



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 003 638 A1** 2006.07.27

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 003 638.4**

(22) Anmeldetag: **24.01.2005**

(43) Offenlegungstag: **27.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07H 21/00** (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 1/44 (2006.01)

B01J 19/12 (2006.01)

(71) Anmelder:

**Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena,
DE**

(72) Erfinder:

**Claussen, Uwe, Prof. Dr. med., 07743 Jena, DE;
Halbhuber, Karl-Jürgen, Prof. Dr. med., 07751
Jena, DE; Liehr, Thomas, Dr. rer. nat., 07751 Jena,
DE; Weise, Ania, Dipl.-Biol., 07743 Jena, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Nukleinsäurehybridisierung**

(57) Zusammenfassung: Es sollen die in situ-Hybridisierung mit Nukleinsäuren verbessert und das Hybridisierungsverfahren verkürzt werden.

Erfindungsgemäß wird das Verfahren zur Nukleinsäurehybridisierung unter dem Einfluss von Mikrowellen bei einer Hybridisierungstemperatur von maximal 37°C durchgeführt.

Die Erfindung wird beispielsweise angewendet zur Markierung und Auswertung von Nukleinsäureproben.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur schnellen in-situ-Hybridisierung mit Nukleinsäuren, beispielsweise für die Markierung auszuwertender Nukleinsäureproben. Anwendungsgebiete hierfür sind zum einen in-situ-Hybridisierungen die unter zeitlichem Druck stehen, wie z. B. in der Pränataldiagnostik oder schwer zu hybridisierende bzw. kleine Nukleinsäureproben, die durch das Verfahren zuverlässiger hybridisieren.

Stand der Technik

[0002] In-situ-Hybridisierungen mit Nukleinsäuren sind an sich bekannt (z. B. Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization, Proc Natl Acad Sci USA 83, 1986, 2934-2938). Diese werden bei festgelegten Temperaturen (meist 37 °C) vorgenommen und haben zum Ziel, dass Nukleinsäureproben (beispielsweise DNA-Proben bzw. Sonden), die zumeist in besonderer Form markiert sind (beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop nach entsprechender Anregung leuchten), an Zielsequenzen mit entsprechender Basenhomologie binden. Diese Zielsequenzen können sich in unterschiedlichen Formen befinden. Es können z. B. DNA-Sequenzen in Zellkernen, in Chromosomen oder generell in Geweben und Gewebsschnitten sein, aber auch bereits gebunden an besondere Oberflächen, wie Glas in Verbindung mit array-Techniken (Überblick z. B. Forster T, Roy D, Ghazal P: Experiments using microarray technology: limitations and standard operating procedures, J Endocrinol. 178, 2003, 195-204).

[0003] Die Zielsequenzen sind bekanntermaßen für die Probensequenzen vielfach schwer erreichbar (wie beispielsweise DNA-Sequenzen in chromosomalen Strukturen, Saitoh Y, Laemmli UK: Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold, Cell 76, 1994, 609-622).

[0004] Das Aufschmelzen der Zielsequenzen (Denaturieren z. B. der DNA) wird vor der Hybridisierung insbesondere durch Hitze erreicht. (Überblick in „FISH Technologies“, Rautenstraß und Liehr, 1. Auflage, Springer 2001).

[0005] Insgesamt muss angemerkt werden, dass in-situ-Hybridisierungen mit Nukleinsäuren relativ zeitaufwendig sind und mehrere Stunden an Reaktion bedürfen. Aus diesen Gründen verlaufen diese nicht selten bis in die Nacht oder bis in den nächsten Tag hinein, wovon natürlich die Weiterbehandlung der hybridisierten Präparate betroffen wird. In der Regel ist durch die langen Reaktionszeiten eine kontinuierliche Weiterverarbeitung nicht oder nur selten ge-

geben.

[0006] Zur Verbesserung der Hybridisierungseffizienz an chromosomaler DNA wurde bisher die Mikrowelle nicht eingesetzt. Über einen solchen spezifischen Einsatz von Mikrowellen ist auch in der Fachwelt bisher nichts bekannt geworden.

[0007] Mikrowellen wurden bislang nur für die Hybridisierungsverbesserung auf Gewebeschnitten in der Immunohistochemie eingesetzt. (z. B. Coates PJ, Hall PA, Butler MG, D'Ardenne AJ: Rapid technique of DNA-DNA in situ hybridisation on formalin fixed tissue sections using microwave irradiation, J Clin Pathol 40, 1987, 865-869; Bull JH, Harnden P: Efficient nuclear FISH on paraffin-embedded tissue sections using microwave pretreatment, Biotechniques. 26, 1999, 416-418, 422; Kobayashi K, Kitayama Y, Igarashi H, Yoshino G, Kobayashi T, Kazui T, Sugimura H: Intratumor heterogeneity of centromere numerical abnormality in multiple primary gastric cancers: application of fluorescence in situ hybridization with intermittent microwave irradiation on paraffinembedded tissue, Jpn J Cancer Res 91, 2000, 1134-1141).

[0008] Weiterhin wurden Mikrowellen an chromosomaler DNA wie auch Gewebeschnitten lediglich vor dem Hybridisierungsprozess verwandt, um die Zielsequenzen (über einen Wärmeeffekt) von der Doppelstrangform in die Einstrangform zu überführen (Aufschmelzen des Doppelstrangs) und damit für eine Hybridisierung mit Proben-DNA erst zugänglich zu machen (z. B. Ko E, Rademaker A, Martin R: Microwave decondensation and codenaturation: a new methodology to maximize FISH data from donors with very low concentrations of sperm, Cytogenet Cell Genet 95, 2001, 143-145). Dieser Effekt berührt die Verwendbarkeit der Zielsequenzen für die Hybridisierung an sich, jedoch nicht die Effizienz der nachfolgenden Hybridisierung.

[0009] Es besteht aber seitens der Fachwelt ein großes Interesse, die Hybridisierungszeiten zu verringern, da Standard Fluoreszenz in situ Protokolle im wesentlichen sechs Schritte beinhalten. Jeder dieser Schritte ist wichtig um ein Hybridisierungsergebnis zu erhalten (praktische Einzelheiten: Levy ER, Herrington CS: Non-isotopic methods in molecular biology: a practical approach, 1995 Oxford University Press; Choo KHA: Methods in Molecular Biology, Vol.33: In situ hybridisation Protocols, 1994, Humana Press Inc.; Totowa NJ, Wilkinson DG: In situ hybridization: a practical approach. 1992, Oxford University Press): 1. Zielsequenz präparieren (Fixierung und Vorverdau), 2. Sondenpräparation und Sondenmarkierung, 3. Zielsequenz und Sonde denaturieren, 4. Hybridisieren der Sonde auf die Zielsequenz, 5. Posthybridisierungswaschungen und 6. Detektion. Der zeitaufwendigste Schritt ist mit Abstand Schritt 4, der je nach Sondentyp zwei bis vier Stunden (Zentromer-

sonden) oder einen bis mehrere Tage (single copy und sehr kleine Sonden) dauert.

Aufgabenstellung

[0010] Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, die in-situ-Hybridisierung mit Nukleinsäuren zu verbessern und das Hybridisierungsverfahren zu verkürzen.

[0011] Erfindungsgemäß wird das Verfahren zur Nukleinsäurehybridisierung unter dem Einfluss von Mikrowellen durchgeführt.

[0012] Überraschend hat sich gezeigt, dass die Hybridisierung unter dem besagten Mikrowelleneinfluss wesentlich schneller verläuft als auf herkömmliche Weise. Der eingangs genannte und sonst übliche hohe zeitliche Aufwand für die Hybridisierung kann durch die Erfindung erheblich reduziert werden, so dass auch eine zeitlich problemlose Weiterbearbeitung der Präparate nach der Hybridisierung (beispielsweise Auswertung unter dem Mikroskop) noch am selben Tag (und damit unmittelbar nach der Hybridisierung) vorgenommen werden kann, was bisher nicht selten problematisch war. Darüber hinaus hinterlassen die Hybridisierungsergebnisse im Ergebnis der vorgeschlagenen Mikrowellenbehandlung qualitativ einen deutlich besseren Eindruck, der sich über spezifischere Hybridisierungssignale vermittelt. Dies ist besonders entscheidend beim Einsatz kleiner und single copy Nukleinsäuresonden, deren konventionelle Hybridisierung oft zu hintergrundreichen nicht auswertbaren Ergebnissen führt.

[0013] Der erfindungsgemäße Mikrowelleneffekt ist auf den Hybridisierungsprozess selbst hingegen sehr weitgehend unabhängig von der Wärmebildung an den Zielsequenzen. Es ist vielmehr von einer Mikrowellen-vermittelten Anregung der Molekülbewegungen auszugehen, welche das Erreichen der Zielsequenzen durch die Probensequenzen sterisch erleichtert und verbessert.

[0014] Die Nukleinsäurehybridisierung unter dem Einfluss von Mikrowellen erfolgt vorzugsweise bei einer Hybridisierungstemperatur von maximal 37 °C. Dabei kann die Hybridisierungstemperatur vorteilhaft durch ein Kaltwasserbad geregelt werden, indem die Mikrowelleneinwirkungszeit anhand von Eichkurven entsprechend der Wassertemperatur und dem Wasservolumen des Kaltwasserbades so bestimmt wird, dass am Ende der Mikrowelleneinwirkungszeit eine Wassertemperatur von maximal 37 °C erreicht wird.

Ausführungsbeispiel

[0015] Die Erfindung soll nachstehend anhand eines Ausführungsbeispiels (Vorschrift zur Herstellung von Präparaten menschlicher Metaphasechromoso-

men aus Lymphozyten zur Markierung und fluoreszenzmikroskopischen Analyse) näher erläutert werden.

Vorschrift:

[0016] Stelle Präparate von menschlichen Metaphasechromosomen aus Lymphozyten auf konventionelle Art her und denaturiere die chromosomale DNA ebenfalls auf konventionelle Art (über den Einsatz von Hitze).

[0017] Wähle eine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Sonde (beispielsweise einen menschlichen BAC-Klon) und denaturiere seine DNA auf konventionelle Weise (z. B. hitzevermittelt).

[0018] Überschichte die denaturierte Ziel-DNA mit der denaturierten Proben-DNA (z. B. auf dem Objektträger) und überführe beides zur Hybridisierung in ein kleines Wasserbad bei 37 °C.

[0019] Stelle das Wasserbad in einen Mikrowellenofen und führe in zeitlichen Abständen die Mikrowellenbehandlung in Form von kurzzeitigen Mikrowellenstößen durch (z. B. vier- bis sechsmal innerhalb einer halben Stunde bei 600 W für eine Minute).

[0020] Bereite den Objektträger danach für die fluoreszenzmikroskopische Analyse zu.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Nukleinsäurehybridisierung, beispielsweise für die Markierung auszuwertender Nukleinsäureproben auf chromosomaler DNA, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nukleinsäurehybridisierung unter dem Einfluss von Mikrowellen erfolgt.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäurehybridisierung bei einer Hybridisierungstemperatur von maximal 37 °C durchgeführt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Hybridisierungstemperatur zu Beginn der Mikrowelleneinwirkung durch ein Kaltwasserbad reguliert wird, indem die Mikrowelleneinwirkungszeit entsprechend der Wassertemperatur und dem Wasservolumen des Kaltwasserbades so festgelegt wird, dass am Ende der Mikrowellen-Einwirkungszeit eine Wassertemperatur von maximal 37 °C erreicht wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäurehybridisierung unter einer Mikrowelleneinwirkung in Form kurzzeitiger Mikrowellenstöße, beispielsweise vier- bis sechsmalige Mikrowellenstöße innerhalb einer halben

Stunde, durchgeführt wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen