



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 36 50 679 T3** 2004.10.21

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 505 012 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **P 36 50 679.6**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 201 244.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **27.03.1986**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.09.1992**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **06.05.1998**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **21.01.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.10.2004**

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

C12P 19/34, C12N 15/10

(30) Unionspriorität:

716975 **28.03.1985** **US**

791308 **25.10.1985** **US**

(73) Patentinhaber:

F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

(72) Erfinder:

Mullis, Kary Banks, Kensington, California 94708,

US

(54) Bezeichnung: **Oligonukleotide zur Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen und zur Anknüpfung einer Promotersequenz**

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 ein erstes und zweites einzelsträngiges Oligonucleotid, das die exponentielle Amplifikation von vorhandenen Nucleinsäuresequenzen und die Anknüpfung einer Promotorsequenz erlaubt. Genauer gesagt betrifft sie Oligonucleotide, die in einem Verfahren zur Herstellung einer beliebigen bestimmten Nucleinsäuresequenz von einer bestimmten DNA- oder RNA-Sequenz in Mengen, die im Vergleich zur ursprünglich vorhandenen Menge groß sind, verwendet werden können. Die DNA oder RNA kann einzelsträngig oder doppelsträngig und kann eine relativ reine Spezies oder ein Bestandteil eines Nucleinsäuregemisches sein. Die Oligonucleotide verwenden eine Wiederholungsreaktion zum Erreichen der Amplifikation der gewünschten Nucleinsäuresequenz und zur Anknüpfung einer Promotorsequenz.

[0002] Insbesondere bei diagnostischen Anwendungen kann die Zielnucleinsäuresequenz nur ein kleiner Teil der interessierenden DNA oder RNA sein, so daß der Nachweis ihres Vorhandenseins unter Verwendung von nicht isotoopenmarkierten oder endmarkierten Oligonucleotidsonden schwer sein kann. Es wurde viel Mühe darauf verwendet, die Sensitivität von Sondennachweissystemen zu erhöhen, es wurden jedoch wenig Untersuchungen zur Amplifikation der Zielsequenz durchgeführt, um ausreichende Mengen zum leichten Nachweis mit heutigen Verfahren zu erhalten.

[0003] Mehrere Verfahren zur Synthese von Nucleinsäuren de novo oder von einer vorhandenen Sequenz wurden in der Literatur beschrieben. Diese Verfahren können große Mengen einer bestimmten Nucleinsäure einer vollständig bestimmten Sequenz produzieren.

[0004] Ein bekanntes Verfahren zur de novo-Synthese von Nucleinsäuren schließt die organische Synthese einer Nucleinsäure aus Nucleosidderivaten ein. Diese Synthese kann in einer Lösung oder auf einem festem Träger durchgeführt werden. Ein Typ eines organischen Syntheseverfahrens ist das Phosphotriesterverfahren, das zur Herstellung von Genfragmenten oder kurzen Genen verwendet wurde. Im Phosphotriesterverfahren werden Oligonucleotide, die anschließend unter Bildung von längeren Nucleinsäuren zusammengefügt werden können, hergestellt. Für eine Beschreibung dieses Verfahrens vgl. S. A. Narang et al., Meth. Enzymol. 68 (1979), 90, und das US-Patent Nr. 4,356,270. Das Patent beschreibt die Synthese und Clonierung des Somatostatingens.

[0005] Ein zweiter Typ eines organischen Syntheseverfahrens ist das Phosphodiesterverfahren, das zur Herstellung eines tRNA-Gens verwendet wurde. Vgl. E. L. Brown et al., Meth. Enzymol. 68 (1979), 109, für eine Beschreibung dieses Verfahrens. Wie im Phosphotriesterverfahren umfaßt das Phosphodiesterverfahren die Synthese von Oligonucleotiden, die anschließend zur Herstellung der gewünschten Nucleinsäure zusammengefügt werden.

[0006] Obwohl die vorstehend beschriebenen de novo-Syntheseverfahren zur Synthese von langen Nucleinsäuresträngen verwendet werden können, sind sie zur Synthese von großen Nucleinsäuremengen nicht sehr praktisch. Beide Verfahren sind arbeitsintensiv und zeitaufwendig, benötigen kostspielige Geräte und Reagenzien und haben eine geringe Gesamteffizienz. Die geringe Gesamteffizienz kann durch eine ineffiziente Synthese der Oligonucleotide und ineffiziente Verknüpfungsreaktionen verursacht sein. Zur Synthese einer langen Nucleinsäure oder selbst zur Synthese einer großen Menge einer kürzeren Nucleinsäure müßten viele Oligonucleotide synthetisiert werden und viele Verknüpfungsreaktionen wären erforderlich. Daher wären diese Verfahren zur Synthese großer Mengen einer beliebigen gewünschten Nucleinsäure nicht praktisch.

[0007] Ferner gibt es Verfahren zur Herstellung von großen Nucleinsäuremengen aus kleinen Mengen anfänglich vorhandener Nucleinsäuren. Diese Verfahren umfassen die Clonierung einer Nucleinsäure in einem geeigneten Wirtssystem, wobei die gewünschte Nucleinsäure in einen geeigneten zur Transformation des Wirts verwendeten Vektor inseriert wird. Bei der Züchtung des Wirts wird der Vektor repliziert, und dadurch werden mehr Kopien der gewünschten Nucleinsäure produziert. Für eine kurze Beschreibung der Subclonierung von Nucleinsäurefragmenten vgl. T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory S. 390–401 (1982). Vgl. ferner die Verfahren, die in den US-Patenten mit den Nrn. 4,416,988 und 4,403,036 offenbart sind.

[0008] Ein drittes im US-Patent Nr. 4,293,652 offenbartes Verfahren zur Synthese von Nucleinsäuren ist ein Hybrid der vorstehend beschriebenen Verfahren der organischen Synthese und molekularen Clonierung. In diesem Verfahren wird die passende Zahl von Oligonucleotiden zur Darstellung der gewünschten Nucleinsäuresequenz organisch synthetisiert und nacheinander in einen Vektor inseriert, der vor jeder nachfolgenden Insertion durch Züchtung amplifiziert wird.

[0009] Der Pharmacia-Katalog "Molecular Biologicals" (1984) beschreibt "Gene Cartridges", d.h. trp-Promotor/Operator enthaltende doppelsträngige Restriktionsfragmente. Dieses Dokument beschreibt jedoch nicht die Verwendung dieser Fragmente zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz, und selbst bei einer Verwendung zur Amplifikation erlauben diese Fragmente nicht die Bindung einer Promotorsequenz an ein Ende der amplifizierten Nucleinsäure.

[0010] Das erfindungsgemäße Verfahren weist eine gewisse Ähnlichkeit zu dem molekularen Clonierungsverfahren auf; es beinhaltet jedoch nicht die Vermehrung irgendeines Organismus und vermeidet daher die damit zusammenhängenden möglichen Risiken oder den Aufwand dafür. Für dieses Verfahren ist ferner die Synthese von mit der gewünschten Sequenz nicht verwandten Nucleinsäuresequenzen nicht erforderlich, und daher beseitigt die vorliegende Erfindung die Notwendigkeit einer ausgiebigen Reinigung des Produkts von einem komplizierten biologischen Gemisch.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft ein erstes und zweites einzelsträngiges Oligonucleotid (Primer), das die exponentielle Amplifikation von einer oder mehreren spezifischen, in einer Nucleinsäure oder einem Gemisch davon vorhandenen Nucleinsäuresequenzen und die Anknüpfung einer Promotorsequenz erlaubt. Das Extensionsprodukt eines Primers wird nach seiner Hybridisierung an den anderen eine Matrize zur Herstellung der gewünschten spezifischen Nucleinsäuresequenz und umgekehrt, und das Verfahren wird so oft wiederholt, wie es zur Produktion der gewünschten Menge der Sequenz erforderlich ist. Es wird angenommen, daß dieses Verfahren effizienter als die vorstehend für die Produktion großer Mengen von Nucleinsäuren aus einer Zielsequenz beschriebenen Verfahren ist und diese Nucleinsäure in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum produziert. Das Verfahren ist zur Amplifikation seltener in einem Gemisch von Nucleinsäuren vorhandener Nucleinsäurespezies zum effektiven Nachweis dieser Spezies besonders nützlich.

[0012] Von Kleppe et al., J. Mol. Biol. 56 (1971), 341 wird ein Verfahren zur Synthese von DNA unter Verwendung einer Primer-initiierten durch die Matrize gesteuerten Reparaturreplikation beschrieben, und es wird darauf hingewiesen, daß Replikationszyklen wiederholt werden können, wobei jedesmal eine frische Dosis DNA-Polymerase zugesetzt wird. Es wird jedoch nicht vorgeschlagen, daß Primerextensionsprodukte vollständig genug sein müssen, um stabile Primer-Matrizen-Komplexe bilden zu können, um als Matrizen für Primer in den anschließenden Runden der Primerverlängerung zu dienen, und daß nur durch Bildung dieser Komplexe und durch Verwendung von vollständigen Matrizen in anschließenden Runden eine exponentielle in vitro-Amplifikation möglich ist.

[0013] Genauer gesagt stellt die vorliegende Erfindung ein erstes und zweites einzelsträngiges Oligonucleotid bereit, das die exponentielle Amplifikation einer spezifischen in einer einzel- oder doppelsträngigen Nucleinsäure oder einem Gemisch von solchen Nucleinsäuren enthaltenen Nucleinsäuresequenz durch Polymerasekettenreaktion erlaubt: wobei

- (a) ein Oligonucleotid dieser Oligonucleotide zu dieser einzelsträngigen Nucleinsäure oder zu einem Strang dieser doppelsträngigen Nucleinsäure im wesentlichen komplementär ist;
- (b) das andere Oligonucleotid dieser Oligonucleotide zu einem komplementären Strang dieser einzelsträngigen Nucleinsäure oder zu dem anderen Strang dieser doppelsträngigen Nucleinsäure im wesentlichen komplementär ist;
- (c) eines dieser Oligonucleotide zusätzlich eine Sequenz enthält, die zu dieser Nucleinsäure nicht komplementär ist, wobei diese Sequenz eine Promotorsequenz ist; und wobei
- (d) die Teile dieser Oligonucleotide mit wesentlicher Komplementarität die Enden der spezifischen zu amplifizierenden Nucleinsäuresequenz definieren.

[0014] Das europäische Patent Nr. 0 200 362 offenbart Verfahren zum Nachweis und zur Clonierung von amplifizierten Nucleinsäuresequenzen, wobei diese Sequenzen unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens amplifiziert wurden, und die vorliegende Anmeldung wird von der europäischen Anmeldung Nr. 86 30 2299.2 geteilt.

[0015] Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können nicht nur zur Herstellung von großen Mengen einer vorhandenen Nucleinsäure mit einer vollständig bestimmten Sequenz, sondern auch zur Herstellung von Nucleinsäuresequenzen, die bekanntermaßen existieren, jedoch nicht vollständig bestimmt sind, verwendet werden, und zur anschließenden Transkription der amplifizierten Nucleinsäuren muß in jedem der Fälle eine anfängliche Kopie der zu amplifizierenden Sequenz verfügbar sein, obwohl sie nicht rein oder ein diskretes Molekül sein muß.

[0016] Fig. 1 zeigt ein 94 bp-Sequenz von menschlichem β -Globin, dessen Amplifikation gewünscht wird. Die

mit der Sichelzellanämie zusammenhängende Veränderung eines einzelnen Basenpaars ist unterhalb des 94-mers dargestellt.

[0017] Fig. 2 zeigt ein Autoradiogramm einer Polyacrylamidgelelektrophorese, das die Amplifikation des 94-mers, das in menschlicher Wildtyp-DNA und in einem ein 1,9 kb-BamHI-Fragment des normalen β -Globin-enthaltenden Plasmid (mit der Bezeichnung pBR328:HbA) enthalten ist, zeigt.

[0018] Fig. 3 zeigt ein Autoradiogramm einer Polyacrylamidgelelektrophorese, das die Amplifikation einer beliebigen spezifischen 94-mer-Zielsequenz zeigt, die in pBR328:HbA, einem Plasmid, das ein 1,9 kb-BamHI-Fragment des Sichelzellenallels des β -Globins (mit der Bezeichnung pBR328:HbS) enthält, in pBR328:HbA, in dem die zu amplifizierende Sequenz mit MstII gespalten wird, und in pBR328:HbS, in dem die zu amplifizierende Sequenz mit MstII behandelt, jedoch nicht gespalten wird, vorhanden ist. Fig. 4 zeigt genau die Schritte und Produkte der Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation der gewünschten 94-mer-Sequenz des menschlichen β -Globins über drei Zyklen unter Verwendung von zwei Oligonucleotidprimern.

[0019] Fig. 5 zeigt ein Autoradiogramm einer Polyacrylamidgelelektrophorese, das die Amplifikation einer 240-mer-Sequenz in pBR328:HbA nach vier Zyklen zeigt, wobei die Aliquots mit NcoI (Bahn 3), MstII (Bahn 4) oder HinfI (Bahn 5) gespalten werden. Bahn 1 enthält den Molekulargewichtsstandard und Bahn 2 das intakte 240 bp-Produkt.

[0020] Fig. 6 zeigt die Sequenz der normalen (β^A) und Sichelzell (β^S)- β -Globingene im Bereich der DdeI- und HinfI-Restriktionsstellen, wo die einzelnen Linien für β^A die Position der DdeI-Stelle (CTGAG) und die doppelten Balken für β^A und β^S die Position der HinfI-Stelle (GACTC) markieren.

[0021] Fig. 7 zeigt die Ergebnisse der sequentiellen Spaltung des normalen β -Globins unter Verwendung einer 40-mer-Sonde und des DdeI- und anschließend des HinfI-Restriktionsenzym.

[0022] Fig. 8 zeigt die Ergebnisse der sequentiellen Spaltung des Sichelzell- β -Globins unter Verwendung der gleichen 40-mer-Sonde wie in Fig. 7 und des DdeI- und anschließend HinfI-Restriktionsenzym.

[0023] Fig. 9 zeigt ein Autoradiogramm einer Polyacrylamidgelelektrophorese, das die Verwendung der gleichen 40-mer-Sonde wie in Fig. 7 zur spezifischen Charakterisierung der beta-Globin-Allele zeigt, die in Proben von menschlicher Gesamt-DNA, die einer Amplifikation durch das erfindungsgemäße Verfahren unterzogen wurde, vorhanden sind.

[0024] Fig. 10 zeigt eine Aufnahme eines 6% NuSieve-Agarosegels, das unter Verwendung von Ethidiumbromid und UV-Licht sichtbar gemacht wurde. Diese Aufnahme zeigt die Amplifikation eines Unterfragments eines 110 bp-Amplifikationsprodukts, wobei das Unterfragment ein innen angeordneter Satz innerhalb des 110 bp-Fragments ist.

[0025] Der Begriff "Oligonucleotid", wie hier in Bezug auf Primer, Sonden, nachzuweisende Oligomerfragmente, Oligomerkontrollen und nicht-markierte blockierende Oligomere verwendet, ist als ein Molekül, das aus zwei oder mehr Desoxyribonucleotiden oder Ribonucleotiden, vorzugsweise mehr als drei, besteht, definiert. Seine exakte Größe hängt von vielen Faktoren ab, die wiederum von der letztendlichen Funktion oder Verwendung des Oligonucleotids abhängen.

[0026] Der Begriff "Primer", wie hier verwendet, meint ein Oligonucleotid, ungeachtet ob es natürlich vorkommt, wie in einem gereinigten Restriktionsspaltungsansatz, oder synthetisch produziert wird, das als Initiationsstelle der Synthese wirken kann, wenn Bedingungen herrschen, bei denen die Synthese eines zu einem Nucleinsäurestrang komplementären Primerverlängerungsproduktes induziert wird, d. h. in Gegenwart von Nucleotiden und eines Induktionsmittels, wie einer DNA-Polymerase, und einer geeigneten Temperatur und eines geeigneten pH-Werts. Der Primer ist für eine maximale Effizienz der Amplifikation einzelsträngig. Der Primer ist vorzugsweise ein Oligodesoxyribonucleotid. Der Primer muß ausreichend lang sein, um die Synthese der Verlängerungsprodukte in Gegenwart des Induktionsmittels zu primen. Die genaue Länge der Primer hängt von vielen Faktoren, einschließlich der Temperatur, Quelle des Primers und des verwendeten Verfahrens, ab. Für diagnostische Anwendungen enthält der Oligonucleotidprimer beispielsweise üblicherweise je nach der Komplexität der Zielsequenz 15 bis 25 oder mehr Nucleotide, obwohl er weniger Nucleotide enthalten kann. Für andere Anwendungen ist der Oligonucleotidprimer üblicherweise kürzer, z. B. 7 bis 15 Nucleotide. Diese kurzen Primermoleküle erfordern üblicherweise kühlere Temperaturen, um ausreichend stabile Hybridkomplexe mit der Matrize zu bilden.

[0027] Die hier beschriebenen Primer werden so gewählt, daß sie "im wesentlichen" zu den verschiedenen Strängen von jeder spezifischen zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind. Dies bedeutet, daß die Primer zur Hybridisierung mit ihren jeweiligen Strängen ausreichend komplementär sein müssen. Somit muß die Primersequenz nicht die genaue Sequenz der Matrize widerspiegeln. Einer der zur Amplifikation verwendeten Primer enthält ferner eine zur amplifizierten Sequenz nicht komplementäre Promotorsequenz. Nicht-komplementäre Basen oder längere Sequenzen können hier und da in den Primer eingefügt werden, vorausgesetzt, daß die Primersequenz eine ausreichende Komplementarität zu der Sequenz des zu amplifizierenden Strangs aufweist, um daran zu hybridisieren und dabei eine Matrize zur Synthese des Verlängerungsprodukts des anderen Primers zu bilden.

[0028] Wie hier verwendet, meinen die Begriffe "Restriktionsendonucleasen" und "Restriktionsenzyme" bakterielle Enzyme, von denen jedes doppelsträngige DNA an oder in der Nähe einer spezifischen Nucleotidsequenz spaltet.

[0029] Wie hier verwendet, meint der Begriff "DNA-Polymorphismus" den Zustand, bei dem zwei oder mehrere verschiedene Nucleotidsequenzen an einer bestimmten Stelle in der DNA vorkommen.

[0030] Der Begriff "Polymorphismus der Restriktionsfragmentlänge" ("RFLP") meint die Unterschiede der einzelnen Moleküle bezüglich der Länge der durch Spaltung mit einem bestimmten Restriktionsenzym gebildeten Restriktionsfragmente.

[0031] Die erfindungsgemäße Verwendung umfaßt einzelsträngige Oligonucleotide, die in einem Verfahren zur exponentiellen Amplifikation einer beliebigen oder von mehreren wunschgemäßen spezifischen Nucleinsäuresequenzen, die in einer Nucleinsäure gefunden werden, durch Polymerasekettenreaktion, und zur Anknüpfung einer Promotorsequenz verwendet werden können. Da große Mengen einer spezifischen Sequenz durch dieses Verfahren produziert werden können, kann die vorliegende Erfindung zur Erhöhung der Clonierungseffizienz von DNA oder Messenger-RNA und zur Amplifikation einer Zielsequenz zur Erleichterung ihres Nachweises verwendet werden. Die vorliegende Erfindung kann ferner zum Erhalt von großen Mengen der gewünschten Sequenz aus einem durch eine fehlerhafte chemische Synthese erhaltenen Gemisch von Nucleinsäuren verwendet werden.

[0032] Üblicherweise können die erfindungsgemäßen einzelsträngigen Oligonucleotide in einem Verfahren verwendet werden, das eine Kettenreaktion zur Herstellung von mindestens einer spezifischen Nucleinsäuresequenz in exponentiellen Mengen relativ zur Zahl der beteiligten Reaktionsschritte umfaßt, unter der Voraussetzung, daß (a) die Enden der erforderlichen Sequenz in ausreichender Genauigkeit bekannt sind, so daß an sie hybridisierende Oligonucleotide synthetisiert werden können, und (b) eine kleine Menge der Sequenz zur Initiation der Kettenreaktion verfügbar ist. Das Produkt der Kettenreaktion ist ein diskretes Nucleinsäureduplexmolekül mit Termini, die den Enden der verwendeten spezifischen Primer entsprechen.

[0033] Jede beliebige Quelle von Nucleinsäure, in gereinigter oder nicht-gereinigter Form kann als Ausgangsnucleinsäure oder -säuren verwendet werden, vorausgesetzt, daß sie die gewünschte spezifische Nucleinsäuresequenz enthält oder vermutlich enthält. Daher kann das Verfahren beispielsweise DNA oder RNA, einschließlich Messenger-RNA, verwenden, wobei die DNA oder RNA einzelsträngig oder doppelsträngig sein kann. Ferner kann ein DNA-RNA-Hybrid, das einen Strang von jeder Nucleinsäure enthält, verwendet werden. Ferner kann ein Gemisch jeglicher dieser Nucleinsäuren verwendet werden, oder die Nucleinsäuren, die von einer hier zuvor durchgeführten Amplifikationsreaktion unter Verwendung der gleichen oder verschiedener Primer produziert wurden, können verwendet werden. Die zu amplifizierende spezifische Nucleinsäuresequenz kann nur eine Fraktion eines größeren Moleküls sein oder anfänglich als ein diskretes Molekül vorhanden sein, so daß die spezifische Sequenz die vollständige Nucleinsäure darstellt. Die zu amplifizierende Sequenz muß anfänglich nicht in reiner Form vorhanden sein; sie kann eine kleinere Fraktion eines komplexen Gemisches sein, wie ein Teil des β -Globingens, das in menschlicher Gesamt-DNA enthalten ist, oder ein Teil einer Nucleinsäuresequenz eines bestimmten Mikroorganismus sein, wobei der Organismus nur eine sehr kleine Fraktion einer bestimmten biologischen Probe darstellt. Die Ausgangsnucleinsäure kann mehr als eine gewünschte spezifische Nucleinsäuresequenz, die gleich oder verschieden sein kann, enthalten. Daher können die vorliegenden Oligonucleotide nicht nur zur Herstellung von großen Mengen einer spezifischen Nucleinsäuresequenz verwendet werden, sondern auch zur gleichzeitigen Amplifikation von mehr als einer unterschiedlichen spezifischen Nucleinsäuresequenz, die auf den gleichen oder verschiedenen Nucleinsäuremolekülen liegt.

[0034] Die Nucleinsäure oder -säuren können von jeder beliebigen Quelle erhalten werden, beispielsweise von Plasmiden, wie pBR322, von clonierter DNA oder RNA oder von natürlicher DNA oder RNA von einer be-

liebigen Quelle, einschließlich Bakterien, Hefe, Viren und höheren Organismen, wie Pflanzen oder Tieren. DNA oder RNA kann aus Blut, Gewebematerial, wie Chorionzotten oder Amnionzellen, durch eine Reihe von Verfahren, wie die von Maniatis et al., *Molecular Cloning* (1980), 280–281, extrahiert werden.

[0035] Jegliche spezifische Nucleinsäuresequenz kann mit den erfindungsgemäßen Oligonucleotiden produziert werden. Es ist nur erforderlich, daß eine ausreichende Zahl von Basen an beiden Enden der Sequenz in ausreichender Genauigkeit bekannt ist, so daß zwei einzelsträngige Oligonucleotide hergestellt werden können, die mit verschiedenen Strängen der gewünschten Sequenz und mit den entsprechenden Positionen entlang der Sequenz hybridisieren, so daß ein von einem Primer synthetisiertes Verlängerungsprodukt nach seiner Trennung von seiner Matrize (Komplement) als Matrize zur Verlängerung des anderen Primers in eine Nucleinsäure von definierter Länge dienen kann. Je größer die Kenntnisse über die Basen an beiden Enden der Sequenz sind, desto größer kann die Spezifität der Primer für die Zielnucleinsäuresequenz und daher die Effizienz des Verfahrens sein. Es ist selbstverständlich, daß sich der Begriff Primer, wie hier nachstehend verwendet, auf mehr als einen Primer bezieht, besonders dann, wenn es eine Mehrdeutigkeit in der Information in Bezug auf die terminale Sequenzen) des zu amplifizierenden Fragments gibt. Wenn beispielsweise eine Nucleinsäuresequenz von der Proteinsequenzinformation abgeleitet wird, wird ein Satz von Primern, der Sequenzen, die alle möglichen Codonvariationen auf der Basis der Degeneriertheit des genetischen Codes repräsentieren, enthält, für jeden Strang verwendet. Ein Primer dieses Satzes ist zu 100% zu dem Ende der zu amplifizierenden gewünschten Sequenz homolog.

[0036] Die Oligonucleotidprimer können unter Verwendung eines beliebigen geeigneten Verfahrens, wie beispielsweise den vorstehend beschriebenen Phosphotriester- und Phosphodiesterverfahren oder den automatisierten Ausführungsformen davon, hergestellt werden. In einer dieser automatisierten Ausführungsformen werden Diethylphosphoramidite als Ausgangsmaterialien verwendet und können, wie von Beaucage et al., *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859–1862, beschrieben, synthetisiert werden. Ein Verfahren zur Synthese von Oligonucleotiden auf einem modifizierten festen Träger wird im US-Patent Nr. 4,458,066 beschrieben. Es ist ferner möglich, einen Primer zu verwenden, der von einer biologischen Quelle (beispielsweise von Restriktionsendonuclease-Spaltprodukten) isoliert wurde.

[0037] Die spezifische Nucleinsäuresequenz wird unter Verwendung der diese Sequenz als Matrize enthaltenden Nucleinsäure hergestellt. Wenn die Nucleinsäure zwei Stränge enthält, müssen die Nucleinsäurestränge vor ihrer Verwendung als Matrize entweder in einem separaten Schritt oder gleichzeitig mit der Synthese der Primerverlängerungsprodukte getrennt werden. Diese Strangtrennung kann durch jedes beliebige geeignete Verfahren, einschließlich physikalischer, chemischer oder enzymatischer Mittel, durchgeführt werden. Ein physikalisches Verfahren zur Trennung der Nucleinsäurestränge umfaßt die Erhitzung der Nucleinsäure bis zu ihrer vollständigen (> 99 %) Denaturierung. Eine typische Hitzedenaturierung kann Temperaturen im Bereich von etwa 80 bis 105°C über Zeiträume von etwa 1 bis 10 Minuten umfassen. Die Strangtrennung kann ferner durch ein Enzym der Klasse von als Helicasen bezeichneten Enzymen oder das Enzym RecA, das eine Helicaseaktivität aufweist und bekanntermaßen DNA in Gegenwart von riboATP denaturiert, induziert werden. Die zur Trennung der Nucleinsäurestränge mit Helicasen geeigneten Reaktionsbedingungen werden von Kuhn Hoffmann-Berling, *CSH-Quantitative Biology* 43 (1978), 63, beschrieben, und Verfahren zur Verwendung von RecA werden in C. Radding, *Ann. Rev. Genetics* 16 (1982), 405-37, zusammengefaßt.

[0038] Wenn die die zu amplifizierende Sequenz enthaltende ursprüngliche Nucleinsäure einzelsträngig ist, wird ihr Komplement durch Zugabe eines oder zweier Oligonucleotidprimer synthetisiert. Wenn ein passender einzelner Primer zugesetzt wird, wird ein Primerverlängerungsprodukt in Gegenwart des Primers, eines Induktors oder Katalysators der Synthese und der nachstehend beschriebenen vier Nucleotide synthetisiert. Das Produkt ist zur einzelsträngigen Nucleinsäure partiell komplementär und hybridisiert mit dem Nucleinsäurestrang, wobei ein Duplexmolekül von ungleich langen Strängen gebildet wird, die anschließend in Einzelstränge, wie vorstehend beschrieben, getrennt werden können, um zwei einzelne getrennte komplementäre Stränge herzustellen. Alternativ können zwei passende Primer zur einzelsträngigen Nucleinsäure zugesetzt und die Reaktion durchgeführt werden.

[0039] Wenn die ursprüngliche Nucleinsäure die zu amplifizierende Sequenz darstellt, ist (sind) das (die) produzierte(n) Primerverlängerungsprodukt(e) zu den Strängen der ursprünglichen Nucleinsäure vollständig komplementär und hybridisiert damit, wobei ein Duplexmolekül von gleich langen Strängen, die in einzelsträngige Moleküle getrennt werden sollen, gebildet wird.

[0040] Wenn die komplementären Stränge der Nucleinsäure oder -säuren getrennt werden, ungeachtet ob die Nucleinsäure ursprünglich doppel- oder einzelsträngig war, sind die Stränge zur Verwendung als Matrize

zur Synthese von weiteren Nucleinsäuresträngen einsatzbereit. Diese Synthese kann unter Verwendung jeglicher geeigneten Verfahren durchgeführt werden. Üblicherweise erfolgt sie in einer gepufferten wäßrigen Lösung, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 7 bis 9, am meisten bevorzugt von etwa 8. Vorzugsweise wird ein molarer Überschuß (bei clonierten Nucleinsäuren üblicherweise etwa 1000:1 an Primer:Matrize und bei genomischer Nucleinsäure üblicherweise etwa 10^6 :1 an Primer:Matrize) der beiden Oligonucleotidprimer dem die getrennten Matrizenstränge enthaltenden Puffer zugesetzt. Es ist jedoch selbstverständlich, daß die Menge des komplementären Strangs nicht bekannt ist, wenn das hier beschriebene Verfahren für diagnostische Anwendungen verwendet wird, so daß die Menge an Primer relativ zur Menge an komplementärem Strang nicht mit Sicherheit ermittelt werden kann. Aus praktischen Gründen ist jedoch die zugesetzte Primermenge üblicherweise in einem molaren Überschuß zur Menge an komplementärem Strang (Matrize), wenn die zu amplifizierende Sequenz in einem Gemisch von komplizierten langkettigen Nucleinsäuresträngen enthalten ist. Ein großer molarer Überschuß wird zur Erhöhung der Effizienz des Verfahrens bevorzugt.

[0041] Die Desoxyribonucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und TTP werden ebenfalls dem Synthesegemisch in geeigneten Mengen zugesetzt, und die erhaltene Lösung wird auf etwa 90 bis 100°C von etwa 1 bis etwa 10 Minuten, vorzugsweise 1 bis 4 Minuten, erhitzt. Nach diesem Erwärmungszeitraum läßt man die Lösung auf Raumtemperatur, die für die Primerhybridisierung bevorzugt wird, abkühlen. Dem abgekühlten Gemisch wird ein geeignetes Mittel zur Induktion oder Katalyse der Primerextensionsreaktion (hier als "Induktionsmittel" bezeichnet) zugesetzt, und die Reaktion kann unter im Stand der Technik bekannten Bedingungen erfolgen. Diese Synthesereaktion kann bei Raumtemperatur bis zu einer Temperatur, oberhalb der das Induktionsmittel nicht mehr effizient funktioniert, erfolgen. Wenn daher beispielsweise die DNA-Polymerase als Induktionsmittel verwendet wird, ist die Temperatur allgemein nicht höher als etwa 40°C. Am besten erfolgt die Reaktion bei Raumtemperatur.

[0042] Das Induktionsmittel kann jegliche Verbindung oder jegliches System einschließlich Enzyme sein, das die Synthese der Primerextensionsprodukte bewirkt. Geeignete Enzyme für diesen Zweck schließen beispielsweise die E. coli-DNA-Polymerase I, das Klenowfragment der E. coli-DNA-Polymerase I, die T4-DNA-Polymerase, andere verfügbare DNA-Polymerasen, die Reverse Transkriptase und andere Enzyme, einschließlich hitzestabile Enzyme ein, die die Kombination der Nucleotide in geeigneter Weise erleichtern, um die zu jedem Nucleinsäurestrang komplementären Primerextensionsprodukte zu bilden. Üblicherweise wird die Synthese am 3'-Ende jedes Primers initiiert und in 5'-Richtung entlang des Matrizenstrangs fortgesetzt, bis die Synthese beendet ist, wobei Moleküle von unterschiedlichen Längen produziert werden. Es kann jedoch Induktionsmittel geben, die die Synthese unter Verwendung des gleichen vorstehend beschriebenen Verfahrens am 5'-Ende initiieren und in der anderen Richtung fortsetzen.

[0043] Der neu synthetisierte Strang und sein komplementärer Nucleinsäurestrang bilden ein doppelsträngiges Molekül, das in den folgenden Schritten des Verfahrens verwendet wird. Im nächsten Schritt werden die Stränge des doppelsträngigen Moleküls unter Verwendung eines beliebigen vorstehend beschriebenen Verfahrens getrennt, um einzelsträngige Moleküle zu erhalten.

[0044] Die neue Nucleinsäure wird auf einzelsträngigen Molekülen synthetisiert. Weitere Induktionsmittel, Nucleotide und Primer können zugesetzt werden, falls sie erforderlich sind, um die Reaktion unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen fortzusetzen. Erneut wird die Synthese an einem Ende der Oligonucleotidprimer initiiert und entlang der einzelnen Stränge der Matrize fortgesetzt, um weitere Nucleinsäuren zu produzieren. Nach diesem Schritt besteht die Hälfte des Verlängerungsproduktes aus der von den beiden Primern gebundenen spezifischen Nucleinsäuresequenz.

[0045] Die Schritte der Strangtrennung und der Synthese des Extensionsprodukts können so oft wie zur Produktion der gewünschten Menge der spezifischen Nucleinsäuresequenz erforderlich wiederholt werden. Wie nachstehend genauer beschrieben, akkumuliert die Menge der produzierten spezifischen Nucleinsäuresequenz in einer exponentiellen Weise.

[0046] Wenn die Produktion von mehr als einer spezifischen Nucleinsäuresequenz von der ersten Nucleinsäure oder einem Gemisch von Nucleinsäuren gewünscht wird, werden eine passende Zahl von verschiedenen Oligonucleotidprimern verwendet. Wenn beispielsweise zwei unterschiedliche spezifische Nucleinsäuresequenzen produziert werden sollen, werden vier Primer verwendet. Zwei der Primer sind für eine der spezifischen Nucleinsäuresequenzen spezifisch und die beiden anderen Primer sind für die zweite spezifische Nucleinsäuresequenz spezifisch. So kann jede der beiden unterschiedlichen spezifischen Sequenzen durch das erfindungsgemäße Verfahren exponentiell produziert werden.

[0047] Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können in einem exponentiellen Amplifikationsverfahren verwendet werden, das schrittweise unter Zugabe von neuen Reagenzien nach jedem Schritt, gleichzeitig unter Zugabe aller Reagenzien im anfänglichen Schritt oder teilweise schrittweise und teilweise gleichzeitig unter Zugabe von frischem Reagenz nach einer bestimmten Zahl von Schritten durchgeführt wird. Wenn ein Verfahren zur Strangtrennung, wie durch Erhitzen, verwendet wird, das das Induktionsmittel, wie bei einem hitzelabilen Enzym, inaktiviert, dann ist die Erneuerung des Induktionsmittels nach jedem Strangtrennungsschritt erforderlich. Das gleichzeitige Verfahren kann verwendet werden, wenn ein enzymatisches Mittel für den Strangtrennungsschritt verwendet wird. Im gleichzeitigen Verfahren kann das Reaktionsgemisch neben dem Nucleinsäurestrang (den Nucleinsäuresträngen), der (die) die gewünschte Sequenz enthält (enthalten), das strangtrennende Enzym (z. B. Helicase), eine geeignete Energiequelle für das strangtrennende Enzym, wie rATP, die vier Nucleotide, die Oligonucleotidprimer in molarem Überschuß und das Induktionsmittel, z. B. Klenowfragment der E. coli-DNA-Polymerase I, enthalten. Bei Verwendung von Wärme zur Denaturierung in einem gleichzeitigen Verfahren kann ein hitzestabiles Induktionsmittel, wie eine thermostabile Polymerase, das bei einer erhöhten Temperatur, vorzugsweise 65 bis 90°C je nach Induktionsmittel, tätig ist, wobei die Nucleinsäure bei dieser Temperatur aus Einzel- und Doppelsträngen im Gleichgewicht besteht, verwendet werden. Für kürzere Nucleinsäuren können geringere Temperaturen von etwa 50°C verwendet werden. Die obere Temperatur hängt von der Temperatur ab, bei der das Enzym abgebaut wird, oder der Temperatur, oberhalb der ein unzureichendes Niveau der Primerhybridisierung existiert. Ein solches hitzestabiles Enzym wird z. B. von A. S. Kaledin et al., Biokhimiya 45 (1980), 644–651, beschrieben. Jeder Schritt des Verfahrens erfolgt sequentiell, obwohl zu Beginn alle Reagenzien vorhanden sind. Weitere Materialien können, falls erforderlich, zugesetzt werden. Nach einem ausreichenden Zeitraum zur Produktion der gewünschten Menge der spezifischen Nucleinsäuresequenz kann die Reaktion durch Inaktivierung der Enzyme in jeder bekannten Weise oder Trennung der Bestandteile der Reaktion beendet werden.

[0048] Ein Verfahren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Oligonucleotide kann kontinuierlich durchgeführt werden. In einer Ausführungsform eines automatisierten Verfahrens kann die Reaktion einen Zyklus aus einem denaturierenden Abschnitt, Reagenzzugabeabschnitt und Reaktionsabschnitt durchlaufen. In einer anderen Ausführungsform kann das zur Synthese der Primerverlängerungsprodukte verwendete Enzym in einer Säule immobilisiert werden. Die anderen Reaktionsbestandteile können kontinuierlich durch eine Pumpe durch die Säule und eine anschließende Heizspirale zirkuliert werden, so daß die produzierten Nucleinsäuren ohne Inaktivierung des Enzyms wiederholt denaturiert werden können.

[0049] Ein Verfahren, in dem die erfindungsgemäßen Oligonucleotide verwendet werden, ist nachstehend als Diagramm dargestellt, wobei doppelsträngige DNA, die die aus den komplementären Strängen [S⁺] und [S⁻] bestehende gewünschte Sequenz [S] enthält, als Nucleinsäure verwendet wird. Während der ersten und jeder anschließenden Reaktionszyklusverlängerung jedes Oligonucleotidprimers an der ursprünglichen Matrize wird ein neues ssDNA-Molekülprodukt von unbestimmter Länge mit nur einem der Primer am Ende produziert. Diese Produkte, hier nachstehend als "lange Produkte" bezeichnet, akkumulieren in einer linearen Weise; das heißt, die nach einer beliebigen Zahl von Zyklen vorhandene Menge ist proportional zur Zahl der Zyklen.

[0050] Die so hergestellten langen Produkte dienen als Matrizen für den einen oder anderen der Oligonucleotidprimer während der anschließenden Zyklen und produzieren Moleküle der gewünschten Sequenz [S⁺] oder [S⁻]. Diese Moleküle dienen ferner als Matrizen für den einen oder den anderen der Oligonucleotidprimer, wobei weitere [S⁺] und [S⁻] produziert werden, und so kann eine Kettenreaktion, die zu einer exponentiellen Akkumulation von [S] relativ zur Zahl der Zyklen führt, entstehen.

[0051] Nebenprodukte, die durch andere Oligonucleotidhybridisierungen als die beabsichtigten gebildet werden, sind nicht selbst-katalytisch (außer in seltenen Fällen) und akkumulieren daher in einer linearen Rate.

[0052] Die zu amplifizierende spezifische Sequenz [S] kann, wie folgt, als Diagramm dargestellt werden:

```
[S+]      5'  AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCC  3'
[S-]      3'  TTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG  5'
```

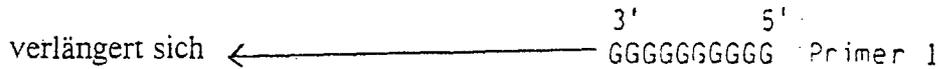
[0053] Die geeigneten Oligonucleotidprimer sind:

```
Primer 1:      GGGGGGGGGG
Primer 2:      AAAAAAAAAA
```

so daß, wenn die DNA, die [S]

...zzzzzzzzzzzzzzzzAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzzzzzzzzzz....
 ...zzzzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGzzzzzzzzzzzzzzzz....

enthält, in Einzelstränge getrennt wird und ihre Einzelstränge mit den Primern 1 und 2 hybridisiert werden, die nachstehenden Verlängerungsreaktionen durch die DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxyribonucleosidtriphosphate katalysiert werden können:

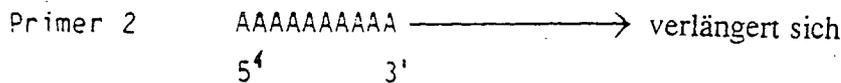


...zzzzzzzzzzzzzzzzAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzzzzzzzzzz....

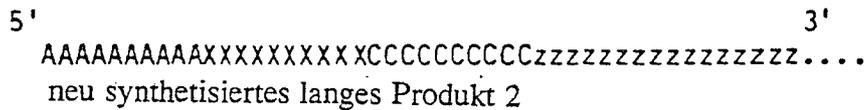
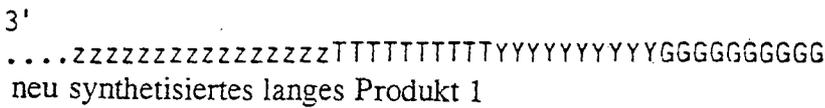
ursprünglicher Matrizenstrang⁺

ursprünglicher Matrizenstrang⁻

...zzzzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGzzzzzzzzzzzzzzzz....



[0054] Nach der Denaturierung der beiden gebildeten Duplexmoleküle sind die Produkte:



[0055] Wenn diese vier Stränge mit den Primern 1 und 2 im nächsten Zyklus erneut hybridisieren können, katalysiert das Induktionsmittel die nachstehenden Reaktionen:

Zahl der Doppelstränge nach 0 bis Zyklen

Zyklusnummer	Matrize	Länge Produkte	Spezifische Sequenz [S]
0	1	-	-
1	1	1	0
2	1	2	1
3	1	3	4
5	1	5	26
10	1	10	1013
15	1	15	32752
20	1	20	1048555
n	1	n	$(2^n - n - 1)$

[0059] Bei Verwendung einer einzelsträngigen Nucleinsäure als Matrize wird nur ein langes Produkt pro Zyklus gebildet.

[0060] Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide (Primer) können zur Clonierung einer bestimmten Nucleinsäuresequenz zur Insertion in einen geeigneten Expressionsvektor verwendet werden. Der Vektor kann anschließend zur Transformation eines geeigneten Wirtsorganismus zur Produktion des Genprodukts der Sequenz durch Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie verwendet werden.

[0061] Ferner können die Oligonucleotide zur in vitro-Mutagenese verwendet werden. Die Oligodesoxyribonucleotidprimer müssen zur DNA-Sequenz, die amplifiziert wird, nicht genau komplementär sein. Sie müssen nur eine ausreichende Hybridisierung mit der Sequenz zeigen, um durch das Polymeraseenzym oder durch ein beliebiges anderes Induktionsmittel verlängert zu werden. Das Produkt einer Polymerasekettenreaktion, bei der die verwendeten Primer zur ursprünglichen Matrize nicht genau komplementär sind, enthält die Sequenz des Primers anstelle der Matrize, wodurch eine in vitro-Mutation eingeführt wird. In weiteren Zyklen wird diese Mutation mit unverminderter Effizienz amplifiziert, da kein weiteres fehlgepaartes Primer erforderlich ist. Die so produzierte Mutante kann in einen geeigneten Vektor durch molekularbiologische Standardverfahren inseriert werden und kann diesem Vektor mutante Eigenschaften, wie das Potential zur Produktion von verändertem Protein, verleihen.

[0062] Das Verfahren zur Herstellung einer veränderten DNA-Sequenz, wie vorstehend beschrieben, kann mit der veränderten DNA unter Verwendung von verschiedenen Primern wiederholt werden, um weitere Sequenzänderungen zu induzieren. So kann allmählich eine Reihe von mutierten Sequenzen produziert werden, wobei jeder weitere Neuling der Reihe sich vom letzten geringfügig, von der Sequenz der ursprünglichen DNA-Quelle jedoch in einer zunehmend erheblichen Weise unterscheidet. So können Veränderungen letztendlich durchgeführt werden, die aufgrund der Funktionsunfähigkeit eines sehr stark fehlgepaarten Primers in einem einzigen Schritt nicht durchführbar wären.

[0063] Ferner enthält eines der erfindungsgemäßen Oligonucleotide als Teil seiner Sequenz eine nicht-komplementäre Promotorsequenz, vorausgesetzt, daß ein ausreichender Teil des Primers eine zu dem zu amplifizierenden Strang komplementäre Sequenz aufweist.

[0064] Nach Zugabe des Verlängerungsprimers werden genügend Zyklen durchgeführt, um die gewünschte Menge an neuer die nicht-komplementäre Promotorsequenz enthaltender Matrize zu erhalten. Dies ermöglicht die Produktion von großen Mengen der kombinierten Fragmente in einem relativ kurzen Zeitraum (z. B. zwei Stunden oder weniger) unter Verwendung eines einfachen Verfahrens.

[0065] Die hier beschriebenen Oligonucleotide können auch verwendet werden, um den Nachweis und/oder die Charakterisierung von spezifischen Nucleinsäuresequenzen, die mit infektiösen Erkrankungen, genetischen Störungen oder zellulären Störungen, wie Krebs, assoziiert sind, zu ermöglichen. Die Amplifikation ist nützlich, wenn die zur Analyse verfügbare Menge Nucleinsäure sehr klein ist, wie beispielsweise bei der pränatalen Diagnose von Sichelzellanämie unter Verwendung von von fötalen Zellen erhaltener DNA. Die Ampli-

fikation ist besonders nützlich, wenn eine solche Analyse mit einer kleinen Probe unter Verwendung von an sich unempfindlichen nicht-radioaktiven Nachweisverfahren durchgeführt werden muß oder wenn zwar radioaktive Verfahren verwendet werden, jedoch ein schneller Nachweis wünschenswert ist.

[0066] Für die erfindungsgemäßen Zwecke können genetische Erkrankungen spezifische Deletionen und/oder Mutationen in genomischer DNA von einem beliebigen Organismus, wie z. B. Sichelzellanämie, zystische Fibrose, α -Thalassämie, β -Thalassämie etc., einschließen. Sichelzellanämie kann durch Oligomer-Restriktionsanalyse oder eine RFLP-ähnliche Analyse nach einer Amplifikation der passenden DNA-Sequenz durch das erfindungsgemäße Verfahren leicht nachgewiesen werden. α -Thalassämie kann durch Abwesenheit einer Sequenz und β -Thalassämie kann durch Gegenwart einer polymorphen Restriktionsstelle, die eng mit einer die Krankheit verursachenden Mutation verknüpft ist, nachgewiesen werden.

[0067] Alle diese genetischen Erkrankungen können durch Amplifikation der passenden Sequenz und Analyse durch Southern-Blots ohne Verwendung von radioaktiven Sonden nachgewiesen werden. In einem solchen Verfahren wird beispielsweise eine kleine Probe von DNA von z. B. Amnionflüssigkeit, die eine sehr kleine Menge der gewünschten Sequenz enthält, amplifiziert, mit einem Restriktionsenzym gespalten und durch das Southern-Blot-Verfahren analysiert. Die Verwendung von nicht-radioaktiven Sonden wird durch große Mengen des amplifizierten Signals erleichtert.

[0068] In einer anderen Ausführungsform kann eine kleine Probe DNA bis zu einer ausreichenden Menge amplifiziert und anschließend ein weiterer Zyklus von Verlängerungsreaktionen durchgeführt werden, wobei leicht nachweisbare Nucleotidderivate (wie ^{32}P -markierte oder Biotin-markierte Nucleosidtriphosphate) direkt in das DNA-Endprodukt eingeschlossen werden, das durch Spaltung und elektrophoretische Trennung oder ein beliebiges anderes geeignetes Verfahren analysiert werden kann. Ein Beispiel dieses Verfahrens in einem Modellsystem wird in **Fig. 5** gezeigt.

[0069] In einer weiteren Ausführungsform, wie in einem Modellsystem in **Fig. 3** gezeigt, kann die Nucleinsäure vor der Amplifikation gegen eine bestimmte Restriktionsendonuclease exponiert werden. Da eine gesplante Sequenz nicht amplifiziert werden kann, legt das Erscheinen eines amplifizierten Fragments trotz der vorherigen Spaltung der DNA-Probe die Abwesenheit einer Stelle für die Endonuclease innerhalb der amplifizierten Sequenz nahe. Die Gegenwart oder Abwesenheit einer amplifizierten Sequenz kann durch ein geeignetes Verfahren nachgewiesen werden.

[0070] Eine praktische Anwendung dieses Verfahrens kann durch seine Verwendung zum erleichterten Nachweis von Sichelzellanämie durch das Oligomer-Restriktionsverfahren erläutert werden, das hier nachstehend und von R. Saiki et al., *Bio/Technology* 3 (1985), 1008–1012, beschrieben wird. Sichelzellanämie ist eine Hämoglobinerkrankung, die durch eine einzelne Basenpaaränderung im sechsten Codon des β -Globingens verursacht wird. **Fig. 6** erläutert die Sequenzen von normalen und Sichelzell- β -Globingenen im Bereich ihres Polymorphismus, wobei die einzelnen Balken die Lage einer Ddel-Stelle, die nur in einem normalen Gen vorhanden ist, und die doppelten Balken die Lage einer Hinfl-Stelle, die nicht-polymorph ist und daher sowohl in den normalen als auch Sichelzellallelen vorhanden ist, markieren. **Fig. 7** erläutert das Verfahren der Oligomer-Spaltung von normaler β -Globin-DNA unter Verwendung einer Sonde, die beide Restriktionsstellen umfaßt und an der Stelle des Sternchens markiert ist. Die DNA, die wie hier beschrieben amplifiziert wird, wird denaturiert und an die markierte Sonde aneliert. Das Enzym Ddel spaltet die DNA an der erneut gebildeten Ddel-Stelle und erzeugt ein markiertes Octamer. Unter den im Test verwendeten Bedingungen ist das Octamer kurz genug, um vom Duplexmolekül zu dissoziieren. Die anschließende Zugabe des Enzyms Hinfl hat keine Wirkung auf das nun einzelsträngige Octamer. **Fig. 8** erläutert das gleiche Verfahren, das bei dem Sichelzellallel der β -Globin-DNA verwendet wurde. Das Enzym Ddel kann das Duplexmolekül, das durch die amplifizierte DNA und die markierte Sonde gebildet wird, aufgrund der A-A-Basenpaar-Fehlpaarung nicht spalten. Das Enzym Hinfl spaltet jedoch das Hybrid und ein markiertes Trimer entsteht. In der Praxis kann das Verfahren die DNA eines Individuums entweder als homozygot für den Wildtyp, homozygot für den Sicheltyp oder als einen heterozygoten Träger des Sichelzellmerkmals diagnostizieren, da ein spezifisches Signal mit der Gegenwart von jedem der Allele verbunden ist. Die Verwendung dieses vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Amplifikation der passenden Sequenz ermöglicht eine schnelle Analyse eines einmalig vorkommenden Gens unter Verwendung einer Sonde mit nur einem einzigen ^{32}P -Marker.

[0071] Verschiedene infektiöse Erkrankungen können durch die Gegenwart von spezifischen DNA-Sequenzen, die für den verursachenden Mikroorganismus charakteristisch sind, in klinischen Proben diagnostiziert werden. Diese schließen Bakterien, wie Salmonellen, Chlamydia und Neisseria; Viren, wie die Hepatitis-Viren und Protozoen-Parasiten, wie Plasmodium, das für Malaria verantwortlich ist, ein. Das an Falkow erteilte

US-Patent 4,358,535 offenbart die Verwendung von spezifischen DNA-Hybridisierungssonden zur Diagnose von infektiösen Erkrankungen. Ein mit dem Falkow-Verfahren verbundenes Problem ist, daß eine relativ kleine Zahl von pathogenen Organismen in einer klinischen Probe eines infizierten Patienten vorhanden sein und die von ihnen extrahierte DNA nur einen sehr kleinen Teil der Gesamt-DNA in der Probe ausmachen kann. Die spezifische Amplifikation der mutmaßlichen Sequenzen vor der Immobilisierung und der Hybridisierungsnachweis der DNA-Proben konnten die Empfindlichkeit und Spezifität dieser Verfahren stark verbessern.

[0072] Die routinemäßige klinische Verwendung von DNA-Sonden zur Diagnose von infektiösen Erkrankungen würde wesentlich erleichtert, wenn nicht-radioaktiv-markierte Sonden, wie in der EP 63,879 für Ward offenbart, verwendet werden könnten. In diesem Verfahren werden Biotin enthaltende DNA-Sonden durch chromogene Enzyme, die an Avidin- oder Biotin-spezifische Antikörper gebunden sind, nachgewiesen. Diese Art von Nachweis ist zweckmäßig, jedoch relativ unempfindlich. Die Kombination der spezifischen DNA-Amplifikation unter Verwendung der erfindungsgemäßen Oligonucleotide und die Verwendung von stabil markierten Sonden könnte die Zweckmäßigkeit und Empfindlichkeit bereitstellen, die erforderlich sind, um die Falkow- und Ward-Verfahren in einem Routineklinikbetrieb verwendbar zu machen.

[0073] Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können ferner zur Produktion von ausreichenden DNA-Mengen von einem einmalig vorkommenden menschlichen Gen in einer einzigen Kopie verwendet werden, so daß der Nachweis durch eine einfache nichtspezifische DNA-Farbe wie Ethidiumbromid verwendet werden kann, um eine direkte DNA-Diagnose durchzuführen.

[0074] Neben dem Nachweis von infektiösen Erkrankungen und pathologischen Abnormalitäten im Genom von Organismen können die hier beschriebenen Oligonucleotide ferner zum Nachweis von DNA-Polymorphismus, der nicht mit einem pathologischen Zustand assoziiert sein kann, verwendet werden.

[0075] Die nachstehend beschriebenen Beispiele werden als Erläuterung angeboten und sollen die Erfindung in keiner Weise einschränken. In diesen Beispielen sind alle Prozentangaben Gewichtsprozent bei Feststoffen und Volumenprozent bei Flüssigkeiten und alle Temperaturen sind in Grad Celsius, sofern nicht anders angegeben.

Beispiel 1

[0076] Eine 25 Basenpaar-Sequenz mit der Nucleinsäuresequenz

```
5' CCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCT 3'
3' GGAGCCGTGGCAGTGGGACCTACGA 5' ,
```

die auf einem 47 Basenpaar-FokI-Restriktionsfragment von dem von der ATCC erhältlichen pBR322 enthalten ist, wurde, wie nachstehend beschrieben, hergestellt. Ein FokI-Spaltprodukt von pBR322, das das 47 bp-Fragment enthielt, wurde durch Spaltung von pBR322 mit FokI gemäß den vom Lieferanten New England Biolabs, Inc., vorgeschlagenen Bedingungen produziert. Die verwendeten Primer waren 5'-d(CCTCG-GCACCG)-3' und 5'-d(AGCATCCAGGGTG)-3' und wurden unter Verwendung von üblichen Verfahren hergestellt. Die nachstehend beschriebenen Bestandteile wurden zu 33 µl Puffer, der aus 25 mM Kaliumphosphat, 10 mM Magnesiumchlorid und 100 mM Natriumchlorid bei einem pH-Wert von 7,5 bestand, zugesetzt: 2433 pmol jeder der vorstehend beschriebenen Primer, 2,4 pmol FokI-gespaltene pBR322, 12 nmol dATP, 22 nmol dCTP, 19 nmol dGTP und 10 nmol TTP.

[0077] Das Gemisch wurde auf 85°C 5 Minuten erhitzt und konnte auf Umgebungstemperatur abkühlen. 5 Einheiten Klenowfragment der E. coli-DNA-Polymerase I wurden zugesetzt, und die Temperatur wurde 15 Minuten gehalten. Nach dieser Zeit wurde das Gemisch erneut 5 Minuten auf 85°C erhitzt und konnte dann abkühlen. 5 Einheiten Klenowfragment wurden erneut zugesetzt, und die Reaktion wurde 15 Minuten durchgeführt. Die Erhitzungs-, Abkühlungs- und Syntheseschritte wurden weitere 11 Male durchgeführt.

[0078] Nach der letzten Wiederholung wurde ein 5 µl-Aliquot aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Dieses wurde auf 85°C für 3 Minuten erhitzt und konnte dann auf Umgebungstemperatur abkühlen. 12,5 pmol α-³²P-Desoxycytidintriphosphat und 5 Einheiten Klenowfragment wurden zugesetzt und die Reaktion 15 Minuten fortgesetzt. Die markierten Produkte wurden durch Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Die FokI-Spaltprodukte wurden in ähnlicher Weise markiert und dienten als Kontrolle und Molekulargewichtsmarker. Die einzige stark markierte Bande, die nach den 13 Zyklen sichtbar war, war die gewünschte 25 Basenpaar-Sequenz.

Beispiel 2

[0079] Die zu amplifizierende gewünschte Sequenz war eine 94 Basenpaar-Sequenz, die im menschlichen β -Globingen enthalten war und die an der Sichelzellanämie beteiligte MstII-Stelle einschloß. Die Sequenz hat die in **Fig. 1** dargestellte Nucleotidsequenz.

1. Synthese von Primern

[0080] Die nachstehenden beiden Oligodesoxyribonucleotidprimer wurden durch das nachstehend beschriebene Verfahren hergestellt:

5'-CACAGGGCAGTAACG-3' Primer A

5'-TTTGCTTCTGACACA-3' Primer B

[0081] Automatisierte Syntheseverfahren: Die gemäß Beaucage und Caruthers (Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859–1862) synthetisierten Diethylphosphoramidite wurden sequentiell an einen Nucleosid-derivatisierten Glaträger mit kontrollierten Poren unter Verwendung einer Biosearch SAM-1 kondensiert. Das Verfahren schloß eine Detritylierung mit Trichloressigsäure in Dichlormethan, Kondensation unter Verwendung von Benzotriazol als aktivierendem Protonendonator und Kappenstrukturbildung mit Acetanhydrid und Dimethylaminopyridin in Tetrahydrofuran und Pyridin ein. Der Zyklus dauerte etwa 30 Minuten. Die Ausbeuten bei jedem Schritt waren im wesentlichen quantitativ und wurden durch Sammlung und spektroskopische Untersuchung des während der Detritylierung freigesetzten Dimethoxytritylalkohols untersucht.

[0082] Verfahren zur Entfernung der Schutzgruppen vom Oligodesoxyribonucleotid und zur Reinigung des Oligonucleotids: Der feste Träger wurde aus der Säule entfernt und gegen 1 ml konzentriertes Ammoniumhydroxid bei Raumtemperatur vier Stunden in einem geschlossenen Röhrchen exponiert. Der Träger wurde anschließend durch Filtration entfernt, und die das partiell geschützte Oligodesoxynucleotid enthaltende Lösung wurde fünf Stunden auf 55°C gebracht. Das Ammoniak wurde entfernt und der Rückstand auf ein präparatives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 30 Volt/cm 90 Minuten durchgeführt, wonach die das Produkt enthaltende Bande durch UV-Beschattung einer fluoreszierenden Platte identifiziert wurde. Die Bande wurde ausgeschnitten und mit 1 ml destilliertem Wasser über Nacht bei 4°C eluiert. Diese Lösung wurde auf eine Altech RP18-Säule aufgetragen und mit einem 7 bis 13 %-Gradienten von Acetonitril in 1 % Ammoniumacetatpuffer bei einem pH-Wert von 6,0 eluiert. Die Elution wurde durch UV-Absorption bei 260 nm überwacht, und die geeignete Fraktion wurde gesammelt, durch UV-Absorption in einem festen Volumen quantitativ bestimmt und bei Raumtemperatur in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockenheit eingedampft.

[0083] Charakterisierung von Oligodesoxyribonucleotiden: Testaliquots der gereinigten Oligonucleotide wurden mit der Polynucleotidkinase mit γ -³²P-ATP ³²P-markiert. Die markierten Verbindungen wurden durch Autoradiographie von 14 bis 20% Polyacrylamidgelen nach einer Elektrophorese über 45 Minuten bei 50 Volt/cm untersucht. Dieses Verfahren weist das Molekulargewicht nach. Die Basenzusammensetzung wurde durch Spaltung des Oligodesoxyribonucleotids in Nucleoside unter Verwendung von Schlangengift-Diesterase und bakterieller alkalischer Phosphatase und anschließender Trennung und quantitativer Bestimmung der abstammenden Nucleoside unter Verwendung einer Umkehrphasen-HPLC-Säule und einer mobilen Phase aus 10 % Acetonitril und 1 % Ammoniumacetat ermittelt.

II. Quelle der DNA

A. Extraktion der menschlichen Wildtyp-Gesamt-DNA

[0084] Menschliche genomische DNA, die für normales β -Globin homozygot war, wurde aus der Zelllinie Molt4 (von der Human Genetic Mutant Cell Repository erhalten und als GM2219c identifiziert) unter Verwendung des von Stetler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982), 5966–5970, beschriebenen Verfahrens extrahiert.

B. Konstruktion von clonierten Globingenen

[0085] Ein 1,9 kb-BamHI-Fragment des normalen β -Globingens wurde vom Cosmid pFC11 isoliert und in die BamHI-Stelle von pBR328 inseriert (Soberon et al., Gene 9 (1980), 287–305). Dieses Fragment, das den Bereich umfaßt, der mit der synthetischen 40mer-Sonde hybridisiert, schließt die ersten und zweiten Exons, das erste Intron und die flankierenden 5'-Sequenzen des Gens ein (Lawn et al., Cell 15 (1978), 1157–1174). Dieser Clon erhielt die Bezeichnung pBR328:HbA und wurde am 25. Mai 1984 unter der ATCC-Nr. 39,698 hinterlegt.

[0086] Das entsprechende 1,9 kb-BamHI-Fragment des Sichelzellallels des β -Globins wurde vom Cosmid pFC12 isoliert und, wie vorstehend beschrieben, cloniert. Dieser Clon wurde als pBR328:HbS bezeichnet und am 25. Mai 1984 unter der ATCC-Nr. 39,699 hinterlegt.

[0087] Jedes rekombinante Plasmid wurde in *E. coli* MM294 (ATCC Nr. 39,607) transformiert und vermehrt.

C. Spaltung der clonierten Globingene mit MstII

[0088] Insgesamt 100 μ g von pBR328:HbA bzw. pBR328:HbS wurden separat mit 20 Einheiten MstII (New England Biolabs) 16 Stunden bei 37°C in 200 μ l 150 mM NaCl, 12 mM Tris-HCl (pH 7,5), 12 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol (DTT) und 100 μ g/ml Rinderserumalbumin (BSA) gespalten. Die Produkte werden als pBR328:HbA/MstII bzw. pBR328:HbS/MstII bezeichnet.

III. Polymerasekettenreaktion

[0089] Zu 100 μ l Puffer, der aus 60 mM Natriumacetat, 30 mM Trisacetat und 10 mM Magnesiumacetat bei einem pH-Wert von 8,0 bestand, wurden 2 μ l einer Lösung, die 100 pmol Primer A (der Sequenz d(CACAGGG-CACTAACG)), 100 pmol Primer B (der Sequenz d(TTTGCTTCTGACACA)) und jeweils 1000 pmol dATP, dCTP, dGTP und TTP enthielt, zugesetzt. Ferner wurde eine der nachstehenden Quellen der vorstehend beschriebenen DNA zugesetzt:

- 10 μ g menschliche Wildtyp-Gesamt-DNA (Reaktion I)
- 0,1 pmol pBR328:HbA (Reaktion II)
- 0,1 pmol pBR328:HbS (Reaktion III)
- 0,1 pmol pBR328:HbA/MstII (Reaktion IV)
- 0,1 pmol pBR328:HbS/MstII (Reaktion V)
- Keine Ziel-DNA (Reaktion VI)

[0090] Jede erhaltene Lösung wurde vier Minuten auf 100°C erhitzt und konnte dann zwei Minuten auf Raumtemperatur abkühlen, wonach 1 μ l, das vier Einheiten Klenowfragment der *E. coli*-DNA-Polymerase enthielt, zugesetzt wurde. Jede Reaktion wurde 10 Minuten durchgeführt, wonach der Zyklus der Zugabe der Primer, Nucleotide und DNA, Erhitzung, Abkühlung, Zugabe der Polymerase und Umsetzung 19mal für die Reaktion I und viermal für die Reaktionen II bis VI wiederholt wurde.

[0091] Vier Mikroliter-Aliquots der Reaktionen I und II, die vor dem ersten Zyklus und nach dem letzten Zyklus jeder Reaktion entfernt wurden, wurden auf ein 12% Polyacrylamidgel mit 0,089 M Tris-Boratpuffer bei einem pH-Wert von 8,3 und 2,5 mM EDTA aufgetragen. Das Gel wurde bei 25 Volt/cm vier Stunden einer Elektrophorese unterzogen, es wurde ein Transfer auf eine als Festphasenträger dienende Nylonmembran durchgeführt und mit einem durch Standardverfahren hergestellten ³²P-markierten synthetischen 40 bp-3'-Fragment mit der Sequenz

5' d (TCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAG) 3'

in 30% Formamid, 3 x SSPE, 5 x Denhardts und 5% Natriumdodecylsulfat bei einem pH-Wert von 7,4 sondiert. **Fig. 2** ist ein Autoradiogramm der sondierten Nylonmembran der Reaktionen I und II. Bahn 1 enthält 0,1 pmol einer synthetischen 58 bp-Fragmentkontrolle, von der ein Strang zur vorstehend beschriebenen Sonde komplementär ist. Bahn 2 enthält 4 μ l Reaktion I vor dem ersten Amplifikationszyklus. Bahn 3 enthält 4 μ l Reaktion I nach dem 20. Amplifikationszyklus. Bahn 4 enthält 4 μ l Reaktion II nach fünf Amplifikationszyklen. Bahn 5 enthält einen Molekulargewichtsstandard, der aus FokI (New England Biolabs)-Spaltprodukten von pBR322 (New England Biolabs) besteht, die mit alpha-³²P-dNTPs und Polymerase markiert sind. Bahn 3 zeigt, daß nach zwanzig Zyklen das Reaktionsgemisch I eine große Menge der spezifischen Sequenz von passendem Molekulargewicht und keine anderen nachweisbaren Produkte enthielt. Das Reaktionsgemisch II enthielt nach fünf Zyklen ferner dieses Produkt sowie die Ausgangsnucleinsäure und andere Produkte, wie durch Bahn 4 dargestellt.

[0092] Zu 5,0 μ l-Aliquots der Reaktionen II bis VI nach dem vierten Zyklus wurden 5 pmol jedes der vorstehend beschriebenen Primer zugesetzt. Die Lösungen wurden vier Minuten auf 100°C erhitzt und konnten auf Raumtemperatur abkühlen. Jeweils drei pmol von alpha-³²P-dATP, alpha-³²P-dCTP, alpha-³²P-dGTP und alpha-³²P-TTP und vier Einheiten Klenowfragment wurden zugesetzt. Die Reaktion konnte mit einem Endvolumen von 10 μ l und den vorstehend beschriebenen Salzkonzentrationen 10 Minuten fortschreiten. Die Polymeraseaktivität wurde durch Erhitzen 20 Minuten bei 60°C beendet. 4 μ l-Aliquots der Reaktionen II bis VI wurden auf ein 12% Polyacrylamidgel mit 0,089 M Tris-Boratpuffer bei einem pH-Wert von 8,3 und 2,5 mM EDTA auf-

getragen. Das Gel wurde bei 25 Volts/cm vier Stunden einer Elektrophorese unterzogen, wonach eine Autoradiographie durchgeführt wurde.

[0093] Fig. 3 ist ein Autoradiogramm der Elektrophorese. Bahn 1 ist ein Molekulargewichtsstandard, Bahn 2 ist Reaktion II, Bahn 3 ist Reaktion III, Bahn 4 ist Reaktion IV und Bahn 5 ist Reaktion V. Bei einer weiteren Bahn für die Reaktion VI ohne DNA als Kontrolle war nichts in irgendeiner der Bahnen zu sehen. Die Figur zeigt, daß das 94 bp-Fragment, das von der Ziel-DNA vorhergesagt wurde, nur dort vorhanden war, wo intakte β -Globin-DNA-Sequenzen zur Amplifikation verfügbar waren, d. h. pBR328:HbA (Bahn 2), pBR328:HbS (Bahn 3) und pBR328:HbS/MstII (Bahn 5). Die MstII-Spaltung schneidet pBR328:HbA in der 94-mer-Sequenz, was eine Amplifikation unmöglich macht, und die 94-mer-Bande erscheint nicht in Bahn 4. Im Gegensatz dazu wird die 94-mer-Sequenz in pBR328:HbS nicht gespalten, wenn das Plasmid mit MstII gespalten wird, und ist daher für eine Amplifikation, wie in Bahn 5 dargestellt, verfügbar.

[0094] Fig. 4 zeigt die Kettenreaktion über drei Zyklen zur Amplifikation der 94 bp-Sequenz. PC01 und PC02 sind die Primer A und B. Die Zahlen auf der rechten Seite geben die Zyklen wieder, während die Zahlen auf der linken Seite die Zyklusnummer, in dem ein bestimmtes Molekül produziert wurde, angeben.

Beispiel 3

[0095] Dieses Beispiel erläutert die Amplifikation einer 110 bp-Sequenz, die die allele MstII-Stelle im menschlichen Hämoglobinen umfaßt.

[0096] Insgesamt 1,0 Mikrogramm menschlicher Gesamt-DNA und jeweils 100 picomol der beiden durch das Verfahren von Beispiel 2 hergestellten Primer d(ACACAACTGTGTTCACTAGC) und d(CAACTTCATC-CACGTTACC) wurden in 100 μ l Lösung, die
1,5 mM jedes der vier Desoxyribonucleosidtriphosphate
30 mM Tris-Acetat-Puffer bei pH 7,9
60 mM Natriumacetat
10 mM Magnesiumacetat und
0,25 mM Dithiothreit
enthielt, gelöst.

[0097] Die Lösung wurde eine Minute auf 100°C erhitzt und schnell eine Minute auf 25°C gebracht, wonach 2,5 Einheiten Klenowfragment der DNA-Polymerase zugesetzt wurden. Die Polymerasereaktion erfolgte zwei Minuten bei 25°C, wonach der Zyklus des Erhitzens, Abkühlens, Zugabe von Klenow und Umsetzung so oft, wie gewünscht, wiederholt wurde.

[0098] Mit einer Effizienz von 70% in jedem Zyklus bewirkten 15 Zyklen die Synthese von 1,4 femtomol des gewünschten 110 bp-Fragments des β -Globingens.

Beispiel 4

[0099] Dieses Beispiel erläutert die Amplifikation einer 240 bp-Sequenz, die die allele MstII-Stelle im menschlichen Hämoglobinen umfaßt. Diese Sequenz enthält NcoI-, HinfI- und MstII-Restriktionsstellen.

[0100] Zu 100 μ l eines Gemisches von 60 mM Natriumacetat, 30 mM Tris-Acetat und 10 mM Magnesiumacetat bei pH 8,0, das 0,1 pmol pBR328:HbA enthielt, wurden 2 μ l Lösung A, die

100 pmol d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG)-Primer,

100 pmol d(TAACCTTGATACCAACCTGCCC)-Primer und

jeweils 1000 pmol von dATP, dCTP, dGTP und TTP enthielt, zugesetzt.

[0101] Die beiden Primer wurden durch das in Beispiel 2 beschriebene Verfahren hergestellt. Die Lösung wurde vier Minuten auf 100°C erhitzt und konnte zwei Minuten bei Umgebungstemperatur abkühlen, wonach vier Einheiten Klenowfragment der E. coli-DNA-Polymerase in 1 μ l zugesetzt wurde. Die Reaktion wurde 10 Minuten fortgesetzt, wonach der Zyklus der Zugabe der Lösung A, Erhitzung, Kühlung, Zugabe der Polymerase und Umsetzung dreimal wiederholt wurde. Zu einem 5,0 μ l-Aliquot der Reaktionen wurden 5 picomol jedes vorstehend beschriebenen Oligonucleotidprimers zugesetzt. Die Lösung wurde vier Minuten auf 100°C erhitzt und konnte auf Umgebungstemperatur abkühlen, wonach jeweils 3 picomol der alpha-³²P-markierten Desoxyribo-

nucleosidtriphosphate und 4 Einheiten Klenowfragment zugesetzt wurden. Die Reaktion bei einem Endvolumen von 10 µl und den vorstehend beschriebenen Salzkonzentrationen wurde 10 Minuten fortgesetzt. Die Polymeraseaktivität wurde durch 20-minütiges Erhitzen bei 60°C beendet. 2 µl-Aliquots wurden mit NcoI, MstII oder Hinfl gespalten und auf ein 12% Polyacrylamidgel mit 0,089 M Tris-Borat-Puffer bei einem pH-Wert von 8,3 und 2,5 mM in EDTA aufgetragen. Das Gel wurde bei 25 Volt/cm vier Stunden einer Elektrophorese unterzogen und eine Autoradiographie durchgeführt. **Fig. 5** erläutert das Autoradiogramm der Elektrophorese, wobei Bahn 1: der Molekulargewichtsstandard, Bahn 2: ohne Enzymsspaltung (240 bp, intakt), Bahn 3: Spaltung mit NcoI (131 und 109 bp), Bahn 4: Spaltung mit MstII (149 und 91 bp) und Bahn 5: Spaltung mit Hinfl (144 und 96 bp) ist. Das Autoradiogramm stimmt mit der Amplifikation der 240 bp-Sequenz überein.

Beispiel 5

[0102] Dieses Beispiel erläutert die Verwendung des hier beschriebenen Verfahrens zum Nachweis von Sichelzellanämie durch sequentielle Spaltung.

Synthese und Phosphorylierung von Oligodesoxyribonucleotiden

[0103] Die markierte DNA-Sonde RS06 mit der Sequenz

5' *CTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGG 3'

wobei * den Marker anzeigt, und ein nicht-markiertes blockierendes Oligomer RS 10 mit der Sequenz

3' GACAGAGGTCACCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCC 5'

das drei Basenpaar-Fehlpaarungen bezüglich RS06 aufweist, wurden gemäß den in Beispiel 2(I) bereitgestellten Verfahren synthetisiert. Die Sonde RS06 wurde durch Inkontaktbringen von 5 pmol RS06 mit 4 Einheiten T4-Polynucleotidkinase (New England Biolabs) und 50 pmol γ P³²-ATP (New England Nuclear, etwa 7 200 Ci/mmol) in einem 40 µl-Reaktionsvolumen, das 70 mM Tris-Puffer (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 1,5 mM Spermin und 2,5 mM Dithiothreitol enthielt, 90 Minuten bei 37°C markiert. Das Gesamtvolumen wurde anschließend auf 100 µl mit 25 mM EDTA eingestellt und gemäß dem Verfahren von Maniatis et al. Molecular Cloning (1982), 464–465, über eine 1 ml-Bio Gel P-4-Spin-Dialysesäule von BioRad, die mit Tris-EDTA (TE)-Puffer (10 mM Tris-Puffer und 0,1 mM EDTA, pH 8,0) äquilibriert war, gereinigt. Die markierte Sonde wurde weiter durch Elektrophorese auf einem 18% Polyacrylamidgel (19:1 Acrylamid:BIS, BioRad) in Tris-Borsäure-EDTA (TBE)-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure und 2,5 mM EDTA, pH 8,3) bei 500 Vh weiter gereinigt. Nach der Lokalisierung durch Autoradiographie wurde der die markierte Sonde enthaltende Teil des Gels ausgeschnitten, zerkleinert und in 0,2 ml TE-Puffer über Nacht bei 4°C eluiert. Die TCA-Fällung des Reaktionsprodukts zeigte, daß die spezifische Aktivität 4,9 Ci/mmol und die Endkonzentration 20 pmol/ml war.

[0104] Das nicht-markierte blockierende RS 10-Oligomer wurde bei einer Konzentration von 200 pmol/ml verwendet.

Isolierung von menschlicher genomischer DNA aus Zelllinien

[0105] Genomische DNA mit hohem Molekulargewicht wurde von den lymphoiden Zelllinien Molt4, SC-1 und GM2064 im wesentlichen unter Verwendung des Verfahrens von Stetler et al., PNAS 79 (1982), 5966–5970, (für Molt4) und Maniatis et al., Molecular Cloning (1982), 280–281, isoliert.

[0106] Molt4 (Human Mutant Cell Repository, GM2219C) ist eine für normales β -Globin homozygote T-Zelllinie und SC-1 (am 19. März 1985 bei der ATCC hinterlegt) ist eine für das Sichelzellallel homozygote EBV-transformierte B-Zelllinie. GM2064 (Human Mutant Cell Repository, GM2064) wurde ursprünglich von einem Individuum isoliert, das für ein erbliches Fortbestehen von fötalem Hämoglobin (HPFH) homozygot ist und keine beta- oder delta-Globingensequenzen enthält. Alle Zelllinien wurden in RPMI-1640-Medium mit 10% fötalem Kälberserum gehalten.

Isolierung von menschlicher genomischer DNA aus klinischen Blutproben

[0107] Eine klinische Blutprobe mit der Bezeichnung CH 12 von einem bekannten Sichelzellträger (AS) wurde von Dr. Bertrand Lubin vom Children's Hospital in Oakland, California, erhalten. Die genomische DNA wurde von der "Buffy coat"-Fraktion, die primär aus peripheren Blutlymphocyten besteht, unter Verwendung einer Modifikation des von Nunberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978), 5553–5556, beschriebenen Verfahrens

hergestellt.

[0108] Die Zellen wurden in 5 ml Tris-EDTA-NaCl (TEN)-Puffer (10 mM Tris-Puffer, pH 8, 1 mM EDTA und 10 mM NaCl) resuspendiert und auf 0,2 mg/ml Proteinase K und 0,5% SDS eingestellt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Natriumperchlorat wurde anschließend zu 0,7 M zugesetzt und das Lysat vorsichtig 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lysat wurde mit 30 ml Phenol/Chloroform (1:1) und anschließend mit 30 ml Chloroform extrahiert, wonach eine Ethanol-fällung der Nucleinsäuren folgte. Der Pellet wurde in 2 ml TE-Puffer resuspendiert und RNase A zu 0,005 mg/ml zugesetzt. Nach der Spaltung für eine Stunde bei 37°C wurde die DNA jeweils einmal mit gleichen Volumina Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Die DNA wurde in 0,5 ml TE-Puffer resuspendiert und die Konzentration durch Absorption bei 260 nm ermittelt.

Polymerasekettenreaktion zur selektiven Amplifikation von β -Globinsequenzen

[0109] 2 Mikrogramm genomischer DNA wurden in einem anfänglichen 100 μ l-Reaktionsvolumen, das 10 mM Tris-Puffer (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 150 pmol Primer A der Sequenz d(CACAGGGCACTAACG) und 150 pmol Primer B der Sequenz d(CTTTGCTTCTGACACA) enthielt, amplifiziert und zur Verhinderung der Verdunstung mit etwa 100 μ l Mineralöl überschichtet.

[0110] Jede DNA-Probe wurde 15 Zyklen einer Amplifikation unterzogen, wobei ein Zyklus aus drei Schritten besteht:

- 1) Denaturierung in einem auf 95°C eingestellten Hitzeblock zwei Minuten.
- 2) Sofortiger Transfer in einen auf 30°C eingestellten Hitzeblock zwei Minuten zur Anelierung der Primer und der genomischen DNA.
- 3) Zugabe von 2 μ l Lösung, die 5 Einheiten des Klenowfragments der E. coli-DNA-Polymerase I (New England Biolabs) und 1 nmol dATP, dCTP, dGTP bzw. TTP in einem Puffer, der aus 10 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 4 mM Dithiothreitol bestand, enthielt. Diese Verlängerungsreaktion wurde 10 Minuten bei 30°C durchgeführt.

[0111] Nach dem letzten Zyklus wurde die Reaktion durch zweiminütiges Erhitzen bei 95°C beendet. Das Mineralöl wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert und verworfen. Das Reaktionsendvolumen war 130 μ l.

Hybridisierung/Spaltung der amplifizierten genomischen DNA mit Sonden und Ddel/Hinfl

[0112] 45 Mikroliter der amplifizierten genomischen DNA wurden mit Ethanol ausgefällt und in einem gleichen Volumen TE-Puffer resuspendiert. 10 Mikroliter (die das Voramplifikationsäquivalent von 154 ng genomischer DNA enthielten) wurden in ein 1,5 ml-Microfugenröhrchen mit 20 μ l TE-Puffer zu einem Endvolumen von 30 μ l gegeben.

[0113] Die Probe wurde mit Mineralöl überschichtet und 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Ein 10 Mikroliter Volumen von 0,6 M NaCl, das 0,02 pmol markierter RS06-Sonde enthielt, wurde dem Röhrchen zugesetzt, vorsichtig gemischt und sofort 1 Stunde in einen Hitzeblock von 56°C transferiert. 4 Mikroliter nicht-markiertes blockierendes RS10-Oligomer (0,8 pmol) wurden zugesetzt, und die Hybridisierung wurde weitere 10 Minuten bei der gleichen Temperatur fortgesetzt. 5 Mikroliter 60 mM MgCl₂/0,1 % BSA und 1 μ l Ddel (10 Einheiten, New England Biolabs) wurden zugesetzt und die neu anelierte DNA 30 Minuten bei 56°C gespalten. 1 Mikroliter Hinfl (10 Einheiten, New England Biolabs) wurde anschließend zugesetzt, und es wurde weitere 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 μ l 75 mM EDTA und 6 μ l Nachweisfarbstoff zu einem Endvolumen von 61 μ l beendet.

[0114] Das Mineralöl wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert und 18 μ l Reaktionsgemisch (45 ng genomischer DNA) auf ein 30% Polyacrylamid-Minigel (19:1, Bio Rad) in einem Hoeffer SE200-Gerät aufgetragen. Das Gel wurde bei etwa 300 Volt eine Stunde einer Elektrophorese unterzogen, bis die Bromphenolblau-Farbstofffront 3,0 cm vom Startpunkt gewandert war. Die obersten 1,5 cm des Gels wurden entfernt, und das verbleibende Gel wurde vier Tage mit einem Verstärkerschirm bei -70°C exponiert.

Diskussion des Autoradiogramms (Fig. 9)

[0115] Jede Bahn enthält 45 ng amplifizierte genomische DNA. Bahn A enthält Molt4-DNA; Bahn B CH12-DNA; Bahn C SC-1; und Bahn D GM2064-DNA. Molt4 repräsentiert den Gentyp eines normalen Individuums mit zwei Kopien des β^A -Gens pro Zelle (AA), CH12 ist eine klinische Probe von einem Sichelzellerträger

mit einem β^A - und einem β^S -Gen pro Zelle (AS), und SC-1 repräsentiert den Genotyp eines Sichelzellindividuums mit zwei Kopien des β^S -Gens pro Zelle (SS). GM2064, das keine Beta- oder delta-Globin-Sequenzen enthält, ist als negative Kontrolle vorhanden.

[0116] Wie das Autoradiogramm zeigt, ist das Ddel-gespaltene β^A -spezifische Octamer nur in den DNAs vorhanden, die das β^A -Gen (Bahnen A und B) enthalten, und das Hinfl-gespaltene β^S -spezifische Trimer ist nur in den DNAs vorhanden, die das β^S -Gen (Bahnen B und C) enthalten. Die Gegenwart sowohl vom Trimer als auch Octamer (Bahn B) ist für einen Sichelzellträger diagnostisch und kann von einem normalen Individuum (Bahn A), das nur das Octamer aufweist, und einem Sichelzellträger-Individuum (Bahn C), das nur das Trimer besitzt, unterschieden werden.

[0117] Als Vergleich zeigte die Wiederholung des vorstehend beschriebenen Experiments unter Verwendung von nicht-amplifizierter genomischer DNA, daß die Amplifikation die Empfindlichkeit des Nachweises um mindestens das 1000fache erhöhte.

Beispiel 6

[0118] Dieses Beispiel erläutert den direkten Nachweis eines vollständig ungereinigten einmalig vorkommenden Gens in menschlicher Gesamt-DNA auf Gelen, ohne daß eine markierte Sonde erforderlich ist.

[0119] Unter Verwendung des in Beispiel 3 beschriebenen Verfahrens wurde ein 110 bp-Fragment einer Sequenz im ersten Exon des beta-Globingens ausgehend von 10 Mikrogramm menschlicher Gesamt-DNA in 20 Zyklen amplifiziert. Dieses in 20 Zyklen produzierte 110 bp-Fragment wurde leicht auf mit Ethidiumbromid angefärbten Gelen sichtbar gemacht.

[0120] Die Sequenz wurde nicht amplifiziert, wenn sie zunächst mit dem Restriktionsenzym Ddel gespalten wurde, sofern, wie im beta-Globin-S-Allel, die Sequenz nicht die durch das Enzym erkannte Restriktionsstelle enthält.

Beispiel 7

A. Insgesamt 100 fmol pBR328, die eine 1,9 kb-Insertion des menschlichen beta-Globin-A-Allels, jeweils 50 nmol der alpha- ^{32}P -dNTPs bei 500 Ci/mol, und jeweils 1 nmol der in Beispiel 3 verwendeten Primer enthielten, wurden in einer Lösung, die 100 μl 30 mM Tris-Acetat bei einem pH-Wert von 7,9, 60 mM Natriumacetat, 100 mM Dithiothreitol und 10 mM Magnesiumacetat enthielt, gelöst. Diese Lösung wurde zwei Minuten auf 100°C gebracht und eine Minute auf 25°C abgekühlt. Ein Volumen von insgesamt 1 μl das 4,5 Einheiten Klenowfragment der E. coli-DNA-Polymerase I und 0,09 Einheiten anorganische Pyrophosphatase enthielt, wurde zugesetzt, um die mögliche Entstehung von Pyrophosphat im Reaktionsgemisch zu verhindern, und die Reaktion wurde zwei Minuten bei 25°C fortgesetzt, wonach der Zyklus von Erhitzen, Abkühlen, Enzymzugabe und Umsetzen neunmal wiederholt wurde. 10 μl -Aliquots wurden entfernt und zu 1 μl 600 mM EDTA nach jedem Syntheszyklus zugesetzt. Jeder wurde auf einem 14% Polyacrylamidgel in 90 mM Tris-Borat und 2,5 mM EDTA bei pH 8,3 und 24 Volt/cm 2,5 Stunden analysiert. Das Gel wurde nach der Elektrophorese 20 Minuten im gleichen Puffer unter Zugabe von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid eingeweicht, mit dem ursprünglichen Puffer gewaschen und im UV-Licht unter Verwendung eines roten Filters fotografiert. Das produzierte 110 bp-Fragment wurde aus dem Gel unter ultraviolettem Licht ausgeschnitten und das eingebaute ^{32}P durch Cerenkov-Strahlung gezählt. Ein Versuch, die Daten einer Gleichung der Form $\text{pmol}/10 \mu\text{l} = 0,01 [(1 + y)^N - 1]$ anzupassen, wobei N die Zahl von Zyklen und y den Bruchteil der Ausbeute pro Zyklus repräsentiert, war bei $y = 0,619$ optimal. Dies zeigt an, daß eine signifikante Amplifikation erfolgt.

B. Das vorstehend beschriebene Experiment wurde wiederholt, ausgenommen daß 100 nmol jedes dNTP zu einer 100 μl -Reaktion zugesetzt wurden, kein Radiomarker verwendet wurde, und Aliquots nicht bei jedem Zyklus entfernt wurden. Nach 10 Zyklen wurde die Reaktion durch zweiminütiges Kochen beendet und eine Rehybridisierung eine Stunde bei 57°C durchgeführt. Die Sequenz des 110 bp-Produkts wurde durch eine Restriktionsanalyse von 8 μl -Aliquots unter Zugabe von 1 μl Rinderserumalbumin (25 mg/ml) und 1 μl des geeigneten Restriktionsenzym (Hinfl, MnlI, MstII und Neol) und durch Reaktion 15 Stunden bei 37°C bestätigt. Die PAGE wurde, wie vorstehend beschrieben, durchgeführt.

Beispiel 8

[0121] Dieses Beispiel erläutert die Verwendung von unterschiedlichen Primern zur Amplifikation von ver-

schiedenen Fragmenten von pBR328 und 322.

A. Das in Beispiel 7A beschriebene Experiment wurde wiederholt, ausgenommen daß die folgenden Primer d(TTTGCTTCT-GACACAACCTGTGTTCACTAGC) und d(GCCTCACCACTTCATCCACGTTCCACC) zur Produktion eines 130 bp-Fragments von pBR328 verwendet wurden.

B. Das in Beispiel 7A beschriebene Experiment wurde wiederholt, ausgenommen daß die folgenden Primer d(GGTT-GGCCAATCTACTCCCAGG) und d(TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG) zur Produktion eines 262 bp-Fragments von pBR328 verwendet wurden. Die Reaktionszeit war 20 Minuten pro Zyklus.

C. Das in Beispiel 8B beschriebene Experiment wurde wiederholt, ausgenommen daß 100 fmol MstII-Spaltprodukt von pBR328, das eine 1,9 kb-Insertion des menschlichen beta-Globin-S-Allels enthielt, als Ausgangsmatrix verwendet wurde. Dieses Plasmid wurde mehrfach durch MstII, jedoch nicht innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz gespalten. Ferner wurden die nachstehend beschriebenen Primer

d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) und

d(TAACCTTGATACCAACCTGCCC)

zur Produktion eines 240 bp-Fragments verwendet.

D. Das in Beispiel 7B beschriebene Experiment wurde wiederholt, ausgenommen daß 100 fmol NruI-Spaltprodukt von pBR322 als Matrix verwendet wurde, 200 nmol jedes dNTP in der 100 µl-Reaktion verwendet wurden und die beiden Primer

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) und

d(CTTCCCCATCGGTGATGTCG)

waren, um ein 500 bp-Fragment von pBR322 herzustellen. Die Reaktionszeiten waren 20 Minuten pro Zyklus bei 37°C. Die letztendliche Rehybridisierung dauerte 15 Stunden bei 57°C. Die Elektrophorese erfolgte auf einem 4% Agarosegel.

Beispiel 9

[0122] Dieses Beispiel erläutert das erfindungsgemäße Verfahren, wobei eine in vitro-Mutation in den amplifizierten Abschnitt eingeführt wird.

A. Insgesamt 100 fmol von pBR322, das mit NruI linearisiert wurde, 1 nmol jedes der Primer

d(CGCATTAAGCTTATCGATG) und

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT)

die zur Produktion eines 75 bp-Fragments konstruiert wurden, 100 nmol jedes dNTP wurden in 100 µl 40 mM Tris bei einem pH-Wert von 8, 20 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol und 5 mg/ml Rinderserumalbumin vereinigt. Das Gemisch wurde eine Minute auf 100°C gebracht und 0,5 Minuten in einem Wasserbad bei 23°C abgekühlt, wonach 4,5 Einheiten Klenowfragment und 0,09 Einheiten anorganische Pyrophosphatase zugesetzt wurden, und man ließ die Reaktion drei Minuten ablaufen. Der Zyklus von Erhitzen, Abkühlen, Enzymzugabe und Umsetzen wurde neunmal wiederholt. Der zehnte Reaktionszyklus wurde durch Einfrieren beendet und ein 8 µl-Aliquot des Reaktionsgemisches auf ein 4% Agarosegel, das mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht wird, aufgetragen.

B. Das in Beispiel 9A beschriebene Experiment wurde wiederholt, ausgenommen daß die nachstehenden Oligonucleotidprimer

d(CGCATTAAGCTTATCGATG) und

d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCACGAGGCCCT)

verwendet wurden.

Diese Primer sollen ein 101 bp-Fragment produzieren, von dem 26 Nucleotide (im zweiten aufgelisteten Primer) nicht in pBR322 vorhanden sind. Diese Nucleotide repräsentieren die Sequenz des T7-Promotors, der an die 75 bp-Sequenz von pBR322 unter Verwendung der Primer mit 20 komplementären Basen und einer 5'-Verlängerung von 26 Basen angehängt wurde. Das Verfahren erforderte weniger als zwei Stunden und produzierte 2 Picomol des relativ reinen 101 bp-Fragments ausgehend von 100 fmol von pBR322.

Der T7-Promotor kann zur Initiation der RNA-Transkription verwendet werden. Die T7-Polymerase kann zu dem 101 bp-Fragment zur Produktion von einzelsträngiger RNA zugesetzt werden.

C. Das in Beispiel 8D beschriebene Experiment wurde wiederholt, ausgenommen daß die nachstehenden Oligonucleotidprimer

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) und
d(CCAGCAAGACGTAGCCCAGC)

verwendet wurden, um ein 1 000 bp-Fragment von pBR322 zu produzieren.

D. Das in Beispiel 9C beschriebene Experiment wurde wiederholt, ausgenommen daß die nachstehenden Oligonucleotidprimer

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) und
d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCACGAGGCCCT)

verwendet wurden, um ein 1026 bp-Fragment zu produzieren, von dem 26 Nucleotide (im zweiten aufgeführten Primer) nicht in pBR322 vorhanden sind und den vorstehend beschriebenen T7-Promotor repräsentieren. Der Promotor wurde benachbart zum 1 000 bp-Fragment von pBR322 inseriert.

Die Ergebnisse zeigen, daß ein Primer, der der Matrizensequenz nicht perfekt entspricht, der jedoch trotzdem ausreichend hybridisieren kann, um enzymatisch verlängert zu werden, ein langes Produkt produziert, das die Sequenz des Primers statt der entsprechenden Sequenz der ursprünglichen Matrize enthält. Das lange Produkt dient als Matrize für den zweiten Primer zur Einführung einer in vitro-Mutation. In weiteren Zyklen wird diese Mutation mit unverminderter Effizienz amplifiziert, da kein weiteres fehlgepaartes Primer erforderlich ist. In diesem Fall wurde ein Primer, der eine nichtkomplementäre Verlängerung an seinem 5'-Ende trägt, zur Insertion einer neuen Sequenz in das Produkt benachbart zur kopierten Matrizensequenz verwendet.

E. Da die Reaktion mit Polymerase Pyrophosphat erzeugt und theoretisch reversibel ist (Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman, San Francisco, 1980), wurde die Wirkung des Einschlusses einer anorganischen Pyrophosphatase zur Vermeidung einer potentiellen Pyrophosphorolyse des Produkts untersucht. Die qualitative Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Untersuchung von Reaktionen mit und ohne Pyrophosphatase zeigte eine geringe aber signifikante Erhöhung der Homogenität des Produkts als Ergebnis des Einschlusses dieses Enzyms.

Beispiel 10

[0123] Dieses Beispiel erläutert die Verwendung von ineinander angeordneten Sätzen von Primern zur Verinergerung des Hintergrunds bei der Amplifikation von einmalig vorkommenden Genen.

[0124] Menschliche Gesamt-DNA, die für das Wildtyp-Betaglobinallel homozygot war, wurde zwanzig Amplifikationszyklen, wie nachstehend beschrieben, unterzogen: Insgesamt 10 µg DNA, 200 picomol jedes Primers

d(ACACAACGTGTTCCTACTAGC) und
d(CAACTTCATCCACGTTCACC)

und 100 nmol jedes dNTP in 100 µl 30mM Tris-Acetat, pH 7,9, 60 mM Natriumacetat, 10 mM Dithiothreit und 10 mM Magnesiumacetat wurden eine Minute auf 100°C erhitzt, eine Minute auf 25°C abgekühlt und zwei Minuten mit 2 Einheiten Klenowfragment behandelt. Der Zyklus von Erhitzen, Abkühlen und Zugabe von Klenow wurde 19mal wiederholt. Ein 10 µl-Aliquot wurde aus dem Reaktionsgemisch entfernt und weiteren zehn Amplifikationszyklen unter Verwendung von jedem der Primer

d(CAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTG) und
d(CCCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCC)

unterzogen, die ein 58 bp-Fragment, das im vorstehend produzierten 110 bp-Fragment enthalten ist, amplifizieren. Diese letzten zehn Amplifikationszyklen wurden durch Verdünnen des 10 µl-Aliquots in 90 µl des vorstehend beschriebenen frischen Tris-Acetat-Puffers, der 100 nmol jedes dNTPs und 200 pmol jedes Primers enthielt, erreicht. Die Reaktionsbedingungen waren, wie vorstehend beschrieben. Nach zehn Zyklen wurde ein 10 µl-Aliquot (der 100 Nanogramm der ursprünglichen DNA entsprach) auf ein 6% NuSieve (FMC Corp.)-Agarosegel aufgetragen und unter Verwendung von Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

[0125] Fig. 10 erläutert dieses Gel, das mit UV-Licht bestrahlt und durch ein rotes Filter photographiert wurde, wie es auf dem Fachgebiet bekannt ist. Bahn 1 zeigt Molekulargewichtsmarker. Bahn 2 zeigt ein Aliquot der vorstehend beschriebenen Reaktion. Bahn 3 zeigt ein Aliquot einer Reaktion, die mit der vorstehend beschriebenen identisch ist, ausgenommen daß die ursprüngliche Wildtyp-DNA mit Ddel vor der Amplifikation gespalten wurde. Bahn 4 zeigt ein Aliquot einer Reaktion, die mit der vorstehend beschriebenen identisch ist, ausge-

(TN10) 5'-CCTCGTCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCGACTATGTGCTCCTCA-
CCCACACCGTCAGCC-3'

(TN11) 5'-GGCAGGGGCTCTTGACGGCAGAGAGGAGGTTGACCTTCTCCTGGTAGGAGATGGCGAAG-
CGGCTGACGGTGTGG-3'

(LL09) 5'-CCTGGCCAATGGCATGGATCTGAAAGATAACCAGCTGGTGGTGCCAGCAGATGGCCTGT-
ACCTCGTCTACTCCC-3'

(LL12) 5'-CTCCCTGATAGATGGGCTCATACCAGGGCTTGAGCTCAGCCCCCTCTGGGGTGTCTTC-
GGGCAGGGGCTCTTG-3'

(TN08) 5'-TGTAGCAAACCATCAAGTTGAGGAGCAGCTCGAGTGGCTGAGCCAGCGGGCCAATGCC-
TCCTGGCCAATGGCA-3'

(TN13) 5'-GATACTTGGGCAGATTGACCTCAGCGCTGAGTTGGTCACCCCTTCTCCAGCTGGAAGACC-
CCTCCCTGATAGATG-3'

(LLD7) 5'-CCTTAAGCTTATGCTCAGATCATCTTCTCAAACCTCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATG-
TTGTAGCAAACCATC-3'

(TN14) 5'-GCTCGGATCCTTACAGGGCAATGACTCCAAAGTAGACCTGCCAGACTCGGCAAAGTCG-
AGATACTTGGGCAGA-3'

Allgemeine Verfahren

I. Zehn Zyklen des nachstehend angegebenen Protokolls wurden unter Verwendung der Primer TN10 und TN11 durchgeführt, die, wie im nachstehenden Diagramm in Schritt (a) dargestellt, miteinander wechselwirken.

II. Insgesamt 2 µl des Reaktionsgemisches des vorstehenden Teils I wurden den Primern LL09 und LL12 zugesetzt. Das nachstehend beschriebene Protokoll wurde 15 Zyklen durchgeführt, so daß die Primer mit dem Produkt von Teil I miteinander wechselwirken, wie im nachstehenden Diagramm in Schritt (b) dargestellt.

III. Insgesamt 2 µl des Reaktionsgemisches des vorstehenden Teils II wurden den Primern TN08 und TN13 zugesetzt. Das nachstehend beschriebene Protokoll wurde 15 Zyklen durchgeführt, so daß die Primer mit dem Produkt von Teil II miteinander wechselwirken, wie im nachstehenden Diagramm in Schritt (c) dargestellt.

IV. Insgesamt 2 µl des Reaktionsgemisches des vorstehenden Teils III wurden den Primern LL07 und LL14 zugesetzt. Das nachstehend beschriebene Protokoll wurde 15 Zyklen durchgeführt, so daß die Primer mit dem Produkt von Teil III miteinander wechselwirken, wie im nachstehenden Diagramm in Schritt (d) dargestellt.

Protokoll

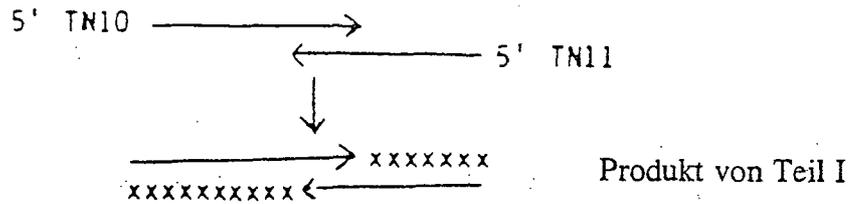
Jede Reaktion enthielt 100 µl
2 mM dATP, dCTP, dGTP bzw. TTP
3 uM jedes in diesem Schritt verwendeten Primers
1 x Polymerasepuffer (30 mM Tris-Acetat, 60 mM Na-Acetat, 10 mM Mg-Acetat und 2,5 mM Dithiothreit)

Jeder Zyklus bestand aus:

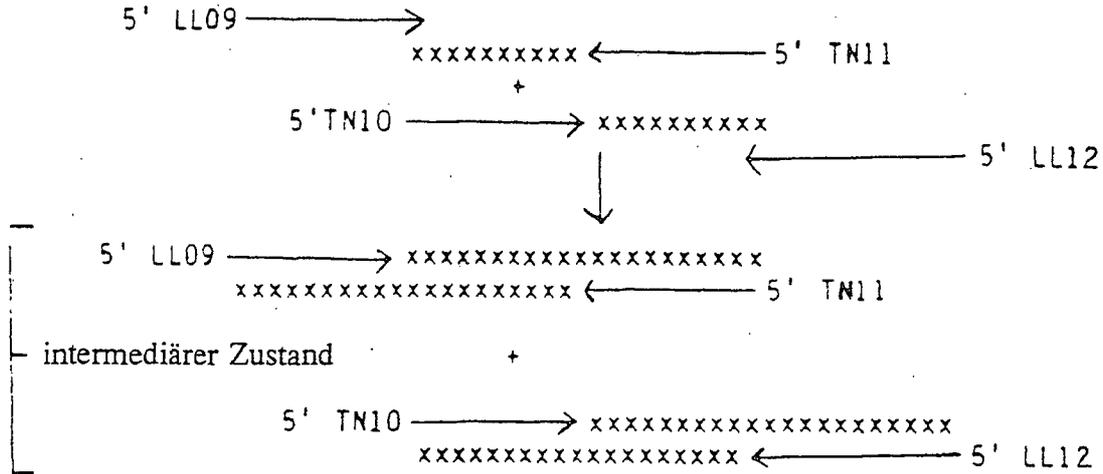
- 1) 1 min in kochendem Wasser
- 2) 1 min Abkühlen bei Raumtemperatur
- 3) Zugabe von 1 µl (5 Einheiten) des Klenowfragments der DNA-Polymerase
- 4) Durchführung der Polymerisation 2 min. Der nächste Zyklus beginnt erneut bei Schritt 1.

Diagramm

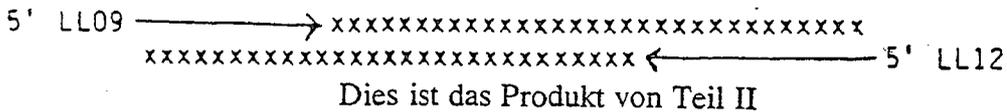
a)



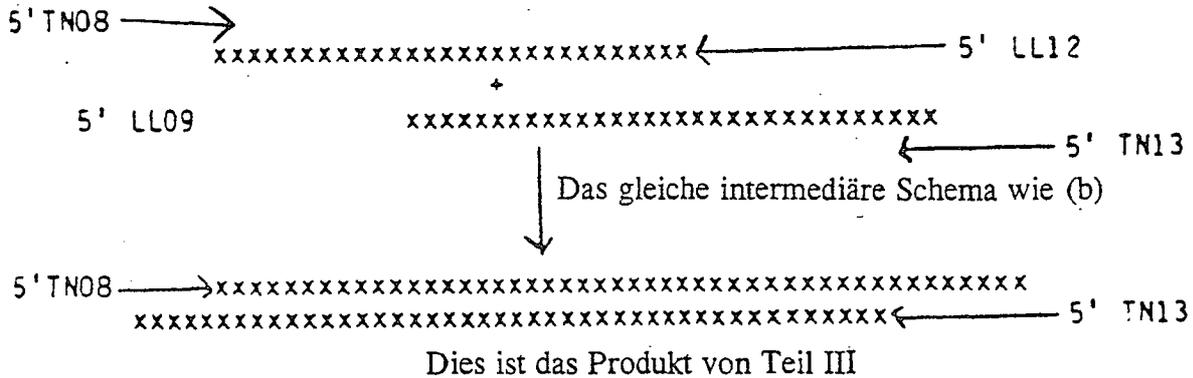
b)

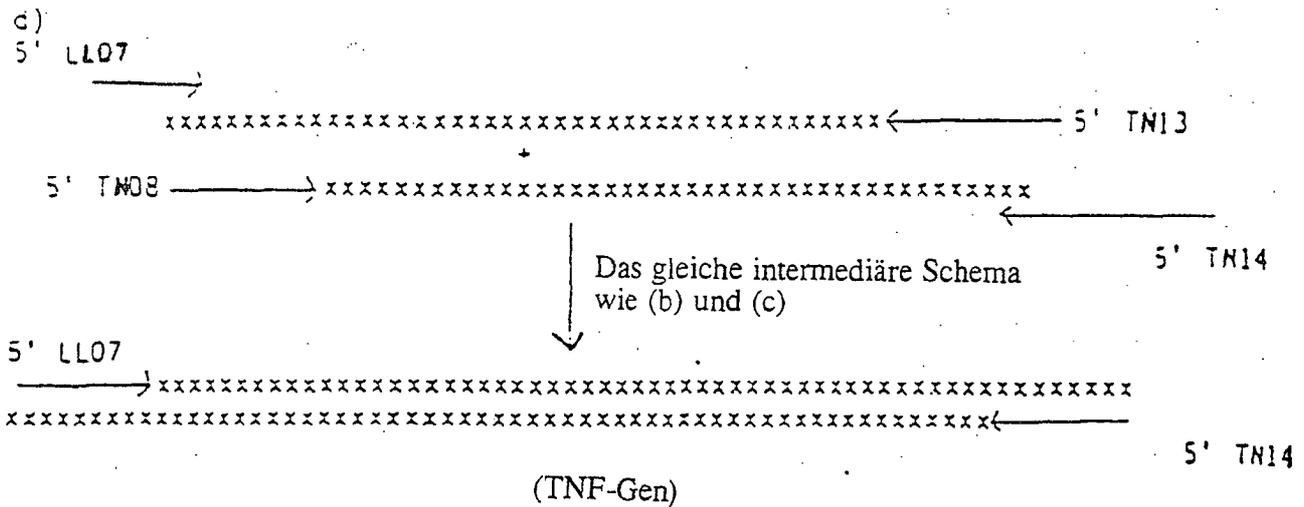


Nur die Sequenz zwischen 5' von LL09 und 5' von LL12 hat die vollständige Länge. Die TN10 und TN11 enthaltenden Stränge haben nicht wachsende Enden. Daher ...



c)





[0130] Die Zelle SC-1 (CTCC #0082) wurde am 19. März 1985 bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 USA, unter der ATCC-Hinterlegungsnummer CRL#8756 hinterlegt.

[0131] Zusammengefaßt betrifft die vorliegende Erfindung Oligonucleotide (Primer), die eine exponentielle Amplifikation von einer oder mehreren spezifischen Nucleinsäuresequenzen und Anknüpfung einer Promotorsequenz unter Verwendung einer Polymerasekettenreaktion erlauben, bei der Primerextensionsprodukte produziert werden, die anschließend als Matrizen für weitere Primerextensionsreaktionen dienen können. Die Oligonucleotide sind besonders nützlich zum Nachweis von Nucleinsäuresequenzen, die zu Beginn nur in sehr kleinen Mengen vorhanden sind.

[0132] Man ist sich bewußt, daß diese Oligonucleotide zur Amplifikation jeglicher gewünschten Nucleinsäuresequenz verwendet werden können. Beispiele für diese Sequenzen sind menschliche HLA-, DQ-, DR- oder DP- α - und - β -Gene, N-ras-Onkogene und TNF-Gene oder ein Teil oder modifizierte Sequenzen davon (z. B. unter Verwendung von selektierten Deletionen oder Substitutionen).

Patentansprüche

1. Erstes und zweites einzelsträngiges Oligonucleotid, das die exponentielle Amplifikation einer spezifischen, in einer einzel- oder doppelsträngigen Nucleinsäure oder in einem Gemisch solcher Nucleinsäuren enthaltenen Nucleinsäuresequenz durch Polymerase-Kettenreaktion erlaubt, wobei
 - (a) ein Oligonucleotid dieser Oligonucleotide zu der einzelsträngigen Nucleinsäure oder zu einem Strang der doppelsträngigen Nucleinsäure im Wesentlichen komplementär ist;
 - (b) das andere Oligonucleotid dieser Oligonucleotide zu einem komplementären Strang der einzelsträngigen Nucleinsäure oder zu dem anderen Strang der doppelsträngigen Nucleinsäure im Wesentlichen komplementär ist;
 - (c) eines der Oligonucleotide zusätzlich eine Sequenz enthält, die zu der Nucleinsäure nicht komplementär ist, wobei die Sequenz eine Promotorsequenz ist; und wobei
 - (d) die Teile der Oligonucleotide mit wesentlicher Komplementarität die Enden der spezifischen zu amplifizierenden Nucleinsäuresequenz definieren.
2. Oligonucleotide nach Anspruch 1, wobei der Promotor der T7-Promotor ist.
3. Oligonucleotide nach Anspruch 1 oder 2, wobei die spezifische Nucleinsäuresequenz in einer größeren Sequenz enthalten ist.
4. Oligonucleotide nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Nucleinsäure DNA oder RNA ist, einschließlich Boten-RNA, wobei die DNA oder RNA einzelsträngig oder doppelsträngig sein kann, oder ein DNA-RNA-Hybrid ist.
5. Oligonucleotide nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nucleinsäure genomische DNA ist.
6. Oligonucleotide nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Teile der Oligonucleotide mit wesentlicher Komplementarität mindestens etwa 7 bis 25 Nucleotide enthalten.

7. Verwendung der Oligonucleotide nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur exponentiellen Amplifikation einer spezifischen Nucleinsäuresequenz, die in einer einzel- oder doppelsträngigen Nucleinsäure oder in einem Gemisch solcher Nucleinsäuren enthalten ist, durch Polymerase-Kettenreaktion.

8. Verwendung nach Anspruch 7 zur Ermöglichung von Amplifikation, Nachweis und/oder Charakterisierung von spezifischen Nucleinsäuresequenzen, die mit infektiösen Erkrankungen wie solchen, die durch Bakterien, Viren und parasitäre Protozoen verursacht werden, mit genetischen Erkrankungen, wie solchen, die durch spezifische Deletionen und/oder Mutationen in genomischer DNA verursacht werden, oder mit zellulären Erkrankungen, wie Krebs in Zusammenhang stehen.

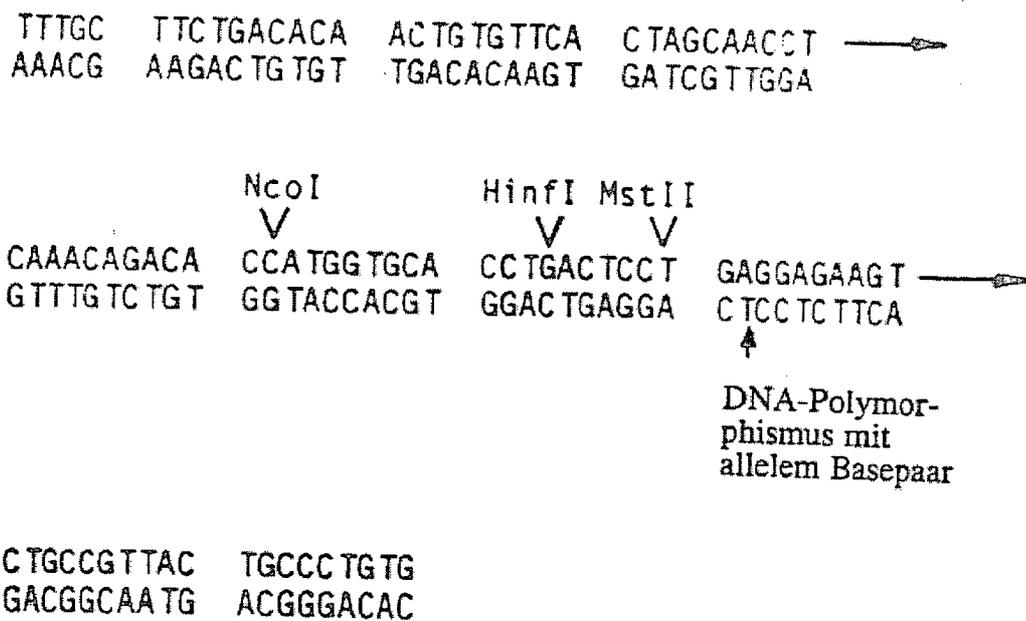
9. Verwendung nach Anspruch 7 zur Ermöglichung von RNA-Transkription.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

Doppelsträngige 94 bp-Sequenz



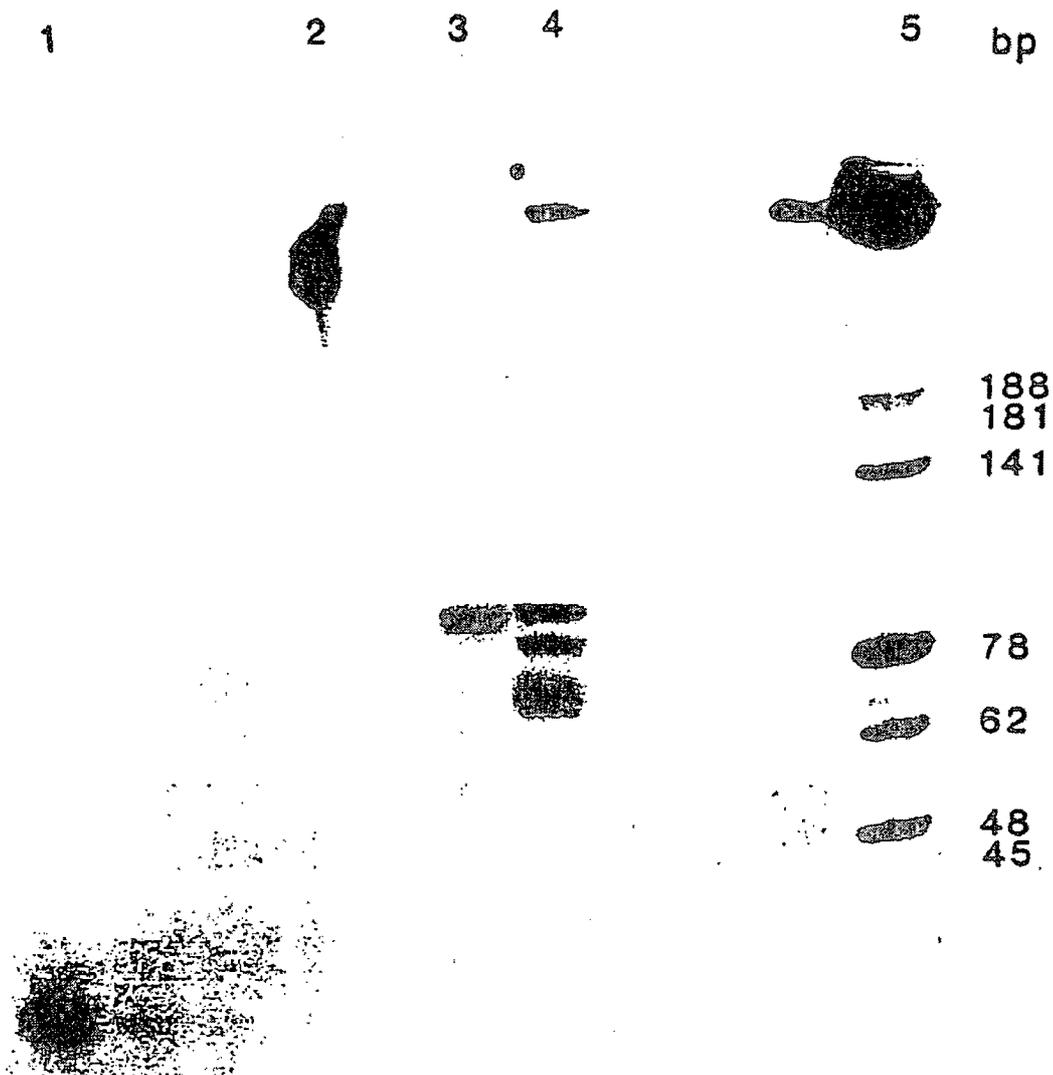


FIG.2

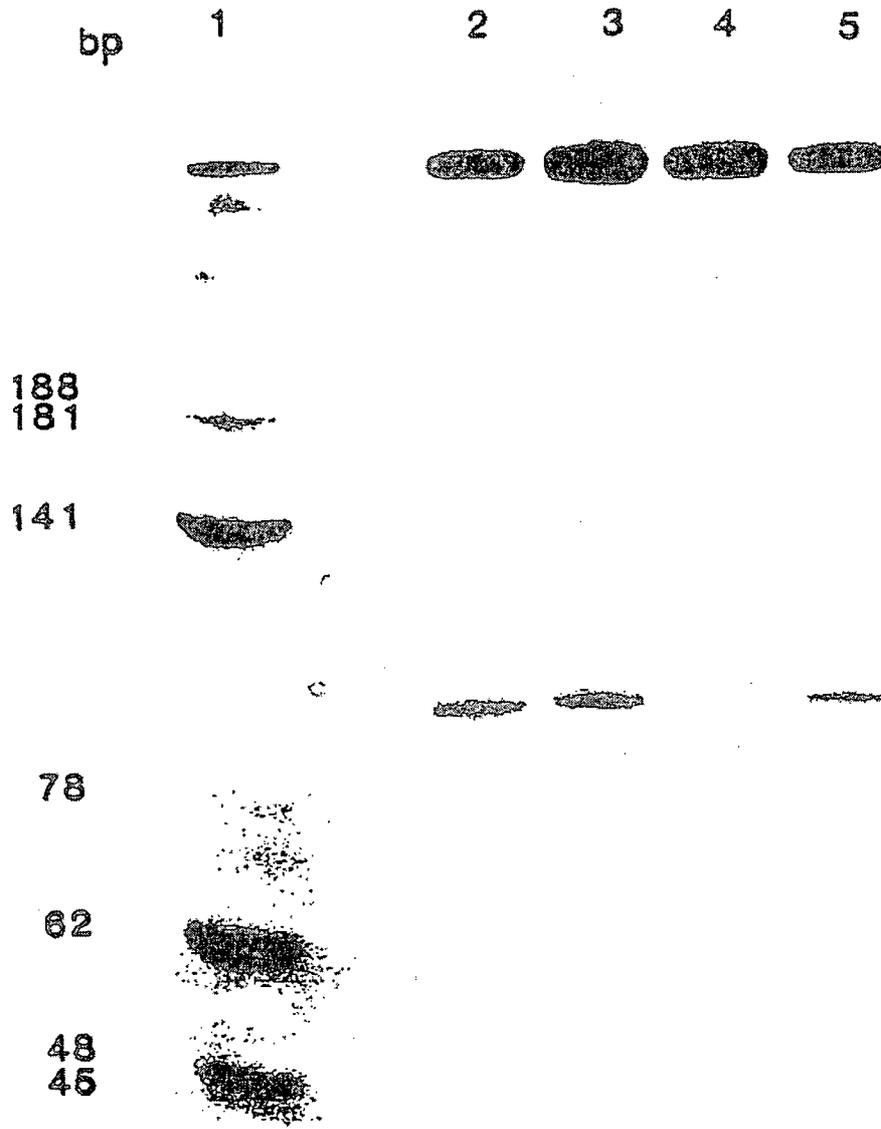


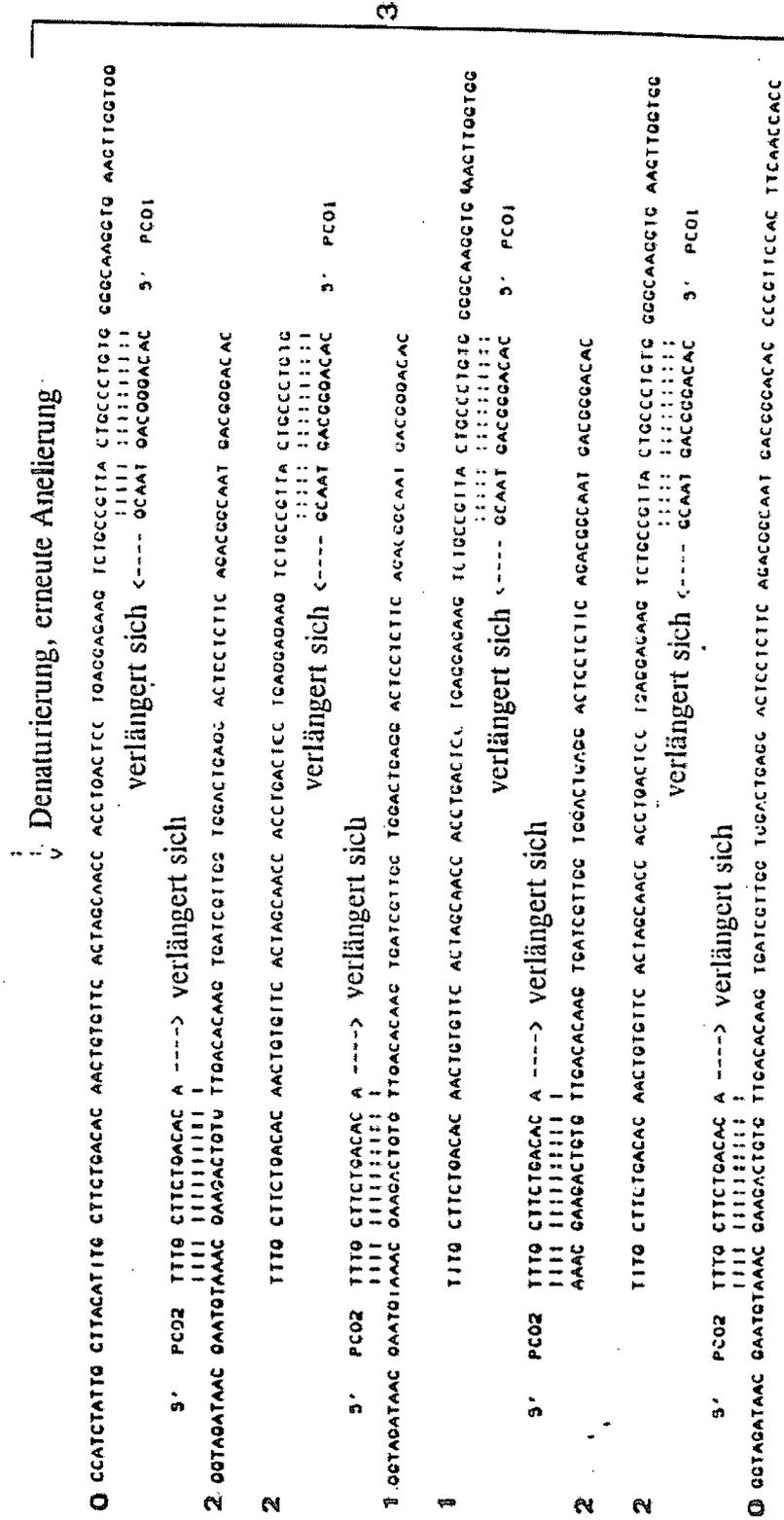
FIG.3

FIG.4-2 : Polymerase, dNTPs

0	CCATCTATTG	CTTCTGACAC	AACCTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCGTTA	CTGCCCTGTG	GGGCAAGCTG	AAGTTGGTGG
1										
2	GGTAGATAAC	GAATGATAAC	GAAGACTGTG	TGACACAAAG	TGACTGTTGG	TGACTGACC	ACTCCTCTTC	AGACGCCAAT	GACGGGACAC	
0	TTTG	CTTCTGACAC	AACCTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCGTTA	CTGCCCTGTG	GGGCAAGCTG	AAGTTGGTGG
1										
2	AAAC	GAAGACTGTG	TGACACAAAG	TGACTGTTGG	TGACTGACC	ACTCCTCTTC	AGACGCCAAT	GACGGGACAC		
0	TTTG	CTTCTGACAC	AACCTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCCGTTA	CTGCCCTGTG	GGGCAAGCTG	AAGTTGGTGG
1										
2	GGTAGATAAC	GAATGATAAC	GAAGACTGTG	TGACACAAAG	TGACTGTTGG	TGACTGACC	ACTCCTCTTC	AGACGCCAAT	GACGGGACAC	CCCGTTCCAC

2

FIG.4-2 Fortsetzung



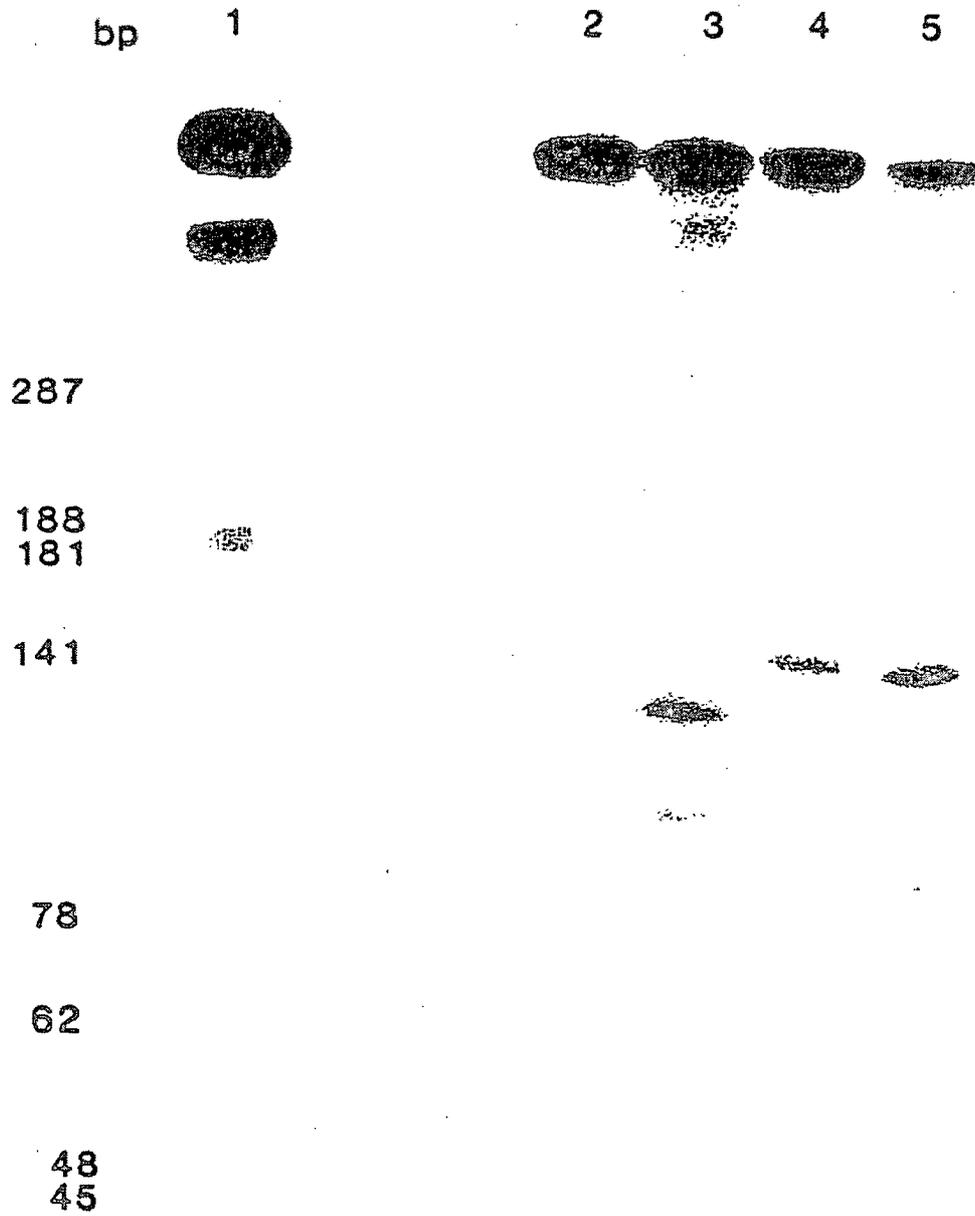
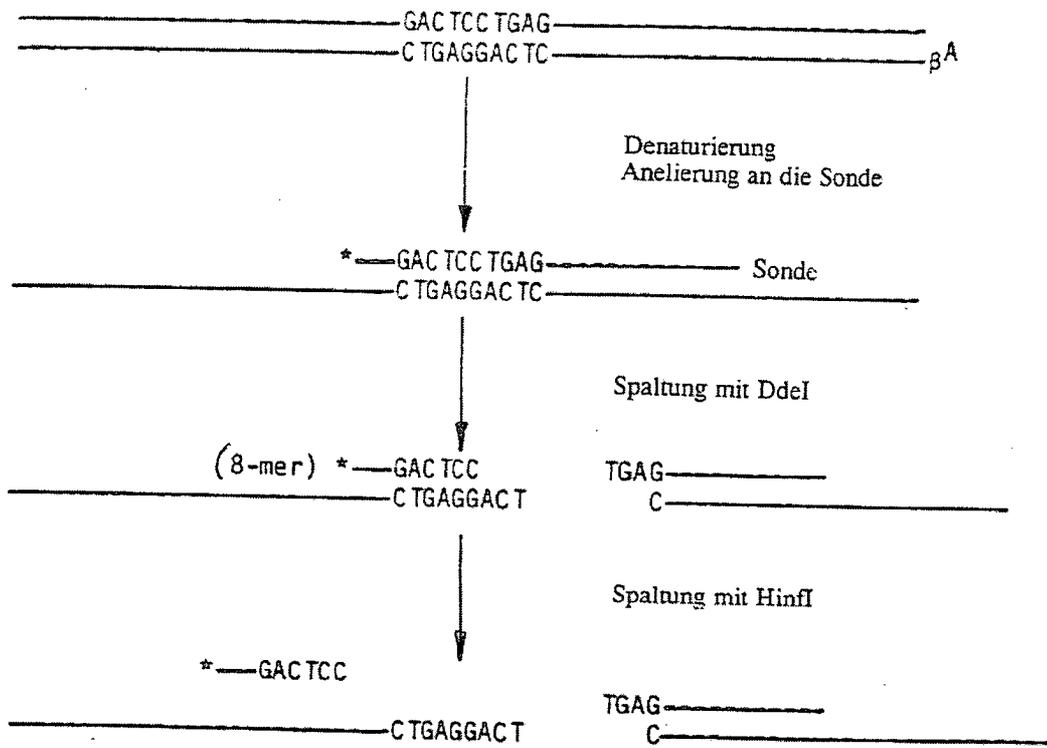


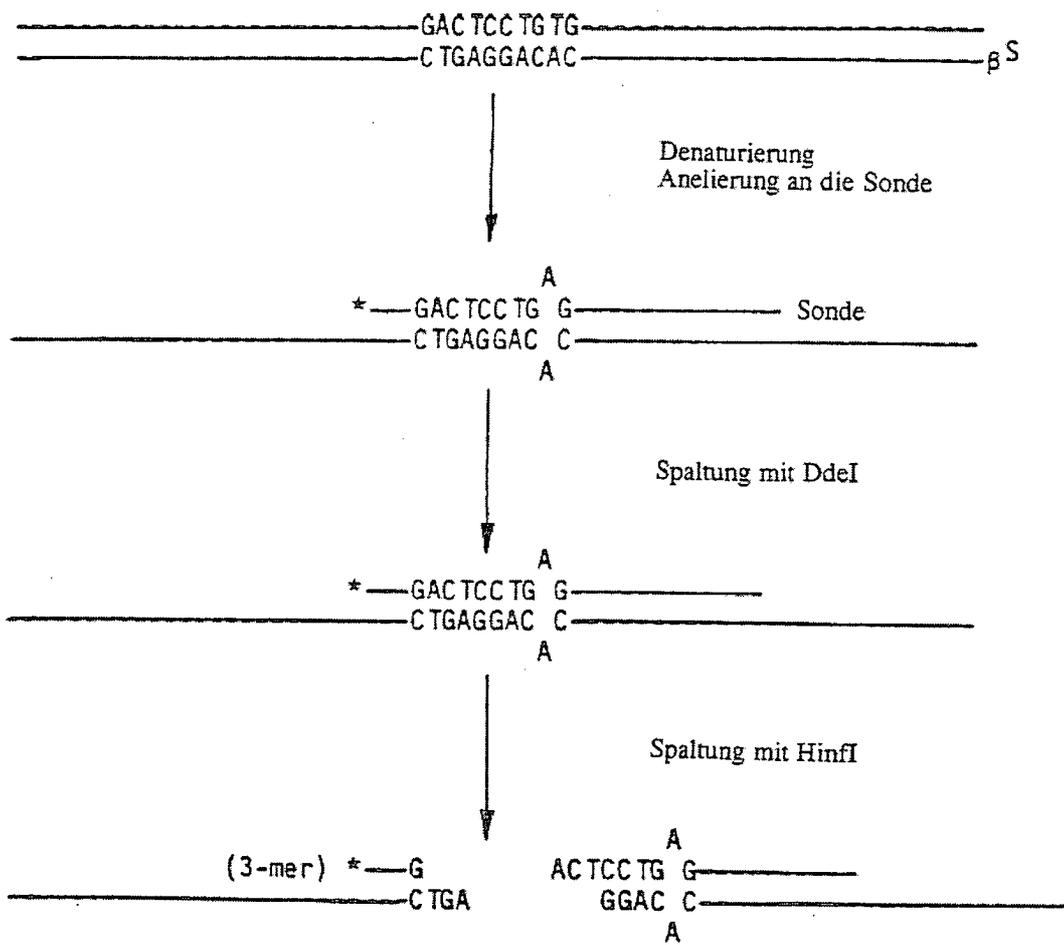
FIG.5

FIG.7



* ist der Marker

FIG.8



* ist der Marker

FIG.9

A B C D

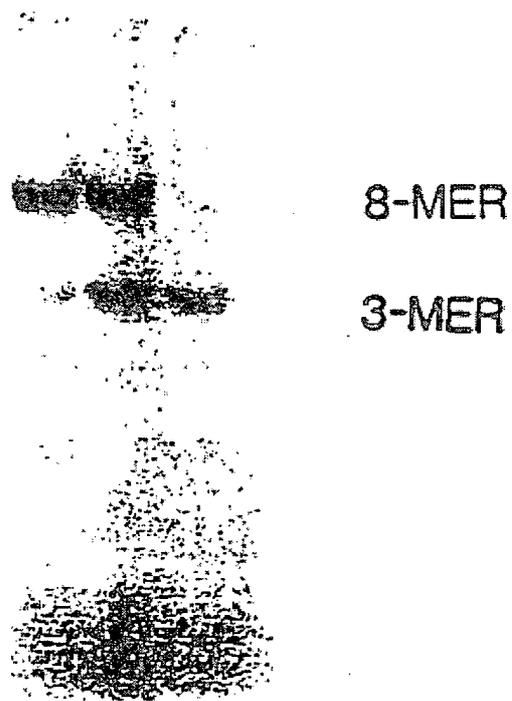


FIG. 10

