



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 692 33 285 T2** 2004.11.25

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 525 882 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 33 285.5**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 202 238.9**

(96) Europäischer Anmeldetag: **22.07.1992**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.02.1993**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **14.01.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.11.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/68**
C12Q 1/70

(30) Unionspriorität:

91202000 02.08.1991 EP

(73) Patentinhaber:

bioMérieux B.V., Boxtel, NL

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**van Gemen, Bob, NL-5283 TD Boxtel, NL; Kievits,
Tim, NL-5262 XB Vught, NL; Lens, Peter Franklin,
NL-5237 EW Den Bosch, NL**

(54) Bezeichnung: **Quantifikation von Nukleinsäuren**

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

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

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Quantifizierung von Target-Nukleinsäure in einer Messprobe. Ein Testkit, um dieses Verfahren auszuführen, ist ebenfalls Teil der Erfindung.

[0002] Ein Verfahren, um die Amplifikation von Nukleinsäure in einer Messprobe durchzuführen, ist unter anderem von Cetus Corp. in USP 4,683,195 und 4,683,202 offenbart worden, die so genannte Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

[0003] Kürzlich ist ein anderes Verfahren zu Amplifikation von Nukleinsäure in einer Messprobe, insbesondere RNA-Sequenzen, in der europäischen Patentanmeldung EP 0,329,822 der Cingene Corp. offenbart worden.

[0004] Die Methode umfasst die Transkription mehrfacher RNA-Kopien von einer Matrize, die einen Promotor umfasst, der von einer RNA-Polymerase erkannt wird. Mit diesen Verfahren werden mehrfache RNA-Kopien aus einer DNA-Matrize transkribiert, welche einen funktionellen Promotor umfasst, der von der RNA-Polymerase erkannt wird. Die genannten Kopien werden wieder als Target benutzt, von dem eine neue Menge der DNA-Matrize erhalten wird, usw. Das Verfahren selbst wird hier nicht im Einzelnen diskutiert werden, aber es betrifft die sogenannte NASBATM-Methode (= Nukleinsäure-Sequenz-basierte Amplifikation).

[0005] Amplifikation ist ein exponentieller Prozess. Kleine Unterschiede in irgendeiner der Variablen, welche die Reaktionsrate bestimmen, werden zu dramatischen Unterschieden in der Ausbeute des amplifizierten Produkts führen. PCR ebenso wie NASBA haben weit gestreute Anwendungen in der genetischen Krankheitsdiagnose, jedoch liefern diese Methoden nur qualitative Ergebnisse.

[0006] Es besteht ein Bedürfnis für ein Verfahren, welches direkt, genau und in einer reproduzierbaren Weise die Menge einer spezifischen Nukleinsäure, die in einer Messprobe vorhanden ist, quantifiziert.

[0007] Eine empfindliche, reproduzierbare, quantitative Analyse einer Messprobe, die von einem Patienten erhalten wird, der an einer Infektionskrankheit leidet, z. B. AIDS oder Hepatitis, kann von äusserster Wichtigkeit sein, um das Ausmass zu bestimmen, in dem der Infektionserreger im Patienten vorhanden ist, wobei diese Information nützlich ist, um die Behandlung des Patienten zu überwachen.

[0008] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Verfügung, um eine Target-Nukleinsäure in einer Messprobe zu quantifizieren, welches umfasst, dass eine bekannte Anzahl von Molekülen einer entsprechenden Nukleinsäure, welche eine wohldefinierte Mutationssequenz umfasst, der Messprobe zugegeben wird, wobei sich die genannte Mutationssequenz von der Target-Nukleinsäure charakteristisch unterscheidet, aber mit vergleichbarer Effizienz amplifizierbar ist, und dass anschliessend eine transkriptionsbasierte Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion der Nukleinsäure durchgeführt wird, nach welcher eine Quantifikation der amplifizierten Nukleinsäure durch Differenzialdetektion durchgeführt wird.

[0009] Die Target-Nukleinsäure kann Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder auch Ribonukleinsäure (RNA) sein.

[0010] Bevorzugt handelt es sich bei der Target-Nukleinsäuresequenz um eine Ribonukleinsäure. Die Differenzialdetektion, welche in diesem Verfahren notwendig ist, wird durchgeführt, indem eine Sondensequenz verwendet wird, die in der Lage ist, sowohl mit der Target-Nukleinsäure als auch der Mutationssequenz zu hybridisieren, oder indem zwei Sonden verwendet werden, die zwischen der Target-Sequenz und der Mutationssequenz unterscheiden.

[0011] Die genannte Unterscheidung kann auch durchgeführt werden, indem ein Ribozym verwendet wird, welches fähig ist, die Mutationssequenz zu spalten, während die Target-Sequenz nicht von dem Ribozym gespalten wird, oder umgekehrt.

[0012] Ein Teil der Erfindung schliesst ein Testkit ein, um die zuvor beschriebenen Verfahren auszuführen.

[0013] Kürzlich wurde die Patentanmeldung WO 91/02817 veröffentlicht, in welcher eine gemeinsame Amplifikation eines Nukleinsäuresegments als internem Standard und einer Targetsequenz beschrieben wurde. Das Verfahren, welches in dieser Anmeldung verwendet wird, ist nicht eine kompetitive Reaktion. Im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung wird in jener Anmeldung die Mengenbestimmung durchgeführt, indem die er-

haltenen Signale gemessen werden und anschliessend das Verhältnis zwischen den beiden amplifizierten Sequenzen ermittelt wird.

[0014] In Nuc.Ac.Res., Vol. 17, Nr. 22, 1989, S. 9437–9446 wird ein PCR-unterstütztes Transkript-Titrationsassay von Becker Andre et al. beschrieben. Das PATTY-Assay beruht auf der gemeinsamen Amplifikation eines in vitro erzeugten Transkripts, welches sich durch einen einzigen Basen-Austausch von der Target-mRNA unterscheidet.

[0015] Ein Verfahren zur quantitativen PCR wird auch von Gilliland et al. in P.N.A.S. Vol. 87, 1990, 2725–2729 beschrieben.

[0016] In der WO9102815 wird ein weiteres quantitatives Amplifikationsverfahren beschrieben, welches auf PCR basiert. Wiederum unterscheiden sich Target und Referenz durch mindestens eine Punktmutation. Detektion wird durch Temperaturgradient-Gel-Elektrophorese erreicht.

[0017] Ein Verfahren, um EBV-DNA unter Verwendung von quantitativer PCR zu quantifizieren, wird von Lambé et al. in Abst.An.Meet.Am.Chem.Soc., Vol. 90, S. 114, D206 offenbart. Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich signifikant von jenem Verfahren, da unter anderem Kompetition zwischen Wildtyp (Target-Nukleinsäure) und einer wohldefinierten Mutationssequenz ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist.

[0018] Das Verfahren gemäss der vorliegenden Erfindung basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Amplifikation von Nukleinsäure aus einer klinischen Probe, die eine unbekannte Konzentration einer Target-Nukleinsäure des Wildtyps enthält, der eine bekannte Menge einer wohldefinierten Mutationssequenz beigefügt wurde.

[0019] Das Amplifikationsverfahren umfasst:

- (a) Hybridisieren eines ersten Primers an eine erste Matrize. Der erste Primer weist eine DNA-Sequenz auf, die ausreichend komplementär zu einer RNA-Sequenz der ersten Matrize ist.
- (b) Synthetisieren einer ersten DNA-Sequenz, die kovalent an den ersten Primer gebunden ist und komplementär zur RNA-Sequenz der ersten Matrize ist. Die erste DNA-Sequenz und der erste Primer umfassen eine zweite Matrize;
- (c) Abtrennen der ersten Matrize von der zweiten Matrize, um Hybridisierung eines zweiten Primers zu erlauben;
- (d) Hybridisieren des zweiten Primers an die zweite Matrize. Der zweite Primer weist eine DNA-Sequenz auf, welche ausreichend komplementär zu einer DNA-Sequenz der zweiten Matrize ist. Der zweite Primer weist auch eine Antisense-Sequenz eines Promotors und eine Antisense-Sequenz einer Transkriptionsinitiationsstelle für eine RNA-Polymerase auf;
- (e) Synthetisieren einer zweiten DNA-Sequenz, welche kovalent an den zweiten Primer gebunden ist und komplementär zur DNA-Sequenz der zweiten Matrize ist, sowie Synthetisieren einer dritten DNA-Sequenz, die kovalent an die zweite Matrize gebunden ist und komplementär zur DNA-Sequenz des zweiten Primers ist. Die zweite und dritte DNA-Sequenz, der zweite Primer und die zweite Matrize umfassen eine dritte Matrize;
- (f) Synthetisieren einer Vielzahl von Kopien der RNA-Sequenz der ersten Matrize aus der dritten Matrize.

[0020] Eine Sequenz des ersten oder zweiten Primers ist ausreichend komplementär zu einer Sequenz der spezifischen Nukleinsäuresequenz, und eine Sequenz des ersten oder zweiten Primers ist ausreichend homolog zu einer Sequenz der spezifischen Nukleinsäuresequenz. Ein 3'-Ende des ersten Primers ist in Richtung eines 3'-Endes des zweiten Primers auf komplementären Strängen orientiert.

[0021] Dieses Amplifikationsverfahren, als NASBA bekannt, wurde in EP329822 und von Compton J., Nature 1991, 7. März; 350 (6313): 91–92 beschrieben. Geeignete Reaktionsbedingungen sind in EP329822 offenbart (z. B. in Beispiel 3).

[0022] Amplifikation sowohl der Target-Nukleinsäure als auch der Mutationssequenz wird vorzugsweise mit einem Primersatz durchgeführt, der zwei Primer enthält, wobei jeder dieser Primer an die Target-Nukleinsäure und an die Mutationssequenz mit der selben Effizienz hybridisiert.

[0023] Diese kompetitive Amplifikation wird mit einer festen Menge einer (klinischen) Probe und Verdünnungsreihen der Mutationssequenz oder umgekehrt ausgeführt.

[0024] Die Mutation in der zugefügten Sequenz ist notwendig für die diskriminatorische Detektion der Wildtyp- und der mutierten amplifizierten Sequenzen mit Wildtyp- bzw. Mutationsspezifischen markierten Oligonukleotiden.

[0025] Dies bedeutet, dass nach einer kompetitiven Amplifikation die Proben in duplo analysiert werden, wobei irgendeine sequenzspezifische Detektion verwendet wird, z.B.:

1. Gelelektrophorese, Blotting, Hybridisierung, Autoradiographie, Scanning;
2. Slot-Blotting, Hybridisierung, Autoradiographie, Scanning;
3. "Non-Capture" Bead-basiertes Assay, Zählen; und
4. "Capture" Bead-basiertes Assay, Zählen.

[0026] Das anfängliche Verhältnis von Wildtyp- und mutierter Sequenz wird sich im Verhältnis der Wildtyp- und mutierten Signale wiederfinden. Bei einem 1 : 1-Verhältnis und gleicher Effizienz der Amplifikation wird die Reduktion des Signals sowohl der Wildtyp- als auch der mutierten Sequenz 50% betragen. Somit sind bei derjenigen Verdünnung der mutierten Nukleinsäure, die zu einer 50%igen Signalreduktion führt, die Menge an mutierter Nukleinsäure und die Menge an Wildtyp-Nukleinsäure in der (klinischen) Probe gleich.

[0027] Indem eine wohlbekannte Mutationssequenz benutzt wird, die z. B. in der Sequenz eine einzige Basenmutation (z. B. eine A → G Ersetzung) aufweist, braucht nur ein Restriktionsenzym oder ein Ribozym benutzt zu werden, um zwischen der Target-Nukleinsäure und der Mutationssequenz zu unterscheiden.

[0028] Anschliessend ist nur ein Analysedurchlauf (z. B. ein Gelsystem) notwendig, um die Target-Nukleinsäure zu quantifizieren.

[0029] Proben, die für die Analyse mit diesem Verfahren geeignet sind, können menschlichen oder nicht-menschlichen Ursprungs sein. Die Proben können aus angezüchteten Proben abgeleitet sein, z. B. mononukleare Zellen, oder aus präpariertem Gewebe isoliert sein. Auch Blut und Blutplasma, ebenso Hirnflüssigkeit, Urin usw. können als Messprobenmaterial verwendet werden.

[0030] Wenn beispielsweise die Messprobe aus Blut besteht, wobei ein Targetvirus erfindungsgemäss quantifiziert werden soll, kann die virale Nukleinsäure aus der Messprobe extrahiert werden. Um ein sehr schnelles, einfaches und reproduzierbares erfindungsgemässes Vorgehen zu erreichen, kann die wohldefinierte Mutationssequenz vor, während oder nach der Extraktion der Target-Nukleinsäure zugegeben werden, ohne dass dies mit dem Extraktionsvorgang interferiert. Anschliessend kann die erfindungsgemässe kompetitive Amplifikation und Differenzialdetektion unmittelbar nach dem Extraktionsvorgang durchgeführt werden.

[0031] Aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit, Geschwindigkeit, Reproduzierbarkeit und Genauigkeit kann das vorliegende Verfahren benutzt werden, um genau die Menge an z. B. Viren wie dem AIDS-Virus oder dem Hepatitisvirus in der Messprobe zu ermitteln, die von einem Patienten erhalten wurde, der im Verdacht steht, an der Krankheit zu leiden.

[0032] Es kann von grosser Wichtigkeit sein, in verschiedenen Stadien einer Krankheit die genaue Menge an Viren oder anderen Krankheitserregern zu kennen, um z. B. die Medikamentendosis, die dem Patienten zugeführt werden soll, zu ermitteln.

[0033] Das erfindungsgemässe Testkit wird in seiner einfachsten Ausführungsform mit einer wohldefinierten Mutationssequenz und entsprechenden Oligonukleotiden, nämlich Primern/Primerpaar zur Verfügung gestellt, um die gewünschte Amplifikationsreaktion durchzuführen, sowie mit einer Sondensequenz oder einem Ribozym.

[0034] Zusätzlich kann ein Testkit mit den entsprechenden Enzymen ausgestattet sein, um die Amplifikationsreaktion durchzuführen.

[0035] Das erfindungsgemässe Verfahren wird durch die folgenden Beispiele erläutert.

Beispiel I

[0036] In vitro hergestellte Wildtyp- (WT-) und mutierte (Q-) RNA wurden benutzt, um das Prinzip der quantitativen NASBA™ zu belegen. Plasmide, die für die in-vitro RNA-Synthese benutzt wurden, enthielten ein 1416 bp-Fragment der HIV-1-Sequenz, welches aus einem teilweisen Aufschluss mit Fok 1-Restriktionsenzym (Nu-

kleotide 1186–2638 der HIV-1hxb2-Sequenz, Ratner et al., 1987), welcher in pGEM3 oder PGEM4 (Promega) kloniert wurde, resultierte. Die Sequenz zwischen den Restriktionsstellen PstI (Position 1418 auf HIV-1 hxb2) und Sph I (Position 1446 auf HIV-1 hxb2) wurde von GAATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATG (OT309) im WT nach GACAGTGTAGATAGATGACAGTCGCATG (OT321) in der Q-RNA geändert. In vitro RNA wurde aus diesen Konstrukten entweder mit T7-Polymerase oder SP6-RNA-Polymerase (Sambrook et al., 1989) erzeugt.

[0037] Reaktionsgemische wurden mit DNase behandelt, um Plasmid-DNA zu entfernen. Nach Extraktion mit Phenol und Ausfällung mit Ethanol wurde die gewonnene RNA auf mit Ethidiumbromid angefärbtem Agarose-Gel durch Vergleich mit einer Kalibrationsreihe mit bekannten Mengen ribosomaler RNA quantifiziert. Die RNA-Lösungen wurden auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und als Ausgangssubstanz für die Amplifikation mit NASBA™ verwendet, wie in EP 0329,822 beschrieben. Primer, die für die Amplifikation verwendet wurden, waren OT270:

(AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGTGCTATGCTACTTCCCCTTGTTCTCTCA, P1) und OT271 (AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAA, P2), welche ein RNA-Molekül generieren, das komplementär zur HIV1hxb2-Sequenz von 142 Nt (Pos. 1357 bis 1499) ist. Detektion von 10 µl jeder Amplifikation wurde mit Elektrophorese in duplo auf 3% NuSieve, 1% Agarose-Gels (Sambrook et al., 1989) durchgeführt, die auf Zeta-Probe (Biorad) unter Verwendung einer Vakuumblot-Einrichtung (Pharmacia) geblottet wurden und mit ³²P-markierten Oligonukleotiden hybridisiert wurden, die spezifisch für entweder die WT- oder die Q-RNA-Sequenz zwischen den oben genannten Sph1 und Pst 1-Stellen sind. Belichtungszeiten auf Röntgenfilme (Kodak) lagen zwischen 30 Minuten und 3 Tagen.

[0038] Die Filme wurden mit einem LKB Ultrascan XL Densitometer gescannt, um das Signal in den Banden zu quantifizieren. Zahlen der Targetmoleküle sowohl der WT- als auch der Q-RNA sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1

Röhrchen	Kopien WT-RNA	Kopien Q-RNA
1	10 ³	10 ¹
2	10 ³	10 ²
3	10 ³	10 ³
4	10 ³	10 ⁴
5	10 ³	10 ⁵

[0039] Als Referenz wurde eine Amplifikation von WT-RNA oder Q-RNA alleine durchgeführt. Die Ergebnisse der kompetitiven NASBA™ sind in Fig. 1 gezeigt. Beim Mittelwert der 50%igen Reduktion für sowohl WT- als auch Q-RNA beträgt die Anzahl der Anfangsmoleküle etwa 10³ Moleküle Q-RNA, was gleich der Zahl der WT-RNA-Moleküle ist.

[0040] Die Formel, die verwendet wurde, um den Mittelwert von 50%iger Reduktion für sowohl Q- als auch WT-RNA zu ermitteln, lautet wie folgt:

$$\log (\text{conc. WT}) = \frac{\log ([Q] 50\% \text{ Sig. Q}) + \log ([Q] 50\% \text{ Sig. WT})}{2}$$

wobei ([Q] 50% Sig. Q) die Zahl der Q-RNA-Moleküle ist, bei der das Signal bei Verwendung von OT321, welches spezifisch für Q-RNA ist, nur noch 50% des Signals beträgt, das erhalten wird, wenn Q-RNA alleine amplifiziert wird, und ([Q] 50% Sig. WT) die Zahl der Q-RNA-Moleküle ist, bei der das Signal bei Verwendung von OT 309, welches für WT-RNA spezifisch ist, nur noch 50% des Signals beträgt, das erhalten wird, wenn WT-RNA alleine amplifiziert wird.

Beispiel II

[0041] Wie in Beispiel I, ausser dass die anfänglichen RNA-Moleküle wie in Tabelle 2 vorliegen.

Tabelle 2

Röhrchen	Kopien WT-RNA	Kopien Q-RNA
1	10^4	10^2
2	10^4	10^3
3	10^4	10^4
4	10^4	10^5
5	10^4	10^6

[0042] Die Ergebnisse, die in Fig. 2 dargestellt sind, zeigen eine Anfangsmenge von 10^4 Molekülen der WT-RNA unter Benutzung der Formel

$$\log (\text{conc. WT}) = \frac{\log ([Q] \text{ Sig Q } 50\%) + \log ([Q] \text{ Sig. WT } 50\%)}{2}$$

Beispiel III

[0043] Wie in Beispiel 1, ausser dass die anfänglichen RNA-Moleküle wie in Tabelle 3 vorliegen.

Tabelle 3

Röhrchen	Kopien WT-RNA	Kopien Q-RNA
1	10^5	10^3
2	10^5	10^4
3	10^5	10^5
4	10^5	10^6
5	10^5	10^7

[0044] Die Ergebnisse, die in Fig. 2 dargestellt sind, zeigen eine Anfangsmenge von $6,5 \times 10^4$ Molekülen der WT-RNA unter Benutzung der Formel

$$\log (\text{conc. WT}) = \frac{\log ([Q] \text{ Sig Q } 50\%) + \log ([Q] \text{ Sig. WT } 50\%)}{2}$$

Beispiel IV

[0045] Hier wird quantitative NASBA™ auf Nukleinsäure angewendet, die aus Plasma von HIV-1-infizierten Personen isoliert wurde. 1 ml Plasmaproben von 3 seropositiven HIV-1-infizierten Personen wurden verwendet, um Nukleinsäure zu isolieren (Boom et al., 1990).

[0046] Nukleinsäure wurde schliesslich in 100 µl Wasser erhalten.

[0047] Amplifikationen wurden wie in Beispiel I durchgeführt, ausser dass die anfänglichen RNA-Moleküle wie in Tabelle 4 vorlagen.

Tabelle 4

Röhrchen	Volumen der Nukleinsäurelösung	Kopien Q-RNA
1	2 µl Patient 1	10 ¹
2	2 µl Patient 1	10 ²
3	2 µl Patient 1	10 ³
4	2 µl Patient 1	10 ⁴
5	2 µl Patient 1	10 ⁵
6	2 µl Patient 2	10 ¹
7	2 µl Patient 2	10 ²
8	2 µl Patient 2	10 ³
9	2 µl Patient 2	10 ⁴
10	2 µl Patient 2	10 ⁵
11	2 µl Patient 3	10 ¹
12	2 µl Patient 3	10 ²
13	2 µl Patient 3	10 ³
14	2 µl Patient 3	10 ⁴
15	2 µl Patient 3	10 ⁵

[0048] Die Ergebnisse sind in Fig. 4, 5 und 6 für die Patienten 1, 2 bzw. 3 dargestellt.

[0049] Die Ergebnisse zeigen, dass für die Patienten 1, 2 und 3 die Anzahl der WT-RNA-Moleküle $4,5 \times 10^3$, $2,1 \times 10^3$ bzw. $1,2 \times 10^4$ in 2 µl Nukleinsäurelösung beträgt, unter Benutzung der Formel

$$\log(\text{conc. WT}) = \frac{\log([\text{Q}] \text{ Sig Q } 50\%) + \log([\text{Q}] \text{ Sig. WT } 50\%)}{2}$$

Beispiel V

[0050] Wie in Beispiel 2, ausser dass die anfänglichen RNA-Moleküle wie in Tabelle 5 vorliegen und dass die Detektion von NASBAamplifizierter WT- und Q-RNA gemäss dem im Folgenden beschriebenen Verfahren erfolgte.

[0051] Amplifizierte WT- und Q-RNA aus 5 µl NASBA-Reaktion wurden auf Streptavidin-beschichteten magnetischen Dynabeads (Dyna) mit dem biotinylierten Oligonukleotid OT 700 (5'-Biotin-TGTTAAAAGAGAC-CATCAATGAGGA-3') als Zwischenglied gebunden. Das Hybridisierungsverfahren zur Bindung findet bei 45 °C für 30 Minuten in 100 µl Hybridisierungspuffer II (5 × SSPE, 0,1% SDS, 0,1% Milchpulver, 10 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA; Sambrook et al., 1989). Nach diesem Schritt werden die Beads in 2 × SSC, 0,1% BSA gewaschen, unter Verwendung eines Magneten, um die Beads in dem Reaktionsröhrchen oder der Mikrotiterplatte zurückzuhalten.

[0052] Anschliessend wurde die RNA mit Oligonukleotiden, die mit Meerrettich-Peroxidase (engl. Horse Radish Peroxidase, HRP) markiert waren, hybridisiert, wobei die Oligonukleotide spezifisch für die WT- oder Q-RNA-Sequenz zwischen den zuvor erwähnten PstI und SphI-Stellen waren, und zwar in 100 µl Hybridisierungspuffer II für 30 Minuten bei 45°C.

[0053] Nicht hybridisierte HRP-Oligonukleotide werden mit der selben Methode wie oben beschrieben ausgewaschen. Detektion von HRP, welches auf den Beads zurückgehalten wird, wird durch Zugabe von 100 µl Substratlösung (0,45 mM TMB.HCl.H₂O, 0,5 mM CTAB, 7,65 g/l Emdex, 27 mM NaCitrat.2H₂O, 22,1 mM Citronensäure.H₂O, 2,25 mM Harnstoff-Peroxid und 5,35 mM 2-Chloro-Acetamid) erreicht.

[0054] Die Reaktion wird zu einem geeigneten Zeitpunkt mit 50 µl 250 mM Oxalsäure angehalten. Das Ausmass an Substratveränderung von farblos nach gelb wird ermittelt, indem die Absorbanz bei 450 nm in einem Organon Teknika 510 Mikropplattenleser gemessen wird. Die A₄₅₀-Werte werden sowohl für die WT- als auch

die Q-Sonde wie zuvor analysiert (Fig. 7).

[0055] Die Ergebnisse in Fig. 7 zeigen eine Anfangsmenge von $2,7 \times 10^2$ Molekülen WT-RNA unter Verwendung der Formel

$$\log (\text{conc. WT}) = \frac{\log ([Q] \text{ Sig Q } 50\%) + \log ([Q] \text{ Sig. WT } 50\%)}{2}$$

Tabelle 5

Röhrchen	Kopien WT ⁻ -RNA	Kopien Q-RNA
1	10 ²	-
2	10 ²	10 ²
3	10 ²	10 ³
4	10 ²	10 ⁴
5	10 ²	10 ⁵
5	10 ²	10 ⁶

Literatur

Boom R, Sol CFA, Salimans MMM, Jansen CL, Werthiem-van Dillen PME and Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. [Schnelles und einfaches Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren.]

J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 495–503.

Ratner L, Fisher A, Jagodzinske HH, Misuya H., Lion RS, Gallo RC and Wong-Staal F.

Complete nucleotide sequence of functional clones of the AIDS virus.

[Vollständige Nukleotidsequenz von funktionellen Klonen des AIDS-Virus.]

AIDS Res. Hum. Retroviruses 1987 ; 3: 57–69.

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E.

Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edition.

[Molekulares Klonen. Ein Laborhandbuch, 2. Auflage.]

Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Quantifizieren einer Target-Nukleinsäure in einer Messprobe, umfassend die Schritte
 - Zugeben einer bekannten Zahl von Nukleinsäuremolekülen zur Probe, wobei die genannten Moleküle eine Nukleinsäuresequenz aufweisen, die in einer solchen Weise mutiert ist, dass sie von der Targetsequenz während der Detektion unterschieden werden kann, die aber der Targetsequenz dadurch ähnelt, dass sie die selben Primer-Bindungsstellen umfasst und mit vergleichbarer Effizienz amplifizierbar ist,
 - kompetitives Amplifizieren sowohl der Targetsequenz als auch der zugegebenen Moleküle unter Verwendung eines transkriptionsbasierten Nukleinsäure-Amplifikationsverfahrens, wobei ein oder mehrere Primer, die geeignet sind, sich sowohl an die Targetsequenz als auch an die zugegebenen Moleküle anzulagern, verwendet werden und wobei mindestens einer der genannten Primer eine DNA-abhängige RNA-Polymerase-Promotorsequenz umfasst,
 - Detektieren sowohl der Targetsequenz als auch der zugegebenen mutierten Sequenz,
 - Messen der Signale, die die Menge von amplifizierter Targetsequenz bzw. mutierter Sequenz widerspiegeln, und
 - Berechnen der Menge an Targetsequenz, die ursprünglich in der Probe vorhanden war, aus diesen Signalen.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Target-Nukleinsäure eine Ribonukleinsäure ist.

3. Verfahren gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die zugegebenen Nukleinsäuremoleküle RNA-Moleküle sind.

4. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass für die Detektion der amplifizierten Sequenzen zwei Sonden verwendet werden, wobei eine Sonde eine Sequenz umfasst, die geeignet ist, an die amplifizierte RNA, die von der Targetsequenz abgeleitet ist, und nicht an die amplifizierte RNA, die von den zugegebenen Molekülen abgeleitet ist, zu hybridisieren, und wobei eine Sonde eine Sequenz umfasst, die geeignet ist, an die amplifizierte RNA, die von den zugegebenen Molekülen abgeleitet ist, und nicht an amplifizierte RNA, die von der Targetsequenz abgeleitet ist, zu hybridisieren.

5. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass eine Sonde verwendet wird, die eine Sequenz umfasst, die geeignet ist, sowohl an die amplifizierte RNA, die von der Targetsequenz abgeleitet ist, als auch an die amplifizierte RNA, die von den zugegebenen Molekülen abgeleitet ist, zu hybridisieren.

6. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Sequenz der zugegebenen Moleküle sich von der Targetsequenz dadurch unterscheidet, dass ein Teil der Sequenz der zugegebenen Moleküle aus im wesentlichen den gleichen Nukleotiden zusammengesetzt ist wie der entsprechende Teil der Targetsequenz, wobei diese Nukleotide in eine andere Reihenfolge gebracht wurden.

7. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein Ribozym, welches geeignet ist, die Mutationssequenz oder die Target-Nukleinsäure zu spalten, verwendet wird, um die getrennte Detektion der Targetsequenz und der zugegebenen Moleküle zu ermöglichen.

8. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die bekannte Menge von Nukleinsäuremolekülen zu einer Probe des biologischen Materials, in dem die Menge der Targetsequenz bestimmt werden soll, zugegeben wird, bevor die Probe des biologischen Materials einem Nukleinsäureextraktionsverfahren unterworfen wird.

9. Testkit zur Durchführung des Verfahrens des Anspruchs 1, umfassend

- eine bekannte Zahl von Nukleinsäuremolekülen, wobei die genannten Moleküle eine Nukleinsäuresequenz aufweisen, die in einer solchen Weise mutiert ist, dass sie von der Targetsequenz während der Detektion unterschieden werden kann, aber der Targetsequenz dadurch ähnelt, dass sie die selben Primer-Bindungsstellen umfasst und mit vergleichbarer Effizienz amplifizierbar ist,
- mindestens einen Primer, der geeignet ist, sich sowohl an die Targetsequenz als auch an die Sequenz der zugegebenen Moleküle anzulagern, umfassend die Sequenz eines Promotors, der von einer DNAabhängigen RNA-Polymerase erkannt wird.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

Quantitative NASBA 10e3 Anfangsmoleküle

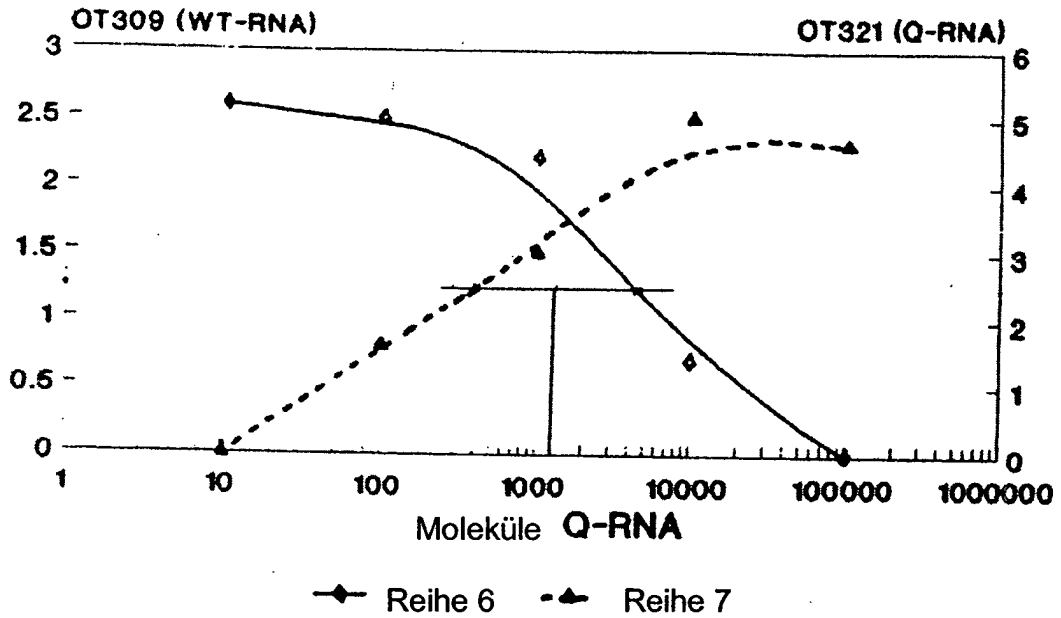


Fig. 2

Quantitative NASBA 10e4 Anfangsmoleküle

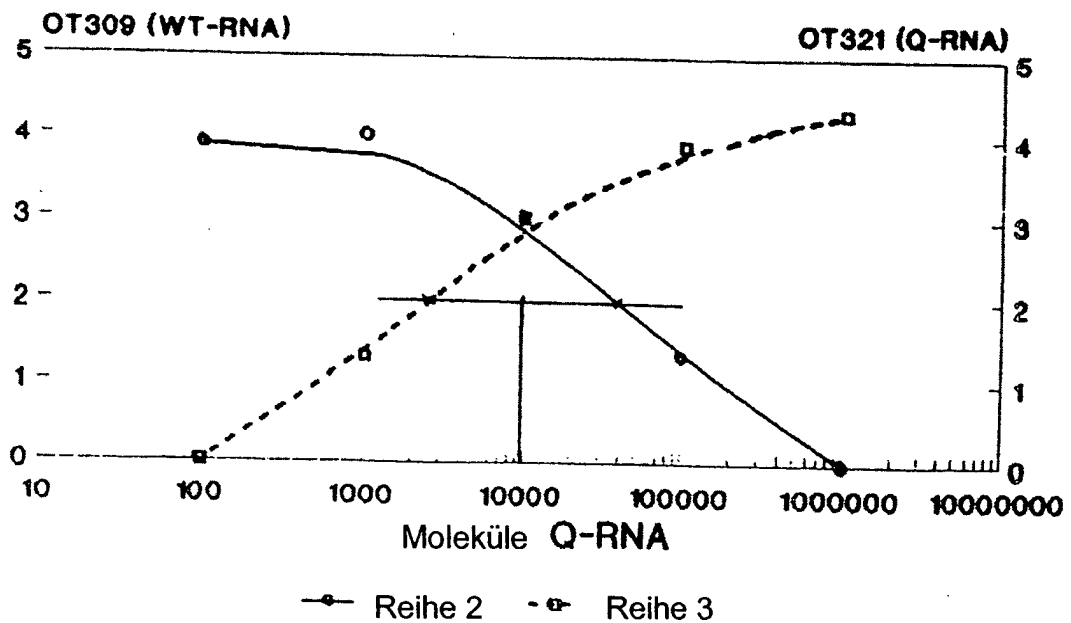


Fig. 3

Quantitative NASBA 10e5 Anfangsmoleküle

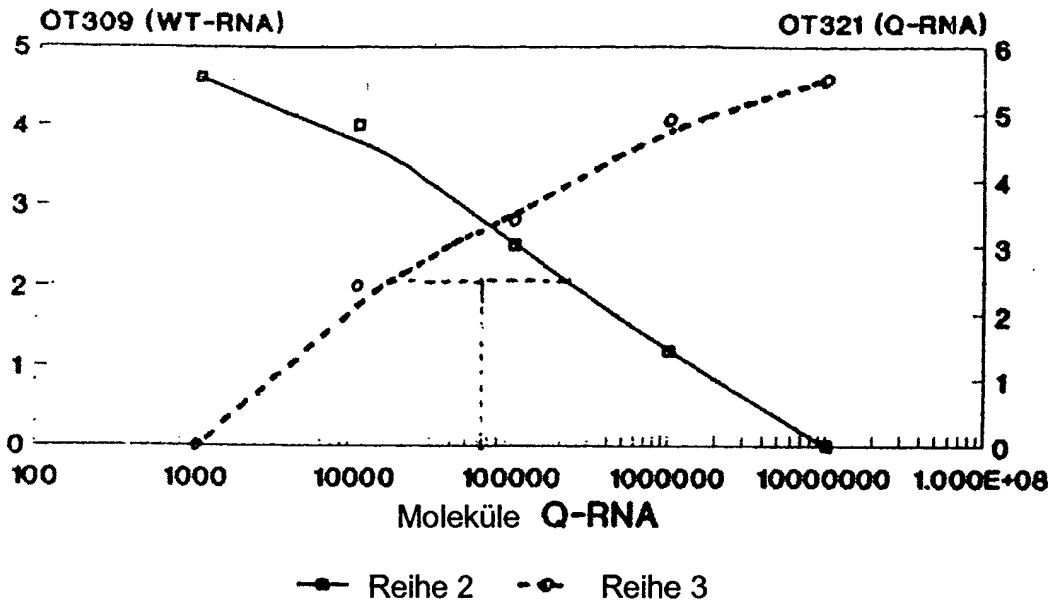


Fig. 4

Quantitative NASBA Plasmaprobe 1

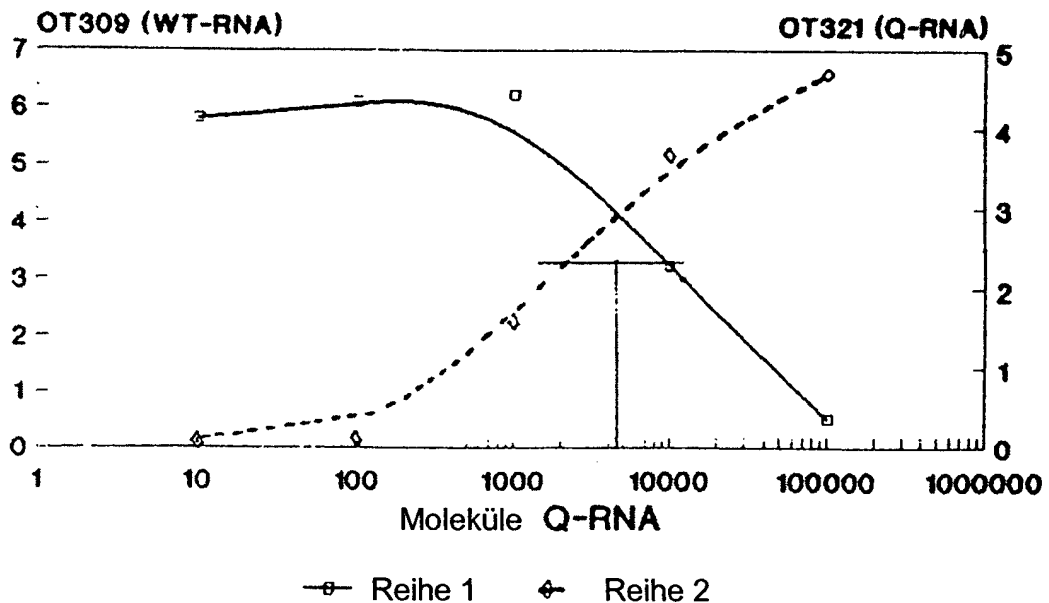


Fig. 5

Quantitative NASBA Plasmaprobe 2

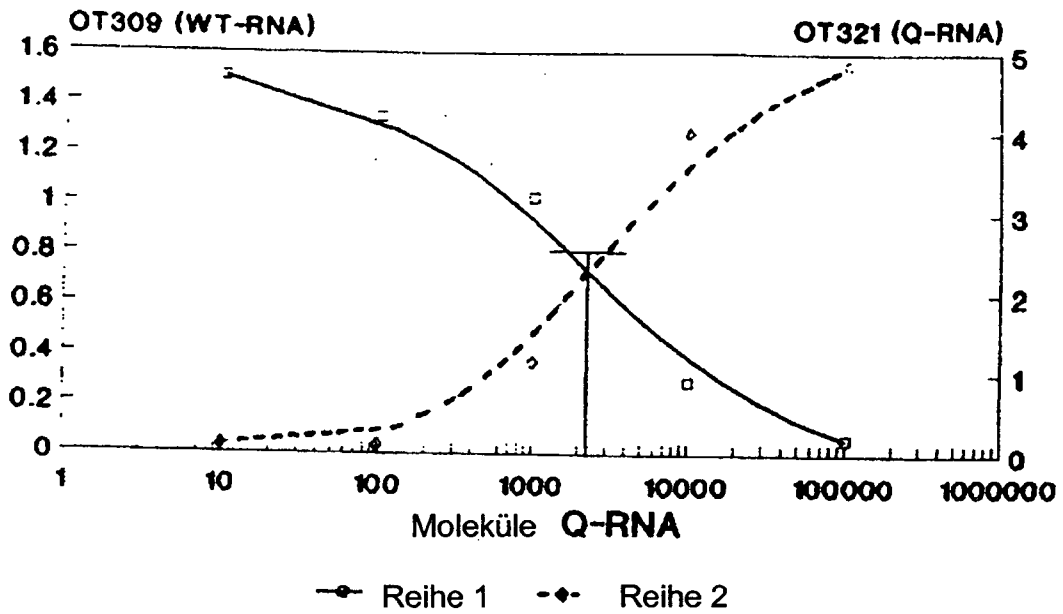


Fig. 6

Quantitative NASBA Plasmaprobe 3

