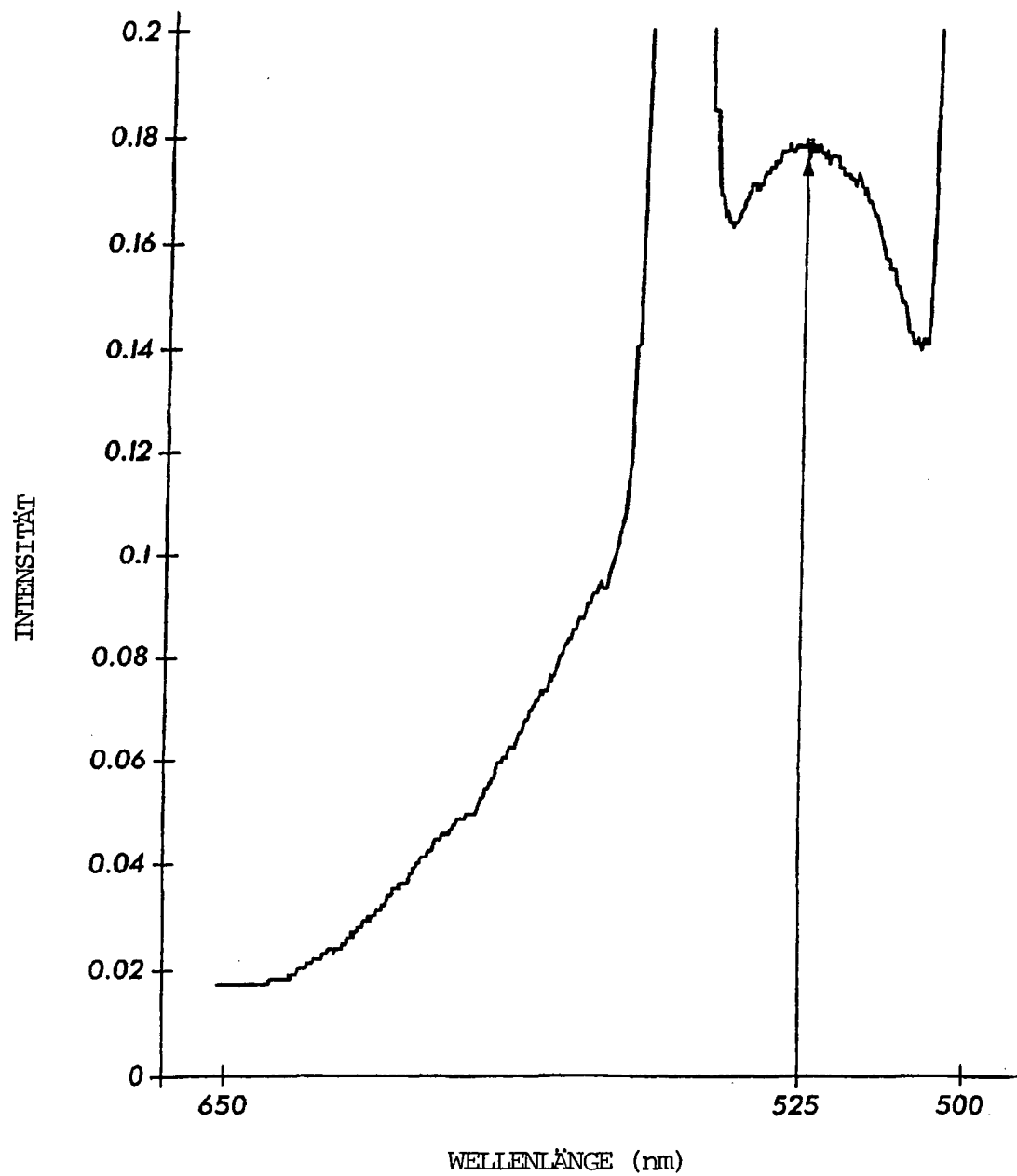
FLUORESZENZSPEKTRUM DER MUTANTEN-DNA (Seq.ID Nr.9)  
HYBRIDISIERUNG BEI 25°C FÜR 1 STUNDE



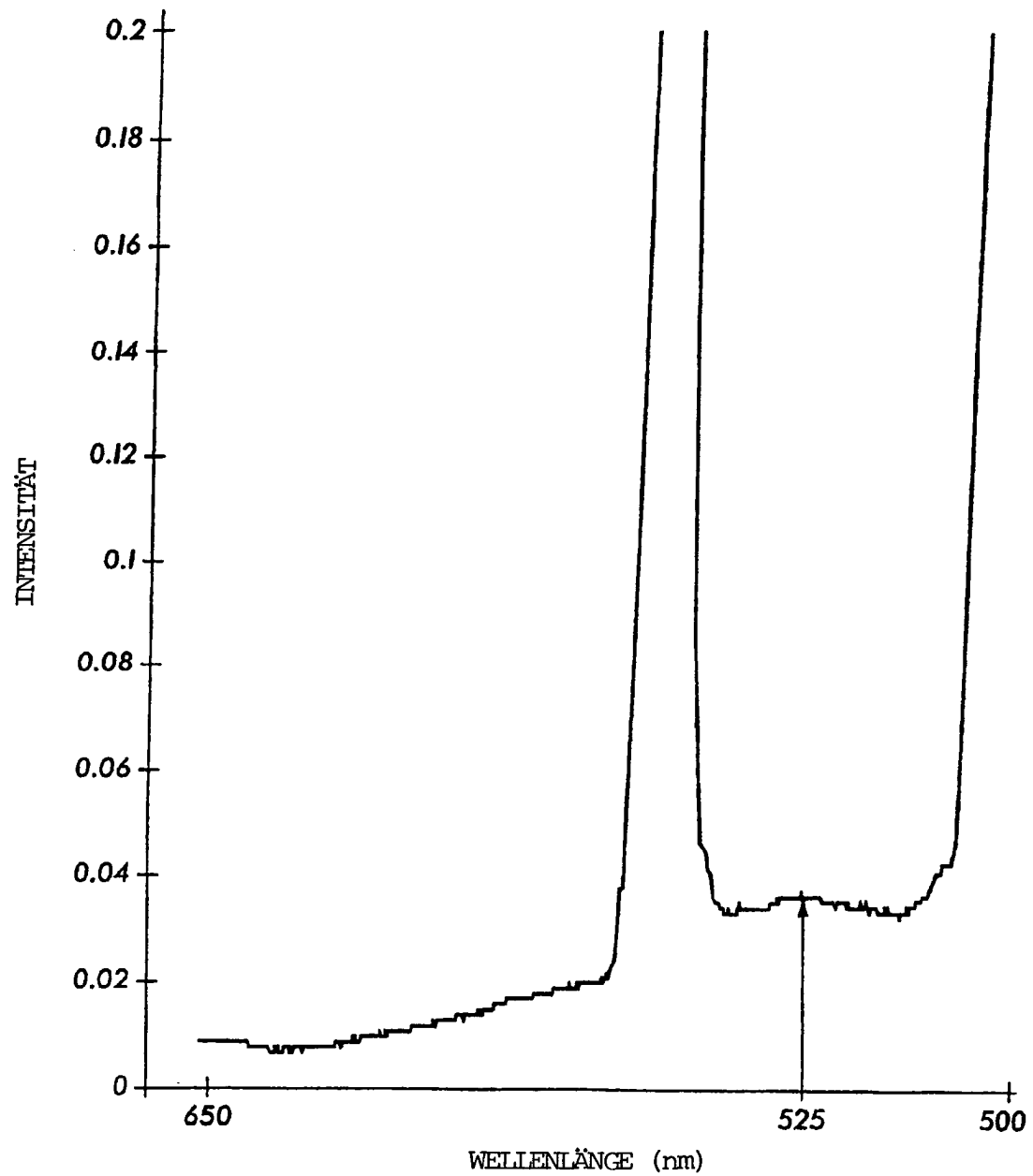
**FIG.9D**



FLUORESZENZSPEKTRUM DER DNA-NEGATIVKONTROLLE (Seq.ID Nr.10)  
HYBRIDISIERUNG BEI 25°C FÜR 1 STUNDE

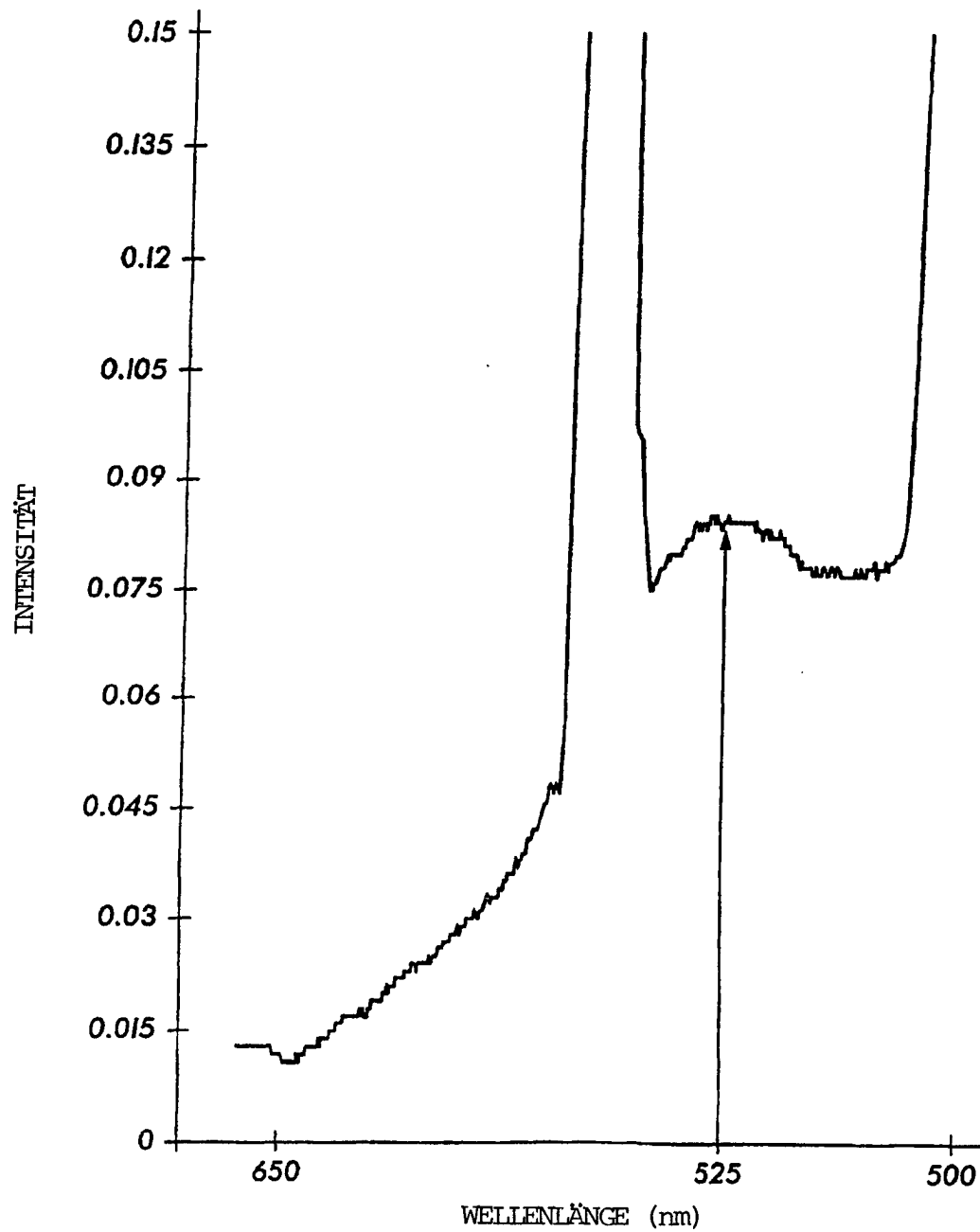
**FIG.10A**

EINE SONDE (5'CAT TCC GCT CTC), DIE MIT EINER DNA-PROBE 1  
(Seq.ID Nr.3) BEI 25°C FÜR 1 STUNDE HYBRIDISIERT IST

**FIG.10B**

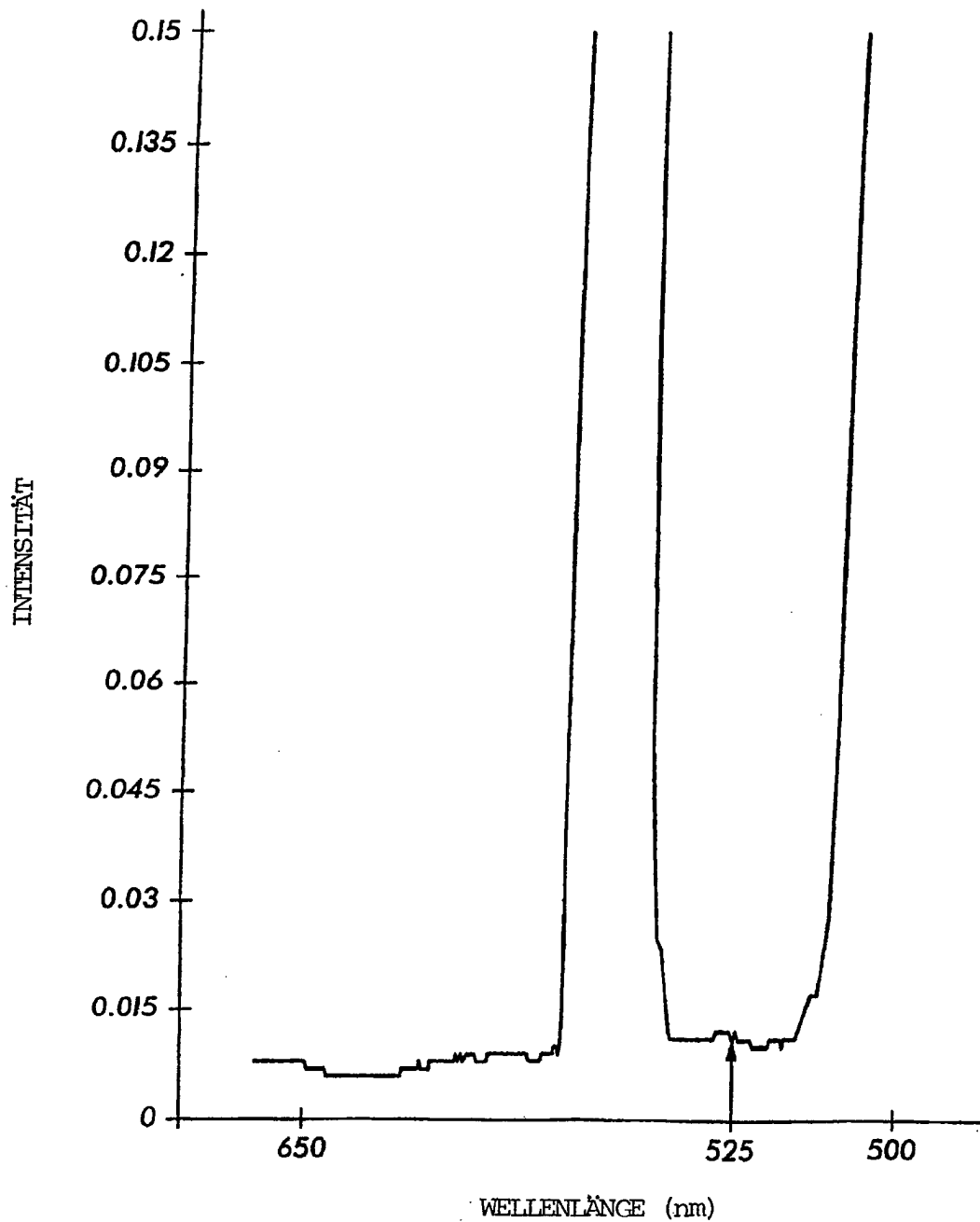
EINE SONDE (5'-CAT TCC GCT CTC), DIE MIT DER DNA-PROBE 2 (Seq.ID Nr.1) BEI 25°C FÜR 1 STUNDE HYBRIDISIERT IST

**FIG. IIA**



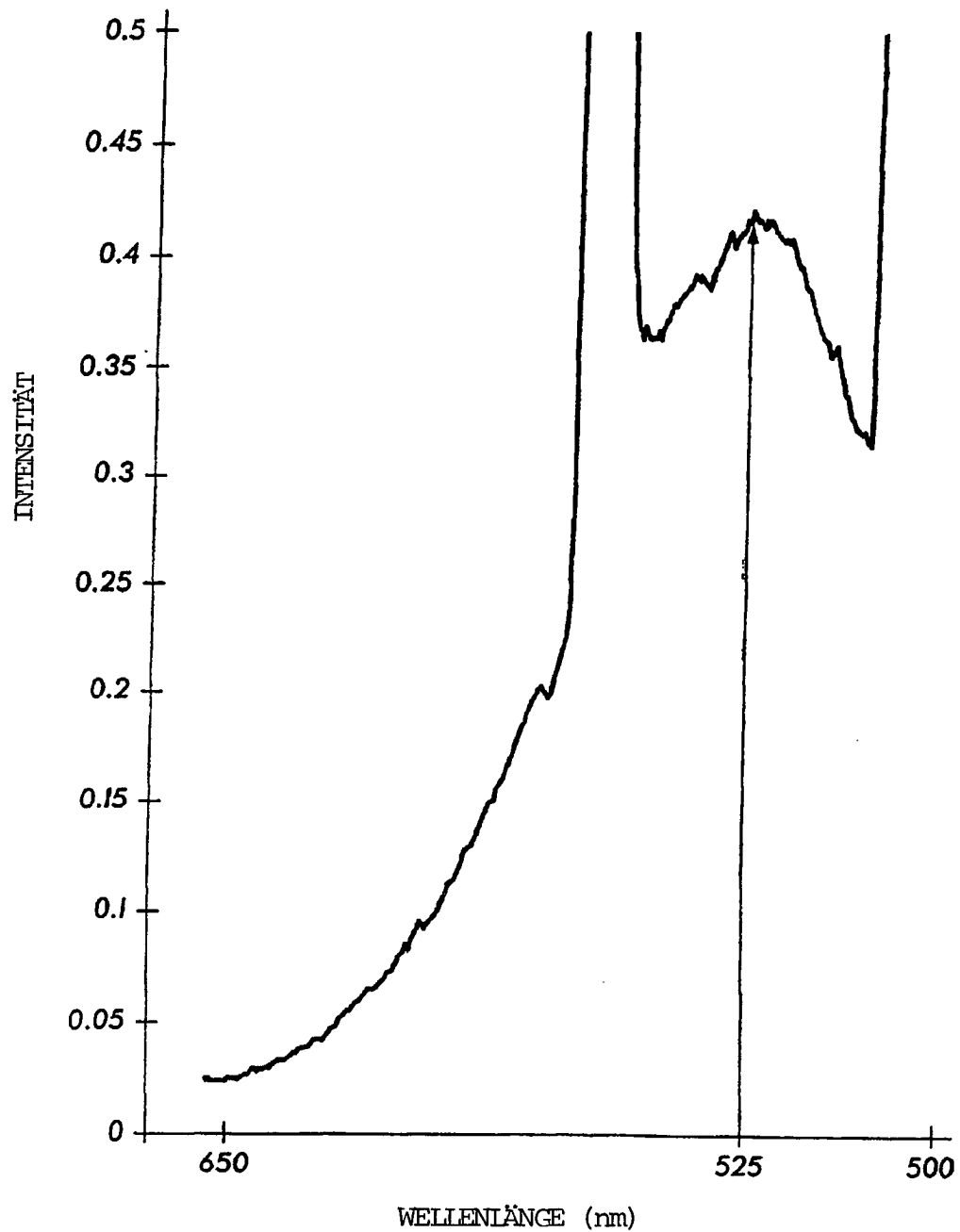
FLUORESZENZSPEKTRUM DER WT EINSTRÄNGIGEN DNA (Seq.ID Nr.1)  
HYBRIDISIERUNG BEI 25°C FÜR 1 STUNDE

**FIG. IIB**



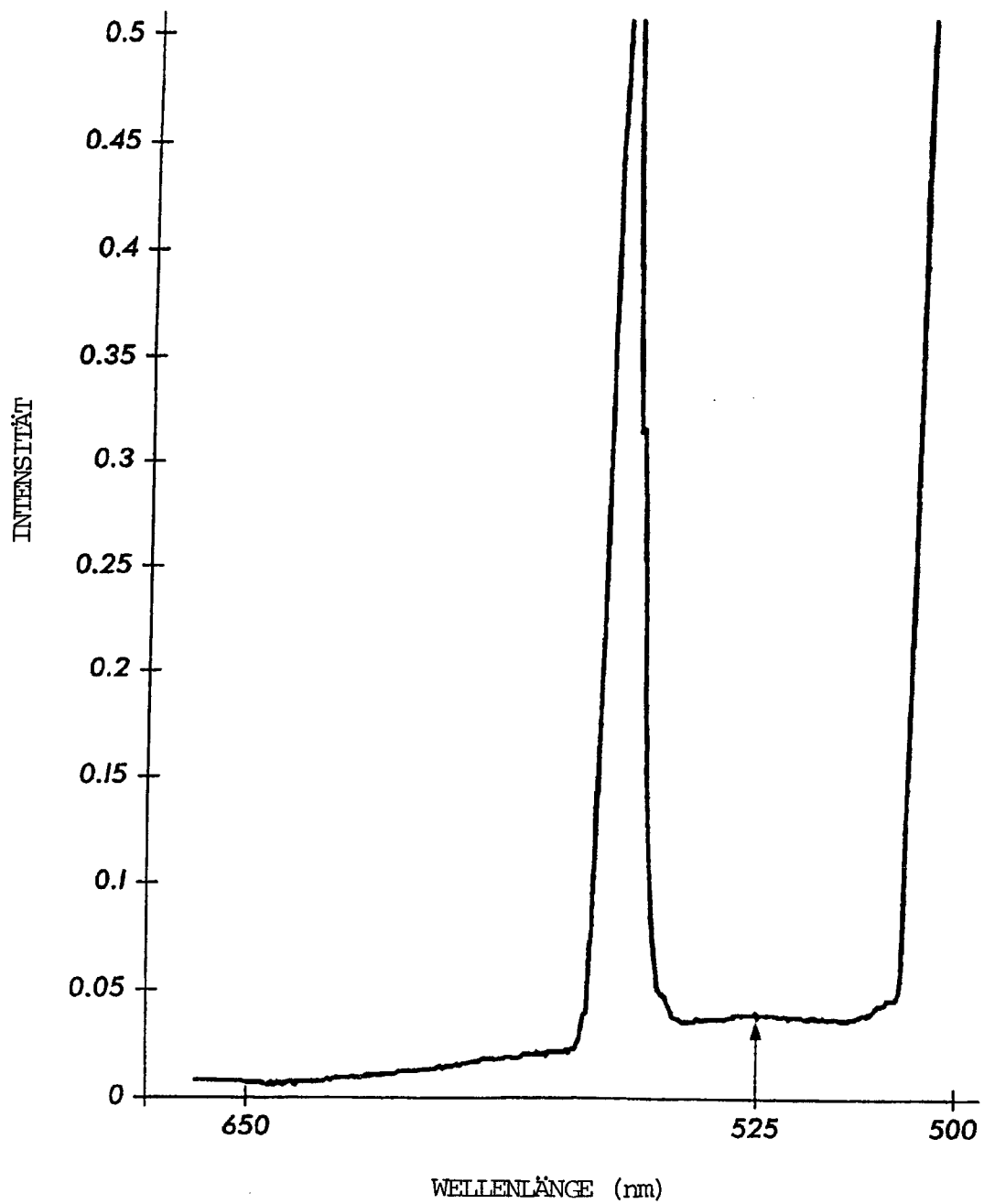
FLUORESZENZSPEKTRUM DER MUTIERTEN EINSTRÄNGIGEN  
DNA (Seq.ID Nr.2) HYBRIDISIERUNG BEI 25°C FÜR 1 STUNDE

**FIG.12A**



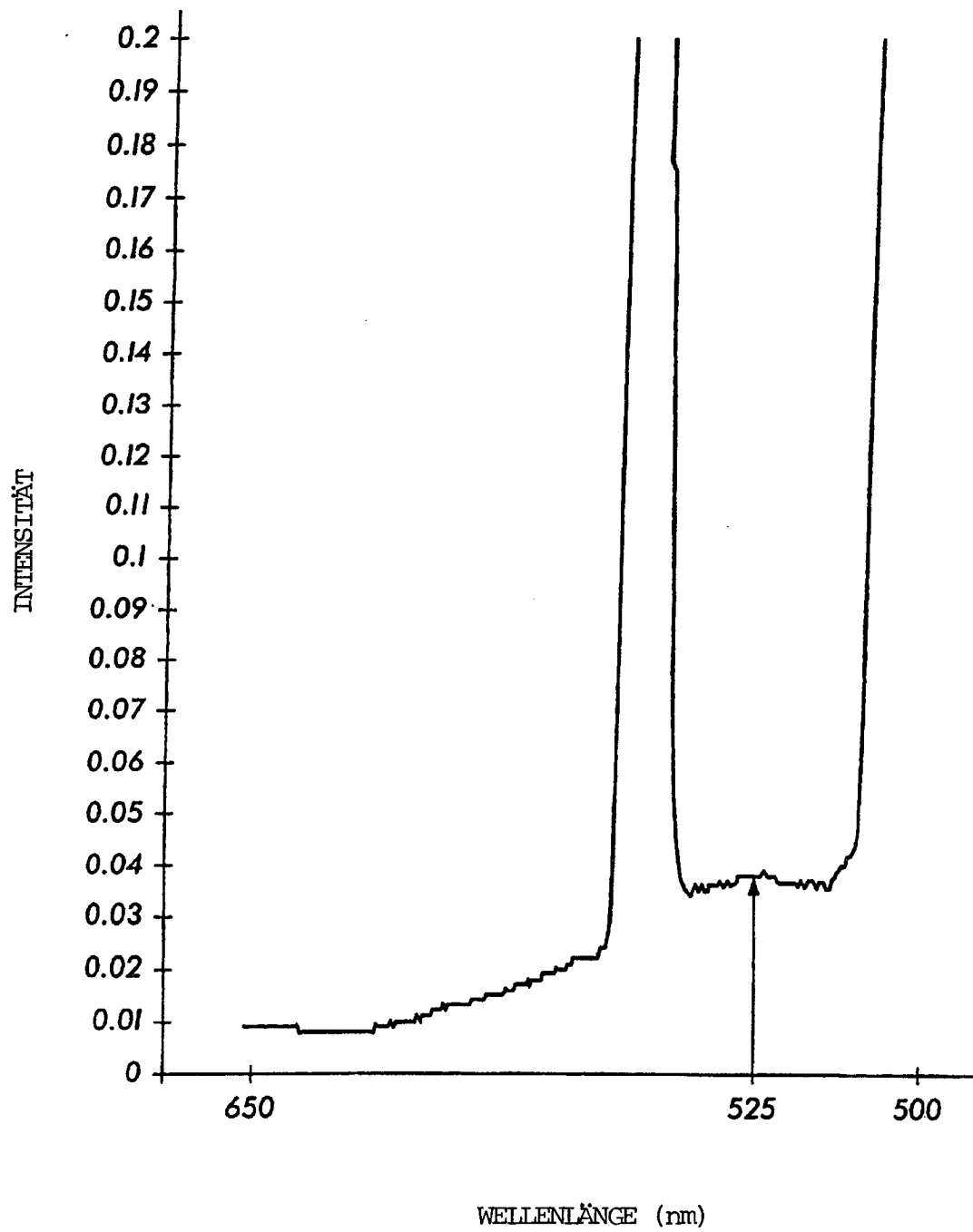
EINE SONDE (5'-CAT TCA GCT CTC), DIE MIT PROBE 1  
BEI 25°C FÜR 1 STUNDE HYBRIDISIERT IST

**FIG.12B**



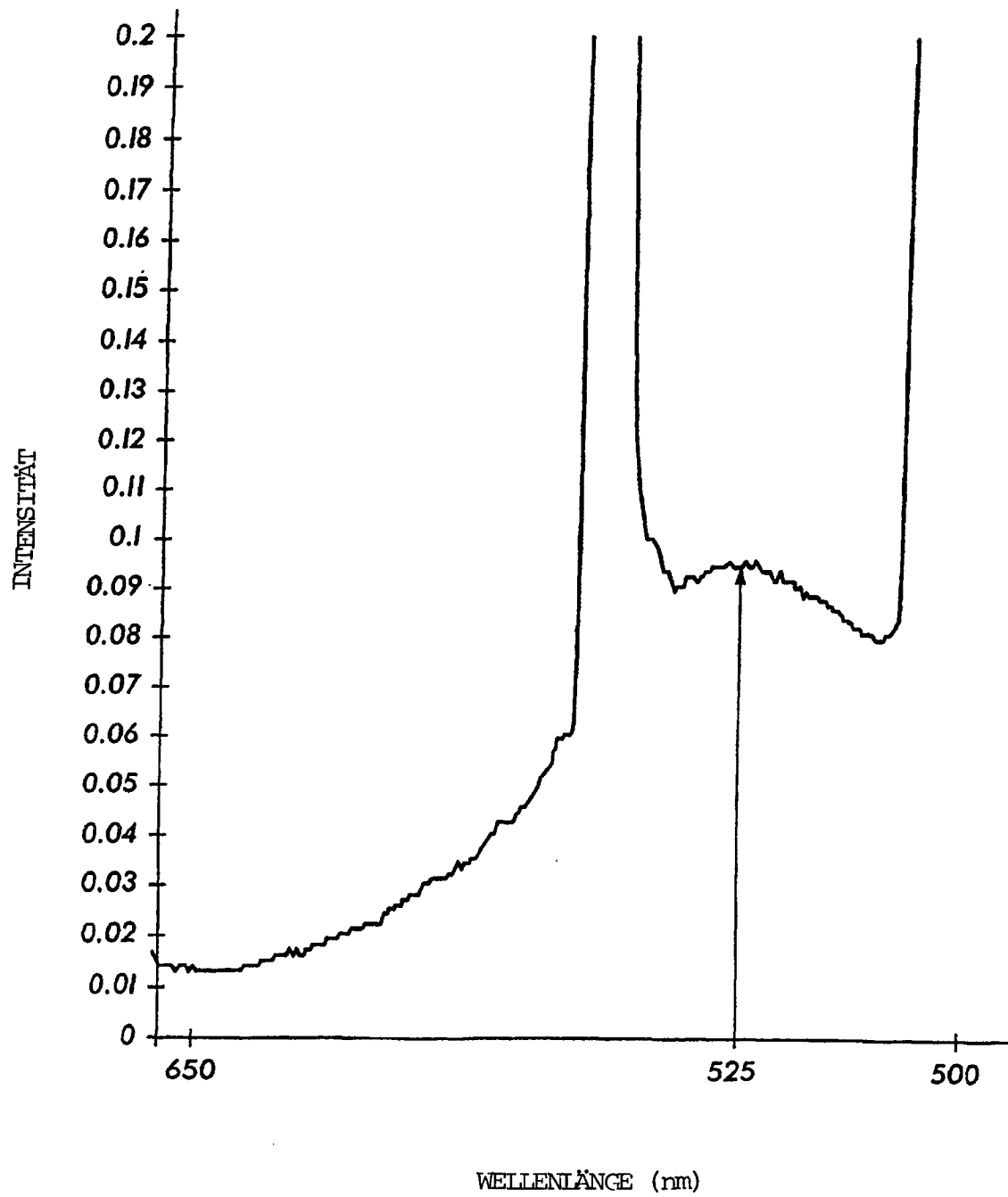
EINE SONDE (5'-CAT TCA GCT CTC), DIE MIT PROBE 1  
BEI 25°C FÜR 1 STUNDE HYBRIDISIERT IST

**FIG.13A**

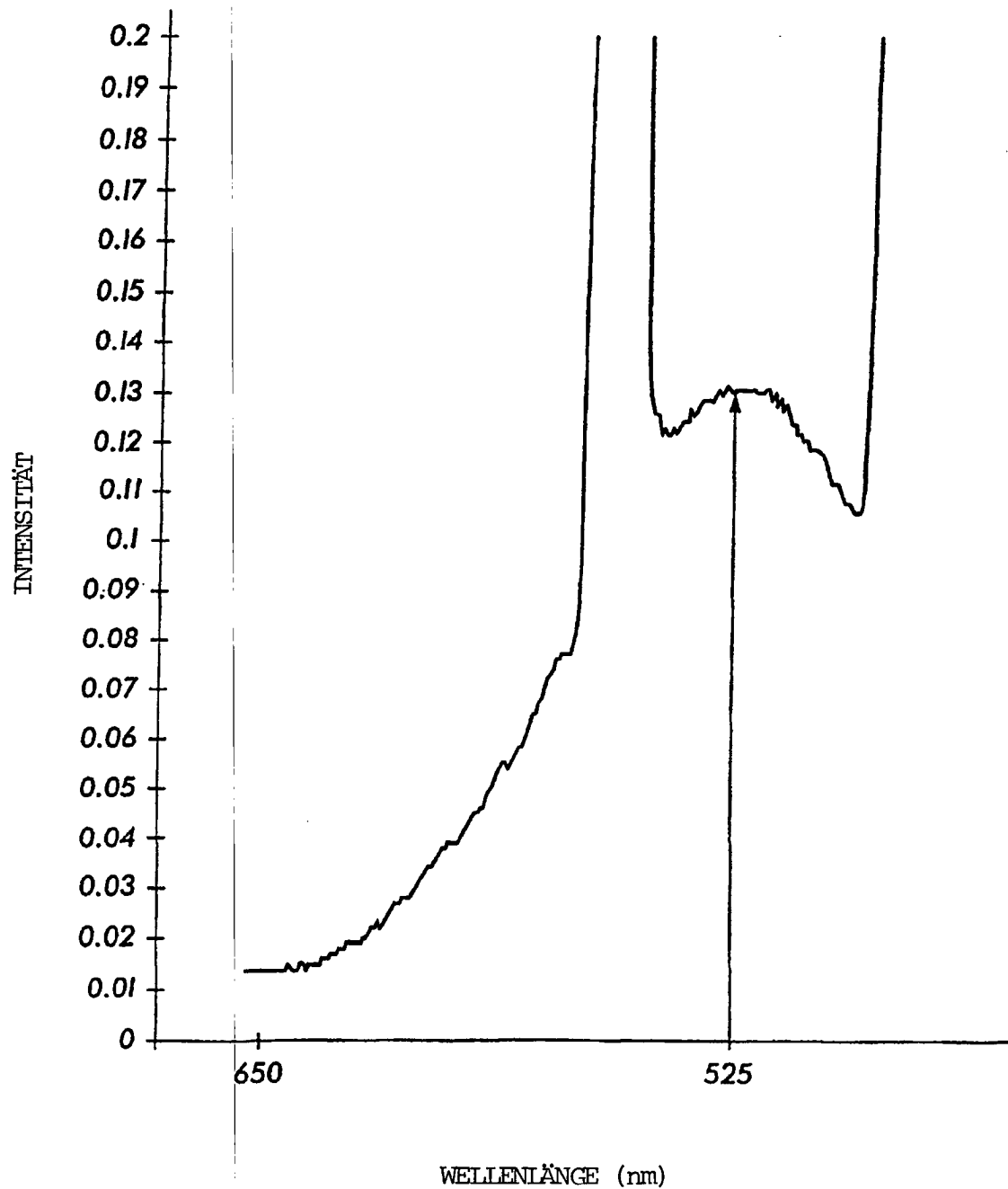




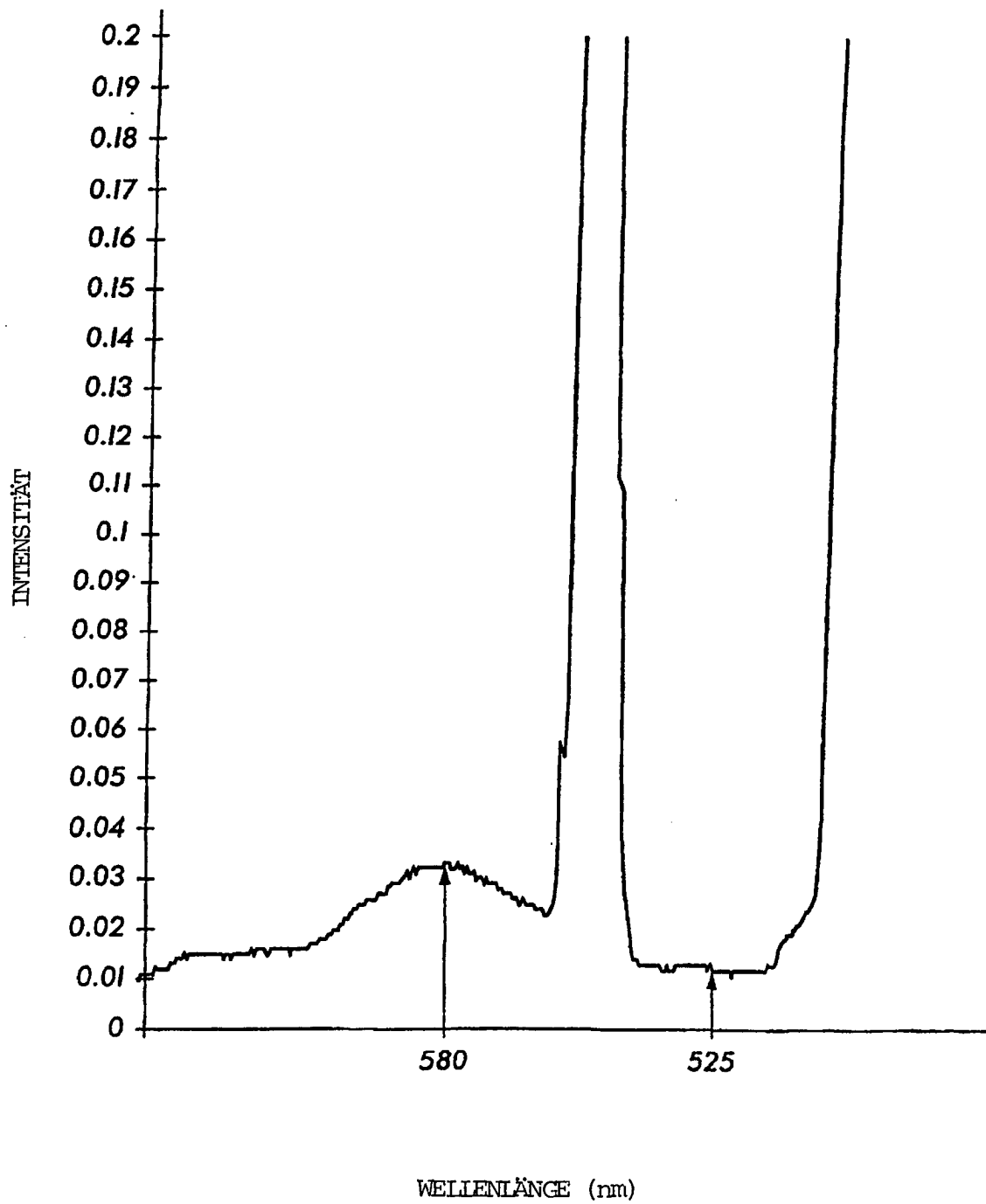
**FIG.13B**



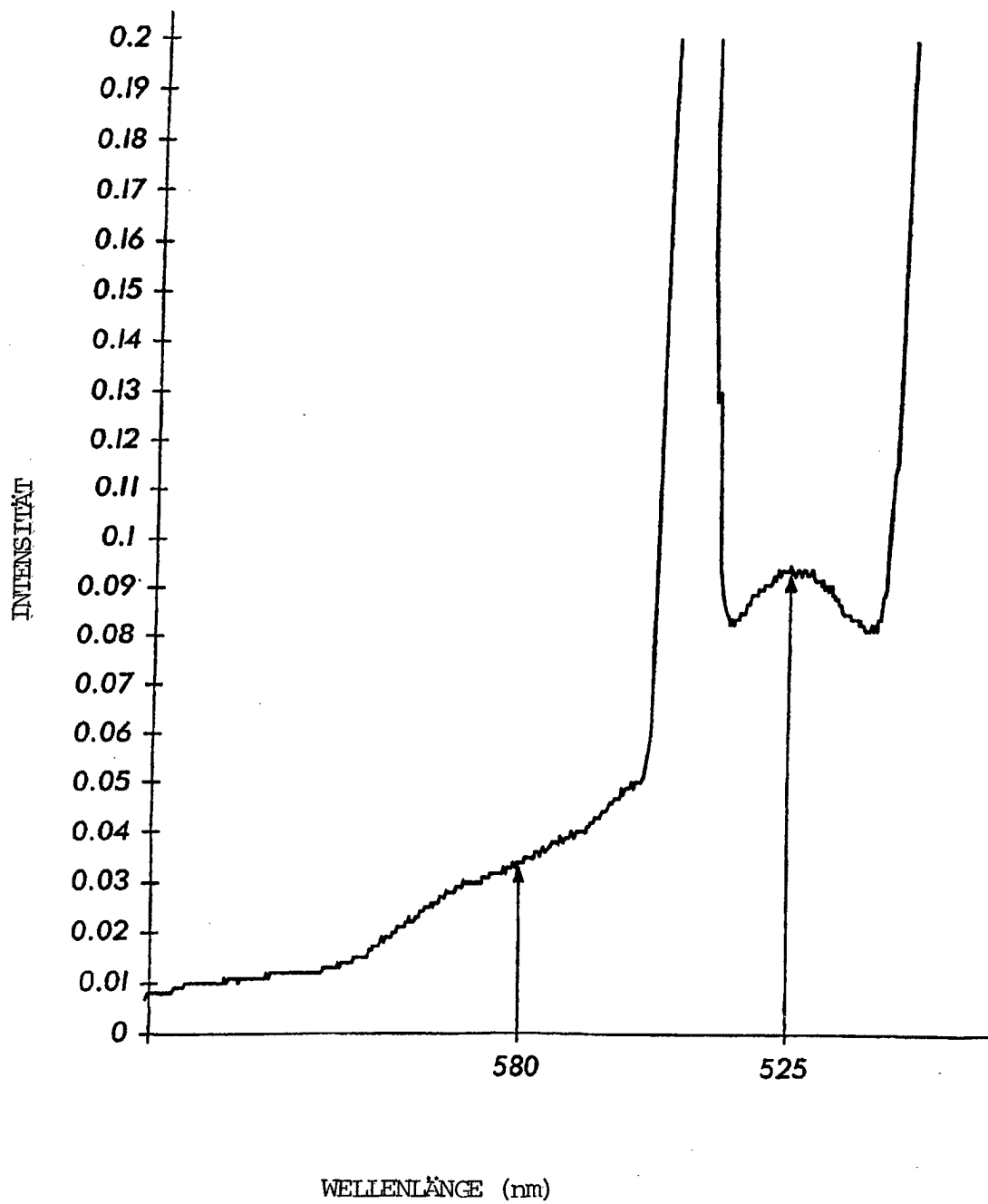
**FIG.13C**



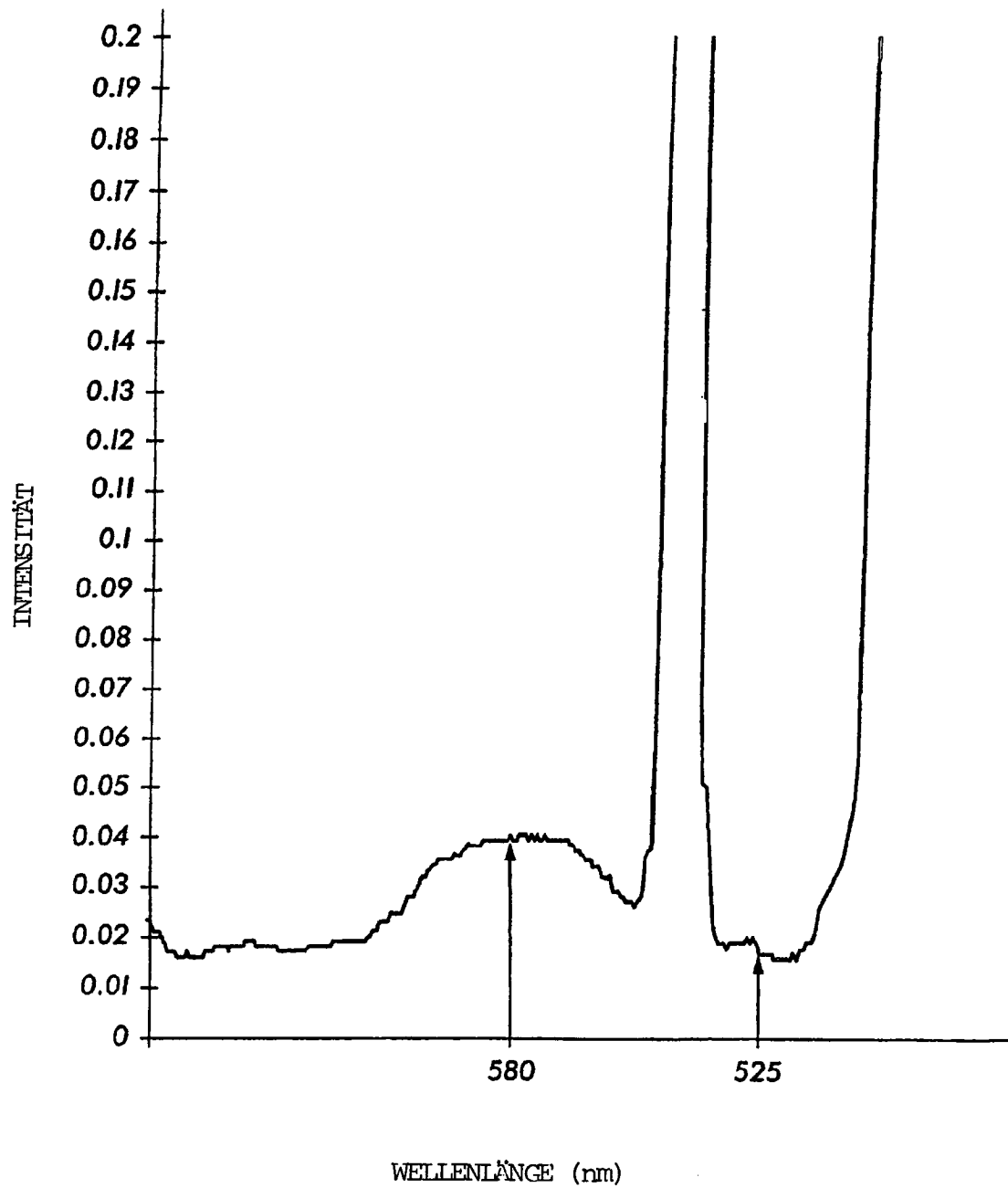
**FIG.14A**



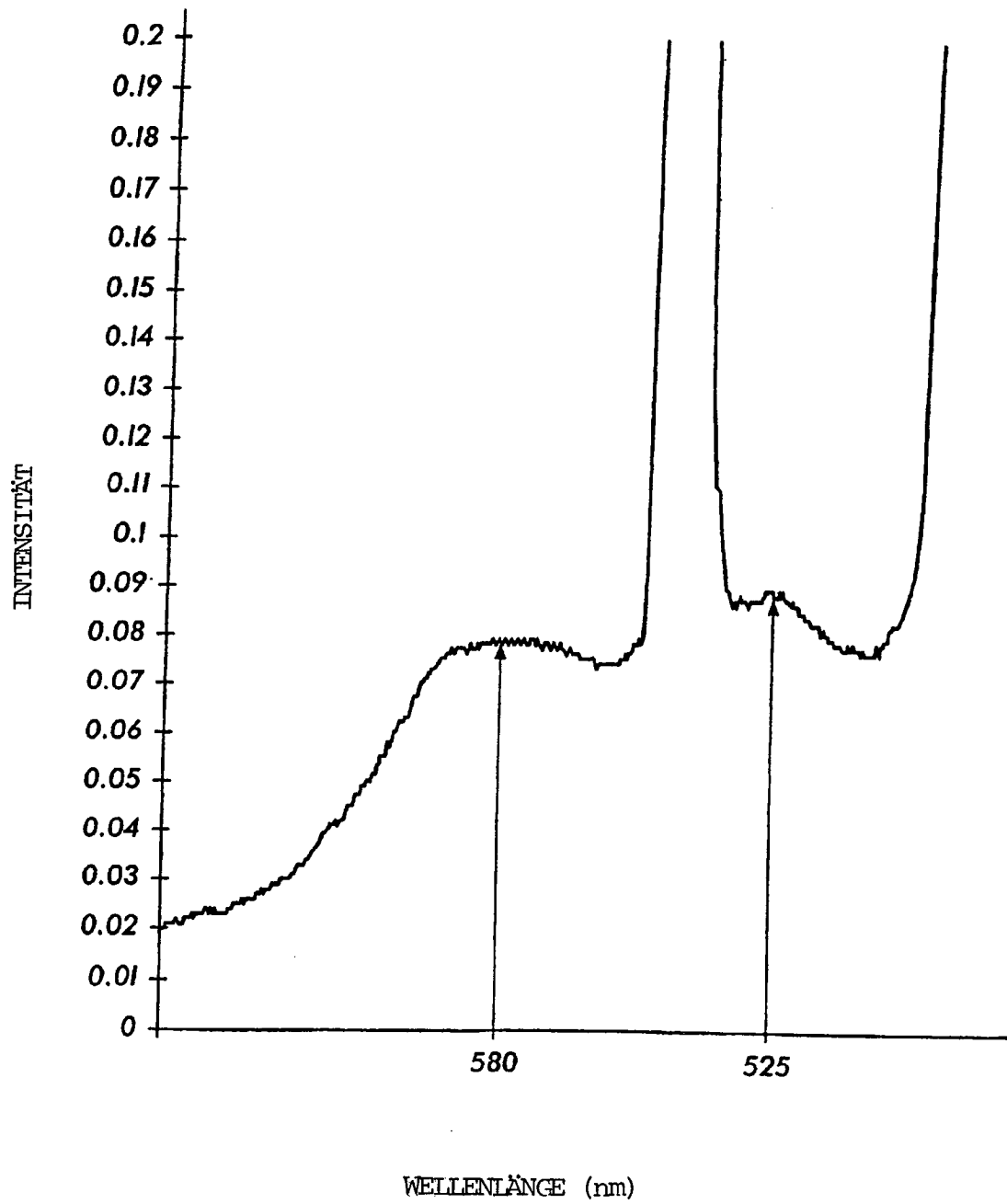
**FIG. 14B**



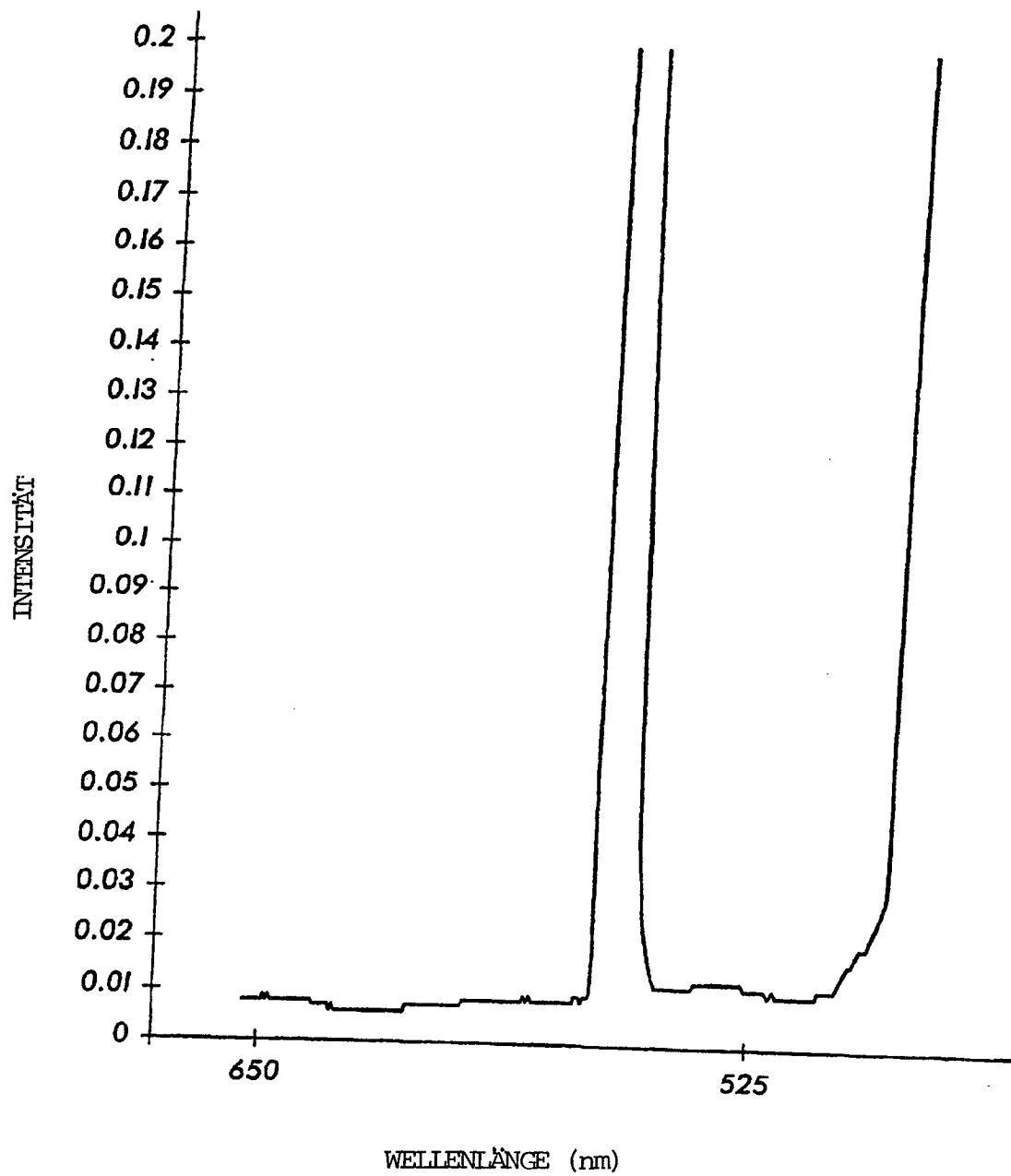
**FIG.15A**



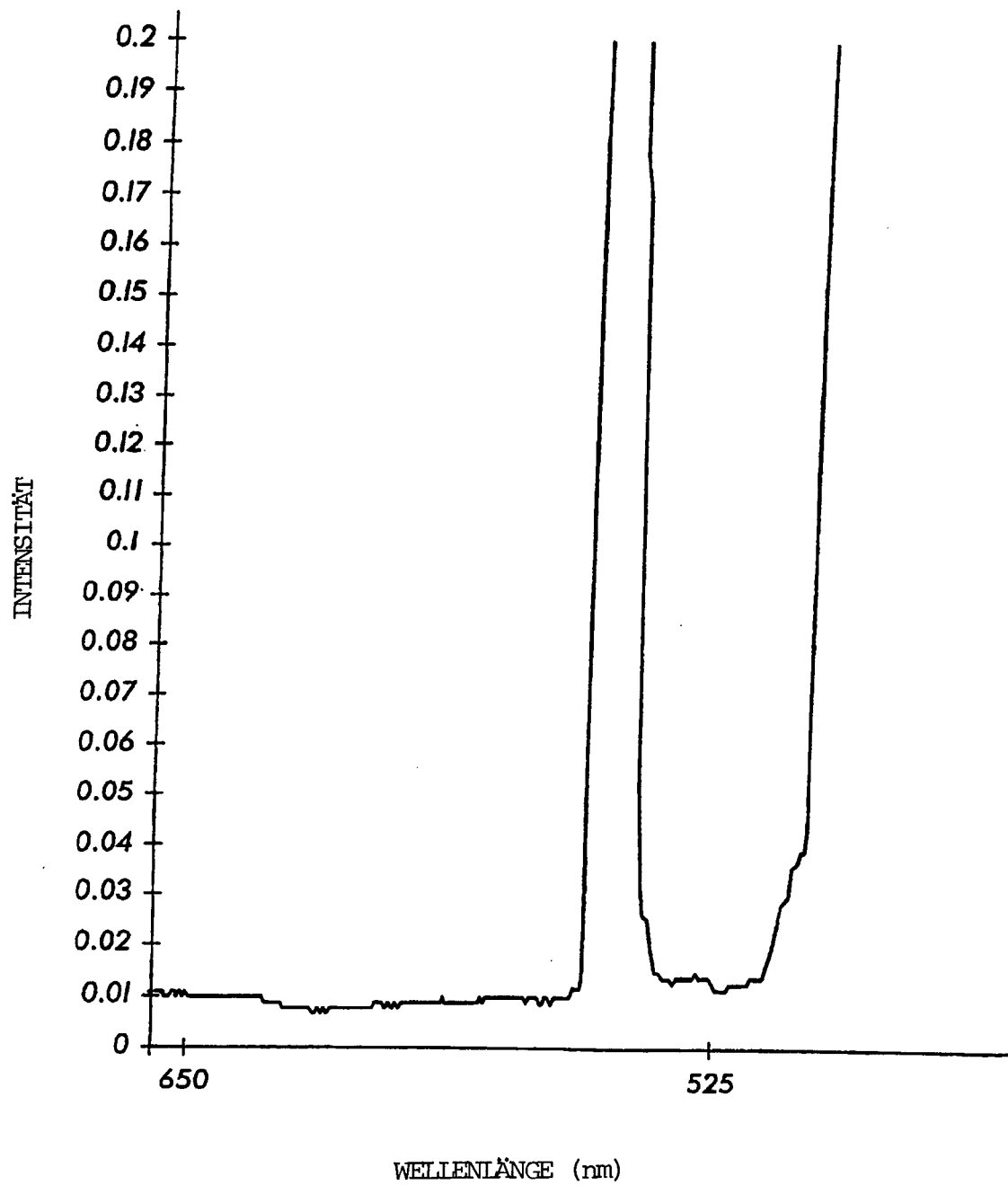
**FIG.15B**



**FIG.16A**

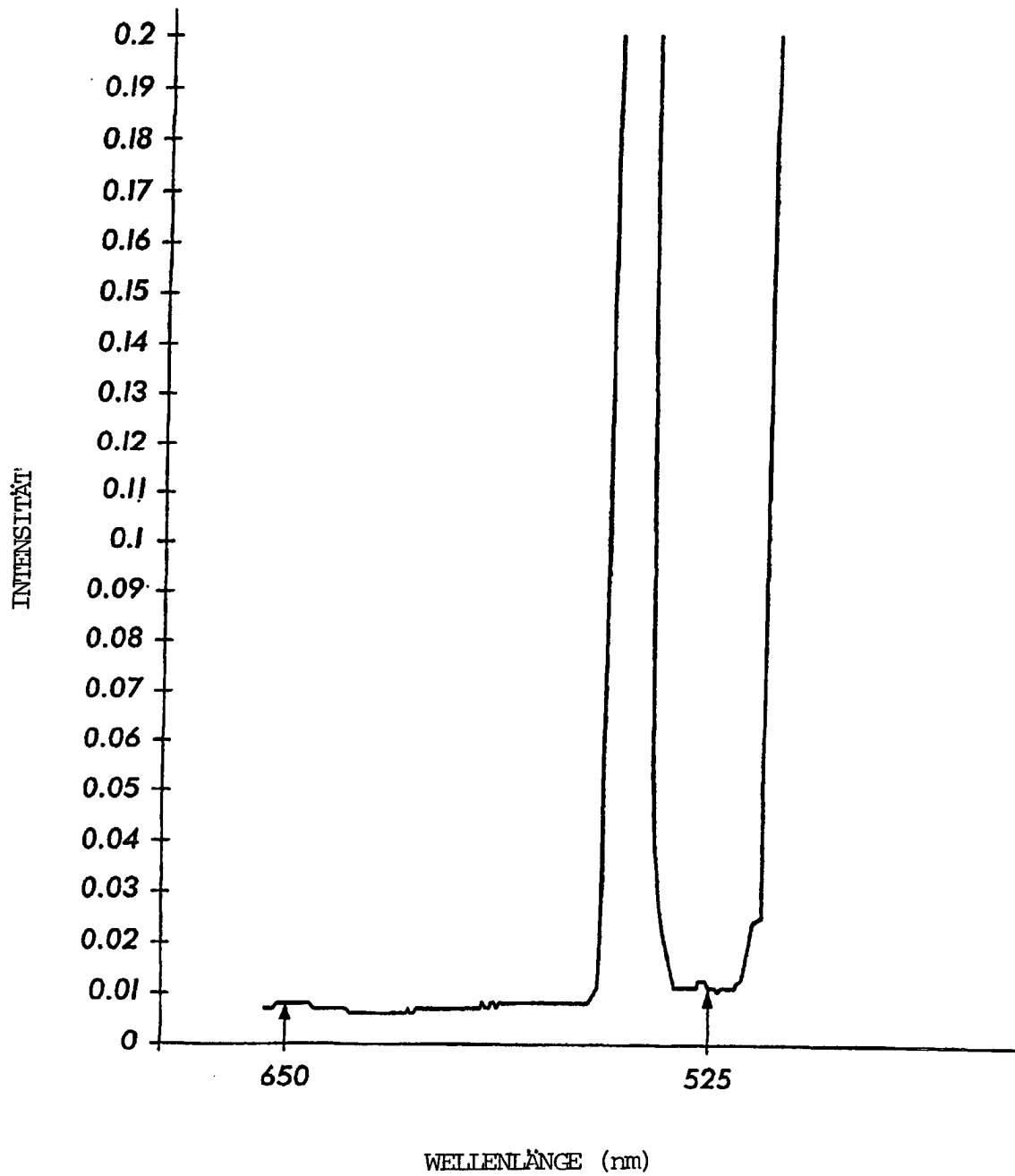


**FIG.16B**

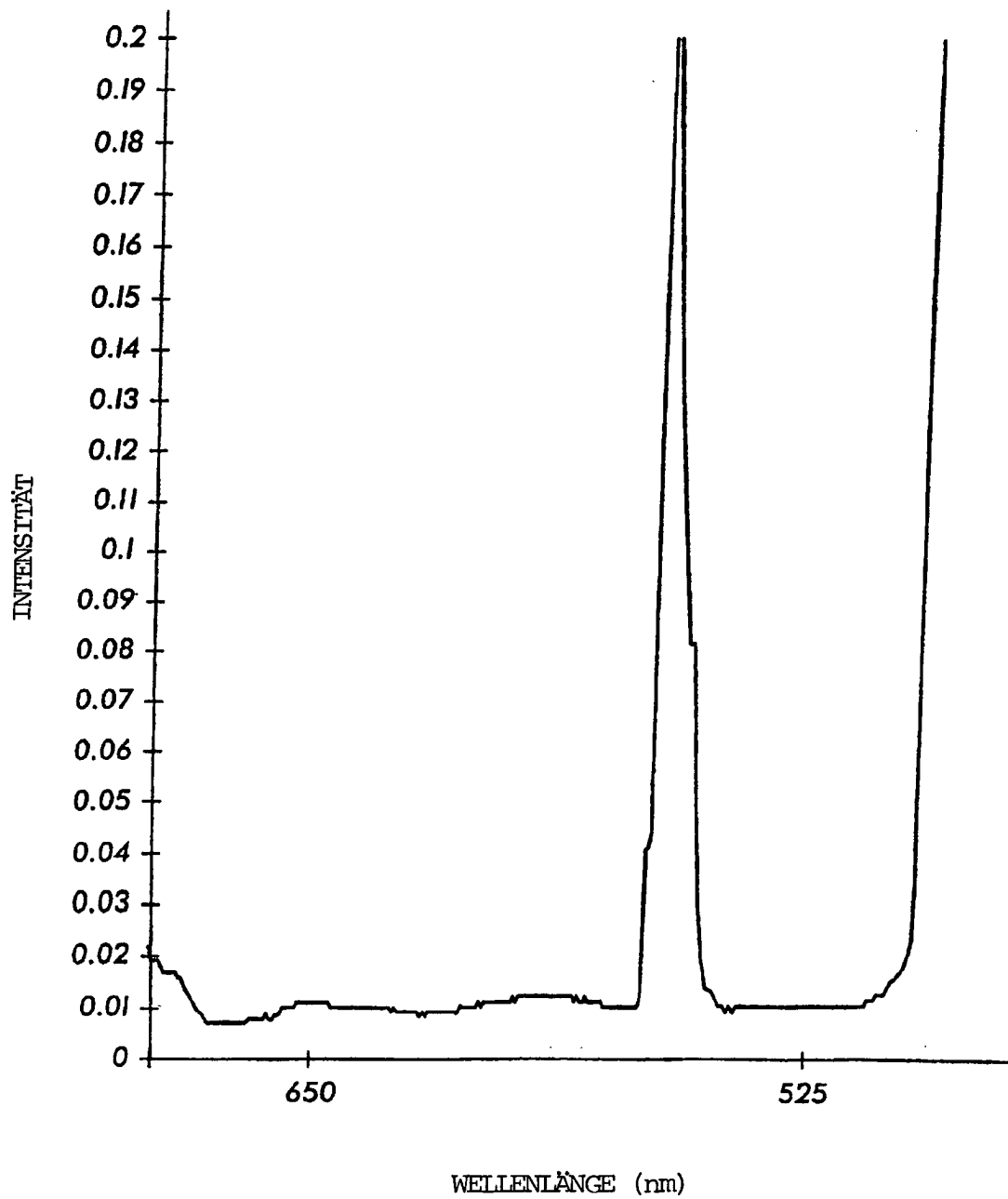




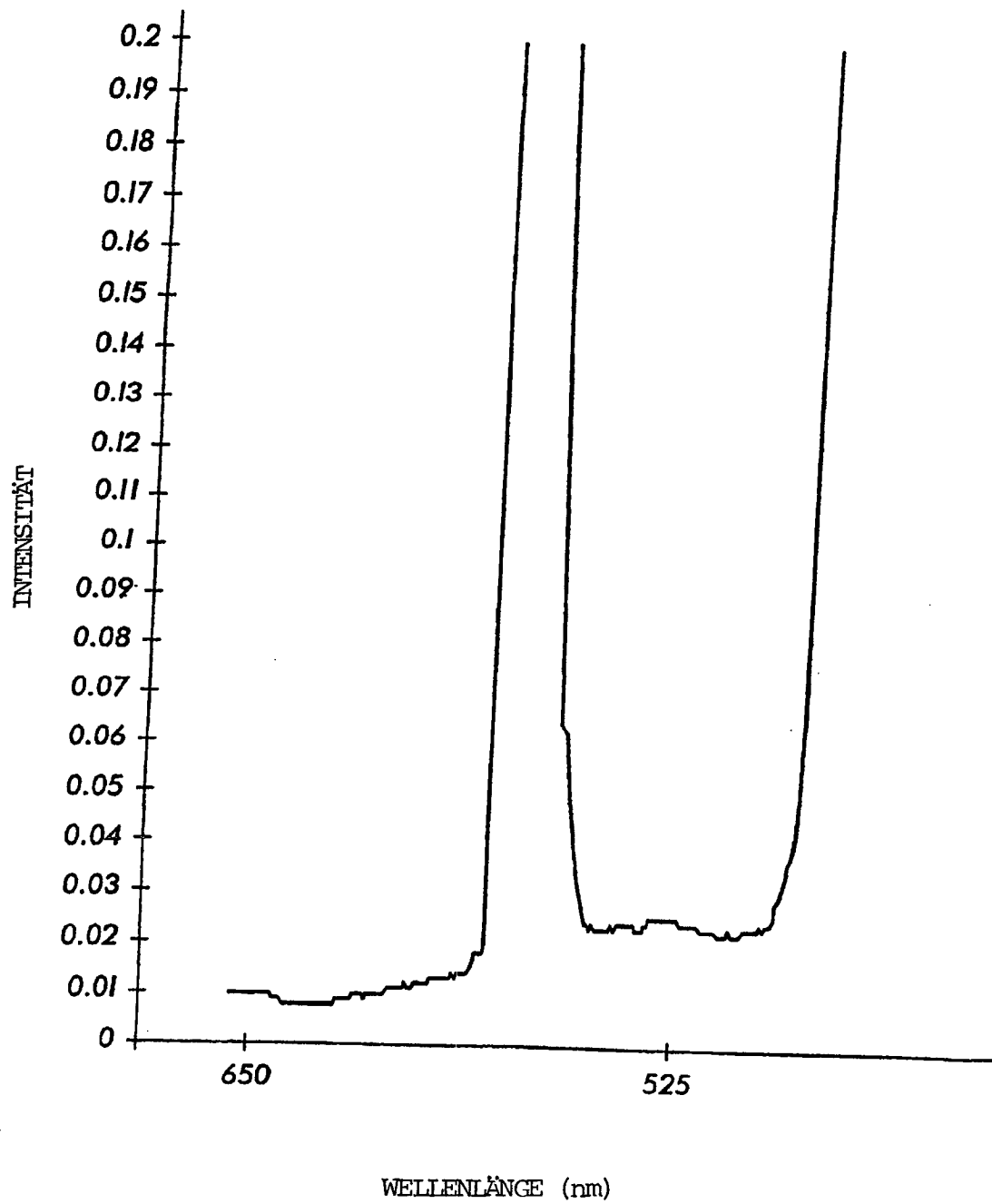
**FIG. 16C**



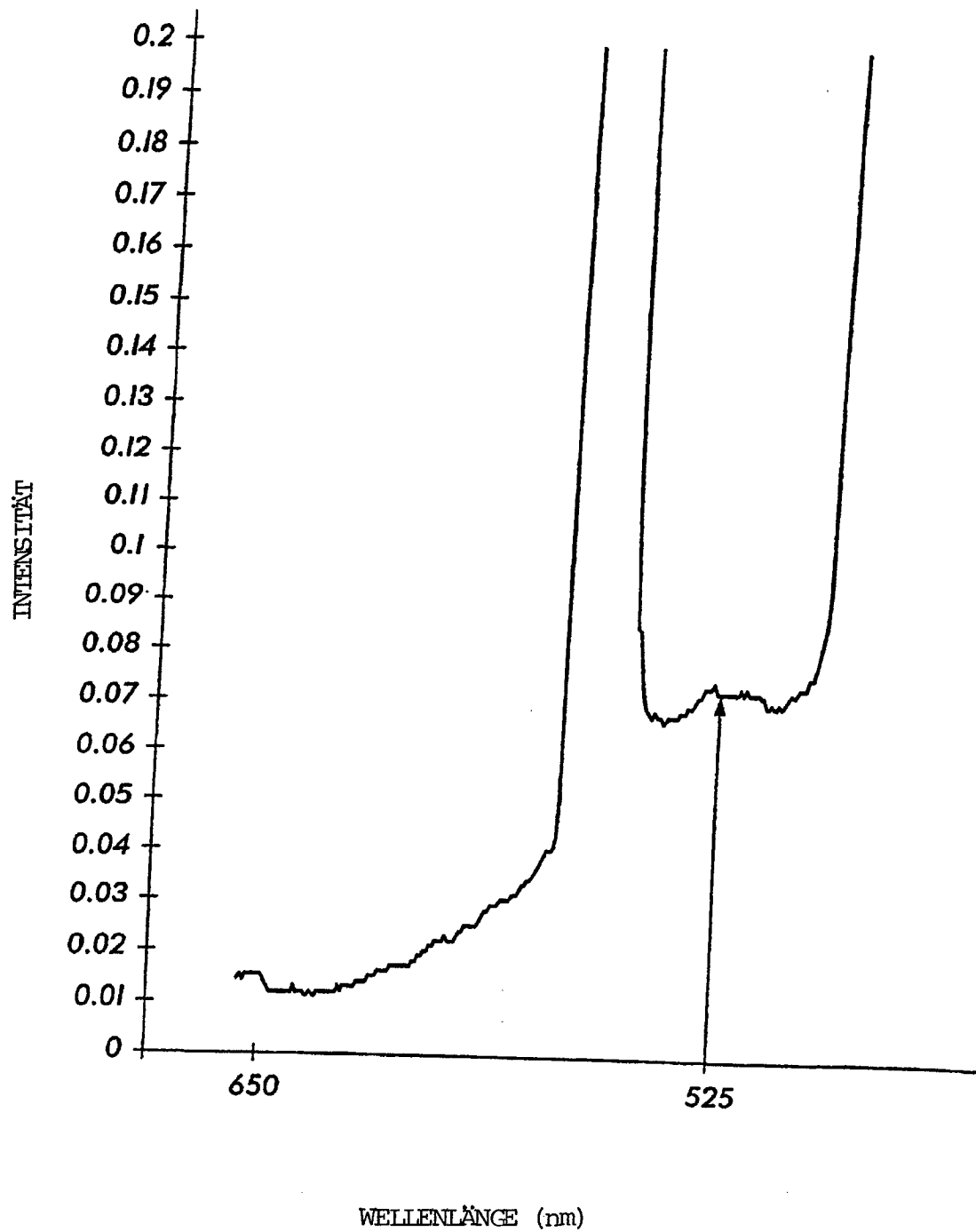
**FIG.16D**



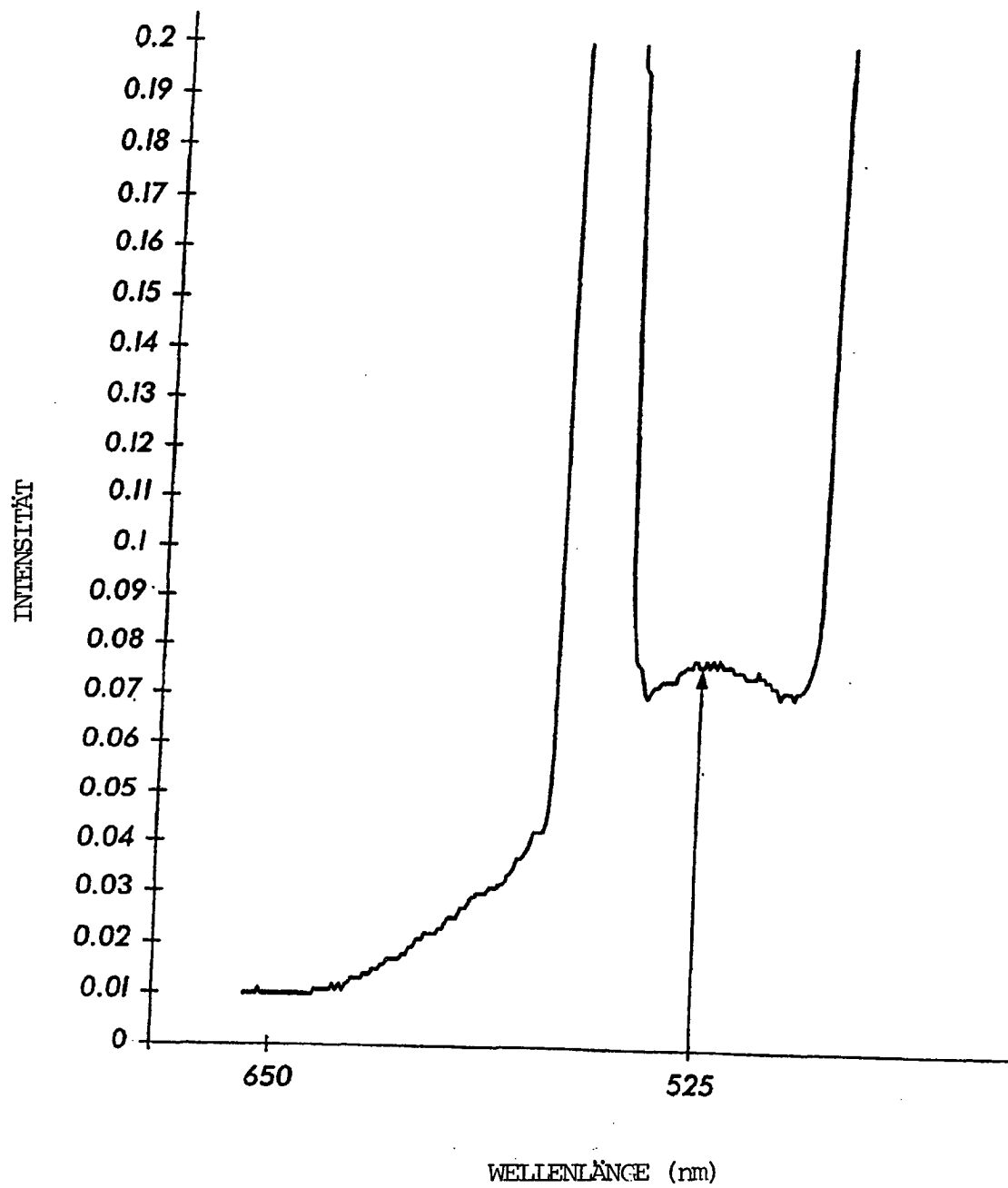
**FIG.17A**



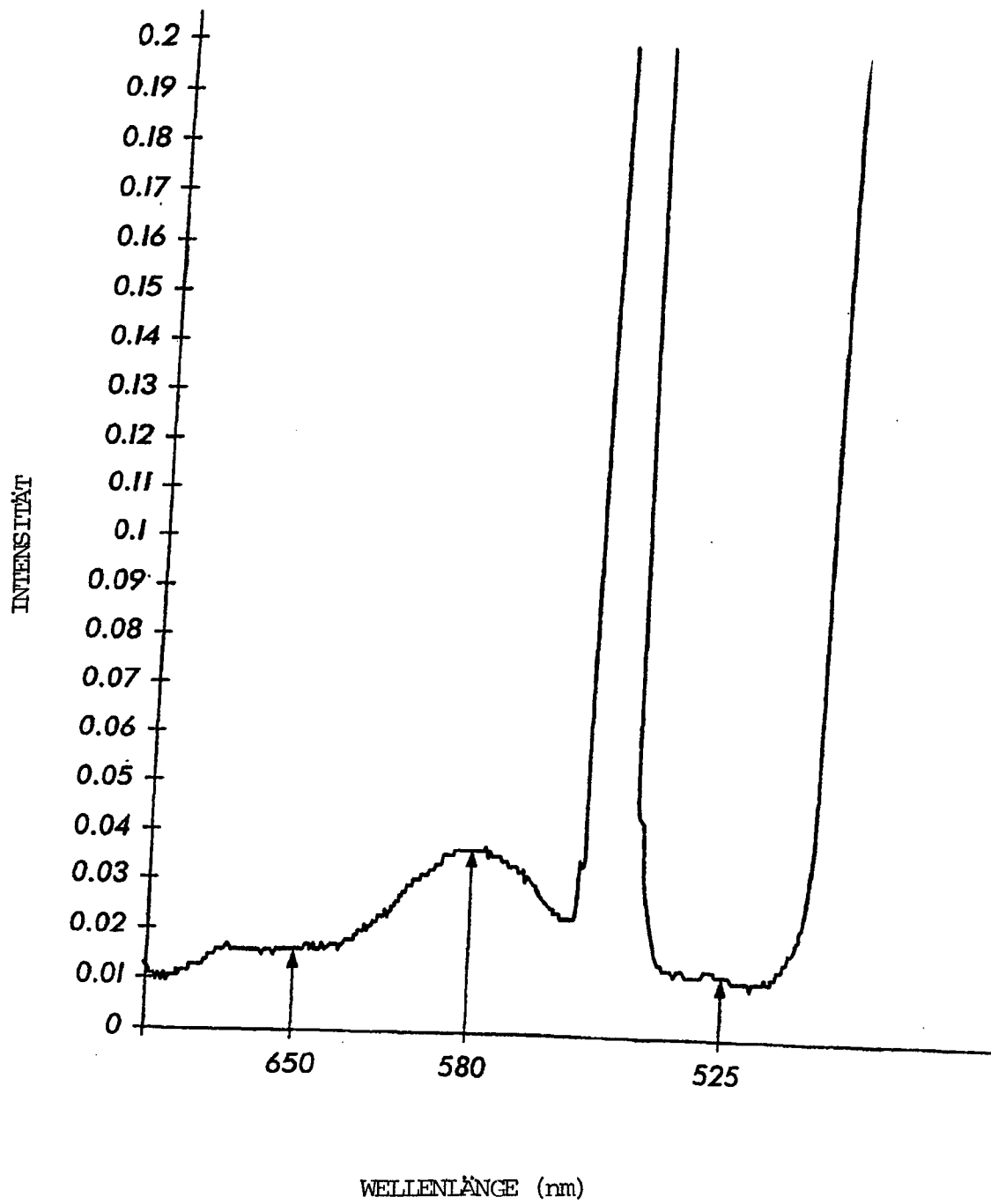
**FIG.17B**



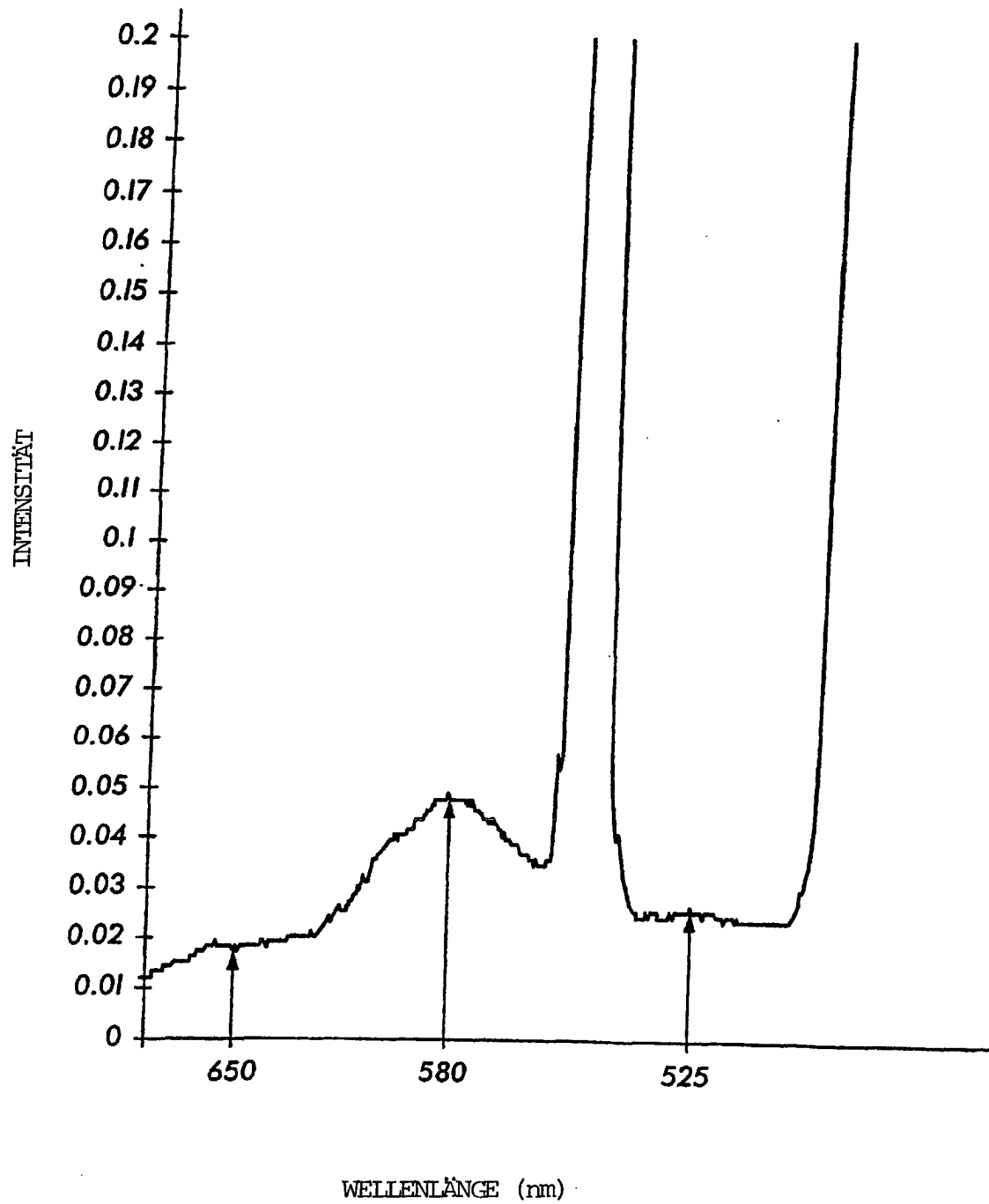
**FIG.17C**



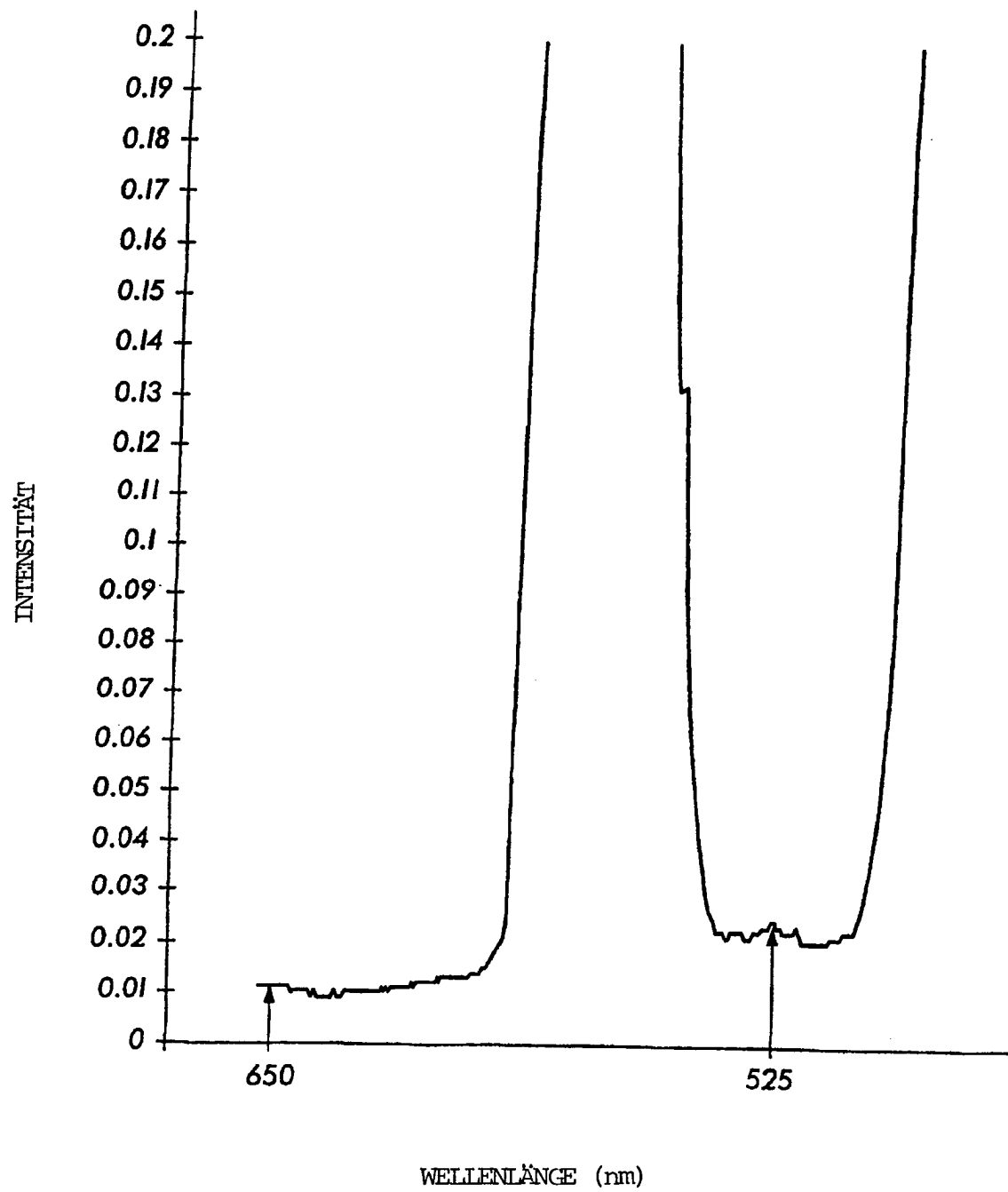
**FIG.18A**



**FIG.18B**

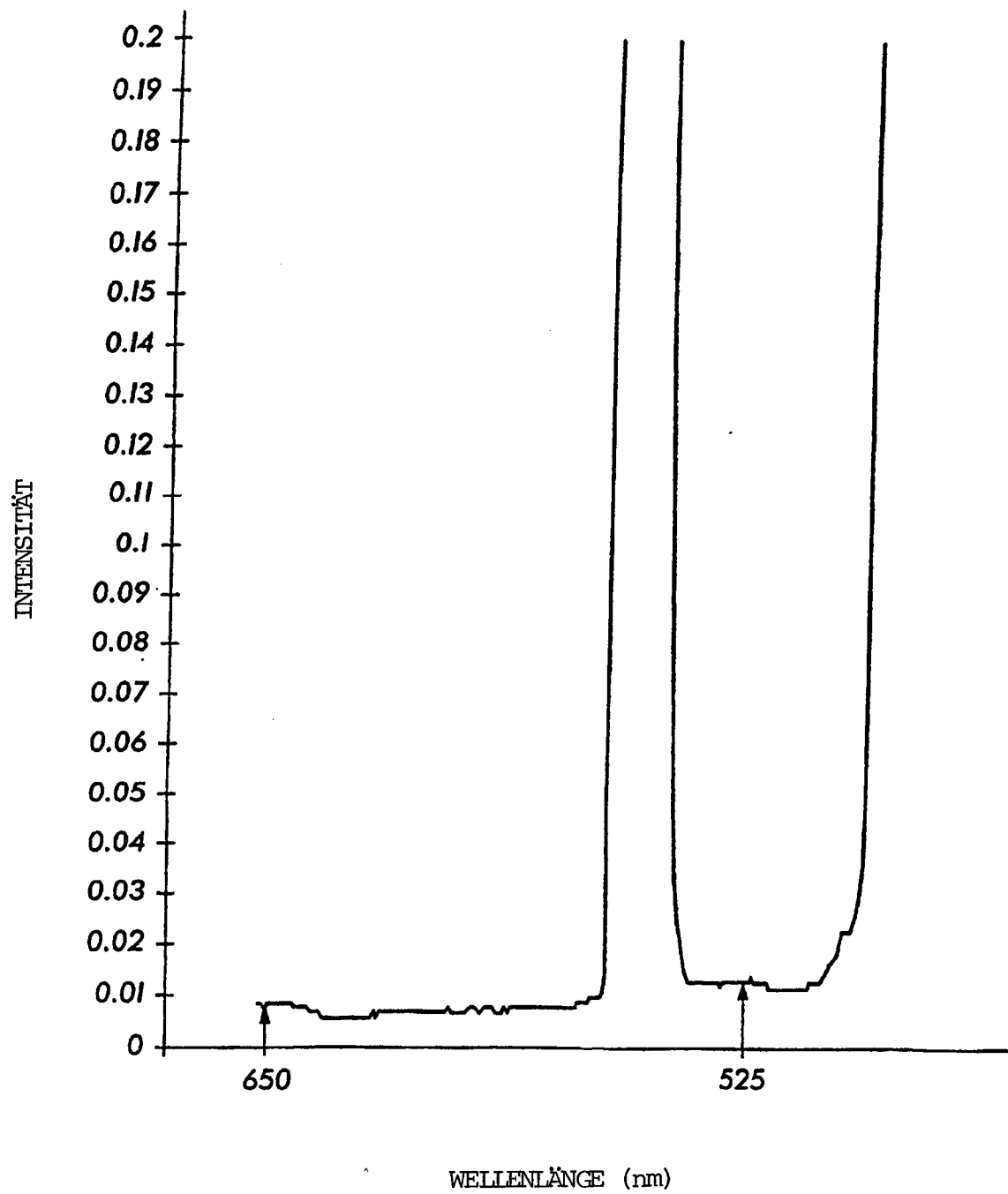


**FIG. 19A**

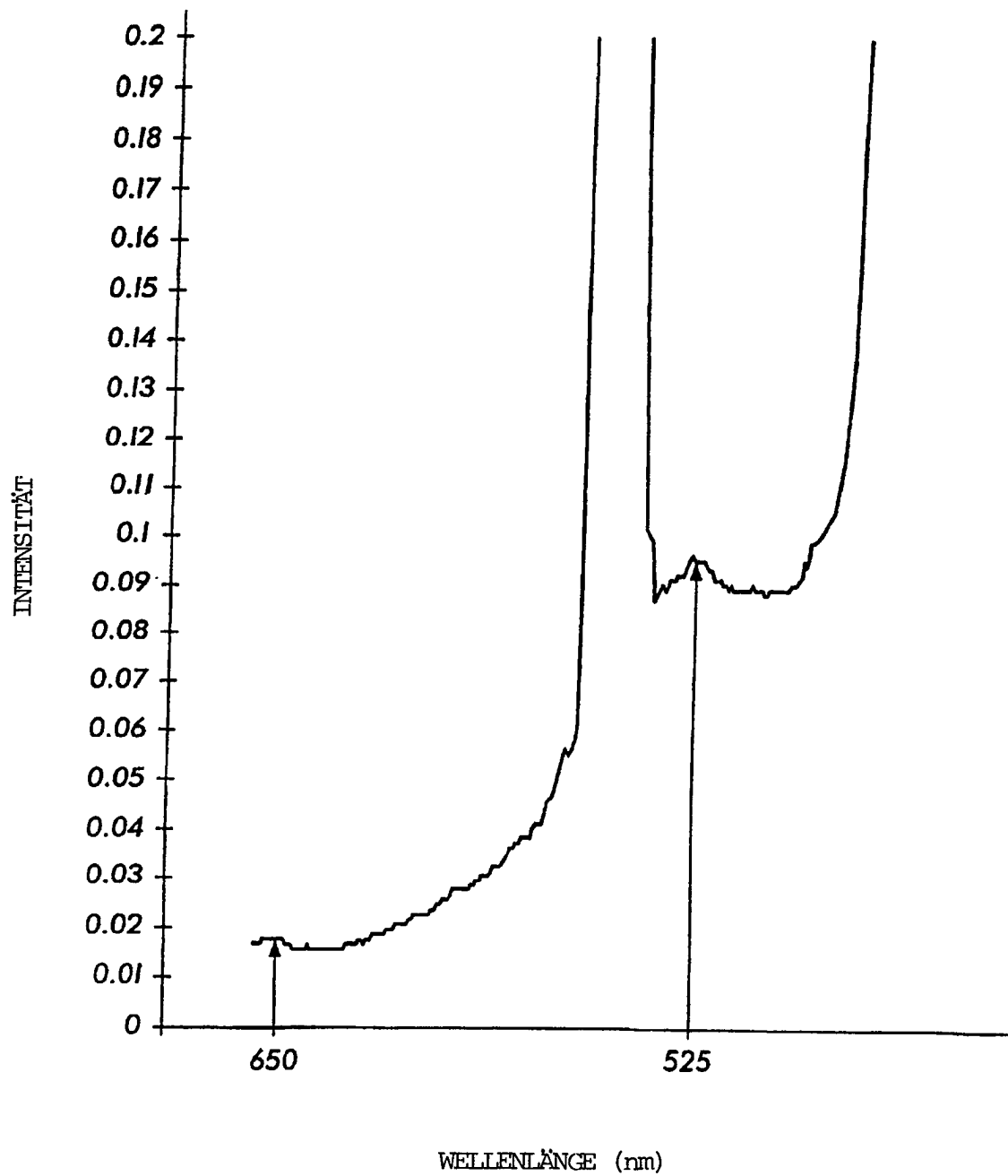




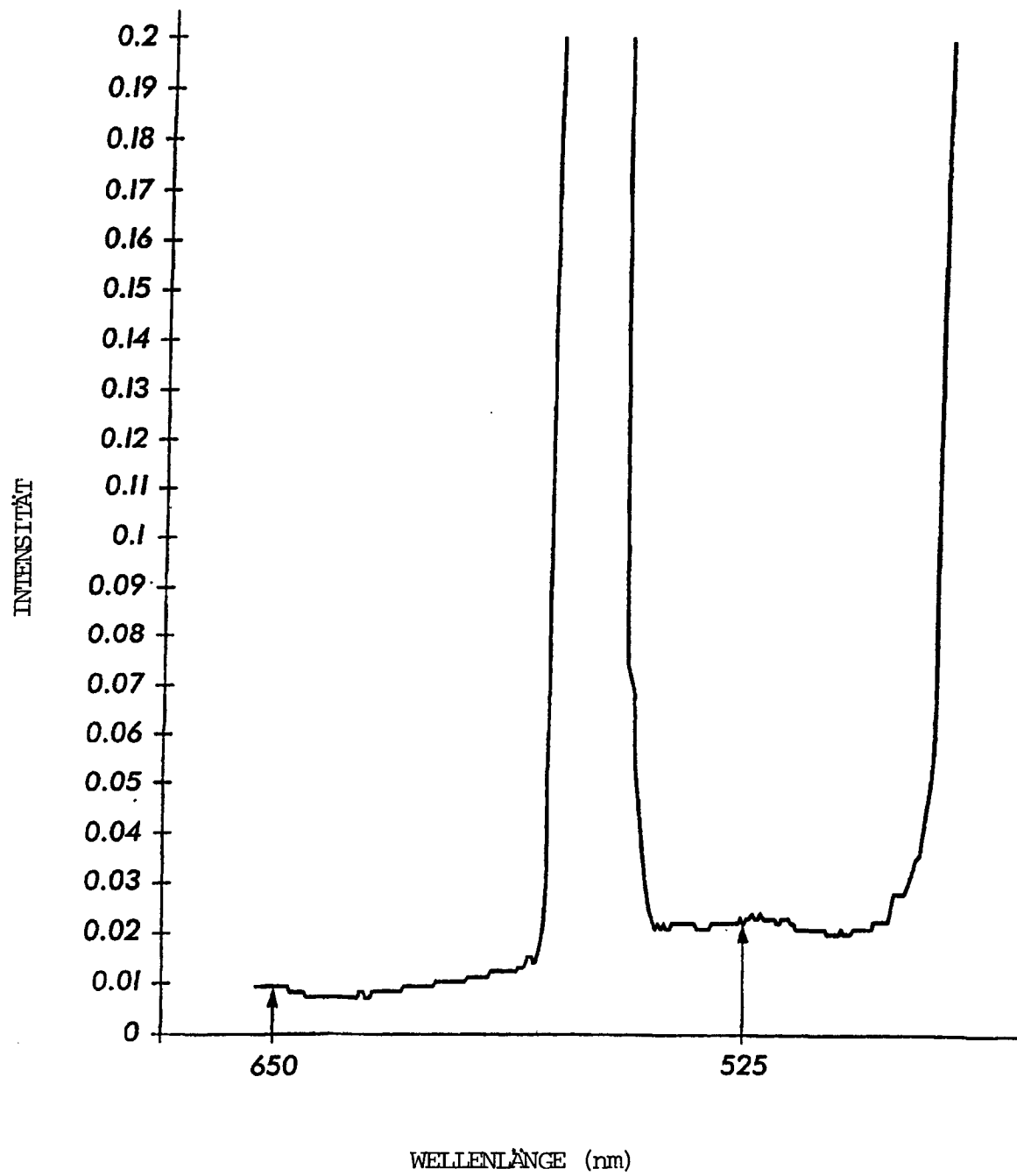
**FIG.19B**



**FIG.19C**



**FIG.19D**



**FIG.19E**

