



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 18 655 T2** 2007.04.05

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 162 277 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 18 655.9**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 112 130.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **17.05.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.12.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **12.04.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.04.2007**

(30) Unionspriorität:

590061 08.06.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

BE, DE, ES, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:

**Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, N.J.,
US**

(72) Erfinder:

**Nadeau, James G., Ellicott City, Maryland 21042,
US; Hellyer, Tobin J., Owings Mills, Maryland
21117, US**

(74) Vertreter:

Weickmann & Weickmann, 81679 München

(54) Bezeichnung: **Sonden und Methoden zum Nachweis von Nukleinsäuren**

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 in den angeschlossenen Ansprüchen definierte Erfindung bezieht sich auf Verfahren zum Nachweisen von Nucleinsäurezielsequenzen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die sequenzspezifische Hybridisierung von markierten Oligonucleotidsonden wird seit langem als Mittel zum Nachweisen und Identifizieren ausgewählter Nucleotidsequenzen eingesetzt, und das Versehen solcher Sonden mit fluoreszierenden Markierungen sorgte für ein relativ empfindliches, nichtradioaktives Mittel zum Ermöglichen des Nachweisens einer Sondenhybridisierung. Bei jüngst entwickelten Nachweismethoden wird anstelle der direkten Detektion der Fluoreszenzintensität zum Nachweisen einer Sondenhybridisierung eher das Verfahren des Fluoreszenzenergietransfers (FET) angewandt. Ein Fluoreszenzenergietransfer erfolgt zwischen einem Donor-Fluorophor und einem Quencher-Farbstoff (der ein Fluorophor sein kann oder auch nicht), wenn das Absorptionsspektrum des einen (des Quenchers) mit dem Emissionsspektrum des anderen (des Donors) überlappt und sich die beiden Farbstoffe in enger Nachbarschaft befinden. Farbstoffe mit diesen Eigenschaften werden als Donor/Quencher-Farbstoffpaare oder Energietransferfarbstoffpaare bezeichnet. Die Energie des angeregten Zustands des Donor-Fluorophors wird durch eine dipolinduzierte Resonanz-Dipol-Wechselwirkung auf den benachbarten Quencher übertragen. Dies führt zu einer Löschung der Donor-Fluoreszenz. Wenn der Quencher (der auch als „Akzeptor“ bezeichnet wird) ebenfalls ein Fluorophor ist, kann in manchen Fällen die Intensität seiner Fluoreszenz verstärkt werden. Die Effizienz der Energieübertragung hängt stark vom Abstand zwischen dem Donor und dem Quencher ab, und diese Beziehungen vorhersagende Gleichungen wurden von Förster entwickelt (1948, Ann. Phys. 2, 55–75). Die Distanz zwischen dem Donor- und dem Quencher-Farbstoff, bei welcher die Effizienz der Energieübertragung 50% beträgt, wird als Förster-Distanz (R_0) bezeichnet. Auch andere Mechanismen der Fluoreszenzlöschung sind bekannt, einschließlich z.B. der Ladungsübertragung und der Stoßlöschung. In diesen Fällen kann der Quencher ein fluoreszierender Farbstoff sein, allerdings muss er dies nicht sein. Mechanismen der Fluoreszenzlöschung, die nicht auf einem FET beruhen, erfordern typischerweise keine nennenswerte Überlappung zwischen dem Absorptionsspektrum des Quenchers und dem Emissionsspektrum des Donor-Fluorophors.

[0003] Die Energieübertragung und andere Mechanismen, die von der Wechselwirkung zwischen zwei eng benachbarten Farbstoffen abhängen, um eine Löschung hervorzurufen, stellen ein interessantes Mittel zum Nachweisen oder Identifizieren von Nucleotidsequenzen dar, da solche Analysen in homogenen Formaten durchgeführt werden können. Homogene Analyseformate sind einfacher als herkömmliche Sondenhybridisierungsanalysen, welche auf dem Nachweis der Fluoreszenz einer einzigen Fluorophor-Markierung beruhen, da heterogene Analysen im Allgemeinen zusätzliche Schritte zum Abtrennen einer hybridisierten Markierung von einer freien Markierung erfordern. Typischerweise beruhen der FET und verwandte Methoden auf dem Überwachen einer Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften einer oder beider Farbstoffmarkierungen, wenn diese durch Hybridisierung zweier komplementärer Oligonucleotide zusammengebracht werden. Bei diesem Format kann die Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften als Veränderung der Menge an Energieübertragung oder als Veränderung der Menge an Fluoreszenzlöschung gemessen werden, was typischerweise als Anstieg der Fluoreszenzintensität bei einem der Farbstoffe angezeigt wird. Auf diese Art und Weise kann die Nucleotidsequenz, die von Interesse ist, ohne Trennung nicht hybridisierter und hybridisierter Oligonucleotide nachgewiesen werden. Die Hybridisierung kann zwischen zwei getrennten komplementären Oligonucleotiden erfolgen, von denen eines mit dem Donor-Fluorophor und eines mit dem Quencher markiert ist. In der doppelsträngigen Form kommt es im Vergleich zu einzelsträngigen Oligonucleotiden zu einer verminderten Donor-Fluoreszenz (gesteigerten Löschung) und/oder zu einer erhöhten Energieübertragung. Mehrere Formate für FET-Hybridisierungsanalysen werden in Nonisotopic DNA Probe Techniques (1992, Academic Press, Inc., S. 311–352) besprochen. Alternativ können der Donor und der Quencher solcherart mit einem einzelnen Oligonucleotid verbunden sein, dass es bei einem oder beiden zu einem nachweisbaren Unterschied in den Fluoreszenzeigenschaften kommt, und zwar wenn das Oligonucleotid nicht hybridisiert ist, verglichen mit dem Zustand, wenn es mit seiner komplementären Sequenz hybridisiert ist. Bei diesem Format ist die Donor-Fluoreszenz typischerweise erhöht und die Energieübertragung/Löschung vermindert, wenn das Oligonucleotid hybridisiert ist. Ein mit Donor- und Quencher-Farbstoffen markiertes Oligonucleotid kann beispielsweise selbstkomplementäre Sequenzen enthalten, die Basenpaare bilden, um eine Haarnadel zu formen, welche die beiden Farbstoffe in enge räumliche Nähe bringt, wo eine Energieübertragung und -löschung stattfinden kann. Eine Hybridisierung dieses Oligonucleotids mit seiner komplementären Sequenz in einem zweiten Oligonucleotid zerstört die Haarnadel und vergrößert den Abstand zwischen den beiden Farbstoffen, wodurch die Lö-

schung verringert wird. Siehe Tyagi und Kramer (1996, Nature Biotech. 14, 303–308) und B. Bagwell, et al. (1994, Nucl. Acids Res. 22, 2424–2425; U.S.-Patent Nr. 5,607,834). Homogene Verfahren, bei denen eine Energieübertragung oder andere Mechanismen der Fluoreszenzlöschung zum Nachweisen einer Nucleinsäureamplifikation eingesetzt werden, wurden ebenfalls beschrieben. L. G. Lee, et al. (1993, Nuc. Acids Res. 21, 3761–3766) offenbaren ein Echtzeit-Nachweisverfahren, bei dem eine doppelt markierte Detektorsonde während einer PCR in zielamplifikationsspezifischer Weise gespalten wird. Die Detektorsonde wird stromabwärts vom Amplifikationsprimer hybridisiert, so dass die 5'-3'-Exonucleaseaktivität von Taq-Polymerase die Detektorsonde aufschneidet, wobei zwei fluoreszierende Farbstoffe, die ein Energieübertragungspaar bilden, getrennt werden. Die Fluoreszenzintensität nimmt beim Spalten der Sonde zu.

[0004] Signalprimer (die manchmal auch als Detektorsonden bezeichnet werden), welche mit der Zielsequenz stromabwärts von der Hybridisierungsstelle der Amplifikationsprimer hybridisieren, wurden in Hinblick auf eine homogene Detektion einer Nucleinsäureamplifikation beschrieben (U.S.-Patent Nr. 5,547,861). Der Signalprimer wird durch die Polymerase in einer Weise verlängert, die der Verlängerung der Amplifikationsprimer ähnelt. Die Verlängerung des Amplifikationsprimers verdrängt das Verlängerungsprodukt des Signalprimers in einer zielamplifikationsabhängigen Weise, wobei ein doppelsträngiges sekundäres Amplifikationsprodukt hergestellt wird, das als Hinweis auf eine Zielamplifikation nachgewiesen werden kann. Beispiele für homogene Nachweisverfahren zur Verwendung bei einzelsträngigen Signalprimern sind im U.S.-Patent Nr. 5,550,025 (Einbau von lipophilen Farbstoffen und Restriktions-Schnittstellen) und im U.S.-Patent Nr. 5,593,867 (Nachweis von Fluoreszenzpolarisation) beschrieben. In jüngerer Zeit wurden Signalprimer zur Detektion von Nucleinsäurezielen angepasst, wobei FET-Verfahren eingesetzt werden, bei denen das Entfalten sekundärer Strukturen zur Anwendung kommt (z.B. U.S.-Patent 5,691,145 und US 5,928,869). Teils einzelsträngige, teils doppelsträngige Signalprimer, die mit Donor/Quencher-Farbstoffpaaren markiert sind, wurden ebenfalls vor kurzem beschrieben. Die US 5,846,726 offenbart beispielsweise Signalprimer mit Donor/Quencher-Farbstoffpaaren, welche eine einzelsträngige Restriktionsendonuclease-Erkennungsstelle flankieren. In Gegenwart des Ziels wird die Restriktions-Schnittstelle doppelsträngig und durch die Restriktionsendonuclease spaltbar. Die Furchungsteilung trennt das Farbstoffpaar und vermindert das Donor-Quenching.

[0005] Das U.S.-Patent Nr. 5,866,336 beschreibt die Verwendung einer fluoreszenzmarkierten Haarnadel an einem Amplifikationsprimer bei einer PCR. Das 3'-Ende des Haarnadelprimers hybridisiert mit dem Complementary einer Nicht-Zielsequenz, die durch einen zweiten Primer am Ziel angefügt ist. Bei diesem System hat der Haarnadelprimer einen wesentlichen Anteil an der Amplifikation der Zielsequenz und muss verlängerbar sein.

[0006] Im Gegensatz dazu ist es bei der vorliegenden Erfindung nicht notwendig, dass die Reportersonde verlängerbar ist, da sie an der Amplifikation der Zielsequenz nicht beteiligt ist, sondern in einer separaten Abfolge von gleichzeitig mit der Zielamplifikation stattfindenden Reaktionsschritten ein Signal erzeugt. Ein weiterer Gegensatz besteht darin, dass die erfindungsgemäßen Signalprimer mit einer internen Sequenz des Ziels (d.h. zwischen den Amplifikationsprimern) hybridisieren, so dass die Signalerzeugungsreaktion eine Subsequenz des Ziels und nicht das Amplifikationsprodukt selbst nachweist.

[0007] Bei anderen Fluoreszenzlöschverfahren zum Nachweisen einer Zielsequenz kommt eine Furchungsteilung einer Restriktions-Schnittstelle zur Anwendung, welche durch direkte Hybridisierung einer die einzelsträngige Restriktions-Schnittstelle enthaltenden Sonde mit dem einzelsträngigen Ziel produziert wird. Das japanische Patent Nr. 93015439 B offenbart Verfahren zum Messen von Polynucleotiden durch Hybridisierung des einzelsträngigen Ziels mit einer einzelsträngigen Polynucleotidsonde, welche mit zwei Markierungen, die ein Energieübertragungspaar bilden, versehen ist. Das doppelsträngige Hybrid wird durch ein Restriktionsenzym zwischen den Markierungen gespalten, und die Fluoreszenz einer der Markierungen wird gemessen. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass die Restriktions-Schnittstelle in der Sonde auch in der Zielsequenz, die nachgewiesen wird, vorhanden sein muss. S. S. Ghosh, et al. (1994, Nucl. Acids Res. 22, 3155–3159) beschreiben die Restriktionsenzym-katalysierte Furchungsteilung Fluorophor-markierter Oligonucleotide, welche unter Anwendung eines Fluoreszenzresonanz-Energietransfers analysiert werden. Bei diesen Analysen werden die komplementären Oligonucleotide hybridisiert, um die doppelsträngige Restriktions-Schnittstelle herzustellen, wobei eine der fluoreszierenden Markierungen mit jedem der beiden Stränge verbunden ist.

KURZFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Bei der in den angeschlossenen Ansprüchen definierten, vorliegenden Erfindung wird ein Signalprimer zum Nachweisen einer Nucleinsäurezielsequenzamplifikation eingesetzt. Der bei der Erfindung verwendete Signalprimer hat eine ähnliche Struktur wie der im U.S.-Patent Nr. 5,547,861 beschriebene Signalprimer, ist je-

doch unmarkiert. Das Nachweissystem umfasst weiters eine markierte Reportersonde, deren 3'-Ende mit dem Complement der 5'-Schwanzsequenz des Signalprimers hybridisiert, um einen 5'-Überhang zu erzeugen. Der den 5'-Überhang bildende Bereich der Reportersonde (die Reporterkomponente) umfasst eine Struktur oder Sequenz, die in einer Weise markiert ist, welche das Nachweisen der Synthese des Complements des Überhangs ermöglicht. Vorzugsweise ist die Reporterkomponente fluoreszenzmarkiert, so dass die Fluoreszenz vor der Verlängerung des Signalprimers und der Synthese eines komplementären Strangs gelöscht wird. Das Vorhandensein des Complements der Reporterkomponente, welches diese doppelsträngig macht, reduziert in direkter Weise die Fluoreszenzlöschung und/oder ermöglicht das Stattfinden einer anschließenden Reaktion zwecks Verringerung der Löschung. Bei beiden Mechanismen führt das Complement der markierten Struktur oder Sequenz zu einem vergrößerten Abstand zwischen den Farbstoffen. Ein damit zusammenhängender Anstieg der Donor-Fluoreszenz oder eine Veränderung eines anderen, mit einer verminderten Fluoreszenzlöschung zusammenhängenden Fluoreszenzparameters kann als Hinweis auf eine Amplifikation der Zielsequenz nachgewiesen werden.

[0009] Die 5'-Schwanzsequenz des Signalprimers umfasst eine Sequenz, welche nicht mit dem Ziel hybridisiert (die Adaptorsequenz). Die Adaptorsequenz kann dahingehend ausgewählt sein, dass sie bei einer Vielzahl von Signalprimern, die verschiedene 3'-Zielbindesequenzen aufweisen, gleich ist (d.h. eine „universelle“ 5'-Schwanzsequenz). Dies ermöglicht die Verwendung einer einzigen Reportersondensequenz zum Nachweisen jeder gewünschten Zielsequenz, was einen Vorteil darstellt, da die Synthese der Reportersonde aufgrund der Markierung komplexer ist. Weiters vereinfacht die Erfindung die Synthese des zielspezifischen Signalprimers. Da der Signalprimer nicht markiert ist, können Signalprimer mit verschiedenen, für unterschiedliche Ziele spezifischen Zielbindesequenzen leichter und effizienter synthetisiert werden.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0010] [Fig. 1A](#) veranschaulicht die Detektion einer Nucleinsäurezielsequenz in einer Strangverdrängungsamplifikations(SDA)-Reaktion gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren. [Fig. 1B](#) stellt die zusätzlichen Reaktionsschritte dar, welche auftreten können, wenn die fluoreszenzmarkierte Sequenz in der Reportersonde eine mit Einzelstrangbrüchen versehbare RERS ist.

[0011] [Fig. 2](#) stellt die Ergebnisse von Beispiel 1 dar.

[0012] [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) stellen die Ergebnisse von Beispiel 2 dar.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0013] Bestimmte, hier verwendete Begriffe sind wie folgt definiert:

Ein Amplifikationsprimer ist ein Primer für die Amplifikation einer Zielsequenz durch Primerverlängerung. Bei einer SDA hybridisiert das 3'-Ende des Amplifikationsprimers (die Zielbindesequenz) mit dem 3'-Ende der Zielsequenz. Der Amplifikationsprimer umfasst in der Nähe seines 5'-Endes eine Erkennungsstelle für eine Restriktionsendonuclease. Die Erkennungsstelle besteht für eine Restriktionsendonuclease, die einen Strang eines DNA-Doppelstrangs spaltet, wenn die Erkennungsstelle hemimodifiziert wird („Einführen von Einzelstrangbrüchen“), wie im U.S.-Patent Nr. 5,455,166; im U.S.-Patent Nr. 5,270,184 und in der EP 0 684 315 beschrieben. Da zum Vorantreiben der Amplifikationsreaktion keine speziellen Sequenzen oder Strukturen erforderlich sind, können Amplifikationsprimer für eine PCR nur aus Zielbindesequenzen bestehen. Im Gegensatz dazu umfassen Amplifikationsprimer für 3SR und NASBA in der Nähe des 5'-Endes einen RNA-Polymerase-Promotor. Der Promotor ist an der Zielsequenz angefügt und dient zum Vorantreiben der Amplifikationsreaktion durch Steuern der Transcription multipler RNA-Kopien des Ziels.

[0014] Verlängerungsprodukte sind Nucleinsäuren, die einen Primer oder einen Teil eines Primers und einen neu synthetisierten Strang umfassen, welcher das Complement der stromabwärts von der Primerbindungsstelle gelegenen Sequenz ist. Verlängerungsprodukte resultieren aus der Hybridisierung eines Primers mit einer Matrize, die eine komplementäre Sequenz enthält, und der Verlängerung des Primers durch Polymerase unter Verwendung der Matrize.

[0015] Die Begriffe „Ziel“ oder „Zielsequenz“ beziehen sich auf zu amplifizierende oder nachzuweisende Nucleinsäuresequenzen. Diese umfassen die ursprüngliche, zu amplifizierende Nucleinsäuresequenz, deren komplementären zweiten Strang und beide Stränge einer Kopie der ursprünglichen Sequenz, die durch Replikation oder Amplifikation hergestellt wird. Eine Zielsequenz kann auch als Matrize für die Verlängerung hybridisierter Primer bezeichnet werden.

[0016] Ein Signalprimer, wie er bei der vorliegenden Erfindung verwendet wird, umfasst eine 3'-Zielbindesequenz, die mit einer komplementären Sequenz im Ziel hybridisiert und weiters eine 5'-Schwanzsequenz umfasst, die zum Ziel nicht komplementär ist (die Adaptorsequenz). Die Adaptorsequenz ist dahingehend ausgewählt, dass ihre komplementäre Sequenz mit dem 3'-Ende der untenstehend beschriebenen Reportersonde hybridisiert. Bei manchen Ausführungsformen der Erfindung ist die Adaptorsequenz dahingehend ausgewählt, dass ihre komplementäre Sequenz sowohl an das 3'-Ende der Reportersonde als auch an eine Sequenz innerhalb der Reporterkomponente der Reportersonde bindet, so wie untenstehend beschrieben. Bei der Erfindung weist der Signalprimer keine nachweisbare Markierung auf.

[0017] Eine Reportersonde, wie sie bei der vorliegenden Erfindung verwendet wird, umfasst eine Markierung, die vorzugsweise zumindest ein Donor/Quencher-Farbstoffpaar, d.h. ein fluoreszierender Donor-Farbstoff und ein Quencher für das Donor-Fluorophor, ist. Die Markierung ist mit einer Sequenz oder Struktur in der Reportersonde (der Reporterkomponente) verbunden, welche nicht direkt mit der Zielsequenz hybridisiert. Die Sequenz der Reportersonde, die 3' zur Reporterkomponente gelegen ist, wird dahingehend ausgewählt, um mit dem Complement der Signalprimer-Adaptorsequenz zu hybridisieren. Im Allgemeinen enthält das 3'-Ende der Reportersonde keine Sequenzen mit signifikanter Komplementarität zur Zielsequenz. In manchen Fällen kann die Reportersonde jedoch die Sequenz enthalten, die mit dem Adaptor-Complement hybridisiert, sowie eine weitere kurze Sequenz am 3'-Ende, die mit einem kurzen Segment des Ziel-Complements hybridisiert. In diesem Fall ist der Bereich der Zielkomplementarität nicht groß genug, um eine signifikante Hybridisierung ohne gleichzeitige Hybridisierung des adaptorspezifischen Bereichs der Reportersonde zu ermöglichen. Die Markierung der Reportersonde wird als Hinweis auf das Vorhandensein eines Complements der Reporterkomponente, welches diese doppelsträngig macht, nachgewiesen, wodurch das Vorhandensein oder die Amplifikation des Ziels angezeigt wird. Der 3'-Terminus der Reportersonde kann zwecks Verhinderung einer Verlängerung durch Polymerase mit einem Cap versehen werden oder kann verlängerbar sein. Das Anbringen des Caps kann die Leistung steigern, indem das Hintergrundsignal und der unproduktive Verbrauch von Reagenzien in unerwünschten Nebenreaktionen, die aus der Bildung von Primerdimeren und anderen fehlgeleiteten Startvorgängen resultieren, reduziert werden.

[0018] Jede Nucleinsäuresequenz oder -struktur, die so markiert werden kann, dass das Vorhandensein ihres gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Complements auf das Vorhandensein der Zielsequenz hinweist, kann als Reporterkomponente der Reportersonde dienen. Vorzugsweise ist die Reporterkomponente mit einem Donor/Quencher-Farbstoffpaar markiert, so dass die Donor-Fluoreszenz vor dem Nachweis eines Ziels gelöscht wird und die Löschung der Donor-Fluoreszenz als Hinweis auf das Vorhandensein des Ziels reduziert wird. Die Reporterkomponente kann eine sekundäre Struktur am 5'-Ende der Reportersonde sein, zum Beispiel ein Stern-Loop (oder eine Haarnadel), wie im U.S.-Patent Nr. 5,928,869 beschrieben, oder eine G-Quartett, wie im U.S.-Patent Nr. 5,691,145 beschrieben. Die sekundäre Struktur ist solcherart markiert, dass sich der Donor und der Quencher in enger Nachbarschaft befinden, wenn die sekundäre Struktur gefaltet wird, was zur Löschung der Donor-Fluoreszenz führt. Bei Vorhandensein eines Ziels wird die sekundäre Struktur in einer zielabhängigen Primerverlängerungsreaktion entfaltet, so dass der Abstand zwischen dem Donor und dem Quencher vergrößert wird. Dies vermindert die Löschung und erzeugt einen Anstieg der Donor-Fluoreszenz, was als Hinweis auf das Vorhandensein der Zielsequenz nachgewiesen werden kann. Alternativ kann die Reporterkomponente eine einzelsträngige Sequenz am 5'-Ende der Reportersonde sein, welche mit dem Donor und dem Quencher in ausreichend enger Nachbarschaft markiert ist, um eine Löschung zu erzeugen, und welche eine einzelsträngige Restriktionsendonuclease-Erkennungsstelle (RERS) enthält, so wie im U.S.-Patent Nr. 5,846,726 und im U.S.-Patent Nr. 5,919,630 beschrieben. In der einzelsträngigen Reportersonde ist die RERS nicht spaltbar. Bei Vorhandensein eines Ziels wird die einzelsträngige RERS jedoch in einer zielabhängigen Primerverlängerungsreaktion in die doppelsträngige Form umgewandelt und wird dadurch spaltbar. Eine Behandlung mit der geeigneten Restriktionsendonuclease spaltet die RERS zwischen den beiden Farbstoffen und teilt diese dabei in getrennte Nucleinsäurefragmente. Die damit zusammenhängende Vergrößerung des Abstands zwischen den Farbstoffen führt zu einer reduzierten Löschung der Donor-Fluoreszenz, die als Hinweis auf das Vorhandensein der Zielsequenz nachgewiesen werden kann. Bei einer weiteren Ausführungsform kann eine RERS-Reporterkomponente während der zielabhängigen Primerverlängerungsreaktion für das Einführen von Einzelstrangbrüchen geeignet gemacht werden, wie im U.S.-Patent Nr. 5,846,726 und im U.S.-Patent Nr. 5,919,630 gelehrt. Bei dieser Ausführungsform führt die Restriktionsendonuclease an dem Strang, mit dem der Donor und der Quencher verbunden sind, Einzelstrangbrüche ein, wenn die RERS doppelsträngig gemacht wird. Die Polymerase verlängert vom Einzelstrangbruch weg, wobei ein mit einem der Farbstoffe verbundenes, einzelsträngiges Fragment aus der Reportersonde verdrängt wird. Dies vergrößert auch den Abstand zwischen dem Donor und dem Quencher und führt zu einem Anstieg der Donor-Fluoreszenz aufgrund verminderter Löschung.

[0019] Eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, die bei einer SDA zur Anwendung kommt, ist in [Fig. 1A](#) schematisch dargestellt. Die Anfangsschritte der Reaktion stimmen mit der im U.S.-Patent Nr. 5,547,861 beschriebenen Signalprimerreaktion überein. Ein Signalprimer mit einer 3'-Zielbindesequenz (B) und einem nicht komplementären 5'-Schwanz (A) hybridisiert mit dem Ziel stromabwärts von einem Amplifikationsprimer (S_1) (Schritt 1). Wie dargestellt, ist die gesamte Hybridisierungsstelle des Signalprimers stromabwärts von der Hybridisierungsstelle des Amplifikationsprimers gelegen. Die Hybridisierungsstellen des Signalprimers und des Amplifikationsprimers am Ziel können jedoch auch teilweise überlappen (typischerweise nur durch einige Nucleotide), ohne die erfindungsgemäßen Verfahren maßgeblich zu beeinflussen. Wie hier verwendet, soll der Begriff „stromabwärts von“ bezüglich der Hybridisierungsstellen des Signalprimers und des Amplifikationsprimers am Ziel nicht überlappende und teilweise überlappende Stellen im Ziel umfassen. Im Anschluss an eine Hybridisierung mit dem Ziel werden der Amplifikationsprimer und der Signalprimer an der Zielsequenz gleichzeitig verlängert, und die Verlängerung des Amplifikationsprimers verdrängt das einzelsträngige Signalprimer-Verlängerungsprodukt (Schritt 2). Der zweite Amplifikationsprimer (S_2) hybridisiert mit dem Signalprimer-Verlängerungsprodukt (Schritt 3), und sowohl das Signalprimer-Verlängerungsprodukt als auch der Amplifikationsprimer werden verlängert, um ein doppelsträngiges sekundäres Amplifikationsprodukt mit einer hemimodifizierten RERS an einem Ende zu erzeugen (Schritt 4). Bei einer SDA wird durch das Einführen von Einzelstrangbrüchen am nicht modifizierten S_2 -Strang der RERS (in Schritt 4 als Pfeil dargestellt) und das Verdrängen des stromabwärts vom Einzelstrangbruch gelegenen Strangs ein einzelsträngiges Oligonucleotid erzeugt, welches das Complement des Signalprimers umfasst (Schritt 5). Das Complement des Signalprimers und das doppelsträngige sekundäre Amplifikationsprodukt werden nur dann hergestellt, wenn das Ziel vorhanden und amplifiziert ist. Sie können daher als Hinweis auf eine Zielamplifikation nachgewiesen werden.

[0020] Bei dem im U.S.-Patent Nr. 5,547,861 gelehrt Nachweisverfahren wird das doppelsträngige sekundäre Amplifikationsprodukt nachgewiesen. Im Gegensatz dazu weist die vorliegende Erfindung das einzelsträngige Oligonucleotid nach, welches nach dem Einführen von Einzelstrangbrüchen aus dem doppelsträngigen sekundären Amplifikationsprodukt verdrängt wird. Da dieses Oligonucleotid das Complement des Signalprimers umfasst, hybridisiert das 3'-Ende der Reportersonde mit ihm (Schritt 6). Das 5'-Ende der Reportersonde, welches die markierte Struktur oder Sequenz enthält, bildet einen Überhang mit zwei zurückversetzten 3'-Enden, welche geeignete Substrate für Polymerase sind. Wenn die Reportersonde nicht mit einem Cap zur Verhinderung einer Verlängerung versehen ist, werden sowohl die Reportersonde als auch das einzelsträngige Oligonucleotid verlängert, um ein völlig doppelsträngiges Molekül zu produzieren (Schritt 7). Ist die Reportersonde nicht verlängerbar, so wird nur das zurückversetzte 3'-Ende des einzelsträngigen Oligonucleotids (welches das Complement des Signalprimers umfasst) verlängert, und das Produkt ist teilweise einzelsträngig und teilweise doppelsträngig. In beiden Fällen wird jene Sequenz synthetisiert, die zur markierten Struktur oder Sequenz der Reportersonde komplementär ist, und wird dabei doppelsträngig gemacht. [Fig. 1A](#) veranschaulicht die Erfindung unter Verwendung einer Haarnadel-Reporterkomponente, die mit einem Donor/Quencher-Farbstoffpaar markiert ist, so dass die Donor-Fluoreszenz gelöscht wird. Aus diesem Beispiel ist zu erkennen, dass es für den Nachweis der Reporterkomponente nicht unbedingt notwendig ist, diese vollständig doppelsträngig zu machen. Ein Teilcomplement der Haarnadelstruktur kann beispielsweise ausreichen, um die Arme des Stamms davon abzuhalten, miteinander zu hybridisieren. Wie hier verwendet, soll „doppelsträngige Reporterkomponente“ sowohl völlig als auch teilweise doppelsträngige Reporterkomponenten umfassen, vorausgesetzt, dass sie ausreichend doppelsträngig sind, um die Reporterkomponente nachweisbar zu machen. Wenn die Reporterkomponente in der Primerverlängerungsreaktion doppelsträngig gemacht wird, wird die Haarnadel entfaltet. Beim Entfalten werden die beiden Farbstoffe räumlich genügend voneinander getrennt, um die Löschung der Donor-Fluoreszenz durch den Quencher zu verringern oder auszuschalten. Der resultierende Anstieg der Donor-Fluoreszenz oder eine Veränderung eines anderen Fluoreszenzparameters in Zusammenhang mit einer Veränderung der Fluoreszenzlöschung (wie z.B. Fluoreszenzlebensdauer, Fluoreszenzpolarisation oder Veränderung der Emission des Quencher/Akzeptor-Farbstoffs) kann als Hinweis auf die Amplifikation der Zielsequenz nachgewiesen werden. Außerdem können, wie in [Fig. 1A](#) dargestellt, mehrere Reporterkomponenten in einer einzigen Reportersonde vereinigt sein, und eine markierte Haarnadel kann beispielsweise in der einzelsträngigen „Schleife“ eine einzelsträngige RERS aufweisen. Bei dieser Ausführungsform entfaltet die Synthese des Complements der Reporterkomponente nicht nur die Haarnadel, um einen Fluoreszenzanstieg zu bewirken, sondern die RERS wird gleichzeitig auch spaltbar oder mit Einzelstrangbrüchen versehen, wodurch im Allgemeinen ein zusätzlicher Fluoreszenzanstieg erzeugt wird.

[0021] Wie in [Fig. 1A](#) dargestellt, hybridisiert die gefaltete Reporterkomponente (z.B. eine Haarnadel) der Reportersonde nicht mit dem Complement der Adaptorsequenz. Die Adaptorsequenz kann jedoch dahingehend ausgewählt sein, dass ihre komplementäre Sequenz mit einer gesamten gefalteten Reporterkomponente der Reportersonde oder einem Teil davon hybridisiert. In diesem Fall wird allein die Hybridisierung die Reporterkomponente entfalten oder teilweise entfalten, wobei ohne Notwendigkeit einer Polymerase-katalysierten Ver-

längerung im Anschluss an die Hybridisierung ein Signal erzeugt wird. Die gefaltete Reporterkomponente kann bei dieser Ausführungsform die gesamte Reportersondensequenz oder einen Teil davon umfassen. Bei einem Beispiel für eine solche Ausführungsform kann die Reportersonde ein molekularer Beacon sein, wie von Tyagi und Kramer beschrieben, siehe oben, wobei die Schleife der Beacon-Haarnadel die gesamte Adaptorsequenz oder einen Teil davon umfasst. Da das Complement der Adaptorsequenz während der Zielamplifikation synthetisiert wird, bindet es an den molekularen Beacon und entfaltet die Struktur und erzeugt dabei eine erhöhte Fluoreszenz. Bei einer weiteren Ausführungsform enthält die Reportersonde eine einzelsträngige Sequenz 3' zur gefalteten Reporterkomponente, so dass sowohl die einzelsträngige Sequenz als auch die gesamte gefaltete Reporterkomponente oder ein Teil davon mit der zur Adaptorsequenz komplementären Sequenz hybridisieren, wenn diese während der Amplifikation erzeugt wird.

[0022] Bei anderen alternativen Ausführungsformen können in dem in [Fig. 1A](#) gezeigten Reaktionsschema andere Reporterkomponenten substituiert werden. Beispielsweise können andere gefaltete Nucleinsäurestrukturen, wie z.B. G-Quartetts, in einer ähnlichen zielabhängigen Weise substituiert und entfaltet werden, um die Fluoreszenzlöschung zu reduzieren. Alternativ kann eine spezialisierte lineare Sequenz als Reporterkomponente verwendet werden, beispielsweise eine RERS. Wird eine RERS als Reporterkomponente verwendet, so sind der Donor und der Quencher die Spaltstelle flankierend gebunden, so dass die beiden Farbstoffe auf separaten Nucleinsäurefragmenten getrennt werden, wenn die RERS doppelsträngig gemacht und in zielabhängiger Weise gespalten wird (Schritt 8, [Fig. 1A](#)). Diese alternativen sekundären Strukturen können ebenfalls mit spezialisierten Sequenzen, wie z.B. einer RERS in einem G-Quartett, kombiniert werden. Alternativ kann die RERS in ihrer doppelsträngigen Form für das Einführen von Einzelstrangbrüchen geeignet gemacht werden, anstatt spaltbar gemacht zu werden. Dies ist eine besonders geeignete Ausführungsform für die Verwendung bei einer SDA, da der Einbau von modifizierten Nucleotiden und die Herstellung von RERS, an denen Einzelstrangbrüche eingeführt werden können, einen wesentlichen Teil der Amplifikationsreaktion bilden. Die Erzeugung einer RERS, an der Einzelstrangbrüche eingeführt werden können, in der Reportersonde fügt einige zusätzliche Nebenreaktionen zum Reaktionsschema der [Fig. 1A](#) hinzu (gezeigt in [Fig. 1B](#)). [Fig. 1B](#) veranschaulicht die Reaktion, wenn die RERS des in Schritt 7 der [Fig. 1A](#) dargestellten, doppelsträngigen Moleküls, anstatt gespalten zu werden, einer Einführung von Einzelstrangbrüchen unterzogen wird. Unter Bezugnahme auf [Fig. 1B](#) werden zwei Produkte erzeugt, wenn Polymerase vom Einzelstrangbruch weg verlängert: das doppelsträngige Molekül (das nun nur einen der beiden Farbstoffe trägt) wird regeneriert, und das einzelsträngige Molekül stromabwärts vom Einzelstrangbruch wird verdrängt (Schritt 9, trägt den anderen der beiden Farbstoffe). Am doppelsträngigen Molekül können erneut Einzelstrangbrüche eingeführt werden, wobei es zu einer Verdrängung zusätzlicher einzelsträngiger Moleküle kommt, und die verdrängten einzelsträngigen Moleküle können mit einem Amplifikationsprimer hybridisieren (Schritt 10) und verlängert werden, um in einem vollständig doppelsträngigen Molekül eine RERS zu produzieren, an der Einzelstrangbrüche eingeführt werden können (Schritte 11 und 12). Durch weiteres Einführen von Einzelstrangbrüchen und Verdrängen werden einzelsträngige Moleküle erzeugt, die an einem Ende eine von der vorhergehenden Reportersonde abgeleitete teilweise RERS und keine Markierung aufweisen (Schritt 13). Diese hybridisiert mit einer neuen Reportersonde (Schritt 14), und das zurückversetzte Ende wird verlängerbar, da die Haarnadel atmet und eine Hybridisierung der teilweisen RERS ermöglicht. Das Auffüllen des zurückversetzten Endes macht die RERS für das Einführen von Einzelstrangbrüchen geeignet (Schritt 15), und das verdrängte einzelsträngige Molekül tritt erneut in die Reaktion ein und der Kreislauf wiederholt sich. Dies verstärkt das Signal, das anfänglich durch eine einzige Signalprimer/Ziel-Wechselwirkung erzeugt wurde, und zwar mittels einer separaten Reaktion, die unabhängig von jeder weiteren Zielamplifikation abläuft.

[0023] Im Allgemeinen ist die Länge der Sequenzen, die an der intermolekularen Basenpaarung zwischen dem Complement der Adaptorsequenz des Signalprimers und der Reportersonde beteiligt sind, nicht entscheidend. Hinsichtlich des Signalprimers wurde jedoch beobachtet, dass die T_m der Zielbindesequenz im Allgemeinen einen größeren Einfluss auf die Analyseeffizienz hat und dass längere Zielbindesequenzen im Allgemeinen mehr fluoreszierendes Signal während der Analyse erzeugen. Dies könnte an der Konkurrenz zwischen dem Signalprimer und dem Verlängerungsprodukt des stromaufwärts gelegenen Amplifikationsprimers hinsichtlich der Hybridisierung mit der Zielsequenz liegen. Die geeignete Länge für den Signalprimer und die Reportersonde wird durch die Anzahl der Nucleotide bestimmt, die für eine stabile Basenpaarung erforderlich sind, um ein teilweise doppelsträngiges Molekül unter den ausgewählten Reaktionsbedingungen zu erhalten, und dies gehört zum durchschnittlichen Fachwissen. Aus Gründen der Zweckdienlichkeit sind die an der Basenpaarung beteiligten Sequenzen typischerweise zwischen etwa 8 und 75 Nucleotide lang. Die maximale Länge wird nur durch praktische Bedenken wie z.B. die Einfachheit und Effizienz der Oligonucleotidsynthese und -gewinnung einschränkt.

[0024] Das Auswählen der passenden Konzentrationen von Signalprimer und Reportersonde bei der Reakti-

on gehört ebenfalls zum durchschnittlichen Fachwissen. Vorzugsweise ist die Konzentration an Signalprimer und Reportersonde relativ hoch und die Konzentration an stromaufwärts gelegenem Amplifikationsprimer relativ niedrig, da dies im Allgemeinen für eine höhere Fluoreszenzsignalerzeugung bei der Reaktion sorgt.

[0025] Ein zweiter Signalprimer, der mit dem zweiten komplementären Strang einer doppelsträngigen Zielsequenz hybridisiert, kann gegebenenfalls in der Reaktion inkludiert sein, vorausgesetzt, dass der erste und der zweite Signalprimer nicht miteinander hybridisieren. Der zweite Signalprimer hybridisiert mit dem zweiten Strang der Zielsequenz stromabwärts vom zweiten Amplifikationsprimer und wird durch Verlängerung des zweiten Amplifikationsprimers verlängert und verdrängt. Das zweite Signalprimer-Verlängerungsprodukt wird durch Hybridisierung und Verlängerung des ersten Amplifikationsprimers doppelsträngig gemacht. Die Erzeugung der doppelsträngigen markierten Struktur oder Sequenz und die Trennung des Farbstoffpaars verlaufen wie beim ersten Strang der Zielsequenz. Der zweite Signalprimer umfasst vorzugsweise dieselbe 5'-Adaptorsequenz wie der erste Signalprimer, um das Nachweisen der Amplifikationsprodukte beider Zielstränge mit einer einzigen Reportersonde zu ermöglichen.

[0026] Außerdem können, falls gewünscht, mehrere Signalprimer pro Zielstrang eingesetzt werden, wobei jeder mit der Zielsequenz stromabwärts vom anderen am selben Strang hybridisiert, wodurch alle Signalprimer stromabwärts vom Amplifikationsprimer hybridisiert werden. Auf diese Art und Weise wird jeder Signalprimer durch Verlängerung der stromaufwärts gelegenen Detektornucleinsäure verdrängt, und der Signalprimer, der am meisten 5' ist, wird vom Amplifikationsprimer verdrängt. Die Verwendung mehrerer Signalprimer hat den Vorteil, dass das pro Ziel erzeugte Signal erhöht oder verstärkt wird, wobei es zu einem Anstieg der Empfindlichkeit der Analyse kommt. Wiederum ist es vorzuziehen, aber nicht notwendig, dass alle Signalprimer dieselbe 5'-Adaptorsequenz umfassen, um einen Nachweis aller Reaktionsprodukte unter Verwendung einer einzigen Reportersonde zu ermöglichen.

[0027] Mehrere Signalprimer können auch verwendet werden, um eine Mehrzahl von verschiedenen Zielsequenzen gleichzeitig nachzuweisen. In diesem Fall sind die 5'-Adaptorsequenzen der Signalprimer vorzugsweise für jedes nachzuweisende Ziel verschieden. Durch das Markieren von Reportersonden, die für die 5'-Adaptorsequenz jedes zielspezifischen Signalprimers spezifisch sind, mit Donor/Quencher-Farbstoffpaaren, die unterscheidbar sind, kann durch das Nachweisen von Veränderungen im Ausmaß der Fluoreszenzlöschung bei der auf jedes Ziel gerichteten Reportersonde das Vorhandensein jedes Ziels ermittelt werden. Diese Ausführungsform der Erfindung ist besonders nützlich für das Nachweisen einzelner Nucleotidsequenzvariationen wie z.B. solcher, die mit bestimmten Erkrankungszuständen und -bedingungen zusammenhängen. Die Zielbindesequenz jedes Signalprimers kann dahingehend ausgewählt werden, um für eine spezifische Sequenzvariante des Ziels spezifisch zu sein. Nur jene Signalprimer, welche die korrekte Zielbindesequenz für die Hybridisierung mit dem Ziel umfassen, hybridisieren, werden verlängert und führen dazu, dass ein Complement der Adaptorsequenz produziert wird. Die für dieses Adaptorsequenz-Complement spezifische Reportersonde erzeugt daraufhin ein Signal, das anzeigt, welche Sequenzvariante(n) aufgrund ihrer charakteristischen Markierung vorhanden ist bzw. sind.

[0028] Alternativ kann bei einer separaten Analyse mehrerer verschiedener Ziele dieselbe 5'-Adaptorsequenz bei Signalprimern, die auf die mehreren verschiedenen Zielsequenzen gerichtet sind, verwendet werden. Eine Spezifität für die verschiedenen Zielsequenzen wird durch Abwandlung der 3'-Zielbindesequenz des Signalprimers verliehen. Dieser Ansatz vereinfacht nicht nur das Design und die Synthese von Signalprimern, sondern ermöglicht auch die Verwendung derselben Reportersonde für das Nachweisen jeder gewünschten Zielsequenz. In kommerzieller Hinsicht hat dies den Vorteil, dass die Produktion nur einer einzigen Reportersonde erforderlich ist, um Analysesysteme für eine Vielzahl von Zielen herzustellen, wodurch Produktionskosten gesenkt werden und die Entwicklung von Analysen für neue Ziele vereinfacht wird. Weiters wird die Synthese der verschiedenen Signalprimer einfacher und kostengünstiger, da sie keine Markierung benötigen.

[0029] Es ist offensichtlich, dass die erfindungsgemäßen Signalprimer zusätzlich zur SDA für die Verwendung bei anderen Primerverlängerungsamplifikationsverfahren (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 als Ersatz eingesetzt werden und eine Strangverdrängungs-DNA-Polymerase verwendet wird, die keine 5'→3'-Exonucleaseaktivität aufweist (z.B. Sequencing Grade Taq von Promega oder exo⁻Vent oder exo⁻Deep Vent von New England BioLabs). Die Signalprimer hybridisieren mit dem Ziel stromabwärts von den PCR-Amplifikationsprimern. Sie werden verlängert, aus dem Ziel verdrängt und doppelsträngig gemacht, und zwar im Wesentlichen wie hinsichtlich der SDA beschrieben. Das einzelsträngige Oligonucleotid, welches das Complement der Signalprimer-5'-Adaptorsequenz umfasst, wird durch Denaturierung des doppelsträngigen sekundären Amplifikationsprodukts erzeugt, gefolgt von einer Hybridisierung der

Reportersonde und einer Polymerase-Verlängerung zwecks Synthetisierung des komplementären Strangs der markierten Reporterkomponente in der Reportersonde. Wie bei SDA-Systemen sorgt eine Synthese des komplementären Strangs entweder direkt oder indirekt für eine Veränderung der Nähe zwischen Donor- und Quencherfarbstoff und verändert den Grad der Fluoreszenzlöschung. Eine damit zusammenhängende Veränderung eines Fluoreszenzparameters, wie z.B. der Intensität, dient als Hinweis auf eine Zielamplifikation.

[0030] Zur Anpassung der erfindungsgemäßen Verfahren an 3SR, TMA oder NASBA wird eine 5'→3'-Exonuclease-defiziente Reverse Transcriptase mit strangverdrängender Aktivität eingesetzt, wobei es zu einer Hybridisierung des Signalprimers mit dem RNA-Ziel stromabwärts von einem Amplifikationsprimer kommt. In einem Reaktionsschema, das dem zuvor beschriebenen ähnelt, wird der hybridisierte Signalprimer 1) verlängert und 2) durch Verlängerung des stromaufwärts gelegenen Amplifikationsprimers verdrängt. Das verdrängte Signalprimer-Verlängerungsprodukt wird danach durch Hybridisierung und Verlängerung des zweiten Amplifikationsprimers, der einen RNA-Polymerase-Promotor enthält, vollständig doppelsträngig gemacht. Die Promotorsequenz, welche sich am 5'-Schwanz des zweiten Amplifikationsprimers befindet, wird durch Verlängerung des 3'-Endes des Signalprimer-Verlängerungsprodukts doppelsträngig gemacht. Aus dem doppelsträngigen Promotor erzeugt RNA-Polymerase RNA-Kopien, die zum Signalprimer-Verlängerungsprodukt komplementär sind. Das 3'-Ende jeder RNA-Kopie enthält eine zur Adaptorsequenz des Signalprimers komplementäre Sequenz. Diese Sequenz hybridisiert dann mit einem komplementären Bereich der Reportersonde. Wenn die Reportersonde verlängerbar ist, verlängert eine Reverse Transcriptase das 3'-Ende der Sonde auf der RNA-Matrize, um ein Reportersonden-Verlängerungsprodukt zu erzeugen. Danach zerlegt RNase H den RNA-Strang dieser Heteroduplex und befreit dabei das Reportersonden-Verlängerungsprodukt für die Hybridisierung mit dem zweiten Amplifikationsprimer, welcher die Promotorsequenz enthält. Eine Umwandlung der Promotorsequenz in die doppelsträngige Form leitet eine neue Runde der RNA-Synthese ein, wodurch sich Produkte ergeben, die zum Reportersonden-Verlängerungsprodukt, einschließlich der vollen Reporterkomponentensequenz, komplementär sind. Eine Hybridisierung von Reportersonden mit diesen RNA-Zielen bewirkt eine Entfaltung der Reporterkomponente, wodurch beim Trennen von Donor- und Quencher-Farbstoff und beim Verändern der Löschung ein Signal erzeugt wird. Außerdem werden die Reportersonden, wie obenstehend beschrieben, am RNA-Ziel verlängert, und der Zyklus wird wiederholt.

[0031] Wenn die Reportersonden nicht verlängerbar (mit Cap versehen) sind, muss die Adaptorsequenz des Signalprimers dahingehend ausgewählt werden, um solche Sequenzen zu enthalten, dass das Complement der Adaptorsequenz mit der Reporterkomponente der Reportersonde hybridisiert. Die Reaktion schreitet voran wie obenstehend beschrieben, abgesehen davon, dass die mit Cap versehenen Reportersonden nicht verlängert werden und die RNA-Complemente des Signalprimer-Verlängerungsprodukts mit der mit einem Cap versehenen Reportersonde (einschließlich der Reporterkomponente) hybridisieren. Ein Signal wird erzeugt, wenn sich die Reporterkomponente entfaltet und die Löschung der Donor-Fluoreszenz während der Hybridisierung abgeschwächt wird.

[0032] In Hinblick auf einen reduzierten Hintergrund wird bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen Signalprimer wie obenstehend beschrieben verwendet werden, wobei das Signalprimer-Verlängerungsprodukt durch Verdrängung aufgrund einer Verlängerung des stromaufwärts gelegenen Amplifikationsprimers von der Zielsequenz getrennt wird. Es ist jedoch zu erkennen, dass die für die Verwendung in den verschiedenen Nucleinsäureamplifikationsreaktionen bekannten Amplifikationsprimer selbst für eine Hybridisierung der Reportersonde verwendet werden können, wenn die Primer geeignete Adaptorsequenzen enthalten. Bei dieser Ausführungsform befindet sich die Adaptorsequenz eines SDA-Primers zwischen der mit Einzelstrangbrüchen versehenen Restriktionsendonuclease-Stelle, welche die SDA vorantreibt, und der Zielbindesequenz. Eine SDA mit diesem Primer erzeugt ein amplifiziertes Produkt, das an seinem 3'-Ende eine zur Reportersonde komplementäre Sequenz enthält. Das Binden der Reportersonde an diese komplementäre Sequenz erzeugt ein Signal, so wie obenstehend beschrieben. Für eine PCR und eine NASBA werden die Amplifikationsprimer durch Hinzufügen eines nicht komplementären 5'-Schwanzes modifiziert, wie obenstehend hinsichtlich des Signalprimers beschrieben. Im Falle einer NASBA ist der Primer, dem der RNA-Polymerase-Promotor fehlt, der mit der 5'-Adaptorsequenz modifizierte Primer. Während einer PCR und einer NASBA werden Complementary Primer-Verlängerungsprodukte, die einen Adaptor enthalten, hergestellt, so wie obenstehend hinsichtlich der Signalprimer beschrieben. Diese komplementären Sequenzen werden entweder durch Wärmedenaturierung (PCR) oder durch enzymatischen Aufschluss der RNA-Matrize (RNase H in NASBA) einzelsträngig gemacht, und das einzelsträngige Complement bindet danach an die Reportersonde, so wie obenstehend hinsichtlich der Signalprimer beschrieben. Die Verwendung von Amplifikationsprimern als Signalprimer beseitigt bei der Reaktion den Bedarf am zusätzlichen Signalprimer, da der Hintergrund bei dieser Ausführungsform jedoch höher sein kann, könnte die Empfindlichkeit der Analyse vermindert sein.

[0033] Bei anderen alternativen Ausführungsformen können die erfindungsgemäßen Signalprimer bei Analyseformaten, die nicht auf einer Amplifikation beruhen, zum Nachweisen von Zielsequenzen verwendet werden. Bei einer ersten Ausführungsform einer Nicht-Zielamplifikation hybridisiert die einzelsträngige 3'-Zielbindesequenz des Signalprimers solcherart mit dem 3'-Ende der Zielsequenz, dass die 5'-Adaptorsequenz einen 5'-Überhang bildet. Die Zielsequenz funktioniert als Primer für die Synthese eines zum Signalprimer komplementären Strangs, wobei zum Verlängern der Zielsequenz eine Polymerase verwendet wird und der 5'-Überhang als Matrize verwendet wird. Wenn die Zielbindesequenz des Signalprimers nur mit einem Teil der Zielsequenz hybridisiert, bildet die Zielsequenz ebenfalls einen 5'-Überhang und kann der Signalprimer gleichermaßen verlängert werden, wobei der 5'-Überhang des Ziels als Matrize verwendet wird. Alternativ kann der Signalprimer nicht verlängerbar sein, da bei dieser Ausführungsform der Erfindung eine Synthese einer Kopie der Zielsequenz nicht erforderlich ist. In beiden Fällen wird das Complement der Adaptorsequenz des Signalprimers synthetisiert. Nach einer Trennung der beiden Stränge hybridisiert das Complement der Signalprimer-Adaptorsequenz im Ziel mit dem 3'-Ende der Reportersonde, wodurch die markierte Reporterkomponente nach einer Polymerase-Verlängerung des zurückversetzten 3'-Endes des Adaptorsequenz-Complements doppelsträngig gemacht wird. Ein Vorteil dieser Ausführungsform gegenüber der im U.S.-Patent Nr. 5,866,336 beschriebenen Reaktion besteht darin, dass die Verwendung des Überhangs eine Synthese des Complements der Adaptorsequenz in einem einzigen Verlängerungsschritt anstatt in zwei ermöglicht. Das heißt, das Complement der Adaptorsequenz wird direkt am ursprünglichen Ziel angefügt, wodurch eine Zieldetektion ohne Bedarf an einer Amplifikation ermöglicht wird. Bei einer zweiten bevorzugten, erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Nicht-Zielamplifikation wird der Signalprimer mit einer internen Sequenz des Ziels hybridisiert, wobei stromaufwärts ein zusätzlicher Primer hybridisiert wird, um ihn zu verdrängen (allgemein als „Bumper“-Primer bezeichnet). Der Signalprimer und der Bumperprimer werden verlängert, so dass das Signalprimer-Verlängerungsprodukt aus der Zielsequenz verdrängt wird. Ein zweites Paar von Primern wird mit dem Verlängerungsprodukt hybridisiert und solcherart verlängert, dass das stromabwärts gelegene Primerverlängerungsprodukt das Complement der Adaptorsequenz enthält und durch Verlängerung seines Bumperprimers aus dem Signalprimer-Verlängerungsprodukt verdrängt wird. Die Reportersonde hybridisiert mit dem Complement der Adaptorsequenz, und die Adaptorsequenz wird verlängert so wie hier beschrieben, um das Complement der Reporterkomponente zu synthetisieren. Da es sich dabei um eine isotherme Reaktion handelt, die zum Trennen komplementärer Stränge von einer Strangverdrängung abhängt, macht eine Verlängerung des ersten Bumperprimers das Ziel doppelsträngig und untauglich für die Teilnahme an irgendwelchen weiteren Reaktionsschritten. Obwohl eine Kopie erzeugt und verdrängt wird, wird dies nicht als Zielamplifikation betrachtet, da die Kopie eine Subsequenz des ursprünglichen Ziels darstellt, welche als Hinweis auf das Vorhandensein des Ziels nachgewiesen wird, und pro ursprünglicher Zielsequenz nur eine Kopie der Subsequenz erzeugt wird.

[0034] Die vorhergehende Offenbarung bezieht sich in erster Linie auf bevorzugte Ausführungsformen, bei denen die Reporterkomponente mit einem fluoreszierenden Donor/Quencher-Farbstoffpaar markiert ist und die Synthese des Complements der Reporterkomponente durch einen Anstieg der Fluoreszenz nachgewiesen wird. Dieses Markierungssystem ermöglicht die Synthese des nachzuweisenden Complements in Echtzeit und/oder in einer homogenen Analyse (d.h. ohne Abtrennung der Markierung vor der Detektion). Dem Fachmann sind allerdings auch andere, bei der Erfindung nützliche Markierungen offensichtlich. An der Reporterkomponente kann zum Beispiel eine einzige Fluoreszenzmarkierung verwendet werden, wobei in Gegenwart des Complements der Reporterkomponente eine Veränderung der Fluoreszenzpolarisation nachgewiesen wird (siehe U.S.-Patent Nr. 5,593,867). Nicht fluoreszierende Markierungen sind ebenfalls nützlich. Die Reporterkomponente kann beispielsweise mit einem lipophilen Farbstoff markiert sein und eine Restriktions-Schnittstelle enthalten, die in Gegenwart des Complements der Reporterkomponente gespalten wird (siehe U.S.-Patent Nr. 5,550,025). Alternativ kann die Reportersonde radiomarkiert sein, und die aus einer Synthese des Complements der Reporterkomponente resultierenden Produkte können durch Elektrophorese aufgelöst und durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Immunologische Markierungen können ebenfalls verwendet werden. Nach der Synthese des Complements der Reporterkomponente kann eine mit einem Hapten markierte Reportersonde nachgewiesen werden, indem zuerst eine nicht umgesetzte Reportersonde entfernt wird (beispielsweise durch Adaptor-spezifisches Einfangen an einer Festphase) und danach die Hapten-Markierung unter Verwendung standardmäßiger chemilumineszierender oder kolorimetrischer ELISAs an der umgesetzten Reportersonde nachgewiesen wird. Eine Biotinmarkierung kann das Hapten ersetzen und unter Anwendung im Stand der Technik bekannter Verfahren nachgewiesen werden.

[0035] Die Markierung, welche das Vorhandensein des Complements der Reporterkomponente anzeigt, kann an einem ausgewählten Endpunkt in der Reaktion nachgewiesen werden. Da jedoch Oligonucleotide mit einem vergrößerten Abstand zwischen dem Donor und dem Quencher zugleich mit einer Hybridisierung und Primerverlängerung hergestellt werden, kann die Markierung auch beim Ablaufen der Reaktion, d.h. in „Echtzeit“, überwacht werden. Dieses homogene Echtzeit-Analyseformat kann zur Bereitstellung halbquantitativer oder

quantitativer Informationen über die Ausgangsmenge an vorhandenem Ziel verwendet werden. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Markierung (z.B. die Fluoreszenzintensität) während der Reaktion ändert (entweder als Teil einer Zielamplifikation oder in Nicht-Amplifikationsnachweisverfahren) ist beispielsweise ein Hinweis auf anfängliche Zielpegel. Demzufolge erreicht die Markierung rascher einen ausgewählten Schwellenwert (d.h. kürzere Zeit bis zur Positivität), wenn mehr Ausgangskopien der Zielsequenz vorhanden sind. Außerdem ist die Geschwindigkeit der Veränderung der Markierung im Verlauf der Reaktion bei Proben, die höhere Ausgangsmengen an Ziel enthalten, höher als bei Proben, die geringere Ausgangsmengen an Ziel enthalten. Diese oder andere, im Stand der Technik bekannte Messungen kann bzw. können als Hinweis auf das Vorhandensein eines Ziels oder als Hinweis auf eine Zielamplifikation durchgeführt werden. Die Ausgangsmenge an Ziel wird typischerweise durch einen Vergleich der Versuchsergebnisse mit den Ergebnissen hinsichtlich bekannter Zielmengen ermittelt.

[0036] Zahlreiche, im Stand der Technik bekannte Donor/Quencher-Farbstoffpaare sind bei bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung von Nutzen. Diese umfassen beispielsweise Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)/Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC), FITC/Texas Red™ (Molecular Probes), FITC/N-Hydroxysuccinimidyl-1-pyrenbutyrat (PYB), FITC/Eosinisothiocyanat (EITC), N-Hydroxysuccinimidyl-1-pyrensulfonyl (PYS)/FITC, FITC/Rhodamin X, FITC/Tetramethylrhodamin (TAMRA) und andere. Die Auswahl eines bestimmten Donor/Quencher-Paars ist nicht entscheidend. Bei Energietransfer-Löschungsmechanismen ist es nur erforderlich, dass die Emissionswellenlängen des Donor-Fluorophors mit den Anregungswellenlängen des Quenchers überlappen, d.h., zwischen den beiden Farbstoffen muss eine ausreichende spektrale Überlappung bestehen, um eine effiziente Energieübertragung, Ladungsübertragung oder Fluoreszenzlöschung zu ermöglichen. P-(Dimethylaminophenylazo)benzoesäure (DABCYL) ist ein nicht fluoreszierender Quencher-Farbstoff, welcher die Fluoreszenz aus einem benachbarten Fluorophor, z.B. Fluorescein oder 5-(2'-Aminoethyl)aminonaphthalin (EDANS), wirksam löscht. Bestimmte Donor/Quencher-Paare sind obenstehend und in den nachfolgenden Beispielen veranschaulicht, andere sind dem Fachmann jedoch offensichtlich und bei der Erfindung ebenfalls von Nutzen. Jedes Farbstoffpaar, das bei den erfindungsgemäßen Reportersonden eine Fluoreszenzlöschung bewirkt, ist für die Verwendung bei den erfindungsgemäßen Verfahren geeignet, und zwar ungeachtet des Mechanismus, durch den die Löschung erfolgt. Terminale und interne Markierungsverfahren sind ebenfalls im Stand der Technik bekannt und können routinemäßig zum Verbinden des Donor- und des Quencher-Farbstoffs an deren jeweiligen Stellen in der Reportersonde verwendet werden.

BEISPIEL 1

[0037] Strangverdrängungsamplifikationsreaktionen, die erfindungsgemäße Signalprimer enthalten, wurden im Wesentlichen so ablaufen gelassen, wie es im U.S.-Patent Nr. 5,547,861 hinsichtlich der Detektion einer synthetischen Zielsequenz beschrieben ist. Eine erste Reaktion enthielt 10^6 Kopien der Zielsequenz, für die Amplifikation der synthetischen Zielsequenz geeignete SDA-Amplifikationsprimer, 100 nM eines erfindungsgemäßen Signalprimers, umfassend eine für das Ziel spezifische Zielbindesequenz und eine zur 3'-Sequenz einer Reportersonde identische 5'-Schwanzsequenz, sowie 200 nM der Reportersonde. Die Sequenz der Reportersonde enthielt eine RERS im 5'-Bereich, welche von Fluorescein und Rhodamin X (Rox) solcherart flankiert war, dass die Fluoreszenz von Fluorescein gelöscht wurde, wenn die RERS intakt war. Die Sequenzen des Signalprimers und der Reportersonde (in der 5'- bis 3'-Richtung dargestellt) werden untenstehend gezeigt. Die Zielbindesequenz ist kursiv dargestellt, die 5'-Adaptorsequenz des Signalprimers und die identische 3'-Sequenz der Reportersonde sind unterstrichen, und die RERS der Reportersonde ist fett geschrieben.

Signalprimer (SEQ ID NO: 1):

CCAAAATGACAGCTTCTGATGGAATGACTCACTGAGTTGGAACGT

Reportersonde (SEQ ID NO: 2):

(Fluorescein)**TACCTCGAGT**(rox)GCAGCCAAAAGACAGCTTCTGATGGAA

[0038] Eine zweite Reaktion enthielt kein Ziel und denselben Signalprimer wie in der ersten Reaktion. Eine dritte Reaktion war eine Kontrollreaktion, die nur 10^6 Zielkopien und die Reportersonde (d.h. keinen Signalprimer) enthielt. Die Fluorescein-Fluoreszenz wurde während der Amplifikationsreaktionen in Echtzeit ermittelt. Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, blieb die Donor-Fluoreszenz bei Fehlen eines Ziels niedrig und konstant, was auf eine Löschung der Fluoreszenz während der gesamten Reaktion aufgrund eines Versagens der RERS der Reportersonde, in die doppelsträngige Form umgewandelt und gespalten zu werden, hinwies. Bei Fehlen eines Signalprimers blieb die Donor-Fluoreszenz ebenfalls während der gesamten Amplifikationsreaktion gelöscht. Bei

Vorhandensein eines Ziels, eines Signalprimers und einer Reportersonde war die Donor-Fluoreszenz jedoch anfänglich gering, stieg aber während des Zeitverlaufs der Amplifikationsreaktion an, als die RERS der Reportersonde in die doppelsträngige Form umgewandelt und gespalten wurde, um das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung zu reduzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die erfindungsgemäßen Signalprimer und Reportersonden zum Nachweisen einer Nucleinsäurezielsequenz verwendet werden können, und zwar durch Überwachung der Veränderungen beim Ausmaß der Fluoreszenzlöschung.

[0039] In einem ähnlichen Versuch wurden 0 und 250 Kopien von klonierter HIV-Ziel-DNA unter Verwendung einer Vielzahl von Signalprimern in Kombination mit einer von zwei Reportersonden nachgewiesen, wobei jede dieselbe Sequenz aufwies, aber mit unterschiedlichen Donor/Quencher-Farbstoffpaaren markiert war. Die Sequenzen der Signalprimer und Reportersonden sind untenstehend in der 5'- bis 3'-Richtung dargestellt. Die Zielbindesequenz ist kursiv dargestellt, die 5'-Adaptorsequenz des Signalprimers und die identische 3'-Sequenz der Reportersonde sind unterstrichen, und die RERS der Reportersonde ist fett geschrieben.

Signalprimer:

GAAAGACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATTGTG (SEQ ID NO:3, UA1)

GAAAGACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATTGTGGATG (SEQ ID NO:4, UA2)

GAAAGACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATT (SEQ ID NO:5, UA3)

GAAAGACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATTG (SEQ ID NO:6, UA3.1)

ACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATTGTG (SEQ ID NO:7, UA4)

ACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATTGTGGATG (SEQ ID NO:8, UA5)

ACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATT (SEQ ID NO:9, UA6)

ACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATTG (SEQ ID NO:10, UA6.1)

AGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATTGTG (SEQ ID NO:11, UA7)

AGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATTGTGGATG (SEQ ID NO:12, UA8)

AGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATT (SEQ ID NO:13, UA9)

AGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAAATTG (SEQ ID NO:14, UA9.1)

Reportersonden (Sequenz ID NO: 15)

(Fluorescein)TGCCCGAGT(dabcyl)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

(Fluorescein)TGCCCGAGT(rox)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

[0040] Die Signalprimer unterschieden sich in der Länge und in der T_m der Zielbindesequenz und der Reporterbindesequenz. Die Fluorescein-Fluoreszenz wurde während der Amplifikation überwacht. Zum Vergleich der Reportersonden/Signalprimer-Kombinationen wurden die Ergebnisse als Fläche unter der Fluoreszenzkurve oder „MOTA“ ausgedrückt. Je mehr Fläche sich unter der Kurve befand, desto mehr Fluoreszenz wurde von einer bestimmten Reportersonden/Signalprimer-Kombination erzeugt und desto effizienter war die Detektion der amplifizierten Produkte. Beide Reportersonden funktionierten gut in Kombination mit allen Signalprimern für den Nachweis des HIV-Ziels, obwohl die Leistung im Allgemeinen nicht so gut war wie bei Reportersonden, die Haarnadel-Reporterkomponenten enthalten. Lineare Reportersonden wie diese sind jedoch kürzer als Reportersonden, die sekundäre Strukturen enthalten, und können daher leichter in höherer Ausbeute synthetisiert werden. Unter Verwendung der Fluorescein-Dabcyl-Reportersonde wurden höhere MOTA-Werte erzielt, was darauf hinweist, dass dieses Farbstoffpaar eine höhere Löschungseffizienz besitzen könnte.

BEISPIEL 2

[0041] SDA-Reaktionen wurden dahingehend vorbereitet, um die in Beispiel 1 gezeigten, verschiedenen Signalprimer, entweder 0 oder 5.000 Kopien des klonierten HIV-Ziels und eine Reportersonde zu enthalten. Die Sequenz der Reportersonde war wie folgt:

(Dabcyl)TAGTGCCCGAGCACT(rox)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

(SEQ ID NO: 16, TBD9)

[0042] SEQ ID NO: 16 enthält eine BsoBI-RERS in der einzelsträngigen Schleife einer Haarnadelstruktur am 5'-Ende. Die SDA-Reaktionen enthielten 500 nM SDA-Amplifikationsprimer, 50 nM Bumperprimer und jeweils 200 nM Signalprimer und Reportersonden. Die Rhodamin-Fluoreszenz wurde während der Amplifikation überwacht. Bei jeder Signalprimer/Reportersonden-Kombination erhöhte sich die Rhodamin-Fluoreszenz bei Vorhandensein eines Ziels während der Amplifikationsreaktion. Bei Fehlen eines Ziels blieb die Rhodamin-Fluoreszenz während der gesamten Reaktion gering. Die Ergebnisse einer der Reaktionen werden in [Fig. 3A](#) für den Signalprimer SEQ ID NO: 3 gezeigt, wobei die multiplen Kurven wiederholte Proben darstellen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Länge und die T_m der Adaptorsequenz die Analyseleistung nicht maßgeblich beeinflussten. Die T_m der Zielbindesequenz des Signalprimers beeinflusste jedoch die Signalerzeugung, wobei Signalprimer mit längeren Zielbindesequenzen bessere Leistungen erbrachten als jene mit kürzeren Zielbindesequenzen.

[0043] Der Versuch wurde unter Verwendung dreier verschiedener Reportersonden, einschließlich SEQ ID NO: 16, wiederholt. Die zusätzlichen Reportersonden waren wie folgt:

(Fluorescein)TAGTGCCCGAGCACT(dabcyl)ACGTTAGCCACCATACGGAT

(SEQ ID NO: 17, TBD10)

(Fluorescein)TAGTGCCCGAGCACT(dabcyl)AGCCACCATACGGAT

(SEQ ID NO: 18, TBD11)

[0044] Bei diesem Versuch wurde die Konzentration des stromaufwärts gelegenen Amplifikationsprimers auf 100 nM reduziert. Eine Amplifikation wurde in Gegenwart von entweder 0 oder 250 Kopien an Ziel-DNA durchgeführt. Reaktionen, die ein Ziel enthielten, wiesen nach nur 5-minütiger Inkubation einen raschen Anstieg der Fluorescein-Fluoreszenz auf. Im Gegensatz dazu wiesen Reaktionen ohne Ziel während des gesamten Reaktionszeitraums eine geringe Fluorescein-Fluoreszenz auf. Die Ergebnisse hinsichtlich einer SEQ ID NO: 8 und SEQ ID NO: 17 enthaltenden Reaktion werden in [Fig. 3B](#) gezeigt, wobei die multiplen Kurven wiederholte Proben darstellen. Die Reportersonden/Signalprimer-Kombinationen SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 8 brachten ähnliche MOTA-Werte (62,147 bzw. 66,051) hervor, wohingegen die SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 12-Kombination weniger effizient war (MOTA = 49,879), was auf eine weniger effiziente Hybridisierung und Umwandlung aufgrund der kürzeren Sonden- und Primerlänge hinweist.

BEISPIEL 3

[0045] Bei diesem Versuch wurde in einer SDA eine Reportersonde mit einer Haarnadel und einer BsoBI-RERS, die anstatt spaltbar zu sein, eher mit Einzelstrangbrüchen versehbar war, getestet. Die Reportersonde hatte folgende Sequenz (SEQ ID NO: 19, TBD13,1):

(Fluorescein)TAGTGCTCGGGCACT(dabcyl)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

[0046] Diese Reportersonde wurde bei der Amplifikationsreaktion mit SEQ ID NO: 4 als Signalprimer verwendet. In Gegenwart von 250 Kopien der HIV-Ziel-DNA wurde ein mittlerer MOTA-Wert von 48.000 erhalten, verglichen mit einer Punktezahl von weniger als 150 bei negativen Kontrollen. Die niedrigere MOTA-Punktezahl, die im Vergleich zur dieselbe 3'-Zielsequenz aufweisenden Reportersonde SEQ ID NO: 16 beobachtet wurde, kann an einem ineffizienten Primen der Polymerase von dem kurzen Oligonucleotid weg liegen, das nach dem Einführen von Einzelstrangbrüchen an der BsoBI-Stelle zurückbleibt. Die Leistung der Reaktion kann durch eine Vergrößerung der Länge der Haarnadel erhöht werden, um dieses Oligonucleotid zu stabilisieren und einen größeren Bereich zum Binden der Polymerase bereitzustellen.

BEISPIEL 4

[0047] Bei diesem Versuch wurde eine SDA durchgeführt, wobei eine Reportersonde, die eine G-Quartettstruktur und eine RERS als Reporterkomponente enthielt, verwendet wurde. Diese Reportersonde hatte folgende Sequenz (SEQ ID NO: 20, TBD14):

(Fluorescein)GGTTGGCTCGAGGTTGGT(dabcyl)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

[0048] Im Verlauf der Amplifikation von 250 Kopien der HIV-Ziel-DNA wurde ein Anstieg der Fluorescein-Flu-

oreszenz beobachtet. Bei Fehlen eines Ziels wurde kein derartiger Fluoreszenzanstieg beobachtet.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Nadeau, James G.

Hellyer, Tobin J.

<120> Sonden und Verfahren zum Nachweisen von Nucleinsäuren

<130> Universal Reporter

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Sequenz für Versuchsmodell

<400> 1

ccaaaatgac agcttctgat ggaatgactc actgagttgg aacgt

45

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Sequenz für Versuchsmodell

<400> 2

tacctcgagt gcagccaaaa gacagcttct gatggaa

37

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 3

gaaagacggt agccaccata cggatacccc tttctttta aaattgtg

48

<210> 4

<211> 52

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 4

gaaagacggt agccaccata cggatacccc tttctttta aaattgtgga tg

52

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 5

gaaagacggt agccaccata cggatacccc tttctttta aaatt

45

<210> 6

<211> 46

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 6

gaaagacggt agccaccata cggatacccc tttctttta aaattg

46

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 7

acgtagcca ccatacggat acccctttc tttaaaatt gtg

43

<210> 8

<211> 47

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 8

acgtagcca ccatacggat acccctttc tttaaaatt gtggatg

47

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 9

acgtagcca ccatacggat acccctttc tttaaaatt

40

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 10

acgtagcca ccatacggat acccctttc tttaaaatt g

41

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 11

agccaccata cggatacccc tttctttta aaattgtg

38

<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 12

agccaccata cggatacccc tttctttta aaattgtgga tg

42

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 13

agccaccata cggatacccc tttctttta aaatt

35

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 14

agccaccata cggatacccc tttctttta aaattg

36

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 15

tgcccgagtg aaagacgtta gccaccatac ggat

34

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 16

tagtgcccga gcactgaaag acgttagcca ccatacggat

40

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 17

tagtgcccgga gcactacgtt agccaccata cggat

35

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 18

tagtgcccgga gcactagcca ccatacggat

30

<210> 19

<211> 40

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 19

tagtgctcgg gcactgaaag acgtagcca ccatacggat

40

<210> 20

<211> 43

<212> DNA

<213> menschliches Immunschwächevirus

<400> 20

gggtggctcg aggttggtga aagacgttag ccaccatacg gat

43

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweisen einer Nucleinsäurezielsequenz, umfassend:

- a) das Hybridisieren eines unmarkierten Signalprimers, bestehend aus einem einzigen Oligonucleotid und umfassend eine 3'-Zielbindesequenz und eine 5'-Adaptorsequenz, mit der Zielsequenz stromabwärts von einem Primer, wobei die 3'-Zielbindesequenz mit der Zielsequenz hybridisiert und wobei weiters die 5'-Adaptorsequenz nicht mit der Zielsequenz hybridisiert, wodurch ein Complement der Adaptorsequenz synthetisiert wird;
- b) das Hybridisieren einer Reportersonde, umfassend eine markierte Reporterkomponente, mit dem in Schritt a) erzeugten Complement der Adaptorsequenz, wodurch eine doppelsträngige Reporterkomponente hergestellt wird, und
- c) das Nachweisen der doppelsträngigen Reporterkomponente als Hinweis auf das Vorhandensein der Zielsequenz.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die doppelsträngige Reporterkomponente nach der Hybridisierung der Reporterkomponente mit dem Complement der Adaptorsequenz hergestellt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die doppelsträngige Reporterkomponente nach der Synthese eines Complements der Reporterkomponente hergestellt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, weiters umfassend die Amplifikation der Zielsequenz gleichzeitig mit der Synthese des Complements der Adaptorsequenz.

5. Verfahren zum Nachweisen der Amplifikation einer Zielsequenz, welches in einer Amplifikationsreaktion Folgendes umfasst:

- a) das Hybridisieren eines unmarkierten Signalprimers, bestehend aus einem einzigen Oligonucleotid und umfassend eine 3'-Zielbindesequenz und eine 5'-Adaptorsequenz, mit der Zielsequenz stromabwärts von einem Primer, wobei die 3'-Zielbindesequenz mit der Zielsequenz hybridisiert und wobei weiters die 5'-Adaptorsequenz nicht mit der Zielsequenz hybridisiert;
- b) das Verlängern des Signalprimers an der Zielsequenz zwecks Herstellung eines Verlängerungsprodukts;
- c) das Hybridisieren eines Amplifikationsprimers mit dem Verlängerungsprodukt und das Verlängern des Amplifikationsprimers zwecks Synthetisierung eines Complements der Adaptorsequenz;
- d) das Hybridisieren einer Reportersonde, umfassend eine markierte Reporterkomponente, mit dem in Schritt c) erzeugten Complement der Adaptorsequenz, wodurch eine doppelsträngige Reporterkomponente hergestellt wird;
- e) das Nachweisen der doppelsträngigen Reporterkomponente als Hinweis auf eine Amplifikation der Zielsequenz.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die doppelsträngige Reporterkomponente nach der Hybridisierung der Reporterkomponente mit dem Complement der Adaptorsequenz hergestellt wird.

7. Verfahren zum Nachweisen einer Nucleinsäurezielsequenz, umfassend:

- a) das Hybridisieren eines unmarkierten Signalprimers, bestehend aus einem einzigen Oligonucleotid und umfassend eine 3'-Zielbindesequenz und eine 5'-Adaptorsequenz, mit der Zielsequenz, so dass die Adaptorsequenz einen 5'-Überhang erzeugt, wobei die 3'-Zielbindesequenz mit der Zielsequenz hybridisiert und wobei weiters die 5'-Adaptorsequenz nicht mit der Zielsequenz hybridisiert;
- b) das Herstellen eines Complements der Adaptorsequenz durch Verlängerung der hybridisierten Zielsequenz;
- c) das Hybridisieren einer Reportersonde, umfassend eine markierte Reporterkomponente, mit dem in Schritt b) erzeugten Complement der Adaptorsequenz, wodurch eine doppelsträngige Reporterkomponente hergestellt wird; und
- d) das Nachweisen der doppelsträngigen Reporterkomponente als Hinweis auf das Vorhandensein der Zielsequenz.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die doppelsträngige Reporterkomponente nach der Hybridisierung der Reporterkomponente mit dem Complement der Adaptorsequenz hergestellt wird.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

FIG. 1A

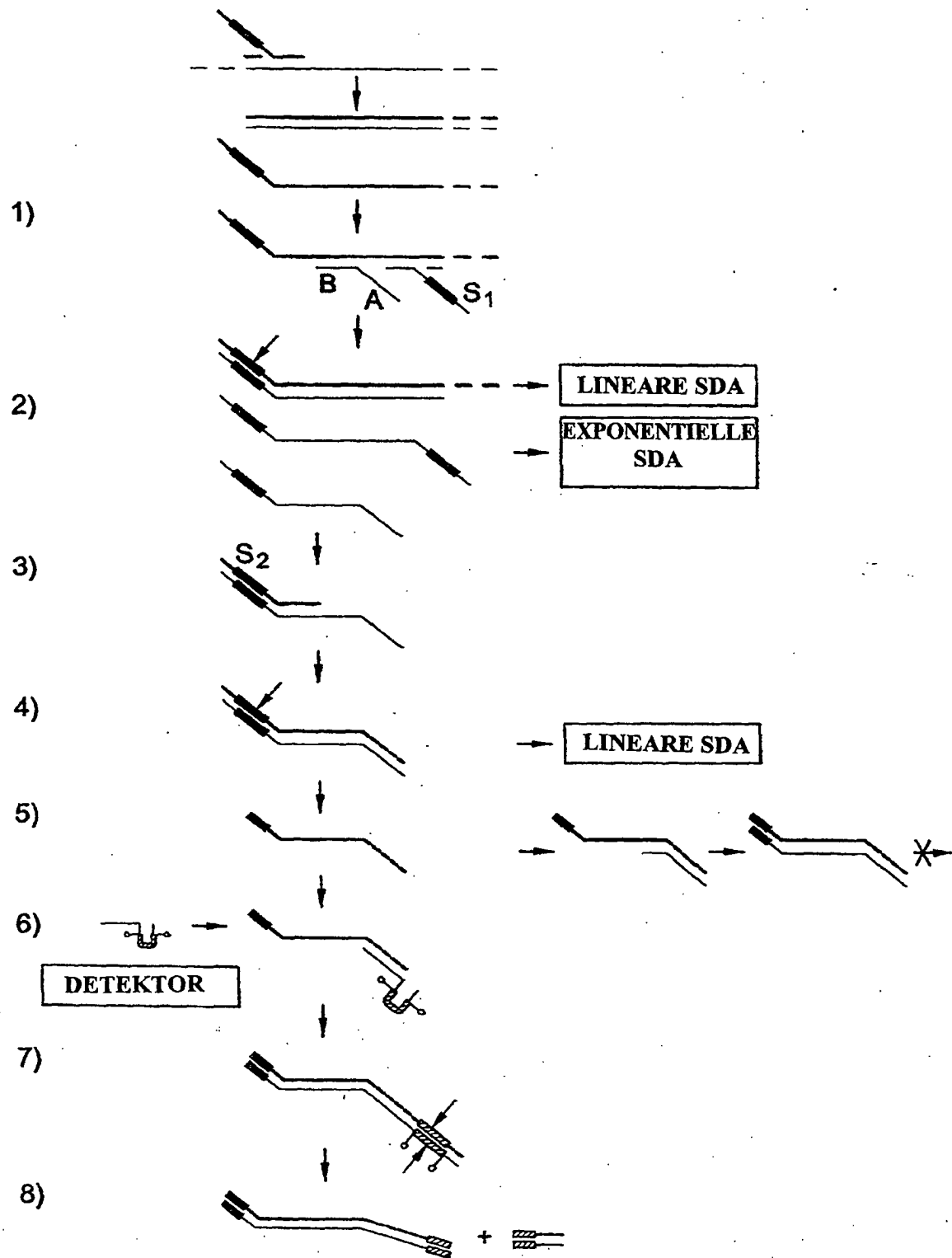


FIG. 1B

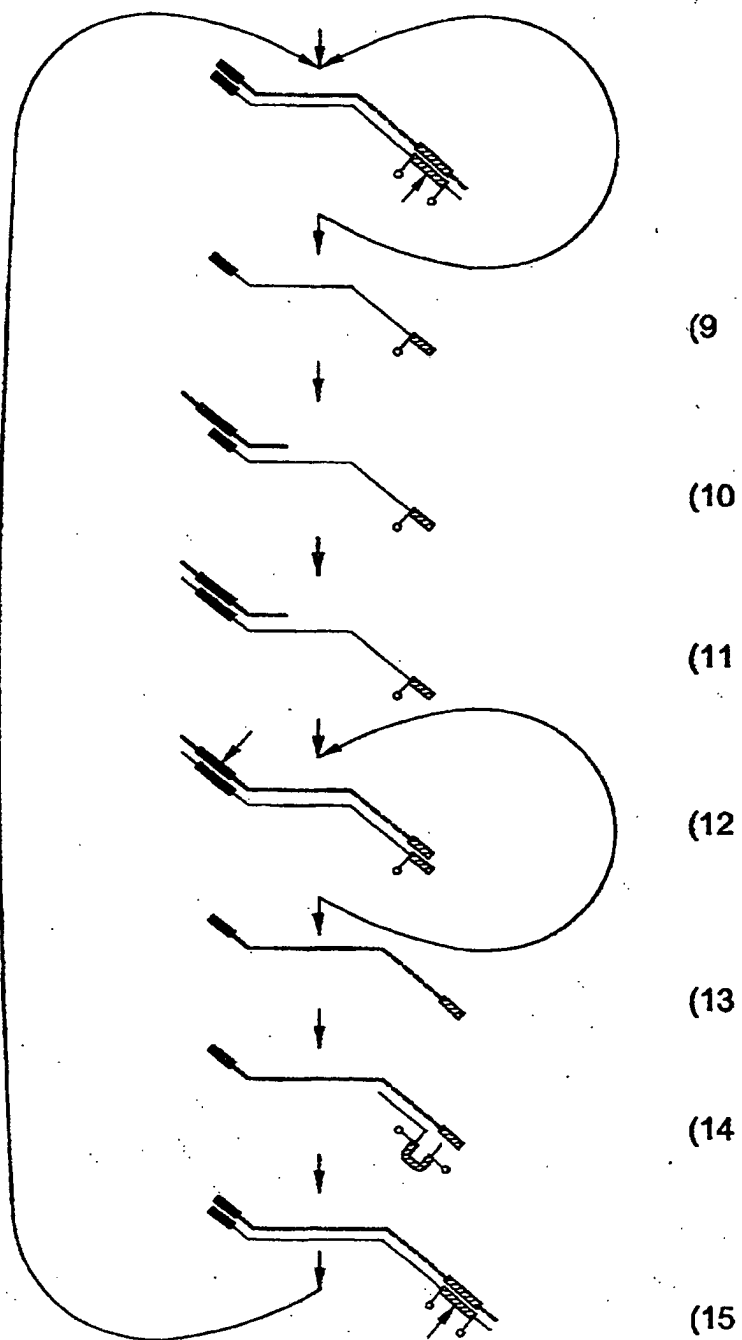


FIG. 2

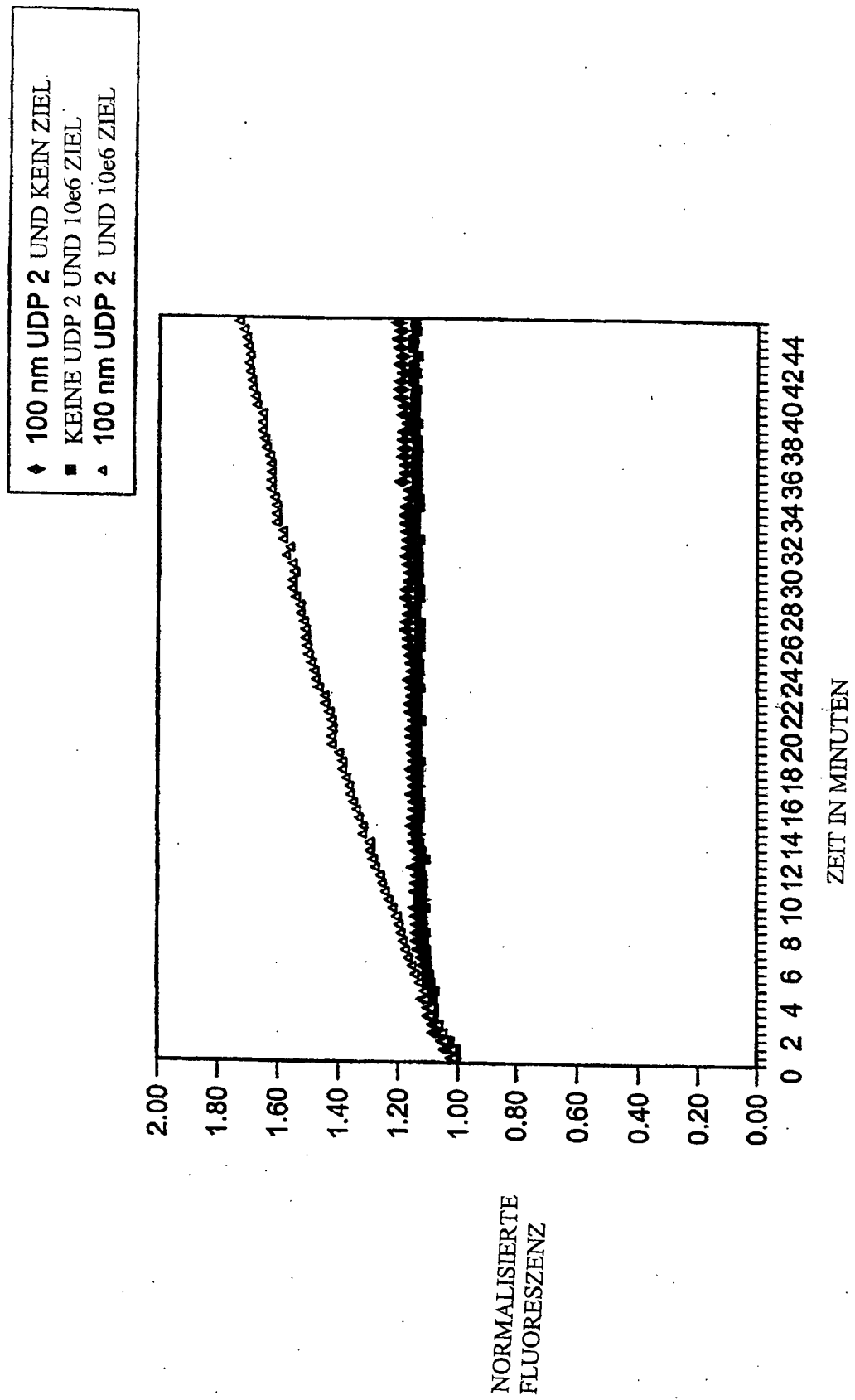


FIG. 3A

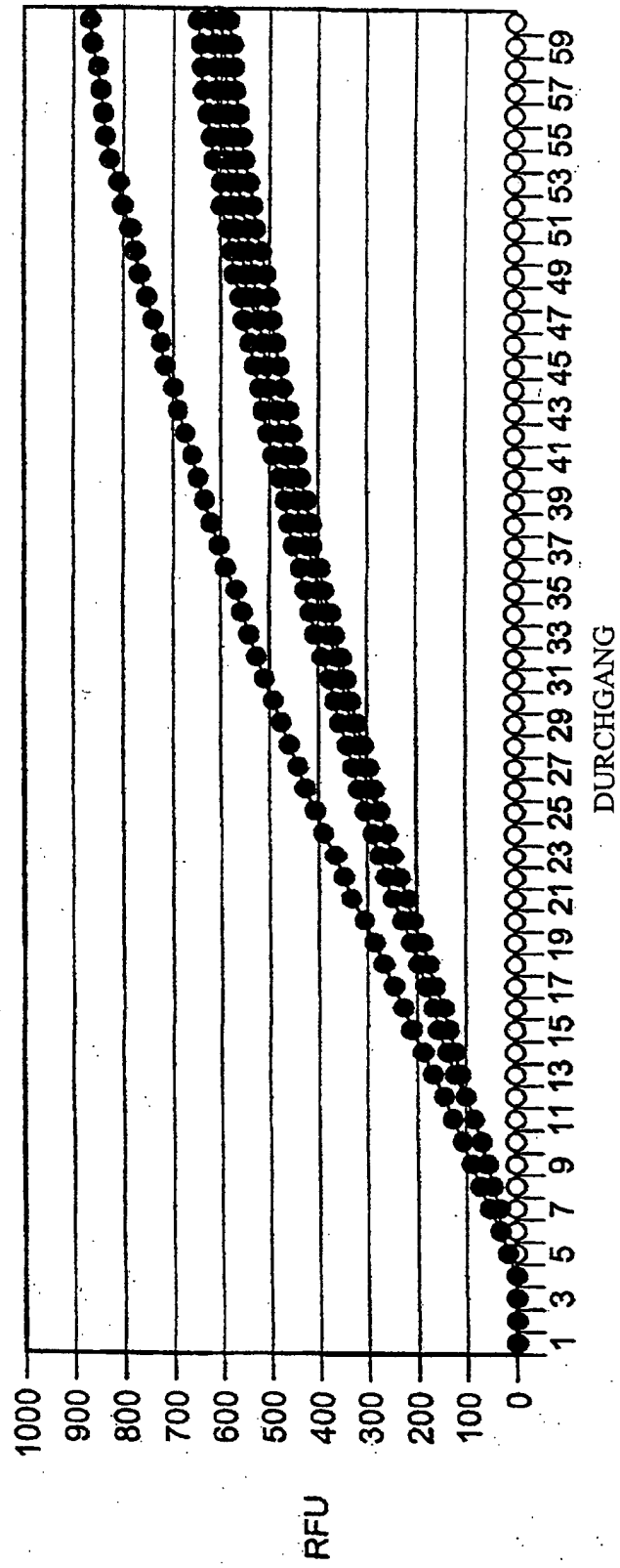


FIG. 3B

