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

(10) **DE 600 04 122 T2** 2004.04.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 045 030 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 04 122.0**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 104 307.4**
(96) Europäischer Anmeldetag: **02.03.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.10.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **30.07.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.04.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12Q 1/68**

(30) Unionspriorität:
**289747** **12.04.1999** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**DE, FR, GB, IT**

(73) Patentinhaber:
**Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, N.J., US**

(74) Vertreter:
**Weickmann & Weickmann, 81679 München**

(72) Erfinder:
**McMillian, Ray A., Timonium, Maryland 21093, US;**
**Fort, Thomas L., Finksburg, Maryland 21048, US;**
**You, Qimin, Lutherville, Maryland 21093, US**

(54) Bezeichnung: **Amplifizierung und Nachweis von Campylobacter jejuni und Campylobacter coli**

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

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

**Beschreibung**

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zum Bestimmen des Vorhandenseins oder Fehlens von Campylobacter jejuni und C. coli bei Patienten. Das Verfahren umfasst die Verwendung von Nucleinsäureprimern, um spezifisch das C. jejuni- und C. coli-Superoxiddismutase (sodB)-Gen zu amplifizieren, vorzugsweise unter Anwendung einer der Techniken der Strangverdrängungsamplifikation (SDA), der thermophilen Strangverdrängungsamplifikation (tSDA) oder der thermophilen Fluoreszenz-Echtzeit-Strangverdrängungsamplifikation, sowie gegebenenfalls unter Anwendung eines mikroelektronischen Array.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] C. jejuni und C. coli werden als wichtige Ursachen einer akuten Durchfallerkrankung bei Menschen in aller Welt erkannt. Die Nucleinsäureamplifikation ist eine leistungsfähige Technologie, welche die rasche Detektion spezifischer Zielsequenzen ermöglicht. Sie ist daher eine vielversprechende Technologie, welche eine rasche Nachweisung und Identifizierung von C. jejuni und C. coli ermöglicht. Die Oligonucleotidprimer der vorliegenden Erfindung sind für die Nucleinsäureamplifikation und Detektion der C. jejuni- und C. coli-spezifischen Bereiche des Superoxiddismutase (sodB)-Gens anwendbar. Das sodB-Gen ist ungefähr 900 Basenpaare groß und ist wichtig für das Überleben von C. jejuni und C. coli in der Luft und während der Infektion.
[0003] Das Dokument US5494795 offenbart ein Verfahren zum Nachweisen des Vorhandenseins von Campylobacter jejuni und Campylobacter coli in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte: (a) die Behandlung der Probe unter Verwendung eines Paars von Oligonucleotidprimern, welche mit dem Flagellingen (flaA) der Bakterien komplementär sind, in einer Nucleinsäure-Amplifikationsreaktion; und (b) die Detektion des amplifizierten Nucleinsäureprodukts mit einer DNA-Hybridisierungssonde, welche für das flaA-Gen spezifisch ist.
[0004] Die EP0592894 lehrt die Verwendung des SOD-Gensystems als Ziel für die Detektion und Differenzierung von Mikroorganismen, einschließlich Bakterien. Bakterielle SOD-Gene, einschließlich des sodB-Gens von Campylobacter jejuni, werden amplifiziert und mit gattungs- oder artspezifischen Sonden detektiert. Die verwendeten Primer sind jedoch nicht für Campylobacter-Arten spezifisch, da sie SOD-Gene aus allen 133 Bakterienarten amplifizieren können.
[0005] Die folgenden Begriffe sind hier wie folgt definiert:
Ein Amplifikationsprimer ist ein Primer für die Amplifikation einer Zielsequenz durch Verlängerung des Primers nach der Hybridisierung mit der Zielsequenz. Amplifikationsprimer sind typischerweise etwa 10–75 Nucleotide lang, vorzugsweise etwa 15–50 Nucleotide lang. Die Gesamtlänge eines Amplifikationsprimers für eine SDA beträgt typischerweise etwa 25–50 Nucleotide. Das 3'-Ende eines SDA-Amplifikationsprimers (die Zielbindesequenz) hybridisiert am 3'-Ende der Zielsequenz. Die Zielbindesequenz ist etwa 10–25 Nucleotide lang und verleiht dem Amplifikationsprimer eine Hybridisierungsspezifität. Der SDA-Amplifikationsprimer umfasst weiters eine Erkennungsstelle für eine Restriktions-Endonuclease 5**'** zur Zielbindesequenz. Die Erkennungsstelle besteht für eine Restriktions-Endonuclease, die einen Strang einer DNA-Duplex mit Einzelstrangbrüchen versieht, wenn die Erkennungsstelle hemimodifiziert wird, wie von G. Walker, et al. (1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 392–396 und 1992 Nucl. Acids Res. 20: 1691–1696) beschrieben. Die Nucleotide 5**'** zur Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstelle (der "Schwanz") wirken als Polymerase-Reprimierungsstelle, wenn der Rest des Amplifikationsprimers während der SDA mit Einzelstrangbrüchen versehen und verdrängt wird. Die Reprimierungsfunktion der Schwanznucleotide erhält die SDA-Reaktion aufrecht und ermöglicht eine Synthese multipler Amplikone aus einem einzigen Zielmolekül. Der Schwanz ist typischerweise etwa 10-25 Nucleotide lang. Seine Länge und seine Sequenz sind im Allgemeinen nicht entscheidend und können routinemäßig ausgewählt und modifiziert werden. Da die Zielbindesequenz jener Teil eines Primers ist, welcher dessen Zielspezifität bestimmt, besteht im Allgemeinen der Amplifikationsprimer für Amplifikationsverfahren, die keine spezialisierten Sequenzen an den Enden des Ziels erfordern, im Wesentlichen nur aus der Zielbindesequenz. Beispielsweise werden bei einer unter Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgenden Amplifikation einer Zielsequenz gemäß der Erfindung Amplifikationsprimer verwendet, welche aus den Zielbindesequenzen der hier beschriebenen Amplifikationsprimer bestehen. Für Amplifikationsverfahren, die spezialisierte Sequenzen erfordern, welche an ein anderes Ziel als die mit Einzelstrangbrüchen versehbare Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstelle und den Schwanz einer SDA (z. B. ein RNA-Polymerase-Promotor für die sich selbst erhaltende Sequenzreplikation (3SR), die auf Nucleinsäuresequenzen basierende Amplifikation (NASBA) oder das Amplifikationssystem auf Transcriptionsbasis (TAS)) angehängt sind, kann die erforderliche spezialisierte Sequenz an die Zielbindesequenz gebunden werden, wobei Routinemethoden zur Herstellung von Oligonucleotiden ohne Änderung der Hybridisierungsspezifität des Primers zur Anwendung kommen.
[0006] Ein Bumperprimer oder äußerer Primer ist ein Primer, der zur Verdrängung von Primer-Verlängerungsprodukten in isothermen Amplifikationsreaktionen verwendet wird. Der Bumperprimer verbindet sich wieder mit

einer Zielsequenz stromaufwärts vom Amplifikationsprimer, so dass eine Verlängerung des Bumperprimers den stromabwärts gelegenen Amplifikationsprimer und sein Verlängerungsprodukt verdrängt.

[0007] Die Begriffe Ziel oder Zielsequenz beziehen sich auf zu amplifizierende Nucleinsäuresequenzen. Diese umfassen die ursprüngliche, zu amplifizierende Nucleinsäuresequenz, den komplementären zweiten Strang der ursprünglichen, zu amplifizierenden Nucleinsäuresequenz und beide Stränge einer Kopie der ursprünglichen Sequenz, die durch die Amplifikationsreaktion hergestellt wird. Diese Kopien dienen als amplifizierbare Ziele, und zwar aufgrund der Tatsache, dass sie Kopien der Sequenz, mit welcher die Amplifikationsprimer hybridisieren, enthalten.

[0008] Kopien der Zielsequenz, welche während der Amplifikationsreaktion erzeugt werden, werden als Amplifikationsprodukte, Amplimere oder Amplikone bezeichnet.

[0009] Der Begriff Verlängerungsprodukt bezieht sich auf die Kopie einer Zielsequenz, welche durch Hybridisierung eines Primers und Verlängerung des Primers durch Polymerase hergestellt wird, wobei die Zielsequenz als Matrize verwendet wird.

[0010] Der Begriff artspezifisch bezieht sich auf die Detektion, Amplifikation oder Oligonucleotidhybridisierung bei einer Spezies eines Organismus oder einer Gruppe von verwandten Spezien ohne wesentliche Detektion, Amplifikation oder Oligonucleotidhybridisierung bei anderen Spezien derselben Gattung oder Spezien einer anderen Gattung.

[0011] Der Begriff Analysesonde bezieht sich auf jedes Oligonucleotid, das zur Ermöglichung der Detektion oder Identifikation einer Nucleinsäure verwendet wird. Detektorsonden, Detektorprimer, Einfangsonden, Signalprimer und Reportersonden, wie untenstehend beschrieben, sind Beispiele für Analysesonden.

[0012] Der Begriff Amplikon bezieht sich auf das Produkt der Amplifikationsreaktion, welches durch Verlängerung eines oder beider Primer eines Amplifikationsprimerpaars hergestellt wird. Ein Amplikon kann exponentiell amplifizierte Nucleinsäuren enthalten, wenn beide Primer, die verwendet werden, mit einer Zielsequenz hybridisieren. Alternativ können Amplikone durch eine lineare Amplifikation hergestellt werden, wenn einer der verwendeten Primer nicht mit der Zielsequenz hybridisiert. Somit wird dieser Begriff hier gattungsmäßig verwendet und impliziert nicht die Gegenwart exponentiell amplifizierter Nucleinsäuren.

[0013] Ein mikroelektronischer Array (oder elektronischer Mikroarray) ist eine Vorrichtung mit einem Array elektronisch selbstadressierbarer mikroskopischer Positionen. Jede mikroskopische Position enthält eine zugrundeliegende, von einem Substrat getragene Betriebsgleichstrom (DC)-Mikroelektrode. Die Oberfläche jeder Mikroposition besitzt eine Permeationsschicht für den freien Transport kleiner Gegenione und eine Befestigungsschicht für die kovalente Koppelung spezifischer Bindungseinheiten.

[0014] Ein Array oder eine Matrix ist eine Anordnung von Positionen auf der Vorrichtung. Die Positionen können in zweidimensionalen Arrays, dreidimensionalen Arrays oder anderen Matrixformaten angeordnet sein. Die Anzahl der Positionen kann von einigen Tausenden bis zu mindestens Hunderttausenden reichen.

[0015] Das elektronische Adressieren (oder Abzielen) ist das Platzieren geladener Moleküle an spezifischen Teststellen. Da DNA eine starke negative Ladung aufweist, kann sie elektronisch in einen Bereich positiver Ladung bewegt werden. Eine Teststelle oder eine Reihe von Teststellen am Mikrochip wird mit einer positiven Ladung elektronisch aktiviert. Eine Lösung von DNA-Sonden wird auf den Mikrochip aufgebracht. Die negativ geladenen Sonden bewegen sich rasch zu den positiv geladenen Stellen, wo sie sich konzentrieren und chemisch an diese Stelle gebunden werden. Der Mikrochip wird danach gewaschen, und eine andere Lösung verschiedener DNA-Sonden kann hinzugefügt werden. Seite an Seite, Reihe an Reihe kann ein Array spezifisch gebundener DNA-Sonden am Mikrochip zusammengebaut oder adressiert werden. Mit der Fähigkeit, Einfangsonden elektronisch an spezifische Stellen zu adressieren, ermöglicht das System die Herstellung individuell angefertigter Arrays durch die Platzierung spezifischer Einfangsonden am Mikrochip. In diesem Zusammenhang bezieht sich der Begriff „elektronisch adressierbar" auf die Fähigkeit eines Mikrochips, durch elektronisches Vorspannen der Einfangstellen des Chips Materialien wie Nucleinsäuren und Enzyme sowie andere Amplifikationskomponenten von einer Position am Mikrochip zu einer anderen zu lenken. „Elektronisches Vorspannen" soll bedeuten, dass die elektronische Ladung an einer Einfangstelle oder einer anderen Position am Mikrochip zwischen einer positiven und einer negativen Gesamtladung manipuliert werden kann, so dass Moleküle, die sich in Lösung und in Kontakt mit dem Mikrochip befinden, in eine oder aus einer Position am Mikrochip oder von einer Position zur anderen gelenkt werden können.

[0016] Bei der elektronischen Konzentration und der Hybridisierung wird eine Elektronik eingesetzt, um Zielmoleküle zu einer oder mehreren Teststellen (oder Einfangstellen) am Mikrochip zu bewegen und dort zu konzentrieren. Die elektronische Konzentration einer Proben-DNA an jeder Teststelle fördert die rasche Hybridisierung von Proben-DNA mit komplementären Einfangsonden. Im Gegensatz zum passiven Hybridisierungsverfahren bietet das elektronische Konzentrationsverfahren den eindeutigen Vorteil, die Hybridisierungsgeschwindigkeit beträchtlich zu steigern. Um jegliche ungebundene oder unspezifisch gebundene DNA von jeder Stelle zu entfernen, wird die Polarität oder Ladung der Stelle ins Negative umgekehrt, wodurch jegliche ungebundene oder unspezifisch gebundene DNA weg von den Einfangsonden zurück in eine Lösung gezwungen wird. Da die Testmoleküle über der Teststelle elektronisch konzentriert werden, ist zudem eine niedrigere Kon-

zentration an Ziel-DNA-Molekülen erforderlich, wodurch die Zeit und der Arbeitsaufwand, die ansonsten zur Herstellung einer Vortestprobe erforderlich wären, verringert werden. Der Begriff „Einfangstelle" bezieht sich auf eine spezifische Position auf einem elektronisch adressierbaren Mikrochip, wo eine elektronische Vorspannung ausgelöst wird und Moleküle, wie z. B. Nucleinsäuresonden und Zielmoleküle, durch eine solche Vorspannung angezogen oder adressiert werden.

[0017] Eine elektronische Stringenzkontrolle ist die Umkehrung des elektrischen Potentials, um ungebundene und unspezifisch gebundene DNA rasch und leicht als Teil des Hybridisierungsverfahrens zu entfernen. Eine elektronische Stringenz schafft eine Qualitätskontrolle für das Hybridisierungsverfahren und stellt sicher, dass alle gebundenen DNA-Paare wirklich komplementär sind. Die Präzision, Kontrolle und Genauigkeit einer Plattformtechnologie ermöglichen durch die Anwendung einer kontrollierten Abgabe von Strom im elektronischen Stringenzverfahren die Detektion einzelner Punktmutationen, einzelner Basenpaar-Fehlpaarungen oder anderer genetischer Mutationen, welche bei einer Reihe von Diagnose- und Forschungsanwendungen signifikante Auswirkungen haben können. Eine elektronische Stringenz wird ohne die mühsame Verarbeitung und Handhabung erreicht, welche ansonsten erforderlich ist, um dieselben Ergebnisse durch herkömmliche Verfahren zu erzielen. Im Gegensatz zu passiven Arrays kann diese Technologie sowohl kurze als auch lange einzelsträngige DNA-Fragmente aufnehmen. Die Verwendung längerer Sonden steigert die Gewissheit, dass die DNA, welche mit der Einfangsonde hybridisiert, das richtige Ziel ist. Eine elektronische Stringenzkontrolle reduziert im Verhältnis zu herkömmlichen DNA-Arrays die erforderliche Anzahl an Sonden und daher an Teststellen am Mikrochip. Im Gegensatz dazu sind traditionelle passive Hybridisierungsverfahren schwierig zu steuern und erfordern mehr Replikate jeder möglichen Basenpaarübereinstimmung, so dass korrekte Übereinstimmungen sicher identifiziert werden können.

[0018] Ein elektronisches Multiplexen erlaubt die gleichzeitige Analyse mehrerer Tests aus einer einzigen Probe. Das elektronische Multiplexen wird durch die Fähigkeit, individuelle Teststellen unabhängig (für das Adressieren von Einfangsonden oder Einfangmolekülen und Konzentrieren von Testprobenmolekülen) zu steuern, ermöglicht, wodurch die gleichzeitige Verwendung biochemisch nicht verwandter Moleküle am selben Mikrochip gestattet wird. Die Stellen auf einem herkömmlichen DNA-Array können nicht individuell gesteuert werden, und daher müssen am gesamten Array dieselben Verfahrensschritte durchgeführt werden. Die Anwendung von Elektronik bei dieser Technologie liefert im Vergleich zu solchen herkömmlichen Verfahren eine erhöhte Vielseitigkeit und Flexibilität.

## KURZFASSUNG DER ERFINDUNG

[0019] Die vorliegende Erfindung stellt Oligonucleotidprimer bereit, welche zur Amplifikation der sodB-Zielsequenzen, die in C. jejuni und C. coli gefunden werden, verwendet werden können. Genauer gesagt, die Zielsequenz umfasst Segmente des sodB-Gens. Die Amplifikationsprimer wurden für eine hocheffiziente, hochspezifische Amplifikation bei erhöhten Temperaturen, wie z. B. bei der thermophilen SDA und der PCR, entworfen, allerdings sind sie auch bei Amplifikationsreaktionen mit niedrigeren Temperaturen, wie z. B. der herkömmlichen SDA, 3SR oder NASBA, nützlich. Oligonucleotidassay-Sonden, welche mit dem Assaybereich des amplifizierten Ziels hybridisieren, werden zum Nachweisen der Amplifikationsprodukte eingesetzt.

[0020] Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können nach einer Kultivierung als Mittel zum Bestätigen der Identität des kultivierten Organismus eingesetzt werden. Alternativ können sie bei klinischen Proben von Mensch oder Tier, wie z. B. Fäkalmaterial, oder bei verseuchten Lebensmittel- oder Wasserproben für die Detektion und Identifikation der C. jejuni- und C. coli sodB-Nucleinsäure verwendet werden, wobei bekannte Amplifikationsverfahren zur Anwendung kommen. In jedem Fall schaffen die erfinderischen Oligonucleotide und Analyseverfahren ein Mittel zum raschen Unterscheiden zwischen C. jejuni oder C. coli und anderen Mikroorganismen, wodurch dem praktischen Anwender die rasche Identifizierung dieses Mikroorganismus ohne Zurückgreifen auf die traditionelleren Verfahrensweisen, auf die man gewöhnlich angewiesen ist, ermöglicht wird. Eine derartige rasche Identifizierung des an einer Infektion beteiligten, spezifischen ätiologischen Mittels liefert Informationen, welche zur Festlegung einer geeigneten Therapie innerhalb eines kurzen Zeitraums verwendet werden können.

## ZUSAMMENFASSUNG DER SEQUENZEN

[0021] SEQ ID NOs: 1–3 sind Sequenzen von Oligonucleotiden, welche als stromaufwärtige Primer für die Amplifikation des C. jejuni- und C. coli sodB-Gens verwendet werden. SEQ ID NOs: 4–6 sind Sequenzen von Oligonucleotiden, welche als stromabwärtige Primer für die Amplifikation des C. jejuni- und C. coli sodB-Gens verwendet werden. SEQ ID NO: 7 ist die Sequenz eines Oligonucleotids, welches als stromaufwärtiger Bumper für eine SDA-Amplifikation verwendet wird. SEQ ID NO: 8 ist die Sequenz eines Oligonucleotids, welches als stromabwärtiger Bumper für eine SDA-Amplifikation verwendet wird. SEQ ID NOs: 9–10 sind Sequenzen von Detektor-Oligonucleotiden (Sonden oder Reporter) für das C. jejuni- und C. coli sodB-Gen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0022] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Oligonucleotide, Amplifikationsprimer und Analysesonden, die bei Nucleinsäure-Amplifikationsreaktionen eine Campylobacter jejuni- und C. coli-Spezifität aufweisen. Ebenso werden Verfahren zum Nachweisen und Identifizieren von C. jejuni- und C. coli sodB-Nucleinsäuren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Oligonucleotide bereitgestellt. Die bevorzugten Verfahren bestehen darin, eine SDA, eine tSDA oder eine homogene Echtzeit-Fluoreszenz-tSDA einzusetzen. Diese Verfahren sind dem Fachmann aus Referenzen wie dem U.S.-Patent Nr. 5,547,861, dem U.S.-Patent Nr. 5,648,211, dem U.S.-Patent Nr. 5,846,726 und der U.S.-Patentanmeldung mit Seriennummer 08/865,675, eingereicht am 30. Mai 1997, bekannt. Die Verwendung mikroelektronischer Arrays für die Analyse von Nucleinsäuren ist dem Fachmann aus Referenzen wie dem U.S.-Patent Nr. 5,605,662 und dem U.S.-Patent Nr. 5,632,957 sowie den veröffentlichten PCT-Anmeldungen Nr. WO 96/01836 und WO 97/12030 bekannt.

[0023] Die erfindungsgemäßen Primer wurden auf Basis der bei GenBank erhältlichen, genomischen sodB-Sequenzen entworfen. Die Sequenzen für C. jejuni, C. coli, Helicobacter pylori und Escherichia coli wurden verglichen. Diese Sequenzen wurden aufbereitet und mit der GeneWorks-Software abgeglichen, um die Sequenzhomologie zu bestimmen. Bei den Untersuchungen der DNA-Abgleichung wurde ein 600-Basenpaar-Bereich mit einer 89%igen Homologie zwischen C. jejuni und C. coli identifiziert. Primer, die für die Verwendung bei der SDA entwickelt wurden, werden in Tabelle 1 gezeigt. Ebenso werden Sonden für die Detektion der resultierenden Amplikone gezeigt. Die beispielhaften Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstellen (BsoBI) in den Amplifikationsprimern sind fettgedruckt dargestellt, und die Zielbindesequenzen sind kursiv. Die Zielbindesequenz eines Amplifikationsprimers bestimmt dessen Zielspezifität.

TABELLE 1
Amplifikations-Oligonucleotide

Stromaufwärtige Primer

AL46: 5'-CGATTCCGCTCC AGACTT**CTCGGG***CAGGATGGTTTTGGTT* (SEQ ID NO:1)

AL44: 5'-CGATTCCGCTCCAGACTT**CTCGGG***CAGGATGGTTTTGGT* (SEQ ID NO:2)

AL42: 5'-CGATTCCGCTCCAGACTT**CTCGGG***CAGGATGGTTTTGG* (SEQ ID NO:3)

Stromabwärtige Primer

AR48: 5'-ACCGCATCGAATGCATGT**CTCGGG***GAAGTACCTACAAATTCT* (SEQ ID NO:4)

AR44: 5'-ACCGCATCGAATGCATGT**CTCGGG***AAGTACCTACAAATTCT* (SEQ ID NO:5)

AR42: 5'-ACCGCATCGAATGCATGT**CTCGGG***AGTACCTACAAATTCT* (SEQ ID NO:6)

Stromaufwärtiger Bumper

BL42: 5'-ACAGGAGTTTTTGGTT (SEQ ID NO:7)

Stromabwärtiger Bumper

BR42: 5'-AATAGGTGTAGCTGC (SEQ ID NO:8)

Detektorsonden

DL52: 5'-GGTTAGTTTATAATACT (SEQ ID NO:9)

DR48: 5'-CTAGTTTTTGATTTTTAGT (SEQ ID NO:10)

[0024] Da Nucleinsäuren zum Hybridisieren keine vollständige Komplementarität benötigen, ist zu verstehen,

dass die Sonde und die Primersequenzen, welche hier geoffenbart sind, in einem gewissen Ausmaß ohne Verlust an Nützlichkeit als C. jejuni- und C. colispezifische Sonden und Primer modifiziert werden können. Wie im Stand der Technik bekannt, kann die Hybridisierung komplementärer und teilweise komplementärer Nucleinsäuresequenzen durch Anpassung der Hybridisierungsbedingungen zur Steigerung oder Verringerung der Stringenz (d. h. Anpassung von pH, Hybridisierungstemperatur oder Salzgehalt des Puffers) erzielt werden. Derartige geringfügige Modifikationen der geoffenbarten Sequenzen und alle notwendigen Anpassungen der Hybridisierungsbedingungen zur Bewahrung einer C. jejuni- und C. coli-Spezifität erfordern nur routinemäßiges Experimentieren und liegen innerhalb durchschnittlicher Fachkenntnisse.

[0025] Die Amplifikationsprodukte, welche unter Verwendung der hier geoffenbarten Primer hergestellt werden, können anhand einer charakteristischen Größe, beispielsweise auf mit Ethidiumbromid gefärbten Polyacrylamid- oder Agarosegels, detektiert werden. Alternativ können amplifizierte Zielsequenzen mittels einer Analysesonde, die ein mit einer nachweisbaren Markierung versehenes Oligonucleotid ist, detektiert werden. Bei einer Ausführungsform kann zumindest eine markierte Analysesonde zum Detektieren amplifizierter Zielsequenzen durch Hybridisierung (eine Detektorsonde), durch Hybridisierung und Verlängerung, wie von Walker et al. (1992, Nucl. Acids Res. 20: 1691-1696) beschrieben (ein Detektor-Primer), oder durch Hybridisierung, Verlängerung und Umwandlung in die doppelsträngige Form, wie in der EP 0 678 582 beschrieben (ein Signalprimer), eingesetzt werden. SEQ ID 9 und SEQ ID 10 sind in Verbindung mit den erfindungsgemäßen Amplifikationsprimern besonders nützlich als Detektor-Primer, d. h.

[0026] Primerverlängerungs-Detektorsonden, für die Detektion von C. jejuni und C. coli. Vorzugsweise wird die Analysesonde dazu ausgewählt, mit einer Sequenz im Ziel, welche sich zwischen den Amplifikationsprimern befindet, zu hybridisieren, d. h., sie sollte eine interne Analysesonde sein. Alternativ kann ein Amplifikationsprimer oder die Zielbindesequenz davon als Analysesonde eingesetzt werden.

[0027] Die nachweisbare Markierung der Analysesonde ist ein Rest, der als Hinweis auf die Gegenwart der Zielnucleinsäure entweder direkt oder indirekt detektiert werden kann. Für die direkte Detektion der Markierung können die Analysesonden mit einem Radioisotop gekennzeichnet und mittels Autoradiographie detektiert oder mit einem fluoreszierenden Rest gekennzeichnet und mittels Fluoreszenz detektiert werden, wie im Stand der Technik bekannt. Alternativ können die Analysesonden indirekt detektiert werden, indem sie mit einer Markierung versehen werden, die, um nachweisbar gemacht zu werden, zusätzliche Reagenzien benötigt. Indirekt nachweisbare Markierungen umfassen beispielsweise chemilumineszierende Mittel, Enzyme, die sichtbare Reaktionsprodukte produzieren, und Liganden (z. B. Haptene, Antikörper oder Antigene), die durch Bindung an markierte spezifische Bindungspartner (z. B. Antikörper oder Antigene/Haptene) detektiert werden können. Liganden sind auch nützlich für die Immobilisierung des Ligand-markierten Oligonucleotids (der Einfangsonde) auf einer festen Phase, um dessen Detektion zu ermöglichen. Besonders nützliche Markierungen umfassen Biotin (nachweisbar durch Bindung an markiertes Avidin oder Streptavidin) und Enzyme, wie z. B. Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase (nachweisbar durch Zugabe von Enzymsubstraten zwecks Herstellung gefärbter Reaktionsprodukte). Verfahren zum Hinzufügen solcher Markierungen zu oder zum Einschließen solcher Markierungen in Oligonucleotiden sind im Stand der Technik wohlbekannt, und jedes dieser Verfahren ist zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung geeignet.

[0028] Beispiele für spezifische Detektionsverfahren, die angewandt werden können, umfassen ein Chemilumineszenzverfahren, bei dem amplifizierte Produkte unter Verwendung einer biotinylierten Einfangsonde und einer Enzym-konjugierten Detektorsonde detektiert werden, wie im U.S.-Patent Nr. 5,470,723 beschrieben. Nach der Hybridisierung dieser beiden Analysesonden mit verschiedenen Stellen im Analysebereich der Zielsequenz (zwischen den Bindungsstellen der beiden Amplifikationsprimer) wird der Komplex mittels der Einfangsonde auf einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiter-Platte eingefangen und wird das chemilumineszierende Signal entwickelt und in einem Luminometer gelesen. Als weitere Alternative für die Detektion von Amplifikationsprodukten kann ein Signalprimer, wie in der EP 0 678 582 beschrieben, in die SDA-Reaktion einbezogen werden. Bei dieser Ausführungsform werden markierte sekundäre Amplifikationsprodukte während der SDA in zielamplifikationsabhängiger Weise hergestellt und können mittels der dazugehörigen Markierung als Hinweis auf eine Zielamplifikation nachgewiesen werden.

[0029] Aus Gründen des kommerziellen Komforts können die Amplifikationsprimer für die spezifische Detektion und Identifikation von Nucleinsäuren in Form einer Ausstattung verpackt sein. Typischerweise enthält eine solche Ausstattung zumindest ein Paar von Amplifikationsprimern. Reagenzien zum Durchführen einer Nucleinsäure-Amplifikationsreaktion können bei den zielspezifischen Amplifikationsprimern ebenfalls inkludiert sein, beispielsweise Puffer, zusätzliche Primer, Nucleotidtriphosphate, Enzyme etc.. Die Bestandteile der Ausstattung sind in einem gemeinsamen Behälter zusammengepackt, wobei gegebenenfalls Instruktionen zur Durchführung einer spezifischen Ausführungsform der erfinderischen Methoden inbegriffen sind. Andere nicht vorgeschriebene Bestandteile können ebenfalls in der Ausstattung enthalten sein, z. B. ein Oligonucleotid, das mit einer Markierung versehen ist, welche für die Verwendung als Analysesonde geeignet ist, und/oder Reagenzien oder Mittel zum Detektieren der Markierung.

[0030] Die Zielbindesequenzen der Amplifikationsprimer verleihen den Oligonucleotiden eine Spezies-Hybri-

disierungsspezifität und bringen daher eine Artspezifität in die Amplifikationsreaktion ein. Somit sind die Zielbindesequenzen der Amplifikationsprimer der Erfindung auch in anderen Nucleinsäureamplifikationsprotokollen, wie z. B. der PCR, einer herkömmlichen SDA (ein Reaktionsschema, das im Wesentlichen dasselbe ist wie jenes einer thermophilen SDA, jedoch bei niedrigeren Temperaturen unter Verwendung mesophiler Enzyme durchgeführt wird), einer 3SR, NASBA und TAS, nützlich. Im Spezifschen können bei jeglichem Amplifikationsprotokoll, das eine cyclische, spezifische Hybridisierung von Primern mit der Zielsequenz, eine Verlängerung der Primer unter Verwendung der Zielsequenz als Matrize und eine Trennung oder Verdrängung der Verlängerungsprodukte von bzw. aus der Zielsequenz einsetzt, die erfindungsgemäßen Zielbindesequenzen zur Anwendung kommen. Für Amplifikationsverfahren, die keine spezialisierten Nichtziel-bindenden Sequenzen benötigen (z. B. PCR), können die Amplifikationsprimer nur aus den Zielbindesequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Amplifikationsprimer bestehen.

[0031] Andere Sequenzen, die für die Durchführung einer ausgewählten Amplifikationsreaktion benötigt werden, können gegebenenfalls zu den hier geoffenbarten Zielbindesequenzen hinzugefügt werden, ohne die Artspezifität des Oligonucleotids zu verändern. Als Beispiel können die spezifischen Amplifikationsprimer eine Erkennungsstelle für die Restriktions-Endonuclease BsoBI enthalten, an welcher während der SDA-Reaktion Einzelstrangbrüche eingeführt werden. Dem Fachmann ist offensichtlich, dass die BsoBI-Erkennungsstelle, an der Einzelstrangbrüche eingeführt werden können, durch andere Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstellen ersetzt werden kann, und zwar einschließlich jener Erkennungsstellen, die in der EP 0 684 315 geoffenbart sind, ohne auf diese beschränkt zu sein. Vorzugsweise besteht die Erkennungsstelle für eine thermophile Restriktions-Endonuclease, so dass die Amplifikationsreaktion unter den Bedingungen einer thermophilen SDA (tSDA) durchgeführt werden kann. Gleichermaßen ist die Schwanzsequenz des Amplifikationsprimers (5' zur Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstelle) im Allgemeinen nicht entscheidend, obwohl die für eine SDA verwendete Restriktions-Schnittstelle und Sequenzen, welche entweder mit ihrer eigenen Zielbindesequenz oder mit den anderen Primern hybridisieren, vermieden werden sollten. Manche Amplifikationsprimer für die SDA bestehen daher aus 3'-Zielbindesequenzen, einer Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstelle 5' zur Zielbindesequenz, an der Einzelstrangbrüche eingeführt werden können, und einer etwa 10-25 Nucleotide langen Schwanzsequenz 5' zur Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstelle. Die Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstelle, an der Einzelstrangbrüche eingeführt werden können, und die Schwanzsequenz sind Sequenzen, welche für die SDA-Reaktion erforderlich sind. Für andere Amplifikationsreaktionen (z. B. 3SR, NASBA und TAS) können die Amplifikationsprimer aus der Zielbindesequenz und zusätzlichen Sequenzen bestehen, welche für die ausgewählte Amplifikationsreaktion erforderlich sind (z. B. für die SDA benötigte Sequenzen, wie obenstehend beschrieben, oder ein von RNA-Polymerase erkannter Promotor für die 3SR). Bei der Anpassung der erfindungsgemäßen Zielbindesequenzen an andere Amplifikationsverfahren als die SDA werden Routineverfahren zur Herstellung von Amplifikationsprimern, wie z. B. eine chemische Synthese, sowie die wohlbekannten strukturellen Anforderungen für die Primer der ausgewählten Amplifikationsreaktion eingesetzt. Die erfindungsgemäßen Zielbindesequenzen können daher bei einer Vielfalt von Amplifikationsreaktionen leicht an eine C. jejuni- und C. coli-spezifische Zielamplifikation und Detektion angepasst werden, wobei für Produktion, Screening und Optimierung nur Routineverfahren eingesetzt werden.

[0032] Bei einer SDA sind die Bumperprimer für die Artspezifität nicht wesentlich, da sie dahingehend funktionieren, die stromabwärtigen artspezifischen Amplifikationsprimer zu verdrängen. Es ist nur erforderlich, dass die Bumperprimer mit dem Ziel stromaufwärts von den Amplifikationsprimern hybridisieren, so dass sie, wenn sie verlängert werden, den Amplifikationsprimer und sein Verlängerungsprodukt verdrängen. Die bestimmte Sequenz des Bumperprimers ist daher im Allgemeinen nicht entscheidend und kann von jeglicher stromaufwärtiger Zielsequenz abgeleitet werden, welche ausreichend nahe an der Bindungsstelle des Amplifikationsprimers liegt, um eine Verdrängung des Amplifikationsprimer-Verlängerungsprodukts nach der Verlängerung des Bumperprimers zu ermöglichen. Gelegentliche Fehlpaarungen mit dem Ziel in der Bumperprimersequenz oder eine gewisse Kreuzhybridisierung mit Nichtzielsequenzen beeinflussen die Amplifikationseffizienz im Allgemeinen nicht negativ, so lange der Bumperprimer in der Lage bleibt, mit der spezifischen Zielsequenz zu hybridisieren.

[0033] Amplifikationsreaktionen, bei denen die erfindungsgemäßen Primer eingesetzt werden, können Thymin umfassen, wie von Walker et al. (1992, Nucl. Acids Res. 20: 1691-1696) gelehrt, oder können in der Reaktion 2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat ganz oder teilweise durch TTP ersetzen, um eine Querkontamination nachfolgender Amplifikationsreaktionen zu verringern, wie z. B. in der EP 0 624 643 gelehrt. dU (Uridin) wird in Amplifikationsprodukte eingebaut und kann durch eine Behandlung mit Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) herausgeschnitten werden. Diese abasischen Stellen machen das Amplifikationsprodukt in nachfolgenden Amplifikationsreaktionen unamplifizierbar. UDG kann vor der Durchführung der nachfolgenden Amplifikation durch einen Uracil-DNA-Glycosylase-Inhibitor (UGI) inaktiviert werden, um das Herausschneiden von dU in den neu gebildeten Amplifikationsprodukten zu verhindern.

[0034] Die Strangverdrängungsamplifikation (SDA) ist ein isothermes Verfahren der Nucleinsäureamplifikation, bei dem die Verlängerung von Primern, das Einführen von Einzelstrangbrüchen an einer hemimodifizierten

Restriktions-Endonuclease-Erkennungs-/Spaltstelle, das Verdrängen einzelsträngiger Verlängerungsprodukte, das Reassoziieren von Primern mit den Verlängerungsprodukten (oder der ursprünglichen Zielsequenz) und die nachfolgende Verlängerung der Primer gleichzeitig im Reaktionsgemisch stattfinden. Dies steht im Gegensatz zur Polymerasekettenreaktion (PCR), bei der die Reaktionsschritte als Ergebnis des für die Reaktion charakteristischen Temperaturwechsels in getrennten Phasen oder Zyklen stattfinden. Eine SDA beruht auf 1) der Fähigkeit einer Restriktions-Endonuclease, am unmodifizierten Strang einer Hemiphosphorthioat-Form ihrer doppelsträngigen Erkennungs-/Spaltstelle Einzelstrangbrüche einzuführen, und 2) der Fähigkeit bestimmter Polymerasen, eine Replikation am Einzelstrangbruch zu initiieren und den stromabwärtigen Nicht-Matrizen-Strang zu verdrängen. Nach einer anfänglichen Inkubation bei erhöhter Temperatur (etwa 95°C), um die doppelsträngigen Zielsequenzen zwecks Reassoziierung der Primer zu denaturieren, finden die anschließende Polymerisation und Verdrängung neu synthetisierter Stränge bei konstanter Temperatur statt. Die Herstellung jeder neuen Kopie der Zielsequenz besteht aus fünf Stufen: 1) das Binden von Amplifikationsprimern an eine ursprüngliche Zielsequenz oder ein zuvor polymerisiertes, verdrängtes, einzelsträngiges Verlängerungsprodukt, 2) die Verlängerung der Primer durch eine 5'-3'-Exonuclease-defiziente Polymerase, die ein α-Thiodesoxynucleosidtriphosphat (αthio dNTP) enthält, 3) das Einführen von Einzelstrangbrüchen an einer hemimodifizierten doppelsträngigen Restriktions-Schnittstelle, 4) die Dissoziation des Restriktionsenzyms von der Einzelstrangbruchstelle und 5) die Verlängerung vom 3'-Ende des Einzelstrangbruchs weg, durch die 5'-3'-Exonuclease-defiziente Polymerase, mit einer Verdrängung des stromabwärts gelegenen, neu synthetisierten Strangs. Das Einführen von Einzelstrangbrüchen, die Polymerisation und die Verdrängung finden gleichzeitig und kontinuierlich bei konstanter Temperatur statt, da die Verlängerung vom Einzelstrangbruch weg eine weitere Restriktions-Schnittstelle, an der Einzelstrangbrüche eingeführt werden können, neu bildet. Wenn ein Paar von Amplifikationsprimern verwendet wird, von denen jeder mit einem der zwei Stränge einer doppelsträngigen Zielsequenz hybridisiert, so ist die Amplifikation exponentiell. Und zwar deshalb, weil die Sinn- und Antisinn-Stränge in anschließenden Amplifikationsdurchgängen als Matrizen für den entgegengesetzten Primer dienen. Bei Verwendung eines einzelnen Amplifikationsprimers ist die Amplifikation linear, da nur ein Strang als Matrize für die Primerverlängerung dient. Beispiele für Restriktions-Endonucleasen, die an ihren doppelsträngigen Erkennungs-/Spaltstellen Einzelstrangbrüche einführen, wenn ein α-thio dNTP eingebaut ist, sind HincII, HindII, AvaI, NciI und Fnu4HI. All diese Restriktions-Endonucleasen und andere, welche die erforderliche Aktivität des Einzelstrangbrüche-Einführens zeigen, sind für eine Verwendung bei der herkömmlichen SDA geeignet. Sie sind jedoch relativ thermolabil und verlieren bei über etwa 40°C an Aktivität.

[0035] Ziele für eine Amplifikation mittels SDA können durch die Fragmentierung größerer Nucleinsäuren mittels Restriktion mit einer Endonuclease, welche die Zielsequenz nicht schneidet, vorbereitet werden. Es wird jedoch im Allgemeinen bevorzugt, dass die Zielnucleinsäuren, welche ausgewählte Restriktions-Endonuclease-Erkennungs-/Spaltstellen zum Einführen von Einzelstrangbrüchen in der SDA-Reaktion aufweisen, erzeugt werden, wie es bei Walker et al. (1992, Nucl. Acids Res. 20: 1691–1696) und im U.S. Patent Nr. 5,270,184 beschrieben ist. Kurz gesagt, wenn die Zielsequenz doppelsträngig ist, werden vier Primer mit ihr hybridisiert. Zwei der Primer ($S_1$ und $S_2$) sind SDA-Amplifikationsprimer und zwei ($B_1$ und $B_2$) sind externe oder Bumperprimer. $S_1$ und $S_2$ binden an entgegengesetzte Stränge von die Zielsequenz flankierenden, doppelsträngigen Nucleinsäuren. $B_1$ und $B_2$ binden an die Zielsequenz 5' (d. h. stromaufwärts) von $S_1$ bzw. $S_2$. Die Exonucleasedefiziente Polymerase wird dann dazu verwendet, alle vier Primer in Gegenwart dreier Desoxynucleosidtriphosphate und mindestens eines modifizierten Desoxynucleosidtriphosphats (z. B. 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(1-thiotriphosphat), „dATPαS") gleichzeitig zu verlängern. Die Verlängerungsprodukte von $S_1$ und $S_2$ werden dabei durch Verlängerung von $B_1$ und $B_2$ von der ursprünglichen Zielsequenzmatrize verdrängt. Die verdrängten, einzelsträngigen Verlängerungsprodukte der Amplifikationsprimer dienen als Ziele für die Bindung des entgegengesetzten Amplifikations- und Bumperprimers (z. B. bindet das Verlängerungsprodukt von $S_1$ $S_2$ und $B_2$). Der nächste Zyklus von Verlängerung und Verdrängung führt zu zwei doppelsträngigen Nucleinsäurefragmenten mit hemimodifizierten Restriktions-Endonuclease-Erkennungs-/Spaltstellen an jedem Ende. Diese sind geeignete Substrate für eine Amplifikation mittels SDA. Wie bei der SDA finden die einzelnen Schritte der Zielbildungsreaktion gleichzeitig und kontinuierlich statt, wobei Zielsequenzen mit den Erkennungs-/Spaltsequenzen an den Enden erzeugt werden, welche für das Einführen von Einzelstrangbrüchen durch das Restriktionsenzym bei der SDA erforderlich sind. Da alle Komponenten der SDA-Reaktion bereits bei der Zielbildungsreaktion vorhanden sind, treten erzeugte Zielsequenzen automatisch und kontinuierlich in den SDA-Zyklus ein und werden amplifiziert.

[0036] Um eine Querkontamination einer SDA-Reaktion durch die Amplifikationsprodukte einer anderen zu verhindern, kann dUTP anstelle von dTTP in die SDA-amplifizierte DNA ohne Hemmung der Amplifikationsreaktion eingebaut werden. Die Uracil-modifizierten Nucleinsäuren können dann spezifisch erkannt und durch Behandlung mit Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) inaktiviert werden. Wenn daher dUTP in einer früheren Reaktion in SDA-amplifizierte DNA eingebaut wird, kann jede anschließende SDA-Reaktion vor der Amplifikation doppelsträngiger Ziele mit UDG behandelt und jede dU-haltige DNA aus vorher amplifizierten Reaktionen nicht amplifizierbar gemacht werden. Die Ziel-DNA, die in der anschließenden Reaktion amplifiziert werden soll, ent-

hält kein dU und wird durch die UDG-Behandlung nicht beeinflusst. UDG kann dann vor der Amplifikation des Ziels durch eine Behandlung mit UGI gehemmt werden. Alternativ kann UDG hitzeinaktiviert werden. Bei einer thermophilen SDA kann die höhere Reaktionstemperatur selbst (≥ 50°C) zur gleichzeitigen UDG-Inaktivierung und Amplifikation des Ziels verwendet werden.

[0037] Die SDA verlangt eine Polymerase, die keine 5'-3'-Exonucleaseaktivität aufweist, in doppelsträngigen Nucleinsäuren eine Polymerisation an einem Einzelstrangbruch initiiert und den stromabwärts vom Einzelstrangbruch gelegenen Strang verdrängt, während unter Verwendung desjenigen Stranges als Matrize, in dem keine Einzelstrangbrüche eingeführt wurden, ein neuer komplementärer Strang gebildet wird. Die Polymerase muss durch das Hinzufügen von Nucleotiden zu einem freien 3'-OH verlängern. Um die SDA-Reaktion zu optimieren, ist es auch wünschenswert, dass die Polymerase hoch arbeitsprogressiv ist, um die Länge der Zielsequenz, die amplifiziert werden kann, zu maximieren. Hoch arbeitsprogressive Polymerasen können neue Stränge von bedeutender Länge vor dem Dissoziieren und dem Beenden einer Synthese des Verlängerungsprodukts polymerisieren. Die Verdrängungsaktivität ist für die Amplifikationsreaktion wesentlich, da sie das Ziel für die Synthese zusätzlicher Kopien verfügbar macht und das einzelsträngige Verlängerungsprodukt erzeugt, mit dem ein zweiter Amplifikationsprimer in exponentiellen Amplifikationsreaktionen hybridisieren kann. Die Aktivität des Einzelstrangbrüche-Einführens des Restriktionsenzyms ist ebenfalls von großer Bedeutung, da es das Einführen von Einzelstrangbrüchen ist, das die Reaktion aufrechterhält und anschließenden Zielamplifikationsdurchgängen erlaubt zu starten.

[0038] Die thermophile SDA wird im Wesentlichen wie die von Walker et al. beschriebene herkömmliche SDA (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 392–396 und 1992 Nucl. Acids Res., 20: 1691–1696) durchgeführt, mit einer Substitution der erwünschten thermostabilen Polymerase und thermostabilen Restriktions-Endonuclease. Natürlich wird die Temperatur der Reaktion an die für die substituierten Enzyme geeignete, höhere Temperatur angepasst und wird die HincII-Restriktions-Endonuclease-Erkennungs-/Spaltstelle durch die für die ausgewählte thermostabile Endonuclease passende Restriktions-Endonuclease-Erkennungs-/Spaltstelle ersetzt. Ebenfalls im Gegensatz zu Walker et al. kann der praktische Anwender die Enzyme vor dem anfänglichen Denaturierungsschritt in das Reaktionsgemisch einbringen, wenn diese bei der Denaturierungstemperatur ausreichend stabil sind. Bevorzugte Restriktions-Endonucleasen zur Verwendung bei der thermophilen SDA sind BsrI, BstNI, BsmAI, BslI und BsoBI (New England BioLabs) sowie BstOI (Promega). Die bevorzugten thermophilen Polymerasen sind Bca (Panvera) und Bst (New England Biolabs).

[0039] Die homogene Echtzeit-Fluoreszenz-tSDA ist eine Modifikation der tSDA. Bei ihr werden Detektor-Oligonucleotide eingesetzt, um ein reduziertes Fluoreszenz-Quenching in zielabhängiger Weise herzustellen. Die Detektor-Oligonucleotide enthalten ein Donor/Akzeptor-Farbstoffpaar, das solcherart gekoppelt ist, dass ein Fluoreszenz-Quenching bei Fehlen eines Ziels auftritt. Ein Entfalten oder eine Linearisierung einer sekundären Struktur mit intramolekular gepaarten Basen im Detektor-Oligonucleotid bei Vorhandensein des Ziels vergrößert den Abstand zwischen den Farbstoffen und verringert das Fluoreszenz-Quenching. Ein Entfalten der sekundären Struktur mit gepaarten Basen umfasst typischerweise eine intermolekulare Basenpaarung zwischen der Sequenz der sekundären Struktur und einem komplementären Strang, so dass die sekundäre Struktur zumindest teilweise zerbrochen wird. Sie kann bei Vorhandensein eines komplementären Strangs von ausreichender Länge vollständig linearisiert werden. Bei einer bevorzugten Ausfihrungsform ist zwischen den beiden Farbstoffen eine Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstelle (RERS) vorhanden, so dass eine intermolekulare Basenpaarung zwischen der sekundären Struktur und einem komplementären Strang die RERS auch doppelsträngig und durch eine Restriktions-Endonuclease spaltbar oder mit Einzelstrangbrüchen versehbar macht. Eine Furchungsteilung oder eine Einführung von Einzelstrangbrüchen durch die Restriktions-Endonuclease trennt die Donor- und Akzeptor-Farbstoffe auf getrennte Nucleinsäurefragmente auf, wodurch weiters zu einem verringerten Quenching beigetragen wird. Bei jeder Ausfihrungsform wird eine damit verbundene Veränderung eines Fluoreszenz-Parameters (z. B. ein Anstieg der Donor-Fluoreszenzintensität, eine Verringerung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität oder ein Fluoreszenzverhältnis vor und nach der Entfaltung) als Hinweis auf das Vorhandensein der Zielsequenz überwacht. Die Überwachung einer Veränderung der Donor-Fluoreszenzintensität wird bevorzugt, da diese Veränderung typischerweise größer als die Veränderung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität ist. Andere Fluoreszenz-Parameter wie eine Veränderung der Fluoreszenz-Lebensdauer können ebenso überwacht werden.

[0040] Ein Detektor-Oligonucleotid für eine homogene Echtzeit-Fluoreszenz-tSDA ist ein Oligonucleotid, das einen einzelsträngigen 5'- oder 3'-Abschnitt, der mit der Zielsequenz (der Zielbindesequenz) hybridisiert, und eine sekundäre Struktur mit intramolekular gepaarten Basen, die der Zielbindesequenz benachbart ist, umfasst. Die erfindungsgemäßen Detektor-Oligonucleotide umfassen weiters ein an das Detektor-Oligonucleotid gekoppeltes Donor/Akzeptor-Farbstoffpaar, so dass die Donor-Fluoreszenz gequencht wird, wenn die Basen der sekundären Struktur intramolekular gepaart werden und eine Entfaltung oder Linearisierung der sekundären Struktur zu einer Verringerung des Fluoreszenz-Quenching führt. Die Furchungsteilung eines Oligonucleotids bezieht sich auf das Zerbrechen der Phosphodiesterbindungen beider Stränge einer DNA-Duplex oder das Zerbrechen der Phosphodiesterbindung einer einzelsträngigen DNA. Dies steht im Gegensatz zur Einfüh-

rung von Einzelstrangbrüchen, welche sich auf das Zerbrechen der Phosphodiesterbindung nur eines der beiden Stränge in einer DNA-Duplex bezieht.

[0041] Die erfindungsgemäßen Detektor-Oligonucleotide für eine homogene Echtzeit-Fluoreszenz-tSDA umfassen eine Sequenz, die unter den für eine Primer-Verlängerung oder Hybridisierung ausgewählten Reaktionsbedingungen eine sekundäre Struktur mit intramolekular gepaarten Basen bildet. Die sekundäre Struktur ist der Zielbindesequenz des Detektor-Oligonucleotids benachbart positioniert, so dass zumindest ein Teil der Zielbindesequenz einen einzelsträngigen 3'- oder 5'-Schwanz bildet. Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "der Zielbindesequenz benachbart", dass die gesamte Zielbindesequenz oder ein Teil davon in einem für die Hybridisierung mit dem Ziel verfügbaren 5'- oder 3'-Schwanz einzelsträngig gelassen wird. Das heißt, die sekundäre Struktur umfasst nicht die gesamte Zielbindesequenz. Ein Teil der Zielbindesequenz kann an der intramolekularen Basenpaarung in der sekundären Struktur beteiligt sein, kann eine gesamte erste Sequenz, die an der intramolekularen Basenpaarung in der sekundären Struktur beteiligt ist, oder einen Teil davon umfassen, kann eine gesamte erste Sequenz, die an der intramolekularen Basenpaarung in der sekundären Struktur beteiligt ist, oder einen Teil davon umfassen, erstreckt sich vorzugsweise allerdings nicht in ihre komplementäre Sequenz. Beispielsweise kann sich die Zielbindesequenz, wenn die sekundäre Struktur eine Stamm-Schleifen-Struktur (z. B. eine "Haarnadel") ist und die Zielbindesequenz des Detektor-Oligonucleotids als einzelsträngiger 3'-Schwanz vorhanden ist, auch den gesamten ersten Arm des Stamms entlang oder einen Teil davon und gegebenenfalls die gesamte Schleife entlang oder einen Teil davon erstrecken. Vorzugsweise erstreckt sich die Zielbindesequenz jedoch nicht in den zweiten Arm der an einer intramolekularen Stammbasenpaarung beteiligten Sequenz. Das heißt, es ist wünschenswert zu vermeiden, dass beide Sequenzen, die an einer intramolekularen Basenpaarung in einer sekundären Struktur beteiligt sind, zur Hybridisierung mit dem Ziel in der Lage sind. Fehlpaarungen im Teil mit intramolekular gepaarten Basen der sekundären Struktur des Detektor-Oligonucleotids können den Umfang der Veränderung der Fluoreszenz bei Vorhandensein eines Ziels verringern, sind jedoch akzeptabel, wenn eine Analyseempfindlichkeit keine Rolle spielt. Fehlpaarungen bei der Zielbindesequenz des einzelsträngigen Schwanzes sind ebenfalls akzeptabel, können jedoch die Analyseempfindlichkeit und/oder -spezifität gleichermaßen reduzieren. Es ist jedoch ein Merkmal der vorliegenden Erfindung, dass eine perfekte Basenpaarung sowohl bei der sekundären Struktur als auch bei der Zielbindesequenz die Reaktion nicht gefährdet. Perfekte Paarungen bei den an der Hybridisierung beteiligten Sequenzen verbessern die Analysespezifität ohne negative Auswirkungen auf die Reaktionskinetik.

[0042] Bei Hinzufügung zur Amplifikationsreaktion werden die erfindungsgemäßen Detektor-Oligonucleotid-Signalprimer durch Hybridisierung und Verlängerung in eine doppelsträngige Form umgewandelt, wie obenstehend beschrieben. Eine Strangverdrängung durch die Polymerase entfaltet oder linearisiert auch die sekundäre Struktur und wandelt sie durch Synthese eines komplementären Strangs in eine doppelsträngige Form um. Die RERS wird, falls vorhanden, ebenfalls doppelsträngig und durch die Restriktions-Endonuclease spaltbar oder mit Einzelstrangbrüchen versehbar. Wenn die sekundäre Struktur durch die Strangverdrängungsaktivität der Polymerase entfaltet oder linearisiert wird, so wird der Abstand zwischen dem Donor- und Akzeptor-Farbstoff vergrößert, wodurch das Quenching der Donor-Fluoreszenz verringert wird. Die damit verbundene Veränderung der Fluoreszenz von entweder dem Donor- oder dem Akzeptor-Farbstoff kann als Hinweis auf die Amplifikation der Zielsequenz überwacht oder detektiert werden. Eine Furchungsteilung der oder eine Einführung von Einzelstrangbrüchen an der RERS steigert den Umfang der Fluoreszenzveränderung im Allgemeinen weiter, indem zwei getrennte Fragmente des doppelsträngigen sekundären Amplifikationsprodukts hergestellt werden, wobei jedes einen der beiden Farbstoffe angekoppelt hat. Diese Fragmente können sich frei in der Reaktionslösung verbreiten, wodurch der Abstand zwischen den Farbstoffen des Donor/Akzeptor-Paars weiter vergrößert wird. Ein Anstieg der Donor-Fluoreszenzintensität oder eine Verringerung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität kann als Hinweis detektiert und/oder überwacht werden, dass eine Zielamplifikation stattfindet oder stattgefunden hat, andere Fluoreszenz-Parameter, die durch die Nähe des Donor-/Akzeptor-Farbstoffpaars beeinflusst werden, können allerdings ebenfalls überwacht werden. Eine Veränderung der Fluoreszenzintensität des Donors oder Akzeptors kann auch als Veränderung im Verhältnis von Donorund/oder Akzeptor-Fluoreszenzintensität detektiert werden. Beispielsweise kann eine Veränderung der Fluoreszenzintensität als a) Anstieg im Verhältnis der Donor-Fluorophor-Fluoreszenz nach der Linearisierung oder Entfaltung der sekundären Struktur und der Donor-Fluorophor-Fluoreszenz im Detektor-Oligonucleotid vor der Linearisierung oder Entfaltung oder b) als Verringerung im Verhältnis der Akzeptor-Farbstoff-Fluoreszenz nach der Linearisierung oder Entfaltung und der Akzeptor-Farbstoff-Fluoreszenz im Detektor-Oligonucleotid vor der Linearisierung oder Entfaltung detektiert werden.

[0043] Es ist zu erkennen, dass die erfindungsgemäßen Detektor-Oligonucleotide zusätzlich zur SDA für die Verwendung als Signalprimer bei anderen Primer-Verlängerungsamplifikationsverfahren (z. B. PCR, 3SR, TMA oder NASBA) angepasst werden können. Beispielsweise können die Verfahren für die Verwendung in einer PCR angepasst werden, indem in der PCR PCR-Amplifikationsprimer und eine Strangverdrängungs-DNA-Polymerase, die keine 5'→3'-Exonucleaseaktivität aufweist, verwendet werden (z. B. Sequencing

Grade Taq von Promega oder exo Vent oder exo Deep Vent von New England BioLabs). Die Detektor-Oligonucleotid-Signalprimer hybridisieren mit dem stromabwärts von den PCR-Amplifikationsprimern gelegenen Ziel, werden verdrängt und doppelsträngig gemacht, im Wesentlichen wie hinsichtlich der SDA beschrieben. In einer PCR kann jede RERS gegebenenfalls für die Verwendung im Detektor-Oligonucleotid ausgewählt werden, da typischerweise keine modifizierten Desoxynucleosidtriphosphate vorhanden sind, die eher als eine Furchungsteilung der RERS eine Einführung von Einzelstrangbrüchen auslösen könnten. Da der Temperaturwechsel ein Merkmal einer Amplifikation durch PCR ist, wird die Restriktions-Endonuclease vorzugsweise bei niedriger Temperatur hinzugegeben, und zwar nach dem letzten Zyklus einer Primer-Reassozüerung und Verlängerung für die Endpunkt-Detektion einer Amplifikation. Eine thermophile Restriktions-Endonuclease, die während der Hochtemperaturphasen der PCR-Reaktion aktiv bleibt, könnte jedoch während der Amplifikation vorhanden sein, um eine Echtzeit-Analyse zu bieten. Wie in SDA-Systemen verringert eine Trennung des Farbstoffpaars das Fluoreszenz-Quenching, wobei eine Veränderung eines Fluoreszenz-Parameters, wie z. B. der Intensität, als Hinweis auf eine Zielamplifikation dient.

[0044] Die Veränderung der Fluoreszenz, die aus der Entfaltung oder Linearisierung der Detektor-Oligonucleotide resultiert, kann an einem ausgewählten Endpunkt in der Reaktion detektiert werden. Da linearisierte sekundäre Strukturen gleichzeitig mit einer Hybridisierung oder Primer-Verlängerung hergestellt werden, kann die Veränderung der Fluoreszenz jedoch auch bei Stattfinden der Reaktion, d. h. in "Echtzeit", überwacht werden. Dieses homogene Echtzeitanalyse-Format kann zur Bereitstellung semiquantitativer oder quantitativer Informationen über die anfänglich vorhandene Menge an Ziel eingesetzt werden. Beispielsweise ist die Geschwindigkeit, in der sich die Fluoreszenzintensität während der Entfaltungs- oder Linearisierungsreaktion (entweder als Teil einer Zielamplifikation oder in Nichtamplifikations-Detektionsverfahren) ändert, ein Hinweis auf anfängliche Zielpegel. Als Ergebnis erreicht die Donor-Fluoreszenz rascher einen ausgewählten Schwellenwert (d. h. in kürzerer Zeit zur Positivität), wenn mehr anfängliche Kopien der Zielsequenz vorhanden sind. Die Verringerung der Akzeptor-Fluoreszenz weist gleichermaßen eine kürzere Zeit zur Positivität auf, welche als jene Zeit, die zur Erreichung eines ausgewählten Minimalwerts erforderlich ist, detektiert wird. Außerdem ist die Geschwindigkeit der Veränderung von Fluoreszenz-Parametern während des Ablaufs der Reaktion in Proben, die größere anfängliche Zielmengen enthalten, rascher als in Proben, die geringere anfängliche Zielmengen enthalten (d. h. erhöhter Anstieg der Fluoreszenz-Kurve). Diese oder andere Messungen, die im Stand der Technik bekannt sind, können als Hinweis auf das Vorhandensein eines Ziels oder als Hinweis auf eine Zielamplifikation vorgenommen werden. Die anfängliche Zielmenge wird typischerweise durch Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit Ergebnissen für bekannte Zielmengen bestimmt.

[0045] Assays hinsichtlich des Vorhandenseins einer ausgewählten Zielsequenz können gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren in einer Lösung oder auf einer Festphase durchgeführt werden. Homogene Echtzeit- oder Endpunktanalysen, bei denen das Detektor-Oligonucleotid als Primer wirkt, werden typischerweise in einer Lösung durchgeührt. Hybridisierungsassays unter Verwendung der erfindungsgemäßen Detektor-Oligonucleotide können ebenfalls in einer Lösung vorgenommen werden (z. B. als homogene Echtzeitanalysen), sind jedoch auch besonders gut für Festphasenanalysen für eine Echtzeit- oder Endpunktdetektion eines Ziels geeignet. Bei einer Festphasenanalyse können Detektor-Oligonucleotide über interne oder terminale Markierungen auf der Festphase (z. B. Perlen, Membranen oder dem Reaktionsgefäß) immobilisiert werden, wobei im Stand der Technik bekannte Verfahren angewandt werden. Beispielsweise kann ein Biotin-markiertes Detektor-Oligonucleotid auf einer Avidin-modifizierten Festphase immobilisiert werden, wo es eine Veränderung der Fluoreszenz erzeugt, wenn es unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen dem Ziel ausgesetzt wird. Ein Einfangen des Ziels in dieser Weise ermöglicht die Trennung des Ziels von der Probe und erlaubt die Entfernung von Substanzen in der Probe, welche die Detektion des Signals oder andere Aspekte des Assays stören könnten. Ein Beispiel für ein Festphasensystem, das verwendet werden kann, ist ein elektronischer Mikroarray, d. h. ein aktives, progammierbares, elektronisches Matrix-Hybridisierungssystem.

[0046] Eine vereinfachte Version des aktiven, progammierbaren, elektronischen Matrix-Hybridisierungssystems für die Verwendung bei dieser Erfindung wird wie folgt beschrieben. Im Allgemeinen trägt ein Substrat eine Matrix oder einen Array elektronisch adressierbarer Mikropositionen. Über den einzelnen Elektroden ist eine Permeationsschicht angeordnet. Die Permeationsschicht ermöglicht den Durchtransport relativ kleiner geladener Einheiten, hindert jedoch große geladene Einheiten, wie z. B. DNA, an einem direkten Berühren der Elektroden. Die Permeationsschicht verhindert die elektrochemische Zersetzung, welche in der DNA durch direkten Kontakt mit den Elektroden auftreten würde. Sie dient weiters dazu, die starke, unspezifische Adsorption der DNA an die Elektroden zu verhindern. Befestigungsbereiche sind auf der Permeationsschicht verteilt und sorgen für spezifische Bindungsstellen für Zielmaterialien.

[0047] Im Betrieb umfasst ein Reservoir jenen Raum oberhalb der Befestigungsbereiche, welcher die für Detektion, Analyse oder Verwendung gewünschten (sowie unerwünschten) Materialien enthält. Im Reservoir befinden sich geladene Einheiten, wie z. B. geladene DNA. In einem Aspekt umfasst das aktive, progammierbare Matrixsystem ein Verfahren zum Transportieren des geladenen Materials zu irgendeiner der spezifischen Mikropositionen. Bei Aktivierung erzeugt eine Mikroposition den elektrophoretischen Freifeld-Transport jeglicher

geladener, funktionalisierter, spezifischer Bindungseinheit zur Elektrode. Würde eine Elektrode beispielsweise positiv und eine zweite Elektrode negativ gemacht, so verliefen elektrophoretische Kraftströme zwischen den zwei Elektroden. Die Ströme elektrophoretischer Kraft bewirken den Transport geladener Bindungseinheiten, welche eine negative Gesamtladung aufweisen, zur positiven Elektrode. Geladene Materialien mit positiver Gesamtladung bewegen sich unter der elektrophoretischen Kraft zur negativ geladenen Elektrode. Wenn die insgesamt negativ geladene Bindungseinheit, welche funktionalisiert wurde, als Ergebnis ihrer Bewegung unter der elektrophoretischen Kraft die Befestigungsschicht berührt, so wird die funktionalisierte spezifische Bindungseinheit kovalent an die mit der ersten Elektrode übereinstimmende Befestigungsschicht gebunden.

[0048] Ein elektrophoretischer Transport resultiert im Allgemeinen aus dem Anlegen einer Spannung, welche ausreicht, um innerhalb des Systems eine Elektrolyse und einen Ionentransport zu ermöglichen. Eine elektrophoretische Mobilität folgt daraus, und Strom fließt durch das System, so wie durch die Elektrolytlösung mittels Ionentransport. In dieser Weise kann über den Stromfluss der Ionen ein vollständiger Stromkreis gebildet werden, wobei der Rest des Stromkreises durch die herkömmlichen elektronischen Komponenten, wie z. B. die Elektroden und die kontrollierte Schalttechnik, vervollständigt wird. Bei einer wässrigen Elektrolytlösung, welche ein herkömmliches Material, wie z. B. Natriumchlorid, Natriumphosphat, Puffer und Ionenarten enthält, ist die Spannung, welche eine Elektrolyse und einen Ionentransport auslöst, beispielsweise größer oder gleich ca. 1,2 Volt.

[0049] Es ist möglich, die Befestigungsschichten, welche nicht einer Reaktion unterzogen werden, zu schützen, indem ihre entsprechenden Elektroden negativ gemacht werden. Dies führt zu aus solchen Befestigungsbereichen ausgehenden, elektrophoretischen Kraftströmen. Die elektrophoretischen Kraftströme dienen dazu, negativ geladene Bindungseinheiten aus der Befestigungsschicht, die kein Reaktant ist, weg und hin zur mit der ersten Elektrode übereinstimmenden Befestigungsschicht zu treiben. In dieser Weise wird um die Befestigungsschichten ein „Kraftfeld"-Schutz herumgebildet, bei denen wünschenswert ist, dass sie zu jener Zeit mit den geladenen Molekülen nicht reaktionsfähig sind.

[0050] Ein höchst vorteilhaftes Ergebnis dieses Systems ist, dass geladene Bindungsmaterialien in den Signalbefestigungsschichten benachbarten Bereichen hochkonzentriert sein können. Ist eine einzelne Mikroposition beispielsweise positiv geladen und sind die restlichen Mikropositionen negativ geladen, so bewirken die Ströme elektrophoretischer Kraft den Transport der insgesamt negativ geladenen Bindungseinheiten zur positiv geladenen Mikroposition. In dieser Weise kann ein Verfahren zum Konzentrieren und Umsetzen von Analyten oder Reaktanten an jeder spezifischen Mikroposition an der Vorrichtung erzielt werden. Nach der Befestigung der spezifischen Bindungseinheiten an der Befestigungsschicht kann die zugrundeliegende Mikroelektrode weiterhin im Gleichstrom (DC)-Modus funktionieren. Dieses einzigartige Merkmal ermöglicht, dass relativ verdünnte, geladene Analyten oder reagierende Moleküle, die sich in freier Lösung befinden, rasch transportiert, konzentriert und umgesetzt werden, und zwar hintereinander oder parallel an jeder spezifischen Mikroposition, welche in der dem Analyten oder den reagierenden Molekülen entgegengesetzten Ladung gehalten wird. Diese Fähigkeit, einen verdünnten Analyten oder reagierende Moleküle an ausgewählten Mikropositionen zu konzentrieren, beschleunigt stark die Reaktionsgeschwindigkeiten an diesen Mikropositionen.

[0051] Nach Beendigung der gewünschten Reaktion kann das Potential der Elektrode umgekehrt werden, wodurch eine elektrophoretische Kraft in die Richtung, die jener der vorhergehenden Anziehungskraft entgegengesetzt ist, geschaffen wird. In dieser Weise können nicht spezifische Analyten oder nicht umgesetzte Moleküle von der Mikroposition entfernt werden. Spezifische Analyten oder Reaktionsprodukte können aus jeglicher Mikroposition freigesetzt und für eine weitere Analyse zu anderen Positionen transportiert, an anderen adressierbaren Positionen gelagert oder vollständig aus dem System entfernt werden. Diese Entfernung oder Dekonzentration von Materialien durch Umkehr des Feldes erhöht die Unterscheidungsfähigkeit des Systems, indem sie zur Entfernung nicht spezifisch gebundener Materialien führt. Durch Kontrolle der Menge an nunmehr abstoßender elektrophoretischer Kraft gegenüber nicht spezifisch gebundenen Materialien an der Befestigungsschicht kann eine elektronische Stringenzkontrolle erzielt werden. Durch Erhöhung des elektrischen Potentials an der Elektrode, um ein Feld zu schaffen, das zur Entfernung teilweise hybridisierter DNA-Sequenzen ausreicht, wodurch die Identifikation einzelner fehlgepaarter Hybridisierungen ermöglicht wird, können Punktmutationen identifiziert werden.

[0052] An den verschiedenen Befestigungsschichten können Operationen parallel oder in Serie durchgeführt werden. Beispielsweise kann eine Reaktion zuerst an einer ersten Befestigungsschicht auftreten, wobei die Potentiale wie gezeigt eingesetzt werden. Das Potential an einer ersten Elektrode kann umgekehrt, d. h. negativ gemacht werden, und das Potential an der benachbarten zweiten Elektrode kann positiv gemacht werden. In dieser Weise tritt eine Serienreaktion auf. Materialien, die nicht spezifisch an die erste Befestigungsschicht gebunden wurden, würden durch die elektrophoretische Kraft zur Befestigungsschicht transportiert. In dieser Weise wird der Konzentrationsaspekt eingesetzt, um hohe Konzentrationen an dieser spezifischen Befestigungsschicht zu schaffen, welche danach der positiven elektrophoretischen Kraft ausgesetzt wird. Die konzentrierten Materialien können als nächstes zu einer benachbarten oder einer anderen Befestigungsschicht bewegt werden. Alternativ kann bei multiplen Befestigungsschichten in diesem Sinn der Schutz aufge-

hoben werden werden, dass es ein elektrophoretisches Nettokraftfeld gibt, das, von der Elektrode ausgehend, durch die Befestigungsschicht in das Reservoir hinausgeht. Durch die Aushebung des Schutzes multipler Befestigungsschichten werden Multiplexreaktionen durchgeführt. Jede einzelne Stelle kann im Wesentlichen als eigenes biologisches „Teströhrchen" dienen, da sich die besondere Umgebung, die von einer bestimmten Befestigungsschicht angesprochen wird, von den die anderen Befestigungsschichten umgebenden Umgebungen unterscheiden kann.

[0053] Bei einer Ausführungsform enthält die Permeationsschicht Avidin und einer der SDA-Primer Biotin. Nach einer Amplifikation werden die Amplikone elektronisch an den Array adressiert und binden an das Avidin. Eine oder mehrere markierte Detektorsonden wird bzw. werden dann hinzugefügt und mit den Amplikonen hybridisieren gelassen. Das Vorhandensein hybridisierter Detektorsonden wird daraufhin nachgewiesen. Bei einer zweiten Ausführungsform wird bzw. werden eine oder mehrere Einfangsonden dazu entworfen, mit der amplifizierten Nucleinsäure zu hybridisieren. Jede Einfangsonde enthält Biotin und wird an einen Array, in dem die Permeationsschicht Avidin enthält, entweder gebunden oder elektronisch adressiert und gebunden. Die Amplikone werden danach elektronisch an den Array adressiert und hybridisieren mit den Einfangsonden. Eine oder mehrere markierte Detektorsonden wird bzw. werden dann hinzugefügt und mit den Amplikonen hybridisieren gelassen. Das Vorhandensein hybridisierter Detektorsonden wird daraufhin nachgewiesen.

[0054] Weitere Details des elektronischen Mikroarrays und der dazugehörigen Systeme sind bei Heller et al. (1997, U.S.-Patent Nr. 5,605,662; 1997, U.S.-Patent Nr. 5,632,957; 1997, veröffentlichte PCT-Anmeldung Nr. WO97/12030) und Sosnowski et al. (1998, veröffentlichte PCT-Anmeldung Nr. WO98/10273) beschrieben.

[0055] Bei einer in dieser Anmeldung beschriebenen Ausführungsform wird ein Sandwichassay eingesetzt, bei dem eine einzelsträngige Einfangsonde elektronisch am Array deponiert wird und dazu dient, einen Strang eines geladenen Moleküls, wie z. B. eine Zielnucleinsäure oder Amplikone davon, einzufangen. Eine Vielzahl von Molekülen, wie z. B. Nucleinsäure-Einfangsonden, kann auf verschiedenen Anschlussflächen des Arrays elektronisch deponiert werden. Es wird bevorzugt, dass die Hybridisierung des Zielmoleküls oder Amplikons und der Einfangsonde elektronisch durchgeführt wird. Nach dem Einfangen des geladenen Moleküls an den Einfangstellen kann das eingefangene Molekül durch eine markierte Reportersonde, die an das eingefangene Molekül bindet, detektiert werden.

[0056] Bei einer zweiten in dieser Anmeldung beschriebenen Ausführungsform wird am Mikroarray eine elektronische Amplifikation durchgeführt. Bei dieser Ausführungsform wird Zielnucleinsäure in der Nähe verankerter Primer, die an einer Einfangstelle lokalisiert sind und bei einem SDA- oder einem anderen Amplifikationsverfahren verwendet werden, elektronisch konzentriert. Eine elektronische Hybridisierung wird angewandt, um die Matrizenmoleküle mit den verankerten SDA-Primern zu hybridisieren. Die Mikrochips werden daraufhin mit einem SDA-Reaktionsgemisch, welches andere SDA-Komponenten als die Matrize und die Amplifikationsprimer enthält, inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion werden die Produkte denaturiert und wird das Mikrochip mit Reportersonden inkubiert, um die Gegenwart von Zielnucleinsäure zu detektieren. Diese Ausführungsformen veranschaulichen, dass (a) die Amplifikation auf einem elektronischen Mikroarray, gefolgt von einer Analyse, durchgeführt werden kann oder (b) die Amplifikation in einer Lösung und die Analyse danach auf einem elektronischen Mikroarray durchgeführt werden kann.

## BEISPIELE

[0057] Die folgenden Beispiele veranschaulichen spezifische Ausführungsformen der hier beschriebenen Erfindung. Wie dem Fachmann offensichtlich wäre, sind verschiedene Veränderungen und Modifikationen möglich und werden innerhalb des beschriebenen Umfangs der Erfindung in Erwägung gezogen.

### BEISPIEL 1

### Primer-Screening

[0058] Alle paarweisen Kombinationen der in Tabelle I gezeigten, stromaufwärtigen und stromabwärtigen Amplifikationsprimer wurden hinsichtlich einer Amplifikation des Ziels getestet. Die Amplifikationsreaktionen wurden in Gegenwart von $10^6$ genomischen Äquivalenten einer C jejuni-Ziel-DNA durchgeführt. Die Amplifikationsreaktionen wurden bei 52°C in Puffern durchgeführt, welche Endkonzentrationen der folgenden Komponenten enthielten: 30–40 mM Kaliumphosphat (pH 7,6), 5–9% Glycerin, 3–7% Dimethylsulfoxid (DMSO), 5 mM Magnesiumacetat, 700 ng DNA der menschlichen Plazenta, 10 µg acetyliertes Rinderserumalbumin, 1,82% Trehalose, 0,36 mM Dithiothreitol, 500 nM SDA-Primer, 50 nM SDA-Bumperprimer, 0,25 mM dUTP, 0,7 mM 2'-Desoxycytidin-5'-O-(1-thiotriphosphat), 0,1 mM dATP, 0,1 mM dGTP und ungefähr 640 Einheiten BsoBI und 40 Einheiten Bst-Polymerase.

[0059] Kurz gesagt, die Ziel-DNA wurde 5 Minuten lang bei 95°C denaturiert und vor der Hinzugabe zu einem Puffer, welcher die SDA-Primer und Bumper enthielt, auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Inkubation wurde bei

Raumtemperatur 20 Minuten lang fortgesetzt, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 70°C, um ein mögliches falsches Starten minimal zu halten. Die Amplifikation wurde draufhin bei 52°C durch Übertragung eines feststehenden Volumens an Startmischung in Mikrotitermulden, welche die Amplifikationsenzyme enthielten, ausgelöst. Die Amplifikation wurde 1 Stunde lang bei einer konstanten Temperatur von 52°C durchgeführt. SDA-Amplifikationsprodukte wurden nach einer Primerverlängerung mit den $^{32}$P-markierten Detektorsequenzen SEQ ID NO: 9 und SEQ ID NO: 10 und einer Auflösung in 8% denaturierenden Polyacrylamidgels mittels Autoradiographie detektiert. Bei allen 9 getesteten Primerkombinationen wurden spezifische Amplifikationsprodukte nachgewiesen.

## BEISPIEL 2

### Bestimmung der analytischen Empfindlichkeit

[0060] Eine SDA wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit den Amplifikationsprimern SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 5 und SEQ NO: 2 und SEQ ID NO: 5 durchgeführt. Eine Ziel-DNA wurde bei 0, $10^2$, $10^3$, $10^4$ oder $10^5$ genomischen Äquivalenten pro Reaktion inkludiert. Eine analytische Empfindlichkeit von $10^2$ Zielen wurde erzielt.

## BEISPIEL 3

### Bewertung der Primerspezifität

[0061] Die Primerspezifität wurde unter Verwendung von SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 und SEQ ID NO: 8, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit 30 mM Kaliumphosphat, 9% Glycerin und 3% DMSO bewertet. Vierunddreißig Stämme von C. jejuni und C. coli wurden bei $10^5$ genomischen Äquivalenten pro Reaktion getestet (Tabelle 2). Bei allen vierunddreißig Stämmen war der Test hinsichtlich einer berechneten Spezifität von 100% positiv.

TABELLE 2
Tafel der Campylobacter-Spezifität

| Art | Stamm |
|---|---|
| C. jejuni | ATCC 33291 |
| C. jejuni | ATCC 33292 |
| C. jejuni | ATCC 49349 |
| C. jejuni | ATCC 29428 |
| C. jejuni | ATCC 33560 |
| C. jejuni | ATCC 49943 |
| C. jejuni | T-401 |
| C. jejuni | T-402 |
| C. jejuni | T-403 |
| C. jejuni | T-404 |
| C. jejuni | T-405 |
| C. jejuni | T-407 |
| C. jejuni | T-408 |
| C. jejuni | T-410 |
| C. jejuni | T-411 |
| C. jejuni | T-413 |
| C. coli | ATCC 43474 |
| C. coli | ATCC 33559 |
| C. coli | ATCC 49941 |
| C. coli | ATCC 43472 |
| C. coli | ATCC 43473 |
| C. coli | ATCC 43475 |
| C. coli | ATCC 43476 |
| C. coli | ATCC 43477 |
| C. coli | ATCC 43479 |
| C. coli | ATCC 43481 |
| C. coli | ATCC 43482 |
| C. coli | ATCC 43483 |
| C. coli | ATCC 43484 |
| C. coli | ATCC 43486 |
| C. coli | ATCC 43489 |
| C. coli | ATCC 43499 |
| C. coli | T-449 |
| C. coli | T-834 |

BEISPIEL 4

Bewertung einer Kreuzreaktivität

[0062] Die Kreuzreaktivität wurde unter Verwendung der in Beispiel 3 beschriebenen Primer und Reaktionsbedingungen bewertet. Nicht-C. jejuni und -C. coli-Organismen wurden mit $10^7$ genomischen Äquivalenten pro Reaktion getestet. Bei allen 20 getesteten Organismen wurden negative Ergebnisse erzielt (Tabelle 3). Wurden $10^4$ Kopien einer C. jejuni-Ziel-DNA in die Reaktionen gesät, so wurde in allen Fällen ein spezifisches Produkt erhalten, welches auf das Fehlen einer Amplifikationshemmung hinwies.

TABELLE 3
Tafel der Campylobacter-Kreuzreaktivität

| Art | | Stamm |
|---|---|---|
| *Actinomyces israelii* | Serotyp 1 | ATCC 10049 |
| *Arcobacter butzleri* | | ATCC 49616 |
| *Bacteroides ureolyticus* | | ATCC 33387 |
| *Campylobacter lari* | | ATCC 43675 |
| *Candida albicans* | | ATCC 44808 |
| *Citrobacter freundii* | | ATCC 8090 |
| *Enterobacter cloacae* | | ATCC 13047 |
| *Enterococcus faecalis* | | ATCC 29212 |
| *Escherichia coli* | | T-4025 |
| *Escherichia* | | T-3785 |
| *Helicobacter pylori* | | ATCC 43526 |
| *Klebsiella pneumoniae* | Unterart *pneumoniae* | ATCC 13883 |
| *Proteus mirabilis* | | ATCC 29906 |
| *Salmonella typhimurium* | | ATCC 13311 |
| *Shigella sonnei* | | ATCC 29029 |
| *Staphylococcus aureus* | Unterart *aureus* | ATCC 12598 |
| *Streptococcus bovis* | | ATCC 9809 |
| *Streptococcus pyogenes* | Gruppe A | ATCC 19615 |
| *Vibrio cholerae* | Biotyp Eltor | ATCC 14035 |
| *Yersinia enterocolitica* | | ATCC 9610 |

BEISPIEL 5

Elektronische Mikroarray-Analyse

[0063] Die mikroelektronische Array-Zusammenstellung wurde zuvor beschrieben (R. G. Sosnowski et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 119–123). Beim elektronischen Abzielen von Einfangsonden, Amplikonen oder Detektorsonden wurden Bedingungen eingesetzt, über die anderswo berichtet wird (R. G. Sosnowski et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 119–123; C. F. Edman et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 4907–4914). Die Permeationsschicht der mikroelektronischen Array-Zusammenstellung enthält vorteilhafterweise Avidin. Kurz gesagt, Einfangsonden werden elektronisch an einen mikroelektronischen Array adressiert. Rohe Amplifikationsreaktionen werden entweder 2 Minuten lang durch mit destilliertem Wasser vorausgegliche G6-Säulen (Biorad, Hercules, CA) zentrifugiert oder in Multiwell-Platten (Millipore, Bedford, MA) ≥ 5 Stunden lang gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die zubereiteten Proben werden daraufhin, vor einem elektronischen Adressieren, in einem 1 : 1-Verhältnis mit 100 mM Histidin vermischt und bei 95°C 5 Minuten lang erhitzt. Zur Detektion wird ein fluoreszenzmarkiertes Oligonucleotid (Detektorsonde) in 6XSSC eingebracht und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur hybridisieren gelassen. Der Array wird dann in 0,1XSTE/1%SDS, gefolgt von 1XSTE, gewaschen. Das Vorhandensein einer Detektorsonde wird daraufhin nachgewiesen.
[0064] Verschiedene Merkmale der Erfindung sind in den anschließenden Ansprüchen dargelegt.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> McMillian, Ray A.
Fort, Thomas L.
Hellyer, Tobin J.
You, Qimin

<120> Amplifikation und Detektion von Campylobacter jejuni und Campylobacter coli.

<130> Anwendung von C. jejuni und C. coli

<140>
<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 40
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für SDA von C. jejuni und C. coli

<400> 1
cgattccgct ccagacttct cgggcaggat ggttttggtt 40

<210> 2
<211> 39
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für SDA von C. jejuni und C. coli

<400> 2

cgattccgct ccagacttct cgggcaggat ggttttggt 39

<210> 3
<211> 38
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für SDA von C. jejuni und C. coli

<400> 3
cgattccgct ccagacttct cgggcaggat ggttttgg 38

<210> 4
<211> 42
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für SDA von C. jejuni und C. coli

<400> 4
accgcatcga atgcatgtct cggggaagta cctacaaatt ct 42

<210> 5
<211> 41
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für SDA von C. jejuni und C. coli

<400> 5
accgcatcga atgcatgtct cgggaagtac ctacaaattc t 41

<210> 6
<211> 40

<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für SDA von C. jejuni und C. coli

<400> 6
accgcatcga atgcatgtct cgggagtacc tacaaattct 40

<210> 7
<211> 16
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Bumper für SDA für C. jejuni und C. coli

<400> 7
acaggagttt ttggtt 16

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Bumper für SDA für C. jejuni und C. coli

<400> 8
aataggtgta gctgc 15

<210> 9
<211> 17
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Detektorsonde für SDA für C. jejuni und C. coli

<400> 9
ggttagttta taatact 17

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Detektorsonde für SDA für C. jejuni und C. coli

<400> 10
ctagtttttg atttttagt 19

**Patentansprüche**

1. Oligonucleotid, bestehend aus einer Zielbindesequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den Zielbindesequenzen AL46 (SEQ ID NO: 1), AL44 (SEQ ID NO: 2), AL42 (SEQ ID NO: 3), AR48 (SEQ ID NO: 4), AR44 (SEQ ID NO: 5) und AR42 (SEQ ID NO: 6), und gegebenenfalls einer für eine Amplifikationsreaktion erforderlichen Sequenz.

2. Oligonucleotid nach Anspruch 1, wobei die für die Amplifikationsreaktion erforderliche Sequenz eine Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstelle ist, an der während einer Strangverdrängungsamplifikation durch eine Restriktions-Endonuclease Einzelstrangbrüche eingeführt werden.

3. Oligonucleotid, bestehend aus BL42 (SEQ ID NO: 7) oder BR42 (SEQ ID NO: 8).

4. Oligonucleotid, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus DL52 (SEQ ID NO: 9), einer zu SEQ ID NO: 9 komplementären Nucleinsäure, DR48 (SEQ ID NO: 10) und einer zu SEQ ID NO: 10 komplementären Nucleinsäure.

5. Ausstattung umfassend:
a) einen oder mehrere Primer, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus AL46 (SEQ ID NO: 1), AL44 (SEQ ID NO: 2) und AL42 (SEQ ID NO: 3),
b) einen oder mehrere Primer, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus AR48 (SEQ ID NO: 4), AR44 (SEQ ID NO: 5) und AR42 (SEQ ID NO: 6),
c) Bumper BL42 (SEQ ID NO:7) und BR42 (SEQ ID NO: 8), und
d) einen oder mehrere Detektoren, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus DL52 (SEQ ID NO: 9), einer zu SEQ ID NO: 9 komplementären Nucleinsäure, DR48 (SEQ ID NO: 10) und einer zu SEQ ID NO: 10 komplementären Nucleinsäure.

6. Verfahren zum Nachweisen des Vorhandenseins oder Fehlens von Campylobacter jejuni oder C. coli in einer Probe, wobei dieses Verfahren folgende Schritte umfasst:
a) die Behandlung der Probe in einer Nucleinsäure-Amplifikationsreaktion unter Verwendung eines Paars von Nucleinsäureprimern, wobei ein erster Primer ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus AL46 (SEQ ID NO: 1), AL44 (SEQ ID NO: 2) und AL42 (SEQ ID NO: 3), und ein zweiter Primer ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus AR48 (SEQ ID NO: 4), AR44 (SEQ ID NO: 5) und AR42 (SEQ ID NO: 6); und

b) die Detektion jeglichen amplifizierten Nucleinsäureprodukts, wobei die Detektion eines amplifizierten Produkts das Vorhandensein von C. jejuni und C. coli anzeigt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Detektion des amplifizierten Nucleinsäureprodukts durch Hybridisierung des amplifizierten Nucleinsäureprodukts mit einem Detektor, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus DL52 (SEQ ID NO: 9), einer zu SEQ ID NO: 9 komplementären Nucleinsäure, DR48 (SEQ ID NO: 10) und einer zu SEQ ID NO: 10 komplementären Nucleinsäure, durchgeführt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6, wobei bei der Amplifikationsreaktion, der Detektion oder sowohl der Amplifikationsreaktion als auch der Detektion ein elektronischer Mikroarray eingesetzt wird.

9. Verfahren zur Amplifizierung einer Zielnucleinsäuresequenz des C. jejuni- und C. coli sodB-Gens, welches Folgendes umfasst:
a) die Hybridisierung
i) eines ersten Amplifikationsprimers, bestehend aus einer Zielbindesequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den Zielbindesequenzen AL46 (SEQ ID NO: 1), AL44 (SEQ ID NO: 2) und AL42 (SEQ ID NO: 3) und gegebenenfalls einer für eine Amplifikationsreaktion erforderlichen Sequenz, und
ii) eines zweiten Amplifikationsprimers, bestehend aus einer Zielbindesequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den Zielbindesequenzen AR48 (SEQ ID NO: 4), AR44 (SEQ ID NO: 5) und AR42 (SEQ ID NO: 6) und gegebenenfalls einer für die Amplifikationsreaktion erforderlichen Sequenz, mit der Nucleinsäure; und
b) die Verlängerung des hybridisierten ersten und des hybridisierten zweiten Amplifikationsprimers an der Zielnucleinsäuresequenz, wobei die Zielnucleinsäuresequenz amplifiziert wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, weiters umfassend die Detektion der amplifizierten Zielnucleinsäure durch Hybridisierung mit einer Detektorsonde.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Detektorsonde aus DL52 (SEQ ID NO: 9) oder DR48 (SEQ ID NO: 10), die mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind, besteht.

12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei bei der Amplifikationsreaktion, der Detektion oder sowohl der Amplifikationsreaktion als auch der Detektion ein elektronischer Mikroarray eingesetzt wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen