



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 31 542 T2 2004.06.24**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 754 240 B1**

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/68**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 31 542.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/01639**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 910 213.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/021271**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.02.1995**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **10.08.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.01.1997**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **20.08.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.06.2004**

(30) Unionspriorität:

192631 07.02.1994 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif., US

(72) Erfinder:

**NIKIFOROV, Theo, San Diego, US; KARN,
Jonathan, Little Shelford LB2 5HJ, GB; GOELET,
Philip, Cockeysville, US**

(74) Vertreter:

**KRAMER - BARSKE - SCHMIDTCHEN, 81245
München**

(54) Bezeichnung: **LIGASE/POLYMERASE-VERMITTELTE ANALYSE GENETISCHER ELEMENTE VON EINZELNUKLEOTID-POLYMORPHISMEN UND IHRE VERWENDUNG IN DER GENETISCHEN ANALYSE**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Technologie rekombinanter DNA. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Ligase/Polymerase-vermitteltes Verfahren zur Bestimmung der Identität eines Nucleotids, das an einer bestimmten Stelle vorliegt, wie z. B. einer polymorphen Einzelnucleotidstelle, im Genom eines Tieres. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung solcher Bestimmungen zur Analyse der Identität, der Vorfahren oder der genetischen Merkmale.

I. Die Bestimmung des Nucleotids, das an einer polymorphen Stelle vorliegt

[0002] Die Genome von Viren, Bakterien, Pflanzen und Tieren unterliegen im Verlauf ihrer fortgesetzten Evolution natürlicherweise spontanen Mutationen (J. F. Gusella, *Ann. Rev. Biochem.* 55, 831–854 (1986)). Da solche Mutationen nicht sofort durch alle Mitglieder einer Art übertragen werden, erzeugt der Evolutionsvorgang polymorphe Allele, die in den Populationen der Art koexistieren. In manchen Fällen befindet sich eine solche Koexistenz in einem stabilen oder quasi-stabilen Gleichgewicht. In anderen Fällen verleiht die Mutation der Art einen Überlebens- oder Evolutionsvorteil und sie kann schließlich (d. h. im Zeitrahmen der Evolution) in die DNA jedes Mitglieds dieser Art eingebaut werden.

[0003] Es wurden verschiedene Polymorphismusklassen identifiziert. Polymorphismen des variablen Nucleotidtyps („VNTR's“) ergeben sich z. B. aus spontanen Tandemwiederholungen von wiederholten Di- oder Trinucleotidmotiven von Nucleotiden (J. L. Weber, *US-PS 5,075,217*; J. A. L. Armour et al., *FEBS Lett.* 307, 113–115 (1992); L. Jones et al., *Eur. J. Haematol.* 39, 144–147 (1987), G. T. Hom et al., *PCT-Anmeldung WO91/14003*; A. J. Jeffreys, *Europäische Patentanmeldung 370 719*; A. J. Jeffreys, *US-PS 5,175,082*; A. J. Jeffreys et al., *Amer. J. Hum. Genet.* 39, 11–24 (1986); A. J. Jeffreys et al., *Nature* 316, 76–79 (1985); I. C. Gray et al., *Proc. R. Acad. Soc. Lond.* 243, 241–253 (1991); S. S. Moore et al., *Genomics* 10, 654–660 (1991); A. J. Jeffreys et al., *Anim. Genet.* 18, 1–15 (1987); J. Hillel et al., *Anim. Genet.* 20, 145–155 (1989); J. Hillel et al., *Genet.* 124, 783–789 (1990)). Wenn eine solche Variation die Längen der Fragmente verändert, die durch eine Spaltung mittels Restriktionsendonuklease erzeugt werden, dann werden die Variationen als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen („RFLP's“) bezeichnet. RFLP's wurden weit verbreitet bei Analysen der menschlichen Genetik und bei tiergenetischen Analysen verwendet (J. Glassberg, *GB-Patentanmeldung 2 135 774*; M. H. Skolnick et al., *Cytogen. Cell Genet.* 32, 58–67 (1982); D. Botstein et al., *Ann. J. Hum. Genet.* 32, 314–331 (1980); S. G. Fischer et al. (*PCT-Anmeldung WO90/13668*); M. Uhlen, *PCT-Anmeldung WO90/11369*)).

[0004] Die meisten Polymorphismen stammen vom Ersetzen lediglich eines einzelnen Nucleotids der ursprünglich vorhandenen Gensequenz. In seltenen Fällen kann eine solche Substitution eine bestimmte Restriktionsstelle erzeugen oder zerstören und folglich einen RFLP-Polymorphismus umfassen. In vielen Fällen kann jedoch die Substitution eines Nucleotids in solchen Einzelnucleotidpolymorphismen nicht durch Restriktionsfragmentanalyse bestimmt werden. In manchen Fällen umfassen solche Polymorphismen Mutationen, die bei einer genetischen Erkrankung die bestimmenden Charakteristika sind. Tatsächlich können solche Mutationen ein einzelnes Nucleotid in einem Protein-kodierenden Gen in einer Weise beeinflussen, dass die Krankheit verursacht wird (d. h. Hämophilie, Sichelzellenanämie, usw.). Trotz der zentralen Bedeutung solcher Polymorphismen in der modernen Genetik wurden nur wenige Verfahren entwickelt, die einen gleichzeitigen Vergleich der Allele von zwei Individuen bei vielen derartigen Polymorphismen parallel ermöglichen.

II. Die Merkmale der Einzelnucleotidpolymorphismen der vorliegenden Erfindung und die Vorteile ihrer Verwendung in der genetischen Analyse

[0005] Ein „Polymorphismus“ ist eine Variation in der DNA-Sequenz einiger Mitglieder einer Art. Ein Polymorphismus wird deshalb dahingehend als „allelisch“ bezeichnet, dass aufgrund des Polymorphismus einige Mitglieder einer Art die unmutierte Sequenz (d. h. das ursprüngliche „Allel“) aufweisen, wohingegen andere Mitglieder eine mutierte Sequenz (d. h. das variante oder mutante „Allel“) aufweisen können. Im einfachsten Fall kann nur eine mutierte Sequenz vorliegen, wobei der Polymorphismus dann diallelisch genannt wird. Im Fall diallelischer diploider Organismen sind drei Genotypen möglich. Sie können homozygot für ein Allel, homozygot für das andere Allel oder heterozygot sein. Im Fall diallelischer haploider Organismen können sie ein Allel oder das andere aufweisen, wobei folglich zwei Genotypen möglich sind. Diallelische Polymorphismen sind die bevorzugten Polymorphismen der vorliegenden Erfindung. Das Auftreten alternativer Mutationen kann zu triallelischen, usw., Polymorphismen führen. Ein Allel kann durch das Nucleotid/die Nucleotide bezeichnet werden, das bzw. welche die Mutation umfassen. Die vorliegende Erfindung betrifft eine spezielle Klasse allelischer Polymorphismen und deren Verwendung bei der Genotypisierung einer Pflanze oder eines Tiers. Solche allelischen Polymorphismen werden hier als „Ezelnucleotidpolymorphismen“ oder „SNP's“ bezeichnet. „Ezelnucleotidpolymorphismen“ werden durch ihre charakteristischen Merkmale definiert. Ein zentrales Merkmal

eines solchen Polymorphismus besteht darin, dass er eine polymorphe Stelle „X“ enthält, die insbesondere durch ein einzelnes Nucleotid besetzt ist, bei dem es sich um die Stelle der Variation des Polymorphismus handelt (P. Goelet und M. Knapp, US-Patentanmeldung Nr. 08/145,145, die unter Bezugnahme in diese Beschreibung einbezogen wird).

[0006] SNP's haben gegenüber RFLP's und VNTR's mehrere wichtige Vorteile. Erstens sind SNP's stabiler als andere Polymorphismusklassen. Ihre Spontanmutationsrate beträgt etwa 10^{-9} (A. Kornberg, DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980) und ist etwa 1000-mal weniger häufig als diejenige von VNTR's. Polymorphismen des VNTR-Typs sind in signifikanter Weise durch hohe Mutationsraten gekennzeichnet.

[0007] Zweitens treten SNP's mit einer höheren Frequenz und mit einer höheren Einheitlichkeit auf als RFLP's und VNTR's. Die Charakterisierung von VNTR's und RFLP's hängt sehr stark von dem Verfahren ab, das zum Nachweis des Polymorphismus verwendet wird. Im Gegensatz dazu können neue Polymorphismen durch Sequenzieren zufälliger genomischer oder cDNA-Moleküle identifiziert werden, da die SNP's aus einer Sequenzvariation resultieren. VNTR's und RFLP's können auch als Teilsatz von SNP's betrachtet werden, da eine Variation in der Region eines VNTR oder RFLP zu einer Änderung einer einzelnen Base in der Region führen kann. SNP's können sich auch aus Deletionen, Punktmutationen und Insertionen ergeben. Jegliche Einzelbasenveränderung, mit welcher Ursache auch immer, kann eine SNP sein. Je größer die Frequenz von SNP's ist, desto leichter können sie identifiziert werden als die anderen Polymorphismusklassen. Die größere Einheitlichkeit ihrer Verteilung erlaubt die Identifizierung von SNP's „näher“ an einem interessierenden Merkmal. Der kombinierte Effekt dieser beiden Merkmale macht die SNP's extrem wertvoll. Beispielsweise dann, wenn ein bestimmtes Merkmal (z. B. eine Veranlagung für Krebs) eine Mutation an einer bestimmten Stelle wiedergibt, dann kann ein beliebiger Polymorphismus, der mit der bestimmten Stelle verbunden ist, zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit verwendet werden, dass ein Individuum dieses Merkmal zeigen wird.

[0008] SNP's können durch die Verwendung eines beliebigen Verfahrens aus einer Vielzahl von Verfahren charakterisiert werden. Solche Verfahren umfassen das direkte oder indirekte Sequenzieren der Stelle, die Verwendung von Restriktionsenzymen, wenn die jeweiligen Allele der Stelle eine Restriktionsstelle erzeugen oder zerstören, die Verwendung allelspezifischer Hybridisierungs sonden, die Verwendung von Antikörpern, die für die Proteine spezifisch sind, die von den verschiedenen Allelen des Polymorphismus kodiert werden, oder eine andere biochemische Interpretation. Es gibt jedoch noch keinen Test, der sowohl sehr genau als auch leicht durchzuführen ist.

III. Verfahren zur Analyse polymorpher Stellen

A. DNA-Sequenzierung

[0009] Das offensichtlichste Verfahren zur Charakterisierung eines Polymorphismus umfasst das direkte DNA-Sequenzieren der genetischen Stelle, die den Polymorphismus flankiert und umfasst. Eine derartige Analyse kann unter Verwendung entweder des „Dideoxyvermittelten Kettenabbruchverfahrens“, das auch als „Sanger-Verfahren“ bekannt ist (F. Sanger et al., J. Molec. Biol. 94, 441 (1975)), oder des „chemischen Abbauverfahrens“ durchgeführt werden, das auch als „Maxam-Gilbert-Verfahren“ bekannt ist (A. M. Maxam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 560 (1977)). In Kombination mit genomischen sequenzspezifischen Amplifikationstechnologien, wie z. B. der Polymerasekettenreaktion (K. Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 263–273 (1986); H. Erlich et al., Europäische Patentanmeldung 50 424; Europäische Patentanmeldung 84 796, Europäische Patentanmeldung 258 017, Europäische Patentanmeldung 237 362; K. Mullis, Europäische Patentanmeldung 201 184; K. Mullis et al., US-PS 4,683,202; H. Erlich, US-PS 4,582,788; und R. Saiki et al., US-PS 4,683,194)), die zur Erleichterung der Gewinnung der gewünschten Polynucleotide verwendet werden können, sind Direktsequenzierverfahren technisch anspruchsvoll, relativ teuer und weisen niedrige Durchsätze auf. Als Folge davon bestand ein Bedarf für Techniken, welche die wiederholte und parallele Analyse von SNP's vereinfachen.

B. Exonucleasebeständigkeit

[0010] C. R. Mundy (US-PS 4,656,127) diskutiert alternative Verfahren zur Bestimmung der Identität eines Nucleotids, das an einer bestimmten polymorphen Stelle vorliegt. In dem Verfahren von Mundy wird ein spezialisiertes Exonuclease-beständiges Nucleotidderivat eingesetzt. Ein Primer, der zu der allelischen Sequenz komplementär ist, die sich unmittelbar 3' zu der polymorphen Stelle befindet, wird an ein Zielmolekül hybridisieren gelassen, das von einem bestimmten Tier oder Menschen erhalten worden ist. Wenn die polymorphe Stelle auf dem Zielmolekül ein Nucleotid enthält, das zu dem bestimmten Exonuclease-beständigen Nucleotidderivat komplementär ist, dann wird dieses Derivat durch eine Polymerase am Ende des hybridisierten Primers eingebaut. Ein solcher Einbau macht den Primer gegenüber einer Exonuclease beständig und erlaubt daher dessen Nachweis. Da die Identität des Exonuclease-beständigen Derivats der Probe bekannt ist, zeigt

die Erkenntnis, dass der Primer gegenüber Exonucleasen beständig geworden ist, dass das Nucleotid, das in der polymorphen Stelle des Zielmoleküls vorhanden ist, zu dem in der Reaktion verwendeten Nucleotidderivat komplementär war. Das Mundy-Verfahren hat den Vorteil, dass es keine Bestimmung großer Mengen an Fremdsequenzdaten erfordert. Es weist die Nachteile auf, dass es die amplifizierten Zielsequenzen und unmodifizierten Primer zerstört und dass es gegenüber der Geschwindigkeit des Polymeraseeinbaus des verwendeten spezifischen Exonucleasebeständigen Nucleotids extrem empfindlich ist.

C. Mikrosequenzierverfahren

[0011] Kürzlich wurden verschiedene Primer-geführte Nucleotideinbauverfahren zum Testen polymorpher Stellen in DNA beschrieben (J. S. Komher et al., Nucl. Acids Res. 17, 7779–7784 (1989); B. P. Sokolov, Nucl. Acids Res. 18, 3671 (1990); A. C. Syvänen et al., Genomics 8, 684–692 (1990); M. N. Kuppaswamy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88, 1143–1147 (1991); T. R. Prezant et al., Hum. Mutat. 1, 159–164 (1992); L. Ugozzoli et al., GATA 9, 107–112 (1992); P. Nyren et al., Anal. Biochem. 208, 171–175 (1993)). Diese Verfahren unterscheiden sich von der genetischen BitTM-Analyse („GBATM“, die nachstehend ausführlich diskutiert wird) darin, dass sie alle auf dem Einbau markierter Desoxynucleotide beruhen, um zwischen Basen an einer polymorphen Stelle zu unterscheiden. In einem solchen Format können Polymorphismen, die in Durchläufen mit dem gleichen Nucleotid auftreten, zu Signalen führen, die zur Länge des Durchlaufs proportional sind, da das Signal zur Anzahl der eingebauten Desoxynucleotide proportional ist (A.-C. Syvänen et al., Amer. J. Hum. Genet. 52, 46–59 (1993)). Ein solcher Bereich ortsspezifischer Signale könnte im Vergleich mit der einfachen ternären (2 : 0, 1 : 1 oder 0 : 2) Klasse von Signalen, die mit dem GBATM-Verfahren erzeugt werden, insbesondere für Heterozygoten komplexer zu interpretieren sein. Darüber hinaus kann für einige Stellen der Einbau eines falschen Desoxynucleotids selbst in Gegenwart des korrekten Didesoxynucleotids stattfinden (J. S. Komher et al., Nucl. Acids Res. 17, 7779–7784 (1989)). Solche Desoxynucleotid-Fehleinbauereignisse können aufgrund der Km der DNA-Polymerase für das fehlgepaarte Desoxysubstrat bei manchen Sequenzzusammenhängen mit der relativ schlechten Km selbst eines korrekt basengepaarten Didesoxysubstrats vergleichbar sein (A. Kornberg et al., in: DNA Replication, Zweite Auflage (1992), W. H. Freeman and Company, New York; S. Tabor et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86, 4076–4080 (1989)). Dieser Effekt würde zu dem Hintergrundrauschen bei der Ermittlung der polymorphen Stelle beitragen.

D. Verlängerung in Lösung unter Verwendung von ddNTP's

[0012] D. Cohen et al. (FR-PS 2,650,840; PCT-Anmeldung WO91/02087) diskutieren ein Verfahren auf Lösungsbasis zur Bestimmung der Identität des Nucleotids einer polymorphen Stelle. Wie bei dem Mundy-Verfahren der US-PS 4,656,127 wird ein Primer verwendet, der zu allelischen Sequenzen unmittelbar 3' zu einer polymorphen Stelle komplementär ist. Das Verfahren bestimmt die Identität des Nucleotids dieser Stelle unter Verwendung markierter Didesoxynucleotidderivate, die, wenn sie zu dem Nucleotid der polymorphen Stelle komplementär sind, am Ende des Primers eingebaut werden.

[0013] Das Cohen-Verfahren hat den signifikanten Nachteil, dass es sich um ein Verlängerungsverfahren auf Lösungsbasis handelt, bei dem markierte Didesoxynucleosidtriphosphate verwendet werden. Das Ziel-DNA-Templat wird gewöhnlich durch eine DNA-Amplifizierungsreaktion wie z. B. PCR hergestellt, bei dem eine hohe Konzentration an Desoxynucleosidtriphosphaten verwendet wird, den natürlichen Substraten der DNA-Polymerasen. Diese Monomere werden bei der nachfolgenden Verlängerungsreaktion mit den Didesoxynucleosidtriphosphaten konkurrieren. Daher ist nach der PCR ein zusätzlicher Reinigungsschritt erforderlich, um das DNA-Templat von den nicht-eingebauten dNTP's zu trennen. Da es sich um ein Verfahren auf Lösungsbasis handelt, sind die nicht-eingebauten dNTP's schwer zu entfernen und das Verfahren ist für ein Testen mit hohem Durchsatz nicht geeignet.

E. Festphasenverlängerung unter Verwendung von ddNTP's

[0014] Ein alternatives Verfahren, das als genetische BitanalyseTM (Genetic Bit AnalysisTM) oder GBATM bekannt ist, wurde von P. Goelet et al. beschrieben (PCT-Anmeldung 92/15712). In einer bevorzugten Ausführungsform werden in dem Verfahren von P. Goelet et al. Gemische markierter Terminatoren und ein Primer verwendet, der zu der Sequenz 3' zu einer polymorphen Stelle komplementär ist. Der markierte Terminator, der eingebaut wird, wird somit durch das Nucleotid, das in der polymorphen Stelle des zu bewertenden Zielmoleküls vorhanden ist, bestimmt und ist zu diesem komplementär. Im Gegensatz zu dem Verfahren von Cohen et al. (FR-PS 2,650,840; PCT-Anmeldung WO91/02087) ist das Verfahren von P. Goelet et al. vorzugsweise ein Test in heterogener Phase, in welcher der Primer oder das Zielmolekül an einer Festphase immobilisiert ist. Es kann deshalb einfacher durchgeführt werden und ist genauer als das von Cohen diskutierte Verfahren.

F: Oligonucleotid-Ligationstest

[0015] Ein weiteres Festphasenverfahren, bei dem eine andere Enzymologie verwendet wird, ist der „Oligonucleotid-Ligationstest“ (OLA) (U. Landegren et al., Science 241, 1077–1080 (1988)). Bei der OLA-Vorschrift werden zwei Oligonucleotide verwendet, die so gestaltet sind, dass sie an angrenzende Sequenzen eines einzelnen Strangs eines Ziels hybridisieren können. Eines der Oligonucleotide ist biotinyliert und das andere ist nachweisbar markiert. Wenn die genau komplementäre Sequenz in einem Zielmolekül gefunden wird, dann werden die Oligonucleotide derart hybridisieren, dass ihre Endgruppen aneinanderstoßen, und ein Ligationssubstrat erzeugen. Die Ligation ermöglicht es dann, dass das markierte Oligonucleotid unter Verwendung von Avidin oder eines anderen Biotinliganden gewonnen werden kann. OLA kann Punktmutationen nachweisen. D. A. Nickerson et al. haben einen Nucleinsäurenachweistest beschrieben, der Merkmale von PCR und OLA kombiniert (D. A. Nickerson et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87, 8923–8927 (1990)). In diesem Verfahren wird eine PCR verwendet, um die exponentielle Amplifizierung der Ziel-DNA zu erreichen, die dann unter Verwendung von OLA nachgewiesen wird. Tests wie z. B. OLA erfordern, dass jedes Kandidaten-dNTP eines Polymorphismus unter Verwendung eines separaten Satzes von Oligonucleotiden für jedes dNTP separat untersucht werden kann. Der Hauptnachteil von OLA besteht darin, dass die Ligation kein stark unterscheidendes Verfahren ist und unspezifische Signale ein signifikantes Problem sein können.

G. Zusätzliche Verfahren

[0016] Die EP-A-0 246 864 stellt ein Verfahren zur Unterscheidung einer spezifischen Basensequenz von einer varianten Basensequenz bereit, welches das Hybridisieren angrenzender Segmente einer Ziel-Basensequenz mit einer nachweisbaren ersten Nucleotidsonde und mit einer zweiten Nucleotidsonde zur Bildung eines Hybrids, wobei die Nucleotidsequenz der ersten und der zweiten Sonde derart ist, dass sie, wo sie mit einer komplementären Zielsequenz eine gespaltene Sonde bilden, anschließend verbunden werden können, Verbinden jedes erhaltenen Hybrids und Nachweisen jedes erhaltenen Hybrids umfasst. Es sind auch Hybridisierungssonden und Kits zur Verwendung in einem solchen Verfahren beschrieben.

[0017] Die WO92/15712 stellt ein Verfahren zur Nucleinsäure-Typisierung durch Polymeraseverlängerung von Oligonucleotiden unter Verwendung von Terminatormischungen bereit. Die WO92/15712 betrifft auch ein Verfahren zur Bestimmung der Identität einer Nucleotidbase an einer spezifischen Position in einer interessierenden Nucleinsäure, das in einem Verfahren zur Bestimmung der Gegenwart oder Abwesenheit einer bestimmten Nucleotidsequenz in einer Nucleinsäureprobe geeignet ist.

IV. Schlussfolgerungen

[0018] Die meisten der vorstehend beschriebenen Verfahren erfordern den Einbau eines Nucleotidderivats am 3'-Ende eines Primermoleküls durch eine Polymerase. Es wäre erwünscht, ein selektiveres Verfahren zur Unterscheidung von Einzelnucleotidpolymorphismen zu entwickeln. Die vorliegende Erfindung erfüllt dieses Bedürfnis durch die Bereitstellung eines Ligase/Polymerase-vermittelten Verfahrens zur Bestimmung der Identität des Nucleotids, das an einer polymorphen Stelle vorliegt. Die Zugabe einer Ligase zu dem Verfahren bedeutet, dass zwei Ereignisse erforderlich sind, um ein Signal, eine Verlängerung und eine Ligation zu erzeugen. Dies verleiht der vorliegenden Erfindung eine höhere Spezifität und ein niedrigeres „Rauschen“ als Verfahren, bei denen entweder eine Verlängerung oder eine Ligation allein verwendet wird. Anders als bei dem Oligonucleotidligationstest wird der Unterscheidungsschritt der Verlängerung in der vorliegenden Erfindung durch Polymerase vermittelt und Polymerasen sind bezüglich ihrer Aktivität spezifischer als Ligasen. Anders als die Tests auf Polymerasebasis erhöht dieses Verfahren die Spezifität des Polymeraseschritts dadurch, dass dieser mit einem zweiten Hybridisierungs- und Ligationsschritt für ein Signal kombiniert wird, das an die Festphase gebunden werden soll.

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Ligase/Polymerase-vermitteltes Verfahren zur Bestimmung der Identität des Nucleotids, das an einer polymorphen Stelle eines Organismus (entweder eines Mikroorganismus, einer Pflanze, eines nicht-menschlichen Tiers oder eines Menschen) vorliegt. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Verwendung dieser Informationen bei der genetischen Analyse.

[0020] Insbesondere stellt die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der Identität eines Nucleotids bereit, das an einer vorausgewählten Einzelnucleotid-Langstelle in einem einzelsträngigen Ziel-Nucleinsäuremolekül vorliegt, wobei in dem Verfahren ein Satz von Oligonucleotiden eingesetzt wird, der aus zwei Oligonucleotiden besteht, die an das Ziel hybridisierbar sind und wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

A) Immobilisieren eines ersten Oligonucleotids des Satzes von Oligonucleotiden, wobei das erste Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid oder ein Linker-Oligonucleotid ist, an einem Träger, wobei das erste Oligonucleotid eine Nucleotidsequenz aufweist, die zu der einer ersten Region des Zielmoleküls komplementär ist und an die erste Region des Zielmoleküls derart hybridisieren kann, dass eine Endgruppe des hybridi-

disierten ersten Oligonucleotids unmittelbar an die vorausgewählte Stelle angrenzt,

B) Inkubieren des immobilisierten ersten Oligonucleotids in Gegenwart des Zielmoleküls und ferner in Gegenwart eines markierten oder unmarkierten zweiten Oligonucleotids des Satzes von Oligonucleotiden, wobei das zweite Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist, wenn das erste Oligonucleotid ein Linker-Oligonucleotid ist, oder ein Linker-Oligonucleotid ist, wenn das erste Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist, wobei das zweite Oligonucleotid eine Sequenz aufweist, die zu der einer zweiten Region des Zielmoleküls komplementär ist und an die zweite Region des Zielmoleküls hybridisieren kann, wobei die erste und die zweite Region durch die vorausgewählte Stelle voneinander getrennt sind, wobei die Inkubation unter Bedingungen stattfindet, die ausreichend sind, um die Hybridisierung des ersten und des zweiten Oligonucleotids an das Zielmolekül zur Bildung eines hybridisierten Produkts zu ermöglichen, bei dem das erste und das zweite Oligonucleotid durch einen Zwischenraum eines einzelnen Nucleotids voneinander getrennt sind, wobei der Zwischenraum der vorausgewählten Stelle gegenüberliegt,

C) weiter Inkubieren des hybridisierten Produkts in Gegenwart einer Polymerase, einer Ligase und eines Nucleosidtriphosphatgemischs, das eine Nucleosidtriphosphatverbindung enthält, die zu dem Nucleotid der vorausgewählten Stelle komplementär ist und nachweisbar markiert ist, wenn das zweite Oligonucleotid unmarkiert ist, wobei das Gemisch aus einer Desoxynucleosidtriphosphatverbindung und drei Didesoxynucleosidtriphosphatverbindungen zusammengesetzt ist, so dass ungeachtet der Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle eine templatabhängige, Polymerase-vermittelte Verlängerungsreaktion stattfinden wird, die dazu führt, dass eine Nucleosidtriphosphatverbindung des Nucleosidtriphosphatgemischs, die zu dem Nucleotid der vorausgewählten Stelle komplementär ist, unabhängig davon, ob das erste oder das zweite Oligonucleotid das Primer-Oligonucleotid ist, an der 3'-Endgruppe eingebaut wird, wobei die Inkubation unter Bedingungen stattfindet, die ausreichend sind, so dass der templatabhängige, Polymerase-vermittelte Einbau stattfindet, und dadurch der Zwischenraum zwischen den hybridisierten Oligonucleotiden gefüllt und ein Anstoßen der Oligonucleotide verursacht wird,

D) Ligierenlassen der anstoßenden ersten und zweiten hybridisierten Oligonucleotide durch die Ligase,

E) weiter Inkubieren des immobilisierten ersten Oligonucleotids unter Bedingungen, die ausreichend sind, so dass jegliches nicht-kovalent gebundene Ziel oder zweite Oligonucleotid davon getrennt wird, und

F) Bestimmen, ob das immobilisierte erste Oligonucleotid von Schritt E markiert worden ist, wobei die Gegenwart eines immobilisierten markierten Oligonucleotids zeigt, dass die Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle zu dem Desoxynucleosidtriphosphat des Desoxynucleosidtriphosphatgemischs komplementär ist.

[0021] Die Erfindung umfasst ferner die Ausführungsformen des vorstehend genannten Verfahrens, bei denen das erste und das zweite Oligonucleotid und das Zielmolekül DNA-Moleküle, RNA-Moleküle, Peptidnucleinsäuren und andere modifizierte DNA-Moleküle sind.

[0022] Die Erfindung umfasst ferner die Ausführungsformen der vorstehend genannten Verfahren, bei denen in Schritt A die 3'-Endgruppe des ersten Oligonucleotids (des „Linkers“) an dem Träger immobilisiert ist, und bei denen in Schritt C die Bedingungen den Einbau des Nucleosidtriphosphats an der 3'-Endgruppe des zweiten hybridisierten Oligonucleotids (des „Primers“) ermöglichen, oder bei denen in Schritt A die 5'-Endgruppe des ersten Oligonucleotids an dem Träger immobilisiert ist, und bei denen in Schritt C die Bedingungen den Einbau des Nucleosidtriphosphats an der 3'-Endgruppe des ersten hybridisierten Oligonucleotids (Primer) ermöglichen. Nach dem Einbau werden der Primer und die Linker-Oligonucleotide zusammenligiert und die Identität des polymorphen Nucleotids wird aus dem Signal bestimmt, das mit der Festphase zusammenhängt.

[0023] Das Nucleosidtriphosphat ist nachweisbar markiert (wie z. B. mit einem Hapten, einem Enzymmarker, einem Fluoreszenzmarker, einem Radioisotopenmarker oder einem Chemilumineszenzmarker).

[0024] Die Erfindung betrifft auch die Ausführungsform der vorstehend genannten Verfahren, bei welcher das zweite Oligonucleotid nachweisbar markiert ist, und bei welcher im Schritt F die Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle durch Nachweisen des Markers des immobilisierten markierten zweiten Oligonucleotids bestimmt wird.

[0025] In einer anderen Ausführungsform können die Schritte A bis D in Lösung durchgeführt werden und die ligierten Oligonucleotide sind zum Nachweis an einer Festphase gebunden.

[0026] In einer anderen Ausführungsform können die Schritte A bis D und der Nachweis der ligierten Oligonucleotide in Lösung durchgeführt werden.

[0027] Die Erfindung umfasst die Verwendung der vorstehend beschriebenen Verfahren zum Analysieren eines Polymorphismus eines beliebigen diploiden Organismus, einschließlich eines Tiers, das aus der Gruppe bestehend aus einem Pferd, einem Schaf, einem Rind, einem Hund, einer Katze, einer Pflanze und einem Menschen ausgewählt ist, sowie haploider Organismen, einschließlich Bakterien, Pilzen und Viren.

[0028] **Fig. 1** ist ein Diagramm eines Ligase-vermittelten GBATM-Verfahrens unter Verwendung eines markierten dNTP's. In (1) wird ein 5'-phosphoryliertes Linkeroligonucleotid an die Oberfläche eines Mikrowells gebunden. In (2) wird Templat-DNA an den Linker hybridisieren gelassen. In (3) hybridisiert ein Primer-Oligonucleotid

an das immobilisierte Templat. In (4) wird in Gegenwart von DNA-Polymerase, Ligase, eines markierten dNTP's und eines unmarkierten bzw. unmarkierter dNTP('s) ein markiertes dNTP eingebaut und der Linker und der Primer werden ligiert. In (5) wird der Well mit Alkali gewaschen, um jegliche unligierte DNA zu entfernen. In (6) wird die markierte Base unter Verwendung eines Enzym-konjugierten Antikörpers und eines Substrats nachgewiesen.

[0029] **Fig. 2** ist ein Diagramm eines Ligase-vermittelten GBATM-Verfahrens unter Verwendung eines markierten Primers. In (1) wird ein 5'-phosphoryliertes Linker-Oligonucleotid mittels seines 3'-Endes an die Oberfläche eines Mikrowells gebunden. In (2) wird Templat-DNA an den Linker hybridisieren gelassen. In (3) wird ein biotinyliertes Primer-Oligonucleotid an den immobilisierten Linker hybridisieren gelassen. In (4) wird in Gegenwart von DNA-Polymerase, Ligase, eines markierten dNTP's und drei unmarkierte ddNTP's das dNTP eingebaut und der Linker und der Primer werden ligiert. In (5) wird der Well mit Alkali gewaschen, um jegliche unligierte DNA zu entfernen. In (6) wird die markierte Base unter Verwendung eines Enzym-konjugierten Antikörpers und eines Substrats nachgewiesen.

[0030] **Fig. 3** ist ein Diagramm eines Ligase-vermittelten GBATM-Verfahrens unter Verwendung eines markierten Linkers. In (1) wird ein Primeroligonucleotid mittels seines 5'-Endes an die Oberfläche eines Mikrowells gebunden. In (2) wird Templat-DNA an den Linker hybridisieren gelassen. In (3) hybridisiert ein 5'-phosphorylierter 3'-biotinylierter Linker an das immobilisierte Templat. In (4) wird in Gegenwart von DNA-Polymerase, Ligase, eines markierten dNTP's und drei ddNTP's das dNTP eingebaut und der Linker und der Primer werden ligiert. In (5) wird der Well mit Alkali gewaschen, um jegliche unligierte DNA zu entfernen. In (6) wird die markierte Base unter Verwendung eines Enzym-konjugierten Antikörpers und eines Substrats nachgewiesen.

[0031] **Fig. 4** ist ein Diagramm eines Ligase-vermittelten GBATM-Verfahrens in Lösung. In (1) wird ein 5'-phosphoryliertes, 3'-fluoresceiniertes Linkeroligonucleotid mit Templat-DNA und einem Primer-Oligonucleotid inkubiert. In (2) werden die drei DNA-Moleküle in Lösung hybridisieren gelassen. In (3) wird in Gegenwart von DNA-Polymerase, Ligase, eines markierten dNTP's und eines unmarkierten bzw. unmarkierter dNTP('s) das dNTP eingebaut und der Linker und der Primer werden ligiert. In (4) werden die ligierten Oligonucleotide an einer Festphase gebunden und der Well wird zum Entfernen unligierter DNA gewaschen. In (5) wird die markierte Base unter Verwendung eines Enzym-konjugierten Antikörpers und eines Substrats nachgewiesen.

I. Der erfindungsgemäße Ligase/Polymerase-vermittelte Test

A. Probenherstellung

[0032] Nucleinsäureproben können von einem Individuum der Art, die analysiert werden soll, entweder durch „invasive“ oder „nicht-invasive“ Probenahmemittel erhalten werden. Ein Probenahmemittel wird als „invasiv“ bezeichnet, wenn es die Gewinnung von Nucleinsäuren von innerhalb der Haut oder von Organen eines Tiers umfasst (einschließlich insbesondere einer Maus, einem Menschen, einem Schaf, einem Pferd, einem Rind, einem Schwein, einem Hund oder einer Katze). Beispiele für invasive Verfahren umfassen die Blutgewinnung, die Samengewinnung, eine Nadelbiopsie, eine Pleuralaspiration, usw. Beispiele solcher Verfahren werden von C. H. Kim et al. (J. Virol. 66, 3879–3882 (1992)); B. Biswas et al. (Annals NY Acad. Sci. 590, 582–583 (1990)); B. Biswas et al. (J. Clin. Microbiol. 29, 2228–2233 (1991)) diskutiert.

[0033] Im Gegensatz dazu ist ein „nicht-invasives“ Probenahmemittel ein Probenahmemittel, mit dem die Nucleinsäuremoleküle von einer internen oder externen Oberfläche des Tiers gewonnen werden. Beispiele für solche „nicht-invasiven“ Probenahmemittel umfassen „Ausstreichen“, Gewinnen von Tränen, Speichel, Urin, Fäkalmaterial, Schweiß oder Hautatmung, usw. Der Ausdruck „Ausstrich“ bezeichnet das In-Kontakt-Bringen eines Applikators/einer Sammeleinrichtung („Tupfer“), der ein Adsorptionsmaterial enthält oder umfasst, mit einer Oberfläche in einer Weise, die ausreichend ist, Oberflächenbruchstücke und/oder tote oder abgestreifte Zellen oder Zellbruchstücke zu gewinnen. Eine solche Gewinnung kann durch Abtupfen nasaler, oraler, rektaler, vaginaler oder auraler Öffnungen, durch Kontaktieren der Haut oder von Tränengängen, durch Gewinnen von Haarfollikeln, usw. erfolgen.

B. Amplifizierung von Zielsequenzen

[0034] Der Nachweis polymorpher Stellen in einer DNA-Probe kann durch die Verwendung von DNA-Amplifizierungsverfahren erleichtert werden. Solche Verfahren erhöhen insbesondere die Konzentration von Sequenzen, welche die polymorphe Stelle überspannen oder welche die Stelle und Sequenzen umfassen, die sich entweder distal oder proximal zu der Stelle befinden. Solche amplifizierten Moleküle können leicht mittels Gelelektrophorese oder einem anderen Mittel nachgewiesen werden.

[0035] Bei dem am meisten bevorzugten Verfahren zum Erreichen einer solchen Amplifizierung wird eine PCR unter Verwendung von Primerpaaren eingesetzt, die an die proximalen Sequenzen hybridisieren können, die einen Polymorphismus in seiner doppelsträngigen Form definieren.

C. Herstellung einer einzelsträngigen DNA

[0036] Die erfindungsgemäßen Verfahren erfordern nicht, dass die Zielnucleinsäure nur einen seiner zwei natürlichen Stränge enthält. Folglich können die erfindungsgemäßen Verfahren entweder mit einzelsträngiger DNA, die z. B. durch Alkalibehandlung erhalten worden ist, oder mit nativer DNA durchgeführt werden. Die Gegenwart des nicht verwendeten Strangs (nicht-Templat-Strang) beeinflusst die Reaktion nicht.

[0037] Gegebenenfalls kann ein beliebiges Verfahren von verschiedenen Verfahren verwendet werden, um einen der beiden natürlichen Strängen des Ziel-DNA-Moleküls aus der Reaktion zu entfernen. Einzelsträngige DNA-Moleküle können unter Verwendung der einzelsträngigen DNA-Bakteriophage M13 (J. Messing et al., *Meth. Enzymol.* 101, 20 (1983); vgl. auch J. Sambrook et al. (in: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)) erzeugt werden.

[0038] Zur Erzeugung einzelsträngiger DNA-Moleküle können mehrere alternative Verfahren verwendet werden. U. Gyllensten et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85, 7652–7656 (1988) und M. Mihovilovic et al. (*BioTechniques* 7 (1), 14 (1989)) beschreiben ein Verfahren, das als „asymmetrische PCR“ bezeichnet wird, bei dem das Standard-„PCR“-Verfahren unter Verwendung von Primern durchgeführt wird, die in verschiedenen molaren Konzentrationen vorliegen. R. G. Higuchi et al. (*Nucleic Acids Res.* 17, 5865 (1985)) beschreiben ein zusätzliches Verfahren zur Erzeugung einzelsträngiger Amplifikationsprodukte. Das Verfahren umfasst die Phosphorylierung der 5'-Endgruppe eines Strangs eines doppelsträngigen Amplifikationsprodukts und dann das bevorzugte Abbauenlassen des phosphorylierten Strangs durch eine 5'→3'-Exonuclease (wie z. B. Exonuclease).

[0039] Andere Verfahren haben auch die nucleasebeständigen Eigenschaften von Phosphorothioat-Derivaten genutzt, um einzelsträngige DNA-Moleküle zu erzeugen (Benkovic et al., US-PS 4,521,509, 4. Juni 1985); J. R. Sayers et al. (*Nucl. Acids Res.* 16, 791–802 (1988)); F. Eckstein et al., *Biochemistry* 15, 1685–1691 (1976); J. Ott et al., *Biochemistry* 26, 8237–8241 (1987)).

[0040] Insbesondere werden solche einzelsträngigen Moleküle unter Verwendung der Verfahren der WO94/16090 beschrieben. In diesen Verfahren werden nucleasebeständige Nucleotidderivate eingesetzt und solche Derivate werden durch chemische Synthese oder durch enzymatische Mittel anstelle von natürlich vorkommenden Nucleotiden in Primermoleküle oder deren Verlängerungsprodukte eingebaut.

[0041] Geeignete Nucleotidderivate umfassen Derivate, in denen eines der beiden nicht-verbrückenden Sauerstoffatome des Phosphatrests eines Nucleotids durch eine Schwefelenthaltende Gruppe (insbesondere ein Phosphorothioat), eine Alkylgruppe (insbesondere eine Methyl- oder Ethyl-Alkylgruppe), eine Stickstoff-enthaltende Gruppe (insbesondere ein Amin), und/oder eine Selen-enthaltende Gruppe ersetzt worden ist. Phosphorothioat-Desoxyribonucleotid- oder -Ribonucleotidderivate (z. B. ein Nucleosid-5'-O-1-thiotriphosphat) sind die am meisten bevorzugten Nucleotidderivate. Zur Erzeugung solcher Phosphorothioatderivate kann ein beliebiges Verfahren aus verschiedenen chemischen Verfahren verwendet werden (vgl. z. B. G. Zon et al., *Anti-Canc. Drug Des.* 6, 539–568 (1991); S. G. Kim et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 1614–1619 (1991); H. Vu et al., *Tetrahedron Lett.* 32, 3005–3008 (1991); J. W. Taylor et al., *Nucl. Acids Res.* 13, 8749–8764 (1985); F. Eckstein et al., *Biochemistry* 15, 1685–1691 (1976); J. Ott et al., *Biochemistry* 26, 8237–8241 (1987); J. Ludwig et al., *J. Org. Chem.* 54, 631–635 (1989), die alle unter Bezugnahme in diese Beschreibung einbezogen sind).

[0042] Es ist wichtig, dass das ausgewählte Nucleotidderivat zur primervermittelten in-vitro-Verlängerung geeignet ist und der Region des Nucleinsäuremoleküls, in das es eingebaut wird, eine Nucleasebeständigkeit verleiht. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform muss es eine Beständigkeit gegenüber Exonucleasen verleihen, die doppelsträngige DNA vom 5'-Ende her angreifen (5' → 3')-Exonucleasen. Beispiele solcher Exonucleasen umfassen Bakteriophage T7-Gen 6-Exonuclease („T7-Exonuclease“) und die Bakteriophage Lambda-Exonuclease („Exonuclease“). Sowohl die T7-Exonuclease als auch die Exonuclease werden in einem signifikanten Maß durch die Gegenwart von Phosphorothioatbindungen gehemmt, so dass der selektive Abbau eines der Stränge ermöglicht wird. Für dieses Verfahren kann jedoch eine beliebige doppelstrangspezifische 5' → 3'-Exonuclease verwendet werden, mit der Maßgabe, dass deren Aktivität durch die Gegenwart der Bindungen der nucleasebeständigen Nucleotidderivate beeinflusst wird. Das bevorzugte Enzym bei der Verwendung von Phosphorothioatderivaten ist die T7-Gen 6-Exonuclease, die eine maximale enzymatische Aktivität in dem gleichen Puffer zeigt, der für viele DNA-abhängige Polymerasepuffer, einschließlich Taq-Polymerase verwendet wird. Die 5' → 3'-Exonuclease-beständigen Eigenschaften von Phosphorothioatderivat-enthaltenen DNA-Molekülen werden z. B. in T. A. Kunkel diskutiert (in: *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Band 2, 124–135 (Hrsg. F. Eckstein et al.), Springer-Verlag, Berlin (1988)). Die 3' → 5'-Exonuclease-beständigen Eigenschaften von Phosphorothioatnucleotid-enthaltenen Nucleinsäuremolekülen sind z. B. in S. D. Putney et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78, 7350–7354 (1981)) und A. P. Gupta et al. (*Nucl. Acids Res.* 12, 5897–5911 (1984)) beschrieben.

D. Immobilisierungsverfahren

[0043] Zur Immobilisierung des Linkers oder des Primeroligonucleotids kann ein beliebiges Verfahren aus einer Vielzahl verschiedener Verfahren verwendet werden. Eines der am gebräuchlichsten verwendeten Verfahren zum Erreichen einer solchen Immobilisierung von Oligonucleotidprimern für eine anschließende Verwendung in Tests auf Hybridisierungsbasis besteht aus dem nicht-kovalenten Beschichten dieser Festphasen mit Streptavidin oder Avidin und der anschließenden Immobilisierung biotinylierter Oligonucleotide (K. Holmstrom et al., *Anal. Biochem.* 209, 278–283 (1993)). Ein weiteres neueres Verfahren (J. A. Running et al., *Bio-Techniques* 8, 276–277 (1990); C. R. Newton et al., *Nucl. Acids Res.* 21, 1155–1162 (1993)) erfordert das Vorbeschichten der Polystyrol- oder Glasfestphasen mit poly-L-Lys oder poly-L-Lys, Phe und anschließend das kovalente Binden entweder Amino- oder Sulfhydrylmodifizierter Oligonucleotide unter Verwendung bifunktionaler Vernetzungsmittel. Beide Verfahren haben den Nachteil, dass sie die Verwendung modifizierter Oligonucleotide sowie eine Vorbehandlung der Festphase erfordern.

[0044] In einem anderen veröffentlichten Verfahren (S. Kawai et al., *Anal. Biochem.* 209, 63–69 (1993)) wurden kurze Oligonucleotidsonden zur Bildung von Multimeren zusammenligiert und diese wurden in einen Phagemidvektor ligiert. Nach der in-vitro-Amplifizierung und Isolierung der einzelsträngigen Form dieser Phagemide wurden sie auf Polystyrolplatten immobilisiert und durch UV-Bestrahlung bei 254 nm fixiert. Die auf diese Weise immobilisierten Sonden wurden dann zum Einfangen und Nachweisen eines biotinylierten PCR-Produkts verwendet.

[0045] Ein Verfahren zur direkten kovalenten Bindung kurzer 5'-phosphorylierter Primer an chemisch modifizierte Polystyrolplatten („Covalink“-Platten, Nunc) wurde ebenfalls veröffentlicht (S. R. Rasmussen et al., *Anal. Biochem.* 198, 138–142 (1991)). Die kovalente Bindung zwischen dem modifizierten Oligonucleotid und der Festphasenoberfläche wird durch Kondensieren mit einem wasserlöslichen Carbodiimid eingeführt. Von diesem Verfahren wird behauptet, dass es eine vorwiegende 5'-Bindung der Oligonucleotide über ihre 5'-Phosphatreste sicherstellt. Es erfordert jedoch die Verwendung speziell hergestellter teurer Platten.

[0046] Insbesondere wird die Immobilisierung der erfindungsgemäßen Oligonucleotide unter Verwendung eines Verfahrens erreicht, das direkt ohne das Erfordernis einer Vorbehandlung käuflicher Polystyrol-Mikrowellplatten (ELISA-Platten) oder Mikroskop-Glasträger direkt eingesetzt werden kann. Da 96-Well-Polystyrolplatten in ELISA-Tests verbreitet verwendet werden, bestand ein signifikantes Interesse zur Entwicklung von Verfahren für die Immobilisierung kurzer Oligonucleotidprimer an den Wells dieser Platten für anschließende Hybridisierungstests. Ebenfalls von Interesse ist ein Verfahren zur Immobilisierung an Mikroskop-Glasträgern, da die letztgenannten Träger in dem so genannten immunenzymatischen Trägertest (SIA) verwendet werden (E. C. de Macario et al., *BioTechniques* 3, 138–145 (1985)).

[0047] Der Träger kann aus Glas, Kunststoff, Papier, usw., bestehen. Der Träger kann in Form von Kugeln, als Eintauchstab, Reagenzglas oder in vielen anderen Formen vorliegen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Träger eine Mikrotiterplatte mit einer Mehrzahl von Wells. Die in diagnostischen Laboratorien und in der Gewebekultivierung verwendeten herkömmlichen 96-Well-Mikrotiterplatten sind ein bevorzugter Träger. Die Verwendung eines solchen Trägers ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung einer großen Anzahl von Proben und Kontrollen und erleichtert somit die Analyse. Zur Bereitstellung von Reagenzien für solche Mikrotiterplatten können automatisierte Abgabesysteme verwendet werden. Entsprechend können zur Analyse der polymorphen Stellen spektrophotometrische Verfahren eingesetzt werden und eine solche Analyse kann unter Verwendung automatisierter Spektrophotometer durchgeführt werden.

[0048] Erfindungsgemäß kann für die Immobilisierung eine beliebige Polystyrolplatte einer Vielzahl käuflicher Polystyrolplatten direkt verwendet werden, mit der Maßgabe, dass sie eine hydrophile Oberfläche aufweisen. Beispiele für geeignete Platten umfassen die Imulon 4-Platten (Dynatech) und die Maxisorp-Platten (Nunc).

[0049] Die Immobilisierung der Oligonucleotide an den Platten wird einfach durch Inkubieren in Gegenwart eines geeigneten Salzes durchgeführt. In Abwesenheit eines Salzes findet keine Immobilisierung statt, d. h. wenn das Oligonucleotid in einer Wasserlösung vorliegt. Beispiele für geeignete Salze sind: 50 bis 250 mM NaCl; 30 bis 100 mM 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC), pH 6,8; 50 bis 100 mM Octyldimethylamin-hydrochlorid, pH 7,0; 50 bis 250 mM Tetramethylammoniumchlorid. Die Immobilisierung wird durch Inkubieren durchgeführt, vorzugsweise 3 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur. Nach einer solchen Inkubation werden die Platten gewaschen, vorzugsweise mit einer Lösung von 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, die 150 mM NaCl und 0,05 Vol.-% Tween 20 (TNTw) enthält. Der letztgenannte Bestandteil spielt die wichtige Rolle des Blockierens aller freien Oligonucleotid-Bindungsstellen, die nach wie vor auf der Polystyroloberfläche vorliegen, so dass kein unspezifisches Binden von Oligonucleotiden während der anschließenden Hybridisierungsschritte stattfinden kann. Unter Verwendung radioaktiv markierter Oligonucleotide wurde die Menge an immobilisierten Oligonucleotiden pro Well zu mindestens 500 fmol bestimmt. Die Oligonucleotide werden an der Oberfläche der Platte mit ausreichender Stabilität immobilisiert und können nur durch längere Inkubationen mit 0,5 M NaOH-Lösungen bei erhöhten Temperaturen entfernt werden. Durch Waschen der Platte mit Wasser, TNTw (Tween 20), PBS, 1,5 M NaCl oder anderen ähnlichen Lösungen wird kein Oligonucleotid entfernt.

[0050] Dieses Bindungsverfahren ist extrem einfach, funktioniert mit jedem Oligonucleotid und bewahrt das Vermögen des Oligonucleotids, an seine komplementäre Sequenz zu hybridisieren. Zusätzlich zu den Mikrotitertplatten können die Oligonucleotide auf Miniaturformaten wie z. B. Mikroskopträger und Siliziumchips immobilisiert werden. Die Oligonucleotide können auf diese Formate unter Verwendung von Technologien wie z. B. Tintenstrahldrucken oder Photolithographie auch in spezifischen Mustern aufgebracht werden. Die Erfassung der Muster in diesen Miniaturformaten kann durch optische Techniken unter Verwendung von fluoreszierend markierten Nucleotiden oder Oligonucleotiden und Geräten wie z. B. Fluoreszenzmikroskopen erreicht werden.

E. Reaktionskomponenten und -bedingungen

[0051] In der am meisten bevorzugten Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung einen Test mit heterogener Phase, bei dem ein Oligonucleotid an einem Träger immobilisiert ist. Es können drei bevorzugte Variationen oder Formate eingesetzt werden, die alle gleich gut arbeiten. Dabei handelt es sich um: a) Die Verwendung eines markierten dNTP mit einem unmarkierten Linker-Oligonucleotid und einem unmarkierten Primer-Oligonucleotid (**Fig. 1**); b) die Verwendung eines markierten Primer-Oligonucleotids mit einem unmarkierten Linker-Oligonucleotid und keinen markierten dNTP's (**Fig. 2**); c) die Verwendung eines markierten Linker-Oligonucleotids mit einem unmarkierten Primer-Oligonucleotid und keinen markierten dNTP's (**Fig. 3**). Die Reihenfolge der Oligonucleotide kann variiert werden, jedoch ist die Verlängerungsrichtung immer 3' nach 5', wie es durch die Polymerase bestimmt wird. Die Hybridisierung, Verlängerung und Ligation können auch in Lösung und mit den auf einer Festphase zum Nachweis gebundenen ligierten Oligonucleotiden durchgeführt werden (**Fig. 4**).

[0052] Das immobilisierte Oligonucleotid weist eine Länge auf, die ausreichend ist, so dass das Molekül stabil und spezifisch an ein komplementäres Molekül hybridisiert. Der Ausdruck „stabile“ Hybridisierung, wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf eine Hybridisierung, die eine T_m aufweist, die höher ist als die Temperatur, bei welcher der Ermittlungstest durchgeführt wird (im Allgemeinen 20 bis 40°C). Der Begriff „spezifische“ Hybridisierung gibt an, dass die Länge und/oder die Sequenzkomplexität der an der Hybridisierung beteiligten Oligonucleotide ausreichend ist bzw. sind, um eine unerwünschte falsche Hybridisierung auszuschließen, die z. B. zwischen Sequenzen auftreten kann, die nur partiell komplementär sind. Die Hybridisierung wird gewöhnlich 15 bis 30 min bei Raumtemperatur in einer Lösung durchgeführt, die 1,5 M NaCl und 10 mM EDTA enthält. Alternativ können andere Hybridisierungsbedingungen eingesetzt werden. Die Sequenz des immobilisierten Oligonucleotids wird so ausgewählt, dass sie an die Invariante Sequenz hybridisieren wird, welche die polymorphe Stelle des Polymorphismus flankiert, der ermittelt werden soll.

[0053] In der bevorzugten Ausführungsform ist das immobilisierte Oligonucleotid der Linker, der mit seinem 3'-Ende an dem Träger gebunden ist. Das Linker-Oligonucleotid in dieser Ausführungsform wirkt zum Verbinden (nach der Verlängerung und der Ligation) des eingebauten Nucleotids und des Primer-Oligonucleotids an die Festphase.

[0054] Die Reaktion wird dann in Gegenwart sowohl der Zielsequenz (welche den Polymorphismus enthält) als auch eines zweiten Oligonucleotids durchgeführt, dessen Sequenz derart ausgewählt ist, dass dann, wenn das immobilisierte Oligonucleotid und das zweite Oligonucleotid beide an das gleiche Zielmolekül hybridisiert sind, die 3'-Endgruppe des Primer-Oligonucleotids und die 5'-Endgruppe des Linker-Oligonucleotids durch einen „Zwischenraum“ einer einzelnen Base getrennt sind, die genau gegenüber der variablen Nucleotidstelle X des Polymorphismus angeordnet ist.

[0055] Ein markiertes 2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat von DNA wird der Reaktion zusammen mit drei unmarkierten ddNTP's zugesetzt. Dies ermöglicht es, dass alle drei Primermoleküle in der Reaktion verlängert und ligiert werden. Die unmarkierten Nucleosidtriphosphate sind Didesoxynucleosidtriphosphate, so dass der Einbau von mehr als eines einzelnen Nucleotids in die Endgruppe des Primers verhindert und auch potentiell eine Strangverschiebung verhindert wird. Dies unterscheidet sich von GBATM, da GBATM während der Verlängerung ddNTP anstelle von dNTP in den Primer einbaut.

[0056] In der Reaktion liegt eine Polymerase vor und die Reaktionsbedingungen werden so aufrechterhalten, dass die 3'-Endgruppe des Primer-Oligonucleotids um ein einzelnes Nucleotid verlängert wird (d. h. das Nucleotid gegenüber der variablen Stelle des Polymorphismus).

[0057] Die gewünschte Primerverlängerung wird nur stattfinden, wenn das zweite Oligonucleotid richtig an das Zielmolekül hybridisiert hat. Die Verlängerung des hybridisierten Primer-Oligonucleotids „füllt“ den Zwischenraum und ermöglicht daher, dass der Linker und die Primer-Oligonucleotide aneinander ligiert werden.

[0058] Die Gegenwart einer Ligase in der Reaktion verbindet die angrenzenden Oligonucleotide. Es können verschiedene Ligasen verwendet werden, einschließlich T4-DNA-Ligase, E. coli-DNA-Ligase, thermostabile DNA-Ligase und RNA-Ligase. Nach der Ligation wird das Reaktionsgefäß gewaschen oder in sonstiger Weise behandelt, so dass die Entfernung jeglicher Nucleinsäure, die nicht an den Träger gebunden ist, bewirkt wird. Es sollte beachtet werden, dass ein ligierbares Substrat nur dann gebildet wird, wenn das Zielmolekül tatsäch-

lich sowohl an das erste als auch an das zweite Oligonucleotid hybridisiert worden ist, und wenn das zweite Oligonucleotid durch die Polymerase in geeigneter Weise verlängert worden ist. Eine solche Ligation führt zur Immobilisierung des vorher nicht gebundenen Primer-Oligonucleotids. Folglich wird das Primer-Oligonucleotid mit einem markierten Nucleotid verlängert und es ergibt sich eine Immobilisierung des Markers.

[0059] Es ist signifikant, dass eine solche Immobilisierung von dem Einbau des komplementären Nucleosids gegenüber der polymorphen Stelle X abhängt. Folglich zeigt die Immobilisierung des Markers, dass das der Reaktion zugesetzte Nucleosidtriphosphat zu dem variablen Nucleosidtriphosphat der polymorphen Stelle komplementär war. In der bevorzugten Ausführungsform bildet sich dann, wenn nur das Linker-Oligonucleotid an ein bestimmtes Zielmolekül hybridisiert hat, kein ligierbares Substrat, und der Marker (des Nucleotids) wird nicht immobilisiert. Entsprechend wird in der bevorzugten Ausführungsform dann, wenn nur das Primer-Oligonucleotid an das Zielmolekül hybridisiert hat, keine Immobilisierung stattfinden, und das markierte Molekül wird beim Waschen verloren gehen.

[0060] In einer zweiten Ausführungsform ist das immobilisierte Oligonucleotid der Linker und mit seinem 3'-Ende an den Träger gebunden. Die Reaktion wird wie vorstehend beschrieben durchgeführt, jedoch befindet sich der Marker am 5'-Ende des Primer-Oligonucleotids (**Fig. 2**).

[0061] In einer dritten Ausführungsform ist das immobilisierte Oligonucleotid der Primer und mit seinem 5'-Ende an den Träger gebunden. Die Reaktion wird wie vorstehend beschrieben durchgeführt, jedoch befindet sich der Marker am 3'-Ende des Linker-Oligonucleotids (**Fig. 3**).

[0062] In einer vierten Ausführungsform können die Hybridisierung, die Verlängerung und die Ligation in Lösung und mit den zum Nachweis an einer Festphase gebundenen ligierten Oligonucleotiden durchgeführt werden (**Fig. 4**).

[0063] In einer fünften Ausführungsform können die Hybridisierung, die Verlängerung und die Ligation in Lösung durchgeführt werden und die ligierten Oligonucleotide können in Lösung nachgewiesen werden.

[0064] Entsprechend den erfindungsgemäßen Verfahren können beliebige der herkömmlich verwendeten Radioisotopen-, Enzym-, Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzmarker eingesetzt werden. Anstelle solcher Marker können Haptenmarker wie z. B. Biotin oder andere Marker wie z. B. Liganden, Antigene, usw., verwendet werden. Geeignete Marker sind z. B. von Kourilsky et al. (US-PS 4,581,333), Albarella et al. (EP 144 914), Sheldon III et al. (US-PS 4,582,789), Albarella et al. (US-PS 4,563,417) und Miyoshi et al. (EP 119 448) beschrieben worden.

[0065] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Reaktion ein einzelnes markiertes Nucleosidtriphosphat und drei unmarkierte Nucleosidtriphosphate enthalten. Wenn das markierte Nucleosid zu dem Nucleotid der vorausgewählten Stelle komplementär ist, dann wird dies gemäß den vorstehend genannten Verfahren zur Immobilisierung des zweiten Primer-Oligonucleotids führen. Folglich wird die Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle durch Nachweisen der Retention des Markers auf dem Träger nach dem Waschen bestimmt.

[0066] Das erfindungsgemäße Ligase/Polymerase-vermittelte Polymorphismus-Ermittlungsverfahren ist eine Verbesserung des vorstehend diskutierten GBATM-Verfahrens. Etwa 15 bis 20 % der GBATM-Primer bewirken den Einbau bestimmter ddNTP's selbst in der Abwesenheit eines Templats (Templat-unabhängiges Rauschen). Dieses Templat-unabhängige Rauschen ist auf die Gegenwart von selbstkomplementären Sequenzen innerhalb der Primermoleküle zurückzuführen, die durch die Polymerase verlängert werden können. Diese Templatunabhängige Verlängerung wird in der Gegenwart eines Templats vermindert und kann auf zwei verschiedene Arten minimiert werden. Erstens kann die Base, die als Templat wirkt und für den Einbau eines spezifischen ddNTP's verantwortlich ist, durch eine andere Base ersetzt werden, so dass die Templat-unabhängige Verlängerung durch eine Base bewirkt wird, welche die Typisierung der Polymorphismen nicht stört. Dies ist mit diallelischen Stellen möglich. Zweitens kann die spezielle Base innerhalb des Primers durch einen 1,3-Propandiol-Linker mit einer Anti-Base-Wirkung ersetzt werden, der verhindert, dass die Polymerase durch eine beliebige Base verlängert wird. Obwohl GBATM genaue Ergebnisse liefert, wäre ein Verfahren erwünscht, das in einem geringeren Ausmaß einem Templatunabhängigen Einbau unterliegen würde.

[0067] GBATM kann auch ein Templat-abhängiges Rauschen aufweisen, bei dem es sich um den Einbau eines Nucleotids in den GBATM-Primer handelt, das zu dem Nucleotid der polymorphen Stelle nicht komplementär ist. Ein Templat-abhängiges Rauschen kann durch mehrere Faktoren verursacht werden. Erstens kann der GBATM-Primer unspezifisch hybridisieren, wodurch der Einbau eines markierten ddNTP an einer irrelevanten Position bewirkt wird. Zweitens kann der GBATM-Primer richtig hybridisieren, jedoch kann sein 3'-Ende während des Polymeraseverlängerungsschritts um einige Basen entlang des Templats gleiten und erneut den Einbau einer irrelevanten Base bewirken. Drittens ist es selbst dann, wenn die vorstehend genannten Ursachen ausgeschlossen werden, möglich, dass die Polymerase eine relativ hohe Fehleinbaurate aufweist. Es wird erwartet, dass diese Rate mit den unnatürlich markierten ddNTP's, die in dem Verlängerungsschritt verwendet werden, höher ist als bei den natürlichen dNTP-Substraten.

II. Verwendung einer Ligase/Polymerase-vermittelten Ermittlung von SNP's in der genetischen Analyse

A. Allgemeine Erwägungen zur Verwendung von Einzelnucleotidpolymorphismen in der genetischen Analyse

[0068] Die Eignung der polymorphen Stellen der vorliegenden Erfindung ist auf die Fähigkeit zurückzuführen, solche Stellen zur Vorhersage der statistischen Wahrscheinlichkeit zu verwenden, dass zwei Individuen die gleichen Allele für einen gegebenen Polymorphismus aufweisen.

[0069] Eine solche statistische Analyse kann für einen beliebigen Zweck einer Vielzahl von Zwecken eingesetzt werden. Wenn ein bestimmtes Tier im Vorhinein getestet worden ist, dann kann ein solcher Test als „Fingerabdruck“ verwendet werden, mit dem bestimmt werden kann, ob ein bestimmtes Tier genau dieses Tier ist oder nicht. Wenn ein mutmaßlicher Elternteil oder beide Elternteile eines Individuums getestet worden sind, können die erfindungsgemäßen Verfahren zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit verwendet werden, dass ein bestimmtes Tier der Nachkomme eines solchen Elternteils oder der beiden Elternteile ist oder nicht. Folglich können der Nachweis und die Analyse von SNP's zum Ausschluss der Vaterschaft eines männlichen Individuums für ein bestimmtes Individuum (wie z. B. die Vaterschaft eines Hengstes für ein bestimmtes Fohlen) oder zur Bewertung der Wahrscheinlichkeit verwendet werden, dass ein bestimmtes Individuum der Nachkomme eines ausgewählten weiblichen Individuums ist (z. B. ein bestimmtes Fohlen und eine ausgewählte Stute).

[0070] Die Polymorphismen, die in einem Satz von Individuen der gleichen Art (wie z. B. Menschen, Pferde, usw.) oder nahe verwandter Arten nachgewiesen worden sind, können analysiert werden, um zu bestimmen, ob die Gegenwart oder die Abwesenheit eines bestimmten Polymorphismus mit einem bestimmten Merkmal korreliert.

[0071] Zur Durchführung einer solchen Polymorphismusanalyse wird die Gegenwart oder Abwesenheit eines Satzes von Polymorphismen (d. h. eine „polymorphe Gruppierung“) für einen Satz der Individuen bestimmt, von denen einige ein bestimmtes Merkmal und einige sich gegenseitig ausschließende Eigenschaften aufweisen (beispielsweise bezüglich Pferden brüchige Knochen gegen nicht-brüchige Knochen; Altersblindheit gegen fehlende Blindheit; Veranlagung für Asthma oder kardiovaskuläre Erkrankungen gegen eine diesbezüglich fehlende Veranlagung). Die Allele jedes Polymorphismus des Satzes werden dann untersucht, um zu bestimmen, ob die Gegenwart oder Abwesenheit eines bestimmten Allels mit dem bestimmten interessierenden Merkmal verbunden ist. Jegliche derartige Korrelation definiert eine genetische Karte der Art des Individuums. Allele, die bezüglich eines Merkmals nicht statistisch segregieren, können zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit verwendet werden, dass ein bestimmtes Tier diese Eigenschaft exprimieren wird. Beispielsweise dann, wenn ein bestimmtes polymorphes Allel in nur 20% der Mitglieder einer Art vorliegt, die einen kardiovaskulären Zustand aufweisen, dann würde ein bestimmtes Mitglied dieser Art, das dieses Allel enthält, eine 20%ige Wahrscheinlichkeit aufweisen, einen solchen kardiovaskulären Zustand zu zeigen. Wie es bereits erwähnt worden ist, wird das Vorhersagevermögen der Analyse durch das Ausmaß der Verbindung zwischen einem bestimmten polymorphen Allel und einer bestimmten Eigenschaft erhöht. Entsprechend kann das Vorhersagevermögen der Analyse durch gleichzeitiges Analysieren der Allele mehrfach polymorpher Stellen und eines bestimmten Merkmals erhöht werden. Wenn in dem vorstehenden Beispiel gefunden wird, dass ein zweites polymorphes Allel auch in 20% der Mitglieder vorliegt, die den kardiovaskulären Zustand zeigen, jedoch alle bewerteten Mitglieder, die einen solchen kardiovaskulären Zustand zeigen, eine bestimmte Kombination von Allelen für diesen ersten und zweiten Polymorphismus aufweisen, dann hätte ein bestimmtes Mitglied, das beide Allele enthält, eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit, dass es den kardiovaskulären Zustand aufweist.

[0072] Durch den Nachweis mehrfach polymorpher Stellen kann die Frequenz definiert werden, mit der solche Stellen in einer Population unabhängig segregieren. Wenn beispielsweise zwei polymorphe Stellen statistisch segregieren, dann befinden sie sich entweder auf getrennten Chromosomen oder sie sind auf dem gleichen Chromosom voneinander beabstandet. Umgekehrt sind zwei polymorphe Stellen, die mit einer signifikanten Frequenz gemeinsam vererbt werden, auf dem gleichen Chromosom miteinander verbunden. Eine Analyse der Frequenz der Segregation ermöglicht somit die Erstellung einer genetischen Karte von Markern.

[0073] Die vorliegende Erfindung erleichtert den Aufbau einer genetischen Karte einer Zielspezies. Folglich kann eine bestimmte Gruppierung von Polymorphismen mit einem bestimmten Merkmal korreliert werden, um die Veranlagung eines bestimmten Tiers (oder einer bestimmten Pflanze) für eine solche genetische Erkrankung, einen solchen genetischen Zustand oder ein solches genetisches Merkmal vorherzusagen. Der Begriff „Merkmal“, wie er hier verwendet wird, soll „genetische Erkrankung“, „Zustand“ oder „Eigenschaft“ umfassen. Der Ausdruck „genetische Erkrankung“ bezeichnet einen physiologischen Zustand, der durch eine Mutation verursacht worden ist, und zwar unabhängig davon, ob der Zustand nachgewiesen werden kann oder symptomlos ist. Ein „Zustand“ bezeichnet eine Veranlagung für eine Eigenschaft (wie z. B. Asthma, schwache Knochen, Blindheit, Geschwüre, Krebs, Herzerkrankungen oder kardiovaskuläre Erkrankungen, Skelett-Muskel-Defekte, usw.). Eine „Eigenschaft“ ist ein Merkmal, das einem Tier oder einer Pflanze einen wirtschaftlichen Wert verleiht. Beispiele für Eigenschaften umfassen Langlebigkeit, Schnelligkeit, Ausdauer, Geschwindigkeit der Alterung, Fruchtbarkeit, usw.

[0074] Die Auflösung einer genetischen Karte ist proportional zu der Anzahl von Markern, die sie enthält. Da die erfindungsgemäßen Verfahren zur Isolierung einer großen Anzahl von polymorphen Stellen verwendet werden können, können sie zur Erzeugung einer Karte mit einem gewünschten Auflösungsgrad verwendet werden.

[0075] Die Sequenzierung der polymorphen Stellen erhöht deren Nutzen bei der Genkartierung sehr stark. Solche Sequenzen können verwendet werden, um Oligonucleotidprimer und -sonden zu gestalten, die verwendet werden können, um entlang des Chromosoms zu „wandern“ und dadurch neue Markerstellen zu identifizieren (W. Bender et al., J. Supra. Molec. Struc. 10 (Ergänzung) 32 (1979); A. C. Chinault et al., Gene 5, 111–126 (1979); L. Clarke et al., Nature 287, 504–509 (1980)).

[0076] Die Auflösung der Karte kann durch Kombinieren von Polymorphismusanalysen mit Daten über den Phänotyp anderer Merkmale der Pflanze oder des Tiers weiter erhöht werden, deren bzw. dessen Genom kartiert wird. Wenn folglich ein bestimmter Polymorphismus mit brauner Haarfarbe segregiert, dann liegt dieser Polymorphismus an einer Stelle in der Nähe des Gens oder der Gene, die für die Haarfarbe verantwortlich sind. Entsprechend können biochemische Daten verwendet werden, um die Auflösung der genetischen Karte zu erhöhen. In dieser Ausführungsform wird eine biochemische Bestimmung (wie z. B. des Serotyps, der Isoform, usw.) studiert, um zu bestimmen, ob sie zusammen mit einer beliebigen polymorphen Stelle segregiert. Solche Karten können zur Identifizierung neuer Gensequenzen verwendet werden, um beispielsweise die für eine Erkrankung kausalen Mutationen zu identifizieren.

[0077] Tatsächlich ermöglicht die Identifizierung der SNP's der vorliegenden Erfindung die Verwendung komplementärer Oligonucleotide als Primer in der PCR oder anderen Reaktionen zur Isolierung und Sequenzierung neuer Gensequenzen, die sich auf jeder Seite des SNP befinden. Die Erfindung umfasst solche neuen Gensequenzen. Die Genomsequenzen, die durch die Verwendung solcher Primer klonal isoliert werden können, können in RNA transkribiert und als Protein exprimiert werden. Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein solches Protein sowie Antikörper und andere bindende Moleküle, die an ein solches Protein binden können.

[0078] Zusätzlich zur Identifizierung der SNP's makroskopischer Pflanzen und Tiere sollte das vorliegende Verfahren auch zur Genotypisierung von Mikroorganismen geeignet sein. Ein Beispiel wäre die Typisierung des menschlichen Immunschwächevirus Typ 1 (HIV-1) und HIV-2. Die schnelle Typisierung von HIV infizierter Patienten könnte eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Überwachung potenzieller Impfstoffe spielen, da bestimmte Impfstoffe nur gegen spezifische HIV-Stämme wirksam sein können. Die HIV-Typisierung kann auch bei der Überwachung therapeutischer Versuche und bei der Einteilung bestimmter Patienten für eine potenzielle Behandlung wichtig sein. Ein weiteres Beispiel eines Virus, der eine schnelle Typisierung erfordert, ist der Hepatitis C-Virus (HCV), um seine Quelle zu ermitteln, den Verlauf von HCV-Erkrankungen vorauszusagen und eine geeignete Behandlung zu bestimmen. Ein Beispiel einer bakteriellen Genotypisierung ist die Typisierung von Mycobakterium tuberculosis-Stämmen für epidemiologische Studien, um sie von Mycobacterium bovis zu unterscheiden und Mehrfach-Arzneistoff-resistente Stämme schnell nachzuweisen.

[0079] Die Erfindung wird nachstehend bezüglich einer ihrer Ausführungsformen veranschaulicht, und zwar der Pferdegenetik und der mit Pferden zusammenhängenden Genetik. Da die fundamentalen Prinzipien der Genetik ungeachtet der Art gelten, ist diese Veranschaulichung auch auf beliebige andere Arten, einschließlich den Menschen, anwendbar. Der Fachmann muss deshalb nur die Verfahren der vorliegenden Erfindung direkt zur Analyse von SNP's in einer beliebigen anderen Art anwenden und dadurch die erfindungsgemäße genetische Analyse durchführen.

[0080] Nachdem die Erfindung allgemein beschrieben worden ist, wird die Erfindung durch Bezugnahme auf die folgenden Beispiele der Isolierung und Analyse von Pferdepolymorphismen besser verständlich, die lediglich der Veranschaulichung dienen und nicht beschränkend aufzufassen sind.

Beispiel 1

Analyse eines Pferdepolymorphismus unter Verwendung markierter dNTP's und unmarkierter ddNTP's

[0081] Zur Ermittlung eines Pferde-Einzelnucleotidpolymorphismus wurden die folgenden Oligonucleotide verwendet (p bezeichnet eine Phosphatgruppe):

#1654 SEQ ID NO:1 5'-GTGGAGATCACAGACTGAAATATTG-p

#1112 SEQ ID NO:2 AGTATAATAATCACAGTATGTTAGC

#1214 SEQ ID NO:3 ACCTTCAAAACTCAACTCAGCTCTT

#1215 SEQ ID NO:4 TTTACCAATGAGAAGGACATCTAAG

[0082] Die Oligonucleotide #1654 und #1112 wurden in dem Festphasen-Verlängerungs/Ligationstest verwendet. Die Oligonucleotide #1214 und #1215 waren die PCR-Primer, die zur Amplifizierung des gewünschten Fragments der genomischen Pferde-DNA verwendet wurden. Der PCR-Primer #1214 wurde an seinem 5'-Ende durch die Einführung von vier Phosphorothioatbindungen modifiziert. Dies diente zum Schutz eines der Stränge des doppelsträngigen PCR-Produkts vor einer Hydrolyse durch T7-Gen 6-Exonuclease. Die Phosphorothioatbindungen befinden sich zwischen den unterstrichenen Resten der Sequenz.

PCR-Amplifizierung

[0083] Genomische Pferde-DNA war die DNA-Quelle in der PCR-Amplifizierungsreaktion. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Endkonzentration der PCR-Primer war 0,5 µM. Nach einem anfänglichen zweiminütigen Denaturierungsschritt bei 95°C wurden 35 Zyklen durchgeführt, die jeweils aus einer Denaturierung (1 min bei 95°C), einer Hybridisierung (2 min bei 60°C) und einer Verlängerung (3 min bei 72°C) bestanden. Taq-DNA-Polymerase wurde von Perkin-Elmer bezogen und in einer Konzentration von 0,025 u/µl verwendet. Die Endzusammensetzung des PCR-Puffers war: 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 und 200 µg/ml BSA.

Herstellung einzelsträngiger PCR-Produkte

[0084] Um einen der Stränge des doppelsträngigen PCR-Produkts vor einer Exonucleasehydrolyse zu schützen, wurden während der Synthese am 5'-Ende eines der PCR-Primer (#1214) vier Phosphorothioatbindungen eingeführt. Zur Erzeugung eines einzelsträngigen PCR-Produkts wurde der PCR-Reaktion nach der PCR-Amplifizierung T7-Gen 6-Exonuclease bis zu einer Endkonzentration von 2 Einheiten/µl zugesetzt. Die Inkubation wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die T7-Gen 6-Exonuclease stammte von USB und wurde in einem vom Hersteller empfohlenen Puffer verdünnt.

Hybridisierung einzelsträngiger PCR-Fragmente an Oligonucleotide die in Mikrotiterplatten immobilisiert sind

[0085] Nach der Exonucleasebehandlung wurde dem Reaktionsgemisch ein gleiches Volumen an 3 M NaCl, 20 mM EDTA zugesetzt und 20 µl-Aliquots der resultierenden Lösung wurden in einzelne Wells überführt, die das immobilisierte Oligonucleotid #1654 enthielten. Der Hybridisierungslösung wurden 1,5 pmol des Oligonucleotidprimers #1112 zugesetzt. Die Hybridisierung wurde 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt, worauf mit TNTw gewaschen wurde.

Verlängerungs/Ligationsreaktion

[0086] Das Verlängerungs/Ligationsgemisch hatte die folgende Zusammensetzung: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 25 mM NaCl; 1 mM ATP; 0,65 Einheiten/Well Sequenase und 0,4 Einheiten/Well T4-DNA-Ligase. Darüber hinaus enthielten einige der Wells 30 µM Biotin-14-dCTP (von GIBCO-BRL bezogen) und jeweils 30 µM der anderen ddNTP's. Andere Wells enthielten 30 µM Biotin-dCTP (GIBCO-BRL) und jeweils 30 µM der anderen ddNTP's. Die Verlängerungs/Ligationsreaktion wurde dann 15 min bei Raumtemperatur ablaufen gelassen und anschließend wurden die Wells mit 0,1 N NaOH gewaschen, um alle Moleküle zu entfernen, die nicht kovalent an das immobilisierte Oligonucleotid gebunden waren. Die Wells wurden anschließend mit einer 1 : 1200-Verdünnung von Antibiotin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Vector-Laboratories) in TNTw, das 1% BSA enthielt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde sechsmal mit TNTw gewaschen und anschließend wurde eine Lösung von 0,1 M Zitratpuffer, pH 4,5, zugesetzt, die 1 mg/ml o-Phenylendiamin (OPD) und 0,012% H₂O₂ enthielt. Die Platte wurde sofort in einem Plattenlesegerät ausgelesen und die Farbentwicklung wurde 2 min bei 450 nm verfolgt. Die Ergebnisse (ausgedrückt als mOD/min), die für drei verschiedene Pferde erhalten wurden, sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

Pferd Nr.	A-Signal	C-Signal	T-Signal
1534	0,4	382,1	1,7
866	0,3	302,0	96,8
527	0,2	0,9	161,9
keine DNA	0,3	0,5	0,3

[0087] Die Ergebnisse in der Tabelle 1 zeigen, dass für diese polymorphe Stelle das Pferd #1534 ein C-Homozygot, das Pferd #866 ein CT-Heterozygot und das Pferd #527 ein T-Homozygot ist.

Beispiel 2

Ligase/Polymerase-vermittelte genetische BitTM-Analyse eines Einzelnucleotidpolymorphismus unter Verwendung unmarkierter dNTP's, ddNTP's und eines markierten Oligonucleotid-Linkermoleküls

[0088] Es wurden folgende Oligonucleotide verwendet (FI bezeichnet einen Fluoresceinrest):

#1401 SEQ ID NO:5 5'-TTCTCCAGTGGCACAGTAAAATT-FI-G

#713-1 SEQ ID NO:6 5'-GCTTCTACATTCATTTTCTTGTCT

**#1376 SEQ ID NO:7 5'-AATTTTACTGTGCCACTGGGAGAACA
GAACAAGAAAATGAATGTAGAAGC**

[0089] In diesem Experiment wurde das Oligonucleotid #1376 als synthetisches Templat verwendet, das sowohl an den Oligonucleotid-Primer #713-1 als auch an das markierte Linkermolekül #1401 hybridisieren soll. Die unterstrichene Base in der Sequenz von #1376 dient als Einzelnucleotidpolymorphismus-Modell.

[0090] Der Oligonucleotid-Primer #713-1 wurde in den Wells einer 96-Well-Polystyrolplatte (Immulon 4, Dynatech) immobilisiert. Er wurde an das synthetische Templatmolekül #1376 in Gegenwart des markierten Oligonucleotids #1401 hybridisiert. Es wurden die folgenden Mengen an #1376 verwendet: 250 und 500 fmol pro Well. Das Oligonucleotid #1401 wurde im Überschuss (1,5 pmol pro Well) verwendet. Die Hybridisierung wurde so durchgeführt, wie es vorstehend im Beispiel 1 beschrieben worden ist. Die Platte wurde gewaschen und die Verlängerungs/Ligationsreaktion wurde wie vorstehend beschrieben durchgeführt, jedoch ausschließlich in Gegenwart unmarkierter Nucleotide, und zwar alle bei einer Konzentration von 30 µM. Die folgenden vier Nucleotidgemische wurden verwendet: dATP plus ddGTP, ddCTP und ddTTP; dCTP plus ddATP, ddGTP und ddTTP; dGTP plus ddATP, ddCTP und ddTTP; und dTTP plus ddATP, ddGTP und ddCTP. Nach der Verlängerungs/Ligationsreaktion wurde die Platte mit 0,1 N NaOH gewaschen, um alle Moleküle zu entfernen, die nicht kovalent an das immobilisierte Oligonucleotid gebunden sind. Die Gegenwart von Fluorescein in den Wells wurde dann unter Verwendung eines Antifluorescein-Meerrettichperoxidase-Konjugats (DuPont) bei einer Verdünnung von 1 : 500 in TNTw, das 1% BSA enthielt, 30 min bei Raumtemperatur nachgewiesen. Der Enzymnachweis wurde so durchgeführt, wie es im Beispiel 1 beschrieben ist. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2

Templat	A-Signal	C-Signal	G-Signal	T-Signal
250 fmol	25,0	26,5	185,3	23,5
500 fmol	50,0	43,5	380,6	42,6

[0091] Als Kontrolle wurde eine entsprechende Reaktion durchgeführt, jedoch wurde die Polymerase im Verlängerungsgemisch weggelassen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3

Templat	A-Signal	C-Signal	G-Signal	T-Signal
250 fmol	33,5	30,8	35,8	32,5
500 fmol	55,5	60,6	60,3	55,1

[0092] Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass es sich bei der polymorphen Base um C handelte.

Beispiel 3

Analyse eines Pferde-Polymorphismus unter Verwendung eines markierten dNTP's und unmarkierter dNTP's

[0093] Zur Ermittlung eines bestimmten Pferde-Polymorphismus wurden zwei Oligonucleotide synthetisiert. Die Moleküle hatten die Sequenzen:

#1357 SEQ ID NO: 8 5'-PCTCCCAGTGGCACAGTAAAATTGGTP

(„Linker“)

713 SEQ ID NO: 9 5'-TTCTACATTCATTTTCTTGTTCTGT

(„Primer“)

[0094] Das Oligonucleotid #1357 war sowohl an seiner 3'-Endgruppe als auch an seiner 5'-Endgruppe phosphoryliert. Das Oligonucleotid #713 wies keine endständigen Phosphatgruppen auf.

[0095] Das Oligonucleotid #1357 wurde an die Wells einer 96-Well-Polystyrolplatte unter Verwendung von N-Ethyl-N'-(3-dimethylamino)propylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC) gebunden. Nach dem Waschen zum Entfernen von nicht-gebundenem Material wurden etwa 250 fmol einer amplifizierten 55 bp-Pferdegenomsequenz zugesetzt. Die Pferdesequenz wurde mittels PCR aus genomischer Pferde-DNA erzeugt. Das amplifizierte Produkt enthielt die folgende Sequenz:

**SEQ ID NO:10 5'-ACCAATTTTACTGTGCCACTGGGA
GAACAGAACAAGAAAATGAATGT
TAGAAGCAT**

[0096] Die Hybridisierung wurde 30 min bei Raumtemperatur in 1,5 M NaCl, 10 mM EDTA durchgeführt. Während des Hybridisierungsschritts war auch 1 pmol des zweiten Oligonucleotids (#713) anwesend. Beide Oligonucleotide (#713 und #1357) hybridisieren an das PCR-Produkt, wobei zwischen dem 3'-Ende von #713 und dem 5'-Ende von #1357 ein Zwischenraum von genau einer Base erhalten wurde, die sich gegenüber dem Rest A26 in der SEQ ID NO: 10 befindet.

[0097] Nach dem Hybridisierungsschritt wurde die Platte gewaschen und die Wells, die den Hybridisierungskomplex enthielten, wurden mit dem Verlängerungs-Ligations-Gemisch mit der folgenden Zusammensetzung inkubiert: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 25 mM NaCl; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 0,65 Einheiten (pro Well) SequenaseTM; 0,4 Einheiten (pro Well) T4-DNA-Ligase.

[0098] Darüber hinaus enthielten einige der Wells 30 µM Biotin-14-dATP (von GIBCO-BRL bezogen) und jeweils 30 µM jedes der drei anderen dNTP's. Andere Wells enthielten 30 µM Biotin-21-dUTP (von Clontech bezogen) und 30 µM der drei anderen dNTP's. Die Verlängerungs-Ligations-Reaktion wurde 15 min bei Raumtemperatur ablaufen gelassen. Die Wells wurden mit 1 N NaOH gewaschen und dann mit einer Verdünnung eines Antibiotin-Meerrettichperoxidase-Konjugats inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Gegenwart des Enzyms unter Verwendung von H₂O₂ und o-Phenylendiamin-hydrochlorid und eines Mikroplattenlesegeräts im Kinetikmodus nachgewiesen. Wells, die biotinyliertes dTTP enthielten, ergaben Werte von 168 mOD/min. Wells, die biotinyliertes dATP enthielten, ergaben Werte von 7,8 mOD/min. Folglich ist der Zwischenraum zwischen den beiden Oligonucleotiden mit einem markierten T gefüllt worden, wodurch die Base des gegenüberliegenden Strangs als A identifiziert worden ist.

[0099] Während die Erfindung im Zusammenhang mit speziellen Ausführungsformen beschrieben worden ist, sollte beachtet werden, dass sie weiter modifiziert werden kann und dass diese Anmeldung jegliche Variationen, Anwendungen oder Anpassungen der Erfindung umfassen soll, die allgemein den Prinzipien der Erfindung entsprechen und Abweichungen von der vorliegenden Offenbarung umfassen, die in die bekannte oder gewöhnliche Praxis innerhalb des Fachgebiets fallen, zu dem die Erfindung gehört, und die auf die wesentlichen Merkmale angewandt werden können, die vorstehend erläutert worden sind und die sich aus den beigefügten Ansprüchen ergeben.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN

(i) ANMELDER: ORCHID BIOSCIENCES, INC.

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: LIGASE/POLYMERASE-VERMITTELTE
GENETISCHE BITANALYSE VON EINZELNUCLEOTID-POLYMORPHISMEN UND DEREN
VERWENDUNG IN DER GENETISCHEN ANALYSE

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

(v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn 1.0, Version 1.25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Equus caballus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

GTGGAGATCA CAGACTGAAA TATTG

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

- (iv) ANTISENSE: NEIN

- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Equus caballus

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

AGTATAATAA TCACAGTATG TTAGC

25

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

 - (ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

 - (iv) ANTISENSE: NEIN

 - (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Equus caballus

 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

ACCTTCAAAA CTCAACTCAG CTCTT

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Equus caballus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

TTTACCAATG AGAAGGACAT CTAAG

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Equus caballus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

TTCTCCCAGT GGCACAGTAA AATTG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Equus caballus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

GCTTCTACAT TCATTTTCTT GTTCT

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 50 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Equus caballus

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

AATTTTACTG TGCCACTGGG AGAACAGAAC AAGAAAATGA ATGTAGAAGC 50

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

- (iv) ANTISENSE: NEIN

- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Equus caballus

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

CTCCCAGTGG CACAGTAAAA TTGGT 25

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Equus caballus
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

TTCTACATTC ATTTTCTTGT TCTGT

25

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:10:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) ANTISENSE: NEIN
 - (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Equus caballus
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

ACCAATTTTA CTGTGCCACT GGGAGAACAG AACAAGAAAA TGAATGTTAG 56
AAGCAT

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zur Bestimmung der Identität eines Nucleotids, das an einer vorausgewählten Einzelnucleotid-Langstelle in einem einzelsträngigen Ziel-Nucleinsäuremolekül vorliegt, wobei in dem Verfahren ein Satz von Oligonucleotiden eingesetzt wird, der aus zwei Oligonucleotiden besteht, die an das Ziel hybridisierbar sind und wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

A) Immobilisieren eines ersten Oligonucleotids des Satzes von Oligonucleotiden, wobei das erste Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid oder ein Linker-Oligonucleotid ist, an einem Träger, wobei das erste Oligonucleotid eine Nucleotidsequenz aufweist, die zu der einer ersten Region des Zielmoleküls komplementär ist und an die erste Region des Zielmoleküls derart hybridisieren kann, dass eine Endgruppe des hybridisierten ersten Oligonucleotids unmittelbar an die vorausgewählte Stelle angrenzt,

B) Inkubieren des immobilisierten ersten Oligonucleotids in Gegenwart des Zielmoleküls und ferner in Gegen-

wart eines markierten oder unmarkierten zweiten Oligonucleotids des Satzes von Oligonucleotiden, wobei das zweite Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist, wenn das erste Oligonucleotid ein Linker-Oligonucleotid ist, oder ein Linker-Oligonucleotid ist, wenn das erste Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist, wobei das zweite Oligonucleotid eine Sequenz aufweist, die zu der einer zweiten Region des Zielmoleküls komplementär ist und an die zweite Region des Zielmoleküls hybridisieren kann, wobei die erste und die zweite Region durch die vorausgewählte Stelle voneinander getrennt sind, wobei die Inkubation unter Bedingungen stattfindet, die ausreichend sind, um die Hybridisierung des ersten und des zweiten Oligonucleotids an das Zielmolekül zur Bildung eines hybridisierten Produkts zu ermöglichen, bei dem das erste und das zweite Oligonucleotid durch einen Zwischenraum eines einzelnen Nucleotids voneinander getrennt sind, wobei der Zwischenraum der vorausgewählten Stelle gegenüberliegt,

C) weiter Inkubieren des hybridisierten Produkts in Gegenwart einer Polymerase, einer Ligase und eines Nucleosidtriphosphatgemischs, das eine Nucleosidtriphosphatverbindung enthält, die zu dem Nucleotid der vorausgewählten Stelle komplementär ist und nachweisbar markiert ist, wenn das zweite Oligonucleotid unmarkiert ist, wobei das Gemisch aus einer Desoxynucleosidtriphosphatverbindung und drei Didesoxynucleosidtriphosphatverbindungen zusammengesetzt ist, so dass ungeachtet der Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle eine templatabhängige, Polymerase-vermittelte Verlängerungsreaktion stattfinden wird, die dazu führt, dass eine Nucleosidtriphosphatverbindung des Nucleosidtriphosphatgemischs, die zu dem Nucleotid der vorausgewählten Stelle komplementär ist, unabhängig davon, ob das erste oder das zweite Oligonucleotid das Primer-Oligonucleotid ist, an der 3'-Endgruppe eingebaut wird, wobei die Inkubation unter Bedingungen stattfindet, die ausreichend sind, so dass der templatabhängige, Polymerase-vermittelte Einbau stattfindet, und dadurch der Zwischenraum zwischen den hybridisierten Oligonucleotiden gefüllt und ein Anstoßen der Oligonucleotide verursacht wird,

D) Ligierenlassen der anstoßenden ersten und zweiten hybridisierten Oligonucleotide durch die Ligase,

E) weiter Inkubieren des immobilisierten ersten Oligonucleotids unter Bedingungen, die ausreichend sind, so dass jegliches nicht-kovalent gebundene Ziel oder zweite Oligonucleotid davon getrennt wird, und

F) Bestimmen, ob das immobilisierte erste Oligonucleotid von Schritt E markiert worden ist, wobei die Gegenwart eines immobilisierten markierten Oligonucleotids zeigt, dass die Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle zu dem Desoxynucleosidtriphosphat des Desoxynucleosidtriphosphatgemischs komplementär ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das erste und das zweite Oligonucleotid und das Zielmolekül DNA-Moleküle sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das erste und das zweite Oligonucleotid und das Zielmolekül RNA-Moleküle sind.

4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Polymerase reverse Transkriptase und die Ligase RNA-Ligase ist.

5. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem in Schritt A das erste Oligonucleotid ein Linker-Oligonucleotid ist und bei dem die 3'-Endgruppe des ersten Oligonucleotids an dem Träger immobilisiert ist, und bei dem in Schritt C die Bedingungen den Einbau des Nucleosidtriphosphats an der 3'-Endgruppe des zweiten hybridisierten Oligonucleotids ermöglichen, wobei das zweite Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist.

6. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem in Schritt C das Desoxynucleotidtriphosphat nachweisbar markiert ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem der nachweisbare Marker ein Enzymmarker, ein Fluoreszenzmarker, ein Radioisotopenmarker oder ein Chemilumineszenzmarker ist.

8. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem in Schritt F die Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle durch Nachweisen des immobilisierten Markers des Nucleotids bestimmt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem das zweite Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist und bei dem in Schritt B das zweite Oligonucleotid nachweisbar markiert ist und alte Nucleosidtriphosphate unmarkiert sind.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem der nachweisbare Marker ein Enzymmarker, ein Fluoreszenzmarker, ein Radioisotopenmarker oder ein Chemilumineszenzmarker ist.

11. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem in Schritt F die Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle aus dem in Schritt C verwendeten Gemisch aus Desoxynucleotid- und Didesoxynucleotidtriphosphaten abgeleitet wird.

12. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das erste Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist und bei dem in Schritt A die 5'-Endgruppe des ersten Oligonucleotids an dem Träger immobilisiert ist, und bei dem in Schritt C die Bedingungen den Einbau des Nucleosidtriphosphats an der 3'-Endgruppe des immobilisierten Oligonucleotids ermöglichen.

13. Verfahren nach Anspruch 12, bei dem das zweite Oligonucleotid ein Linker-Oligonucleotid ist und bei dem das zweite Oligonucleotid an seinem 3'-Ende nachweisbar markiert ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, bei dem in Schritt F die Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle aus dem in Schritt C verwendeten Gemisch aus Desoxynucleotid- und Didesoxynucleotidtriphosphaten abgeleitet wird.

15. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Zielmolekül einen Polymorphismus enthält und die vorausgewählte Stelle das variable Nucleotid des Polymorphismus enthält.

16. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem das Zielmolekül von einem Tier erhalten wird, das aus der Gruppe bestehend aus einem Pferd, einem Schaf, einem Rind, einem Hund, einer Katze und einem Menschen ausgewählt ist.

17. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem das Zielmolekül in vitro von einer Nucleinsäure eines Tieres amplifiziert wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, bei dem das Tier aus der Gruppe bestehend aus einem Pferd, einem Schaf, einem Rind, einem Hund, einer Katze und einem Menschen ausgewählt ist.

19. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem das Zielmolekül von einer Pflanze erhalten wird.

20. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem das Zielmolekül in vitro von einer Nucleinsäure einer Pflanze amplifiziert wird.

21. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem das Zielmolekül von einem Virus, einem Bakterium, einer Hefe oder einem Pilz erhalten wird.

22. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem das Zielmolekül in vitro von einer Nucleinsäure eines Virus, eines Bakteriums, einer Hefe oder eines Pilzes amplifiziert wird.

23. Ein Verfahren zur Bestimmung der Identität eines Nucleotids, das an einer vorausgewählten Einzelnucleotid-Langstelle in einem einzelsträngigen Ziel-Nucleinsäuremolekül vorliegt, wobei in dem Verfahren ein Satz von Oligonucleotiden eingesetzt wird, der aus zwei Oligonucleotiden besteht, die an das Ziel hybridisierbar sind und wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

A) Inkubieren des Zielmoleküls in Gegenwart eines ersten Oligonucleotids des Satzes von Oligonucleotiden, wobei das erste Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid oder ein Linker-Oligonucleotid ist, wobei das erste Oligonucleotid einen gebundenen Liganden enthält, der aus der Gruppe bestehend aus Biotin und Fluorescein ausgewählt ist, wobei das erste Oligonucleotid eine Nucleotidsequenz aufweist, die zu der ersten Region des Zielmoleküls komplementär ist und an die erste Region des Zielmoleküls derart hybridisieren kann, dass eine Endgruppe des hybridisierten ersten Oligonucleotids unmittelbar an die vorausgewählte Stelle angrenzt, B) weiter Inkubieren des bereitgestellten ersten Oligonucleotids und des Zielmoleküls in Gegenwart eines markierten oder unmarkierten zweiten Oligonucleotids des Satzes von Oligonucleotiden, wobei das zweite Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist, wenn das erste Oligonucleotid ein Linker-Oligonucleotid ist, oder ein Linker-Oligonucleotid ist, wenn das erste Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist, wobei das zweite Oligonucleotid eine Sequenz aufweist, die zu der zweiten Region des Zielmoleküls komplementär ist und an die zweite Region des Zielmoleküls hybridisieren kann, wobei die erste und die zweite Region durch die vorausgewählte Stelle voneinander getrennt sind, wobei die Inkubation unter Bedingungen stattfindet, die ausreichend sind, um die Hybridisierung des ersten und des zweiten Oligonucleotids an das Zielmolekül zur Bildung eines hybridisierten Produkts zu ermöglichen, bei dem das erste und das zweite Oligonucleotid durch einen Zwischenraum eines einzelnen Nucleotids voneinander getrennt sind, wobei der Zwischenraum der vorausge-

wählten Stelle gegenüberliegt,

C) weiter Inkubieren des hybridisierten Produkts in Gegenwart einer Polymerase, einer Ligase und eines Nucleosidtriphosphatgemischs, das eine Nucleosidtriphosphatverbindung enthält, die zu dem Nucleotid der vorausgewählten Stelle komplementär ist und nachweisbar markiert ist, wenn das zweite Oligonucleotid unmarkiert ist, wobei das Gemisch aus einer Desoxynucleosidtriphosphatverbindung und drei Didesoxynucleosidtriphosphatverbindungen zusammengesetzt ist, so dass ungeachtet der Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle eine templatabhängige, Polymerase-vermittelte Verlängerungsreaktion stattfinden wird, die dazu führt, dass eine Nucleosidtriphosphatverbindung des Nucleosidtriphosphatgemischs, die zu dem Nucleotid der vorausgewählten Stelle komplementär ist, unabhängig davon, ob das erste oder das zweite Oligonucleotid das Primer-Oligonucleotid ist, an der 3'-Endgruppe eingebaut wird, wobei die Inkubation unter Bedingungen stattfindet, die ausreichend sind, so dass der templatabhängige, Polymerase-vermittelte Einbau stattfindet, und dadurch der Zwischenraum zwischen den hybridisierten Oligonucleotiden gefüllt und ein Anstoßen der Oligonucleotide verursacht wird,

D) Ligierenlassen der anstoßenden ersten und zweiten hybridisierten Oligonucleotide durch die Ligase, so dass ein Ligationsprodukt des ersten und des zweiten Oligonucleotids gebildet wird,

E) Einfangen des Ligationsprodukts des ersten und des zweiten Oligonucleotids auf einem Träger unter Verwendung des Liganden und weiter Inkubieren des bereitgestellten ersten Oligonucleotids unter Bedingungen, die ausreichend sind, so dass jegliches nicht-kovalent gebundene Ziel oder zweite Oligonucleotid von der Inkubation entfernt wird, und

F) Bestimmen, ob das immobilisierte erste Oligonucleotid von Schritt E markiert worden ist, wobei die Gegenwart eines immobilisierten markierten Oligonucleotids zeigt, dass die Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle zu dem Desoxynucleosidtriphosphat des Desoxynucleosidtriphosphatgemischs komplementär ist.

24. Ein Verfahren zur Bestimmung der Identität eines Nucleotids, das an einer vorausgewählten Einzelnucleotid-Langstelle in einem einzelsträngigen Ziel-Nucleinsäuremolekül vorliegt, wobei in dem Verfahren ein Satz von Oligonucleotiden eingesetzt wird, der aus zwei Oligonucleotiden besteht, die an das Ziel hybridisierbar sind und wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

A) Inkubieren des Zielmoleküls in Gegenwart eines ersten Oligonucleotids des Satzes von Oligonucleotiden, wobei das erste Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid oder ein Linker-Oligonucleotid ist, wobei das erste Oligonucleotid mit einem Liganden markiert ist, der aus der Gruppe bestehend aus Biotin und Fluorescein ausgewählt ist, wobei das erste Oligonucleotid eine Nucleotidsequenz aufweist, die zu der ersten Region des Zielmoleküls komplementär ist und an die erste Region des Zielmoleküls derart hybridisieren kann, dass eine Endgruppe des hybridisierten ersten Oligonucleotids unmittelbar an die vorausgewählte Stelle angrenzt,

B) weiter Inkubieren des bereitgestellten ersten Oligonucleotids und des Zielmoleküls in Gegenwart eines zweiten Oligonucleotids des Satzes von Oligonucleotiden, wobei das zweite Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist, wenn das erste Oligonucleotid ein Linker-Oligonucleotid ist, oder ein Linker-Oligonucleotid ist, wenn das erste Oligonucleotid ein Primer-Oligonucleotid ist, wobei das zweite Oligonucleotid eine Sequenz aufweist, die zu der zweiten Region des Zielmoleküls komplementär ist und an die zweite Region des Zielmoleküls hybridisieren kann, wobei die erste und die zweite Region durch die vorausgewählte Stelle voneinander getrennt sind, wobei die Inkubation unter Bedingungen stattfindet, die ausreichend sind, um die Hybridisierung des ersten und des zweiten Oligonucleotids an das Zielmolekül zur Bildung eines hybridisierten Produkts zu ermöglichen, bei dem das erste und das zweite Oligonucleotid durch einen Zwischenraum eines einzelnen Nucleotids voneinander getrennt sind, wobei der Zwischenraum der vorausgewählten Stelle gegenüberliegt,

C) weiter Inkubieren des hybridisierten Produkts in Gegenwart einer Polymerase, einer Ligase und eines Nucleosidtriphosphatgemischs, das eine Nucleosidtriphosphatverbindung enthält, die zu dem Nucleotid der vorausgewählten Stelle komplementär ist und nachweisbar markiert ist, wenn das zweite Oligonucleotid unmarkiert ist, wobei das Gemisch aus einer Desoxynucleosidtriphosphatverbindung und drei Didesoxynucleosidtriphosphatverbindungen zusammengesetzt ist, so dass ungeachtet der Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle eine templatabhängige, Polymerase-vermittelte Verlängerungsreaktion stattfinden wird, die dazu führt, dass eine Nucleosidtriphosphatverbindung des Nucleosidtriphosphatgemischs, die zu dem Nucleotid der vorausgewählten Stelle komplementär ist, unabhängig davon, ob das erste oder das zweite Oligonucleotid das Primer-Oligonucleotid ist, an der 3'-Endgruppe eingebaut wird, wobei die Inkubation unter Bedingungen stattfindet, die ausreichend sind, so dass der templatabhängige, Polymerase-vermittelte Einbau stattfindet, und dadurch der Zwischenraum zwischen den hybridisierten Oligonucleotiden gefüllt und ein Anstoßen der Oligonucleotide verursacht wird.

D) Ligierenlassen der anstoßenden ersten und zweiten hybridisierten Oligonucleotide durch die Ligase, so dass ein Ligationsprodukt des ersten und des zweiten Oligonucleotids gebildet wird,

E) weiter Inkubieren des bereitgestellten ersten Oligonucleotids unter Bedingungen, die ausreichend sind, so

dass jegliches nicht-kovalent gebundene Ziel oder zweite Oligonucleotid davon getrennt wird und die ligierten Oligonucleotide in Lösung gehalten werden,

F) Bestimmen, ob das erste Oligonucleotid von Schritt E markiert worden ist, wobei die Gegenwart eines markierten Oligonucleotids zeigt, dass die Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle zu dem Desoxynucleosidtriphosphat des Desoxynucleosidtriphosphatgemischs komplementär ist.

25. Ein Verfahren zur Bestimmung der Identität eines Nucleotids, das an einer vorausgewählten Einzelnucleotid-Langstelle in einem einzelsträngigen Ziel-Nucleinsäuremolekül vorliegt, wobei in dem Verfahren ein Satz von Oligonucleotiden eingesetzt wird, der mindestens zwei Mitglieder hat, und zwar ein erstes und ein zweites Oligonucleotid, die an das Ziel hybridisieren, und wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

A) Inkubieren des Zielmoleküls in Gegenwart des Satzes von Oligonucleotiden, wobei das erste Oligonucleotid des Satzes ein Primer-Oligonucleotid ist, das an eine erste Region des Zielmoleküls so hybridisiert, dass eine 3'-Endgruppe des hybridisierten ersten Oligonucleotids unmittelbar an die vorausgewählte Stelle angrenzt, und wobei das zweite Oligonucleotid des Satzes an eine zweite Region des Zielmoleküls so hybridisiert, dass die 5'-Endgruppe des hybridisierten zweiten Oligonucleotids durch eine einzelne Oligonucleotidlücke an der Position der vorausgewählten Stelle von der 3'-Endgruppe des ersten hybridisierten Oligonucleotids getrennt ist,

B) Inkubieren der hybridisierten Moleküle in Gegenwart einer Polymerase und eines Nucleosidtriphosphatgemischs, das aus Didesoxynucleosidtriphosphatverbindungen und einer Desoxynucleosidtriphosphatverbindung zusammengesetzt ist, so dass ungeachtet der Identität des Nucleotids der vorausgewählten Stelle eine templatabhängige, Polymerase-vermittelte Verlängerungsreaktion stattfinden wird, die dazu führt, dass eine Nucleosidtriphosphatverbindung des Nucleosidtriphosphatgemischs, die zu dem Nucleotid der vorausgewählten Stelle komplementär ist, an der 3'-Endgruppe des hybridisierten ersten Oligonucleotids eingebaut wird und dadurch der Zwischenraum zwischen dem hybridisierten ersten und zweiten Oligonucleotid gefüllt und ein Anstoßen der Oligonucleotide verursacht wird.

C) Inkubieren der hybridisierten Moleküle in Gegenwart einer Ligase unter Bedingungen, die ausreichend sind, so dass die Ligase anstoßende hybridisierte erste und zweite Oligonucleotide ligieren kann, so dass ein Ligationsprodukt gebildet wird, wenn die Desoxynucleosidtriphosphatverbindung des Nucleosidtriphosphatgemischs an der 3'-Endgruppe des hybridisierten ersten Oligonucleotids eingebaut worden ist, und

D) Bestimmen, ob sich ein Ligationsprodukt gebildet hat.

26. Verfahren nach Anspruch 25, bei dem die Desoxynucleosidtriphosphatverbindung einen ersten Marker enthält.

27. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem mindestens eines des ersten oder des zweiten Oligonucleotids einen zweiten Marker enthält.

28. Verfahren nach Anspruch 25, bei dem mindestens eines des ersten oder des zweiten Oligonucleotids einen Marker enthält.

29. Verfahren nach Anspruch 27, das zusätzlich die Schritte des Immobilisierens eingebauter Desoxynucleotidverbindungen auf einem Träger mittels des ersten Markers und Inkubieren des Ligationsprodukts unter Bedingungen umfasst, die ausreichend sind, von der Inkubation jegliches zweite Oligonucleotid zu entfernen, das nicht an das erste Oligonucleotid ligiert ist.

30. Verfahren nach Anspruch 27, bei dem der Schritt (D) die Bestimmung umfasst, ob das Ligationsprodukt immobilisiert worden ist.

31. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem der erste Marker aus der Gruppe bestehend aus einem radioaktiven Marker, einem Fluoreszenzmarker, einem Biolumineszenzmarker, einem Chemilumineszenzmarker, einem Nucleinsäuremarker, einem Haptenmarker und einem Enzymmarker ausgewählt ist.

32. Verfahren nach Anspruch 28, bei dem der Marker aus der Gruppe bestehend aus einem radioaktiven Marker, einem Fluoreszenzmarker, einem Biolumineszenzmarker, einem Chemilumineszenzmarker, einem Nucleinsäuremarker, einem Haptenmarker und einem Enzymmarker ausgewählt ist.

33. Verfahren nach Anspruch 30, bei dem der erste Marker aus der Gruppe bestehend aus einem Fluoreszenzmarker, einem Nucleinsäuremarker, einem Haptenmarker und einem Enzymmarker ausgewählt ist.

34. Verfahren nach Anspruch 27, bei dem der zweite Marker ein nachweisbarer Marker ist, der aus der Gruppe bestehend aus einem radioaktiven Marker, einem Fluoreszenzmarker, einem Biolumineszenzmarker,

einem Chemilumineszenzmarker, einem Nucleinsäuremarker, einem Haptenmarker und einem Enzymmarker ausgewählt ist.

35. Verfahren nach Anspruch 34, bei dem der zweite Marker Biotin ist.

36. Verfahren nach Anspruch 27, bei dem mindestens einer des ersten oder des zweiten Markers ein Fluoreszenzmarker ist.

37. Verfahren nach Anspruch 25, bei dem die Ligase eine thermostabile Ligase ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

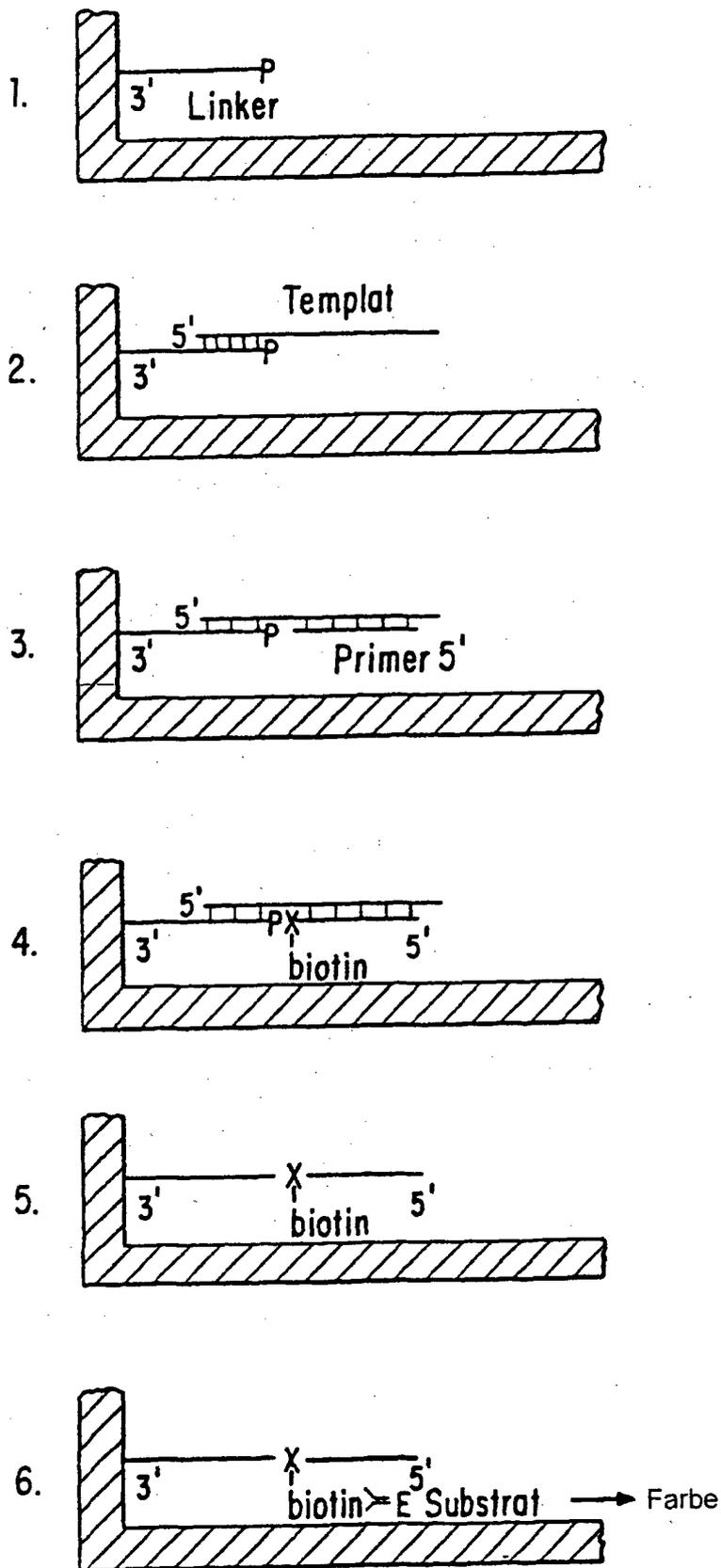


FIG. 1

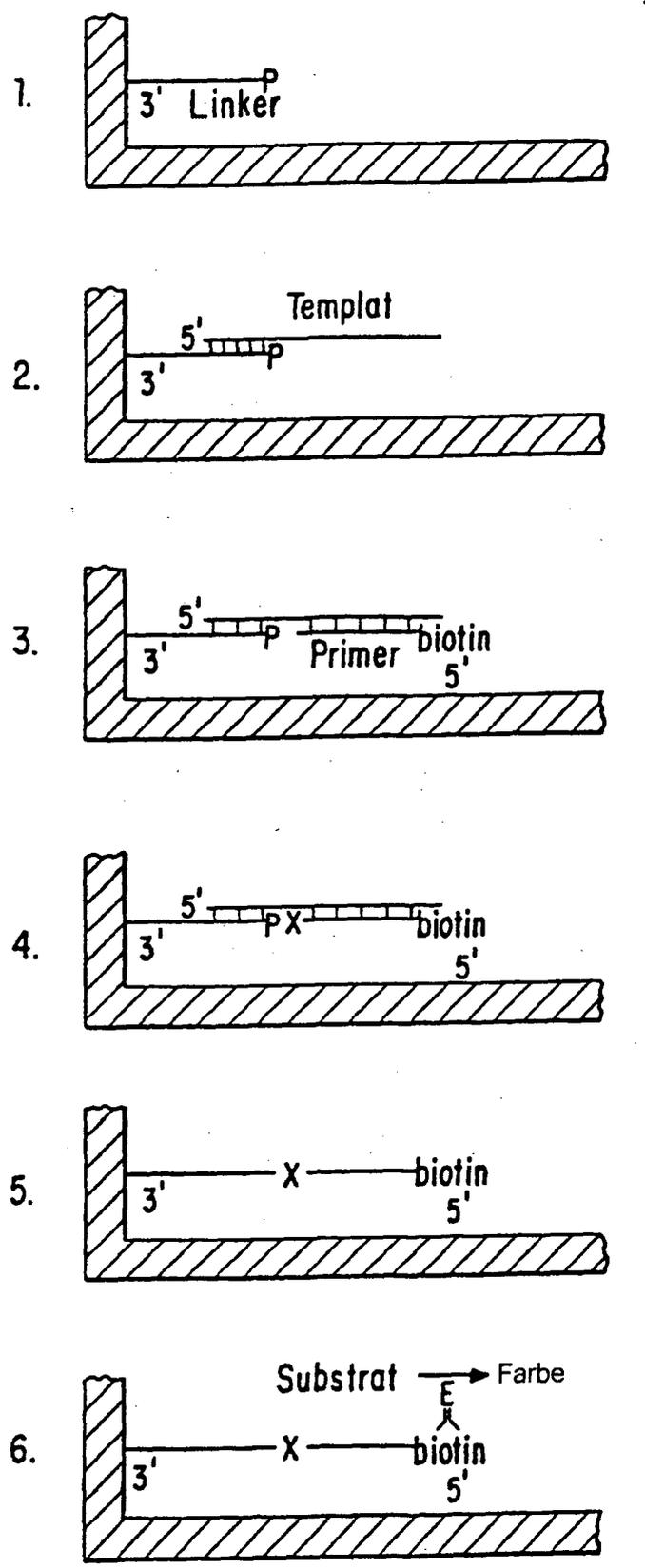


FIG. 2

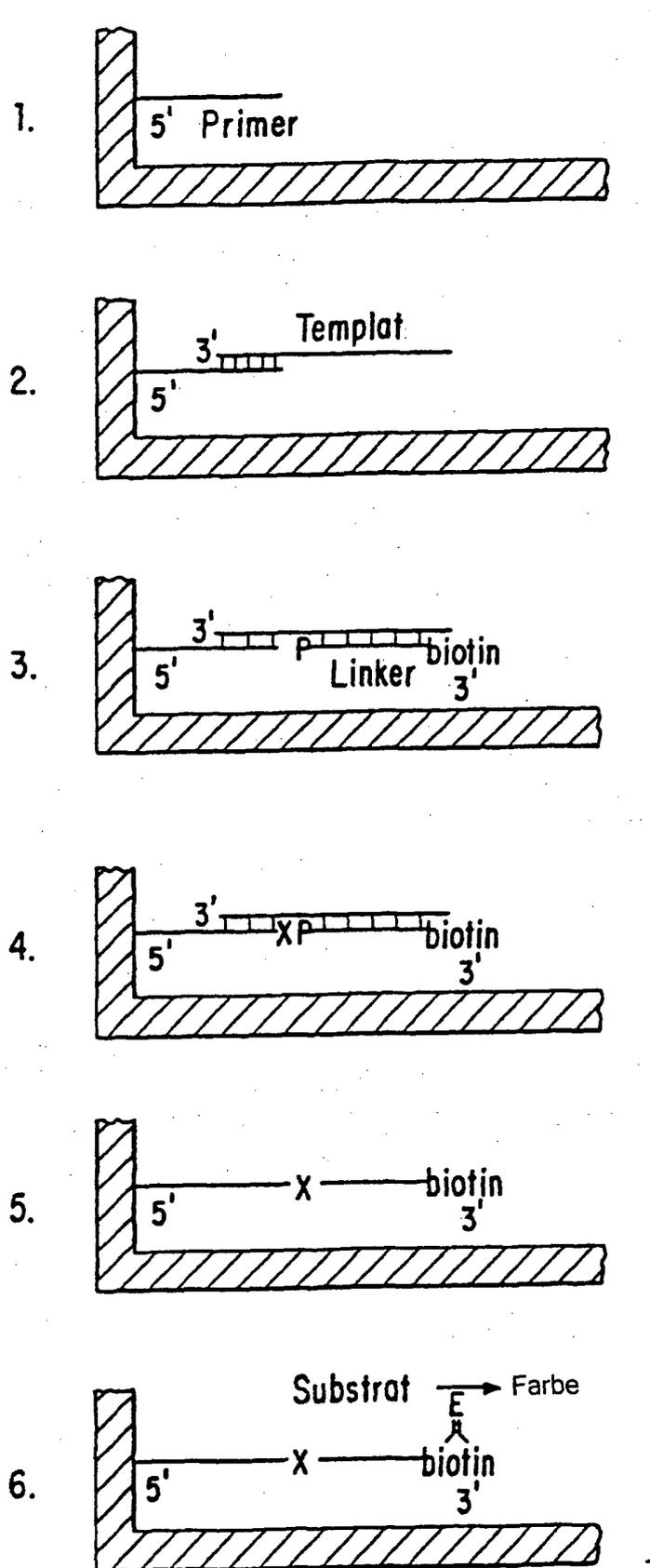


FIG. 3

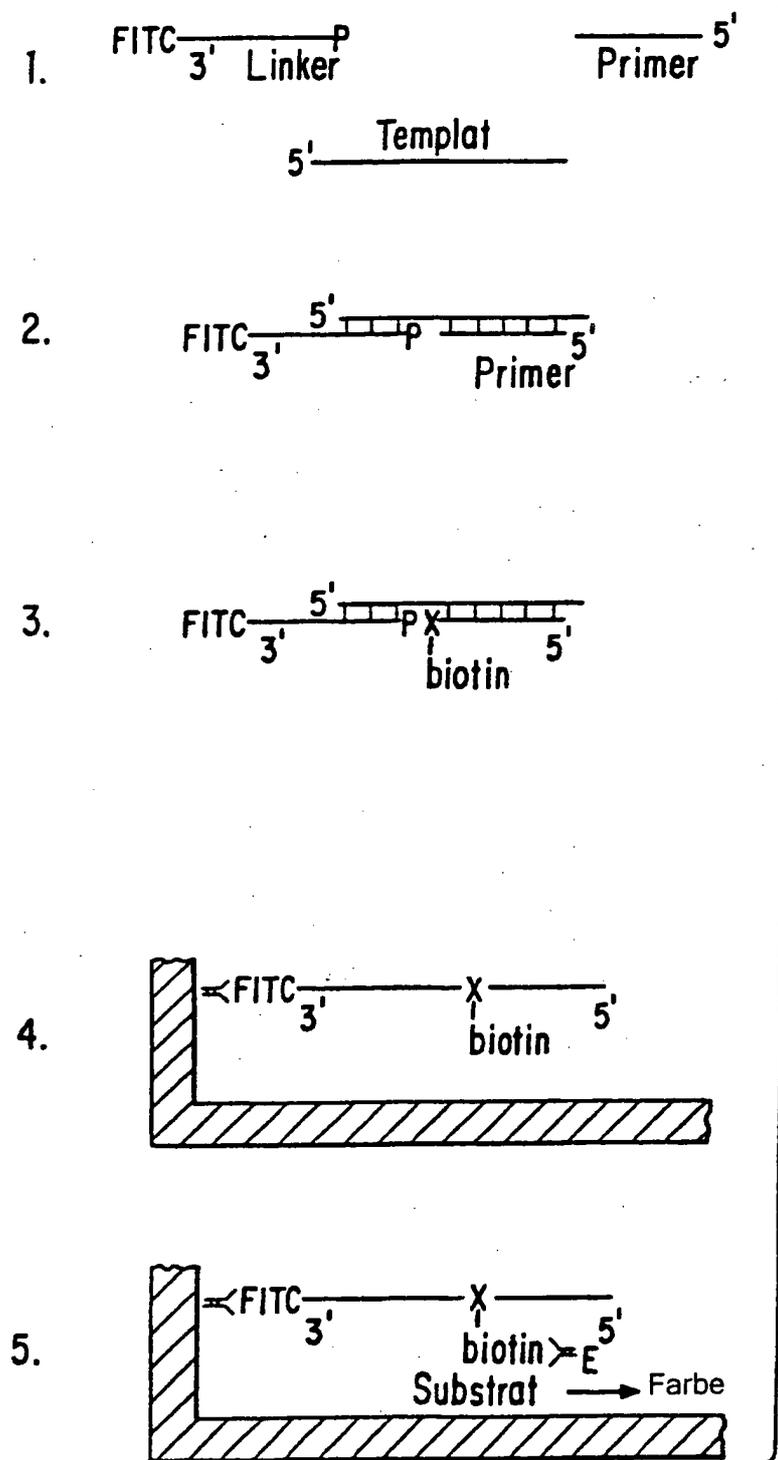


FIG. 4