



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/24606
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Mai 1999 (20.05.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06951	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. November 1998 (03.11.98)	
(30) Prioritätsdaten: 197 48 690.8 4. November 1997 (04.11.97) DE 198 14 001.0 28. März 1998 (28.03.98) DE 198 14 828.3 2. April 1998 (02.04.98) DE	(Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Manheim (DE).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): KESSLER, Christoph [DE/DE]; Schlossbergweg 11, D-82057 Icking (DE). HABERHAUSEN, Gerd [DE/DE]; Jochbergweg 2, D-82393 Iffeldorf (DE). BARTL, Knut [DE/DE]; Am Westend 6, D-82407 Wielenbach (DE). ORUM, Henrik [DK/DK]; Vildrosevej 3, DK-3500 Værløse (DK).	
(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).	

(54) Title: SPECIFIC AND SENSITIVE NUCLEIC ACID DETECTION METHOD

(54) Bezeichnung: SPEZIFISCHES UND SENSITIVES NUKLEINSÄURENACHWEISVERFAHREN

(57) Abstract

The invention relates to a method for detecting a nucleic acid in which a plurality of amplificates of a section of the nucleic acid is produced with the aid of two primers. One primer can bond on a bonding sequence A of the nucleic acid, and the other can bond on a bonding sequence C' which is complimentary to a sequence C, does not overlap with A, and is placed in a 3'-direction of A. The amplificates are brought into contact with a probe having a bonding sequence D which can bond on a sequence B or the complement thereof, said sequence B and the complement thereof being placed between sequences A and C. The formation of a hybrid out of the amplificate and the probe is detected, whereby the sequence placed between bonding sequences A and C contains no nucleotides which do not belong to the bonding sequence D or complement D' thereof of the probe.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz A der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C komplementär ist, binden kann, Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an eine zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde, wobei die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine Nukleotide enthält, die nicht der Bindesequenz D der Sonde oder ihrem Komplement D' zugehören.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänen		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Spezifisches und sensitives Nukleinsäurenachweisverfahren

- 5 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, bei dem eine Amplifikation eines Teilstückes dieser Nukleinsäuren vorgenommen wird und wobei dieses Teilstück im Hinblick auf seine Basensequenz bestimmte Bedingungen erfüllen muß, sowie ein Reagenzkit enthaltend zwei Primer und eine Sonde, die dieses Teilstück definieren.
- 10 Eine der meist angewandten molekularbiologischen Techniken zum Nachweis von Nukleinsäuren ist Hybridisierung mit sequenzspezifischen Sonden zum Nachweis homologer Nukleinsäure-Sequenzen. Der Nachweis von Nukleinsäure-Sequenzen ist von Bedeutung im Grundlagenbereich, jedoch von besonderer Bedeutung in verschiedenen Anwendungsfeldern, z. B. in den Bereichen medizinische Diagnostik, forensische Diagnostik, Lebensmitteldiagnostik, Umweltdiagnostik, Pflanzenschutz und Tiermedizin.
- 15

Als Sonde werden dabei entweder Oligonukleotide (kurze DNA oder RNA) oder Polynukleotide (längere DNA oder RNA) verwendet. Dabei haben die kürzeren Sonden gegenüber den längeren Sonden den Vorteil größerer Sequenzselektivität, wegen des

- 20 kürzeren Hybridisierungsbereichs aber den Nachteil geringerer Sensitivität. Eine verbesserte Sensitivität und Sequenzselektivität wird mit PNA-Sonden (Peptidnukleinsäuren, z. B. WO 92/20702) erreicht, da diese Sonden eine höhere Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren haben (höherer Tm) und durch eine höhere Basendiskriminierung gekennzeichnet sind (ΔT_m). Zusätzlich können Sonden zum Nukleinsäure-Nachweis 25 Markierungsgruppen tragen, die entweder zum Fangen und/oder zur Detektion von Hybridkomplexen aus Sonde und nachzuweisender Nukleinsäure geeignet sind.

Zum Nukleinsäure-Nachweis durch Hybridisierung werden eine oder mehrere Sonden entweder zur Hybridisierung in Lösung oder auf festen Trägern verwendet. Bei Nukleinsäure-Nachweisen in Lösung spricht man von homogenen Nachweisformaten, bei Nachweis auf festen Trägern und/oder vermittelt durch feste Trägern von heterogenen

5 Nachweisformaten. Bei den heterogenen Nachweisverfahren (z. B. dot blot) kann die nachzuweisende Nukleinsäure auf dem festen Träger vorgebunden sein. Die Hybridisierung erfolgt durch Inkontaktbringen mit einer Lösung, die die Sonde enthält. Umgekehrt kann die Sonde auf dem festen Träger vorgebunden sein (z. B. reverse dot blot). Die Hybridisierung erfolgt durch Inkontaktbringen der gebundenen Sonde mit einer Lösung,

10 welche die nachzuweisende Nukleinsäure enthält. Bei homogenen Testformaten werden z. B. Sondenpaare verwendet, die endständig energieübertragende Gruppen tragen und die über Co-Hybridisierung an die nachzuweisende Nukleinsäure in unmittelbaren Kontakt gebracht werden und dadurch ein Signal erzeugen.

Der Nachweis von Nukleinsäuren durch alleinige Sonden-Hybridisierung hat nur

15 begrenzte Sensitivität. So ist selbst mit empfindlichen Detektions-Markierungsgruppen wie ^{32}P , Digoxigenin, Biotin, Fluorescein, Ruthenium-Chelate, Fluorescein, Rhodamin oder AMCA allein nur eine Sensitivität in pg- bis fg-Bereich möglich. Zum empfindlichen Nukleinsäure-Nachweis gerade im medizinisch-diagnostischen Bereich sind jedoch Sensitivitäten im ag-Bereich und eine hohe Nachweisspezifität notwendig.

20 Dies gilt sowohl für den Nachweis von körperfremden Nukleinsäuren, z. B. in Form von Infektionserregern, als auch für den Nachweis der An- oder Abwesenheit oder Veränderung körpereigener Nukleinsäuren. Hohe Nachweissensitivität und Nachweisspezifität ist aber auch in den anderen genannten Anwendungsbereichen von hoher Wichtigkeit.

So müssen manche Infektionserreger, wie z. B. HCV, HIV und HBV schon in wenigen

25 Kopien nachgewiesen werden, um rechtzeitig erfolgreiche medizinische Interventionsmaßnahmen, z. B. durch frühzeitige Arzneimittelbehandlung, ansetzen zu können. Für solch frühzeitige Nachweise von Infektionserregen ist der Nachweis von Nukleinsäure-Sequenzen der Infektionserreger von Vorteil, da wegen der Verfügbarkeit von Nukleinsäure-Vervielfältigungstechniken (Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren) ein empfindli-

cher Nachweis schon in einer frühen Infektionsphase (Latenzphase) möglich ist. Die Möglichkeit der gezielten Vermehrung des nachzuweisenden Agens gibt es nur im Fall von Nukleinsäuren, nicht aber im Fall von immunologischen Nachweisverfahren. Bei diesen Verfahren ist eine Steigerung der nachzuweisenden Infektionserreger-5 spezifischen Partikel nur über die humorale Immunantwort über Bildung von entsprechenden Infektionserreger-spezifischen Antikörpern möglich; diese Immunantwort erfolgt jedoch erst nach Ablauf der Latenzzeit und ist eine Sekundärreaktion nach Infektion durch den Erreger. Daher hat der Nachweis über Nukleinsäure-Hybridisierung den Vorteil, daß z. B. der Infektionserreger direkt nach 10 Infektion und sehr empfindlich nachgewiesen werden kann.

Der Erfolg von medizinischen Interventionsmaßnahmen ist jedoch auch davon abhängig, daß der Infektionserreger nicht nur frühzeitig mit hoher Sensitivität, sondern auch sehr spezifisch nachgewiesen werden kann. Zur gezielten Behandlung ist daher eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Infektionserregern sowie die 15 Unterscheidung einzelner Subtypen oder Varianten wie, z. B. HIV-1 und HIV-2 oder z. B. HBV, HCV und HGV, von Bedeutung. Dabei ist aber auch entscheidend, daß quantitative Aussagen gemacht werden können und keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse erhalten werden, da solche falschen Ergebnisse u.U. gravierende therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen können. Dies setzt Richtigkeit und hohe 20 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse voraus. Daher muß der Nukleinsäure-Nachweis nicht nur sehr sensitiv, sondern auch sehr spezifisch und reproduzierbar sein. Der spezifische und sensitive Nukleinsäure-Nachweis muß auch rasch erfolgen, damit eine gezielte Therapie umgehend erfolgen kann.

Oftmals ist auch von Bedeutung, mehrere Infektionserreger wie z. B. HCV, HIV und 25 HBV nebeneinander nachzuweisen, z. B. im Rahmen von Blutbanken-Screeningtests. Dies erfolgt bei derzeit gängigen Nukleinsäure-Nachweistests durch hintereinander-geschaltete Einzelbestimmungen der nachzuweisenden Infektionserreger. Dies hat den Nachteil, daß mehrere Bestimmungen hintereinander durchgeführt werden müssen, was gerade beim Screening von großen Specimen-Stückzahlen nachteilig ist. Im Rahmen

dieser Nukleinsäure-Bestimmungen ist wünschenswert, sensitive und spezifische Testmöglichkeiten verfügbar zu haben, die z. B. eine rasche parallele Bestimmung mehrerer Infektionserreger nebeneinander in einer einzigen Probe ermöglichen (Multiplex-Bestimmung).

- 5 Beim Nachweis der An- oder Abwesenheit von körpereigener Nukleinsäure innerhalb bestimmter genomischer Loci und/oder deren Veränderungen, wie z. B. ererbte, spontane oder eine Mischung aus ererbten und spontanen Mutationen, Deletionen, Inversionen, Translokationen, Rearrangements oder Trippel-Expansionen in Form von spezifischen und/oder polymorphen Veränderungen, ist ebenfalls die Verfügbarkeit 10 spezifischer und sensitiver Nukleinsäure-Nachweisverfahren von Vorteil. Die Verfügbarkeit spezifischer und sensitiver Nukleinsäure-Nachweisverfahren ist jedoch auch in den anderen genannten Anwendungsbereichen von hoher Wichtigkeit.

Die bisherigen Testverfahren zum sensitiven und spezifischen Nachweis der An- oder Abwesenheit von Nukleinsäuren basieren auf der kombinierten Durchführung von 15 Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen (Nukleinsäure-Vermehrung) und Nukleinsäure-Nachweisreaktionen (Detektion).

Die nachzuweisende Nukleinsäure wird dabei in einer für die Vermehrungsreaktionen zugänglichen Form eingesetzt, z. B. in Form von unbehandeltem oder behandeltem Probenmaterial und/oder Probenmaterial-Konzentrierung, z. B. durch Adsorption des 20 unbehandelten oder behandelten Probenmaterials an die Oberfläche eines festen Trägers und anschließende Resorption von diesem festen Träger. Solche festen Träger sind z. B. feste Träger mit glashaltigen Oberflächen. Durch diese festen Träger erfolgt keine substantielle Reinigung und/oder Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren, sondern lediglich eine Probenmaterial-Konzentrierung und ggf. Inaktivierung und/oder 25 Eliminierung von Inhibitoren für die darauffolgenden Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktionen. Durch diese festen Träger ist auch die Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, in für die Nukleinsäure-Vermehrungs- und -Nachweis-Reaktionen zugänglichen Form möglich.

Andere Probenvorbereitungs-Verfahren enthalten gezielte Verfahrensschritte zur Nukleinsäure-spezifischen und/oder sequenzspezifischen Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. die Verwendung von festen Trägern mit Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen und/oder Nukleinsäure-Fangsonden zur selektiven Bindung und

5 Freisetzung der nachzuweisenden Nukleinsäure durch Nukleinsäure-spezifische Bindung und anschließende Dissoziation zwischen Bindungsgruppe und/oder trägergebundener Fangsonde und nachzuweisender Nukleinsäure. Bei dieser Art von festen Trägern sind Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppen und/oder Nukleinsäure-Fangsonden an der Oberfläche der festen Träger notwendig. Daher sind zur

10 Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, entweder mehrere feste Träger notwendig, was aufwendiger ist, oder feste Träger mit einer oder mehreren Bindungsgruppen und/oder mit multiplen oder mehreren Fangsonden. Multiple Fangsonden enthalten mehrere Bindungssequenzen für mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Diese Träger mit

15 mehreren Bindungsgruppen und/oder mehreren und/oder multiplen Fangsonden sind jedoch aufwendiger herzustellen. Ebenfalls sind die Reaktionsbedingungen zur gezielten Bindung mehrer nachzuweisender Nukleinsäuren an Träger mit mehreren Bindungsgruppen und/oder Fangsonden schwieriger einzustellen bzw. die Bindung mehrer nachzuweisender Nukleinsäurearten an eine Nukleinsäure-spezifische

20 Bindungsgruppe oder an eine Fangsonde mit mehreren komplementären Hybridisierungssequenzen schwieriger einzustellen.

Die Vermehrung und der Nachweis der bereitgestellten nachzuweisenden Nukleinsäuren erfolgt in heterogenen oder homogenen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisformaten. Die Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen und Detektionreaktionen können entweder

25 hintereinander (heterogene Testverfahren) oder gleichzeitig (homogene Testverfahren) erfolgen. Als Vermehrungsreaktionen werden entweder targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen, targetabhängige Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen oder Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet. Die Verwendung von Detektionssystemen zum Nachweis der vermehrten Nukleinsäuren erfolgt entweder über

30 den Einbau von Nukleotiden und/oder die Verwendung von markierten Primern oder

markierten Sonden. Die verwendeten Detektionssysteme enthalten entweder direkte oder indirekte Detektionsmarkierungen bzw. gekoppelte sekundäre und tertiäre Nachweiskomponenten. Die Detektion der vermehrten nachzuweisenden Nukleinsäuren kann jedoch auch durch spektroskopische oder physikalische Methoden erfolgen.

- 5 Die bisherigen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierten Signal-Nukleinsäure-Vermehrungreaktionen haben den Nachteil geringer Sensitivität wegen der nicht-exponentiellen Signalvermehrung, erhöhten Störanfälligkeit durch stärkere Tendenz zur Hintergrundsignalbildung durch die Vielzahl der Sondenkomponenten und der Bildung unspezifischer Detektionssignale, da nicht die nachzuweisende
- 10 Nukleinsäure selbst, sondern lediglich ein daran gekoppeltes Detektionssignal targetunabhängig vermehrt wird. Beispiele sind gekoppelte Signalkaskaden (z. B. SELF-Zyklus) oder signalgebende Sonden-Baum- oder -Bürstenstrukturen (z. B. branched DNA).

Die bisherigen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierten target-abhängigen Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen sind wegen der exponentiellen Signalvermehrung zwar sensitiver als die reinen Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren, haben aber wiederum den Nachteil der Bildung unspezifischer Detektionssignale, da nicht die nachzuweisende Nukleinsäure selbst, sondern lediglich ein davon in einer einleitenden targetabhängigen Primärreaktion abgeleitetes

- 15 Detektionssignal in Form eines Nukleinsäure-Reportermoleküls Targetsequenz-unabhängig enzymatisch vermehrt wird. Beispiele sind die Q β -Replikationsreaktion, bei der ein Q β -Reportermolekül enzymatisch vermehrt wird, oder die Ligase-Kettenreaktion, bei der Teilstücke der Nukleinsäure-Reportermoleküle sequenzunabhängig enzymatisch verknüpft werden.
- 20 Als Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der bisher sensitivsten und spezifischsten exponentiellen targetspezifischen Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie z. B. PCR (US-A-4,683,202 bzw EP-B-0 202 362), RT-PCR, NASBA (EP-A-0 329 822) oder TAM, wurden bisher jeweils einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte durch targetsequenzabhängige thermozyklische oder isotherme enzymatische

Elongation gegenläufige Primer, die sequenzspezifisch für die nachzuweisende Nuklein-
säure sind und an die Enden der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit (Amplikon) der
nachzuweisenden Desoxyribo- oder Ribo-Nukleinsäuren oder deren Komplemente
binden und somit die Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte begrenzen, erzeugt. Bei
5 diesen Elongationsreaktionen werden alle 4 Basenspezifitäten eingebaut.

Die genannten Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierter target-
spezifischer Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion sind wegen Targetsequenz-abhängiger
enzymatischer Nukleinsäure-Vermehrungszyklen am spezifischsten. Während lineare
targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen, wie z. B. die Cycling-Probe-
10 Reaktion, nur zu begrenzter Sensitivität führen, ergeben exponentielle targetspezifische
Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie Elongations-basierte Reaktionen wie z. B. die
Polymerase-Kettenreaktion (PCR, RT-PCR) oder Transkriptions-basierte Reaktionen
wie z. B. Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) oder Transcription
Mediated Amplification (TMA) bisher die sensitivsten und spezifischsten Signale.
15 Mischformen zwischen targetabhängiger Signal-Nukleinsäure-Vermehrung und target-
spezifischer Nukleinsäure-Vermehrung, wie z. B. die Gap-filling Ligase-Kettenreaktion
(gap-filling LCR, WO 90/01069), haben zwar gegenüber der nicht-modifizierten LCR
einen targetabhängigen Reaktionsschritt, dieser ist aber begrenzt auf limitierte Sequenz-
abschnitte bestehend aus lediglich 1 oder 2 Basenspezifitäten und damit limitierterer
20 Target-Spezifität.

Für den Nachweis der entstandenen Nukleinsäure stehen verschiedene Verfahren zur
Verfügung. Der Nachweis der gebildeten Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte über
Fragment- oder Sequenz-Gelanalyse ist zeitaufwendig und nicht quantitativ. Der Nach-
weis überträgergebundene Dot-, Slot- oder Reverse-Dot-Blot-Verfahren ist ebenfalls
25 zeitaufwendig und nicht quantitativ.

Quantitative sensitive und spezifische Bestimmungen der nachzuweisenden Nuklein-
säuren wurden bisher im Rahmen von heterogenen oder homogenen targetspezifischen
exponentiellen Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformaten möglich, bei denen das

Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt entweder durch eingebaute Label oder durch Hybridisierung mit einer für die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement spezifischen Sonde in einem Teil des durch Elongation entstandenen Sequenzabschnitts abgefangen wird. Exponentielle Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformate, bei 5 denen eine Interkalation von Nukleinsäure-bindenden Farbstoffen erfolgt, sind zwar auch sensitiv, aber nicht sequenzspezifisch.

Bei den heterogenen Reaktionsformaten wird das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt z. B. entweder über eine Primer-Fangmodifikation oder durch eine immobilisierte Fangsonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-10 Vermehrungsprodukts ist, auf einen festen Träger gebunden und über Einbau eines detektionsmarkierten Nukleotids, durch Hybridisierung mit einer detektionsmarkierten Sonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure- Vermehrungsprodukts ist, oder über eine Primer-Detektionsmodifikation nachgewiesen. In homogenen Reaktionsformaten erfolgte bisher der Nachweis z. B. über die 15 Hybridisierung einer Sonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist und die einen gequenchten Fluoreszenz-Label trägt, wobei die Targetsequenz-abhängige enzymatische Aufhebung der Quenchung durch die Primer-Elongationsbedingte Freisetzung des gequenchten Fluoreszenz- markierten Nukleotids erfolgt (WO92/02638).

20 Bei allen bisherigen quantitativen sensitiven und spezifischen heterogenen und homogenen targetspezifischen exponentiellen Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformaten wurden bisher Nukleinsäure-Vermehrungseinheiten (Amplikons) verwendet, die neben den spezifischen Primer- und Sonden-Bindungssequenzen zusätzliche Sequenzen variabler Länge zwischen den flankierenden Primer-Bindungssequenzen und der 25 internen Sonden-Bindungssequenz enthielten. Diese fünfgeteilte Amplikonsstruktur resultierte in Amplikonlängen größer als die Summe der Sequenzlängen der beiden flankierenden Primer und der internen Sonde zwischen vorzugsweise 100 und 1000 Basen(paaren). Optimierungen der Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion durch

verbesserte Enzymmischungen gingen bisher vielmehr hauptsächlich in Richtung längere Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte.

Kürzere Amplikonlängen wurden bisher lediglich zum Nachweis spezieller Sequenzen wie z. B. bei Tripletts-Expansionen, für In-situ-Untersuchungen oder den Nachweis stark 5 fragmentierter Nukleinsäuren im Rahmen der Altertumsforschung erzeugt. Diese kurzen Amplikon-Längen wurden jedoch in zeitaufwendigeren Gelformaten oder In-situ-Formaten detektiert, die durch mangelnde Sensitivität und/oder fehlende Quantifizierung gekennzeichnet sind. Andere spezielle kurze Sequenzen wie Short Tandem Repeats, Short Interspersed Repetitive Elements Microsatellite Sequences oder 10 HLA-spezifische Sequenzen wurden bisher lediglich als Primer- oder Sonden-Bindungssequenzen verwendet.

Die fünfgeteilten Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte haben den Nachteil, daß sie neben den spezifisch Primer und Sonde bindenden Sequenzen noch zusätzliche Sequenzen beinhalten, die das Amplikon verlängern und die Gesamtspezifität im 15 Hinblick auf die Spezifitäts-generierenden Primer- und Sonden-Bindungsreaktionen reduzieren.

Die bisher verwendeten längeren fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte haben ferner den Nachteil längerer Primer-Elongationszeiten und damit längere Gesamt-Testzeiten. Die Sensitivität ist auch begrenzt durch Plateaueffekte der beteiligten 20 Enzyme und Substrate, die bei längeren Amplikons früher erreicht werden. Ein weiterer Nachteil längerer Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte ist eine Kompetition zwischen Amplikon-Gegenstrang und Detektor- oder Fangsonde und somit reduzierter Sensitivität. Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte Möglichkeit der unspezifischen Bindung bedingt durch die zusätzlichen Sequenzen mit der Folge eines erhöhten 25 Hintergrunds und dadurch geringerer Sensitivität (geringeres Signal-Rausch-Verhältnis). Ein weiterer Nachteil bei der Bindung des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts an trägergebundene Fangsonden ist die sterische und kinetische Hinderung längerer Nukleinsäure-Moleküle; daher werden Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bisheriger Länge vor der Bindung durch die Fangsonde

vorzugsweise fragmentiert. Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Fragmentierung innerhalb der Amplikonsequenz und dadurch Zerstörung der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit; dies führt zu geringerer Reproduzierbarkeit. Ein weiterer Nachteil ist, daß längere Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bei niedrigen 5 Testtemperaturen von z. B. 37 °C, die bei gängigen Nukleinsäure-Analysegeräten vorgegeben sind, weniger spezifisch hybridisieren, da eine größere Differenz zur Schmelztemperatur besteht. Ein weiterer Nachteil von fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten ist beim Nachweis mehrerer verschiedener Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte, daß unterschiedliche Nukleinsäure-Vermehrungslängen gebildet 10 werden, die einen Multiplex-Nachweis erschweren.

Ziel der vorliegenden Erfindung war es, ein alternatives Nachweisverfahren für Nukleinsäuren bereitzustellen, welches Vorteile gegenüber den bisher beschriebenen Verfahren hat.

Eine spezielle Aufgabe der Erfindung bestand darin, ein targetabhängiges exponentielles 15 Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren zum hochsensitiven, hochspezifischen, reproduzierbaren und quantifizierbaren Nachweis einer oder mehrerer einzelsträngiger oder doppelsträngiger Nukleinsäuren bereitzustellen, welches insbesondere einen oder mehrere der genannten Nachteile vermeidet.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung war, unter Erhalt der Gesamtspezifität die Auswahl 20 der Primer- und Sondensequenzen so flexibel zu gestalten, daß eine Bestimmung mehrerer verschiedener nachzuweisender Nukleinsäuren in einem vereinheitlichten Reaktionsformat unter Verwendung von teilweise gleichen Primer- oder Sonden-Sequenzen möglich ist.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl von Amplifizaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an 25 eine erste Bindesequenz (A) eines Strangs der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine zweite Bindesequenz (C'), die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C dieses Stranges im wesentlichen komplementär

ist, binden kann, Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon binden kann, und Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß die zwischen 5 den Bindesequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon keine Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hieran gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören. Bevorzugt ist die Länge der Sonde gleich groß oder größer als die Sequenz B oder das Komplement B'.

10 Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zur Durchführung dieses Verfahrens.

In Fig. 1 ist schematisch die in der vorliegenden Beschreibung verwendete Bezeichnungsweise für die Bereiche auf der nachzuweisenden Nukleinsäure gezeigt.

In Fig. 2 ist die entsprechende Bezeichnungsweise für die intermediär gebildeten 15 Verlängerungsprodukte der Primer sowie die Amplifikate (Amplikons) gezeigt. Ebenfalls ist gezeigt, daß die Amplifikate ein oder mehrere weitere Bereiche Y aufweisen können, die außerhalb des Bereiches liegen, der die von der nachzuweisenden Nukleinsäure stammende Sequenzinformation enthält.

In Fig. 3 ist schematisch gezeigt, wie im Falle der vorliegenden Erfindung die Bindesequenzen der Primer und Sonde angeordnet sind. Es ergeben sich verschiedene 20 Alternativen I bis VI, je nachdem, ob und wie die Bindesequenzen überlappen. Es ist jeweils nur ein Strang des Amplifikats gezeigt. Dieselbe Anordnung (nur komplementär) kann für einen zweiten Strang des Amplifikats erstellt werden. Für die intermediär gebildeten Verlängerungsprodukte ergibt sich ein ähnliches Bild. Als Fall V 25 und VI ist der Fall gezeigt, daß die Sonde neben der Bindesequenz D noch weitere, nicht mit dem Amplifikat Basenpaarungen ausbildende Bereiche X enthält, die gleich oder verschieden sein können. Zum Vergleich ist der Fall des Standes der Technik als VII gezeigt.

In Fig. 4 sind Sequenzen der benutzten Bereiche eingezeichnet, nämlich A', B und C.

In Fig. 5 sind weitere bevorzugte Primer und Sonden gezeigt. Dabei ist insbesondere die Kombination mit der Sonde aus Zeile 3 bevorzugt.

5 In Fig. 6 und 7 sind auch noch Primer und Sonden gezeigt, die entweder unspezifisch sind oder bei denen keine Nukleotide zwischen Primer und Sonde übrig sind.

In Fig. 8 ist ein besonders kurzes Stück HCV-Genom gezeigt, mit dessen Hilfe kurze Amplicons hergestellt werden können.

Nukleinsäuren, welche mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen werden können, können beliebigen Ursprungs sein, beispielsweise Nukleinsäuren viroiden, 10 viralen, bakteriellen oder zellulären Ursprungs. Proben (specimen), in denen die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen oder deren Komplement enthalten sind, sind z. B. humane, tierische, bakterielle oder pflanzliche Flüssigkeiten, Exkreme, Abstriche, Zellsuspensionen, Kulturen oder Gewebs-, Zell- oder Flüssigkeits-Punktionen. Bevorzugt liegen die Nukleinsäuren in Lösung vor. Damit das erfindungsgemäße Verfahren 15 seine Vorteile voll entfalten kann, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, wenn die nachzuweisende Nukleinsäure eine Größe von mindestens 40 bp aufweist. Die Nukleinsäure kann auch eine durch Klonierung und in-vivo-Vermehrung hergestellte Nukleinsäure sein.

Die nachzuweisende Nukleinsäure kann einzelsträngig (insbesondere bei RNA) oder 20 ganz oder teilweise doppelsträngig (insbesondere bei DNA) sein. Für den Fall doppelsträngiger Nukleinsäuren können beide Stränge vermehrt werden oder aber auch nur einer. Aus beiden Sorten von Nukleinsäuren können einzel- oder doppelsträngige Amplifikate gebildet werden, wovon einer oder beide zum weiteren Nachweis verwendet werden können. Entsprechend wird die Sequenz der Sonde oder der Sonden 25 ausgewählt. Sie ist bevorzugt komplementär zu dem Strang des Amplifikats, der zum weiteren Nachweis verwendet wird.

Der Probe oder einer Kontrollprobe können positive oder negative Kontrollnukleinsäuren oder Quantifizierungsstandards zugesetzt sein, die ähnlich oder gleich behandelt werden wie die nachzuweisenden Nukleinsäuren (interner bzw. externer Standard, interne bzw. externe Kontrolle). Als Standards können beispielsweise interne oder 5 externe heterologe DNA- oder RNA-Standards, enthaltend zu den Sequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäuren homologe Primer-Bindesequenzen und zu Sequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäure heterologen Sonden-Bindesequenzen, verwendet werden. Umgekehrt ist aber auch die Verwendung von besonders im 3'-Priming- Bereich heterologen Primer-Bindesequenzen und homologen Sonden-Bindesequenzen 10 möglich. Als Negativ-Kontrollen werden bevorzugt analoge Specimen eingesetzt, welche die nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplement nicht enthalten.

Vor der Vermehrung wird die Probe bevorzugt einem oder mehreren Vorbehandlungsschritten unterzogen, um die nachzuweisenden Nukleinsäuren in eine 15 vermehrungsfähige Form zu bringen. In einem ersten optionalen Schritt findet eine Vorbehandlung der Probe (Specimen) statt, durch welche die Probe in eine Form gebracht wird, aus der die nachzuweisende Nukleinsäure in eine für die Überführung der vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrung geeignete Form gebracht wird (z. B. eine Abtrennung störender Bestandteile aus der Probe).

Die Art der Vorbehandlung der Probe hängt von der Art der Probe und der Komplexität 20 des biologischen Materials in der Probe ab. Bei humanen Körperflüssigkeiten, wie z. B. Human-Blut, erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform zunächst eine Abtrennung von Blutzellen zur Erzeugung von Plasma, Serum oder Blutzellkonzentraten. Durch diesen Trennschritt wird durch die Probenvorbehandlung die Komplexität des biologischen Probenmaterials in den resultierenden Fraktionen deutlich reduziert, ohne daß 25 eine substantielle Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäure erfolgt. Im Fall von Sputum oder Abstrichen erfolgt eine Probenvorbehandlung z. B. durch Suspendieren des Sputums bzw. des Abstrichs in einer Flüssigkeit, im Fall von Urin z. B. durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen. Im Fall von Gewebspunktionen erfolgt eine Probenvorbehandlung z. B. durch Suspendierung und

Behandlung mit einem Zellverbands-auflösenden Agens. Bei Cerebosidal-Flüssigkeit erfolgt die Probenvorbehandlung z. B. durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen. Auch in diesen Fällen erfolgt durch die Probenvorbehandlung eine Reduktion der Komplexität des biologischen Probenmaterials.

- 5 Danach kann sich ein Schritt anschließen, in dem die nachzuweisende Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrung zugängliche Form überführt wird. Dabei werden bevorzugt bekannte Methoden angewandt. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt in einem ersten Reaktionsschritt eine Lysebehandlung der vorbehandelten Probe zur Freisetzung der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. durch Proteinase
- 10 K-Behandlung bei erhöhten Temperaturen oder bei Desoxyribonukleinsäuren durch Alkali. In einem zweiten Schritt wird die durch Lyse vorbehandelte Probe nach Zugabe von chaotropen Agentien, wie z. B. Guanidinium-Hydrochlorid oder Harnstoff, in An- oder Abwesenheit von löslichen Alkoholen, wie z. B. Isopropanol, an die Oberfläche eines festen Trägers und anschließende Resorption von diesem festen Träger konzentriert. Solche festen Träger sind z. B. feste Träger mit glashaltigen Oberflächen (z. B. Magnetpartikel, Glasvließe mit glashaltigen Oberflächen, Partikel, Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäß, Dip-sticks oder miniaturisierte Reaktionskammern, die wiederum auch Teil von integrierten Reaktionschips sein können). Durch diesen festen Träger erfolgt bevorzugt eine nicht-sequenzspezifische Reinigung, d.h. keine substantielle
- 15 15 Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren von anderen Nukleinsäuren, sondern lediglich eine Probenmaterial-(Nukleinsäuren-)Konzentrierung und ggf. Inaktivierung und/oder Eliminierung von Inhibitoren für die darauffolgenden Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktionen. Durch diese festen Träger ist auch die Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäure, z. B. im Rahmen von
- 20 20 Multiplex-Verfahren, in für die Nukleinsäure-Vermehrungs- und -Nachweis-Reaktionen zugängliche Form möglich.

In einer anderen Ausführung kann die Überführung der nachzuweisenden Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe nach Nukleinsäure-Freisetzung in einem ersten Schritt durch z. B. Proteinase K-Behandlung bei erhöhten Temperaturen oder bei Desoxyribo-

nukleinsäuren durch Alkali erfolgen. In einem zweiten Schritt wird die lysierte vorbehandelte Probe zur Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure mit festen Trägern in Kontakt gebracht, die mit Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen und/oder Fangsonden spezifisch zur selektiven Bindung der nachzuweisenden

5 Nukleinsäure modifiziert sind, und anschließend die gebundene nachzuweisende Nukleinsäure durch Dissoziation zwischen Bindungsgruppe und/oderträgergebundener Fangsonde und nachzuweisender Nukleinsäure wieder eluiert. Beispiele für Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppen sind PNA-Homopyrimidin-Oligomere wie z. B. (T)₇-PNA oder Nukleinsäure-bindende niedermolekulare Substanzen wie z. B.

10 Nukleinsäure-Interkalatoren, Major groove-Binder oder Minor groove-Binder. Beispiele für Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind Nukleinsäure-Oligomere oder Nukleinsäure-Polymere mit Bindungssequenzen für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Weitere Beispiele für Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind PNA-Oligomere mit Bindungssequenzen für eine

15 oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Die Bindung der Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen oder der Fangsonden an den festen Träger kann mit oder ohne Zwischenschaltung von Abstandshaltern (Spacern) entweder kovalent oder über Bindungspaares, wie z. B. Biotin:Streptavidin oder Ni:Chelat, erfolgen.

Die zur Vermehrung eingesetzten Nukleinsäuresequenzen können linear oder zirkulär

20 sein und können Sequenz-Modifikationen und/oder sonstige Modifikationen, wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon, enthalten oder methyliert, gecappt, polyadenyliert oder in sonstiger Weise modifiziert sein. Die zur Vermehrung eingesetzten Nukleinsäuren oder deren Komplement können natürlichen Ursprungs sein,

25 fragmentiert, modifiziert oder enzymatisch, z. B. mit dem Enzym Uracil-Deglykosylase (UNG), oder physikalisch vorbehandelt, vorvermehrt, oder chemisch, photochemisch oder enzymatisch erzeugt sein, z. B. durch chemische Oligonukleotidsynthese oder in-vitro-Replikation, in-vitro-Reverse Transkription oder in-vitro-Transkription.

In dem ersten essentiellen Verfahrensschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Teilstück der nachzuweisenden Nukleinsäure amplifiziert. Im folgenden wird dieses Teilstück auch Amplikon genannt. Dieses enthält zwingend den Sequenzbereich zwischen den äußeren Enden der Bindesequenzen A und C' bzw. des Komplements

5 davon der Primer, und enthält den Bindebereich E der Sonde bzw. das Komplement davon. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Amplikon (bevorzugt die Gesamtlänge der Sequenzen der Bereiche A, B und C) bevorzugt kürzer als 100 Nukleotide, besonders bevorzugt kürzer als 60 Nukleotide, jedoch bevorzugt länger als 40 Nukleotide. Dies bedeutet jedoch nicht, daß die Gesamtlänge der Amplifikate nicht

10 doch größer sein kann, z. B. wenn die Primer zusätzlich Nukleotide aufweisen. Es werden solche Vermehrungsmethoden eingesetzt, die eine Vermehrung der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz oder deren Komplement erlauben, die in der Bildung von Tripartite-Mini-Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten münden. Hierfür stehen prinzipiell alle Nukleinsäureamplifikationsverfahren zur Verfügung, die im Stand

15 der Technik bekannt sind. Bevorzugt werden targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet. Besonders bevorzugt werden theoretisch exponentielle targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet, bei denen eine antiparallele Replikation der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement erfolgt, wie z. B. Elongations-basierte Reaktionen wie z. B. die

20 Polymerase-Kettenreaktion (PCR für Desoxyribonukleinsäuren, RT-PCR für Ribonukleinsäuren) oder Transkriptions-basierte Reaktionen wie z. B. Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) oder Transcription Mediated Amplification (TMA). In besonderer Weise bevorzugt werden thermozyklische exponentielle Elongations-basierte Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie z. B. die Polymerase-

25 Kettenreaktion verwendet. Die zur Vermehrung eingesetzten nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplement können in Form von einzelsträngigen oder doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäuren oder Ribonukleinsäuren vorliegen. Ziel der Vermehrungsreaktion (Amplifikation) ist die Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks der nachzuweisenden Nukleinsäure. Unter einem

30 Amplifikat wird daher jede unter Verwendung von Sequenzinformation der

Nukleinsäure hergestellte Molekülspezies verstanden. Insbesondere handelt es sich um Nukleinsäuren. Der Begriff "Amplifikat" beinhaltet sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Nukleinsäuren. Ein Amplifikat kann neben den die Sequenzinformationen der zugrunde liegenden Nukleinsäure enthaltenden Bereichen 5 (Amplikon) außerhalb der voneinander wegweisenden Enden der Primerbindungsstellen noch weitere Bereiche enthalten, welche nicht in direkter Relation mit Sequenzen der zu amplifizierenden Nukleinsäure stehen. Bevorzugt kommen gerade solche Sequenzen einer Länge von mehr als 15 Nukleotiden nicht auf der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement vor und können mit dieser nicht durch direkte Basenpaarung 10 hybridisieren. Amplifikate können somit entweder mit der nachzuweisenden Nukleinsäure selbst oder mit deren Komplement hybridisieren. Amplifikate sind beispielsweise auch die Produkte einer asymmetrischen Amplifikation, d. h. einer Amplifikation, bei der die beiden Stränge in unterschiedlicher Menge gebildet werden (z. B. durch Einsatz unterschiedlicher Mengen an Primern) oder einer der beiden 15 Stränge wieder zerstört wird (z. B. durch RNase).

Unter einem Primer im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein Molekül verstanden, welches über Basenpaarungen an eine Nukleinsäure binden kann und welches, bevorzugt enzymatisch, verlängert werden kann. Bevorzugt sind Oligonukleotide, die an ihrem 3'-Ende unter Verwendung der nachzuweisenden Nukleinsäure oder einem 20 Komplement hiervon als Templatnukleinsäure verlängert werden können. Als Primer können monovalente oder multivalente oder monofunktionelle oder multifunktionelle Agentien eingesetzt werden, die eine Nukleinsäure-abhängige Elongation zulassen. Bevorzugt können als Primer Oligomere oder Polymere einer Bindelänge von zwischen 9 und 30 nt verwendet werden, die an die nachzuweisende Nukleinsäure antiparallel 25 binden und die als einer von mehreren Reaktionspartnern für eine enzymatische Replikation der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement wirken. Besonders bevorzugt werden als Primer Oligomere verwendet, die nach Zugabe eines Vermehrungsreagenzes durch Anlagerung zumindest eines Teils des Primers an die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement eine gerichtete Replikation einer 30 oder beider Stränge der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement

initiieren. Ein Beispiel für einen besonders bevorzugten Primer ist ein Oligonukleotid mit einem freien 3'-Hydroxyl-Ende.

Die als Primer eingesetzten Agentien können eine oder mehrere Bindesequenzen für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren oder deren Komplement enthalten 5 und können Sequenz-Modifikationen, endständige und/oder interne Sequenzergänzungen und/oder sonstige Modifikationen wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloge oder Äquivalente davon, nicht funktionelle Nukleotidanaloge oder Äquivalente davon oder Basen-Analoge oder Äquivalente davon enthalten oder methyliert, gecappt oder polyadenyliert oder in sonstiger Weise 10 modifiziert sein. Erforderlich ist, daß sie die geforderten Bindeeigenschaften zur nachzuweisenden Nukleinsäure bzw. ihrem Komplement haben und verlängerbar sind. Bevorzugte Nukleotid-Äquivalente sind PNA-Monomere bzw. PNA-Oligomere (WO92/20702) mit oder ohne positive und/oder negative Ladungen im Rückgrat 15 und/oder im Abstandshalter. Die als Primer eingesetzten Agentien können Modifikationen tragen, die entweder direkt oder indirekt über ein weiteres Bindungspaar zur Detektion und/oder Bindung an einen festen Träger geeignet sind. Bevorzugte 20 Primer-Modifikationen sind die Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Fluorescein, Rhodamin, AMCA oder Derivate davon, einen der Partner in einem der Bindungspaares Biotin:(Strept-)Avidin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin 25 gekoppelt mit Äquorin, Fluorescein: Anti-Fluorescein oder Ruthenium- oder Rhenium-Chelat oder Äquorin. Eine besonders bevorzugte Primer-Modifikation ist Biotin als Fang- oder Detektions-Modifikation. Die Primer können weitere Sequenzbereiche Y enthalten, insbesondere an ihrem 5'-Ende (Fig. 2). Hier sind sowohl 5'-3'-Verknüpfungen als auch 5'-5'-Verknüpfungen und/oder 5'-2'-Verknüpfungen möglich. 30 Außerdem können sie zusätzliche Strukturkomponenten, wie z. B. Abstandshalter, immobilisierbare Gruppen oder Löslichkeits-vermittelnde Molekülteile oder im Hinblick auf Primingaktivität aktivierbare Bereiche haben, wie z. B. AP-Stellen.

Unter einer Sonde wird ein Molekül verstanden, welches aufgrund von Basen-Basen-Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren hybridisieren kann. Bevorzugte Sonden sind

daher Oligonukleotide sowie basenhaltige Nukleinsäuremimetica, wie Peptidnukleinsäuren (PNA). Die Länge einer Sonde beträgt, bezogen auf die Bindesequenz D, bevorzugt zwischen 9 und 30 Basen.

PNA-Oligomer-Sonden mit oder ohne positive oder negative Ladungen im Rückgrat 5 und/ oder Abstandshalter haben die zusätzlichen Vorteile, daß sie stabil sind gegenüber dem Abbau von Nukleasen oder Proteasen wegen der verschiedenen Struktur des Rückgrats und der H- bzw. NH₂-Enden, einen höheren Schmelzpunkt in Bindungskomplexen zwischen Nukleinsäuren und PNA als zwischen zwei Nukleinsäure-Molekülen aufwiesen und der Hybridkomplex dadurch stabiler ist, bei niedrigen Salz- 10 konzentrationen anwendbar sind, eine höhere Differenz der Schmelzpunkte bei Fehlpaarungen aufwiesen und somit eine bessere Fehlpaarungs-Diskriminierung möglich ist, Sequenzen mit Sekundärstrukturen bei niedrigen Salzkonzentrationen zugänglicher sind, die Kompetition zwischen Amplikon-Gegenstrang und Sonde 15 geringer ist bei niedrigen Salzkonzentrationen und dadurch eine höhere Signalausbeute erreicht wird und das Potential zur Eliminierung des Amplikon-Denaturierungsschritts bei niedrigen Salzkonzentrationen besteht.

Als Sonden können monovalente oder multivalente Agentien eingesetzt werden, die eine Bindung vermehrungsabhängiger Elongationsprodukte und/oder vermehrter Nukleinsäuresequenzen zulassen. Bevorzugt können als Sonden Oligomere oder 20 Polymere verwendet werden, die an die nachzuweisende Nukleinsäure antiparallel binden. Besonders bevorzugt werden als Sonden Oligomere verwendet, die durch Anlagerung zumindest eines Teils der Sonde an die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement eine im Rahmen der Folgereaktionen stabile Bindung an einen oder beide Stränge der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement herbeiführen. 25 Die Oligomere können sowohl 5'-3'-Verknüpfungen als auch 5'-5'-Verknüpfungen und/oder 5'-2'-Verknüpfungen sowie zusätzliche Strukturkomponenten, wie z. B. Abstandshalter oder Löslichkeits-vermittelnde Molekülteile, enthalten.

Unter einer Bindesequenz wird bevorzugt die Sequenz von Basen verstanden, die zwischen den äußersten, mit einer bestimmten Nukleinsäure, einem Primer oder einer Sonde über Basen-Basen-Wechselwirkung bindenden Basen einer bestimmten Nukleinsäure, einem Primer oder einer Sonde liegt, einschließlich dieser äußersten Basen.

- 5 Die als Sonde eingesetzten Agentien können eine oder mehrere Bindesequenzen D für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren oder deren Komplement, insbesondere jedoch für einen Strang des Amplifikats enthalten und können Sequenz-Modifikationen, endständige und/oder interne Sequenzergänzungen und/oder sonstige Modifikationen wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon, nicht funktionelle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon enthalten oder methyliert, gecappt oder polyadenyliert oder in sonstiger Weise modifiziert sein, solange die Bindung an einen Strang des Amplifikats möglich ist. Bevorzugte Nukleotid-Äquivalente sind PNA-Monomere bzw. PNA-Oligomere mit oder ohne positive und/oder negative Ladungen im Rückgrat
- 10 15 und/oder Abstandshalter. Die als Sonden eingesetzten Agentien können Modifikationen tragen, die entweder direkt oder indirekt über ein weiteres Bindungspaar zur Detektion und/oder Bindung an einen festen Träger geeignet sind. Bevorzugte Sonden-Modifikationen (nachweisbare Gruppen L, immobilisierbare Gruppen I) sind die Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Fluorescein, Rhodamin, AMCA oder Derivate davon,
- 20 Bindungspaare Biotin:(Strept-)Avidin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin gekoppelt mit Äquorin, Fluorescein:Anti-Fluorescein oder Ruthenium-Chelat oder Äquorin. Besonders bevorzugte Sonden-Modifikation sind Biotin als Fang- oder Detektions-Modifikation, Digoxigenin, Ruthenium- oder Rhenium-Chelat oder Äquorin als Detektions-Modifikationen.
- 25 In der vorliegenden Erfindung wird das Teilstück der Nukleinsäure, von welchem eine Vielzahl von Amplifikaten hergestellt werden soll, so ausgewählt, daß es drei Bereiche A, B und C enthält. Die Bereiche A und C sind Bereiche, die so gewählt werden, daß einer der Primer die Sequenz A als Bindesequenz benutzen kann und das Komplement des Bereiches C als Bindesequenz für den anderen Primer dienen kann. Unter einem

Komplement wird im Sinne der vorliegenden Erfindung eine zu einer bestimmten anderen Nukleinsäure, z. B. einem Sequenzbereich z. B. eines Amplifikats oder der nachzuweisenden Nukleinsäure im wesentlichen komplementäre Nukleinsäure oder Nukleinsäuresequenz verstanden.

5 Im wesentlichen komplementär bedeutet, daß die Basenpaarungen so gewählt sind, daß (für den Fall, daß eine Hybridisierung mit einer anderen Nukleinsäure, z. B. einer Sonde oder einem Primer) eine Hybridisierung unter den Testbedingungen noch erfolgen kann bzw. (für den Fall eines Verlängerungsprodukts eines Primers im Verhältnis zu dem eingesetzten Templat) die Nukleinsäure aufgrund einer Primerverlängerungsreaktion

10 unter Verwendung der entsprechenden Nukleinsäure gebildet werden konnte. Im wesentlichen komplementär bedeutet daher oft, daß unter stringenten Bedingungen mehr als 90 % der Basen der betrachteten Nukleinsäure bzw. Sequenz mit der bestimmten Nukleinsäure bzw. Sequenz Basenpaarungen ausbilden.

Die Bereiche A und C sind erfindungsgemäß bevorzugt so lang, daß Bedingungen

15 gefunden werden können, bei denen Primer einer entsprechenden Länge mit den Basen in diesen Bereichen hybridisieren können. Daher sind die Bereiche bevorzugt länger als 8, besonders bevorzugt länger als 12 Nukleotide. Auch bezüglich der Obergrenze der Länge der Bereiche A und C ergeben sich im Sinne der Erfindung bevorzugte Bereiche.

Die Bereiche A und C sind jeweils bevorzugt kleiner als 30, besonders bevorzugt

20 kleiner als 20 Nukleotide. Die Länge der Bereiche wird in einem besonderen Aspekt der Erfindung dadurch nach oben begrenzt, daß die Primer in für die nachzuweisende Nukleinsäure unspezifischer Weise daran hybridisieren können sollen. Daher ist die besonders bevorzugte Länge der Bindesequenzen A und C 12 bis 20 Nukleotide. Die Bereiche A und C auf der nachzuweisenden Nukleinsäure überlappen nicht miteinander.

25 Im Sinne der Erfindung enthalten das Teilstück der nachzuweisenden Nukleinsäure (welches dem Amplikon entspricht) und somit die hieraus gebildeten Amplifikate eine zwischen den Bereichen A und C gelegene Sequenz B (Fig. 1 bis 3). Diese Sequenz hat eine Länge von ein oder mehr Nukleotiden, bevorzugt mehr als 4, besonders bevorzugt mehr als 8 Nukleotide. Nach oben hin ist die Länge der Sequenz B durch die geforderte

Nichtanwesenheit von Nukleotiden, die nicht der Bindesequenz der Sonde zugehören, und in einem besonderen Aspekt der Erfindung durch die gewünschte Unspezifität der Sonde begrenzt. Besonders bevorzugt ist die Sequenz B daher kleiner als 30, besonders bevorzugt kleiner als 15 Nukleotide. Die Sequenz B hat bevorzugt eine Länge von 5 zwischen 4 und 15 Nukleotiden. Diese Sequenz oder das Komplement davon dienen im Sinne der Erfindung mit zur Bindung der Sonde. Die Länge der Sonde wird so gewählt, daß eine Hybridisierung mit dem Amplifikat möglich ist. Die Sequenz der Sonde wird so gewählt, daß sie eine Bindesequenz D enthält, welche durch die mit dem Amplikon Basen-Basen-Wechselwirkung ausbildenden Nukleotide der Sonde, insbesondere den 10 zwischen den äußersten mit korrespondierenden Basen des Amplikons Basenwechselwirkung ausbildenden Nukleotide der Sonde definiert ist. Bevorzugt ist die Sonde im wesentlichen komplementär zu den Nukleotiden der Bindesequenz E des Amplifikats. Die Bindesequenz D bzw. deren Komplement D' kann zu dem Amplifikat zu 100 % komplementär sein, aber auch Mismatche (Fehlpaarungen) zwischen den äußeren Enden 15 der Bindesequenz aufweisen. Die Sonde kann neben der Bindesequenz weitere Gruppen oder Reste oder auch Nukleinsäure-bindende Bereiche enthalten (Fig. 3, V, VI).

Abhängig von der Länge des Bereiches B und der Länge der Bindesequenz D bzw. D' lassen sich unterschiedliche Fallgestaltungen treffen. In einem ersten Fall ist die Bindesequenz D oder D' länger als der Bereich B bzw. B' des Amplikons. In diesem Fall 20 reicht die Bindesequenz D bzw. D' in einen oder beide Bereiche A bzw. A' und C bzw. C' des Amplikons hinein. Diese Fälle sind in Fig. 3, II bis IV gezeigt. In diesen Fällen enthält das Amplifikat zwischen den voneinander wegweisenden Enden der Bereiche A und C keine Nukleotide, die nicht der Bindesequenz E oder den Bindesequenzen der 25 Primer zugehören. Die Bindesequenz D der Sonde überlappt in Fig. 3, II und III mit einer der beiden Bindesequenzen der Primer.

In einem weiteren Fall entspricht die Länge des Bereiches B der Länge des Bereiches D, so daß die Bindesequenz der Sonde nicht mit den Bindesequenzen der Primer überlappt (Fig. 3, I).

Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet in einer bevorzugten Ausführungsform die Bildung von dreiteiligen Mini-Amplikons (Tripartite-Mini-Amplikon), die neben den Primer und Sonde bindenden Sequenzen keine zusätzlichen Sequenzen aufweisen und somit die Nachteile bei Bildung von längeren Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten

5 vermeiden, wobei andererseits die Spezifität des gesamten Amplifikationsformats durch Bindung der Primer, durch Bindung der Sonde und durch Ablauf der targetabhängigen enzymatischen Elongationsreaktion mit allen 4 Nukleotid- bzw. Basenspezifitäten oder natürlicher oder artifizieller Analoga, Isomere oder Äquivalente davon aber sichergestellt wird. Das erfindungsgemäße Vermehrungsverfahren wird daher auch als

10 Mini-Chain-Reaction (MCR) bezeichnet.

Die Vermehrung der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen oder deren Komplement erfolgt, wenn im folgenden nichts anderes ausgesagt ist, unter Befolgung der dem Fachmann bekannten Reaktionsschritte und Reaktionsbedingungen. Ein Unterschied zu den herkömmlichen Verfahren ist der Einsatz der speziell ausgewählten Primer und

15 Sondensequenzen, welche die Bildung und Vermehrung des Mini-Tripartite-Amplikons erlauben. Wesentlich im Sinne der Erfindung ist die Zugabe eines oder mehrerer Primer, die an die Primer-Bindesequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäure, des Tripartite-Mini-Amplikons beziehungsweise deren Komplemente binden.

Allgemein üblich ist die Zugabe zur Vermehrung befähigender Vermehrungsreagentien.

20 Bevorzugt können als Vermehrungsreagentien enzymatisch aktive Komponenten (z. B. Enzyme) in Kombination mit Elongationssubstraten und geeignete Hilfsreagentien (wie Puffer) verwendet werden. Bevorzugte Elongationssubstrate sind Nukleinsäurebausteine oder natürliche oder artifizielle Analoga oder Isomere oder Äquivalente davon. Als Elongationssubstrate werden Agentien eingesetzt, die zum

25 Aufbau eines Gegenstrangs der nachzuweisenden Nukleinsäure in gegenläufiger Form geeignet sind. Bevorzugt werden als Elongationssubstrate Nukleotide eingesetzt. Bevorzugte Nukleotide sind dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP, dITP, iso-dGTP, iso-dCTP, deaza-dGTP und ATP, GTP, CTP, UTP und/oder ITP, deazaGTP, iso-GTP, iso-CTP. Äquivalente sind PNA-Monomere bzw. PNA-Oligomere mit oder ohne

positive und/oder negative Ladung im Rückgrat und/ oder im Abstandshalter. Die Elongationssubstrate können, wie oben ausgeführt, Modifikationen tragen.

Besonders bevorzugt werden im Fall der PCR als Nukleinsäure-Vermehrungsreagentien Mischungen aus meta- oder thermostabilen enzymatischen DNA-Polymerasen und

- 5 Mischungen von Desoxyribo- und/oder Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagenzien verwendet, z. B. Taq-DNA Polymerase in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien. Besonders bevorzugt werden im Fall der RT-PCR als Vermehrungsreagentien Mischungen aus thermostabilen enzymatischen Reverse Transkriptase- und DNA-Polymerase-
- 10 Aktivitäten und Mischungen von Desoxyribo- und Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagentien verwendet, z. B. Mischungen aus AMV oder Mo-MLV-Reverse Transkriptase oder Tth-DNA Polymerase in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und ATP, GTP, CTP, UTP und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien.
- 15 Bei den thermozyklischen Vermehrungsreaktionen (z. B. PCR, RT-PCR) werden 2- oder 3-phasige Zyklen durchgeführt, bevorzugt 2-phasige Zyklen. Bei den 2-phasigen Zyklen wird die Strangtrennung der Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bei hoher Temperatur, bevorzugt 85 °C - 95 °C, durchgeführt, das gemeinsame Primer-Annealing und Primer-Elongation bei Temperaturen nahe dem Schmelzpunkt zwischen Primer und
- 20 Elongationsgegenstrang, bevorzugt zwischen 55 °C und 75 °C. Die Strangtrennung erfolgt durch Energiezufuhr und/oder enzymatisch, bevorzugt durch erhöhte Temperatur, Mikrowellen oder das Anlegen einer Spannung über eine Mikroelektrode, besonders bevorzugt durch erhöhte Temperatur. Es werden bis zu 60 Thermozyklen durchgeführt, bevorzugt 32 - 42. Bei den isothermen Vermehrungsreaktionen wird eine kontinuierliche Inkubation bei einer mittleren Temperatur zwischen 30 °C und 70 °C durchgeführt, bevorzugt bei 37 °C - 45 °C mit Enzymmischungen bzw. 60 °C - 65 °C mit mesothermen Enzymmischungen. Es wird bis zu 2 Stunden inkubiert, bevorzugt 30 - 60 Minuten. Die Vermehrungsreaktion kann in Reaktionsgefäß, Kapillaren oder

miniaturisierten Reaktionskammern erfolgen, die auch Teil eines integrierten Reaktionschips sein können.

Bei Verwendung von dUTP anstelle von oder in Ergänzung zu dTTP wird durch die DNA-Polymerase-Aktivität dUMP anstelle von dTMP in die vermehrte Nukleinsäuresequenz oder deren Komplement eingebaut. Dies erlaubt durch Inkubation mit der Enzymaktivität Uracil-Deglycosylase, bevorzugt mit einer thermolabilen Ausführungsform der Enzymaktivität, bei der die Renaturierung nach thermischer Denaturierung der Enzymaktivität langsamer erfolgt, die Fragmentierung des Vermehrungsprodukts und somit seiner Eigenschaft als Nukleinsäure-Vermehrungseinheit. Die Inkubation des UMP-haltigen Vermehrungsprodukts kann im Anschluß an die Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktion (Sterilisierung) und/oder vor einer erneuten Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion (Carry over-Prävention) erfolgen.

Alternativ können auch Psoralen und/oder Isopsoralen und Derivate davon und Bestrahlung mit UV-Licht zur funktionellen Inaktivierung des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts verwendet werden.

Im Fall von NASBA und TMA können als Nukleinsäure-Vermehrungsreagentien bevorzugt Mischungen aus metastabilen enzymatischen Reverse Transkriptase-, DNA-Polymerase, RNase H und RNA-Polymerase und Mischungen von Desoxyribo- und Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagentien verwendet werden, z. B. eine Mischung aus AMV oder Mo-MLV-Reverse Transkriptase, ggf. E. coli DNA-Polymerase, ggf. E. coli RNase H und T7-, T3- oder SP6-codierte RNA-Polymerase oder Mo-MLV Reverse Transkriptase und T7-, T3- oder SP6-RNA-Polymerase oder entsprechende mesostabile Enzyme, z. B. aus *Bacillus stearothermophilus* in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und ATP, GTP, CTP, UTP, und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien. Der Reaktionsverlauf der Vermehrungsreaktion bei NASBA, TMA ist isotherm.

Der Nachweis der Bildung der Amplifikate erfolgt mit der Sonde, die an die Bindesequenz B des Amplikons zu einem Hybrid bindet. Die Sonde kann als Fang- oder

Detektionssonde fungieren. Die Enden der Bindesequenz der Sonde liegen zwischen den äußereren Enden der Primer-Bindesequenzen. Die Sonde ist somit hybridisierbar mit einem Strang des Amplifikats.

Die Bindung der Sonde kann unter Benutzung bekannter Bedingungen geschehen. Denn 5 bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit experimentelle Details im folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins, IRL Press, 1986, z. B. in den 10 Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Ed. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, und Molecular Cloning, Ed. J. Sambrook et al., CSH, 1989, Bezug genommen. Zu den bekannten Methoden gehört auch die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden und die 15 Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die vom Ausmaß der Homologie zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt.

Hierzu wird, wenn die Fangsonde (in geschützter Form) nicht schon vorher zugegeben wurde, die Sonde zu der Reaktionsmischung nach der Vermehrungsreaktion, bevorzugt 20 in Form einer Lösung, zugegeben. Dabei werden Reagenzbedingungen eingestellt, die eine Hybridisierung der Sonde mit einem Amplifikat erlauben.

Die Bindung zwischen der vermehrten Nukleinsäuresequenz des Amplikons und/oder dessen Komplement und der Sonde erfolgt bevorzugt bei einer konstanten Temperatur zwischen 20 °C und 75 °C, bevorzugt um 0 °C - 30 °C, besonders bevorzugt um 0 °C - 25 15 °C unterhalb der Schmelztemperatur des Bindekplexes. Die Inkubationszeit beträgt bis zu 4 Stunden, bevorzugt 15 - 120 Minuten, besonders bevorzugt 30 - 60 Minuten. Die Bindung mit dem Amplifikat und/oder dessen Komplement erfolgt mit oder ohne vorausgehenden Denaturierungsschritt. Die Reaktionsführung ohne vorausgehenden Denaturierungsschritt erfolgt bevorzugt mit PNA-Oligomeren mit oder

ohne negative und/oder positive Ladungen im Rückgrat und/oder im Abstandshalter bei niedrigen Salzkonzentrationen.

Bei Verwendung mehrerer Sonden oder multifunktionaler Sonden oder Sonden, die mehrere Bindesequenzen für Amplifikate verschiedener nachzuweisenden

- 5 Nukleinsäuren oder deren Komplemente aufweisen, können mehrere unterschiedliche Amplifikate oder deren Komplemente gebunden werden. Dabei erlaubt die Bildung von Tripartite-Mini-Amplikons bevorzugt ähnlicher Länge, besonders bevorzugt solcher Tripartite-Mini-Amplikons gleicher Länge, bei der Nukleinsäurevermehrung die Einstellung vereinheitlichter Inkubationsbedingungen für die Bildung der
- 10 unterschiedlichen Bindekomplexe. Dies erlaubt den parallelen und/oder sequentiellen Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen im Rahmen von Multiplex-Verfahren.

Der Nachweis des gebildeten Bindekomplexes zwischen Amplifikat und Sonde kann in für den Fachmann bekannten Verfahren, insbesondere in verschiedenen Ausführungsformen erfolgen, nämlich direkten Nachweisverfahren, wie z. B. mit spektroskopischen 15 oder physikalischen Methoden, durch Sequenzierung oder durch heterogene oder homogene Nachweisformate.

Direkte spektroskopische oder physikalische Verfahren sind z. B. Schmelztemperaturbestimmungen, Anlagerung von interkalierenden oder Nukleinsäure-bindenden Farbstoffen oder Metallatomen oder -partikeln, Massenspektroskopie, Oberflächen-20 Plasmonenresonanz oder Fluoreszenz-gekoppelte Oberflächen-Plasmonenresonanz, oder E-wave-Messungen.

Die Sequenzierung des gebundenen Tripartite-Mini-Amplikons kann über Bindung des Primers und anschließende enzymatische Sequenzierung nach Sanger erfolgen. Zur Detektion der Sequenzierungsprodukte ist bevorzugt entweder der Primer markiert oder 25 die Kettenabbruchreagentien. Die Sequenzierungsprodukte können auch über Massenspektroskopie nachgewiesen werden. Bei Zugabe lediglich limitierter Nukleotidarten entsprechend den flankierenden Nukleotiden am Primerende ist eine Minisequenzierung möglich, was besonders für die Analyse von Polymorphismen von Vorteil ist.

Bei den heterogenen Nachweisverfahren kann die Sonde abhängig von der angebrachten Modifikation entweder als Fangsonde oder als Detektorsonde verwendet werden. Bei Verwendung mehrerer Sonden sind Multiplexformate realisierbar.

Bei Verwendung der Sonde als Fangsonde kann die Sonde entweder an dem festen

5 Trägerkovalent oder über ein Bindungspaar vorgebunden sein und die Bildung des Bindekomplexes zwischen Amplifikat und der Sonde erfolgt auf dem festen Träger. Bei dieser Ausführungsform können neben festen Trägern, die eine Sondenart enthalten, auch feste Träger realisiert werden, die mehrere bzw. eine Vielzahl von Sondenarten enthalten, wie z. B. Sonden-Teststreifen, Sonden-Panels oder Sonden-Arrays auf festen

10 Trägern oder miniaturisierten Chips, die wiederum auch Teil von integrierten Reaktionschips sein können. Diese trägergebundenen Nachweissysteme sind besonders geeignet für Multiplexformate. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Komplex zwischen Amplifikat und Fangsonde in Lösung erst vorgebildet und anschließend auf den festen Träger aufgebracht. Hierzu enthält das Amplikon bevorzugt

15 eine immobilisierbare Gruppe I, die an eine an einer Festphase befindlichen Gruppe R binden kann.

Die Art der Festphase richtet sich nach der zur Immobilisierung befähigenden Gruppe I. Bevorzugt weist sie eine immobilisierende Gruppe R auf, die eine bindende Wechselwirkung mit I eingehen kann. Ist die immobilisierbare Gruppe beispielsweise ein

20 Hapten, dann kann eine Festphase verwendet werden, die an ihrer Oberfläche Antikörper gegen dieses Hapten aufweist. Ist die immobilisierbare Gruppe ein Vitamin, wie z. B. Biotin, dann kann die Festphase bindende Proteine wie Avidin oder Streptavidin immobilisiert enthalten. Besonders bevorzugte Reste I und R sind Biotin und Streptavidin. Die Immobilisierung über eine Gruppe an der modifizierten

25 Nukleinsäure ist besonders vorteilhaft, da sie unter milderer Bedingungen stattfinden kann als beispielsweise Hybridisierungsreaktionen. Bevorzugt wird zur Immobilisierung der gebildeten Nukleinsäuren die Reaktionsmischung vor, während oder nach Bildung der Nukleinsäurehybride in ein Gefäß gefüllt, welches an seiner Oberfläche mit der immobilisierbaren Gruppe reagieren kann. Es ist möglich, eine Festphase in Form eines

porösen Materials, wie einer Membran, eines Gewebes oder eines Vlieses, zu verwenden, auf welche die Reaktionsmischung aufgegeben wird. Ebenso ist die Verwendung von Perlen, sogenannten beads - z. B. Magnetpartikeln oder Latex-Partikeln - möglich. Das Gefäß ist bevorzugt eine Küvette, ein Röhrchen oder eine 5 Mikrotiterplatte. Die feste Phase sollte mindestens so viele Bindungsstellen für die immobilisierbare Gruppe der Sonde haben wie Nukleinsäurehybride und damit nachzuweisende Nukleinsäuren vorhanden sind. Die Herstellung einer bevorzugten festen Phase ist in der EP-A- 0 344 578 beschrieben, auf welche vollinhaltlich Bezug genommen wird.

10 Für die heterogenen Nachweisreaktionen wird nach der Inkubationszeit, während der die Immobilisierungsreaktion stattfindet, die flüssige Phase aus dem Gefäß, dem porösen Material oder den pelletierten beads entfernt. Die Festphase kann anschließend mit einem geeigneten Puffer gewaschen werden, da die Bindung der Hybride an der Festphase sehr effizient ist. Die Detektion der gebundenen Bindekomplexe kann über 15 die während der Nukleinsäuresequenz-Vermehrungsreaktion eingegebauten Detektionsmodifikation im Primer und/oder der Sonde und/oder einem Nukleotid mit Hilfe von bekannten direkten oder indirekten Nachweisarten für diese Modifikationen nach dem Stand der Technik erfolgen.

Bei direkt nachweisbaren Gruppen, beispielsweise Fluoreszenzlabeln, kann die Menge 20 an Markierung fluorometrisch bestimmt werden. Ist die nachweisbare Gruppe indirekt nachweisbar z. B. ein Hapten, so wird die modifizierte Nukleinsäure bevorzugt mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten umgesetzt, wie analog in der EP-A-0 324 474 beschrieben. Die Markierung am Antikörper kann beispielsweise eine Farb- oder Fluoreszenzmarkierung oder bevorzugt eine Enzymmarkierung, wie 25 β-Galactosidase, alkalische Phosphatase oder Peroxidase, sein. Im Falle der Enzymmarkierung wird die Menge an Nukleinsäure über die meist photometrische chemoluminometrische oder fluorometrische Verfolgung einer Reaktion des Enzyms mit einem chromogenen, chemoluminogenen oder fluorogenen Substrat gemessen. Das

Meßsignal ist ein Maß für die Menge ursprünglich vorhandener nachzuweisender Nukleinsäure und somit ggf. an nachzuweisenden Organismen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die vermehrten Tripartite-Mini-Amplikons durch Nukleinsäure-Fangsonden oder PNA-Fangsonden gebunden, die

5 kovalent auf Mikrotiterplatten oder Magnetpartikeln immobilisiert sind. Die Detektion erfolgt in dieser bevorzugten Ausführungsform nach Bildung des Bindekplexes und Waschen über eine Biotin-Modifikation eines oder beider Primer im Amplifikat durch Anlagerung von Avidin-Meerrettich-Peroxydase und einer Mischung aus TMB/TMF-Farbsubstraten.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Einbau einer Digoxigenin-Detektionsmarkierung über eines der Nukleotide der Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion. Der Bindekplex zwischen Amplifikat und einer Biotin-markierten Nukleinsäure-Fangsonde oder PNA-Fangsonde wird auf die Oberfläche eines Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäßes gebunden. Nach Waschen erfolgt Anlagerung von Anti-Digoxigenin-Meerrettich-Peroxidase-Antikörperkonjugaten und Farbnachweis mit dem Farbsubstrat ABTS.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Nachweis einer oder mehrerer Amplikate nach Bindung durch eine oder mehrere verschiedene kovalent (z. B. Anthrachinon: UV-Licht-Kopplung oder Gold-Oberfläche: SH-Kopplung) oder koordinativ (z. B. Biotin: Streptavidin) gebundene Fangsonden, durch Waschen und durch Detektion eines Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Signals, das entweder direkt durch Primärlicht oder über Oberflächenplasmonresonanz oder E-wave angeregt wurde, mit Hilfe von CCD-Kameras oder konfokalen Fluoreszenz-Scannern.

20 Bei Verwendung der Sonde als Detektionssonde kann die Sonde entweder gleichzeitig, vor oder nach Bindung des Amplifikats an die feste Phase binden. In diesem Fall erfolgt die Bindung des Amplifikats an die feste Phase über Modifikationen, die über einen oder beide Primer oder über die eingebauten Nukleotide eingebaut wurden.

25 Anschließend wird gewaschen und detektiert.

In einer weiteren Ausführungsform wird der Komplex zwischen Amplifikat und Detektionssonde in Lösung erst vorgebildet und anschließend auf den festen Träger aufgebracht und gewaschen. Die Detektion der Festphase-gebundenen Bindekoplexe zwischen Amplifikat und Detektionssonde erfolgt über die Detektionsmodifikation der

5 Sonde mit Hilfe von bekannten direkten oder indirekten Nachweisarten für diese Modifikationen nach dem Stand der Technik.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden an die Amplifikate, die über einen oder beide Primer Biotin-Modifikationen enthalten, Ruthenium-Chelat-haltige Detektionssonden gebunden. Die Detektionssonden sind entweder Ruthenium-markierte Oligo-

10 nukleotide oder Ruthenium-markierte PNA-Oligomere. Nach Bildung des Bindekoplexes zwischen Ruthenium-markierter Detektionssonde und Biotin-markiertem Amplifikat erfolgt Bindung des Komplexes an Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel, Transfer in eine Meßzelle, Anlagerung an eine Elektrode innerhalb der Meßzelle und Erzeugung und Messung eines Elektrochemilumineszenz-Signals.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Detektions-Sonde mit Digoxigenin markiert. Nach Bildung des Bindekoplexes zwischen Digoxigenin-markierter Detektionssonde und Biotin-markiertem Amplifikat erfolgt die Bindung des Komplexes durch eine Fangsonde, die kovalent auf einer Mikrotiterplatte oder auf Magnetpartikeln immobilisiert ist. Die Detektion erfolgt in dieser bevorzugten

20 Ausführungsform nach Bildung des Bindekoplexes und Waschen über eine Biotin-Modifikation eines oder beider Primer im Tripartite-Mini-Amplikon durch Anlagerung von Avidin-Meerrettich-Peroxidase und einer Mischung aus TMB/TMF-Farbsubstraten.

Bei der Verwendung von homogenen Reaktionsformaten werden Detektionssonden verwendet, die entweder gequenchte Fluoreszenzmarkierungen, interne

25 Basensubstitutionen mit Doppelstrang-Komplex-aktivierbaren Fluoreszenzfarbstoffen oder endständige Energie-Donatoren oder -Akzeptoren (in Kombination mit entsprechenden Energie-Donatoren oder -Akzeptoren an benachbarten Primerenden: Energy-Transfer-Komplexe) tragen. In diesen Fällen wird die Detektionssonde schon während der Nukleinsäure-Vermehrung zugegeben. Im Fall der gequenchten

Fluoreszenzmarkierungen erfolgt eine Fluoreszenzaktivierung durch Dequenching nach Bindung der Detektions-Sonde an das entstehende Tripartite-Mini-Amplikon und exonukleolytischer Abbau und Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoff-modifizierten Nukleotids. Im Fall der internen Basensubstitutionen erfolgt die Erzeugung des

- 5 Fluoreszenzsignals durch Ausbildung des Bindekplexes zwischen Detektionssonde und dem sich bildenden Tripartite-Mini-Amplikon. Im Fall der Energie-Transfer-Komplexe erfolgt die Bildung eines Fluoreszenzsignals durch benachbarte Anlagerung des markierten Primers und der markierten Sonde. Die Messung der resultierenden Fluoreszenzsignale erfolgt jeweils bevorzugt durch Real time-Messungen.
- 10 In einer besonderen Ausführungsform werden bei den gequenchten Detektorsonden Fluorescein und Rhodamin oder Derivate davon als Fluoreszenz- und Quencher-Komponenten verwendet. In einer weiteren Ausführungsform werden bei den gequenchten Detektorsonden Ruthenium- oder Rhenium-Chelate und Quinone oder Derivate davon als Elektrochemilumineszenz- und Quencher-Komponenten verwendet.
- 15 In einer weiteren besonderen Ausführungsform werden als interne Basensubstituenten der Detektorsonde Anthrachinon oder Derivate davon verwendet. In einer weiteren Ausführungsform werden Cy-5 und Fluorescein oder Derivate davon als Energie-Transfer-Komponenten verwendet. In einer speziellen Ausführungsform werden Cyanin-Farbstoffe wie z. B. SYBR Green oder Acridin-Farbstoffe verwendet.
- 20 Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind solche Ausführungsformen, bei denen mindestens eine der Bindesequenzen der Primer und der Sonde nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist. Spezifisch im Sinne der Erfindung ist eine Sequenz dann, wenn sie aufgrund einer fortlaufenden Sequenz von Nukleobasen prinzipiell in der Lage wäre, unter stringenten Bedingungen nur mit einer Sequenz auf der nachzuweisenden Nukleinsäure, nicht jedoch mit Nukleinsäuren anderer, nicht nachzuweisender Organismen oder Spezies oder Gruppen von Organismen zu binden. Bevorzugt ist eine Sequenz dann nicht für eine Sequenz spezifisch, wenn sie unter den Bedingungen, welche für die Durchführung des Nachweises eingestellt werden, mit anderen Nukleinsäuren hybridisieren könnte.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe mindestens zweier Primer, Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde, welche an das Amplifikat binden kann, und Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Strang des Amplifikates und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist. In diesem Fall kann der Bereich B Nukleotide enthalten, welche nicht der Bindesequenz E zugehören. Auch hier sind jedoch Überlappungen der Bindesequenzen der Primer und der Sonde möglich.

10 Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zur Durchführung dieses Verfahrens.

In einer weiteren Ausführungsform enthalten die Primer an ihrem 5'-Ende weitere Sequenzen, die sich im humanen Genom an die Primersequenzen anschließen. Diese Sequenzen sind zwischen 1 und 100, besonders bevorzugt zwischen 5 und 80 Nukleotide lang. Es ist möglich, einen oder beide der Primer entsprechend zu modifizieren. Die zusätzlichen Sequenzen sind nicht so lang, daß sie eine Hybridisierung der Primer mit den Bindesequenzen auf der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. dem HCV-Genom, verhindern.

15 In einer weiteren Ausführungsform sind das 5'-Ende des einen Primers und das 5'-Ende des anderen Primers miteinander kovalent verknüpft. Zwischen den 5'-Enden der Primer können sich beispielsweise die angrenzenden humanen Sequenzen befinden.

20 Bevorzugt binden die Primer an die Bindesequenzen A bzw C', wie oben beschrieben, und die Sonde an einen zwischen den Enden der Bindesequenzen A und C' gelegenen Bereich B oder das Komplement davon.

25 Auch wenn mindestens eine Sequenz aus den 3 Bindesequenzen der beiden Primer und der Sonde nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure ist, bleibt die Gesamtspezifität des Nachweisverfahrens erhalten. Ist eine der Primersequenzen nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, sondern bindet auch an andere

Nukleinsäuren, kann kein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt auf der anderen Nukleinsäure gebildet werden, da die zweite Primerbindungssequenz auf dieser anderen Nukleinsäure fehlt. Unspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte auf der anderen Nukleinsäure werden nicht detektiert, wenn die spezifische Bindungssequenz

5 für die Sonde fehlt. Ist auch die zweite Primersequenz nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, kann nur dann ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt auf der anderen Nukleinsäure gebildet werden, wenn beide Primerbindungssequenzen in der gleichen Nukleinsäure-Vermehrungseinheit sind. Dieses Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt wird ebenfalls nicht detektiert, da die

10 spezifische Bindungssequenz für die Sonde fehlt. Ist die Sondensequenz nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, jedoch die beiden Primer spezifisch, werden keine Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der anderen Nukleinsäure gebildet. Ist zusätzlich zur Sondensequenz auch eine der beiden Primersequenzen nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, kann wiederum kein spezifisches Nukleinsäure-

15 Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet werden. Unspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der anderen Nukleinsäure, die möglicherweise gebildet werden, enthalten andere Sequenzen im Sondenbindungsbereich und werden daher nicht detektiert. Sind alle drei Bindungssequenzen für die beiden Primer und die Sonde nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, wird kein Nukleinsäure-

20 Vermehrungsprodukt gebildet, wenn mindestens eine der beiden Primersequenzen nicht in einer Nukleinsäure-Vermehrungseinheit der anderen Nukleinsäure liegt. Liegt die Sondensequenz nicht in der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit der beiden Primersequenzen für die andere Nukleinsäure, kann zwar ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet, aber nicht detektiert werden.

25 Der einzige Fall, daß ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet und detektiert werden kann, ist, wenn alle drei Sequenzen innerhalb eines Nukleinsäure-Vermehrungsbereichs liegen. Dies kann jedoch durch entsprechende Sequenzauswahl der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit vermieden werden.

Eine weitere Möglichkeit, Primer und Sonden gezielt unselektiv zu machen, besteht in der Verwendung degenerierter Basen innerhalb der Sequenz. Dabei wird zweckmäßigerweise die Region, in der die Hybridisierung der Targetnukleinsäure mit dem Primer oder der Sonde stattfinden soll, so gewählt, daß relativ wenig Unterschiede 5 zwischen der Targetsequenz und einer anderen, jedoch nicht nachzuweisenden Sequenz (z. B. eines anderen Mikroorganismus) bestehen. Die noch bestehenden Unterschiede können durch den Einsatz degenerierter Basen an den differierenden Basenpositionen weitgehend ausgeglichen werden. So lassen sich Unterschiede von Primern (A bzw. G) durch den Einbau der Base P (6H, 8H-3,4-dihydro-pyrimido[9,5-C][1,2]oxazin-7-on, 10 z. B. Nucleic Acids Research, Vol. 17, 24, 1989, p. 10373-10383) ausgleichen. Dasselbe gilt für Pyrimidine mit der Base K (Nucleorides & Nucleotides, 16 (7-9), 1507-1511 (1997)). Eine noch stärkere Degenierung ist durch den Einsatz von Inosin möglich (US-A-5,585,477; US-A-5,691,134; US-A-5,578,467; J.Biol.Chem. 260, 5, 2605-2608, 15 1985; Nucl.Acids Res. 1995, 23, 13, 2499-2505), da Inosin Basenpaarung mit allen vier Basen erlaubt.

Eine weitere Möglichkeit, nichtkomplementäre Basen einzusetzen, ist der Ersatz von A durch D (Diaminopurine oder/und der Ersatz von C durch M (Methylcytosin)).

Eine weitere Möglichkeit der Erzeugung von unspezifischen Primern und Sonden ist durch das Mischen von 2 oder mehr Sequenzen gegeben. so kann beispielsweise eine 20 Primersequenz einen für einen ersten Organismus, z. B. HCV, spezifischen Teil und einen für einen anderen Organismus, z. B. HGBV-B, spezifischen Teil enthalten. Diese (spezifischen) Teile können durch einen 1 bis 7 Nukleotide langen (gemeinsamen) Bereich getrennt sein. Die Organismen werden bevorzugt so gewählt, daß sie wahrscheinlich nicht in derselben Probe enthalten sind. Vorteile dieser 25 Ausführungsform sind, daß dieselben Primer für Nachweise von verschiedenen Organismen eingesetzt werden können und die Flexibilität der Auswahl größer ist.

In einer weiteren Ausführungsform findet die Herstellung der Amplifikate unter Einsatz von Nukleotiden, besonders bevorzugt Mononukleotiden, welche jeweils zu A, G, C

und/oder T komplementär sind, statt. Bevorzugt enthält der Bereich B bzw. B' der nachzuweisenden Nukleinsäure alle 4 natürlichen Nukleobasen.

In einer weiteren Ausführungsform des neuartigen Verfahrens können Teilkomponenten (Primer oder Sonden) der verschiedenen Primer-Sonden-Kombinationen für die 5 verschiedene nachzuweisenden Nukleinsäuren identisch sein. Hierdurch wird die Bestimmung mehrerer Nukleinsäuretargets, z. B. für unterschiedliche Viren wie HBV, HIV und HCV mit einer einzigen Amplifikationsreaktion möglich (Multiplex). Ein technischer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß bei Mehrfachbestimmungen einer Probe ein hoher Grad an Übereinstimmung der Meßwerte 10 erreicht wird.

Im folgenden sollen die beiden Aspekte der vorliegenden Erfindung anhand eines Nachweises für HCV beschrieben werden. Die Nukleinsäuresequenz von HCV ist beispielsweise in EP-B-0 318 216 beschrieben. Die Sequenzen der beteiligten Komponenten sind in Figur 4 gezeigt. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht den 15 hochspezifischen und hochsensitiven Nachweis von Virus-Nukleinsäuren wie z. B. HCV-RNA aus der 5'-nichttranslatierten Region des HCV-Genoms in einer Kopienzahl von 10 Kopien pro Test mit einem dynamischen Bereich von 105 bedingt durch ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis. Dies ist insofern überraschend, da bei dem Test Primer und Sonden einsetzbar sind, die ein für den Fachmann nicht bevorzugtes 20 Primer/Sonden-Design aufweisen, nämlich z. B. Sequenzabschnitte, die zur Primer-Dimer-Bildung neigen, oder Basenfehlpaarungen nahe dem 3'-Ende. Die kurze Sonde hat einen Schmelzpunkt nahe der Testtemperatur, so daß der Fachmann keine stabile Bindung der Sonde an das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt erwartet hätte. Bei den bisherigen Tests mit den längeren, fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten 25 wurde eine Spezifitäts- und Sensitivitätserhöhung bisher nicht über eine Verkürzung, sondern vielmehr eher über eine Verlängerung der Primer-Sonden-Sequenzen und/oder des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts mit den signalgebenden Komponenten versucht.

Der Nachweis von HCV-RNA ist überraschenderweise trotz der kurzen vermehrten Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure auch spezifisch und reproduzierbar in positiven HCV-Plasmaproben möglich, in denen die HCV-RNA nicht sequenzspezifisch vorgereinigt wurde, sondern direkt aus lysierten und über Glasoberflächen

5 aufkonzentrierten Plasmaproben eingesetzt wurde. HCV-negative Plasmaproben ergeben kein Signal. Dies ist insofern überraschend, als das HCV-RNA-Genom sehr labil ist gegenüber Fragmentierung in Plasma-Lysaten. Mit z. B. HIV-Plasmaproben, HBV-Serumproben, Chlamydiaproben aus Urin oder Human-DNA-Proben aus Vollblut, die ebenfalls über Glasoberflächen aufkonzentriert wurden, wird mit den eingesetzten

10 Primern und Sonden ebenfalls kein Signal erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann verwendet werden, um einen oder mehrere der für den Stand der Technik geschilderten Nachteile zu vermeiden oder um einen oder mehrere der folgenden Vorteile zu realisieren. Die PCR-Zyklen können sehr viel kürzer sein. Die Gesamtzeit der Nachweisverfahren kann dadurch verkürzt werden. Die

15 Sensitivität des Nachweises kann erhöht werden, da weniger Kompetition/Verdrängung zwischen dem kurzen Gegenstrang des Amplikons und der Detektorsonde stattfinden kann. Die Spezifität des Nachweises wird erhöht, da der relative Anteil der internen Detektorregion gegenüber der gesamten Amplikonlänge erhöht wird. Die Differenzierbarkeit von Subtypen kann erhöht werden. Der Nachweishintergrund kann gesenkt

20 werden, da kurze Amplika weniger Potential für unspezifische Hybridisierung mit sich bringen. Aus diesem Grund kann das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kann erhöht werden, da kleinere Targetregionen auf RNA-Genomen weniger sensitiv für RNA-Abbau sind. Die Möglichkeiten zur Ausbildung von Sekundärstrukturen werden reduziert.

25 Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Allgemeines

Alle verwendeten Oligonukleotide sind linear und einzelsträngig.

Beispiel 1

Nachweis von HCV aus menschlichem Blut

5 a) Probenvorbereitung:

Die RNA-Isolierung aus Plasma erfolgte anhand folgenden Probenvorbereitungsprotokolls:

1. Plasma (420 µl) mit 80 µl Proteinase K (25 mg/ml) mischen und einige Sekunden vortexen
- 10 2. Zugabe von 500 µl Lysepuffer (inkl. 1 µg Carrier-RNA (polyA)/ml): 5,4 M Guanidinium-Thiocyanat; 10 mM Harnstoff; 10 mM Tris-HCl; 20 % Triton X 100; pH 4,4
- 15 3. vortexen und anschließend 10 min bei RT schütteln
4. Zugabe von 500 µl Isopropanol-MGP (6 mg magnetische Glaspartikel in Isopropanol)
- 15 5. vortexen und anschließend 20 min bei RT schütteln
6. Magnetseparation der MGPs
7. Überstand abnehmen und verwerfen
8. Zugabe von 750 µl Waschpuffer: 20 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 20 % Ethanol
9. MGPs auf Vortex resuspendieren und erneute Magnetseparation
10. Waschvorgang insgesamt 5mal wiederholen
11. Zugabe von 100 µl DEMC-Wasser zur Elution
12. 15 min bei 80 °C schütteln

13. Magnetseparation

14. 10 µl des Eluats in die RT-PCR einsetzen

b) Klonierung und Präparation des RNA-Standards:

Der Wildtypstandard "pHCV-wt" wurde zunächst durch Amplifikation eines
5 Abschnitts des HCV-Genoms mit den Primern KY80 (5'-gcagaaagcgtagccatggcgt-3', SEQ.ID.NO.1) und KY78 (5'-ctcgcaaggcacccatcaggcgt-3', SEQ.ID.NO.2) gewonnen und das Amplikon anschließend über eine sog. "blund-end"-Klonierung in den Vektor pBluescript SK+ kloniert. Nach Vermehrung der bakteriellen Zellen wurde das Plasmid isoliert,
10 durch restriktionsenzymatischen Verdau linearisiert und über eine in-vitro-Transkription das entsprechende RNA-Fragment gewonnen und aufgereinigt.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte über photometrische Messung der Absorption bei 260 nm.

Alle hier beschriebenen molekularbiologischen Verfahren können einschlägigen
15 Methodik-Büchern entnommen werden (e.g. Maniatis et al.; Ausubel et al.).

- 40 -

c) RT-PCR assay:

Die Amplifikation erfolgte mit den u.g. Reagentien und nach u.g. Cyclerprotokoll:

Reagentien	Endkonzentration im Mastermix
5 x RT-PCR-Puffer	1 x
MnOAc	2,5 mM
Tth-Polym.	10 u
dNTP-Mix	200 μ M (dATP, dCTP, dGTP) / 600 μ M (dUTP)
UNG	2u
Primer forw. HC2F	0.3 μ M (5'-agtatgtgtcgcc-3', SEQ.ID.NO.3)
Primer rev. HC1F-bio	0.3 μ M (5'bio--tggctctccgggagtg-5', SEQ.ID.NO.4)

Die Amplifikation wurde nach folgendem Cyclerprotokoll durchgeführt:

10 min	37 °C	Dekontamination durch UNG
30 min	60 °C	reverse Transkription
1 min	95 °C	Denaturierung

35 Zyklen:

15 sec	94 °C	Denaturierung
20 sec	56 °C	Primer-Annealing und Elongation
7 min	72 °C	Elongation
hold	50 °C	

d) Detektion:

Die gesamte Detektionreaktion erfolgte vollautomatisiert an einem Elecsys® 1010-Analyse-Automaten (Boehringer Mannheim GmbH). Kurzbeschreibung:

1. Entnahme von 10 μ l Amplifikat und 35 μ l Denaturierungslösung (BM-Id-No. 1469053)
2. Inkubation in einem Reaktionsgefäß für 5 min bei 37 °C
3. Zugabe von 120 μ l Hybridisierungslösung BM-Id-No. 146 9045 versetzt mit 10 25 ng/ml Ruthenium-markierter Sonde

- 41 -

4. Inkubation für 30 min bei 37 °C
5. Zugabe von 35 µl einer Elecsys® SA Magnetbeadlsg. (BM-Id-No. 171 9556)
6. Inkubation für 10 min bei 37 °C
7. Messung der Elektrochemilumineszenz von 120 µl des Reaktionsgemisches

5 in der Elecsys® 1010-Meßzelle

Zur Hybridisierung wurden zwei unterschiedliche Ruthenium-gelabelte Sonden verwendet:

PNA-Sonde: Ru-(Ser)₂-TCCAGGACCC-Ser-Gly

DNA-Sonde: 5'-Ru-CTCCAGGACCC-3', SEQ.ID.NO.5

10

Beispiel 2**Ermittlung der analytischen Sensitivität anhand einer RNA-Standard-Verdünnungsreihe**

Amplifiziert wurden in Doppelbestimmungen 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 Kopien HCV-

5 RNA-Standard. Als Kontrollen dienten ein HCV-negatives Plasma, ein HCV-positives Plasma (nach Probenvorbereitung) und Wasser. Nach Amplifikation wurden alle Proben gemessen (ECL-Detektion, Elecsys® 1010).

Ergebnis (Einheiten x 100):

Template	PNA-Sonde		DNA-Sonde	
	1.Best	2.Best.	1.Best	2.Best.
RNA-Std. 10^5 Kopien	30608	30186	16791	15772
RNA-Std. 10^4 Kopien	17895	15737	8977	7718
RNA-Std. 10^3 Kopien	4137	4345	1911	1931
RNA-Std. 10^2 Kopien	280	163	146	86
RNA-Std. 10^1 Kopien	95	76	47	37
HCV-positives Plasma	26658	26262	14996	14552
HCV-negatives Plasma	93	98	49	48
Wasser	61	45	19	15

10 • Die Verwendung der Primer HC2F/HC1F-bio führt zu einer sehr guten Amplifikation in der RT-PCR, gemessen an dem Signalniveau: Hierbei wird der gesamte Detektionsbereich des Elecsys® ausgenutzt (ca. 5 log-Stufen).

• Es erfolgt eine sehr gute Signalabstufung innerhalb der Verdünnungsreihe

• Der Background, gemessen an HCV-negativem Plasma und Wasser, ist relativ gering

15 • Es ist sowohl die Verwendung von PNA als auch DNA als Sonde möglich

Beispiel 3**Überprüfung der HCV-Assay-Spezifität**

Hierzu wurden unterschiedliche Ausgangsnukleinsäuren (human-genomische DNA; HIV-RNA, HBV-DNA, Chlamydia-DNA) mit den o.g. Primern und Sonden getestet.

5 Als Positiv-Kontrolle diente HCV-Plasma und als Negativ-Kontrolle HCV-Negativ-Plasma sowie Wasser.

Ergebnis (Einheiten x 100):

Template	PNA-Sonde		DNA-Sonde	
	1.Best	2.Best.	1.Best	2.Best.
Human-genomische DNA aus Vollblut	52	45	41	56
HIV-positives Plasma	43	60	39	33
HBV-positives Plasma	53	40	25	27
Chlamydia-positiver Urin	43	34	19	17
HCV-positives Plasma	11543	10644	6900	6348
HCV-negatives Plasma	65	67	45	40
Wasser	29	25	15	15

10 • Beide verwendeten Sonden (PNA, DNA) ergeben nur mit ihrem zugehörigen Analyten ein Signal in der ECL-Messung. Das bedeutet: Keine detektierbaren unspezifischen Amplifikationen mit den verwendeten Primern und Sonden.

Beispiel 4**Überprüfung der Sonden-Spezifität**

Für dieses Experiment wurden unterschiedliche Amplifikate anderer Analyten mit den jeweiligen spezifischen Primern hergestellt und dann gegen die o.g. PNA- und DNA-

5 Sonden hybridisiert. Die Kontrolle der erfolgten Amplifikationen erfolgte mit der jeweiligen zugehörigen Analyt-Sonde.

Ergebnis (Einheiten x 100): (jeweils Mittelwert aus Doppelbestimmung)

Template	PNA-Sonde für HCV	DNA-Sonde für HCV	HIV-Sonde	HBV- Sonde	Chlamydia- Sonde
HIV	13	6	11908	nd	nd
HBV	13	13	nd	1384	nd
Chlamydia	10	10	nd	nd	3842
HCV	10132	9345	nd	nd	nd
Wasser	13	9	nd	nd	nd

• Die Kontrollreaktionen (HIV, HBV, Chlamydia) ergeben den deutlichen Nachweis
10 von Amplifikat mit der entsprechenden Sonde.

• Die verwendeten PNA- sowie DNA-Sonden ergeben nur mit HCV ein spezifisches Signal.

• Es treten keine unspezifischen Hybridisierungen der PNA/DNA-Sonden mit anderen Amplifikaten auf.

Beispiel 5**Nachweis von HCV mit alternativen Primern**

In Fig. 8 ist eine weitere Kombination von Primern mit einer Fangsonde angegeben, die keine freien Nukleotide im überspannten Bereich enthält. Das Amplicon ist nur 51
5 Basen(paare) lang.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
 - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz (A) eines Stranges der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann,
 - Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und
 - Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hiervon gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindesequenz D der Sonde mit einer oder beiden Bindesequenzen der Primer überlappt.
3. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer an seinem nicht verlängerbaren Teil Nukleotide aufweist, die nicht direkt mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement hybridisieren.
4. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß mindestens eine der Bindesequenzen nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.

5. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtlänge der Bindesequenzen von dem von der Bindesequenz der Sonde wegweisenden Teil der Bindesequenz des einen Primers bis zu dem ebenfalls von der Bindesequenz der Probe wegweisenden Teil des anderen Primers kleiner ist als 100 Nukleotide.
6. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer immobilisierbar und die Sonde nachweisbar markiert ist.
7. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nachweisbar und die Sonde immobilisierbar markiert oder immobilisiert ist.
8. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde sowohl durch einen Fluoreszenzquencher als auch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.
- 15 9. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Primer durch eine erste Energietransferkomponente und die Sonde durch eine zweite, davon verschiedene Energietransferkomponente markiert ist.
- 10 10. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikat durch physikalische und/oder spektroskopische Methoden detektiert wird.
- 20 11. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.

13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.
14. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.
5
15. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
 - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz A der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C komplementär ist, binden kann, und Nachweis der Amplifikate mittels Massenspektroskopie.
16. Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
 - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe mindestens zweier Primer,
 - Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde, welche an das Amplifikat binden kann, und
 - Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.

19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.

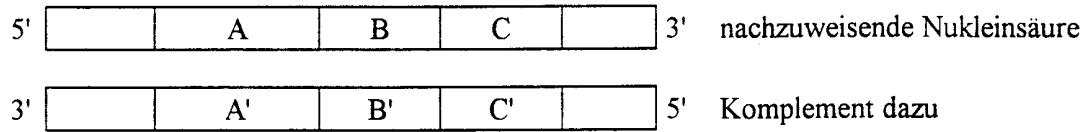
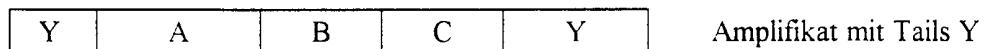
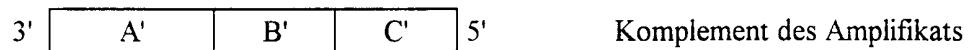
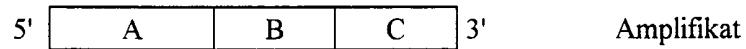
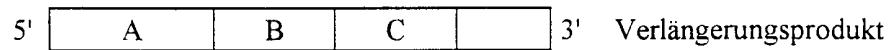
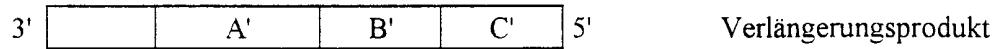
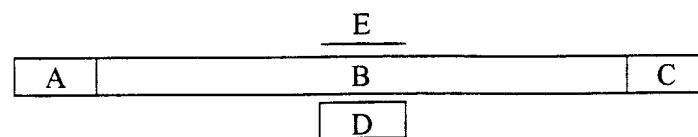
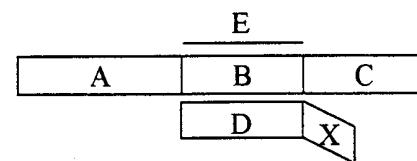
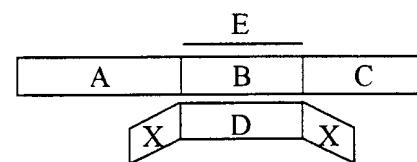
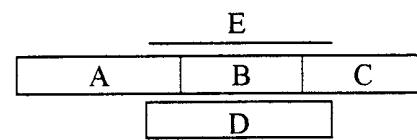
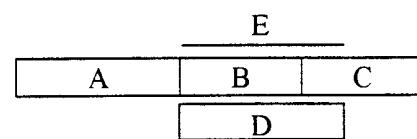
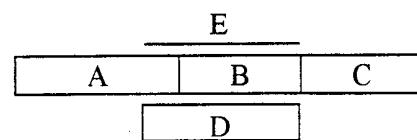
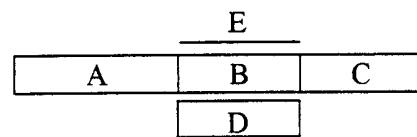
Fig. 1**Fig. 2**

Fig. 3



3/7

Fig. 4

HCV	AGTATGAGTGTGCGA	GCCTCCAGGACCCCCC	CTCCCGGGAGAGCCA
HUMAN	AGTATGTGTGCGA	GCCTCCAGGACCC	CACTCCCGGGAGAGCCA

FIG. 5

AGTATGTCGTGCAGGCC
HCV/MCR01
MPF1
MPF1+1
MPF2
HCV_1A
HCV_1B
HCV_2B
HCV_MCR
MPR1_rev&compl
MPR2_rev&compl
HCV/MCR02_rev&compl
#1

CCAGGACCCCCACTCCCCGG
TCCAGGACCCCCACTCCCCGG
CCAGGACCCCCACTCC
AGTATGAGTGTCTGGCAGCCTCCAGGGCCAGGGAGAGCCA
AGTATGAGTGTCTGGCAGCCTCCAGGGAGAGCCA
AGTATGAGTGTCTGGCAGCCTCCAGGGAGAGCCA
AGTATGAGTGTCTGGCAGCCTCCAGGGAGAGCCA
GTGTGTGTGTGCAGCCTCCAGGA
TCGTGCAGCCTCCAGGA
CCACTCCCCGGAGAGCCA

FIG 6

HCV		261 5'-GGTACTGCCTGATAGGGTGCCTGGAGTGGCCGGAGGTCTCGTAGCCGTGACCATGA-3' 333
Forward primer CK10/Reverse primer CK20		5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3' 5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3'
Forward primer CK11/Reverse primer CK20		5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3' 5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3'
Forward primer CK10-1/Reverse primer CK20-1		5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3' 5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3'
Forward primer CK11-1/Reverse primer CK20-1		5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3' 5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3'
Forward primer CK10-2/Reverse primer CK20-2		5'-CGTAMTGMATIATAGGGTMT-3' 5'-CGTAMTGMATIATAGGGTMT-3'
Forward primer CK11-2/Reverse primer CK20-2		5'-CGTAMTGMATIATAGGGTMT-3' 5'-CGTAMTGMATIATAGGGTMT-3'
Forward primer CK10/Reverse primer CK21		5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3'
Forward primer CK10-1/Reverse primer CK21-1		5'-CGTAMTGMATIATAGGGTCT 3'
Forward primer CK11-1/Reverse primer CK21-1		5'-CGTAMTGMATIATAGGGTCT 3'
Forward primer CK10-1/Reverse primer CK21-2		5'-CGTAMTGMATIATAGGGTCT 3'
Forward primer CK11-1/Reverse primer CK21-2		5'-CGTAMTGMATIATAGGGTCT 3'
Forward primer CK10-2/Reverse primer CK21-3		5'-CGTAMTGMATIATAGGGTMT 3'
Forward primer CK11-2/Reverse primer CK21-3		5'-CGTAMTGMATIATAGGGTMT 3'
HGBV-B		389 5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGCCTGGAGTGGAGTCTCGTAGACCGTAGCACTATGC-3' 449

FIG 7

261 5' -GGTACTGCTGTAGGGTAGCTCGTAGGCCGGAGGTCTCGTAGACCCGTGACCATGA-3' 333
HCV

Forward primer CK12/Reverse primer CK22
5' -CGTAMTGMGTGATAGGGT-3'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-1
5' -CGTAMTGMGTIATAGGGT-3'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-2
5' -CGTAMTGMGTIATAGGGT-3'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-3
5' -CGTAMTGMGTIATAGGGT-3'
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK22-4
5' -CGTDMTGMMTIDTGGGT-3'
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK22-5
5' -CGTDMTGMMTIDTGGGT-3'

3' -CCCTCAGGCATCTGGCATCGTGTACG-5'
3' -CMTTMAAGMTMTGGMATMGTGTAMG-5'
3' -CMTTPMAGATMTGGMATMGTGTAMG-5'
3' -MMTPMAGATMTGGMATMGTGTAMG-5'
3' -CMTTPMAGATMTGGMATMGTGTAMG-5'
3' -MMTPMAGATMTGGMATMGTGTAMG-5'

Forward primer CK12/Reverse primer CK23
5' -CGTAMTGMGTGATAGGGT-3'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK23-1
5' -CGTAMTGMGTIATAGGGT-3'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK23-2
5' -CGTAMTGMGTIATAGGGT-3'
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK23-3
5' -CGTDMTGMMTIDTGGGT-3'
Forward primer CK12/Reverse primer CK24
5' -CGTAMTGMGTGATAGGGT-3'
Forward primer CK12/Reverse primer CK24-1
5' -CGTAMTGMGTIATAGGGT-3'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK24-2
5' -CGTDMTGMMTIDTGGGT-3'

3' -CCCTCAGGCATCTGGCATCGTGTACG-5'
3' -CMTTMAAGMTMTGGMATMGTGTAMG-5'
3' -MMTPMAGMTMTGGMATMGTGTAMG-5'
3' -CMTTPMAGMTMTGGMATMGTGTAMG-5'
3' -MMTPMAGMTMTGGMATMGTGTAMG-5'

389 5' -GGTACTGCTGTAGGGTAGCTCGTAGGCCGGAGGTCTCGTAGACCCGTGACCATGA-3' 449
HGBV-B

7/7

nt -281

nt -231

HCV: TCTTC--ACGCAG-AAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGCAGC
BVDV: TCAGCGAAGGCCGAAAAGAGGGCTAGCCATGCCCTTAGTAGGA----CTAGCATA

F.primer-GH3: 5'-TCaTCACGCAGAcAGCGTCTAG-3'
R.primer-GH4: 5'-GgTGCACGACAgTCATACTAA-3'

capture probe-GH_p2: CTAGCCATGcCGTT
amplicon-size: 51 bp

FIG. 8

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

5 (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
(B) STRASSE: Sandhoferstr. 116
(C) ORT: Mannheim
(E) LAND: DE
(F) POSTLEITZAHL: 68305
(G) TELEFON: 0621 759 4348
10 (H) TELEFAX: 0621 759 4457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:
Spezifisches und sensitives Nukleinsäurenachweisverfahren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

15 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

5 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

10

CTCGCAAGCA CCCTATCAGG CAGT

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

20

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AGTTATGTGT GTCGTGCAGC C

21

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

30

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

5 TGGCTCTCCC GGGAGTG 18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

15

CTCCAGGACC CC 12