

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. November 2001 (01.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/81619 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

[DE/DE]; Mittelstedter Weg 37, 61348 Bad Homburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01025

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. März 2001 (17.03.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AT, AU, BR, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KP, KR, LT, LU, MA, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE, TR, TT, TZ, US, VN, ZA.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
200 07 378.8 22. April 2000 (22.04.2000) DE
60/219,421 20. Juli 2000 (20.07.2000) US
100 60 256.8 4. Dezember 2000 (04.12.2000) DE

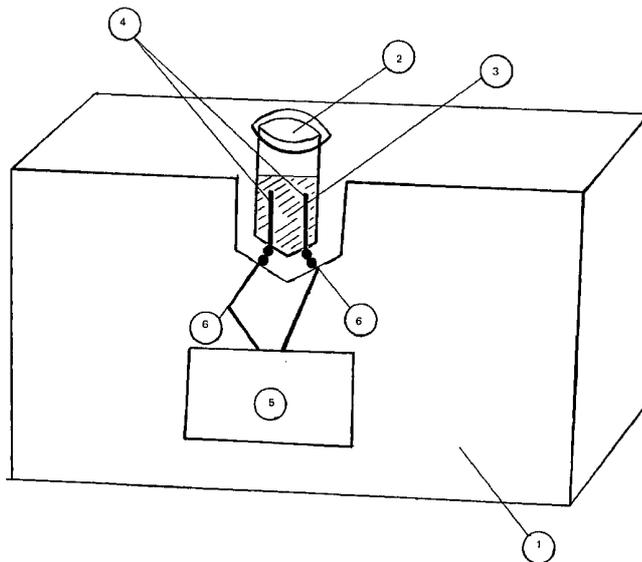
(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **ARNETH, Borros** [DE/DE]; Mittelstedter Weg 37, 61348 Bad Homburg (DE). **ARNETH, Alfons**

Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CONDUCTIVITY PCR

(54) Bezeichnung: KONDUKTIVITÄTS-PCR (LEITFÄHIGKEITS-PCR)



(57) Abstract: The activity of individual genes is an important subject of analysis in molecular biology. Often, a PCR (polymerase chain reaction) or an RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) is carried out in order to determine the activity of individual genes. However, a complication associated with this is that the PCR is difficult to quantify. The invention is based on the concept of using the change in conductivity to be measured during the PCR as a marker for the progression of the PCR and for the quantification of the starting quantity of DNA. This apparatus determines the changes in conductivity "online" during the course of a PCR by means of small microelectrodes which are immersed in the PCR solution. Using this parameter, the apparatus is able to calculate the quantity of DNA or RNA before the conclusion of the PCR.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 01/81619 A2



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Eine in der Molekularbiologie wichtige Fragestellung ist die nach der Aktivität einzelner Gene. Um einzelne Gene in ihrer Aktivität zu bestimmen, wird häufig eine PCR (Polymerasekettenreaktion) oder eine RT-PCR (reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion) durchgeführt. Eine Schwierigkeit besteht darin, daß die PCR-Reaktion nur schwierig quantifizierbar ist. Dieser Erfindung liegt die Überlegung zugrunde die bei Ablauf der PCR-Reaktion zu messende Leitfähigkeitsänderung als Marker für den Verlauf der PCR-Reaktion und die Quantifizierung der Ausgangs-DNA - Menge zu nutzen. Dieser Apparat bestimmt während dem Ablauf einer PCR-Reaktion "online" mittels kleiner Mikroelektroden, die in die PCR-Lösung eintauchen, die Leitfähigkeitsänderungen. Aufgrund dieses Parameters ist der Apparat in der Lage die DNA bzw. RNA-Menge vor Ablauf der PCR-Reaktion zu errechnen.

Beschreibung:KONDUKTIVITÄTS-PCR (Leitfähigkeits PCR)

Eine in der **Molekularbiologie** wichtige Fragestellung ist die nach der Aktivität einzelner Gene. Um einzelne Gene in ihrer Aktivität zu bestimmen wird häufig eine PCR (Polymerasekettenreaktion) oder eine RT-PCR (reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion) durchgeführt. Eine Schwierigkeit besteht darin, daß die PCR-Reaktion nur schwierig quantifizierbar ist, daß heißt die Menge an DNA/RNA vor Ablauf der PCR-Reaktion läßt sich nur abschätzen.

Bisher übliche Apparate zur „online“ PCR färben entweder die im Verlauf der PCR gebildete DNA oder verwenden fluoreszenzmarkierte Oligonucleotidprimer um den Verlauf der PCR zu quantifizieren. Dabei ist ein aufwendiges optisches System zur Messung der jeweiligen Fluoreszenzen nötig.

Dieser Erfindung liegt die Überlegung zugrunde die bei Ablauf der PCR-Reaktion entstehende Menge an Phosphat und die damit verbundene Leitfähigkeitsänderungen als Marker für den Verstärkungsfaktor der PCR-Reaktion zu nutzen. Dieser Apparat bestimmt während dem Ablauf einer PCR-Reaktion „online“ mittels kleiner Mikroelektroden, die in die PCR-Lösung eintauchen, den Phosphatanstieg. Aufgrund dieses Parameters ist der Apparat in der Lage die DNA bzw. RNA- Menge vor Ablauf der PCR-Reaktion zu errechnen.

Die Phosphatmenge wird dabei aufgrund ihrer guten spezifischen elektrischen Leitfähigkeit und aufgrund ihres Anstiegs im Verlauf der Annealing und Extension-phase der PCR als Marker zur Detektion gewählt. Anhand einer zuvor ermittelten Eichkurve und der bestimmten Meßwerte kann anschließend ein Mikroprozessor die Phosphatkonzentration nach Ablauf der PCR-Reaktion, den Verstärkungsfaktor der PCR-Reaktion sowie die DNA- bzw. die RNA-Konzentration vor Beginn der PCR-Reaktion errechnen. Dabei eignet sich der zeitliche Verlauf des Leitfähigkeitsanstiegs als Funktion der Zyklenzahl und der Temperatur zur Ermittlung der Ursprungskonzentration an DNA.

Vorteilhaft an dieser Erfindung ist, daß mit der Leitfähigkeit direkt ein elektronisch verwertbares Maß verwendet wird. Zudem ist die Phosphatmenge ein besonders empfindlicher Parameter. Die Leitfähigkeit ändert sich dabei innerhalb eines jeden Zyklus temperaturabhängig entsprechend den drei Phasen (Annealing, Extension, Denaturierung). Insgesamt nimmt die Leitfähigkeit dabei im Verlauf der PCR ab. In der Annealingphase nimmt die Leitfähigkeit relativ stark ab. In den ersten circa zehn Zyklen steigt die Leitfähigkeit linear („lineare Phase“) bis zum „Trashhold Zyklus“. Dieser Zyklus eignet sich in besonderer Weise zur Quantifizierung der Polymerasekettenreaktion. Ab dem Trashhold Zyklus beginnt die exponentielle Phase. Diese ist durch eine summarische Leitfähigkeitsabnahme gekennzeichnet. Dennoch bleibt auch hier während der Denaturierungsphase und der Extensionsphase eine phasenweise Leitfähigkeitszunahme erhalten. Die Leitfähigkeitsänderungen der einzelnen Phasen eignen sich ebenfalls zur PCR-Quantifizierung.

Möglicherweise binden bei der Annealingtemperatur viele Mononucleotide und viele Magnesiumionen sowie andere Ionen an die DNA. Mit Beginn der Extensionsphase steigt die Leitfähigkeit kontinuierlich bis zum Ende der Extensionsphase an. Dieser Anstieg wird vermutlich durch die Phosphatfreisetzung bewirkt. Und muß gemessen werden. An die Elongationsphase schließt sich die Denaturierung an, hier steigt die Leitfähigkeit auf ein Maximum. Vermutlich dissoziieren in dieser Phase alle Ionen ab.

Erläuterung anhand eines Ausführungsbeispiels: Zeichnung

- 1) Thermocycler
- 2) PCR-Reaktionsgefäß
- 3) PCR-Reaktionslösung
- 4) Mikroelektroden zur Leitfähigkeitsmessung
- 5) Mikroprozessor zur Registrierung der Leitfähigkeitsmeßwerte
- 6) Kontakte

Konduktivitäts-PCRPatentansprücheUnabhängiger Hauptanspruch:

1.) Ein Apparat zur Durchführung einer PCR-Reaktion (Polymerasekettenreaktion) in einem sogenannten "Thermocycler",

dadurch gekennzeichnet,

daß dieser Apparat „online“ während dem Ablauf einer PCR-Reaktion mittels kleiner in die PCR-Lösung eintauchender Mikroelektroden die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit der Lösung kontinuierlich oder diskontinuierlich (z.B. nur während der Annealing/Extension-phase oder nur während der ersten Zyklen) verfolgt.

Abhängige Nebenansprüche:

2.) Ein Thermocycler nach Schutzanspruch 1)

dadurch gekennzeichnet,

daß dieser Thermocycler den Übergang des linearen Leitfähigkeitsanstiegs zum ersten Leitfähigkeitsabfall als trash-hold cycle zur Quantifizierung nutzt.

3.) Reaktionsgefäße zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion,

dadurch gekennzeichnet,

daß Mikroelektroden in die verwendeten Reaktionsgefäße integriert sind.

4.) Eine Multi well Platte zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion,

dadurch gekennzeichnet,

daß Mikroelektroden in die einzelnen Wells der multi well Platte integriert sind.

5.) Ein Thermocycler nach Schutzanspruch 1-4,

zusätzlich dadurch gekennzeichnet,

daß neben der elektrischen Leitfähigkeit auch noch die aktuelle Temperatur in der Reaktionslösung gemessen wird, daß die verschiedenen bekannten Möglichkeiten zur Heizung / Kühlung (z.B. Luftheizung / Kühlung oder Peltierelemente) Anwendung finden und das Kontakte zur Verwendung der Reaktionsgefäße nach Schutzanspruch 3 und 4 vorhanden sind.

6.) Eine elektrische Apparatur,

dadurch gekennzeichnet,

daß diese die im Verlauf der Polymerasekettenreaktion gemessenen Parameter (es sind dies die elektrische Leitfähigkeit, Temperatur, Zykluszahl und Zeit) registriert und sinnvoll verknüpft.

7.) Ein Thermocycler nach Schutzanspruch 1-4 mit der Möglichkeit zur abschließenden Schmelzkurvenanalyse,

zusätzlich dadurch gekennzeichnet,

daß während der Schmelzkurvenanalyse die elektrische Leitfähigkeit gemessen wird.

