



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2006 038 113 A1 2008.02.21

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2006 038 113.0

(22) Anmeldetag: 14.08.2006

(43) Offenlegungstag: 21.02.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12Q 1/68 (2006.01)

(71) Anmelder:  
QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, DE

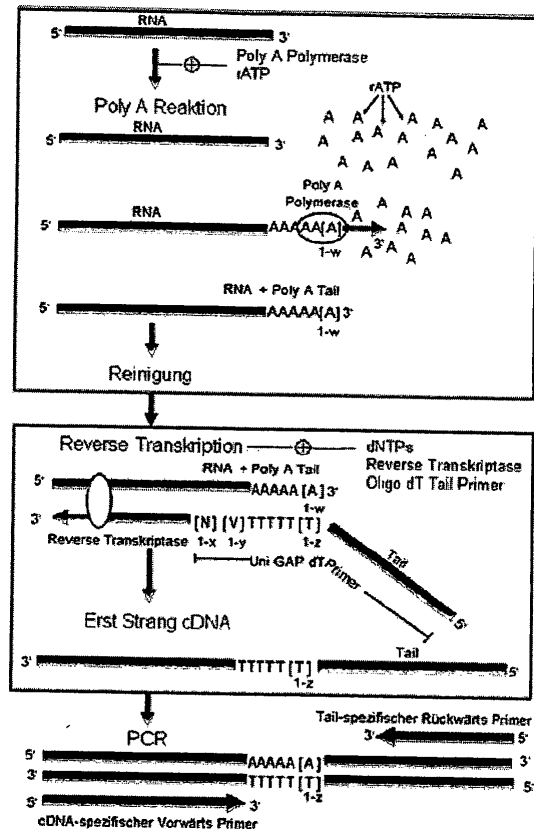
(74) Vertreter:  
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:  
Engel, Holger, 40724 Hilden, DE; Korfhage,  
Christian, 40764 Langenfeld, DE; Löffert, Dirk,  
40589 Düsseldorf, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Synthese einer cDNA in einer Probe in einer enzymatischen Reaktion und gleichzeitigen Bereitstellung eines ersten Enzyms mit Polyadenylierungsaktivität und eines zweiten Enzyms mit reverser Transkriptaseaktivität**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese einer cDNA in einer Probe in einer enzymatischen Reaktion, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt, gleichzeitige Bereitstellung eines ersten Enzyms mit Polyadenylierungsaktivität, eines zweiten Enzyms mit reverser Transkriptaseaktivität, eines Puffers, mindestens eines Ribonukleotids, mindestens eines Desoxyribonukleotids, eines Anker Oligonukleotids, Zugabe einer Probe, umfassend eine Ribonukleinsäure sowie Inkubation der Agenzien der vorhergehenden Schritte bei einem oder mehreren Temperaturschritten, welche so gewählt sind, daß das erste und das zweite Enzym Aktivität zeigen. Die Erfindung betrifft weiter ein Reaktionsgemisch, umfassend ein erstes Enzym mit Polyadenylierungsaktivität, ein zweites Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität, optional einen Puffer, optional mindestens ein Ribonukleotid, optional mindestens ein Desoxyribonukleotid und optional ein Anker Oligonukleotid. Zudem betrifft die Erfindung einen Kit, umfassend ein entsprechendes Reaktionsgemisch.



**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft das Gebiet der Molekularbiologie sowie der Forschung in diesem Gebiet aber auch die humane sowie nicht-humane Diagnostik.

**[0002]** Die Analyse von nicht-polyadenylierten RNA-Molekülen wie zum Beispiel bakteriellen RNAs oder kleinen RNAs, wie den sogenannten microRNAs (miRNA's) gestaltet sich schwierig und erfordert spezielle Verfahren. Ein mögliches Verfahren wurde kürzlich in der Literatur beschrieben. Dieses Verfahren umfaßt mehrere nacheinander geschaltete enzymatische Schritte, d.h. zuerst wird ein „Tailing“ der RNA mit Poly-(A)-Polymerase und einem geeigneten Substrat, typischerweise ATP, durchgeführt. Danach wird die Poly-(A)-Reaktion gestoppt und das Reaktionsprodukt aufgereinigt. Anschließend wird die generierte Poly-(A)-RNA in eine reverse Transkriptasereaktion gegeben und mit geeigneten Primern in cDNA umgeschrieben.

**[0003]** Die Durchführung dieser beiden nacheinander geschalteten enzymatischen Reaktionen ist aufwendig in der Durchführung und besitzt eine Vielzahl von Fehlerquellen, zum Beispiel Eintrag von Nukleasen, Verlust von Material oder Pipettierfehler.

**[0004]** microRNAs (miRNAs) variieren in der Größe von etwa 20 bis 25 Nukleotide und Stellen eine neue Familie von nicht-kodierenden RNA's dar.

**[0005]** Sie werden über einen sogenannten „Hairpin Precursor“ prozessiert und können als negative Regulatoren in der Genexpression eine Rolle spielen. So regulieren sie eine Vielzahl von Genen herunter (Ambros, V., 2001, MicroRNA's: Tiny regulators with great potential, Cell 107, 823–826). miRNAs werden zunächst als lange „primary transcript“ (sie werden auch primary miRNAs genannten) transkribiert (Lee, Y., Jeon, K. et al., 2002, MicroRNA maturation: stepwise processing in subcellular localisation, Embo J. 21, 4663–4670). Diese „primary transcript“ werden danach verkürzt, wobei die daraus resultierende Länge in etwa 70 Nukleotide beträgt. Es entstehen sogenannte „stem-loop structures“, sie werden auch „Prä-miRNAs genannt. Prä-miRNAs werden in das Zytoplasma exportiert. Das exportierende Enzym nennt sich Exportin-5. Sie werden hier weiter prozessiert und es entsteht auf diese Weise ein etwa 22 Nukleotid langes, reifes miRNA-Molekül (Lee, Y., et al., 2003, The nuclear RNA's III Drosha initiates microRNA processing, Nature 425, 415–419). Jüngste Studien haben vorgeschlagen, daß miRNAs eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung spielen. Grundsätzlich können microRNAs auf zwei verschiedene Arten und Weisen regulierend einwirken. In Pflanzen komplementieren miRNAs mit ihren korrespondierenden mRNAs durch exakte Komplementität. Dies führt zu einer Zerstörung der Ziel-mRNA durch einen Mechanismus, welcher RNA-Interferenz (RNAi) umfaßt. In Tieren verhindern miRNAs Genexpression durch einen Mechanismus, welcher Lin-4 und Let-7 umfaßt. Hier sind die miRNAs nicht genau komplementär zu ihren korrespondierenden mRNAs, jedoch verhindern sie die Synthese und Funktion der Proteine (Ambros, V., 2004, The functions of animal microRNAs, Nature, 431, 350–355). Aufgrund der entscheidenden Rolle, die die erst kürzlich entdeckten miRNAs spielen, kommt deren Nachweis bzw. Analyse eine entscheidende Rolle zu.

**[0006]** In Eukaryonten umfaßt die Synthese der 18s, 5,8s und 25/28s rRNAs die Prozessierung in Modifikationen sogenannten Precursor-rRNAs (pre-rRNA) im Nukleolus. Dieser komplexe Ablauf der rRNA-Biogenese umfaßt viele kleine sogenannte „small nucleolar RNAs“ (snoRNA) welche sich im Nukleolus anreichern. Sie tun dies in Form sogenannter small nucleolar ribonucleo Protein particles (snoRNPs) (Maxwell, E. S. et al., 1995, The small nucleolar RNAs, Annual Review Biochem., 35, 897–934).

**[0007]** Alle bis dato charakterisierten snoRNAs, mit der Ausnahme der RNase MRP fallen in zwei Familien. Diese sind die box c/D und box h/ACA slow RNAs, die sich durch ihnen gemeinsame Sequenzmotive unterscheiden lassen (Ballakin, A. D. et al., 1996, The RNA world of the nucleolus: two major families of small nucleolar RNAs defined by different box elements with related functions, Cell, 86, 823–834). Die genomische Organisation der snoRNA-Gene weist eine große Diversität auf in verschiedenen Eukaryonten auf. In Vertebraten sind die meisten snoRNAs innerhalb von Introns via „host gene“ eingefügt. Ausnahmen wie U3 werden unabhängig transkribiert. In Hefe gibt es snoRNAs welche in Introns eingefügt sind, jedoch wird die Majorität der snoRNAs als Einzelgen mit einem eigenen Promotor transkribiert. Geklusterte slow RNA-Gene werden durch gemeinsame Promotoren upstream transkribiert. Aufgrund der kleinen Größen und der fehlenden Polyadenylierung ist der Nachweis bzw. die Analyse von snoRNAs eine molekularbiologische Herausforderung.

**[0008]** Die PCR ist ein häufig eingesetztes Instrument zur Studie mikrobieller Organismen und wird mit unter auch verwendet um 16S rRNA-Gene zu analysieren. Jedoch ist die Entdeckung neuer Gene in mikrobiellen Proben eingeschränkt durch die nur bedingt mögliche Synthese von Primer. So werden Primer für 16S

RNA-Gene von jenen Sequenzen abgeleitet, die man von kultivierten Mikroben bereits kennt (Olson, D. J., 1986, *Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach*, *Annu. Rev. Microbial.* 40: 337–365). Aufgrund der Systematik, daß man nämlich für die Extraktion von 16S rRNA-Genen aus bis dato unbekannten Organismen auf Sequenzen zurückgreift, die man bereits kennt, ist es wahrscheinlich, daß die mikrobielle Diversität stark unterschätzt und auch nicht isoliert wird.

**[0009]** Ebenso wie die 16S rRNA-Moleküle nur schwer zu isolieren sind, sind prokaryontische mRNA-Moleküle mangels Kenntnis der Sequenz und insbesondere mangels Poly-A-Schwanz nur schwer zu isolieren.

**[0010]** Der Stand der Technik kennt einen 2-stufigen Prozess. Bei diesem Verfahren wird ein RNA-Molekül unter zu Hilfenahme des Enzyms Poly-A-Polymerase und dem Substrat Adenosintriphosphat so umgesetzt, daß ein polyadenyliertes Ribonukleinsäuremolekül entsteht. Dieses so polyadenylierte Ribonukleinsäuremolekül wird in einem weiteren Schritt aufgereinigt, bevor in einem dritten Schritt eine reverse Transkription stattfindet. Die reverse Transkription macht sich den polyadenylierten Schwanz zueigen, wobei ein homopolymeres Oligonukleotid in der Regel ein Poly-T-Oligonukleotid den polyadenylierten RNA-Schwanz komplementär anlagert. Das 3'-Ende des Poly-T-Oligonukleotids wird nun von der Polymerase genutzt, um einen Desoxyribonukleinsäurestrang zu erstellen, der komplementär zu dem vorliegenden Ribonukleinsäurestrang ist. Der so entstandene Strang nennt sich „first strand cDNA“. Diese cDNA kann in einer PCR-Reaktion genutzt werden, wobei es zum Einsatz von entweder Random-Primern oder aber spezifischen Primer kommt um so ein Amplifikat zu generieren. Shi et al. lehrt speziell den miRNA Nachweis über einen Oligo-dT Adapter-Primer, wobei ein Adapter spezifischer Primer in der PCR eingesetzt wird (Shi, R. and Chiang, V. L. (Shi, R. et al., *Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR*, *Biotechniques*, 2005, 39, 519–25).

**[0011]** Dieses erst jüngst publizierte Verfahren hat entscheidende Nachteile in Bezug auf die oben genannten speziellen Ribonukleinsäuremoleküle.

**[0012]** So bedingt das zweistufige Verfahren allgemein möglicherweise einen Eintrag von Verunreinigungen. Der Aufreinigungsschritt führt zu Verlusten von seltenen RNAs. Das zweistufige Verfahren erfordert eine Inaktivierung des ersten Enzyms sowie eine Inkubationszeit für das erste und das zweite Enzym, was insgesamt zu einem sehr großen Zeitaufwand führt. Das zweistufige Verfahren hat weiterhin den Nachteil, daß eine Verwechslungsgefahr von Proben dann auftreten kann, wenn zwei oder mehr Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Wie aus dem Stand der Technik bekannt ist, sind Ribonukleinsäuren relativ empfindlich was den Angriff von Nukleasen anbelangt. Das zweistufige Verfahren insbesondere der Schritt der Aufreinigung nach dem ersten Verfahren birgt die Gefahr, daß Nukleasen eingebracht werden. Letztendlich führen zwei oder mehr Schritte stets dazu, daß die Gefahr von Pipettierfehlern steigt.

**[0013]** Es ist somit Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren bereitzustellen, welches die cDNA-Synthese ermöglicht, Verunreinigungen weitestgehend verhindert, weniger zeitaufwändig ist, die Gefahr von Verwechslung der Proben minimiert, die Gefahr des Eintrags von Nukleasen minimiert und schließlich die Gefahr von Pipettierfehlern weitestgehend ausschließt.

**[0014]** Die vorliegende Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Synthese einer cDNA in einer Probe, in einer enzymatischen Reaktion, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt: (a) gleichzeitige Bereitstellung eines ersten Enzyms mit Polyadenylierungsaktivität, eines zweiten Enzyms mit reverser Transkriptaseaktivität, eines Puffers, mindestens eines Ribonukleotids, mindestens eines Desoxyribonukleotids, eines Anker Oligonukleotids, (b) Zugabe einer Probe umfassend eine Ribonukleinsäure und (c) Inkubation der Agenzien der Schritte (a) und (b) bei einem oder mehreren Temperaturschritten, welche so gewählt sind, daß das erste und das zweite Enzym Aktivität zeigen.

**[0015]** Bis dato bestanden Vorbehalte, daß eine Kombination der enzymatischen Polyadenylierung und der reversen Transkription technisch möglich ist. Dies zeigt sich daran, daß selbst in jüngster Zeit, also nach Entdeckung von microRNAs und snoRNAs, die eine besondere molekularbiologische Herausforderung in Bezug auf Analyse und Isolierung darstellen, die enzymatischen Reaktionen stets nacheinander durchgeführt wurden (Want, J. F., et al., *Identification of 20 microRNAs from Oryza sativa*, *Nucleic Acid Res*, 2004, 32, 1688–95; Shi, R. and Chiang, V. L., *Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR*, *Biotechniques*, 2005, 39, 519–25; Fu H., et al., *Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method*; *FERS Lett*, 2005, 579, 3849–54; Chen, C. L. et al., *The high diversity of snoRNAs in plants: identification and comparative study of 120 snoRNA genes from Oryza sativa*, *Nucleic Acids Res*, 2003, 31, 2601–13; Botero, L. M. et al., *Poly(A) polymerase modification and reverse transcriptase PCR amplification of environmental RNA*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 1267–75). Erstaunlicherweise sind beide Verfahren, d.h. also die Polyadenylierung und die

reverse Transkription dem Fachmann schon lange bekannt (Sann, H. and Feix, G., Terminal riboadenylate transferase from *Escherichia coli*. Characterization and application, *Eur. J. Biochem.*, 1976, 71, 577–83). Der Fachmann hat in der Regel nach dem Poly-A-Tailing-Schritt das Reaktionsprodukt aufgereinigt (Shi, R. et al., Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR, *Biotechniques*, 2005, 39, 519–25). Der Grund dafür liegt sowohl in dem sich deutlich unterscheidenden Zusammensetzungen der Reaktionspuffer als auch den für die Reaktion benötigten Substraten.

**[0016]** Das in vivo verwendete Substrat der Poly-(A)-Polymerase ist Adenosintriphosphat (ATP). Für einige Poly-(A)-Polymerasen wurde gezeigt, daß auch das Anfügen kurzer Tails mit anderen NTPs als Substrat möglich sein kann (Martin, G. und Keller, W., Tailing and 3'-end labeling of RNA with yeast poly(A) polymerase and various nucleotides, *RNA*, 1998, 4, 226–30).

**[0017]** Überraschenderweise haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung herausgefunden, daß es möglich ist, unter bestimmten Voraussetzungen die beiden doch sehr unterschiedlichen enzymatischen Reaktionen gleichzeitig, in einem Reaktionsgefäß ablaufen zu lassen. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der Probe um eine Ribonukleinsäure, die ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend prokaryontische Ribonukleinsäuren, eukaryontische Ribonukleinsäuren, virale Ribonukleinsäuren, Ribonukleinsäuren deren Ursprung ein Archae-Organismus ist, microRibonukleinsäuren (miRNA), small nucleolar Ribonukleinsäuren (snoRNA), messenger Ribonukleinsäure (mRNA), Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNA), nicht-polyadenylierte Ribonukleinsäuren im allgemeinen, sowie ribosomale Ribonukleinsäuren (rRNA) Darüberhinaus eine Mischung von zwei oder mehr der genannten Ribonukleinsäuren In der Probe kann natürlich auch bereits poly-A RNA enthalten sein.

**[0018]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der Probe um eine Ribonukleinsäure, die ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend prokaryontische Ribonukleinsäuren, miRNA, snoRNA und rRNA. In der bevorzugtesten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt die Probe eine Ribonukleinsäure, die ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend miRNA und snoRNA. Bevorzugt werden weiter Mischproben aus unterschiedlichen Mengen von Ribonukleinsäuren unterschiedlicher Art einhergehend mit anderen Stoffen.

**[0019]** Aufgrund der vorliegenden Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens konnten die Erfinder zeigen, daß es möglich ist, miRNAs effizient und ohne Kontamination bereitzustellen und zu charakterisieren.

**[0020]** In einer Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Anker Oligonukleotid um ein homopolymeres Oligonukleotid, welches ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, ein Poly-(A)-Oligonukleotid, Poly-(C)-Oligonukleotid, Poly-(T)-Oligonukleotid, Poly-(G)-Oligonukleotid, Poly-(U)-Oligonukleotid, Poly-(A)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail, Poly-(C)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail, Poly-(T)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail, Poly-(G)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail und Poly-(U)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail. Bevorzugt wird ein Poly-(T)-Oligonukleotid, welches optional wie bereits oben ausgeführt, zusätzlich einen 5'-Tail haben kann.

**[0021]** Das erfindungsgemäße Anker Oligonukleotid ist in der Regel zwischen 6 und 75 Nukleotide lang. Es kann jedoch bis zu ca. 150 Nukleotide lang sein. Ist das Anker Oligonukleotid synthetisch, so ergibt sich die maximale Länge aus den technischen Limitationen der DNA Synthese. Optional umfasst das Anker Oligonukleotid einen 5'-Tail und/oder eine Ankersequenz. Ein 5'-Tail ist eine zusätzliche Nukleotidsequenz am 5'-Ende des Oligonukleotids, die beispielsweise dazu dient eine Klonierungssequenz, Primer- und/oder Sonden-Bindungsstellen oder eine beliebige andere Sequenz einzuführen. Das identifizieren von geeigneten Sequenzen für den 5' Tail ist für den Fachmann basierend auf den Anforderungen der jeweiligen Anwendung möglich.

**[0022]** Am 3'-Ende des Anker Oligonukleotids kann eine zusätzliche Ankersequenz typischerweise mit einer Länge von ein bis fünf weitere Nukleotiden enthalten sein. Die Ankersequenz kann eine Länge von mindestens einer Base aufweisen, wobei die erste Position in einer bevorzugten Ausführungsform eine degenerierte Base ist, die alle Basen außer der im homopolymer Anteil des Anker Oligonukleotids verwendeten Base enthält. Darauf kann eine oder mehrere Basen weitere degenerierte Basen folgen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist hier die Verwendung von N Wobbles sinnvoll, wobei N = A, C, G, T oder entsprechende Analoga.

**[0023]** In aller Regel ist das Anker Oligonukleotid eine Desoxyribonukleinsäure (DNA). Es kann sich bei den Anker Oligonukleotid jedoch auch um eine Peptidnukleinsäure (PNA) handeln. Möglich sind auch locked Nukleinsäuren (LNA), Phosphorthioat-Desoxyribonukleinsäuren, Cyclohexen-Nukleinsäuren (CeNA), N3'-P5'-Phosphoramidite (NP), Tricyklo-Desoxyribonukleinsäuren (tcDNA). Bevorzugt wird jedoch ein Anker

Oligonukleotid, welches eine Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist. Möglich sind Mischungen von RNA und DNA oder einer oder mehrerer der modifizierten Nukleinsäuren oder Analoga, sowie andere Modifikationen wie entsprechende Basenanaloga, die unter den gewählten Bedingungen in der Lage sind mit RNA oder DNA zu hybridisieren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Anker Oligonukleotid um ein Poly-(T)-Oligonukleotid, welches zusätzlich ein 5'-Tail umfaßt, eine Desoxyribonukleinsäure ist, 15–150 Nukleotide lang ist und als Gemisch vorliegt. Am 3'-Ende des Anker Oligonukleotids kann eine zusätzliche Ankersequenz typischerweise mit einer Länge von ein bis fünf weitere Nukleotiden enthalten sein. Die Ankersequenz kann eine Länge von mindestens einer Base aufweisen, wobei die erste Position in einer bevorzugten Ausführungsform eine degenerierte Base ist, die alle Basen außer der im homopolymer Anteil des Anker Oligonukleotids verwendeten Base enthält. Darauf kann eine oder mehrere Basen weitere degenerierte Basen folgen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist hier die Verwendung von N Wobbles sinnvoll, wobei N = A, C, G, T oder entsprechende Analoga.

**[0024]** Beispielhaft seien folgende erfindungsgemäße Anker Oligonukleotide genannt:

Beispiel 1 (SEQ ID NO: 10): 5' TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC (T)<sub>x</sub>VVN 3'

Beispiel 2 (SEQ ID NO: 11): 5' AACGAGACGACGACAGAC(T)<sub>x</sub>VN 3'

Beispiel 3 (SEQ ID NO: 12): 5' AACGAGACGACGACAGAC(T)<sub>x</sub>V 3'

Beispiel 4 (SEQ ID NO: 13): 5' AACGAGACGACGACAGAC(T)<sub>x</sub>N 3'

Beispiel 5 (SEQ ID NO: 14): 5' AACGAGACGACGACAGAC(T)<sub>x</sub>NN 3'

Beispiel 6 (SEQ ID NO: 15): 5' AACGAGACGACGACAGAC(T)<sub>x</sub>VNN 3'

Beispiel 7 (SEQ ID NO: 16): 5' AACGAGACGACGACAGAC(T)<sub>x</sub>VNNN 3'

Beispiel 8 (SEQ ID NO: 17): 5' AACGAGACGACGACAGAC(T)<sub>x</sub>NNN 3'

Beispiel 9 (SEQ ID NO: 18): 5' TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC(T)<sub>x</sub>VN 3'

Beispiel 10 (SEQ ID NO: 19): 5' TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC(T)<sub>x</sub>VNN 3'

X ist bevorzugt 10 bis 30 Basen.

V und N sind aus dem Single Letter Code für degenerierte Basen, V = A, C, G; N = A, C, G, T.

**[0025]** Die Identifikation anderer geeigneter 5' Tail Sequenzen ist dem Fachmann möglich.

**[0026]** Der optionale 5'-Tail umfasst zusätzliche 1–100 Nukleotide, welche für nachfolgende Analysen Verwendung finden können. So kann in einer bevorzugten Ausführungsform der 5'Tail die Bindungssequenz für ein Oligonukleotid wie z.B. eine oder mehrere DNA Sonden und/oder einen oder mehrere PCR Primer enthalten. Die verwendeten Sequenzen für den 5'Tail werden bevorzugt so ausgewählt, dass diese mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kompatibel sind. Dies umfasst z.B. die Auswahl solcher Sequenzen, die keine ungewünschten Nebenreaktionen, sowohl im erfindungsgemäßen Verfahren als auch bei nachfolgenden Analyseverfahren, hervorrufen.

**[0027]** Erfindungsgemäße Anker Oligonukleotide sind in [Abb. 12](#) gezeigt.

**[0028]** Grundsätzlich kann die erfindungsgemäße enzymatische Reaktion auf einem Träger bzw. in einem Behälter stattfinden, d.h. die Reaktion kann in einem Reaktionsgefäß stattfinden. Ein solches Reaktionsgefäß kann ein Reaktionsröhrchen oder beispielsweise eine Microtiterplatte sein. Die Reaktion kann auf einem Chip stattfinden. Findet sie auf einem Chip statt, kann eine oder mehrere Komponenten immobilisiert sein. Die Reaktion kann auf einem Teststreifen oder in einem mikrofluidischen System stattfinden. Dem Fachmann sind verschiedenste Ausführungsformen bezüglich des Trägers bzw. Behältnisses bekannt.

**[0029]** In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Ribonukleotid um ein Adenosin-5'-Triphosphat, ein Thymidin-5'-Triphosphat, ein Cytosin-5'-Triphosphat, eine Guanin-5'-Triphosphat und/oder ein Uracil-5'-Triphosphat. Das Ribonukleotid kann auch ein Basenanalogon sein. Das Ribonukleotid kann modifiziert oder markiert sein. Grundsätzlich ist wesentlich, daß das Ribonukleotid von dem Enzym im Polyadenylierungsaktivität als Substrat umgesetzt werden kann.

**[0030]** Das erfindungsgemäße Desoxyribonukleotid kann ausgewählt sein aus der Gruppe umfassend, ein Desoxyadenosin-5'-Triphosphat (dATP), ein Desoxythymidin-5'-Triphosphat (dTTP), ein Desoxycytosin-5'-Triphosphat (dCTP), ein Desoxyguanosin-5'-Triphosphat (dGTP), Desoxyuracil-5'-Triphosphat (dUTP) sowie modifizierte Desoxyribonukleotide und markierte Desoxyribonukleotide. Es sind auch Anwendungen denkbar, bei denen zusätzlich oder im Austausch ein oder mehrere Desoxyribonukleotide, die eine universelle Base oder

ein Basenanalogen enthalten, eingesetzt werden. Wesentlich für die Durchführung der Erfindung ist, dass die verwendeten Desoxyribonukleotide eine cDNA Synthese erlauben.

**[0031]** Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, wenn dATP, dCTP, dTTP und dGTP als Gemisch gemeinsam vorliegen.

**[0032]** Erfindungsgemäß kann in dem Gemisch auch Desoxyuracil-5'-Triphosphat verwendet werden. Dies kann kombiniert werden mit einer nach der eigentlichen Reaktion stattfindenden enzymatischen Reaktion, welche die Uracil-DNA-Glykosylase verwendet und nicht weiter genutztes enzymatisch hergestelltes Reaktionsprodukt abbauen kann.

**[0033]** Sofern ein Desoxyribonukleotid markiert ist, kann die Markierung ausgewählt werden aus der Gruppe umfassend  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ , ein fluoreszierender Farbstoff wie beispielsweise Fluoresceinisothiocyanate (FITC), 6-Carboxyfluorescein (FAM), Xanthen, Rhodamine, 6-Carboxy-2',4',7',4',7-hexachlorofluorescein (HEX), 6-Carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein (JOE), N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAM-RA), 6-Carboxy-X-rhodamine (ROX), 5-Carboxyrhodamine-6G (R6G5), 6-carboxyrhodamine-6G (RG6), Rhodamine 110; Coumarine, wie Umbelliferone, Benzimide, wie Hoechst 33258; Phenanthridine, wie Texas Red, Ethidiumbromide, Acridinfarbstoffe, Carbazolfarbstoffe, Phenoxazinefarbstoffe, Porphyrinfarbstoffe, Polymethinfarbstoffe, Cyaninfarbstoffe, wie Cy3, Cy5, Cy7, BODIPY-Farbstoffe, Quinolinfarbstoffe und Alexa Farbstoffe. Andere Markierungen wie das Einfügen von Biotin oder einem oder mehreren Haptenen wie z.B. Digoxigenin, welchen einen direkten oder indirekten Nachweis der Nukleinsäure erlauben. Indirekte Nachweise wie z.B. über Antikörper, welche wiederum einen z.B. enzymatischen Nachweis über ein am Antikörper gekoppeltes Enzym. Auch über das Einbringen von Nanopartikeln, die z.B. an Antikörper oder einen Affinitätsliganden gekoppelt sind, ist ein indirekter Nachweis möglich.

**[0034]** Eine Modifikation des Desoxyribonukleotids kann auch über das 5'-Phosphat erfolgen, welches eine einfachere Klonierung erlaubt. Durch Einfügen von reaktiven Gruppen, wie z.B. einem Amino-Linker (auch Biotin) kann das Desoxyribonukleotid z.B. immobilisiert werden oder einem direkten oder indirekten Nachweis zugänglich gemacht werden.

**[0035]** Besonders bevorzugte Modifikationen sind ausgewählt aus der Gruppe umfassend Fluoreszenzfarbstoffe, Haptene, 5'-Phosphat, 5'-Biotin, 5'-Amino-Linker.

**[0036]** Erfindungsgemäß ist die Konzentration eines Desoxyribonukleotids in der Reaktion wenigstens 0,01 mM und höchstens 10 mM. Bei dieser Konzentrationsangabe handelt es sich um die Konzentration des einzelnen Desoxyribonukleotids. In einer der bevorzugten Ausführungsformen liegen die Desoxyribonukleotide jeweils dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von 0,2 mM bis 2 mM vor. Bei dieser Konzentrationsangabe handelt es sich um die Konzentration des einzelnen Desoxyribonukleotids im Gemisch. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung liegt das einzelne Desoxyribonukleotid, dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von jeweils 0,5 mM vor.

**[0037]** Die Erfinder haben erstaunlicherweise festgestellt, daß die Ein-Schritt Enzymreaktion wie sie Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, in einem engen Puffer-pH-Bereich von 6 bis 10 unter Anwesenheit von Magnesium Ionen ( $\text{Mg}^{2+}$ ) stattfinden kann. Somit liegt in einer bevorzugten Ausführungsform ein pH von 6 bis 10 vor.

**[0038]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform hat der erfindungsgemäße Puffer einen pH von 6,8 bis 9.

**[0039]** In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Erfindung umfaßt der erfindungsgemäße Puffer zusätzlich Ionen, die ausgewählt sein können aus der Gruppe umfassend,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Na}^+$ .

**[0040]** Erfindungsgemäße Puffer beinhalten beispielsweise  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , Magnesiumacetat,  $\text{MnCl}_2$ , KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , NaCl. Als Puffersubstanz kommen in Frage, Tris, Tricine, Bicine, Hepes, sowie andere Puffersubstanzen die im erfindungsgemäßen pH-Bereich liegen oder Mischungen von zwei oder mehr geeigneten Puffersubstanzen.

**[0041]** Dem Fachmann sind eine Reihe von Enzymen mit Polyadenylierungsaktivität bekannt. Erfindungsgemäß sind diese ausgewählt aus der Gruppe umfassend, Enzyme prokaryontischen Ursprungs, eukaryontischen Ursprungs, viralen Ursprungs und Archae Ursprungs sowie auch Enzyme pflanzlichen Ursprungs.

**[0042]** Eine Polyadenylierungsaktivität im Sinne dieser Erfindung ist eine enzymatische Aktivität, die als Substrat das 3'-Ende einer Ribonukleinsäure verwendet und in einem geeigneten Puffer in der Lage ist, diesem 3'-Ende enzymatisch Ribonukleotide hinzuzufügen und zwar bevorzugterweise wenigstens 10 bis 20 Ribonukleotide. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Enzym um ein Enzym, welches in der Lage ist, Adenosin-5'-Triphosphat als Substrat zu verwenden. Erfindungsgemäß umfasst dies Enzyme und Reaktionsbedingungen, die eine Polyadenylierungsaktivität im Sinne der Erfindung bei Verwendung von einzelsträngiger als auch doppelsträngige RNA, z.B. hairpin RNA wie, z.B. pre-miRNA aufweisen. In Abhängigkeit von der zu analysierenden RNA wird der Fachmann Enzym und Reaktionsbedingungen so auswählen, dass entweder einzelsträngige RNA's (z.B. reife miRNA's) oder doppelsträngige RNA's (z.B. pre-miRNA's) oder beides der Analyse zugänglich gemacht werden.

**[0043]** In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Enzym mit Polyadenylierungsaktivität um ein Enzym, welches ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, Poly-(A)-Polymerase aus *Escherichia coli*., Poly-(A)-Polymerase aus Hefe, Poly-(A)-Polymerase aus Rind, Poly-(A)-Polymerase aus Frosch, humane Poly-(A)-Polymerase, und pflanzliche Poly-A Polymerase. Weitere sind dem Fachmann bekannt oder durch die Analyse der Homologie zu bekannten Poly-(A)-Polymerasen neu zu identifizieren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Enzym mit Polyadenylierungsaktivität um eine Poly-(A)-Polymerase aus *Escherichia coli*.

**[0044]** Das erfindungsgemäße Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität ist erfindungsgemäß ausgewählt aus der Gruppe umfassend, Enzyme aus Viren, Bakterien, Archae-Bakterien und Eukaryonten, insbesondere aus thermostabilen Organismen. Hierzu zählen z.B. auch Enzyme aus Introns, Retrotransposons oder Retroviren. Ein Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität ist erfindungsgemäß ein Enzym, welches in der Lage ist, an einer Ribonukleinsäure am 3'-Ende eines an die Ribonukleinsäure-hybridisierten Desoxyoligonukleotides oder Ribooligonukleotides bei geeigneten Pufferbedingungen Desoxyribonukleotide komplementär einzubauen. Dies umfasst zum einen Enzyme, die natürlicherweise diese Funktion aufweisen aber auch Enzyme, die eine solche Funktion erst durch Veränderung ihrer Gensequenz wie z.B. Mutagenese oder durch entsprechende Pufferbedingungen erhalten.

**[0045]** Bevorzugt ist das Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität, ein Enzym, welches ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend HIV reverse Transkriptase, M-MLV reverse Transkriptase, EAIIV reverse Transkriptase, AMV reverse Transkriptase, *Thermus thermophilus* DNA Polymerase I, M-MLV RNase H<sup>-</sup> (Superscript, Superscript II, Superscript III), Monstersript (Epicentre), Omniscript, Sensiscript Reverse Transkriptase (Qiagen), ThermoScript und Thermo-X (beide Invitrogen). Erfindungsgemäß können auch Enzyme verwendet werden, die erst nach einer Modifikation der Gensequenz als Enzym reverse Transkriptaseaktivität aufweisen. Es kann auch eine Reverse Transkriptaseaktivität verwendet werden, die eine erhöhte Fehlergenauigkeit aufweist. Beispielshaft sei hier z.B. AccuScript reverse Transkriptase (Stratagene) erwähnt. Es ist für den Fachmann ersichtlich, dass auch die Verwendung von Mischungen von zwei oder mehr Enzymen mit reverser Transkriptaseaktivität möglich ist.

**[0046]** Dem Fachmann ist bekannt, daß die meisten Enzyme mit reverser Transkriptaseaktivität ein divalentes Ion benötigen. Somit liegt einer bevorzugten Ausführungsform wie bereits oben beschrieben, bei jenen Enzymen, die ein divalentes Ion benötigen, ein divalentes Ion vor. Bevorzugt sind Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>.

**[0047]** Bevorzugte Kombinationen von Enzymen sind HIV reverse Transkriptase oder M-MLV reverse Transkriptase oder EAIIV reverse Transkriptase oder AMV reverse Transkriptase oder *Thermus thermophilus* DNA Polymerase I oder M-MLV RNase H<sup>-</sup> (Superscript, Superscript II, Superscript III) oder Monstersript (Epicentre) oder Omniscript Reverse Transkriptase (Qiagen) oder Sensiscript Reverse Transkriptase (Qiagen), ThermoScript, Thermo-X (beide Invitrogen) oder eine Mischung von zwei oder mehr Enzymen mit reverser Transkriptaseaktivität und Poly-(A)-Polymerase aus *Escherichia coli*. Außerdem HIV reverse Transkriptase oder M-MLV reverse Transkriptase oder EAIIV reverse Transkriptase oder AMV reverse Transkriptase oder *Thermus thermophilus* DNA Polymerase I oder M-MLV RNase H<sup>-</sup> (Superscript, Superscript II, Superscript III) oder Monstersript (Epicentre) oder Omniscript Reverse Transkriptase (Qiagen) oder Sensiscript Reverse Transkriptase (Qiagen), ThermoScript, Thermo-X (beide Invitrogen) oder eine Mischung von zwei oder mehr Enzymen mit reverser Transkriptaseaktivität und Poly-(A)-Polymerase aus Hefe.

**[0048]** Dem Fachmann ist bekannt, daß hohe Temperaturen bei der reversen Transkription dazu führen, daß Probleme mit Sekundärstrukturen keine so entscheidende Rolle spielen. Zudem führen hohe Temperaturen bei bestimmten Enzymen dazu, daß die Spezifität der reversen Transkription dadurch steigt, daß Fehlpaarungen und falsches Priming unterbunden werden. Somit wird in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung

eine reverse Transkriptase verwendet, die thermophil ist. Bevorzugt wird ein Enzym welches eine optimale Nukleinsäuresyntheseaktivität bei zwischen 45°C und 85°C aufweist, bevorzugter zwischen 55°C und 80°C am bevorzugtesten zwischen 60°C und 75°C. Bevorzugt wird *Thermus thermophilus* (Tth) DNA Polymerase I.

**[0049]** Sofern es sich bei dem Enzym mit Polyadenylierungsaktivität um ein nicht-thermophiles Enzym handelt und bei dem Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität um ein thermophiles Enzym handelt, kann erfindungsgemäß das Verfahren in mehreren Temperaturschritten erfolgen, wobei der erste Temperaturschritt eine Temperatur zur Anwendung kommen läßt, die die optimale Temperatur für das Enzym mit Polyadenylierungsaktivität ist, und der zweite Temperaturschritt eine Temperatur zur Anwendung kommen läßt, die die optimale Temperatur für das Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität ist.

**[0050]** Wird beispielsweise die AMV-reverse Transkriptase verwendet, so findet der zweite Temperaturschritt bei 42°C statt, wohingegen der erste Temperaturschritt, welche primär der Aktivität des Enzyms mit Polyadenylierungsaktivität zukommt, bei einer Temperatur von 37°C statt. Es ist allerdings auch die Durchführung bei einer konstanten Temperatur möglich.

**[0051]** Der Fachmann wird in der Lage sein, die Temperaturen so zu wählen, daß die jeweiligen Enzymaktivitäten zum tragen kommen. Wird beispielsweise eine Kombination aus Poly-(A)-Polymerase aus *Escherichia coli* einhergehend mit DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* verwendet, so sieht der Ablauf der Temperaturen wie folgt aus: Zunächst wird bei 37°C inkubiert und anschließend wird bei 55 bis 70°C inkubiert. Erfindungsgemäß kann also ein Nicht thermostabiles Enzym mit einem thermostabilen kombiniert werden. In diesem Fall richten sich die Temperaturschritte danach welches der beiden das Enzyme mit der Polyadenylierungsaktivität ist. Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, dass das Enzyme mit reverser Transkriptaseaktivität thermostabil ist. Im umgekehrten Fall, und dies leuchtet dem Fachmann ein, kann es sein, dass durch die Inkubation bei hoher Temperatur im Polyadenylierungsschritt, das Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität in Teilen oder ganz inaktiviert wird. Somit ist auch bevorzugt, wenn beide Enzyme thermostabil sind.

**[0052]** Weiterhin ist dem Fachmann bekannt, daß die Enzyme sehr unterschiedlich prozessiv sind, so daß der Fachmann Enzyme mit unterschiedlicher Prozessivität so kombinieren kann, daß Templates mit unterschiedlicher Länge unterschiedlich gut in cDNA umgewandelt werden. Durch Verwendung entsprechender Mengen der jeweiligen Enzyme, einer oder mehrerer geeigneter Inkubationstemperaturen und Inkubationszeiten ist es dem Fachmann möglich zufriedenstellende Ergebnisse zu erzielen.

**[0053]** Die erfindungsgemäße Reaktion kann weiter Reagenzien wie beispielsweise Volume Excluder, einen Singel-strand Binding Protein, DTT und/oder Kompetitornukleinsäuren umfassen.

**[0054]** Wird ein Volume Excluder eingesetzt, so ist dieser ausgewählt aus der Gruppe umfassend Dextran, Polyethylenglycol, und in EP1411133A1 werden erfindungsgemäße Volume Excluder genannt.

**[0055]** In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Kompetitor-Nukleinsäure um eine homopolymere Ribonukleinsäure am bevorzugtesten um Polyadenoribonukleinsäure. Beispiele werden in US 6,300,069 offenbart.

**[0056]** Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass es von Vorteil sein kann zu verhindern, dass die Kompetitor-Nukleinsäure selbst als Substrat für die Poly-A-Polymeraseaktivität dient. Eine mögliche Lösung ist die Blockierung der 3' OH Gruppe der Kompetitor-Nukleinsäure. Entsprechende Lösungen wie z.B. Verwendung eines 3' Phosphat, Einbau eines Didesoxynukleotids oder inverser Basen sind dem Fachmann bekannt.

**[0057]** Es ist für den Fachmann ebenfalls offensichtlich, dass es von Vorteil sein kann zu verhindern, dass die Kompetitor-Nukleinsäure selbst als Substrat für die Reverse Transkriptaseaktivität dient. Dies kann durch Auswahl einer Kompetitor-Nukleinsäure sichergestellt werden, welche nicht unter den gegebenen Reaktionsbedingungen in cDNA umgeschrieben werden kann, z.B. weil die verwendeten Primer nicht an diese hybridisieren können. Eine weitere mögliche Lösung ist die Blockierung der 3' OH Gruppe der Kompetitor-Nukleinsäure. Entsprechende Lösungen wie z.B. Verwendung eines 3' Phosphat, Einbau eines Didesoxynukleotids oder inverser Basen sind dem Fachmann bekannt.

**[0058]** Die Erfindung betrifft weiterhin ein Reaktionsgemisch umfassend ein erstes Enzym mit Polyadenylierungsaktivität, ein zweites Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität, optional einen Puffer, optional mindestens ein Ribonukleotid, optional mindestens ein Desoxyribonukleotid und optional ein Anker Oligonukleotid. Bevorzugt umfasst das Anker Oligonukleotid einen homopolymer Anteil, eine Ankersequenz und/oder einen



Tail. Bevorzugt umfasst das Reaktionsgemisch zusätzlich random Primer. Die zusätzlich Verwendung von random Primern hat den Vorteil, dass auch 5' Enden von langen Transkripten effizient umgeschrieben werden, was bei quantitativen Analysen wichtig ist. Das Reaktionsgemisch kann die gleichen Agenzien beinhalten wie sie für das erfindungsgemäße Verfahren zur Anwendung kommen.

**[0059]** In einer Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Anker Oligonukleotid um ein homopolymeres Oligonukleotid, welches ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, ein Poly-(A)-Oligonukleotid, Poly-(C)-Oligonukleotid, Poly-(T)-Oligonukleotid, Poly-(G)-Oligonukleotid, Poly-(U)-Oligonukleotid, Poly-(A)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail, Poly-(C)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail, Poly-(T)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail, Poly-(G)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail und Poly-(U)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail. Bevorzugt wird ein Poly-(T)-Oligonukleotid, welches optional wie bereits oben ausgeführt, zusätzlich einen 5'-Tail haben kann.

**[0060]** Das erfindungsgemäße Anker Oligonukleotid ist in der Regel zwischen 6 und 75 Nukleotide lang. Es kann jedoch bis zu ca. 150 Nukleotide lang sein. Ist das Anker Oligonukleotid synthetisch, so ergibt sich die maximale Länge aus den technischen Limitationen der DNA Synthese. Optional umfasst das Anker Oligonukleotid einen 5'-Tail und/oder eine Ankersequenz. Ein 5'-Tail ist eine zusätzliche Nukleotidsequenz am 5'-Ende des Oligonukleotids, die beispielsweise dazu dient eine Klonierungssequenz, Primer- und/oder Sonden-Bindungsstellen oder eine beliebige andere Sequenz einzuführen. Das identifizieren von geeigneten Sequenzen für den 5' Tail ist für den Fachmann basierend auf den Anforderungen der jeweiligen Anwendung möglich.

**[0061]** Am 3'-Ende des Anker Oligonukleotids kann eine zusätzliche Ankersequenz typischerweise mit einer Länge von ein bis fünf weitere Nukleotiden enthalten sein. Die Ankersequenz kann eine Länge von mindestens einer Base aufweisen, wobei die erste Position in einer bevorzugten Ausführungsform eine degenerierte Base ist, die alle Basen außer der im homopolymer Anteil des Anker Oligonukleotids verwendeten Base enthält. Darauf kann eine oder mehrere Basen weitere degenerierte Basen folgen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist hier die Verwendung von N Wobbles sinnvoll, wobei N = A, C, G, T oder entsprechende Analoga.

**[0062]** Der optionale 5'-Tail umfasst zusätzliche 1–100 Nukleotide, welche für nachfolgende Analysen Verwendung finden können. So kann in einer bevorzugten Ausführungsform der 5'Tail die Bindungssequenz für ein Oligonukleotid wie z.B. eine oder mehrere DNA Sonden und/oder einen oder mehrere PCR Primer enthalten. Die verwendeten Sequenzen für den 5'Tail werden bevorzugt so ausgewählt, dass diese mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kompatibel sind. dies umfasst z.B. die Auswahl solcher Sequenzen, die keine ungewünschten Nebenreaktionen, sowohl im erfindungsgemäßen Verfahren als auch bei nachfolgenden Analyseverfahren, hervorrufen.

**[0063]** Das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch umfaßt das erfindungsgemäße Anker Oligonukleotid, welches eine Länge zwischen 10 und 150 Nukleotiden hat, und optional am 3'-Ende eine eins bis fünf Nukleotide lange erfindungsgemäße Ankersequenz trägt. Das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch umfaßt das Anker Oligonukleotid, welches wie oben beschrieben zum Beispiel eine Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist, eine Peptidnukleinsäure (PNA) ist oder eine locked-Nukleinsäure (LNA) ist. Das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch umfaßt in einer bevorzugten Ausführungsform ein erfindungsgemäßes Anker Oligonukleotid, welches ein Poly-(T)-Oligonukleotid ist und zusätzlich einen 5'-Tail trägt, wobei es sich bei dem Oligonukleotid um eine Desoxyribonukleinsäure handelt, die 10 bis 75 Nukleotide lang ist und als Gemisch vorliegt, wobei am 3'-Ende eine Ankersequenz vorhanden ist, bestehend aus jeweils einem Nukleotid, welches ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend A, G und C, optional gefolgt von ein bis fünf weiteren Nukleotiden umfassend alle vier Basen A, C, G, und T oder entsprechende Analoga.

**[0064]** Erfindungsgemäße Anker Oligonukleotide des Reaktionsgemisches sind in [Abb. 12](#) gezeigt.

**[0065]** Das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch umfaßt weiter mindestens ein Ribonukleotid wie sie oben für das erfindungsgemäße Verfahren beschrieben wurden. Insbesondere umfaßt das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch mindestens ein Ribonukleotid ausgewählt aus ATP, TTP, CTP, GTP, UTP oder entsprechenden Basenanaloga. Die Ribonukleotide können optional, wie oben beschrieben, modifiziert oder markiert sein. Das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch umfaßt Desoxyribonukleotide wie es für das erfindungsgemäße Verfahren beschrieben wurde. Insbesondere umfaßt das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch eines oder mehrere Desoxyribonukleotide wie beispielsweise dATP, dCTP, dGTP, dUTP und/oder dTTP. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Mischung von Desoxyribonukleotiden verwendet, welche eine cDNA Synthese erlauben. Diese Desoxyribonukleotide können optional modifiziert oder markiert sein.

**[0066]** Sofern ein Desoxyribonukleotid des erfindungsgemäßen Reaktionsgemisches markiert ist, kann die Markierung ausgewählt werden aus der Gruppe umfassend  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ , ein fluoreszierender Farbstoff wie beispielsweise Fluoresceinisothiocyanate (FITC), 6-Carboxyfluorescein (FAM), Xanthen, Rhodamine, 6-Carboxy-2',4',7',4',7'-hexachlorofluorescein (HEX), 6-Carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein (JOE), N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA), 6-Carboxy-X-rhodamine (ROX), 5-Carboxyrhodamine-6G (R6G5), 6-carboxyrhodamine-6G (RG6), Rhodamine 110; Cy3, Cy5, Cy7, Coumarine, wie Umbelliferone, Benzimide, wie Hoechst 33258; Phenanthridine, wie Texas Red, Ethidiumbromide, Acridinfarbstoffe, Carbazolfarbstoffe, Phenoxazinefarbstoffe, Porphyrinfarbstoffe, Polymethinfarbstoffe, Cyaninfarbstoffe, wie Cy3, Cy5, BODIPY-Farbstoffe, Quinolinfarbstoffe und Alexa Farbstoffe. Andere Markierungen wie das Einfügen von Biotin oder einem oder mehreren Haptenen wie z.B. Digoxigenin, welchen einen direkten oder indirekten Nachweis der Nukleinsäure erlauben. Indirekte Nachweise wie z.B. über Antikörper, welche wiederum einen z.B. enzymatischen Nachweis über ein am Antikörper gekoppeltes Enzym. Auch über das Einbringen von Nanopartikeln, die z.B. an Antikörper oder einen Affinitätsliganden gekoppelt sind, ist ein indirekter Nachweis möglich.

**[0067]** Das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch umfaßt jeweils ein Desoxyribonukleotid bei einer Konzentration von 0,01 mM bis 10 mM. Bevorzugt liegt das einzelne Desoxyribonukleotid A, C, G und T in einer Konzentration von jeweils 0,2 mM bis 2 mM vor. Besonders bevorzugt ist es, wenn die Desoxyribonukleotide A, C, G und T gemeinsam vorliegen. Jedes einzelne liegt in dieser bevorzugten Ausführungsform in einer Konzentration von 0,5 mM vor.

**[0068]** Das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch umfaßt weiterhin einen Puffer. Dieser Puffer hat einen pH von 6 bis 10. Im erfindungsgemäßen Reaktionsgemisch befinden sich weiterhin  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform hat das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch einen Puffer mit einem pH von 6,8 bis 9. Das Reaktionsgemisch kann weiter zusätzlich Ionen umfassen, die ausgewählt sein können aus der Gruppe umfassend  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Na}^+$ . Wesentlich für das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch ist das Vorliegen zwei unterschiedlicher Enzymaktivitäten. Das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch umfaßt wenigstens eine erste Enzymaktivität mit Polyadenylierungsaktivität sowie zweitens eine zweite Enzymaktivität mit reverser Transkriptaseaktivität. Die bevorzugten Ausführungsformen dieser Aktivitäten wurden bereits für das Verfahren oben beschrieben. Das Reaktionsgemisch kann wie das Verfahren oben weiterhin zusätzliche Substanzen, wie beispielsweise einen Volume Excluder, einen Single-strand Binding Protein, DTT oder eine oder mehrere Kompetitor-Nukleinsäuren umfassen.

**[0069]** Wird ein Volume Excluder eingesetzt, so ist es bevorzugt, daß dieser ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Dextran, Polyethylenglycol. Weitere Volume Excluder gemäß der vorliegenden Erfindung finden sich in EP1411133A1.

**[0070]** Umfaßt das Reaktionsgemisch optional eine Kompetitor-Nukleinsäure so ist diese ausgewählt aus der Gruppe umfassend homopolymere Ribonukleinsäuren und Polyadenoribonukleinsäure. Weitere erfindungsgemäße Kompetitor-Nukleinsäuren sind in US 6,300,069 offenbart.

**[0071]** Die Erfindung betrifft weiterhin einen Kit, umfassend ein Reaktionsgemisch, wie er oben beschrieben wurde. Das Reaktionsgemisch liegt in einer bevorzugten Ausführungsform in einem einzigen Reaktionsgefäß vor. In einer anderen Ausführungsform umfaßt der Kit ein Reaktionsgefäß, umfassend das Enzym mit Polyadenylierungsaktivität, das Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität, optional die Desoxyribonukleotide, optional mindestens ein Ribonukleotid, optional einen Puffer enthaltend  $\text{Mg}^{2+}$  und optional ein oder mehr Oligodesoxyribonukleotide im Sinne der Erfindung. Optional kann das Reaktionsgefäß in dem erfindungsgemäßen Kit weitere Bestandteile enthalten, wie sie für das erfindungsgemäße Reaktionsgemisch angegeben wurden. Der Kit kann weiterhin eine Sonde für den 5' Tail des erfindungsgemäßen Anker Oligonukleotids umfassen. Außerdem kann das Kit einen oder mehrere weitere Desoxyribonukleotide enthalten, so z.B. einen generischen Primer zum Nachweis der durch die Reverse Transkription eingebrachten Tail Sequenz. Das Reaktionsgemisch kann in „Pellet-Form“ vorliegen also z.B. lyophilisiert. Dem Fachmann sind weitere Verfahren der Bereitstellung bekannt, die z.B. nicht flüssige Formen beinhalten.

**[0072]** Weiterhin kann der Kit optional kombiniert sein mit Reagenzien wie sie für die PCR-Reaktion oder Real-time PCR Reaktion notwendig sind. Bevorzugt sind dies Reagenzien für mindestens eine PCR Reaktion, die den Nachweis mindestens einer der im Erfindungsgemäßen Verfahren generierten cDNA erlaubt.

**[0073]** Der Kit kann weiterhin optional Random-Primer umfassen sowie optional ein oder mehrere Primer oder Primer/Sonden zum Nachweis weiterer Target-Gene in singleplex oder multiplex PCR-Reaktionen und/oder Real-time singleplex oder multiplex PCR Reaktionen.

**[0074]** Das Reaktionsgemisch, das erfindungsgemäße Verfahren bzw. der Kit, können weiter Target-spezifische Primer enthalten. Die Länge der Target-spezifischen Primer sollte so gewählt werden, daß ein spezifischer Nachweis in einer PCR-Reaktion möglich ist, die Sequenz des Targetprimers sollte so spezifisch sein, daß eine Bindung an nur eine Stelle in der generierten cDNA-Sequenz möglich ist. In aller Regel hat ein solcher Primer eine Länge von 15 bis 30 Nukleotiden, bevorzugt von 17 bis 25 Nukleotiden.

**[0075]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Reaktionsgemisch das Enzym mit Polyadenylierungsaktivität und das Enzyme mit reverser Transkriptaseaktivität als Zwei-enzyme Pre-mix. Das Kit umfasst in dieser besonders bevorzugten Ausführungsform das Zwei-enzym-pre-mix-reaktionsgemisch in einem Reaktionsgefäß und in einem getrennten Gefäß einen Puffer,  $Mg^{2+}$ , rNTP(s), dNTP(s), optional ein erfindungsgemäßes Anker Oligonukleotid und optional random Primer sowie weiterhin optional ein volume excluding Reagenz und/oder eine Kompetitor-Nukleinsäure.

**[0076]** Das erfindungsgemäße Verfahren kann, wie bereits oben ausgeführt, in einem oder mehreren Temperaturschritten stattfinden. In einer bevorzugten Ausführungsform findet das erfindungsgemäße Verfahren bei einem einzigen Temperaturschritt für die Inkubation statt und einem weiteren Temperaturschritt für die Inaktivierung für die Enzyme statt. So ist in einer bevorzugten Ausführungsform der Inkubationsschritt bei der die Enzyme Aktivität entfalten, etwa 37°C. Die Inkubationszeit beträgt etwa, 1 bis 120 Minuten, bevorzugt 5 bis 90 Minuten, bevorzugter 10 bis 75 Minuten, noch bevorzugter 15 bis 60 Minuten, noch bevorzugter 20 bis 60 Minuten am bevorzugtesten 50 bis 70 Minuten. Eine darüber hinausgehende Inkubationszeit ist in aller Regel nicht schädlich. In einem weiteren Schritt, welcher der Denaturierung der Enzyme dient, wird eine Temperatur von wenigstens 65°C höchstens jedoch 100°C verwendet. Bevorzugterweise wird eine Temperatur von etwa 80–95°C verwendet. Die Denaturierung geschieht für einen Zeitraum von wenigstens 1 Minute höchstens jedoch für 30 Minuten. In einer bevorzugten Ausführungsform wird für einen Zeitraum von 5 Minuten denaturiert.

**[0077]** Das erfindungsgemäße Verfahren zur Generierung von cDNA kann im Anschluß eine Polymerasekettenreaktion umfassen. Ist dies der Fall, so wird bevorzugterweise ein für den während cDNA Synthese eingebrachten Tail spezifischer Primer und/oder ein spezifischer Primer dem erfindungsgemäßen Reaktionsgemisch zugegeben. Das Reaktionsgemisch enthält dann auch weiterhin eine thermostabile DNA-Polymerase.

**[0078]** Die im Anschluß stattfindende PCR-Reaktion kann auch eine quantitative PCR-Reaktion sein. Sie kann auf einem Array stattfinden, in einem mikrofluidischen System stattfinden, in einer Kapillare stattfinden oder aber eine real-time PCR sein. Andere Varianten der PCR sind dem Fachmann bekannt und sind gleichermaßen vom erfindungsgemäßen Verfahren umfaßt.

#### Beispiele

##### Beispiel 1:

**[0079]** Demonstration der Machbarkeit eines gekoppelten einstufigen Prozesses von Poly-A-Reaktion und reverser Transkription im gleichen Reaktionsgefäß; Effekt verschiedener Puffer auf die Effizienz des Nachweises eines 22-mer RNA-Oligonukleotids.

**[0080]** In diesem Experiment sollte die Machbarkeit eines gekoppelten einstufigen Prozesses von Poly-(A)-Polymerase Reaktion und reverser Transkription im gleichen Reaktionsgefäß demonstriert werden. Zu diesem Zweck wurde der gekoppelte einstufige Prozeß unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Dies waren zum einen der mit der Poly-(A)-Polymerase gelieferte Puffer, zum anderen der mit der reversen Transkriptase gelieferte Puffer. Weiterhin wurde eine Mischung von Poly-(A)-Polymerase- und reversen Transkriptase-Puffern getestet. Als Kontrolle wurde die Reaktion in einem zweistufigen Verfahren in Anlehnung an die [Abb. 1A](#) durchgeführt.

**[0081]** Die Reaktionen wurden wie in Tabelle 1 angegeben zusammengesetzt.

Tabelle 1: Poly-A-Reaktion und Reverse Transkription

	Ansatz 1 a/b	Ansatz 2 a/b	Ansatz 3 a/b	Ansatz 4 a/b	
	Angaben der finalen Konzentrationen			zweistufiges Verfahren	
Reagenzien	PAP Puffer	RT Puffer	Mischung beider Puffer	1.) PAP Reaktion	2.) RT Reaktion
5 × PAP Puffer	1×		1×	1×	
10 × RT Puffer		1×	1×		1×
MnCl <sub>2</sub> , Lösung 25 mM	2,5 mM		2,5 mM	2,5 mM	
rATP, 10 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	
Poly-(A)-Polymerase 2 U/μl	4 U (0,2 U/μl)	2 U (0,1 U/μl)	4 U (0,2 U/μl)	2 U (0,2 U/μl)	
dNTP Mix (dA, dT, dG, dC je 5 mM)	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM		0,5 mM
UniGAPdT Primer 10 μM	1 μM	1 μM	1 μM		1 μM
RNase Inhibitor 10 U/μl	10 U	10 U	10 U		10 U
Sensiscript Reverse Transkriptase	1 μl	1 μl	1 μl		1 μl
RNase freies Wasser	variabel	variabel	variabel	variabel	variabel
a) mleu7a	2x10E9 Kopien	2x10E9 Kopien	2x10E9 Kopien	2x10E9 Kopien	10 μl PAP Reaktion 1.)
b) neg Kontrolle (H <sub>2</sub> O anstatt mleu7a)	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	
a) Mais RNA	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	
b) neg Kontrolle (H <sub>2</sub> O anstatt Mais RNA)	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	
Gesamtvolumen	20 μl	20 μl	20 μl	10 μl	20 μl

Inkubation	1 Std. 37°C 5 min 93°C	1 Std 37°C, dann weiter bei 2.) RT Reaktion	1 Std. 37°C 5 min 93°C
------------	------------------------	---	------------------------

PAP: Poly A Polymerase

RT: Reverse Transkription

rATP: Adenosine 5'-Triphosphate

**[0082]** Dazu wurden die in Tabelle 2 angegebenen Reagenzien verwendet.

Tabelle 2: Materialien für die Poly-A-Reaktion und Reverse Transkription

Poly-(A)-Polymerase	Ambion; Material Nummer 80U: 2030
Sensiscript RT Kit	Qiagen; Material Nummer 50rxn: 205211
Adenosine 5'-Triphosphate (rATP)	Amersham; Material Nummer 25 μmol: 27-2056-01
RNase Inhibitor	Promega; Material Nummer: N2511
Uni GAP dT Primer	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
Mais RNA	Aus 1 g gemörserten Maisblättern mit Qiagen RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74106); Plant Protokoll mit 10 fachem upscale (Maxi shredder und Säule)
mleu7a RNA Oligonukleotid	5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'

**[0083]** Es wurden jeweils Reaktionen mit Template (1a, 2a, 3a, 4a, alle mit synthetischem RNA Oligonukleotid in einem Hintergrund von Mais RNA) bzw. ohne Template (1b, 2b, 3b, 4b, alle wurden H<sub>2</sub>O anstatt Template zugesetzt) durchgeführt. Die Reaktionen ohne Template wurden als Kontrolle für ein mögliches Auftreten von unspezifischen Hintergrund durchgeführt. Als Hintergrund RNA wurde Mais RNA gewählt, da die nachzuweisende Sequenz des 22-mer RNA Oligonukleotids bei Mais nicht vorkommt.

**[0084]** Nach der Inaktivierung der Enzyme (siehe Tabelle: 5 min bei 93°C) wurden je 2 µl der Ansätze 1 a/b bis 4 a/b als Template in eine real-time PCR eingesetzt. Der Ansatz der real-time PCR erfolgte in Dreifachansätzen wie in Tabelle 3 angegeben mit QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Katalog Nr. 204143) und den in Tabelle 4 angegebenen Primer.

Tabelle 3: Komponenten für SYBR Green Real-time PCR

	Finale Konzentration
2 × SYBR Green PCR Master Mix	1×
Hum Uni Primer 10 µM	0,5 µM
miRNA Primer let7short 10 µM	0,5 µM
RNase-free water	variabel
PAP-/RT-Reaktion	2 µl
Finales Reaktionsvolumen	20 µl

Tabelle 4: Materialien für die SYBR Green PCR

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (200)	Qiagen; Material Nummer: 204143
Let 7short (spezifischer miRNA Primer)	5'-GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni Primer	5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'

**[0085]** Die im universellen Tail-Primer Hum Uni Primer enthaltene Sequenz 5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3' wurde in US2003/0186288A1 beschrieben.

**[0086]** Das PCR Protokoll bestand aus einer initialen Reaktivierung der im QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix enthaltenen HotStarTaq Polymerase für 15 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 sec 94°C, 30 sec bei 52°C und 30 sec bei 72°C (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: PCR Protokoll für SYBR Green Real-time PCR

PCR Initiale Reaktivierung	15 min 95°C	40×
Denaturierung	15 sec 94°C	
Annealing	30 sec 52°C	
Extension (Datenaufnahme)	30 sec 72°C	
Schmelzkurve		

**[0087]** Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte während des 72°C Extensions-Schrittes. Die PCR-Analysen wurden mit einem ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt.

**[0088]** Die PCR Produkte wurden anschließend einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Diese wurde auf einem ABI PRISM 7000 Real-time PCR Instrument durchgeführt.

Tabelle 6: Ergebnisse einer Real-time PCR Analyse der Ansätze aus Tabelle 1

Detector	PAP/RT	Template	Ct	Ct Mittel	CV in %
SYBR Green	1) PAP Puffer	a) mleu7a 2 × 10 <sup>8</sup> Kopien + Mais cDNA 5 ng	25,64		
			25,22	25,50	0,95
			25,64		
		b) H <sub>2</sub> O in PAP – RT Reaktion	Kein Ct		
			Kein Ct	Kein Ct	
			Kein Ct		
	2) RT Puffer	a) mleu7a 2 × 10 <sup>8</sup> Kopien + Mais cDNA 5 ng	17,43		
			17,31	17,32	0,58
			17,23		
		b) H <sub>2</sub> O in PAP – RT Reaktion	Kein Ct		
			Kein Ct	Kein Ct	
			Kein Ct		
	3) Mischung beider Puffer	a) mleu7a 2 × 10 <sup>8</sup> Kopien + Mais cDNA 5 ng	30,41		
			30,23	30,28	0,36
			30,21		
		b) H <sub>2</sub> O in PAP – RT Reaktion	Kein Ct		
			Kein Ct	Kein Ct	
			Kein Ct		
	4) zweistufiges Verfahren	a) mleu7a 2 × 10 <sup>8</sup> Kopien + Mais cDNA 5 ng	25,54		
			25,74	25,64	0,39
			25,65		
		b) H <sub>2</sub> O in PAP – RT Reaktion	Kein Ct		
			Kein Ct	Kein Ct	
			Kein Ct		

**[0089]** Die Identität der PCR Produkte wurde anschließend mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden 10 µl jeder PCR-Reaktion auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 2% Agarosegel geladen und aufgetrennt. Als Größenstandard diente 100 bp Lader (Invitrogen, Katalognummer 15628-050). Die Ergebnisse sind in [Abb. 3](#) dargestellt.

#### Beispiel 2

**[0090]** Demonstration der Reproduzierbarkeit und Spezifität eines gekoppelten einstufigen Prozesses von Poly-(A)-Polymerasereaktion und reverser Transkription im gleichen Reaktionsgefäß.

**[0091]** In diesem Experiment sollte die Machbarkeit eines gekoppelten einstufigen Prozesses von Poly-(A)-Polymerase Reaktion und reverser Transkription im gleichen Reaktionsgefäß reproduziert werden. Dazu wurde die Effizienz des einstufigen Prozesses von Poly-(A)-Polymerasenreaktion und reverser Transkription im gleichen Reaktionsgefäß am Beispiel des Nachweises eines 22-mer RNA Oligonukleotids analysiert. Eine reverse Transkriptionsreaktion für das verwendete Template nach Standard-Bedingungen diente als Kontrolle für die Spezifität des Nachweises.

**[0092]** Zu diesem Zweck wurde der gekoppelte einstufige Prozeß unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Diese waren zu einen der mit Poly-(A)-Polymerase gelieferte Puffer, zum anderen der mit der reversen Transkriptase gelieferte Puffer (Tabelle 7, 8).

Tabelle 7: Bezeichnung und Komponenten der durchgeführten Reaktionen

Bezeichnung	Puffer	Template
Reaktion 1	1 Schritt Verfahren in PAP Puffer	RNA 50 ng + mleu7a 2x10E9 Kopien
Reaktion 2		RNA 50 ng
Reaktion 3		negativ Kontrolle: H <sub>2</sub> O
Reaktion 4	1 Schritt Verfahren in RT Puffer	RNA 50 ng + mleu7a 2x10E9 Kopien
Reaktion 5		RNA 50 ng
Reaktion 6		negativ Kontrolle: H <sub>2</sub> O
Reaktion 7	Standard RT	RNA 50 ng + mleu7a 2x10E9 Kopien
Reaktion 8		RNA 50 n

Tabelle 8: Zusammensetzung der kombinierten Poly-(A)-Polymerase/Reverse Transkriptions Reaktion und der Standard Reverse Transkriptions Reaktion

	Angaben der finalen Konzentrationen		
Reagenzien	Reaktion 1, 2, 3 PAP Puffer	Reaktion 4, 5, 6 RT Puffer	Reaktion 7, 8 Standard RT
5 × PAP Puffer	1×		
10 × RT Puffer		1×	1×
MnCl <sub>2</sub> 25 mM	2,5 mM		
rATP 10 mM	1 mM	1 mM	
Poly-(A)-Polymerase 2 U/μl	2 U (0,1 U/μl)	2 U (0,1 U/μl)	
dNTP Mix (dA, dT, dG, dC, je 5 mM)	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
UniGAPdT Primer 10 μM	1 μM	1 μM	1 μM
RNase Inhibitor 10 U/μl	10 U	10 U	10 U
Sensiscript Reverse Transkriptase	1 μl	1 μl	1 μl
RNase freies Wasser	variabel	variabel	variabel
mleu7a: Reaktion 1, 4, 7	2x10E9 Kopien	2x10E9 Kopien	2x10E9 Kopien
RNA: Reaktion 1, 2, 4, 5, 7, 8	50 ng	50 ng	50 ng
Neg. Kontrolle (H <sub>2</sub> O anstatt RNA) in Reaktion 3, 6	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	
Gesamtvolumen	20 μl	20 μl	20 μl

Inkubation

1 Std. 37°C 5 min 93°C

Alle Reaktionsansätze wurden anschließend geteilt: Ansätze a) 10 μl wurden entnommen und bei 4°C gelagert; Für alle Ansätze b): Zu 10 μl wurden erneute Uni GAP dT Primer [1 μM] und 0,5 μl Sensiscript Reverse Transkriptase hinzugefügt und erneut eine Reverse Transkription durchgeführt (1 Std. 37°C), anschließend die Reverse Transkriptase inaktiviert (5 min 93°C).

**[0093]** Weiterhin wurde eine Standard reverse Transkriptionsreaktion durchgeführt, mit dem Ziel, die Spezifi-

tät des Nachweises in der nachfolgenden PCR zu überprüfen (Tabelle 7, 8 siehe oben). Nach der Poly-(A)-Polymerasereaktion und reverse Transkription wurden die Proben geteilt. Jeweils zur Hälfte einer Probe wurde nochmals Uni Gap dT Primer und reverse Transkriptase zugegeben (siehe Tabelle 7, oben). Hierdurch sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß es zu einem geringen Ausmaß Falsch-positive Signale durch ein ungewünschtes Anhängen eines A-Tails an den Uni Gap dT Primer entstehen. Als Template wurde Gesamt-RNA zugegeben, die aus humanem Blut mit einem RNeasy Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland, Kat. No. 75144) isoliert wurde.

**[0094]** Die in den einzelnen Reaktionen eingesetzten Komponenten und ihre Bezeichnungen sind in der Tabelle 7, siehe oben, zusammengefaßt. Die nachgewiesenen 22-mer RNA entspricht in ihrer Sequenz der humanen leu7a miRNA (EMBL Acc#: AJ421724) und wird möglicherweise in humanen Blutzellen wie Leukozyten exprimiert. Allerdings werden solche kleinen RNAs bedingt durch die Aufreinigungstechnologie des für die RNA-Isolierung verwendeten RNeasy Verfahrens nur sehr ineffizient aufgereinigt. Das RNeasy Verfahren gewährleistet nur eine effiziente Bindung von RNA's mit einer Größe über 200 Basen an der Silikamembran der RNeasy Säule (QIAGEN RNeasy Midi/Maxi Handbook, 06/2001, S. 9) und damit werden kleine RNA's wie miRNAs stark abgereichert.

**[0095]** Zusätzlich wurde die synthetische 22-mer RNA in einer Konzentration verwendet, die deutlich höher ist als die zu erwartende endogene Kopienzahl. Die Reaktionen wurden wie in Tabelle 8 (siehe oben) angegeben zusammengesetzt.

**[0096]** Dazu wurden die in Tabelle 9 angegebenen Reagenzien verwendet.

Tabelle 9: Materialien für die Poly-A-Reaktion und Reverse Transkription

Poly (A) Polymerase	Ambion; Material Nummer 80U: 2030
Sensiscript RT Kit	Qiagen; Material Nummer 50rxn: 205211
Adenosine 5'-Triphosphate (rATP)	Amersham; Material Nummer 25 µmol: 27-2056-01
RNase Inhibitor	Promega; Material Nummer: N2511
Uni GAP dT Primer	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV V(N-Q)-3'
RNA	Leukozyten RNA aus humanem Blut mit einem RNeasy Midi Kit isoliert (QIAGEN, Cat. No. 75144)
mleu7a RNA Oligonukleotid	5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'

**[0097]** Nach der Inaktivierung der Enzyme (5 min bei 93°C) wurden die Ansätze 1:2 mit Wasser verdünnt und je 2 µl der Ansätze 1a/b bis 8a/b als Template in eine real-time SYBR Green PCR eingesetzt. Der Ansatz der real-time PCR erfolgte in Zweifachansätzen wie in Tabelle 9 (oben) angegeben mit QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Katalog Nr. 204143) und den in Tabelle 10 angegebenen Primern.

Tabelle 10: Komponenten für SYBR Green Real-time PCR

	Finale Konzentration
2 × SYBR Green PCR Master Mix	1×
Hum Uni Primer 10 µM	0,5 µM
miRNA Primer let7short 10 µM	0,5 µM
RNase-free water	variabel
PAP-/RT-Reaktion 1:2 vorverdünnt	2 µl
Finales Reaktionsvolumen	20 µl

**[0098]** Die im universellen Tail-Primer Hum Uni Primer enthaltene Sequenz 5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3' wurde in US 2003/0186288 A1 beschrieben. Das PCR Protokoll bestand aus einer initialen Reaktivierung der im QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix enthaltenen HotStarTaq Polymerase für 15 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 sec 94°C, 30 sec bei 52°C und 30 sec bei 72°C (siehe Tabelle 11).



Tabelle 11: Materialien für die SYBR Green PCR

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (200)	Qiagen; Material Nummer: 204143
Let 7short (spezifischer miRNA Primer)	5'-GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni Primer	5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'

**[0099]** Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte während des 72°C Extensions-Schrittes. Die PCR-Analysen wurden mit einem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt und anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

**[0100]** Die gekoppelte einstufige Poly-(A)-Reaktion und reverse Transkription sind sowohl in Poly(A)-Polymerase Puffer als auch in RT-Puffer möglich, was anhand der real-time PCR-Analysen deutlich wird. Bevorzugte Pufferbedingungen wurden im Text (siehe oben) bereits angegeben. Es zeigen sich große Unterschiede in den erhaltenen Ct-Werten bei Verwendung der unterschiedlichen Puffer.

**[0101]** Die zur Kontrolle der Spezifität durchgeführten Standard Reverse Transkriptionsreaktionen (Reaktionen 3, 6) ohne Poly-(A)-Reaktionen sind alle negativ (kein Ct). Dies läßt den Schluß zu, daß ohne Polyadenylierung der 22-mer RNA (1, 4, 7) bzw. der natürlich vorkommenden miRNA (2, 5, 8) wie erwartet kein Template für eine PCR-Amplifikation vorliegt und daher kein Signal generiert werden kann („kein Ct“).

**[0102]** In den Ansätzen „RT doppelt“ wurde nach der ersten Inkubation weiteres RT Enzym und Uni GAP dT Primer zugegeben mit dem Ziel, möglicherweise in der ersten Reaktion Poly-(A)-getailten UniGap dT Primer durch eine RT Reaktion nachweisbar zu machen. Alle diese Ansätze zeigten keinen Ct, d.h. ungewünschte Artefakte sind nicht nachweisbar.

**[0103]** Ungewünschte Artefakte wie Poly-(A)-Tailing des für die cDNA-Synthese verwendeten Primers, sind ebenso nicht nachweisbar.

#### Beispiel 3:

**[0104]** Nachweis verschiedener miRNAs mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens.

**[0105]** In diesem Experiment sollte demonstriert werden, dass aus einer Template cDNA, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren mit Poly-(A)-Reaktion gemeinsamer reverser Transkription synthetisiert wurde, mehrere Targets durch miRNA spezifische PCR Primer nachgewiesen werden können. Hierfür wurde Verfahren mit 293 RNA als Template durchgeführt. Eine Reverse Transkriptions Reaktion für das verwendete Template nach Standard-Bedingungen diente als Kontrolle für die Spezifität des Nachweises.

**[0106]** In der anschließenden SYBR Green PCR wurde insgesamt jeweils einer von 4 verschiedenen spezifischen Primer für miRNA's zusammen mit dem Tail spezifischen Primer eingesetzt. Zusätzlich wurde ein am 3' Ende des humanen  $\beta$ -Actin Transkripts lokalisierter Primer zusammen mit einem Tail spezifischen Primer verwendet, um die Effizienz der Poly-A-Reaktion und Reversen Transkription zu prüfen.

**[0107]** Für die Poly-A-Reaktion und Reversen Transkription (PAP + RT Reaktion) wurden die Reagenzien aus Tabelle 13 wie in Tabelle 16 angegeben zusammenpipettiert.

Tabelle 13: Materialien für die Poly A Reaktion und Reverse Transkription

Poly (A) Polymerase	Ambion; Material Nummer 80U: 2030
Sensiscript RT Kit	Qiagen; Material Nummer 50rxn: 205211
Adenosine 5'-Triphosphate (rATP)	Amersham; Material Nummer 25 µmol: 27-2056-01
RNase Inhibitor	Promega; Material Nummer: N2511
Uni GAP dT Primer	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
293 RNA: aus humaner Zell-Linie 293 (ATCC Nummer: CRL-1573)	Mit Qiagen RNeasy Midi Kit isoliert

Tabelle 16: PAP + RT Reaktion

Reagenzien	Finale Konzentration
10 × Buffer RT	1×
rATP 10 mM	1 mM
Poly A Polymerase 2 U/µl	2 U
dNTP Mix (ATGC je 5 mM)	0,5 mM
Uni GAP dT Primer 10 µM	1 µM
RNase Inhibitor 10 U/µl	10 U
Sensiscript Reverse Transkriptase	1 µl
RNase freies Wasser	variabel
a) 293 RNA 20 ng/µl b) H <sub>2</sub> O für neg Kontrolle	5 µl (100 ng) 5 µl
Gesamtvolumen	20 µl
Inkubation	1 Std. 37°C 5 min 93°C

**[0108]** In Reaktion a) 293 RNA und in Reaktion b) Wasser als Negativkontrolle (neg Kontrolle) zugegeben. Als Kontrolle für die Spezifität des Nachweises wurde eine Standard Reverse Transkriptions Reaktion mit den in Tabelle 14 angegebenen Reagenzien anhand des Schemas in Tabelle 17 angesetzt.

Tabelle 14: Materialien für die Reverse Transkription

Sensiscript RT Kit	Qiagen; Material Nummer 50rxn: 205211
RNase Inhibitor	Promega; Material Nummer: N2511
Uni GAP dT Primer	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
293 RNA	Mit Qiagen RNeasy Midi Kit isoliert

Tabelle 17: Standard RT Reaktion

Reagenzien	2.) RT Reaktion
10 × Buffer RT	1×
dNTP Mix (ATGC je 5 mM)	0,5 mM
Uni GAP dT Primer 10 µM	1 µM
RNase Inhibitor 10 U/µl	10 U
Sensiscript Reverse Transkriptase	1 µl
RNase freies Wasser	variabel
c) 293 RNA 20 ng/µl d) H <sub>2</sub> O für neg Kontrolle	5 µl (100 ng) 5 µl
Gesamtvolumen	20 µl
Inkubation	1 Std. 37°C 5 min 93°C

**[0109]** In Reaktion in Reaktion c) 293 RNA und in Reaktion d) Wasser als Negativkontrolle (neg Kontrolle) zugegeben. Die Proben wurden anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Reaktionen für 5 min bei 93°C inkubiert, durch diesen Temperaturschritt werden die Enzyme inaktiviert.

**[0110]** Nach der Inaktivierung der Enzyme wurden die Ansätze 1:2 mit Wasser verdünnt und je 2 µl der Ansätze a) bis d) als Template in eine real-time SYBR Green PCR eingesetzt. Die Materialien für die PCR sind in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Materialien für die SYBR Green PCR

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (200)	Qiagen; Material Nummer: 204143
let 7short (spezifischer miRNA Primer)	5'-GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
hsa-miR-24 (spezifischer miRNA Primer)	5'-TGG CTC AGT TCA GCA GGA-3'
hsa-miR-15a (spezifischer miRNA Primer)	5'-TAG CAG CAC ATA ATG GTT T-3'
hsa-miR-16 (spezifischer miRNA Primer)	5'-TAG CAG CAC GTA AAT ATT G-3'
β-Actin 3' Primer	5'-GTA CAC TGA CTT GAG ACC AGT TGA ATA AA-3'
Hum Uni Primer	5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'

**[0111]** Es wurden 10 verschiedenen Reaktionsansätze pipettiert. In Reaktion 1–5 (Tabelle 18) wurden jeweils der miRNA spezifische bzw. β-Actin 3' Primer und der Tail-Primer (Hum Uni) eingesetzt.

Tabelle 18: SYBR GREEN PCR Reaktion 1–5

Komponenten für SYBR Green PCR	Finale Konzentration
2 × SYBR Green PCR Master Mix	1×
Hum Uni Primer 10 µM	0,5 µM
je ein spezifischer miRNA Primer (10 µM) let 7short hsa-miR-24 hsa-miR-15a hsa-miR-16 bzw. β-Actin 3' Primer	0,5 µM
RNase-free water	variabel
PAP + RT Reaktion a) b) 1:2 vorverdünnt Standard RT Reaktion c) d) 1:2 vorverdünnt bzw. H <sub>2</sub> O als neg Kontrolle	2 µl (5 ng) 2 µl (5 ng) 2 µl
Finale Reaktionsvolumen	20 µl

**[0112]** In Reaktion 6–10 (Tabelle 19) wurde jeweils nur ein Primer eingesetzt, entweder der miRNA spezifi-

sche Primer oder der Tail-spezifische Primer.

**[0113]** In Reaktion 6–10 (Tabelle 19) wurde jeweils nur ein Primer eingesetzt, entweder der miRNA spezifische Primer oder der Tail-spezifische Primer.

Tabelle 19: Kontrolle mit nur einem Primer Reaktion 6–10

Komponenten für SYBR Green PCR	Finale Konzentration
2 × SYBR Green PCR Master Mix	1×
je ein spezifischer miRNA Primer (10 µM) let 7short hsa-miR-24 hsa-miR-15a hsa-miR-16 jeweils mit 3' Hum Uni Primer	0,5 µM
RNase-free water	variabel
PAP + RT Reaktion a) b) 1:2 vorverdünnt Standard RT Reaktion c) d) 1:2 vorverdünnt bzw. H <sub>2</sub> O als neg Kontrolle	2 µl (5 ng) 2 µl (5 ng) 2 µl
Finale Reaktionsvolumen	20 µl

**[0114]** Die Reihenfolge, in der die Primer in die Reaktionen eingesetzt wurden geht aus Tabelle 20 hervor. Der Ansatz der real-time PCR erfolgte in Zweifachansätzen.

Tabelle 20: Primer

	Primer
Reaktion 1	β-Actin 3' Primer + Hum Uni
Reaktion 2	let 7short + Hum Uni
Reaktion 3	hsa-miR-24 + Hum Uni
Reaktion 4	hsa-miR-15a + Hum Uni
Reaktion 5	hsa-miR-16 + Hum Uni
Reaktion 6	Hum Uni
Reaktion 7	let 7short
Reaktion 8	hsa-miR-24
Reaktion 9	hsa-miR-15a
Reaktion 10	hsa-miR-16

**[0115]** Die im universellen Tail-Primer Hum Uni Primer enthaltene Sequenz AAC GAG ACG ACG ACA GAC wurde in US2003/0186288A1 beschrieben.

**[0116]** Das PCR Protokoll bestand aus einer initialen Reaktivierung der im QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix enthaltenen HotStarTaq Polymerase für 15 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 sec 94°C, 30 sec bei 52°C und 30 sec bei 72°C (siehe Tabelle 21). Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte während des 72°C Extensions-Schrittes. Die PCR-Analysen wurden mit einem Applied Biosystems 7000 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt und anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Tabelle 21: 3 Schritt PCR Protokoll

PCR Initial Reaktivierung	15 min 95°C	
Denaturierung	15 sec 94°C	40×
Annealing	30 sec 52°C	
Extension	30 sec 72°C	
Schmelzkurve		

**[0117]** Es zeigt sich, dass die Effizienz der unter Standard-Bedingungen durchgeführten Reversen Transkription und des erfindungsgemäßen Verfahrens für das exemplarisch ausgewählte  $\beta$ -Actin System vergleichbar ist, was an vergleichbaren Ct Werten in der real-time PCR deutlich wird ([Abb. 6](#)).

**[0118]** Die real-time PCR liefert bei Verwendung der unter Standard-Bedingungen hergestellten cDNA sehr hohe Ct Werte von über 38, die bei einer mit SybrGreen durchgeführten real-time PCR eine sehr gute Spezifität des Nachweises bedeuten ([Abb. 6](#)). Bei der Agarosegel-Analyse der PCR Produkte wurden PCR Produkte der erwarteten Größe detektiert ([Abb. 8](#)), bzw. es wurde kein Produkt bei Verwendung der unter Standard-Bedingungen hergestellten cDNA detektiert.

**[0119]** Eine Ausnahme stellt das miR24 Produkt dar. Hier tritt bei Verwendung der unter Standard-Bedingungen hergestellten cDNA ein PCR Produkt der falschen Größe auf ([Abb. 8](#), siehe auch [Abb. 6](#)). Dieses Produkt ist nicht nachweisbar, sobald eine cDNA eingesetzt wird, die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellt wurde ([Abb. 8](#)).

**[0120]** Alle Kontrollreaktionen bei denen Wasser anstatt Template RNA in der Reversen Transkription bzw. des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt wurde zeigen kein Signal, d.h. es wurde kein Ct Wert in den betreffenden real-time PCRs erhalten ([Abb. 7](#), oberer Teil). Das gleiche gilt auch für Reaktionen, bei denen lediglich ein Primer eingesetzt wurde ([Abb. 7](#), oberer Teil). Ebenfalls kein Ct Wert wurde für Negativkontrollen, bei denen Wasser anstatt cDNA in der PCR eingesetzt wurde, erhalten ([Abb. 7](#)).

#### Beispiel 4:

**[0121]** Nachweises von miRNA mit Hilfe des gekoppelten, einstufigen Prozesses von Poly-A-Reaktion und Reverser Transkription und anschließendem Nachweis der generierten cDNA über real-time PCR mit Tail-spezifischer Sonde.

**[0122]** In diesem Experiment wurde eine real-time PCR durchgeführt, bei der eine Taqman Sonde eingesetzt wurde, die eine spezifische Bindungsstelle am Tail-Primer (Uni Gap dT) hat. Der Nachweis über eine Sonde stellt eine denkbare alternative für den Nachweis über SYBR Green real-time PCR dar. Die Verwendung der Sonde bietet die zusätzliche Möglichkeit einer Multiplex PCR, d.h. einer Co-Amplifikation einer oder mehrerer zusätzlicher Ziel-Nukleinsäuren, wie einer internen Kontrolle, die z.B. ein House-Keeping Gen sein kann.

**[0123]** Für die Poly-A-Reaktion und Reversen Transkription (PAP + RT Reaktion) wurden die Reagenzien aus Tabelle 22 wie in Tabelle 24 angegeben zusammenpipettiert.

Tabelle 22: Materialien für die Poly A Reaktion und Reverse Transkription

Poly (A) Polymerase	Ambion; Material Nummer 80U: 2030
Sensiscript RT Kit	Qiagen; Material Nummer 50rxn: 205211
Adenosine 5'-Triphosphate (rATP)	Amersham; Material Nummer 25 $\mu$ mol: 27-2056-01
RNase Inhibitor	Promega; Material Nummer: N2511
Uni GAP dT Primer	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
mleu7a Oligonukleotid	5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'

Tabelle 24: PAP + RT Reaktion

Reagenzien	Finale Konzentration
10 × Buffer RT	1×
rATP 10 mM	1 mM
Poly A Polymerase 2 U/μl	2 U
dNTP Mix (ATGC je 5 mM)	0,5 mM
Uni GAP dT Primer 10 μM	1 μM
RNase Inhibitor 10 U/μl	10 U
Sensiscript Reverse Transkriptase	1 μl
RNase freies Wasser	variabel
mleu7 (10 <sup>9</sup> Kopien/μl)	2 μl (2 × 10 <sup>9</sup> Kopien)
Gesamtvolumen	20 μl
Inkubation	1 Std 37°C 5 min 93°C

**[0124]** Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer Inaktivierung der Enzyme für 5 min auf 93°C.

**[0125]** Nach der Inaktivierung der Enzyme wurden 2 μl des unverdünnten Ansatzes als Template in eine real-time PCR eingesetzt, die zur Detektion eine Taqman Sonde enthielt. Die Materialien für die PCR sind in Tabelle 23 angegeben, und wurden wie in Tabelle 25 angegeben zusammenpipettiert.

Tabelle 23: Materialien für die QT Probe PCR

QuantiTect Probe PCR Kit (200)	Qiagen Material Nr.: 204343
let 7short (spezifischer miRNA Primer)	5'-GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni Primer	5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'
Hum Uni Sonde	5'-HEX-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-BHQ-3' 5' Reporter Farbstoff: HEX 3' Quencher: Black Hole Quencher 1

Tabelle 25: QuantiTect Probe PC:

Komponenten für QuantiTect Probe PCR	Finale Konzentration
2 × QuantiTect Probe PCR Master Mix	1×
Hum Uni Primer 10 μM	0,5 μM
let 7short (spezifischer miRNA Primer)	0,5 μM
RNase-free water	Variabel
PAP + RT Reaktion unverdünnt	2 μl (2 × 10 <sup>8</sup> Kopien)
Finale Reaktionsvolumen	20 μl

**[0126]** Der Ansatz der real-time PCR erfolgte in Zweifachansätzen.

**[0127]** Die im universellen Tail-Primer Hum Uni Primer enthaltene Sequenz AAC GAG ACG ACG ACA GAC wurde in US2003/0186288A1 beschrieben. Die Sequenz der Taqman Sonde wurde dem humanen GAPDH Gen Locus entnommen, sie ist nicht in US2003/0186288A1 enthalten.

**[0128]** Das PCR Protokoll bestand aus einer initialen Reaktivierung der im QuantiTect Probe PCR Master Mix enthaltenen HotStarTaq Polymerase für 15 min bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen mit 15 sec 94°C und 30 sec

bei 52°C (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: 2 Schritt PCR Protokoll

PCR Initiale Reaktivierung	15 min 95°C	45×
Denaturierung	15 sec 94°C	
Annealing	30 sec 52°C	

**[0129]** Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte während des 52°C Annealing-Schrittes. Die PCR-Analysen wurden mit einem 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Die PCR-Ergebnisse sind in Tabelle 27 gezeigt.

Tabelle 27: PCR Ergebnisse

mleu7a	Ct	Ct Mittel	CV in %
unverdünnt $2 \times 10^8$	20,24	20,31	0,45
	20,37		

**[0130]** Ein Nachweis mit Hilfe einer für den Tail spezifischen Sonde ist möglich und liefert das zu erwartende Ergebnis.

#### Beispiel 5:

**[0131]** Effekt von Poly-A-Polymerase Konzentration und Inkubationszeit auf den gekoppelten, einstufigen Prozess von Poly-A-Reaktion und Reverser Transkription.

**[0132]** In diesem Versuch wurden zwei Konzentrationen Poly-A-Polymerase (2 U bzw. 0,5 U) für jeweils 15 min oder 1 h im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt. Alle Bedingungen wurden jeweils in RT Puffer (Qiagen) und Poly-A-Polymerase Puffer getestet.

**[0133]** Für die Poly-A-Reaktion und Reverse Transkription (PAP + RT Reaktion) wurden die Reagenzien aus Tabelle 28 wie in Tabelle 30 angegeben zusammenpipettiert (Reaktion a) 2 U Poly-A-Polymerase, Reaktion b) 0,5 U Poly-A-Polymerase).

Tabelle 28: Materialien für die Poly A Reaktion und Reverse Transkription

Poly (A) Polymerase	Ambion; Material Nummer 80U: 2030
Sensiscript RT Kit	Qiagen; Material Nummer 50rxn: 205211
Adenosine 5'-Triphosphate (rATP)	Amersham; Material Nummer 25 µmol: 27-2056-01
RNase Inhibitor	Promega; Material Nummer: N2511
Uni GAP dT Primer	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
Mais RNA	Aus 1 g gemörserten Maisblättern mit Qiagen RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74106) nach Plant Protokoll.
mleu7a Oligonukleotid	5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'

Tabelle 30: PAP + RT Reaktion

Reagenzien	Finale Konzentration
10 × Buffer RT	1×
rATP 10 mM	1 mM
Poly A Polymerase 2 U/μl	a) 2 U b) 0,5 U
dNTP Mix (ATGC je 5 mM)	0,5 mM
Uni GAP dT Primer 10 μM	1 μM
RNase Inhibitor 10 U/μl	10 U
Sensiscript Reverse Transkriptase	1 μl
RNase freies Wasser	variabel
mleu7a 10 <sup>9</sup> Kopien/μl	2 μl (2 × 10 <sup>9</sup> Kopien)
Mais RNA 25 ng/μl	2 μl (50 ng)
Gesamtvolumen	20 μl
1.) Inkubation	1 Std 37°C 5 min 93°C
2.) Inkubation	15 min 37°C 5 min 93°C

**[0134]** Anschließend wurden die Proben bei 37°C inkubiert (1.1 Std./2.15 min). Anschließend wurden die Reaktionen für 5 min auf 93°C erhitzt und dadurch die Enzyme inaktiviert.

**[0135]** Anschließend wurden je Reaktion jeweils 2 μl unverdünnt in eine SYBR Green PCR eingesetzt. Die Reaktionen wurden in Doppelbestimmungen getestet. Hierfür wurden die Reagenzien aus Tabelle 29 wie in Tabelle 31 angegeben zusammenpipettiert und anschließend die PCR wie in Tabelle 32 angegeben durchgeführt.

Tabelle 29: Materialien für die SYBR Green PCR

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (200)	Qiagen; Material Nummer: 204143
Let 7short (spezifischer miRNA Primer)	5'-GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni Primer	5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'

Tabelle 31: SYBR GREEN PCR

Komponenten für SYBR Green PCR	Finale Konzentration
2 × SYBR Green PCR Master Mix	1×
Hum Uni Primer 10 μM	0,5 μM
let 7short (spezifischer miRNA Primer)	0,5 μM
RNase-free water	variabel
PAP + RT Reaktion 1a) b)/2a) b)	2 μl (2 × 10 <sup>8</sup> Kopien)
Finale Reaktionsvolumen	20 μl

Tabelle 32: 3 Schritt PCR Protokoll

PCR Initiale Reaktivierung	15 min 95°C	45×
Denaturierung	15 sec 94°C	
Annealing	30 sec 52°C	
Extension	30 sec 70°C	
Schmelzkurve		



**[0136]** Das PCR Protokoll bestand aus einer initialen Reaktivierung der im QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix enthaltenen HotStarTaq Polymerase für 15 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 sec 94°C, 30 sec bei 52°C und 30 sec bei 72°C (siehe Tabelle 32 oben). Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte während des 72°C Extensions-Schrittes. Die PCR-Analysen wurden mit einem Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt und anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

**[0137]** Es zeigt sich eine Abhängigkeit der Effizienz des einstufigen Prozesses von Poly-A-Reaktion und Reverser Transkription sowohl von der Konzentration der Poly-A-Polymerase als auch von der Inkubationszeit (siehe [Abb. 9](#)).

Beispiel 6:

**[0138]** Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit verschiedenen Reversen Transkriptasen.

**[0139]** Das erfindungsgemäße Verfahren wurde mit insgesamt fünf verschiedenen Reversen Transkriptasen (siehe Tabelle 35) im Buffer RT (Qiagen) (Reaktion 1–5), bzw. zusätzlich zum Vergleich jeweils im mit der Reversen Transkriptase gelieferten Puffer angesetzt (Reaktion 6–9).

Tabelle 35: Verwendete Reverse Transkriptasen und Puffer

1.) AMV Reverse Transkriptase	AMV Reverse Transcriptase 5 × Reaction
2.) SuperScript III Reverse Transkriptase	Buffer
	5 × First- Strand Buffer
3.) HIV Reverse Transkriptase	10 × First Strand Synthesis Buffer
4.) M-MuLV Reverse Transkriptase	10 × Reverse Transcriptase Reaction Buffer
5.) Sensiscript Reverse Transkriptase	10 × Buffer RT

**[0140]** Für den einstufigen Prozess von Poly-A-Reaktion und Reverser Transkription (PAP + RT Reaktion) wurden die Reagenzien aus Tabelle 33 für Reaktion 1–5 (Reaktionspuffer: Buffer RT (Qiagen) wie in Tabelle 36, und für Reaktion 6–9 (Weitere Reverse Transkriptasen, jeweils im mitgelieferten Puffer) wie in Tabelle 37 angegeben zusammenpipettiert.

Tabelle 33: Materialien für die Poly A Reaktion und Reverse Transkription

Poly (A) Polymerase	Ambion; Material Nummer 80U: 2030
AMV Reverse Transcriptase	Promega; Material Nummer 300U: M5101
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen; Material Nummer 10.000U: 18080-044
HIV Reverse Transcriptase	Ambion; Material Nummer 500U: #2045
M-MuLV Reverse Transcriptase	BioLabs; Material Nummer 10.000U: M0253S
Sensiscript RT Kit	Qiagen; Material Nummer 50rxns: 205211
Adenosine 5'-Triphosphate (rATP)	Amersham; Material Nummer 25 µmol: 27-2056-01
RNase Inhibitor	Promega; Material Nummer: N2511
Uni GAP dT Primer	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTV V-3'
Mais RNA	Aus 1 g gemörserten Maisblättern mit Qiagen RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74106) Plant Protokoll, 10 facher upscale (Maxi shredder und Säule) siehe oben
mleu7a Oligonukleotid	5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'

Tabelle 36: PAP + RT Reaktion in Buffer RT (Qiagen)

Reagenzien	Finale Konzentration
10 × Buffer RT	1×
rATP 10 mM	1 mM
Poly A Polymerase 2 U/μl	1 U
dNTP Mix (ATGC je 5 mM)	0,5 mM
Uni GAP dT Primer 10 μM	1 μM
RNase Inhibitor 10 U/μl	10 U
1.) AMV Reverse Transkriptase 2.) SuperScript III Reverse Transkriptase 3.) HIV Reverse Transkriptase 4.) M-MuLV Reverse Transkriptase 5.) Sensi-script Reverse Transkriptase	24 U 10 U 1 U 10 U 1 μl
RNase freies Wasser	variabel
mleu7a 10 <sup>9</sup> Kopien/μl	2 μl (2 × 10 <sup>9</sup> Kopien)
Mais RNA 20 ng/μl	2 μl (40 ng)
Gesamtvolumen	20 μl
Inkubation	1 Std 37°C 5 min 93°C

Tabelle 37: PAP + RT Reaktion im mit der Reversen Transkriptase gelieferten Puffer

Reagenzien	Finale Konzentration
6.) AMV Reverse Transcriptase 5 × Reaction Buffer 7.) 5 × First- Strand Buffer 8.) 10 × First Strand Synthesis Buffer 9.) 10 × Reverse Transcriptase Reaction Buffer	1× 1× 1× 1×
rATP 10 mM	1 mM
Poly A Polymerase 2 U/μl	1 U
dNTP Mix (ATGC je 5 mM)	0,5 mM
Uni GAP dT Primer 10 μM	1 μM
RNase Inhibitor 10 U/ μl	10 U
6.) AMV Reverse Transkriptase 7.) SuperScript III Reverse Transkriptase 8.) HIV Reverse Transkriptase 9.) M-MuLV Reverse Transkriptase	24 U 10 U 1 U 10 U
RNase freies Wasser	variabel
mleu7a 10 <sup>9</sup> Kopien/μl	2 μl (2 × 10 <sup>9</sup> Kopien)
Mais RNA 20 ng/μl	2 μl (40 ng)
Gesamtvolumen	20 μl
Inkubation	1 Std 37°C 5 min 93°C

**[0141]** Anschließend wurden die Proben 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Reaktionen für 5 min auf 93°C erhitzt und dadurch die Enzyme inaktiviert.

**[0142]** In der Folge wurden je Reaktion jeweils 2 μl in eine SYBR Green PCR eingesetzt. Die Reaktionen wurden in Doppelbestimmungen getestet. Hierfür wurden die Reagenzien aus Tabelle 34 wie in Tabelle 38 angegeben zusammenpipettiert, und die PCR wie in Tabelle 39 angegeben durchgeführt.

Tabelle 34: Materialien für die SYBR Green PCR

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (200)	Qiagen; Material Nummer: 204143
Let 7short (spezifischer miRNA Primer)	5'-GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni Primer	5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'

Tabelle 38: SYBR GREEN PCR

Komponenten für SYBR Green PCR	Finale Konzentration
2 × SYBR Green PCR Master Mix	1×
Hum Uni Primer 10 µM	0,5 µM
let 7short (spezifischer miRNA Primer)	0,5 µM
RNase-free water	variabel
PAP + RT Reaktion unverdünnt	2 µl (2 × 10 <sup>8</sup> Kopien)
Finale Reaktionsvolumen	20 µl

Tabelle 39: 3 Schritt PCR Protokoll

PCR Initiale Reaktivierung	15 min 95°C	
Denaturierung	15 sec 94°C	45×
Annealing	30 sec 52°C	
Extension	30 sec 70°C	
Schmelzkurve		

**[0143]** Das PCR Protokoll bestand aus einer initialen Reaktivierung der im QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix enthaltenen HotStarTaq Polymerase für 15 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 sec 94°C, 30 sec bei 52°C und 30 sec bei 72°C (siehe Tabelle 39). Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte während des 72°C Extensions-Schrittes. Die PCR-Analysen wurden mit einem Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt und anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

**[0144]** Die verwendeten Mengen der Reversen Transkriptasen wurden für Standard Reverse Transkriptions Reaktionen optimiert, was eine wahrscheinliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede im Ct Wert sein kann.

#### Abbildungen

**[0145]** [Abb. 1](#) zeigt einen Vergleich zwischen den einstufigen Verfahren gemäß vorliegender Erfindung (B) und dem Zweistufenprozess wie er im Stand der Technik bekannt ist (A). Pol A Polymerase: Enzym mit Polyadenylierungsaktivität im Sinne der Erfindung; Reverse Transkriptase: Enzym mit Reverser Transkriptaseaktivität im Sinne der Erfindung; rATP: Ribonukleotid, hier beispielhaft Adenosin-5'-Triphosphat; dNTPs: Desoxyribonukleotide; Oligo dT Tail Primer: Anker Oligonukleotid mit verschiedenen möglichen Ausführungsformen im Sinne der Erfindung; Uni GAP dT Primer: spezielle Ausführungsform des Anker Oligonukleotids; Tail: 5' Tail als optionaler Teil des Anker Oligonukleotids; w: definiert die erfindungsgemäße Länge des durch die Polyadenylierungsaktivität angefügten homopolymer Tails (größer 10–20 Basen); x, y: definiert die erfindungsgemäße Art und Länge der 3' Ankersequenz des erfindungsgemäßen Anker Oligonukleotids; z: definiert die Länge des homopolymer Anteils des erfindungsgemäßen Anker Oligonukleotids.

**[0146]** [Abb. 2](#) zeigt eine grafische Darstellung der Ct Werte aus Tabelle 6: Bedingung a) enthielt jeweils Template, bei Bedingung b) wurde anstatt Template nur H<sub>2</sub>O zugesetzt (H<sub>2</sub>O in PAP Reaktion). Bei b) wurde kein Signal bis zu PCR Zyklus 40 (maximale Zahl der durchgeführten Zyklen) erhalten, daher Angabe „Kein Ct“.

**[0147]** [Abb. 3](#) zeigt eine Agarosegel-Analyse der Real-time PCR Produkte aus Beispiel 1. M: 100 bp Ladder

(Invitrogen, Katalog-Nr. 15628-050). 2% Agarose, gefärbt mit Ethidiumbromid in TAE als Laufpuffer. Ladeschema: Spur 1: Marker; dann wurden jeweils die Dreifachbestimmungen nebeneinander aufgetragen; 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b.

[0148] [Abb. 4](#) zeigt eine tabellarische Darstellung von Ct Werten, die durch real-time PCR Analyse der Reaktionsprodukte der in Tabelle 8 beschriebenen Ansätzen erhalten wurden. Bei 3 und 6 wurde kein Signal bis zu PCR Zyklus 40 (maximale Zahl der durchgeführten Zyklen) erhalten, daher Angabe „kein Ct“.

[0149] [Abb. 5](#) zeigt eine grafische Darstellung von Ct Werten, die durch real-time PCR Analyse der Reaktionsprodukte der in Tabelle 8 beschriebenen Ansätzen erhalten wurden.

[0150] [Abb. 6](#) zeigt eine tabellarische Darstellung von Ct Mittelwerten, die durch real-time PCR Analyse der Reaktionsprodukte der in Tabelle 18 beschriebenen Ansätzen b) und e) erhalten wurden.

[0151] Bei 2, 4 und 5 mit Standard RT wurde ein Signal frühestens erst nach Zyklus 38 detektiert, bzw. bei 2) kein Signal, daher Angabe „kein Ct“.

[0152] [Abb. 7](#) zeigt eine tabellarische Darstellung der real-time PCR Ergebnisse der Ansätze b) und d) aus Tabelle 18, sowie der Kontrollen mit nur einem Primer aus Tabelle 19 Ansätze a)–d). Es wurde kein Signal bis zu PCR Zyklus 40 (maximale Zahl der durchgeführten Zyklen) erhalten, daher Angabe „kein Ct“.

[0153] [Abb. 8](#) zeigt eine Agarosegel-Analyse der Real-time PCR Produkte aus Beispiel 3. M: 100 bp Ladder (Invitrogen, Katalog-Nr. 15628-050). 2% Agarose, gefärbt mit Ethidiumbromid in TAB als Laufpuffer.

[0154] [Abb. 9](#) zeigt eine tabellarische Darstellung von Ct Mittelwerten, die durch real-time PCR Analyse der Reaktionsprodukte der in Tabelle 30 beschriebenen Ansätzen 1a) b) und 2 a) b) erhalten wurden.  
Unterer Teil: Grafische Darstellung von Ct Mittelwerten, die durch real-time PCR Analyse der Reaktionsprodukte der in Tabelle 30 beschriebenen Ansätzen erhalten wurden.

[0155] [Abb. 10](#) zeigt eine tabellarische Darstellung von Ct Mittelwerten, die durch real-time PCR Analyse der Reaktionsprodukte der in Tabelle 36 1–5 und in Tabelle 37 6–9 beschriebenen Ansätzen erhalten wurden.  
Unterer Teil: Grafische Darstellung von Ct Mittelwerten, die durch real-time PCR Analyse der Reaktionsprodukte der in Tabelle 36 1–5 und in Tabelle 37 6–9 beschriebenen Ansätzen erhalten wurden.

[0156] [Abb. 11](#) zeigt eine Liste der verwendeten Nukleinsäuresequenzen.

[0157] [Abb. 12](#) zeigt erfindungsgemäße Anker Oligonukleotide.

## SEQUENCE LISTING

<110> Qiagen GmbH  
 Qiagen GmbH

<120> Verfahren zur Synthese einer cDNA in einer Probe in einer  
 enzyma-tischen Reaktion unter gleichzeitiger Bereitstellung eines  
 Enzyms mit Polyadenylierungsaktivität und eines zweiten Enzyms  
 mit reverser Transkriptaseaktivität

<130> Q60006

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Synthetisch

<400> 1  
 ugagguagua gguuguauag uu 22

<210> 2  
 <211> 65  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Synthetisch

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (65)..(65)  
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 2  
 tggaacgaga cgacgacaga ccaagcttcc cgttctcagc cttttttttt tttttttttt 60  
 ttvvn 65

<210> 3  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sythetisch

<400> 3  
 aacgagacga cgacagac 18

<210> 4  
 <211> 19  
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sythetisch

<400> 4

gaggtagtag gttgtatag

19

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetisch

<400> 5

tggctcagtt cagcagga

18

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sythetisch

<400> 6

tagcagcaca taatggttt

19

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sythetisch

<400> 7

tagcagcacg taaatattg

19

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sythetisch

<400> 8

gtacactgac ttgagaccag ttgaataaa

29

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetisch

<400> 9

caagcttccc gttctcagcc

20

<210> 10

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial - poly T between 10 an 30

<220>

<221> misc\_feature

<222> (53)..(53)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 10

tggaacgaga cgacgacaga ccaagctccc gttctcagcc tttttttttt vvn

53

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial - poly T between 10 and 30

<220>

<221> misc\_feature

<222> (30)..(30)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 11

aacgagacga cgacagactt ttttttttvn

30

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial - poly T bztween 10 and 30

<400> 12

aacgagacga cgacagactt ttttttttv

29

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial - poly T between 10 and 30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (29)..(29)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <400> 13  
 aacgagacga cgacagactt ttttttttn 29

<210> 14  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Artificial poyl T between 10 and 30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (29)..(30)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <400> 14  
 aacgagacga cgacagactt ttttttttnn 30

<210> 15  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Artificial poyl T between 10 and 30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (30)..(31)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <400> 15  
 aacgagacga cgacagactt tttttttvn n 31

<210> 16  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Artificial poly T between 10 and 30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (30)..(32)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <400> 16  
 aacgagacga cgacagactt tttttttvn nn 32



<210> 17  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Artifical poly T between 10 and 30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (29)..(31)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 17  
 aacgagacga cgacagactt ttttttttnn n 31

<210> 18  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Artificial poly T between 10 and 30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (52)..(52)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 18  
 tggaacgaga cgacgacaga ccaagcttcc cgtctcagcc tttttttttt vn 52

<210> 19  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Artificial poly T between 10 and 30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (52)..(53)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 19  
 tggaacgaga cgacgacaga ccaagcttcc cgtctcagcc tttttttttt vnn 53

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Synthese einer cDNA in einer Probe in einer enzymatischen Reaktion, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- a. Gleichzeitige Bereitstellung eines ersten Enzyms mit Polyadenylierungsaktivität, eines zweiten Enzyms mit reverser Transkriptaseaktivität, eines Puffers, mindestens eines Ribonukleotids, mindestens eines Desoxyribonukleotids, eines Anker Oligonukleotids,
- b. Zugabe einer Probe umfassend eine Ribonukleinsäure und
- c. Inkubation der Agenzien der Schritte a) und b) bei einem oder mehreren Temperaturschritten, welche so gewählt sind, daß das erste und das zweite Enzym Aktivität zeigen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Probe eine Ribonukleinsäure umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend prokaryontische RNA, Eukaryontische RNA, Virale RNA, Archae-RNA, miRNA, snoRNA, mRNA, tRNA, nicht-polyadenylierte RNA, und rRNA sowie Gemische davon.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Anker Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, ein Poly-(A)-Oligonukleotid, Poly-(C)-Oligonukleotid, Poly-(T)-Oligonukleotid, Poly-(G)-Oligonukleotid, Poly-(U)-Oligonukleotid, Poly-(A)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail, Poly-(C)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail, Poly-(T)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail, Poly-(G)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail und Poly-(U)-Oligonukleotid zusätzlich umfassend einen 5'-Tail.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Anker Oligonukleotid eine Länge zwischen 6 und 150 Nukleotiden hat, und optional am 3'-Ende eine Ankersequenz aufweist,

5. Verfahren nach Anspruch 3 bis 4, wobei das Anker Oligonukleotid eine Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist, eine Peptid-Nukleinsäure (PNA) ist oder eine Locked-Nukleinsäure (LNA) ist, eine Phosphorthioat-Desoxyribonukleinsäure ist, eine Cyclohexen-Nukleinsäuren (CeNA) ist, eine N3'-P5'-Phosphoramidate (NP) ist, oder eine Tricyclo-Desoxyribonukleinsäuren (tcDNA) ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, wobei das Ribonukleotid ausgewählt sein kann aus der Gruppe umfassend, Adenosin-5'-Triphosphat, Thymin-5'-Triphosphat, Cytosin-5'-Triphosphat, Guanin-5'-Triphosphat, Uracil-5'-Triphosphat, ein Ribonukleotid mit einem Basenanalogen, und wobei das Ribonukleotid optional modifiziert oder markiert sein können.

7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, wobei das Desoxyribonukleotid ausgewählt sein kann aus der Gruppe umfassend, Desoxyadenosin-5'-Triphosphat (dATP), Desoxythymine-5'-Triphosphat (dTTP), Desoxycytosin-5'-Triphosphat (dCTP), Desoxyguanin-5'-Triphosphat (dGTP), Desoxyuracil-5'-Triphosphat (dUTP) und wobei das Desoxyribonukleotid optional modifiziert oder markiert sein kann.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Markierung des Desoxyribonukleotids ausgewählt sein kann aus der Gruppe umfassend, eine radioaktive Markierung, wie beispielsweise  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ , ein fluoreszierender Farbstoff wie beispielsweise, Fluoresceinisothiocyanate (FITC), 6-Carboxyfluorescein (FAM), Xanthen, Rhodamine, 6-Carboxy-2',4',7',4',7'-hexachlorofluorescein (HEX), 6-Carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein (JOE), N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA), 6-Carboxy-X-rhodamine (ROX), 5-Carboxyrhodamine-6G (R6G5), 6-carboxyrhodamine-6G (RG6), Rhodamine 110; Coumarine, wie Umbelliferone, Benzimidazole, wie Hoechst 33258; Phenanthridine, wie Texas Red, Ethidiumbromide, Acridinfarbstoffe, Carbazolfarbstoffe, Phenoxazinefarbstoffe, Porphyrinfarbstoffe, Polymethinfarbstoffe, Cyaninfarbstoffe, wie Cy3, Cy5, Cy7, BODIPY-farbstoffe, und Quinolinfarbstoffe und Alexafarbstoffe.

9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Modifizierung ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, Biotinylierung, Digoxigeninmarkierung, und Haptene.

10. Verfahren nach Anspruch 7 bis 9, wobei die Konzentration eines Desoxyribonukleotids wenigstens 0,01 mM in der Reaktion beträgt und höchstens 10 mM in der Reaktion beträgt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Desoxyribonukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von 0,2 mM bis 2 mM vorliegen.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Puffer einen pH von 6 bis 10 hat und  $\text{Mg}^{2+}$  Ionen umfaßt.

13. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, wobei das Enzym mit Polyadenylierungsaktivität ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, Enzyme prokaryontischen Ursprungs, eukaryontischen Ursprungs, viralen Ursprungs, Archae Ursprungs und pflanzlichen Ursprungs.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Enzym mit Polyadenylierungsaktivität ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, Poly(A)-Polymerase aus *Escherichia coli*, Poly(A)-Polymerase aus Hefe, Poly(A)-Polymerase aus Rind, Poly(A)-Polymerase aus Frosch und humane Poly(A)-Polymerase.

15. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, wobei das Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität

ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, Enzyme aus Viren, Bakterien, Archae-Bakterien, Eukaryonten und Enzyme, insbesondere aus thermostabilen Organismen und Enzyme, die eine solche Funktion erst durch Veränderung ihrer Gensequenz Mutagenese oder durch entsprechende Pufferbedingungen erhalten.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, HIV reverse Transkriptase, M-MLV reverse Transkriptase, EAIV reverse Transkriptase, AMV reverse Transkriptase, *Thermus thermophilus* DNA Polymerase I, M-MLV RNase H<sup>-</sup> (Superscript, Superscript II, Superscript III), Monsterscript (Epicentre), Omniscript, Sensiscript Reverse Transkriptase (Qiagen), ThermoScript und Thermo-X (beide Invitrogen), AccuScript reverse Transcriptase (Stratagene).

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Inkubation der Agenzien des Schrittes c) bei einem oder mehreren Temperaturschritten stattfindet, welche so gewählt sind, daß das erste und das zweite Enzym Aktivität zeigen.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Reaktion zusätzlich einen Temperaturschritt bei einer höheren Temperatur von etwa 65°C bis 95°C umfasst.

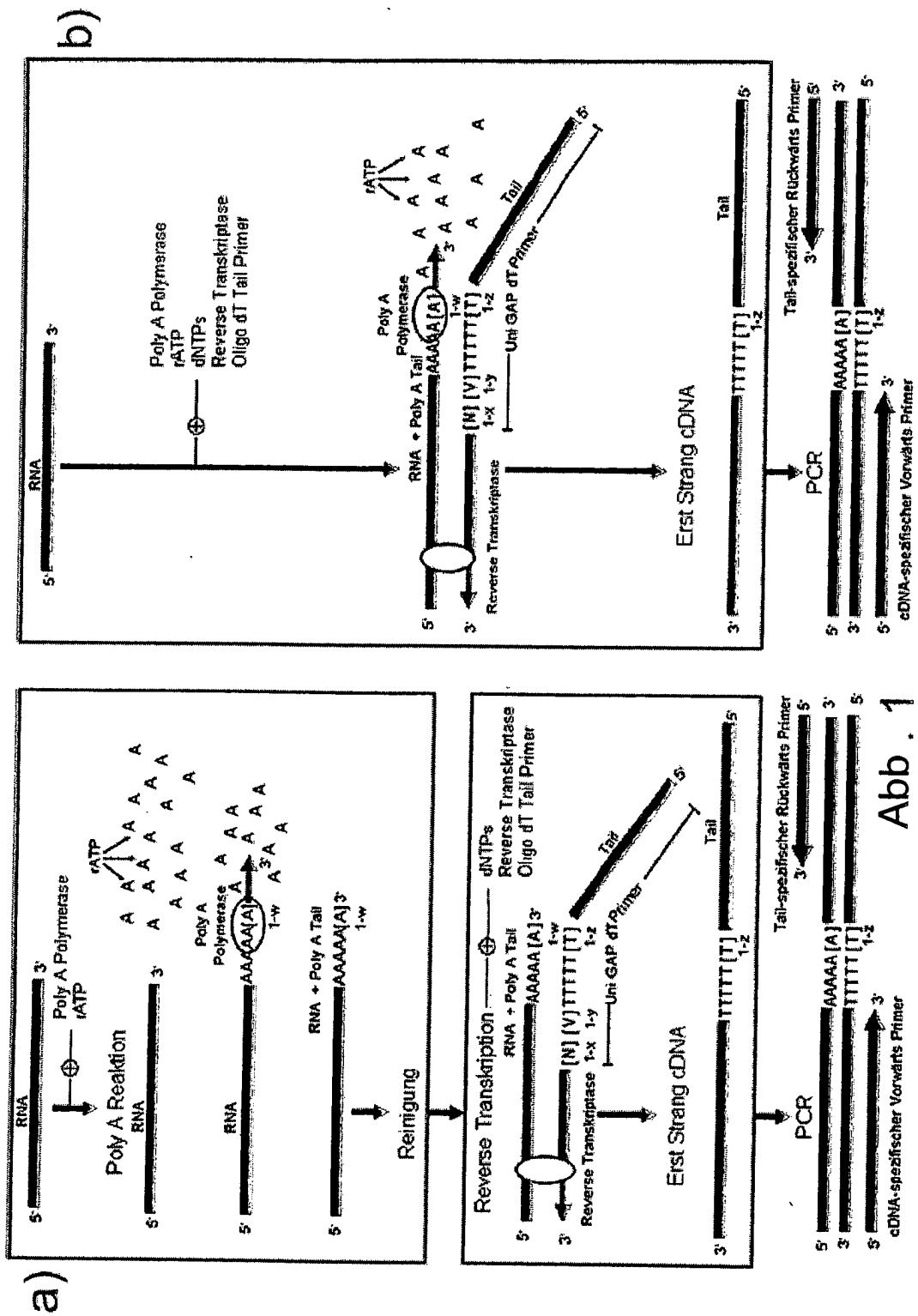
19. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 18, wobei die im Verfahren generierte cDNA anschließend mit einer Polymerasenkettenreaktion amplifiziert wird und die Reaktion Randomprimer umfaßt und/oder spezifische Primer und/oder optional eine oder mehrere Sonden umfaßt.

20. Reaktionsgemisch umfassend ein erstes Enzym mit Polyadenylierungsaktivität, ein zweites Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität, optional einen Puffer, optional mindestens ein Ribonukleotid, optional mindestens ein Desoxyribonukleotid und optional ein Anker Oligonukleotid, optional Random Primer.

21. Kit umfassend ein Reaktionsgemisch nach Anspruch 20.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



	a	b
1) PAP Puffer	25,50	kein Ct
2) RT Puffer	17,32	kein Ct
3) Mischung PAP RT Puffer	30,28	kein Ct
4) zweistufiges Verfahren	25,64	kein Ct

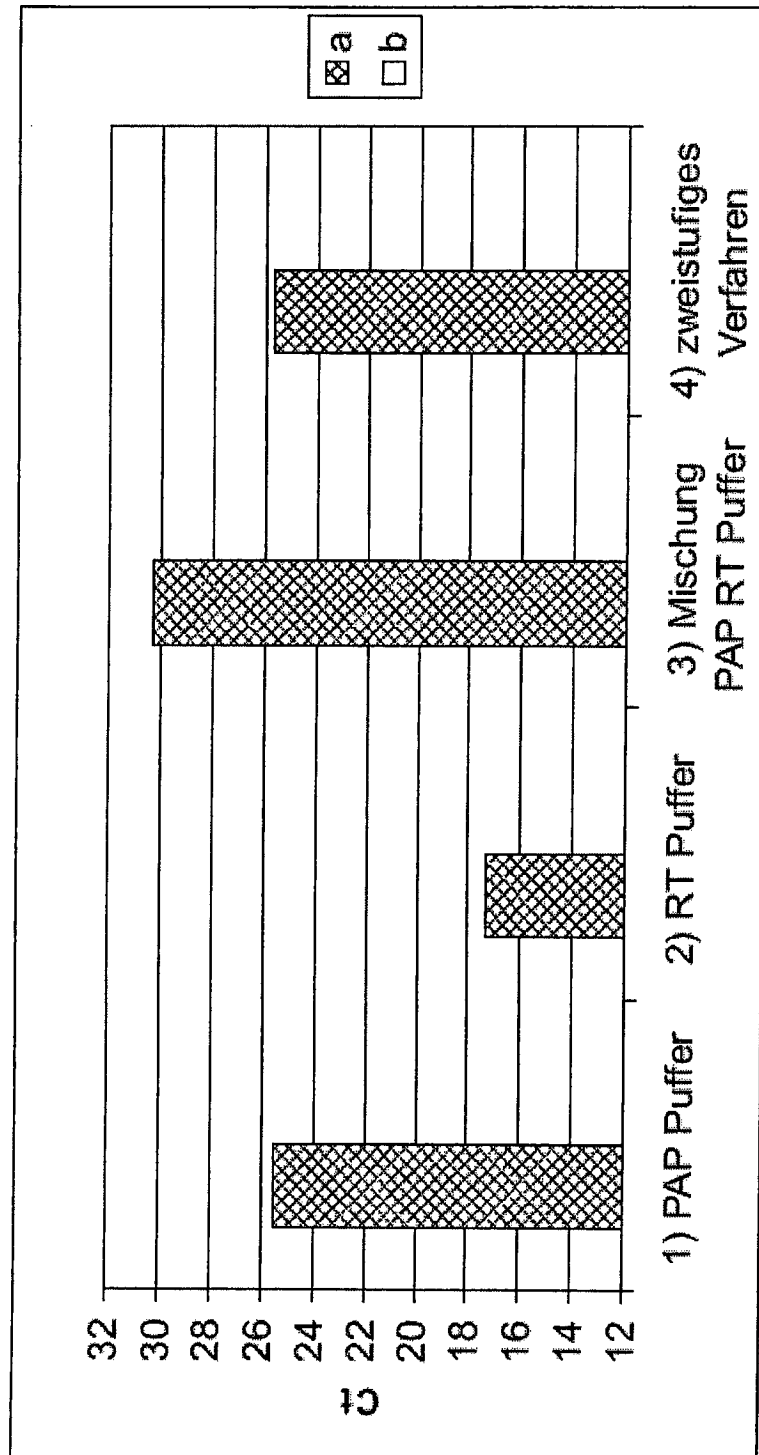


Abb. 2

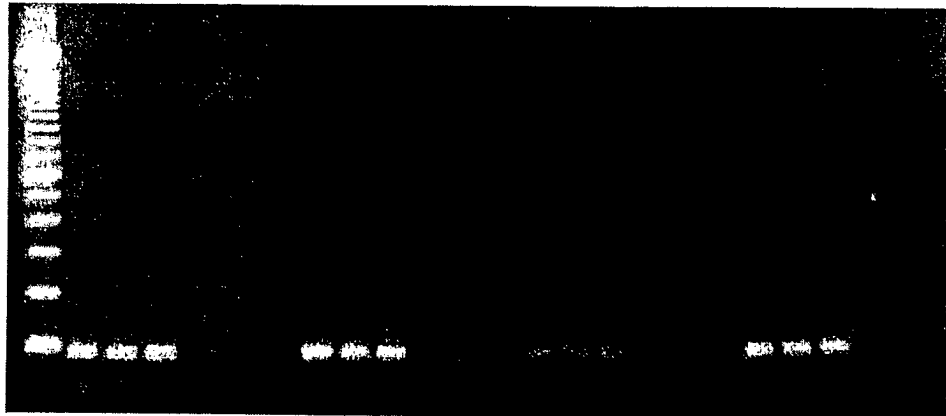
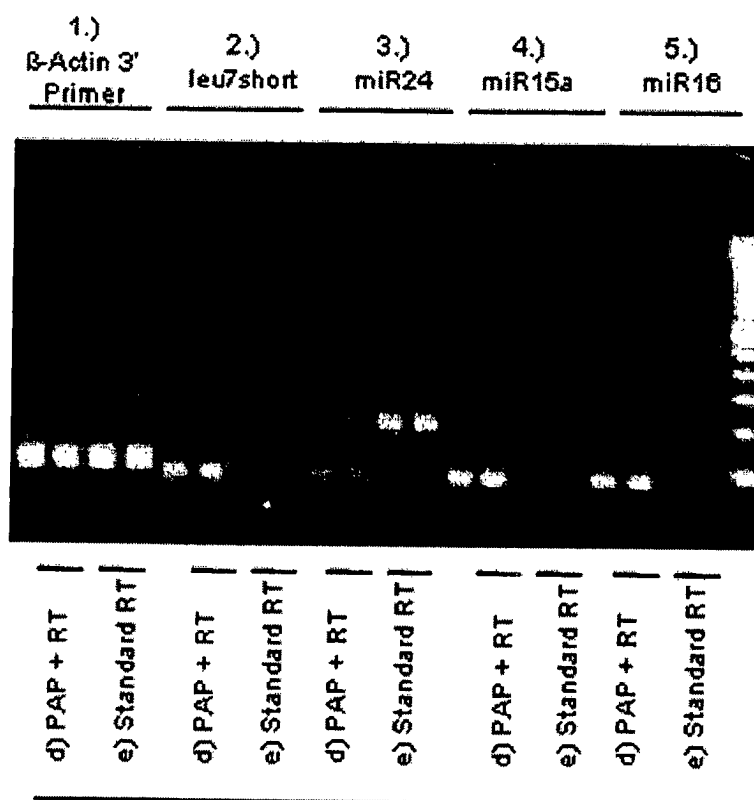


Abb. 3



293 RNA

Abb. 8

	PAP Puffer	RT Puffer	Standard RT
Reaktion: 1, 4, 7			
a) RNA 2,5 ng + mleu7a	22,62	19,69	kein Ct
b) RT Reaktion doppelt	24,30	19,76	kein Ct
Reaktion: 2, 5, 8			
a) RNA 2,5 ng	34,69	31,41	kein Ct
b) RT Reaktion doppelt	34,20	32,77	kein Ct
Reaktion 3, 6			
a) H2O in PAP/ RT	kein Ct	kein Ct	kein Ct
b) RT Reaktion doppelt	kein Ct	kein Ct	kein Ct

Abb . 4

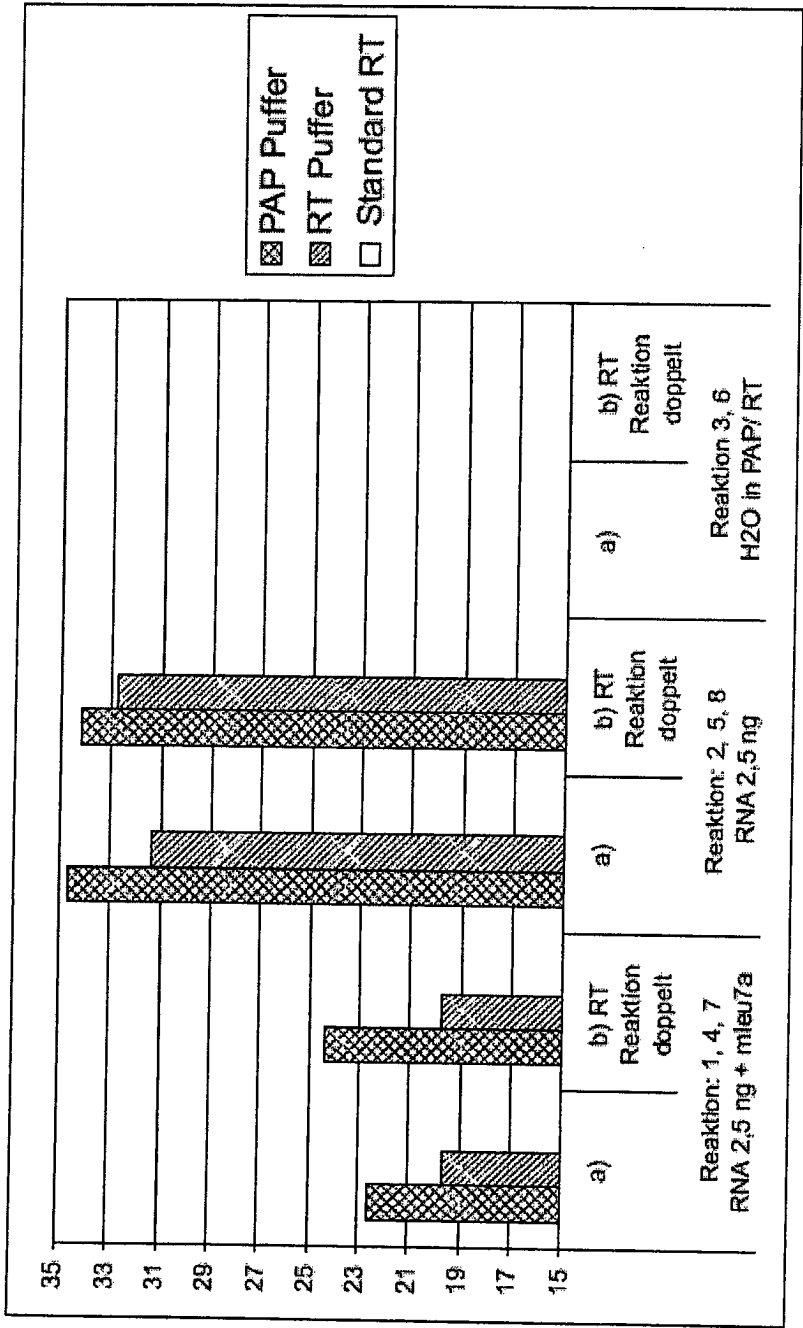


Abb . 5

	1.) $\beta$ -Actin 3' Primer	2.) leu7short	3.) miR24	4.) miR15a	5.) miR16
b) PAP + RT	23,16	25,30	28,47	25,90	23,83
e) Standard RT	22,75	kein Ct	30,95	39,81	38,78

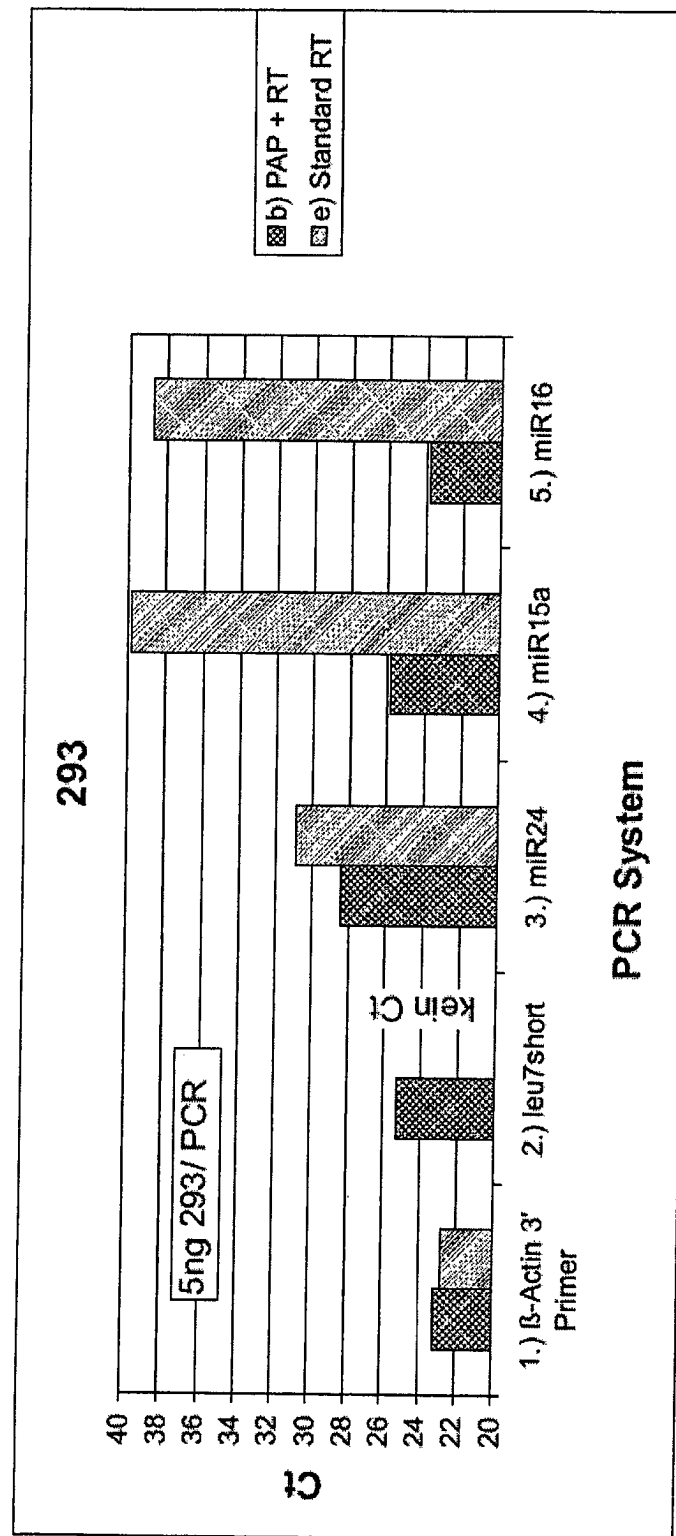


Abb. 6



HumUni + b) H <sub>2</sub> O PAP + RT d) H <sub>2</sub> O Standard RT H <sub>2</sub> O in PCR	1.) $\beta$ -Aktin 3' Primer	2.) leu7short	3.) miR24	4.) miR15a	5.) miR16
	kein Ct				
a) 293 PAP + RT b) H <sub>2</sub> O PAP + RT c) 293 Standard RT d) H <sub>2</sub> O Standard RT H <sub>2</sub> O in PCR	6.) Hum Uni	7.) leu7short	8.) miR24	9.) miR15a	10.) miR16
	kein Ct				

Abb. 7

PAP + RT Reaktion			
1.) 1 Std Inkubationszeit		2.) 15 min Inkubationszeit	
a) 2 U PAP Enzym	b) 0,5 U PAP Enzym	a) 2 U PAP Enzym	b) 0,5 U PAP Enzym
2x10 <sup>8</sup> Kopien mleu7a + Mais RNA 5ng		21,14	22,06
		22,70	24,82

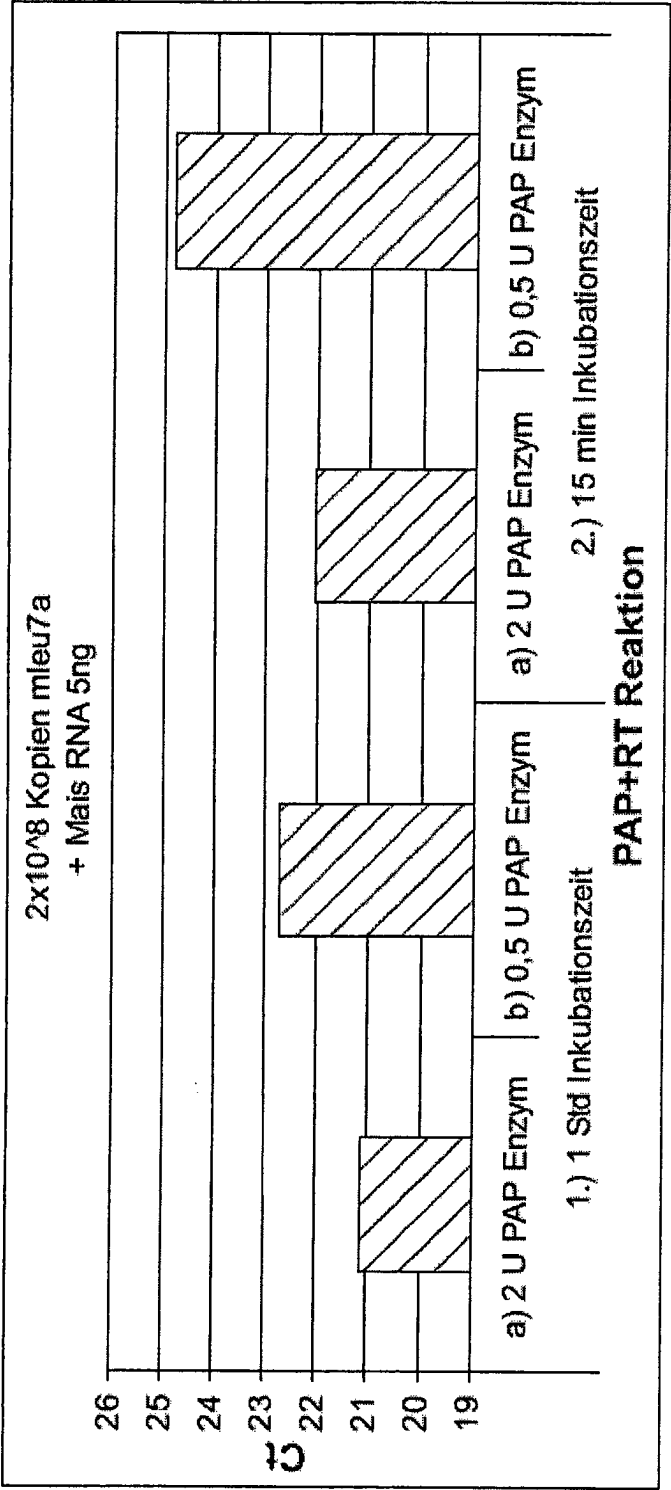


Abb. 9

	Reaktion	10x Buffer RT (Qiagen)	Reaktion	Puffer passend zu Enzym
AMV Reverse Transkriptase 24 U	1.)	19,95	6.)	20,23
SuperScript III Reverse Transkriptase 10 U	2.)	16,78	7.)	15,80
HIV Reverse Transkriptase 1 U	3.)	18,55	8.)	18,88
M-MuLV Reverse Transkriptase 10 U	4.)	17,28	9.)	14,86
Sensiscript Reverse Transkriptase	5.)	20,75		

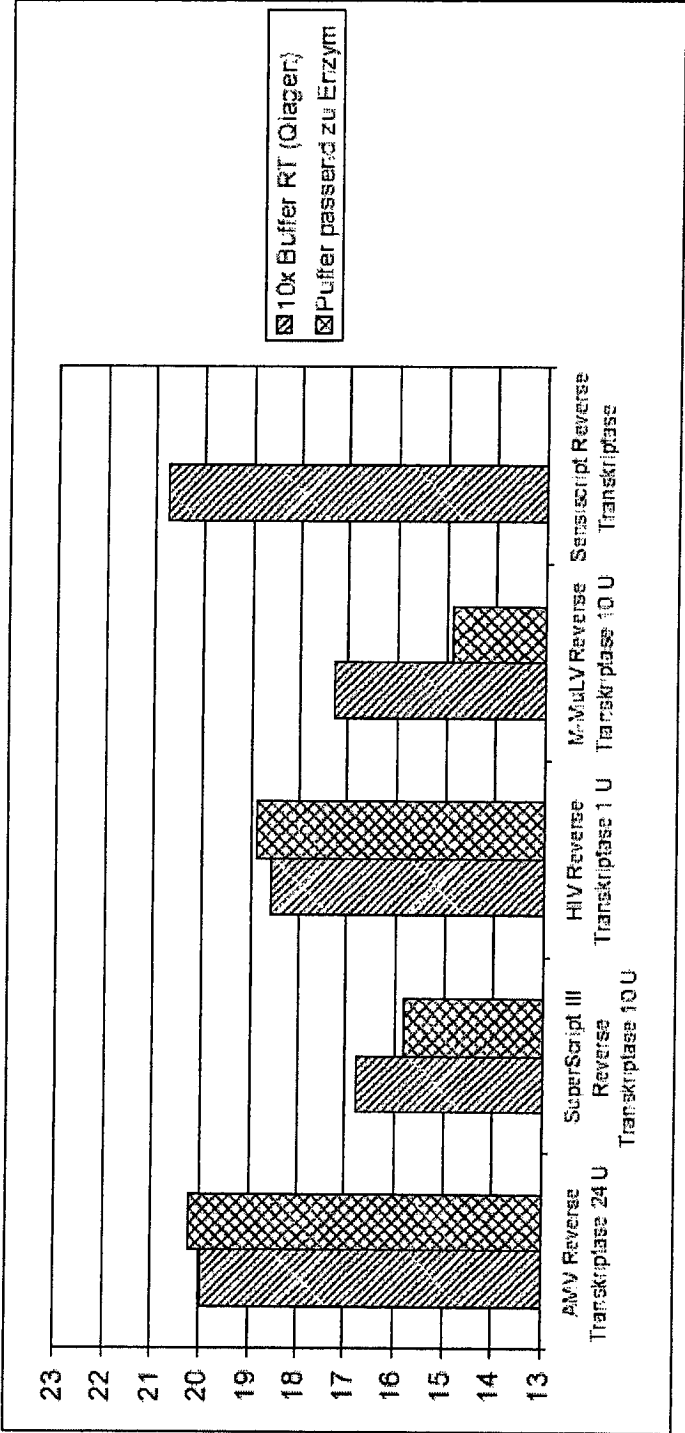


Abb. 10

Synthetische miRNA		
SEQ ID NO. 1	mleu7a RNA	5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'
RT (Tail) Primer		
SEQ ID NO. 2	Uni GAP dT	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
PCR Primer		
SEQ ID NO. 3	Hum Uni	5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'
SEQ ID NO. 4	Let 7short	5'-GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
SEQ ID NO. 5	hsa-miR-24	5'-TGG CTC AGT TCA GCA GGA-3'
SEQ ID NO. 6	hsa-miR-15a	5'-TAG CAG CAC ATA ATG GTT T-3'
SEQ ID NO. 7	hsa-miR-16	5'-TAG CAG CAC GTA AAT ATT G-3'
SEQ ID NO. 8	$\beta$ -Actin 3'	5'-GTA CAC TGA CTT GAG ACC AGT TGA ATA AA-3'
PCR Sonde		
SEQ ID NO. 9	Hum Uni	5'- HEX-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-BHQ-3' 5' Reporter Farbstoff: HEX 3' Quencher: Black Hole Quencher 1

Abb. 11

	5'-Ende (5' Tail)	Mitte: Poly (A, C, G oder T)	3'-Ende („priming nucleotides“)
Allgemeine Beschreibung	Abwesend, oder random, ca 1-100 nukleotide lang, bevorzugt mit Bindesequenz für ein Oligonucleotid, bzw. Gemische davon	Bevorzugt Poly (T); in aller Regel 15-50 Nukleotide lang, wenn Poly T dann bevorzugt 10-30 Nukleotid lang bzw. Gemische davon	Abwesend, oder bevorzugt VVN-3', VN-3' oder V-3', wobei V=A, C oder G bedeutet und N= A, C, G oder T bedeutet
Anker Oligonukleotid 1	N <sub>(n=14-34)</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VVN-3'
Anker Oligonukleotid 2	N <sub>(n=14-34)</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VN-3'
Anker Oligonukleotid 3	N <sub>(n=14-34)</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	V-3'
Anker Oligonukleotid 4	Bindesequenz für Oligonucleotid	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VVN-3
Anker Oligonukleotid 5	Bindesequenz für Oligonucleotid umfassend eine Restriktionsschnittstelle	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VVN-3'
Anker Oligonukleotid 6	N <sub>(n=14-34)</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VNN-3'
Anker Oligonukleotid 7 (Beispiel 1)	TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC (T) <sub>x</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VVN-3'
Anker Oligonukleotid 8 (Beispiel 2)	AACGAGACGACGACAGAC(T) <sub>x</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VN 3'
Anker Oligonukleotid 9 (Beispiel 3)	AACGAGACGACGACAGAC(T) <sub>x</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	V 3'
Anker Oligonukleotid	AACGAGACGACGACAGAC(T) <sub>x</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	N 3'

Abb. 12

10 (Beispiel 4)				
Anker Oligonukleotid 11 (Beispiel 5)	AACGAGACGACGACAGAC(T) <sub>x</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	NN 3'	
Anker Oligonukleotid 12 (Beispiel 6)	AACGAGACGACGACAGAC(T) <sub>x</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VNN 3'	
Anker Oligonukleotid 13 (Beispiel 7)	AACGAGACGACGACAGAC(T) <sub>x</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VNNN 3'	
Anker Oligonukleotid 14 (Beispiel 8)	AACGAGACGACGACAGAC(T) <sub>x</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	NNN 3'	
Anker Oligonukleotid 15 (Beispiel 9)	TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC(T) <sub>k</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VN 3'	
Anker Oligonukleotid 16 (Beispiel 10)	TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC(T) <sub>k</sub>	Poly (T) <sub>(n=10-30)</sub>	VNN 3'	

Abb. 12 (Teil 2)