



(19)

REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 409 383 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2170/99
(22) Anmeldetag: 22.12.1999
(42) Beginn der Patentdauer: 15.12.2001
(45) Ausgabetag: 25.07.2002

(51) Int. Cl.⁷: **C12Q 1/68**

(73) Patentinhaber:
BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR DETEKTION UND QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN IN EINER PROBE

AT 409 383 B

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von Nucleinsäuren in einer Probe unter Verwendung von internen Standards, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass der Probe ein chemisch synthetisiertes Oligonukleotid mit einer Größe von mindestens 90 Basen(paaren) als interner Standard zugegeben wird.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von Nucleinsäuren in einer Probe, unter Verwendung von internen Nucleinsäure-Standards.

Die routinemäßige Bestimmung von Nucleinsäuren in biologischen Proben ist sowohl in der Forschung als auch in der angewandten pharmazeutischen und medizinischen Industrie von immer größer werdender Bedeutung. Vor allem der Detektion von kontaminierenden Nucleinsäuren in 5 medizinischen Reihentestungen mit einer großen Anzahl an zu untersuchenden Einzelproben kommt dabei grundlegende Bedeutung zu.

Weiters ist es auch bei der Qualitätsüberprüfung von biotechnologisch gewonnenen Proteinen erforderlich, Verunreinigungen, die von der jeweiligen Zellkultur herrühren, festzustellen bzw. die Ein- 10 haltung bestimmter Höchstwerte für derartige Verunreinigungen zu überprüfen. So verlangt z.B. die Weltgesundheitsorganisation, dass die Menge heterologer kontaminierender DNA in rekombinanten Produkten unter 100 pg pro verabreichter Dosis sein muss. Die Bestimmungen der US Food and Drug Administration sind noch strenger. Hier wird allerhöchstens eine Kontamination von 10 pg DNA pro Einzeldosis akzeptiert.

Ein weiteres großes Einsatzgebiet für die Detektion und Quantifizierung von Nucleinsäuren besteht in der Genotypisierung von verschiedenen Individuen, beispielsweise von rekombinant her- 15 gestellten Zellen oder Tieren, aber auch bei der medizinischen Reihenuntersuchung im Hinblick auf Nucleinsäure-Polymorphismen.

Mit der „klassischen“ Methodologie zur Bestimmung von kontaminierender DNA, nämlich mit 20 Hybridisierung auf Membranen konnten bis zu 5 pg DNA nachgewiesen werden, wenn radioaktiv markierte genomische Sonden verwendet werden, wobei allerdings die Methode vor allem hinsichtlich der Quantifizierungsinformation als nicht sehr verlässlich gilt.

Mit Etablierung von Nucleinsäure-Amplifizierungsverfahren konnten aber auch Methoden zur 25 Verfügung gestellt werden, die mittels Nucleinsäure-Amplifizierung in effizienter Weise die Quantifizierung und Detektion von Nucleinsäuren in diesen Proben erlauben.

Klinische Proben, die aus biologischen Flüssigkeiten wie Blut oder Zelllysaten abgeleitet wor- 30 den sind, enthalten oft Verunreinigungen, die die Amplifizierungsreaktion inhibieren und zu falsch negativen Resultaten in derartigen Testsystemen führen. Weiters kann es zu Störungen in der Amplifizierung durch Verlust von Nucleinsäuren während der Extraktionsverfahren kommen. Auch technische Fehler oder Fehler beim Probenansatz für die Nucleinsäurereaktion sind möglich. Daher hat sich die Verwendung von internen Kontrollen, die vor der Amplifizierungs-Reaktion oder vor der Nucleinsäure-Extraktion bzw. Aufreinigung zugesetzt werden, als vorteilhaft bei der Verhinde- 35 rung von falsch negativen Resultaten gezeigt.

Besonders hervorzuheben sind hierbei die in den AT-Patentschriften 401 062 und 401 270 be- 40 schriebenen Verfahren, bei welchen die Nucleinsäure-Quantifizierung durch Zugabe von internen Standards durchgeführt wurde. Gemäß den dort beschriebenen Erfindungen wurde - wie auch im übrigen Stand der Technik, bei welchem Nucleinsäure-Detektions- und Quantifizierungsverfahren unter Verwendung von internen Standards durchgeführt wurden, wobei die Standards stets auf biologischem Weg hergestellt werden, meist unter Zuhilfenahme von Plasmidkonstrukten. Jedoch 45 werden derartige interne Standards noch relativ selten in Routineverfahren verwendet, was wahrscheinlich vor allem durch die zeitaufwendigen Verfahren zu deren Herstellung bedingt ist.

Derartige biologische Verfahren zur Herstellung von Standard-Nucleinsäuren sind in der Regel 50 insofern aufwendig als sie die Konstruktion von genetischen Konstrukten, wie z.B. Plasmiden, deren Amplifizierung (beispielsweise durch Klonieren und Anzüchten von Organismen, die diese Konstrukte beinhalten) und Aufreinigung der entsprechenden Standard-Nucleinsäure umfassen. Im Anschluss daran ist auch eine genaue Quantifizierung und Überprüfung der Präparation dieser Standard-Nucleinsäure erforderlich. Diese Schritte müssen für jeden einzelnen Standard neu und unabhängig durchgeführt werden.

Diese umständliche Herstellung der Standards stellt insbesondere für routinemäßig durchzu- 55 führende Reihenversuche einen erheblichen Zeit- und Kostenfaktor dar, insbesondere wenn die Standards sehr flexibel gewählt werden müssen, wie etwa bei Kontaminationsüberprüfungen oder Genotypisierungen.

Die vorliegende Erfindung stellt sich daher zur Aufgabe ein verbessertes Verfahren zur Detek- 55 tion und Quantifizierung von Nucleinsäuren in einer Probe unter Verwendung von internen Stan- dards zur Verfügung zu stellen, mit welchem derartige Verfahren kostengünstiger, effizienter und

schneller durchgeführt werden können.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von Nucleinsäuren in einer Probe, umfassend die Schritte:

- Bereitstellen einer Probe,
 - 5 - Zugeben von zumindest einem internen Nucleinsäure-Standard zur Probe,
 - Durchführen einer Amplifikations-Reaktion, bei welcher der Standard und gegebenenfalls zumindest eine der in der Probe zu detektierenden oder zu quantifizierenden Nucleinsäuren gleichzeitig amplifiziert werden und
 - Detektieren und Quantifizieren der amplifizierten Nucleinsäuren,
- 10 welches dadurch gekennzeichnet ist, dass der Probe ein chemisch synthetisiertes Oligonucleotid mit einer Größe von mindestens 90 Basen(paaren) als interner Standard zugegeben wird.

Erfindungsgemäß wird dabei die gewünschte Sequenz des internen Standards in einfacher Weise durch chemische Synthese zur Verfügung gestellt. Es existieren bereits zahlreiche Firmen, welche die Synthese derartiger Oligonucleotide innerhalb kürzester Zeit und zu sehr effizienten
 15 Kosten anbieten. In der Regel werden zur Synthese der Oligonucleotide sogenannte Oligonucleotid-Synthesizer, wie etwa z.B. Synthesizer 2000 MWG-Biotech AG, Ebenberg (D). Die Quantifizierung der synthetisierten Oligonucleotide erfolgt meistens automatisch im Synthesizer oder ist durch das Synthesizer-System bereits vorgegeben. Weiters wird diese Quantifizierung nicht durch die Anwesenheit von Proteinen gestört, die bei der biogenen Herstellung von Standards im Stand der
 20 Technik nur durch zeitaufwendige, teure Reinigungs- und Extraktionsverfahren hintangehalten werden können.

Überraschender Weise ist das erfindungsgemäße Verfahren durch das Vorsehen von mindestens 90 Basen(paaren) langen chemisch synthetisierten Oligonucleotiden als Standards für die
 25 großindustrielle Anwendung und für die umfassende medizinische Reihentestung ausgezeichnet geeignet und bietet speziell im organisatorischen sowie im präparativen Bereich Vorteile gegenüber den biologisch hergestellten Standards.

Es hat sich gezeigt, dass es bei Verwendung von chemisch synthetisierten Oligonucleotid-
 Standards ab einer Länge von etwa 90 b(p) weder zum Auftreten von Problemen mit unspezifischen
 30 Banden kommt noch Beeinträchtigungen aufgrund der Bildung von Primer-Dimeren entstehen. Bevorzugter Weise werden erfindungsgemäß vor allem Standards eingesetzt, die eine Länge von 100 bis 400 b(p) aufweisen, insbesondere von 105 bis 200 b(p).

Unter Nucleinsäure-Amplifizierung sind prinzipiell Verfahren zu verstehen, welche auf der von
 Mullis et al. (US-PS 4 683 195 und US-PS 4 683 202) entwickelten Technologie beruhen, beispielsweise die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) oder
 35 die Ligase-PCR (LCR).

Die Standard-Nucleinsäure sollte sich vorteilhafterweise in wenigstens einem zu detektierbaren
 Merkmal von der zu amplifizierenden Nucleinsäure unterscheiden. Sie sollte auch vorteilhafterweise
 mit Hilfe der gleichen Primer amplifiziert werden können, mit denen die Ziel-Nucleinsäure (z.B.
 40 die aufzuspürende Kontamination) amplifiziert wird. Als praktisch haben sich Standard-Nucleinsäuren erwiesen, die eine andere Größe (z.B. eine verschiedene Zahl an Basen (b) oder Basenpaaren (bp)) als die zu quantifizierende oder detektierende Nucleinsäure aufweisen. Auch die Verwendung einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle hat sich als vorteilhaft erwiesen. Ansonsten ist vorzugsweise als Standard-Nucleinsäure eine Nucleinsäure zu verwenden, die möglichst
 45 große Ähnlichkeit mit der in der Probe zu quantifizierenden oder detektierenden Nucleinsäure aufweist. Dies gilt vor allem für den GC-Gehalt, die Restriktionsstellen, die Sequenz, etc. Bevorzugte Standards unterscheiden sich von der zu detektierenden/quantifizierenden Nucleinsäure hinsichtlich ihrer Länge um mindestens 10 % oder 5 Basen (Basenpaaren); diese Unterschiede sind aber auch jeweils abhängig von Quantifizierungssystem für die amplifizierten Nucleinsäuren (etwa Gelelektrophorese oder ein chromatographisches Verfahren). Die Detektion und Quantifizierung
 50 der amplifizierten Nucleinsäuren kann dann auf an sich bekannte Weise vorgenommen werden, wobei vorzugsweise die Bestimmung unter Verwendung eines Nucleinsäure-Detektionsgerätes, z.B. eines Fluoreszenz-empfindlichen Nucleinsäure-Detektionsgerätes (wenn fluoreszierende Primer verwendet werden) erfolgt. Beispiele für solche Nucleinsäure-Detektionsgeräte sind automatische DNA-Sequencer mit Laser-induzierten Fluoreszenzmesseinrichtungen, wie z.B. der Gene
 55 Scanner[®]373A der Firma Applied Biosystems oder HPLC-Anlagen. Bei diesen Geräten ist es

sogar möglich, Nukleinsäure-Moleküle voneinander zu trennen, die sich lediglich um ein Basenpaar in der Länge unterscheiden.

Derartige Geräte erlauben auch die Aufarbeitung und Analyse einer Vielzahl von Proben auf einem Gel (z.B. mittels Multiplex-PCR).

5 Vorzugsweise wird der interne Standard bereits vor einer allfälligen Vorreinigung oder Extraktion der Nukleinsäure aus der Probe bereits der Probe zugegeben, wodurch sich diejenigen falsch negativen Resultate ausfiltern lassen, welche auf Fehler oder Verlusten dieser Vorreinigung entstehen können. Mit dem erfindungsgemäßen System lässt sich auch eine Routinetestung unter Verwendung von 2 oder mehreren verschiedenen internen Standards (wie in der AT-PS 401 062
10 beschrieben), die auch in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt werden können, einfach und vor allem kostengünstig etablieren.

Erfindungsgemäß werden bevorzugt virale Nukleinsäuren detektiert oder quantifiziert, insbesondere in Proben, die aus Körperflüssigkeiten entnommen worden sind oder die als Ausgangsprodukt für Arzneimittel, die an Menschen verabreicht werden sollen, dienen.

15 Die erfindungsgemäße Methodologie hat sich vor allem bei viralen Nukleinsäuren bewährt, die ansonsten nur schlecht durch rekombinante Manipulation und Kultivierung des Standards zur Verfügung gestellt werden können. Bevorzugte Viren, die erfindungsgemäß detektiert oder quantifiziert werden können, sind TTV, Parvoviren, insbesondere Parvovirus B19, Hepatitis-Viren, insbesondere HAV, HBV und HCV oder Retroviren, wie HI-Viren.

20 Parvovirus B19 verursacht eine üblicherweise milde verlaufende Kinderkrankheit, die Ringelröteln. In immunkompetenten Personen kann jedoch zu Erythema infectiosum und transientser aplastischer Krise in Patienten mit hämolytischer Anämie, fötalem Tod, Arthritis und chronischer Anämie führen (Anderson. J. Infect. Dis. 161 (1990), Seiten 603-608). TTV ist ein neuer DNA-Virus, der kürzlich im Serum von Patienten mit posttransfusioneller Hepatitis unbekannter Ätiologie isoliert wurde (Simmonds et al. Lancet 352 (1998), Seiten 191-194; Okamoto et al. Hepatol. Res. 10
25 (1998), Seiten 1-16).

Das vorliegende Verfahren eignet sich auch besonders gut zur Charakterisierung von Nukleinsäuren bzw. Nukleinsäure-Kontaminationen aus Kulturflüssigkeiten, insbesondere in einem Verfahren wie etwa in der AT 401 270 B beschrieben.

30 Vorteilhafterweise ist dabei die erfindungsgemäß zu untersuchende Probe von rekombinanten Zellen, Gewebe oder Tieren abgeleitet, wobei vor allem die Detektion von Kontaminationen bzw. die Genotypisierung vorrangige Einsatzgebiete darstellen.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele sowie der Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht eingeschränkt sein soll, näher erläutert. Es zeigen:

35 **Fig. 1: Einzelstufen-IC-PCR (intern kontrollierte PCR) zur Detektion von Parvo B19.** Eine Parvo B19-DNA enthaltende Probe wurde extrahiert und in zehnfachen Stufen verdünnt; 1 und 3,3 µl der letzten zwei Verdünnungen wurden unter Verwendung des Primer-Paares KK5/KK6 der IC-PCR unterzogen (Bahnen 2-5). Zusätzlich wurden die selben Verdünnungen mit etwa 10 Kopien innerer Kontrollen B19c gemischt und mittels PCR amplifiziert (Bahnen 6-9). 142 bp: Fragment von Wildtyp-Parvo B19, 117 bp: Fragment der internen Kontrolle B19c. Bahn 1: negative Kontrolle; Bahn 10: Molekulargewichts-Marker (*MspI*-Verdau von pBR322).

40 **Fig. 2: IC-PCR zur Detektion von TTV nach Co-Extraktion von Proben und interner Kontrolle.** DNA wurde von 200 µl Plasma von 5 verschiedenen Pools von 32 gesunden Spendern in Anwesenheit von etwa 50 Kopien internem Kontroll-TTVc extrahiert. 15 µl der extrahierten DNA-Lösung wurde einer PCR unter Verwendung des Primer-Paares TTVS1/TTVA1 unterzogen. Das PCR-Produkt der internen Kontrolle bei 105 bp (Bahnen 1 und 3-5) zeigte eine erfolgreiche PCR an, ein fehlendes PCR-Produkt (Bahn 2) eine Inhibierung der PCR-Reaktion. Ein PCR-Produkt von 286 bp zeigt eine TTV-positive Probe (Bahn 1); Bahn 6: negative Kontrolle, Bahn 7: Molekulargewichtsmarker (*MspI*-Verdau von pBR322).

50 **Fig. 3: IC-PCR zur Genotypisierung von knockout-Mäusen.**

Schwanzstückchen wurden verdaut, und 3 µl des rohen Lysats wurden einer PCR alleine oder getrennt mit beiden Primer-Paaren in Anwesenheit von etwa 10 Kopien internem Kontroll-FVIIIc unterzogen. Primer MC18/MC19: Bahnen 1-6, Primer MC18/neoR2: Bahnen 7-12. Die PCRs in Bahnen 2, 4, 8, 10 werden ohne, und in Bahnen 3, 5, 7, 9 in Anwesenheit des internen Kontroll-FVIIIc durchgeführt. Primer MC18/MC19: Bahnen 1-6, Primer MC18/neoR2: Bahnen 7-12. Die
55

5 PCRs in den Bahnen 2, 4, 8, 10 werden ohne, und in den Bahnen 3, 5, 7, 9 in Anwesenheit des internen Kontroll-FVIIIc durchgeführt. Ein PCR-Produkt von 680 bp stammt von normalen Mäusen, 160 bp von knockout-Mäusen, der interne Kontroll-FVIIIc ergab entweder 105 bp (MC18/MC19) oder 85 bp (MC18/neoR2). Bahnen 1-7: jeweilige negative Kontrollen, Bahn 13: Molekulargewichtsmarker (*MspI*-Verdau von pBR322).

Beispiele:

10 **Beispiel 1: IC-PCR zur Detektion und Quantifizierung von Parvovirus B19 und TTV und Genotypisierung von FVIII-knockout-Mäusen**

VERFAHREN

Interne Kontrollen

15

Die internen Kontrollen sind synthetisierte Oligonukleotide einer Größe von 105 Nukleotiden für TTVc und FVIIIc und 117 Nukleotiden für B19c (MWG-BIOTECH GmbH, Ebersberg, Deutschland), die die jeweiligen forward Primer-Sequenzen und die komplementären Sequenzen der jeweiligen revers-Primer enthalten. Die DNA-Sequenz zwischen den Primer-Sequenzen wurde beliebig gewählt (Sequenzen siehe Tabelle 1).

20

Extraktion von DNA

25

Parvo-B19-DNA wurde aus einer B19-Virus enthaltenden Probe unter Verwendung des QIAGEN Blood-Sets (QIAGEN, Hilden, Deutschland) extrahiert, wobei man den Anweisungen des Herstellers folgte, und die DNA wurde zuletzt mit 50 µl H₂O eluiert. Die angegebenen Mengen DNA wurden dann der PCR unterzogen. Für TTV wurde DNA aus 200 µl Zitrat-Plasma aus Pools von 32 Spendern einer anonymen Gruppe gesunder Probanden mit der selben Vorgangsweise extrahiert. Zusätzlich wurden vor der Extraktion etwa 50 Kopien der einzelsträngigen internen Kontroll-TTVc zu den Plasma-Pools zugegeben. Schließlich wurden 15 µl Aliquots der PCR unterzogen.

30

Rohe Lysate von Mäuseschwanzstückchen

35

Schwanzstücke mit einer Länge von etwa 5 mm wurden 5 h lang bei 55°C in 600 µl Lyse-Puffer, enthaltend 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 2 mM MgCl₂, 0,01% Nonidet[®] P-40 und 200 µg/ml Proteinase K (Roche, Mannheim, Deutschland) verdaut. Das Enzym wurde 10 min lang bei 94°C inaktiviert, und 3 µl dieses Lysats wurden direkt der PCR unterzogen.

Polymerase-Kettenreaktion

40

1-3 µl zehnfacher Verdünnungen der B19-Probe, 15 µl Aliquots der extrahierten TTV-DNA-Proben, oder 3 µl der Schwanzstückchen-Lysate wurden einer Einzelstufen-IC-PCR unter Verwendung von wärmeaktivierter DNA-Polymerase unterzogen. Die IC-PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl, enthaltend 1 E von HotStarTaq[™] (QIAGEN) im jeweiligen Puffer, der vom Hersteller geliefert wurde, jeweils 200 µM dNTP und jeweils 50 pmol von Primern der jeweiligen Primer-Paare. Interne Kontrollen wurden den TTV-Proben bereits zum Extraktionsverfahren zugegeben, zu den B19-Proben und zu den Schwanzlysaten wurden sie vor der PCR in die angegebenen Reaktionsröhrchen zugesetzt. Die Sequenzen aller Primer und der internen Kontrollen sind in Tabelle 1 gezeigt. Die Proben wurden dann mit Mineralöl überschichtet, 14 min lang bei 94°C inkubiert, und für 45 Zyklen in einem TRIO-Thermoblock (BioMetra, Göttingen, Deutschland) mit dem folgenden Zyklus-Profil amplifiziert: 30 s bei 94°C, 30 s bei 55°C, 60 s bei 72°C, mit einer abschließende Elongation bei 72°C für 1 min. Die Proben wurden auf einem 3,5% niedrigschmelzenden Agarose-Gel, das mit Ethidiumbromid gefärbt war, fraktioniert.

50

55

ERGEBNISSE

Es wurde früher berichtet, dass die Verwendung einer Taq DNA-Polymerase, die bei Raumtemperatur inaktiv ist, eine vergleichbare Empfindlichkeit und Spezifität hat wie eingebettete ("nested") PCR (Zimmermann et al., *BioTechniques* 24 (1998), S. 222-224), mit welcher üblicherweise einzelne Kopien spezifischer Matrizen nachgewiesen werden. Um höchste Empfindlichkeit und Spezifität in einem Einzelstufen-PCR-Protokoll zu erreichen, verwendeten wir eine solche Polymerase bei dieser Untersuchung. Zur Überprüfung der Empfindlichkeit der Einzelstufen-PCR-Ansätze wurden berechnete Konzentrationen der internen Kontrollen Endpunkt-verdünnt und wiederholt mittels PCR amplifiziert. In jedem Fall wurde bestätigt, dass die Empfindlichkeit der Tests mindestens auf dem Niveau einiger Kopien lag (Daten nicht gezeigt).

Das Prinzip einer einzelsträngigen synthetisierten internen Kontrolle wurde zuerst in einem PCR-Ansatz zum Nachweis von Einzelstrang-DNA des Virus Parvo B19 überprüft. DNA aus einer das Virus enthaltenden Probe wurde extrahiert und dann in zehnfachen Stufen bis zu einem Endpunkt verdünnt. Danach wurden 1 und 3,3 µl der letzten beiden Verdünnungen der PCR unterzogen. Dieselben Konzentrationen der B19-Probe wurden auch mit etwa 10 Kopien interner Kontroll-B19c gemischt. Dies war die geringste Menge, die notwendig war, die immer zu PCR-Amplifizierungsprodukten führte. Die Proben wurden mit Primern KK5/KK6, die im hoch konservierten B19-Bereich von bp 961 bis bp 1102 lagen (PVBAOA-Stamm), mittels PCR amplifiziert. Fig. 1 zeigt, dass die interne Kontrolle ein Fragment der erwarteten Größe von 117 bp erzeugte (Bahnen 6-9). Es sei bemerkt, dass die niedrigste Konzentration von B19, die ohne interne Kontrolle sichtbar war (Bahn 4) bei dieser Konzentration in ihrer Intensität beeinflusst war, jedoch noch immer klar sichtbar war, wenn sie mit einer Menge von etwa 10 Kopien B19c gemischt wurde (Bahn 8). Zur Kontrolle der Extraktionseffizienz geben wir derzeit auch die interne Kontrolle B19c vor einem DNA-Extraktionsverfahren zu. Diese Daten sind hier nicht gezeigt, dieses Verfahren wird jedoch im nächsten Beispiel, TTV, präsentiert.

Der Nachweis von TTV wurde gewählt, um die Nützlichkeit von Einzelstrang-Oligonukleotiden als interne Kontrolle für eine Nukleinsäure-Coextraktionsvorgangsweise zu zeigen. Da TTV häufig mittels PCR-Amplifikation unter Verwendung verschiedener PCR-Methoden und Primer-Sets detektiert wird, die alle für dieselbe Region spezifisch sind, welche im ORF von TTV liegt (Naoumov et al., *Lancet* 352 (1998), Seiten 195-197, Nishizawa et al., *BBRC* 241 (1997), Seiten 92-97; Okamoto et al.; Simmonds et al.), wählten wir ebenfalls ein eigenes, für diesen Bereich spezifisches Primer-Set (TTVS1/TTTVA1). Da während der DNA-Extraktion weniger als 100% gewonnen wurden, waren etwa 50 Kopien des internen Kontroll-TTVc die geringst mögliche Anzahl, die vor der TTV-DNA-Extraktion zugegeben werden muss, um zu positiven PCR-Amplifikationsprodukten zu führen. Die interne Kontrolle wurde zu 200 µl Plasma, bestehend aus Pools von 32 Spendern, zugegeben, die Proben wurden extrahiert und danach einer IC-PCR unterzogen. Ein Beispiel für typische IC-PCR-Versuche ist in Fig. 2 gezeigt, wo eine TTV-positive Probe in Bahn 1 gezeigt ist, und ein fehlendes PCR-Produkt der internen Kontrolle bei Bahn 2 eine Inhibierung der PCR andeutet. Das PCR-Produkt der internen Kontrolle bei 105 bp (Bahnen 1 und 3-5) zeigt eine erfolgreiche PCR an.

Die Beispiele Parvo B19 und TTV zeigen, daß Einzelstrang-Oligonukleotide nützliche Werkzeuge für IC-PCR sind, es ist jedoch noch immer unklar, ob sie genauso gut in PCR-Ansätzen zur Analyse von Doppelstrang-DNA verwendet werden könnten. Da wir Mäuse routinemäßig genotypisieren, wählten wir diese PCR zur Analyse von FVIII knockout-Mäusen als Beispiel zur Prüfung. Der E-17 Faktor VIII-defiziente Mäusestamm wurde von Bi et al. (*Nat. Genet.* 10 (1995), Seiten 119-121; *Blood* 88 (1996), Seiten 3446-3450) durch Insertion eines Neomycin-Gens in das 3'-Ende von Exon 17 des Faktor VIII-Gens geschaffen. Wir arbeiten umfassend mit diesen Mäusen, und eine unserer Züchtungsstrategien ist die Kreuzung normaler C57BL/6-Weibchen mit hemizygoten betroffenen knockout-Männchen (Muchitsch et al., *Thromb. Haem.* 82(4), (1999), Seiten 1371-1373). Um die Zygotität der Nachkommenschaft zu bestimmen, wurden rohe Lysate von Schwanzstückchen routinemäßig genotypisiert. Der Zusatz interner Kontrollen vor der PCR erwies sich insbesondere zur Bestätigung der Heterozygotität von X'X-Weibchen in rohen Lysaten als extrem hilfreich. Dazu bestellten wir ein Oligonukleotid, das die Sequenz von MC18 am 5'-Ende und die komplementären Sequenzen von neoR2 und MC19 am 3'-Ende enthielt (was nach PCR zu 85 bzw.

105 bp-Fragmenten führte). Somit konnte diese interne Kontrolle mit der Bezeichnung FVIIIc sowohl für die Amplifikation mit jedem Primer-Paar MC18/neoR2 verwendet werden, was zu einem 160 bp-Fragment des Faktor VIII-Gens von knockout-Mäusen führte, als auch für eine getrennte Amplifikation mit MC18/MC19, was ein 680 bp-Fragment des Faktor VIII-Gens normaler Mäuse ergab. Wiederum war für rohe Lysate die Zugabe von etwa 10 Kopien FVIIIc vor der PCR die niedrigste Anzahl, die notwendig war, die immer zu PCR-Signalen führte. Fig. 3 zeigt ein typisches Beispiel für einen Genotypisierungsversuch, der mit zwei gewählten Proben von X'X-Weibchen durchgeführt wurde. Beide Proben wurden alleine oder in Anwesenheit der internen Kontrollen mit jedem Primer-Paar, MC18/MC19 (Bahnen 1-6) oder MC18/neoR2 (Bahnen 7-12), amplifiziert. Probe 1 (Bahnen 2, 3, 8, 9) zeigte alle erwarteten Banden der spezifischen Matrize, und die interne Kontrolle mit beiden Primer-Paaren, wogegen Probe 2 (Bahnen 4, 5, 10, 11), die offensichtlich PCR-Inhibitoren enthielt, nur zu schwachen Banden bei MC18/neoR2 (Bahnen 10 und 11) und zu keinen Banden bei MC18/MC19 (Bahnen 4 und 5) führte. Nur die Verwendung einer internen Kontrolle verhinderte eine falsche Bestimmung des Genotyps.

Es ist wohlbekannt, dass ein kleiner Anteil der klinischen Proben Substanzen enthält, die die PCR inhibieren, und einige Proben können mittels PCR gar nicht amplifiziert werden (Rosenstraus et al., J. Clin. Microbiol. 36 (1998), Seiten 191-197). Trotz der offensichtlichen Vorteile interner Kontrollen zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse werden sie für qualitative PCRs selten verwendet. Obwohl die Verwendung von Kompetitoren (ein anderer Ausdruck für internen Standard, der bei kompetitiver PCR verwendet wird), die einfach von einem gereinigten PCR-Konstrukt stammen, vorgeschlagen wurde (Jin et al., PCR Meth. Appl. 3 (1994), Seiten 252-255), wird dieses Verfahren nicht routinemäßig angewendet, und die Kompetitoren werden üblicherweise in Plasmiden kloniert (Zimmermann et al., BioTechniques 21 (1996), Seiten 268-279). Diese zeit- und arbeitsintensive Vorgangsweise ist jedoch vermutlich der Hauptgrund dafür, dass keine internen Kontrollen für qualitative PCR-Ansätze konstruiert werden.

Dagegen ist unsere Vorgangsweise zum Erhalt der internen Kontrollen einfach und erfordert keinen Kloniervorgang: man muss nur ein synthetisiertes Oligonukleotid bestellen. Da der Preis für Oligonukleotide nun gut unter 1 \$/Base liegt, sollte die Synthese von Fragmenten mit einer Größe von 100 Nukleotiden oder mehr für jedes Labor erschwinglich sein.

Bei dieser Untersuchung wurden die Oligonukleotide nur als interne Kontrollen verwendet, doch die Versuche mit Parvovirus B19, die ein kompetitives Verhältnis zwischen spezifischer Matrize und interner Kontrolle zeigten, deuten darauf hin, dass sie auch für quantitative kompetitive PCR verwendet werden könnten. Es sei bemerkt, dass wenn nur 10 Kopien der internen Kontrolle in die PCR eingeführt wurden, es zumindest bei unseren Beispielen kein kompetitives Verhältnis in einem Ausmaß gab, in welchem die Bande der höchsten Verdünnung der spezifischen Matrize nicht mehr sichtbar war. Dies steht in Widerspruch zu einem anderen Argument gegen die Verwendung interner Kontrollen in qualitativen PCRs, der Angst vor einem übermäßigen kompetitiven Verhältnis in einem Ausmaß, in welchem das Signal der internen Kontrolle das Signal der spezifischen Matrize unterdrücken würde. Wir haben auch schon früher gezeigt, dass eine intern kontrollierte PCR auch auf dem Niveau einer einzelnen Kopie bei einer PCR mit eingebettetem ("nested") Primer durchgeführt werden kann (Zimmermann et al., BioTechniques 23 (1997), Seiten 882-888).

Die IC-PCR unter Verwendung dieser internen Kontrolle erwies sich auch als anwendbar für die Co-Extraktion und das PCR-Testen von Plasma-Pools für einen Virus mit Einzelstrang-DNA, TTV. Diese Feststellung gilt nur für das Extraktionsverfahren unter Verwendung eines DNA-Extraktions-Sets, wie es bei dieser Untersuchung durchgeführt wurde. Für andere Extraktionsverfahren, wie beispielsweise organische Extraktionen, muss unser Verfahren der Verwendung kurzer Einzelstrang-Oligonukleotide erst noch evaluiert werden.

Die Genotypisierungs-Experimente zeigten deutlich, dass Einzelstrang-Oligonukleotide auch nützliche interne Kontrollen für PCR-Ansätze zur Analyse von doppelsträngiger (genomischer) DNA sind. Selbst trotz des großen Größenunterschieds zwischen der spezifischen 680 bp-Matrize und den 105 bp der jeweiligen internen Kontrolle (MC18/MC19) waren nach Amplifikation beide PCR-Produkte deutlich sichtbar. Bei anderen PCR-Ansätzen können ein derartiger Größenunterschied oder selbst größere Größenunterschiede infolge der Wettbewerbswirkungen in einigen Fällen zu unrichtigen Ergebnissen führen. Der für die internen Kontrollen notwendige zusätzliche PCR-Zyklus zur Kompensation für die beiden Stränge genomischer DNA hat keinen Einfluss auf

qualitative PCR-Versuche, und für quantitative Versuche muss nur ein Faktor 2 in Betracht gezogen werden.

Insgesamt erwiesen sich die bei dieser Studie verwendeten internen Kontrollen als nützliches Werkzeug bei einer IC-PCR, sowohl für Einzelstrang- als auch für Doppelstrang-DNA. Da sie eine Inhibierung von PCR detektieren konnten, wurden falsch negative Ergebnisse deutlich verhindert. Die Einzellauf-PCRs hatten eine Empfindlichkeit auf dem Niveau von einigen Kopien. Vorausgesetzt, dass die Fragmentgrößen der spezifischen Matrize und der internen Kontrolle nicht zu sehr voneinander verschieden sind, könnte das hier beschriebene Verfahren leicht mit neuen Primer-Sequenzen für jede Art von qualitativer und quantitativer PCR angewendet werden.

Beispiel 2: Serielles Testen von TTV gemäß der vorliegenden Erfindung mit einem Vergleichs-Test für eingebettete ("nested") PCR und teilweise eingebettete ("hemi-nested") PCR

VERFAHREN

Extraktion von DNA

Zitrat-Plasma-Proben wurden von einer anonymen Gruppe gesunder Plasma-Spender gesammelt. Alle waren regelmäßige HVB, HCV und HIV-1-negative Spender. DNA wurde aus 200 µl Plasma eines Pools von 32 Spendern mit dem QIAGEN Blood-Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) unter Befolgung der Vorschriften des Herstellers extrahiert. Außerdem wurden vor dem Extraktionsverfahren etwa 50 Kopien des Einzelstrang-internationalen Kontroll-TTVc zu den Plasma-Pools zugegeben, und die DNA wurde schließlich mit 50 µl H₂O eluiert. Die interne Kontrolle ist ein synthetisiertes 105-Basen-Oligonukleotid (MWG-BIOTECH GmbH, Ebersberg, Deutschland), das die Primer-Sequenz von TTVS1 und die komplementäre Sequenz von TTVA1 enthielt.

Polymerase-Kettenreaktion

Die extrahierte DNA-Lösung der Plasma-Pools wurde in 15 µl-Aliquots unterteilt und entweder der eingebetteten ("nested") PCR, wie von Simmonds et al. beschrieben, der teilweise eingebetteten ("hemi-nested") PCR, wie von Okamoto et al. (Taq DNA-Polymerase und 10x Puffer von Pharmacia, Uppsala, Schweden) oder der Einzelstufen-IC-PCR unter Verwendung einer wärmeaktivierten DNA-Polymerase unterzogen. Die IC-PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl, enthaltend 1 E HotStarTaq™ (QIAGEN) im jeweiligen, vom Hersteller gelieferten Puffer, je 200 µM von dNTP und je 50 pmol von forward-Primer TTVS1 und reverse-Primer TTVA1 durchgeführt. Die Sequenz aller Primer und der internen Kontrolle sind in Tabelle 1 gezeigt. Die Proben wurden mit Mineralöl überschichtet, 14 min bei 94°C inkubiert, und für 45 Zyklen in einem TRIO-Thermoblock (BioMetra, Göttingen, Deutschland) mit dem folgenden Zyklus-Profil amplifiziert: 30 s bei 94°C, 30 s bei 55°C, 60 s bei 72°C mit einer abschließenden Elongation bei 72°C auf 1 min. Die Proben wurden dann auf einem 3,5% niedrigschmelzenden Agarose-Gel, das mit Ethidiumbromid gefärbt war, fraktioniert. Die Amplifikation einer positiven Probe mit dem Primer-Paar TTVS1/TTVA1 führte zum erwarteten 286 bp-PCR-Produkt und die der internen Kontrolle zu einer 105 bp-Bande.

ERGEBNISSE

Um die höchste Empfindlichkeit und Spezifität bei einem Einstufen-PCR-Protokoll zu erreichen, verwendeten wir wiederum HotStarTaq™. Zur Bestimmung der Empfindlichkeit dieses Einstufen-PCR-Ansatzes wurde die interne Kontrolle, ein einfaches, synthetisiertes 105 Basen-Oligonukleotid, Endpunkt-verdünnt und wiederholt mittels PCR amplifiziert. Unter Berücksichtigung der Poisson-Verteilung wurde bestätigt, dass die Empfindlichkeit unseres Tests auf Einzelkopie-Niveau lag (Daten nicht gezeigt). Wir verglichen dann die IC-PCR mit den Protokollen von eingebetteter ("nested") und teilweise eingebetteter ("hemi-nested") PCR, die am häufigsten zur Zeit der Amplifizierung desselben TTV-Bereichs verwendet wurden (Charlton et al., Hepatology 28 (1998), Seiten 839-842; Höhne et al., J. Gen. Virol. 79 (1998), Seiten 2761-2764; Naoumov et al., Nishizawa et

al., Okamoto et al., Prescott et al., NEJM 339 (1998), Seiten 776-777; Simmonds et al., Tanaka et al., J. Med. Virol., 56 (1998), Seiten 234-238 und FEBS Letters 437 (1998), 201-206). Unter Berücksichtigung der vorigen Daten (Simmonds et al.) erwarteten wir ein geringes Vorkommen in einer europäischen Population für diesen Bereich der TTV und verglichen daher 20 verschiedene Pools, die aus dem Plasma von 32 Spendern bestanden, um mehrere positive Proben zu erhalten. Etwa 50 Kopien der internen Kontrolle (die niedrigste Anzahl, die notwendig ist, um immer zu PCR-Signalen zu führen) wurden zu 200 µl Plasma zugegeben, die Probe wurde extrahiert und danach einer IC-PCR, der eingebetteten ("nested") PCR, wie von Simmonds et al. beschrieben, und der teilweise eingebetteten ("hemi-nested") PCR, wie von Okamoto et al. beschrieben, unterzogen. Alle Proben wurden unabhängig voneinander extrahiert und den verschiedenen PCRs (einschließlich positiver und negativer Kontrolle) dreimal unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Der Vergleich der drei Methoden zeigt eine vergleichbare Empfindlichkeit und Spezifität unseres Verfahrens und des Verfahrens von Simmonds (13/20 vs 11/20 Proben positiv), wogegen in unseren Händen der PCR-Ansatz, wie von Okamoto et al. beschrieben, nicht funktionierte. Von 60 IC-PCRs wurden zwei Reaktionen einmal inhibiert (Proben 1 und 18), und die beiden anderen Tests waren positiv. Im Gegensatz zur IC-PCR hätte die herkömmliche PCR in diesen beiden Fällen falsch negative Ergebnisse erbracht. Die Proben 3, 4 und 12 zeigten immer die Bande der internen Kontrolle, sie waren jedoch nur in zwei von drei PCR-Versuchen positiv, was vermutlich auf die niedrige Kopienzahl des TTV, die im Plasma oft vorhanden ist, zurückzuführen ist (PCR-Verfahren für TTV sind offensichtlich an der Grenze der Nachweisbarkeit).

Die IC-PCR, die diese interne Kontrolle verwendet, erwies sich als verlässlich bei Tests von Plasmas aus Pools, und als Einzel-Stufen-Ansatz war die Empfindlichkeit und Spezifität mit der eingebetteten ("nested") PCR-Methode, die üblicherweise verwendet wird, vergleichbar. Das von Okamoto et al. beschriebene "hemi-nested" Verfahren zeigte, dass nur eine Probe deutlich positiv war, was beispielsweise durch eine schlechtere Amplifikationseffizienz erklärt werden kann (Takahashi et al., Hepatology Research 12 (1998), Seiten 233-239). Zusätzlich zur vergleichbaren Empfindlichkeit und Spezifität, konnte die IC-PCR die Inhibierung von PCR mehrere Male detektieren und vermeidet somit eindeutig falsch negative Ergebnisse. Die IC-PCR, die mit einem synthetisiertem Oligonukleotid und einer wärmeaktivierten DNA-Polymerase, die hier beschrieben ist, arbeitet, könnte mit neuen Primer-Sequenzen für jede Art qualitativer und quantitativer PCR übernommen werden.

Tabelle 1: Sequenzen von Primern und internen Kontrollen

Ziel	Sequenz	Oligotyp	Primer-Sequenz	Länge des Fragments
Parvo B19	KK5	Forward	5'-GCCAAGAAACCCCGCATTACC-3'	142 bp
	KK6	Reverse	5'-ACCAGTTTACCATTTCCAA-3'	
TTV	TTVS1	Forward	5'-ACAGACAGAGGAGAAGGCAAC-3'	286 bp
	TTVA1	Reverse	5'-CTGGCATTTTACCATTTCCAA-3'	
FVIII knockout	MC-18	Forward	5'-GAGCAAATTCCTGTACTGAC-3'	etwa 680 bp (MC18/MC/19)
	MC-19	Reverse	5'-TGCAAGGCCTGGGCTTATTT-3'	
	neoR2	Reverse	5'-CCGCCCTCCCTTGCGCTAC-3'	etwa 160 bp (MC18/neoR2)

55

AT 409 383 B

Ziel	Sequenz	Oligotyp	Primer-Sequenz	Länge des Fragments
5 Parvo 19	B19c	Interne Kontrolle	5'-GCCAAGAAAC CCCGCATTAC CATGTTATGG ATAGACTGGC ACACAAAAGG CTTTGTTCCT TACTCTTTAA ACTTTGTTCA AACTATGGTA AACTGGT-3'	117 bp
10 TTV	TTVc	Interne Kontrolle	5'-ACAGACAGAG GAGAAGGCAA CATGTTATGG ATAGACTGGC TAAGCAAAA AACACAAAAG GCTTTGTTCC TTA CTCTTTA AACTTTGGAA ATGGTAAAAT GCCAG-3'	105 bp
15 FVIII knockout	FVIIIc	Interne Kontrolle	5'-GAGCAAATTC CTG TACTGAC CATGTTATGG ATAGACTGGC TAAGCAAAGC GCGATCCAAA ACACAAGTAG CGCAAGGGAG GGCGGAAATA AGCCCAGGCC TTGCA-3'	105 bp (MC18/MC19) 85 bp (MC18/neoR2)
20 25				

Tabelle 2: Sequenzen von Primern und interner Kontrolle

30 NG059	5'-ACAGACAGAGGAGAAGGCAACATG-3'
NG061	5'-GGCAACATGTTATGGATAGACTGG-3'
NG063	5'-CTGGCATT T TACCATT T TCCAAAGTT-3'
35 A5430	5'-CAGACAGAGGAGAAGGCAACATG-3'
A5427	5'-TACCAYTTAGCTCTCATTCTWA-3'
A8761	5'-GGMAAYATGYTRTGGATAGACTGG-3'
40 A5432	5'-CTACCTCCTGGCATT T TACCA-3'
TTVS1	5'-ACAGACAGAGGAGAAGGCAAC-3'
45 TTVA1	5'-CTGGCATT T TACCATT T TCAA-3'
TTVc	5'-ACAGACAGAG GAGAAGGCAA CATGTTATGG ATAGACTGGC TAAGCAAAA AACACAAAAG GCTTTGTTCC TTA CTCTTTA AACTTTGGAA ATGGTAAAAT GCCAG-3'
50 55	

Tabelle 3: Vergleich von drei verschiedenen PCR-Verfahren zur Detektion von TTV

Probe Nr.	IC-PCR			"Nested"			"Hemi-nested"		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
5									
1	+	+	i	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-	-	+
3	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4	-	+	+	-	-	-	-	-	-
10									
5	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15									
10	+	+	+	+	+	+	-	+	-
11	-	i	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	+	-	+	-	-	-	-
13	+	+	+	+	+	+	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20									
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	+	+	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	i	+	+	-	+	+	-	-	-
19	+	+	+	+	+	+	-	-	-
25									
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Jede Probe (Pools von 32 Spendern) wurde dreimal extrahiert, und jede extrahierte Lösung wurde den drei verschiedenen PCR-Ansätzen unterzogen: + = positiv, - = negativ, i = Inhibierung der Reaktion

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren in einer Probe, umfassend die Schritte:
 - Bereitstellen einer Probe,
 - Zugabe von zumindest einem internen Nukleinsäure-Standard zur Probe,
 - Durchführen einer Amplifikations-Reaktion, bei welcher der Standard und gegebenenfalls zumindest eine der in der Probe zu quantifizierenden Nukleinsäuren gleichzeitig amplifiziert werden und
 - Detektieren und Quantifizieren der amplifizierten Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass der Probe ein chemisch synthetisiertes Oligonukleotid mit einer Größe von mindestens 90 Basen (Basenpaaren) als interner Standard zugegeben wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sich der Nukleinsäure-Standard von der zu detektierenden oder zu quantifizierenden Nukleinsäure zumindest in einem detektierbaren Merkmal unterscheidet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass vor der Durchführung der Amplifikations-Reaktion die Nukleinsäure aus der Probe vorgereinigt oder extrahiert wird, wobei der interne Standard vorzugsweise vor dieser Vorreinigung oder Extraktion der Probe zugegeben wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass eine virale Nukleinsäure detektiert oder quantifiziert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die virale Nukleinsäure aus TTV, Parvoviren, Hepatitis-Viren oder HI-Viren stammt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe aus einer Körperflüssigkeit entnommen worden ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe einer Kulturflüssigkeit entnommen worden ist.
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe von rekombinanten Zellen, Gewebe oder Tieren abgeleitet ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass ein interner Nukleinsäure-Standard verwendet wird, der sich von der zu detektierenden oder zu quantifizierenden Nukleinsäure hinsichtlich der Länge unterscheidet.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein interner Nukleinsäure-Standard verwendet wird, der sich von der zu detektierenden oder zu quantifizierenden Nukleinsäure hinsichtlich der Länge um mindestens 10 % oder 5 Basen (Basenpaare) unterscheidet.

15

HIEZU 1 BLATT ZEICHNUNGEN

20

25

30

35

40

45

50

55

FIG. 1

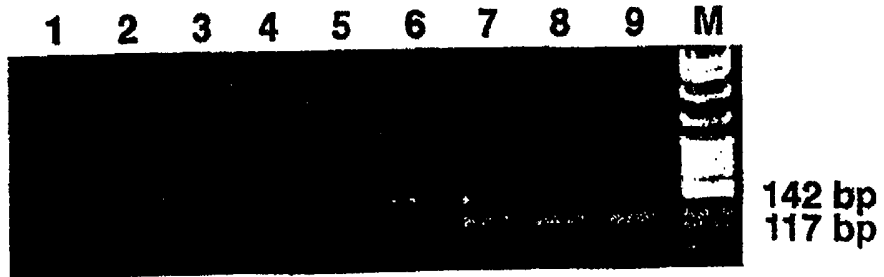


FIG. 2

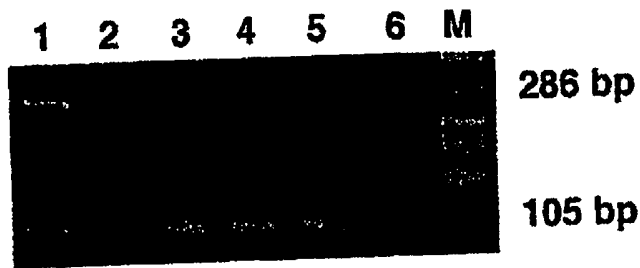


FIG. 3

